CARLOS GONZALO ALVAREZ ROSARIO

**Avaliação da degradação bacteriana de cianeto usando cepas isoladas de
rejeito de mineração**

São Paulo
2017

CARLOS GONZALO ALVAREZ ROSARIO

**Avaliação da degradação bacteriana de cianeto usando cepas isoladas de
rejeito de mineração**

Tese apresentada à Escola Politécnica da
Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2017

CARLOS GONZALO ALVAREZ ROSARIO

**Avaliação da degradação bacteriana de cianeto usando cepas isoladas de
rejeito de mineração**

Tese apresentada à Escola Politécnica da
Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Engenharia
Química.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Alberto Soares
Tenório

Co-orientador: Prof. Dra. Denise Crocce
Romano Espinosa

São Paulo
2017

Este exemplar foi revisado e corrigido em relação à versão original, sob responsabilidade única do autor e com a anuência de seu orientador.

São Paulo, _____ de _____ de _____

Assinatura do autor: _____

Assinatura do orientador: _____

Catálogo-na-publicação

Rosario, Carlos Gonzalo Alvarez

Avaliação da degradação bacteriana de cianeto usando cepas isoladas de rejeito de mineração / C. G. A. Rosario -- versão corr. -- São Paulo, 2017.
130 p.

Tese (Doutorado) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo.
Departamento de Engenharia Química.

1.Cianeto 2.Degradação bacteriana 3.Bacillus pumilus 4.Bacillus licheniformis 5.Bacillus subtilis I.Universidade de São Paulo. Escola Politécnica. Departamento de Engenharia Química II.t.

À Sandra, é claro.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Ao meu orientador, o Prof. Dr. Jorge Alberto Soares Tenório, pela oportunidade de fazer parte deste grupo, pela orientação e pelas experiências vividas que contribuíram com meu crescimento profissional, muito obrigado.

À Prof. Dra. Denise Croce Romano Espinosa, pelo apoio e pela contribuição no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPq pela bolsa de estudos concedida, processo no. 141246/2015-4.

À minha esposa, Sandra, pelo amor, pela paciência e pela companhia nesta e nas outras etapas da minha vida.

Aos meus filhos Gabriela e Carlos Eduardo, duas pessoas maravilhosas que mesmo com pouca idade me entenderam e me apoiaram o tempo todo.

Aos meus pais, Gonzalo (*in memoriam*) e Jiorman, pela educação, pelos valores ensinados e pelos sacrifícios que fizeram por mim para que eu me tornasse a pessoa que sou.

Aos meus irmãos Alexander, Darledy, John e Jeimy, que apesar da distância sempre me acompanharam e me motivaram.

À Ana Carolina Fadel Dalsin, pela dedicação, profissionalismo e pela enorme paciência nos ensinamentos que contribuíram, não só para o desenvolvimento deste trabalho, como também para meu crescimento profissional.

À Monica Maria Jimenez pela amizade, pelos conselhos e principalmente por tudo o apoio emocional oferecido.

À Paula Aliprandini pela amizade construída nestes anos, pelas inúmeras contribuições e principalmente pelas palavras de apoio quando mais precisei.

Aos colegas do LAREX que se tornaram os meus amigos e com os quais sempre vou ser grato, em especial a Adriana Murcia, Amzy Vallenias, Daniella Buzzi, Débora Cabral, Eduardo Junca, Flávia Paulucci Cianga Silvas, Hugo Hashimoto, Isadora Dias

Perez, Jorge Luís Coleti, Marcos Paulo Kolher Caldas, Solange Utimura, Tatiana Scarazatto, Victor Bridi Telles e Viviane Tavares de Moraes.

Aos colegas e amigos de outros laboratórios, Santiago e Claudia da Universidade Ricardo Palma, Bruno e Marcela do CEPEMA, Maria Anita, Lidiane e Meriellen do DEMPSTER.

À Universidade de São Paulo e ao Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica.

A todos que, direta e indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

“É preciso que eu suporte duas ou três larvas
se quiser conhecer as borboletas”
Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO

O cianeto é um composto tóxico, que pode ser encontrado no ambiente de maneira natural ou como resultado de atividades antropogênicas tais como a mineração de ouro e a indústria da galvanoplastia. Dentre as diferentes espécies do composto, o cianeto de hidrogênio (HCN) é considerado o mais tóxico, mesmo concentrações de 100ppm são letais para os seres humanos. Para a degradação destes compostos de cianeto a compostos menos tóxicos existem diferentes métodos de tratamento que podem ser químicos, físicos ou biológicos. O presente trabalho estudou a capacidade de degradação bacteriana de cianeto com cepas nativas isoladas de rejeito de mineração de ouro. Para isto, foram escolhidas três cepas dentro de um grupo de vinte cepas isoladas previamente. As cepas foram identificadas mediante as técnicas de MALDI-TOF e sequenciamento do gene 16s. Posteriormente realizou-se o processo de ativação e crescimento bacteriano no qual foram determinados os parâmetros de crescimento para cada uma das cepas, tais como pH, agitação, temperatura e meio de cultura. Após a etapa de ativação bacteriana, realizou-se a adaptação das três cepas em ambientes alcalinos. Nesta etapa, foram feitos ensaios em frascos agitados e avaliou-se o crescimento celular em função da formação de células viáveis para diferentes condições de pH (7; 8; 9, 10 e 11). Com as cepas adaptadas ao pH 10 foram realizados ensaios de degradação bacteriana de cianeto em frascos agitados contendo 100mL de solução sintética de cianeto de potássio e 0,2mL de inóculo bacteriano. A concentração da solução de cianeto foi de 500mgL⁻¹ e o pH de 10. Foram avaliadas três condições de temperatura (37, 32 e 27°C). Durante os ensaios foi estudado o crescimento bacteriano, o comportamento do pH e a degradação de cianeto. A quantificação do cianeto livre foi determinada pelo método polarográfico com eletrodo de mercúrio. Através dos resultados obtidos, foi possível identificar que as três cepas isoladas pertencem às espécies *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis*. As cepas bacterianas apresentaram maior produção celular quando cultivadas em meio L.B a pH 7, velocidade de rotação de 190rpm e 37°C de temperatura. A máxima faixa de adaptação a ambientes alcalinos aconteceu em valores de pH 10. As melhores taxas de degradação de cianeto para a cepa *B. subtilis* e *B. pumilus* ocorreram em temperatura de 27°C e 65rpm, conseguindo degradar 100% do cianeto. A cepa *B. licheniformis* apresentou a melhor taxa de degradação de cianeto em temperatura de 32°C e 190rpm obtendo 99,5% de degradação. Através dos resultados obtidos no presente trabalho, foi possível avaliar o potencial de degradação de cianeto para as bactérias *B. pumilus*, *B. licheniformis* e *B. subtilis* as quais podem ser utilizadas como alternativa de tratamento em efluentes contaminados com cianeto.

Palavras-chave: Cianeto. Biodegradação. *Bacillus pumilus*. *Bacillus licheniformis*. *Bacillus subtilis*.

ABSTRAC

Cyanide is a highly toxic compound that can be naturally found in the environment or as a result of anthropogenic activities such as gold mining and electroplating industry. Among the different species of the compound, hydrogen cyanide (HCN) is considered the most toxic, even concentrations of 100 ppm are lethal to humans. Degradation of this cyanide compound to less toxic compounds can be carried out through different methods such as chemical, physical and biological treatments. The present work investigated the bacterial degradation capacity of cyanide by isolated native strains from gold mining tailings. Three strains were selected from a group of twenty previously isolated strains which were identified using MALDI-TOF and 16s gene sequencing techniques. The bacterial activation and cellular growth were performed to determine the growth parameters for the strains, such as pH, temperature, rotation speed and culture medium. After the activation, the strains were adapted to grow in alkaline environments. During this phase, cellular growth was carried out in agitated flask at different pHs (7, 8, 9, 10 and 11). The adapted strains were used to perform cyanide degradation tests at pH 10 in agitated flask by using 100mL of a synthetic solution. The solution was composed of 500 ppm of potassium cyanide and 0,2mL of bacterial inoculum. During the experiments, three temperatures were evaluated (37, 32 and 27 °C). Bacterial growth, cyanide degradation and pH behaviour were studied. Free cyanide quantification was determined by polarographic method with a mercury electrode. It was found that the three isolated strains belong to *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* groups. The highest bacterial growth was observed when the strains were cultivated in a L.B media at pH 7,0, 37°C by using 190 rpm of rotation velocity. The maximum range of adaptation to alkaline environments occurred in pH values of 10. The best cyanide degradation rate (100%) were achieved at 27°C for the strain *B. subtilis* and *B. pumilus*. The strain *B. licheniformis* showed the best cyanide degradation rate (99,5%) at 37°C. The results obtained in the present work were able to evaluate the potential of cyanide degradation for the bacteria *B. pumilus*, *B. licheniformis* and *B. subtilis*. These results can be used as an alternative to treat wastewaters that are polluted with cyanide.

Keywords: Cyanide. Biodegradation. *Bacillus pumilus*. *Bacillus licheniformis*. *Bacillus Subtilis*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de especiação para o cianeto livre em função do pH (MUDDER; BOTZ; SMITH, 1991).	24
Figura 2. Diagrama Eh-pH para o sistema CN-H ₂ O a 25°C.	27
Figura 3. Rotas metabólicas para a degradação do cianeto. Adaptada (GUPTA; BALOMAJUMDER; AGARWAL, 2010)	41
Figura 4. Compostos de cianeto presentes em soluções e efluentes industriais, adaptado (MUDDER; BOTZ; SMITH, 1991).	45
Figura 5. Etapas realizadas no estudo de degradação bacteriana do cianeto.	49
Figura 6. Etapas realizadas para a ativação das cepas.	51
Figura 7. Esquema ilustrativo de preparação de amostras para identificação no MALDI-TOF, adaptado (CLARK et al., 2013).	55
Figura 8. Etapas utilizadas na adaptação bacteriana a pH alcalino.	59
Figura 9. Esquema da célula eletroquímica utilizada no Computrace Control VA 797 (MACHADO, 2017).	63
Figura 10. Imagem de cultivo em meio L.B sólido para as cepas isoladas: a) cepa 8; b) cepa 12; c) cepa 17.	65
Figura 11. Imagem de microscópio óptico para a cepa 8.	66
Figura 12. Imagem de microscópio óptico da Coloração de Gram para a cepa 8.	67
Figura 13. Imagem de microscópio óptico da Cepa 12.	67
Figura 14. Imagem de microscópio óptico Coloração de Gram para a Cepa 12.	68
Figura 15. Imagem de microscópio óptico da Cepa 17.	68
Figura 16. Imagem de microscópio óptico Coloração de Gram para a Cepa 17.	69
Figura 17. Espectro de proteínas obtido pela técnica de MALDI-TOF para a cepa número 8.	69
Figura 18. Espectro de proteínas obtido pela técnica de MALDI-TOF para a cepa número 12.	70
Figura 19. Espectro de proteínas obtido pela técnica de MALDI-TOF para a cepa número 17.	70
Figura 20. Crescimento celular com medida de densidade óptica para as cepas: a) <i>Bacillus pumilus</i> . b) <i>Bacillus licheniformis</i> . c) <i>Bacillus subtilis</i>	78
Figura 21. Comparação da densidade óptica para as três bactérias.	79

Figura 22. Fases do crescimento bacteriano. (1) fase lag; (2) fase de aceleração; (3) fase exponencial; (4) fase de desaceleração; (5) fase estacionária e (6) fase de declínio (LOPES, SÔNIA GODOY BUENO CARVALHO; BRANDIMARTE, ANA LUCIA; HO, FANLY FUNGYI CHOW; LAHR, 2014)	80
Figura 23. Velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) para as cepas: a) <i>Bacillus pumilus</i> . b) <i>Bacillus licheniformis</i> . c) <i>Bacillus subtilis</i>	82
Figura 24. Curvas de crescimento em função da massa seca: a) <i>Bacillus pumilus</i> . b) <i>Bacillus licheniformis</i> . c) <i>Bacillus subtilis</i>	84
Figura 25. Produção de biomassa para as três cepas bacterianas.	85
Figura 26. Correlação da densidade óptica (OD ₆₀₀) com a massa seca para as bactérias: a) <i>B. pumilus</i> ; b) <i>B. licheniformis</i> e c) <i>B. subtilis</i>	87
Figura 27. Crescimento bacteriano em pH 8.0 das cepas a) <i>B. pumilus</i> , b) <i>B. licheniformis</i> e c) <i>B. subtilis</i>	90
Figura 28. Crescimento bacteriano em pH 9 das cepas a) <i>B. pumilus</i> , b) <i>B. licheniformis</i> e c) <i>B. subtilis</i>	92
Figura 29. Crescimento bacteriano em pH 10 das cepas a) <i>B. pumilus</i> , b) <i>B. licheniformis</i> e c) <i>B. subtilis</i>	94
Figura 30. Diagrama de predominância para o cianeto de potássio em água, KCN – H ₂ O temperatura de 25°C.	96
Figura 31. Degradação de cianeto para <i>B. pumilus</i> a temperatura de 37°C e velocidade de rotação de 190 e 65rpm.	97
Figura 32. Porcentagem de degradação de cianeto para <i>B. pumilus</i> a 37°C e velocidade de rotação e 190 e 65rpm.	98
Figura 33. Degradação de cianeto para <i>B. pumilus</i> a temperatura de 32°C e velocidade de rotação de 190 e 65rpm	99
Figura 34. Porcentagem de degradação de cianeto para <i>B. pumilus</i> a 32°C e velocidade de rotação e 190 e 65rpm.	100
Figura 35. Degradação de cianeto para <i>B. pumilus</i> a temperatura de 27°C e velocidade de rotação de 190 e 65rpm.	101
Figura 36. Porcentagem de degradação de cianeto para <i>B. pumilus</i> a 27°C e velocidade de rotação e 190 e 65rpm.	102
Figura 37. Degradação de cianeto para <i>B. licheniformis</i> a temperatura de 37°C e velocidade de rotação de 190 e 65rpm.	104

Figura 38. Porcentagem de degradação de cianeto para <i>B. licheniformis</i> a 37°C e velocidade de rotação e 190 e 65rpm.	105
Figura 39. Degradação de cianeto para <i>B. licheniformis</i> a temperatura de 32°C e velocidade de rotação de 190 e 65rpm.	106
Figura 40. Porcentagem de degradação de cianeto para <i>B. licheniformis</i> a 32°C e velocidade de rotação e 190 e 65rpm.	107
Figura 41. Degradação de cianeto para <i>B. licheniformis</i> a 27°C e velocidade de rotação de 190 e 65rpm.	108
Figura 42. Porcentagem de degradação de cianeto para <i>B. licheniformis</i> a 27°C e velocidade de rotação e 190 e 65rpm.	109
Figura 43. Degradação de cianeto para <i>B. subtilis</i> a temperatura de 37°C e velocidade de rotação de 190 e 65rpm.	110
Figura 44. Porcentagem de degradação de cianeto para <i>B. subtilis</i> a 37°C e velocidade de rotação e 190 e 65rpm.	111
Figura 45. Degradação de cianeto para <i>B. subtilis</i> a temperatura de 32°C e velocidade de rotação de 190 e 65rpm.	112
Figura 46. Porcentagem de degradação de cianeto para <i>B. subtilis</i> a 32°C e velocidade de rotação e 190 e 65rpm.	113
Figura 47. Degradação de cianeto para <i>B. subtilis</i> a temperatura de 27°C e velocidade de rotação de 190 e 65rpm.	114
Figura 48. Porcentagem de degradação de cianeto para <i>B. subtilis</i> a 27°C e velocidade de rotação e 190 e 65rpm.	114
Figura 49. Degradação de cianeto a 190rpm utilizando 37°C, 32°C e 27°C de temperatura para as cepas: a) <i>B. pumilus</i> , b) <i>B. licheniformis</i> e c) <i>B. subtilis</i>	117
Figura 50. Degradação de cianeto a 27°C utilizando 65 e 190rpm para as cepas: a) <i>B. pumilus</i> , b) <i>B. licheniformis</i> e c) <i>B. subtilis</i>	119
Figura 51. Degradação de cianeto para as melhores condições das bactérias <i>B. pumilus</i> , <i>B. licheniformis</i> e <i>B. subtilis</i>	120
Figura 52. Degradação de cianeto para os controles abióticos nas diferentes condições de trabalho em pH 10.	121
Figura 53. Diagrama de especiação para o cianeto de potássio concentração 50mM.	122

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentrações de cianeto em algumas plantas. Adaptado (LOGSDON; HAGELSTEIN; MUDDER, 2001).....	20
Tabela 2. Principais processos industriais que geram efluentes cianídricos. Adaptado (TENDULKAR, S.R.; AGNIHOTRI, 1992).....	21
Tabela 3. Classificação das espécies de cianeto com base na estabilidade. Adaptado de (MUDDER; BOTZ; SMITH, 1991).	22
Tabela 4. Padrões e valores máximos de cianeto em águas, adaptado (CETESB, 2014).	31
Tabela 5. Comparação de estudos de remoção bacteriana de cianeto.	39
Tabela 6. Principais métodos analíticos para determinação de cianeto (SCHNEIDER, 2009)	47
Tabela 7. Composição do meio de cultura LB (Luria Bertani).	50
Tabela 8. Intervalos de tempo e volumes das amostras para o cálculo da determinação celular.	52
Tabela 9. Meios de cultura empregados na adaptação das bactérias ao pH.	58
Tabela 10. Condições de trabalho para os ensaios de degradação de cianeto.	62
Tabela 11. Parâmetros utilizados na obtenção dos polarogramas para a determinação de cianeto livre em solução utilizando o Computrace Control VA 797 (METROHM, 2017).	64
Tabela 12. Resultados da identificação das cepas isoladas pela técnica de MALDI-TOF.	71
Tabela 13. Resumo da identificação das cepas pela técnica de MALDI-TOF.....	72
Tabela 14. Sequências obtidas para as cepas 8,12 e 17.	73
Tabela 15. Identificação da cepa 8 pela técnica de sequenciamento 16s.....	74
Tabela 16. Identificação da cepa 12 pela técnica de sequenciamento 16s.....	74
Tabela 17. Identificação da cepa 17 pela técnica de sequenciamento 16s.....	75
Tabela 18. Comparação dos resultados obtidos na identificação das cepas.	75
Tabela 19. Resumo dos dados de crescimento bacteriano.....	86
Tabela 20. Resumo dos resultados de correlação entre OD ₆₀₀ e massa seca.....	88
Tabela 21. Resumo dos resultados de degradação de cianeto para a bactéria <i>Bacillus pumilus</i>	103

Tabela 22. Resumo dos resultados da degradação de cianeto para a bactéria <i>Bacillus licheniformis</i>	109
Tabela 23. Resumo dos resultados de degradação de cianeto para a bactéria <i>Bacillus subtilis</i>	115

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	12
SUMÁRIO.....	14
1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 Aspectos gerais do cianeto	20
2.2 Química do cianeto	22
2.2.1 Cianeto livre.....	23
2.2.2 Compostos de cianeto simples	25
2.2.3 Complexos ciano-metálicos	26
2.2.4 Outros compostos derivados do cianeto:.....	26
2.3 Toxicidade do cianeto e exposição humana	28
2.4 Marco legal.....	30
2.5 Tratamentos de resíduos contendo cianeto	31
2.5.1 Degradação natural	32
2.5.2 Processos de tratamento químico	33
2.5.3 Degradação biológica de cianeto.....	37
2.6 Rotas de degradação biológica do cianeto	40
2.6.1 Rotas de hidrólise	41
2.6.2 Rota oxidativa	43
2.6.3 Rotas redutoras	44
2.6.4 Rotas de substituição / adição	44
2.7 Determinação da concentração de cianeto	45
3 OBJETIVO	48
4 MATERIAIS E MÉTODOS	49
4.1 Ativação das cepas	50
4.2 Determinação da concentração celular	52
4.2.1 Densidade Óptica	52
4.2.2 Massa seca	53
4.3 Identificação das cepas	54
4.3.1 Espectrometria de massas MALDI-TOF	54

4.3.2	Sequenciamento do gene 16s	56
4.4	Adaptação bacteriana	57
4.5	Biodegradação de cianeto.....	60
4.5.1	Soluções para ensaio de biodegradação de cianeto	60
4.5.2	Metodologia dos ensaios	61
4.5.3	Determinação do cianeto livre	62
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
5.1	Identificação dos microrganismos	65
5.1.1	Cepa número 8	66
5.1.2	Cepa número 12.....	67
5.1.3	Cepa número 17	68
5.1.4	Identificação por espectrometria de massas MALDI-TOF	69
5.1.5	Sequenciamento do gene 16s - RNA	72
5.2	Análise da biomassa	76
5.2.1	Velocidade de crescimento.....	81
5.2.2	Massa seca	83
5.2.3	Curva de massa seca correlacionada com absorbância	86
5.3	Ensaio de adaptação a ambiente alcalino	88
5.3.1	Crescimento em pH 8.0	88
5.3.2	Crescimento em pH 9.....	90
5.3.3	Crescimento em pH 10.....	93
5.4	Estudo de degradação bacteriana de cianeto	95
5.4.2	Influência da temperatura	116
5.4.3	Influência da velocidade de rotação	118
5.4.4	Degradação de cianeto para o controle abiótico	120
6	CONCLUSÕES.....	123
	REFERÊNCIAS.....	124

1 INTRODUÇÃO

O cianeto é um composto químico que pode ser produzido de maneira natural no meio ambiente por diversos organismos, incluindo plantas, fungos, algas e bactérias (LUQUE-ALMAGRO et al., 2005; POULTON, 1990). Além da produção natural, o cianeto também pode ser encontrado no ambiente como resultado de atividades antropogênicas que envolvem processos de galvanoplastia, produção de fibras sintéticas, processamento de carvão, processamento de mandioca e extração de ouro e prata (HUERTAS et al., 2010; MUDDER; BOTZ, 2004).

Nos processos de mineração, o método de lixiviação com cianeto é o mais usado na atualidade para a extração de ouro. A lixiviação com cianeto é considerada um método eficiente e rentável para extração de metais principalmente em minérios com baixo teor. Nos Estados Unidos, 90% da extração de ouro usa lixiviação com cianeto (MINERAL POLICY CENTER, 2000).

Os processos de extração de ouro e a galvanoplastia utilizam aproximadamente 20% do cianeto total produzido e são responsáveis pela produção de efluentes e resíduos sólidos contaminados com cianeto (AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ATSDR), 2006; MINERAL POLICY CENTER, 2000). As principais espécies químicas de cianeto presentes nestes resíduos incluem complexos metálicos que ao se degradar permitem a formação de cianeto livre (MUDDER; BOTZ, 2004). O cianeto livre contém as espécies aniônicas (CN^-) e ácido cianídrico ou cianeto de hidrogênio (HCN) (GHOSH; DZOMBAK; WONG-CHONG, 2006).

Dentre as espécies de cianeto, a forma mais perigosa é o cianeto de hidrogênio, enquanto que complexos metálicos formados a partir do ânion cianeto são relativamente menos tóxicos (GURBUZ; CIFTCI; AKCIL, 2009).

O cianeto é um composto altamente tóxico, que pode ser letal para a maioria dos seres vivos. O cianeto inativa o metabolismo oxidativo celular, atuando como inibidor das enzimas que participam na cadeia respiratória a nível mitocondrial, especificamente do citocromo-c oxidase. O grau de toxicidade do cianeto depende da espécie química em que se encontre (GENSEMER et al., 2006).

Os vazamentos acidentais de efluentes contendo cianeto, em rios e cursos d'água, têm produzido diversos problemas de contaminação ambiental,

destacando-se o acidente acontecido no ano 2000, na Romênia, no qual um vazamento de cerca de 100.000m³ de efluentes contaminados com cianeto foram descarregados no rio Tisza, importante afluente do Rio Danúbio, causando a morte de peixes e o envenenamento do ecossistema ao longo de 100km do curso dos rios Tisza e Danúbio (DUTRA et al., 2002).

Diversos processos físicos, químicos e biológicos são empregados para a degradação do cianeto a compostos menos tóxicos. Na atualidade existem diversas tecnologias de oxidação química usadas para a destruição do cianeto, entre as quais se destacam os processos oxidativos com peróxido de hidrogênio, dióxido de enxofre e a cloração alcalina (MUDDER; BOTZ, 2004).

A degradação bacteriana de cianeto tem se mostrado como um processo viável no tratamento de efluentes cianídricos. O tratamento destes efluentes através de microrganismos apresenta vantagens econômicas comparadas aos métodos convencionais. As técnicas de biorremediação utilizam o potencial metabólico dos microrganismos como principal catalisador das reações (WONG-CHONG, 2006).

As principais rotas bioquímicas de degradação de cianeto podem ser agrupadas em quatro categorias: rotas hidrolíticas, redutivas, oxidativas e de substituição ou adição. Cada rota bioquímica engloba diferentes enzimas, as quais permitem a degradação do cianeto para compostos menos tóxicos como o caso do cianato que, posteriormente, é convertido em amônia e dióxido de carbono (KNOWLES, 1976).

Alguns estudos em laboratório têm sido realizados para avaliar a degradação bacteriana de cianeto em efluentes contaminados (KANDASAMY et al., 2015; RAZANAMAHANDRY et al., 2016; WU et al., 2014), sendo que os principais microrganismos estudados pertencem aos gêneros *Bacillus sp.* (FOOLADI et al., 2016; MEKUTO et al., 2013; WU et al., 2014) e *Pseudomonas* (HUERTAS et al., 2010; LUQUE, 2005; NWOKORO; DIBUA, 2014; WATANABE et al., 1998). No Brasil, o tratamento de efluentes cianídricos com uso de microrganismos ainda é pouco estudado. Até o momento da presente pesquisa, existem poucos trabalhos que abordam a degradação bacteriana do cianeto a partir de bactérias.

Tendo em vista que a utilização de microrganismos representa uma vantagem no tratamento de efluentes contaminados com cianeto, e a fim de minimizar o impacto ambiental causado com estes efluentes, o presente trabalho tem por objetivo avaliar o potencial de degradação de cianeto de três microrganismos isolados

de rejeitos de mineração de ouro. Além disso, propor uma alternativa de tratamento biológico que consiste na degradação de compostos de cianeto por bactérias nativas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aspectos gerais do cianeto

Os cianetos são substâncias químicas que podem ser encontrados na natureza em diversas plantas e alimentos tais como amêndoas, caroços de damasco, espinafre e algumas variedades de mandioca (DZOMBAK; GHOSH; WONG-CHONG, 2006). Também podem ser produzidos por algumas bactérias, algas e fungos. Estima-se que existem aproximadamente duas mil fontes naturais de cianeto, incluindo algas, fungos, bactérias, insetos e plantas (KENT R. OLSON, 2014). Na Tabela 1 pode-se observar a concentração de cianeto presente em algumas plantas e alimentos.

Tabela 1. Concentrações de cianeto em algumas plantas. Adaptado (LOGSDON; HAGELSTEIN; MUDDER, 2001).

Espécies de plantas	Concentração (mg/kg)
Mandioca (variedades doces)	
a) Folhas	377 - 500
b) Raízes	138
c) Raízes dessecadas	46 - 100
d) Purê	81
Bambu	Máx. 8.000
Feijão Branco	2.100
Amêndoa Amarga	280-2.500
Sorgo	Máx. 2.500

Além dos processos naturais, o cianeto também pode ser introduzido ao meio ambiente como resultado de atividades antropogênicas que incluem processos de produção de plásticos, desenvolvimento fotográfico, processamento de metais, galvanoplastia, manufatura de produtos químicos orgânicos, produção de pesticidas e mineração do ouro e da prata (LOGSDON; HAGELSTEIN; MUDDER, 2001; SERVICES, 2006).

O cianeto é um dos principais compostos utilizados na indústria química, pois reage facilmente com outras substâncias. Na produção de nitrilo, nylon e plásticos acrílicos são utilizados anualmente aproximadamente um milhão de toneladas de cianeto, o equivalente a 80% da produção total de cianeto. Os 20% restante da produção de cianeto são destinados para a fabricação de cianeto de sódio, sendo que

18% deste cianeto são utilizados na mineração, principalmente na recuperação de ouro (MUDDER; BOTZ, 2004). A Tabela 2 mostra os principais processos industriais que envolvem a geração de efluentes cianídricos e as espécies produzidas.

Tabela 2. Principais processos industriais que geram efluentes cianídricos. Adaptado (TENDULKAR, S.R.; AGNIHOTRI, 1992).

Processo Industrial	Principais Espécies presentes
Metalurgia Extrativa de metais preciosos (Ag, Au)	Cianeto livre, complexos cianeto-metálicos de Fe (II), Cu, Zn, Cd, Ni, Cr, Pb.
Indústria de galvanoplastia	Cianeto livre, complexos ciano-metálicos de Fe (II), Cu, Zn, Cd, Ni, Cr, Pb.
Indústria Siderúrgica	Cianeto Livre
Processos de produção de energia termoelétrica durante a pirolise de carvão.	Cianeto livre
Produção de acrilonitrila	Cianeto livre
Indústria fotoquímica	Cianeto livre, ferrocianetos.
Indústria farmacêutica	Cianeto livre, cianetos orgânicos.
Indústria petroquímica	Cianeto livre

Desde a sua introdução comercial na Nova Zelândia cerca de um século atrás, o cianeto tem sido utilizado a nível industrial na extração da prata e ouro, principalmente em minérios de baixo teor. Suas excelentes propriedades como agente lixiviante o tornaram uma excelente opção nos processos hidrometalúrgicos de recuperação de ouro (MUDDER; BOTZ, 2004).

O cianeto é um ânion tóxico que prejudica os ecossistemas naturais e pode estar presente no ar, na água e nos solos. No solo o cianeto pode ser removido através de processos naturais de microrganismos que o degradam para compostos menos tóxicos. Na água a maior parte do cianeto é volatilizado na forma de cianeto de hidrogênio (SERVICES, 2006).

Os seres humanos podem sofrer contaminação de cianeto através da exposição por inalação, ingestão ou absorção pela pele. Em altas concentrações o cianeto é uma sustância tóxica que pode causar dificuldades respiratórias, alterações sanguíneas, dor de cabeça e em alguns casos leva à morte (EISLER, 2000).

2.2 Química do cianeto

O termo cianeto é usado para definir os compostos químicos que contêm o ânion cianeto (CN^-), o qual se caracteriza pela presença de um átomo de carbono ligado a um átomo de nitrogênio por um triplo enlace covalente ($\text{C}\equiv\text{N}^-$) (COLLINS et al., 2006; SERVICES, 2006).

Em geral, o cianeto é encontrado ligado a outros elementos químicos para a formação de compostos (AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ATSDR), 2006). As formas mais comuns encontradas no ambiente são o cianeto de hidrogênio ($\text{H-C}\equiv\text{N}$) e os sais cianeto de sódio (NaCN) e cianeto de potássio (KCN). O cianeto de sódio e de potássio são sólidos brancos, enquanto que o cianeto de hidrogênio é um gás incolor com odor fraco e amargo, similar ao de amêndoas (SERVICES, 2006). A Tabela 3 apresenta uma variedade de espécies em que o cianeto pode ser encontrado e a classificação a que pertencem em função da estabilidade.

Tabela 3. Classificação das espécies de cianeto com base na estabilidade.
Adaptado de (MUDDER; BOTZ; SMITH, 1991).

Classificação	Espécies
Cianeto livre	HCN , CN^-
Compostos simples	
a) relativamente solúveis	NaCN , KCN , $\text{Ca}(\text{CN})_2$, $\text{Hg}(\text{CN})_2$
b) relativamente insolúveis	$\text{Zn}(\text{CN})_2$, $\text{Cd}(\text{CN})_2$, CuCN , $\text{Ni}(\text{CN})_2$, AgCN
Complexos fracos	$\text{Zn}(\text{CN})_4^{2-}$, $\text{Cd}(\text{CN})_3^-$, $\text{Cd}(\text{CN})_4^{2-}$
Complexos moderadamente estáveis	$\text{Cu}(\text{CN})_2^-$, $\text{Cu}(\text{CN})_3^{2-}$ $\text{Ni}(\text{CN})_2^{2-}$, $\text{Ag}(\text{CN})_2^-$
Complexos fortes	$\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$, $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$, $\text{Co}(\text{CN})_6^{4-}$, $\text{Au}(\text{CN})_2^-$

Nos processos de cianetação são formados compostos de estabilidade variável. A estabilidade desses compostos está associada à força relativa com que esses metais se encontram ligados ao cianeto. Os compostos de cianeto podem ser classificados conforme sua estabilidade química nas seguintes espécies: cianeto livre, compostos simples, complexos fracos, complexos moderadamente estáveis e

complexos estáveis como pode ser observado na Tabela 3 (MUDDER; BOTZ; SMITH, 1991). Esses compostos apresentam diferentes graus de toxicidade, sendo os mais estáveis os menos tóxicos ao meio ambiente (SOBRAL; GRANATO, 1990).

2.2.1 *Cianeto livre*

O cianeto livre é o termo dado para descrever as formas de cianeto molecular e iônica presente em solução aquosa como resultado da dissolução ou dissociação de compostos de cianeto. O cianeto livre compreende a presença de duas espécies, sendo elas o íon cianeto (CN^-) e o cianeto de hidrogênio, também conhecido como ácido cianídrico (HCN) (MUDDER; BOTZ; SMITH, 1991).

Essas duas espécies de cianeto livre são consideradas as mais tóxicas dentre os compostos de cianeto, sendo o ácido cianídrico o mais perigoso. O ácido cianídrico não permanece dissolvido em sistemas naturais aquosos. Em geral, o pH dessas águas varia entre 5 e 8, de modo que a tendência da maioria do cianeto é volatilizar e ficar disperso no ar (EISLER, 2000).

Os íons cianeto podem ser protonados na água formando HCN de acordo com a reação apresentada na Equação 1.

O ácido cianídrico é um ácido relativamente fraco e incolor, sua dissociação em solução aquosa é incompleta. Este ácido é altamente tóxico e volátil, sua reação é expressa através da Equação 2.

As quantidades relativas de cada uma destas espécies podem ser calculadas pela Equação 3.

$$K = \frac{[\text{H}^+][\text{CN}^-]}{[\text{HCN}]} \quad \text{Equação 3}$$

A proporção relativa de cada uma dessas espécies varia em função do pH do sistema. Na Figura 1 é apresentado o diagrama de especiação em função do pH para o cianeto livre a 25°C (MUDDER; BOTZ; SMITH, 1991).

Figura 1. Diagrama de especiação para o cianeto livre em função do pH (MUDDER; BOTZ; SMITH, 1991).

É possível observar que em valores de pH menores que 8 predomina a formação de cianeto de hidrogênio, ou seja, 90% do cianeto livre se encontra na forma de HCN (MUDDER; BOTZ; SMITH, 1991). Quando o pH se encontra acima de 10,5 a maior parte do cianeto livre se encontra presente como íon CN^- . Dessa maneira, em valores de pH acima de 10,5 o teor de HCN é baixo evitando, assim, a volatilização do ácido cianídrico (LOGSDON; HAGELSTEIN; MUDDER, 2001).

Em condições normais de temperatura e pressão as concentrações de CN^- e HCN são iguais em pH 9,4. Nos processos de extração de ouro as soluções com cianeto permanecem em valores de pH entre 10 e 10,5 a fim de impedir a volatilização,

eliminando perdas de cianeto no sistema e ao mesmo tempo reduzindo o risco de inalação por parte dos trabalhadores (MUDDER; BOTZ; SMITH, 1991).

2.2.2 Compostos de cianeto simples

Os compostos de cianeto simples podem ser definidos como os sais que se dissolvem em solução aquosa produzindo cátions livres e ânions de cianeto. Os compostos de cianeto simples são formados pelos sais alcalinos que se dissolvem completamente em solução aquosa, como exemplificado nas Equação 4 e 5. Estes compostos incluem o cianeto de sódio (NaCN), o cianeto de cálcio $\text{Ca}(\text{CN})_2$ e o cianeto de potássio (KCN) (MUDDER; BOTZ; SMITH, 1991).

Os compostos de cianeto simples são representados pela fórmula $\text{A}(\text{CN})_x$ onde (A) representa um álcali ou um metal, com sua respectiva valência (x) que por sua vez representa o número de grupos ciano presentes na molécula (PATNAIK, 1997) (FEDERATION; AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION, 1999).

Os compostos simples de cianeto são eletricamente neutros e existem na forma sólida, ao dissociar-se em água produzem cianeto livre (Equação 6).

O sal de cianeto mais usado na indústria é o cianeto de sódio, no entanto, outros sais, como o cianeto de potássio e o cianeto de cálcio são utilizados em menor escala.

2.2.3 Complexos ciano-metálicos

O cianeto forma complexos com muitas espécies metálicas, tais como, cobre, zinco, ferro, ouro, prata, cádmio, níquel e mercúrio. Os ciano-complexos ou complexos ciano-metálicos estão divididos em três grupos, sendo eles os complexos fracos, complexos moderadamente estáveis e complexos estáveis (GHOSH; DZOMBAK; WONG-CHONG, 2006).

Entre os complexos fracos e moderadamente estáveis se encontram os cianetos complexados com cádmio, cobre, níquel, prata e zinco. A estabilidade do composto está relacionado ao metal complexado, sendo que o zinco e o cádmio formam os complexos mais fracos $\text{Zn}(\text{CN})_4^{2-}$ e $\text{Cd}(\text{CN})_4$.

Os principais complexos estáveis são os formados com ferro $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ e os complexos formados com o ouro $\text{Au}(\text{CN})_2^-$ (GHOSH; DZOMBAK; WONG-CHONG, 2006).

Os complexos ciano-metálicos podem ser representados pela fórmula $\text{A}_y\text{M}(\text{CN})_x$, onde A representa o álcali presente y vezes, M representa o metal e X o número de grupos do íon cianeto. A dissociação inicial de um complexo de cianeto produz um ânion que é o radical $\text{M}(\text{CN})_x^{\cdot-}$. Este composto de cianeto pode continuar a dissociação em função do pH e da concentração com a liberação de CN^- e posteriormente a formação de HCN (MUDDER; BOTZ, 2004).

2.2.4 Outros compostos derivados do cianeto:

A partir dos compostos de cianeto e mediante as reações que acontecem nos processos de cianetação e atenuação de afluentes é possível a obtenção de compostos menos tóxicos como é o caso do cianato (CNO^-) e do tiocianato (SCN^-) (EISLER, 1997a).

2.2.4.1 Cianato

O cianeto livre pode ser oxidado na presença de oxigênio ou de outros oxidantes tais como cloro, peróxido de hidrogênio e ozônio. O resultado desta oxidação é a formação do cianato (CNO^-), nas Equação 7 e 8 são apresentadas as reações que representam a conversão de cianeto livre para cianato (EISLER, 1997a).

Durante os processos de lixiviação estas reações são evitadas, pois reduzem a concentração de cianeto livre formando complexos que diminuem a solubilidade dos metais de interesse (GHOSH; DZOMBAK; WONG-CHONG, 2006).

No diagrama de Eh-pH para o sistema cianeto – água (Figura 2), pode ser observado que em soluções alcalinas e potenciais menores que -0,5mv predomina a presença do íon cianeto que ao ser oxidado se transforma em cianato (DOMÍNGUEZ; COBOS, 2008).

Figura 2. Diagrama Eh-pH para o sistema CN-H₂O a 25°C.

As propriedades químicas do cianato diferem das do cianeto, apresenta menor toxicidade que o cianeto e também menor tendência de formar complexos metálicos solúveis. O cianato é facilmente oxidado, motivo pelo qual raramente é encontrado em sistemas aquosos (GHOSH; DZOMBAK; WONG-CHONG, 2006)

2.2.4.2 Tiocianato

Tiocianato é o ânion cuja fórmula é SCN^- . Este ânion é formado a partir da reação química entre o cianeto e as diferentes formas de enxofre principalmente o tiosulfato ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$) e os polisulfatos (S_xS^{2-}) (EISLER, 1997b). As reações de formação do tiocianato são apresentadas nas equações 9 e 10.

O tiocianato é degradável quimicamente e biologicamente, pode ser oxidado pelo oxigênio e catalisado por bactérias. Os subprodutos metabólicos são amônia (NH_4^+), carbonato (CO_3^{2-}) e sulfatos (SO_2) (DZOMBAK; GHOSH; YOUNG, 2006).

Este ânion raramente é encontrado em águas residuais. No entanto, os resíduos que contêm cianetos ou as águas em contato com sulfitos podem formar tiocianatos (EISLER, 1997b)

2.3 Toxicidade do cianeto e exposição humana

O cianeto é uma substância química altamente tóxica, sendo a sua toxicidade manifestada em todas as espécies animais. Existem diversas formas de exposição diária ao cianeto (fumaça do cigarro, gases de combustão dos carros, consumo de mandioca), porém em concentrações que o organismo humano consegue processar de maneira natural (MARIA, 2002).

A exposição humana ao cianeto pode acontecer por ingestão, inalação e contato dérmico (absorção através dos olhos e da pele) (SERVICES, 2006).

A ingestão em pequenas quantidades acontece principalmente por ingestão de alimentos como sementes de maçã, amêndoas e mandioca brava que contém o cianeto, mesmo em concentrações relativamente baixas (EISLER, 2000).

A exposição por inalação acontece principalmente da fumaça de cigarro e de incêndios em prédios e residências. O ácido cianídrico é produzido durante a pirólise de matérias que contêm nitrogênio sendo liberado como produto intermediário

na queima de plásticos, lã e outros produtos naturais e sintéticos (GENSEMER et al., 2006).

Em ambientes de trabalho, principalmente na indústria de processamento de metais, galvanoplastia, plástico e síntese química, a exposição ao ácido cianídrico, aos sais de cianeto e a soluções aquosas pode acontecer de maneira acidental (GHOSH; DZOMBAK; WONG-CHONG, 2006).

Todas as formas de cianeto podem ser tóxicas em níveis elevados, porém o cianeto de hidrogênio é a forma mais mortal de todas, mesmo em exposições de curto prazo (DASH; GAUR; BALOMAJUMDER, 2009). O nível de toxicidade dos compostos de cianeto depende da facilidade com que estes liberam o ânion cianeto. Como os radicais cianeto tem baixa afinidade por metais alcalinos e elevada afinidade pelo ferro férrico e outros metais, os compostos de cianeto contendo ferro são menos tóxicos que os cianeto de potássio e de sódio (KENT R. OLSON, 2014).

A concentração letal LC50 por inalação de cianeto de hidrogênio (concentração que resulta letal para 50% dos indivíduos expostos) situa-se entre 100 e 300ppm. A inalação desses níveis de cianeto causa a morte em um período de tempo compreendido entre 10 e 60 minutos (AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ATSDR), 2006).

A dose letal, LD50, por ingestão de cianeto é de 1 a 3mg por kg de massa corporal. A dose letal por absorção dérmica é 100mg de cianeto por kg de massa corporal (AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ATSDR), 2006).

Quanto ao meio ambiente, concentrações de cianeto livre maiores que $0,1\text{mgL}^{-1}$ afetam espécies sensíveis em água doce ou salgada, enquanto que concentrações de ácido cianídrico superiores a $0,05\text{mgL}^{-1}$ são letais para os peixes.

O cianeto é considerado um asfixiante químico. A ação bioquímica no corpo é a mesma independente da forma de exposição, do tempo de exposição e da dose. O mecanismo de toxicidade do cianeto consiste na inibição da assimilação do oxigênio por parte das células (EISLER; WIEMEYER, 2004).

Na corrente sanguínea o cianeto forma um complexo estável com o citocromo oxidase celular, bloqueando desta maneira a utilização de oxigênio disponível. O citocromo oxidase é a enzima encarregada de realizar a transferência de elétrons para as mitocôndrias das células durante a síntese da adenosina trifosfato (ATP) (KENT R. OLSON, 2014).

Em ausência da atividade enzimática do citocromo oxidase, as células não conseguem aproveitar o oxigênio da corrente sanguínea aumentando a acumulação de lactato no sangue e causando hipóxia citotóxica dos tecidos e cianose (coloração azulada da pele) (DASH; GAUR; BALOMAJUMDER, 2009).

Os sintomas de envenenamento iniciais podem aparecer mesmo em exposição a baixas concentrações, entre 20 a 40ppm de ácido cianídrico, e podem manifestar-se com dor de cabeça, sonolência, vertigem, alteração cardíaca, dificuldade respiratória, vômito, e alterações sanguíneas (LOGSDON; HAGELSTEIN; MUDDER, 2001).

Para exposição a altos níveis de cianeto, concentrações entre 150 e 200ppm de ácido cianídrico, os sintomas apresentados são a diminuição da temperatura corporal, a coloração azulada do rosto, os lábios e as extremidades, ocorre prejuízo ao cérebro, ao coração e pode causar a morte em poucos minutos (AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ATSDR), 2006).

O antídoto mais comum é o nitrito de amila, que pode ser administrado por via oral ou por injeção, existem também outros antídotos como o tiosulfato de sódio, o nitrito sódico e o dimetil amino fenol (DMAP) (ATSDR, 2006; MARIA, 2002).

O cianeto não se acumula nos seres vivos pelo que exposições prolongadas a concentrações não letais não necessariamente causam intoxicação. A detoxificação no organismo humano ocorre com a transformação do cianeto em tiocianato ou ácido carboxílico e sua posterior eliminação através da urina (EISLER; WIEMEYER, 2004).

2.4 Marco legal

O cianeto se encontra nas águas naturais, principalmente devido a descargas de efluentes industriais provenientes das atividades de galvanoplastia e de processos de mineração. A presença desse ânion prejudica os ecossistemas e o abastecimento público de água (PIVELI, 2006).

No Brasil a resolução Número 357 de 2005 do CONAMA (CONAMA, 2005), dispõe sobre a classificação dos corpos de água e estabelece limites máximos na concentração de cianeto para as diversas classes conforme a Tabela 5.

A legislação federal CONAMA 2005, modificada pela resolução Número 430 de 2011 que dispõe sobre condições e padrões de lançamento de efluentes em cursos

de água, estabelece o limite máximo de $1,0\text{mgL}^{-1}$ de cianeto total e $0,2\text{mgL}^{-1}$ de cianeto livre (CONAMA, 2011a).

O cianeto também é padrão de potabilidade, a Portaria 2914/2011 do ministério de saúde que trata dos procedimentos de controle na qualidade da água para consumo humano estabelece como valor máximo permissível $0,07\text{mgL}^{-1}$ de cianeto (CONAMA, 2011b).

Tabela 4. Padrões e valores máximos de cianeto em águas, adaptado (CETESB, 2014).

Meio	Concentração	Comentário	Referencia
Água	$0,07\text{ mgL}^{-1}$	Padrão de Potabilidade	Portaria 2914/2011
Água	$0,007\text{ mgL}^{-1}$	VMP (consumo humano)	CONAMA 396/2008
Subterrânea	$0,01\text{ mgL}^{-1}$	VMP (recreação)	
Águas Doces	$0,005\text{ mgL}^{-1}$	VM (classes 1,2)	CONAMA 357/2005
	$0,022\text{ mgL}^{-1}$	VM (classe 3)	
Águas Salinas	$0,001\text{ mgL}^{-1}$	VM (classes 1,2)	CONAMA 357/2005
Águas Salobras	$0,001\text{ mgL}^{-1}$	VM (classes 1,2)	CONAMA 357/2005

VM = valor máximo; VPM = valor máximo permitido.

2.5 Tratamentos de resíduos contendo cianeto

Os efluentes contaminados com cianeto podem ser tratados por meio de processos físicos, químicos ou biológicos. Alguns processos atentam para recuperar o cianeto enquanto que outros simplesmente têm como foco principal a remoção do cianeto (AKCIL, 2003).

Dentre os tratamentos que envolvem a reciclagem do cianeto pode-se destacar o processo de acidificação, volatilização e reneutralização (AVR), as resinas de troca iônica, o processo eletrolítico e o processo com resina quelante (DUTRA et al., 2002).

Os processos de remoção do cianeto podem ser de destruição, os quais incluem reações químicas ou biológicas empregadas para transformar o cianeto em compostos menos tóxicos. De maneira geral, os métodos mais empregados no

tratamento de soluções com cianeto podem ser classificados em (LOGSDON; HAGELSTEIN; MUDDER, 2001):

- Degradação natural.
- Oxidação química.
- Precipitação.
- Biodegradação.

2.5.1 Degradação natural

O processo de degradação natural consiste na retenção dos efluentes contaminados em barragens de armazenamento durante um período determinado de tempo, o tratamento é considerado natural, pois não são utilizados meios externos para promover os processos que acontecem de maneira espontânea (LINARDI, 1998).

A degradação de forma natural do cianeto acontece devido a uma combinação de diversos processos físicos, químicos e biológicos de ocorrência natural, dentre os quais se destacam os seguintes:

- diluição,
- volatilização,
- dissociação,
- Fotodegradação,
- oxidação química e oxidação microbiológica,
- hidrólise,
- precipitação de sólidos.

O principal mecanismo de degradação natural que acontece nas bacias de rejeitos contendo cianeto é o de volatilização (KUYUCAK; AKCIL, 2013).

As principais variáveis que influenciam a degradação natural do cianeto são o pH da solução, a temperatura, as espécies de cianeto, a concentração em solução, as condições de aeração, a radiação solar, a presença de microrganismos e as condições da barragem, como área, profundidade, turbidez e turbulência (KUYUCAK; AKCIL, 2013).

O processo de degradação natural tem sido usado na indústria como tratamento primário, visando à diminuição do consumo de reagentes químicos na etapa posterior. A degradação natural é uma alternativa importante a ser considerada em regiões onde exista disposição de áreas e onde as condições climáticas favoreçam o processo (LINARDI, 1998).

A principal desvantagem do processo de degradação natural é a utilização de grandes áreas para construção de bacias e disposição dos rejeitos, além disso apresenta uma taxa de degradação baixa se comparada com outros processos de tratamento (LINARDI, 1998), (GUO; PENG; ESPINOSA-GOMEZ, 2014).

2.5.2 Processos de tratamento químico

Existem diversos processos químicos usados para o tratamento de efluentes contaminados com cianeto. A escolha do método mais apropriado depende da avaliação de variáveis como a concentração de cianeto e o volume da solução a ser tratada (LINARDI, 1998).

A maioria dos processos de destruição de cianeto tem como princípio básico converter o cianeto em complexos menos tóxicos mediante uma reação de oxidação (BOTZ; MUDDER; AKCIL, 2016).

Ante a impossibilidade de produzir efluentes de qualidade aceitável por processos naturais foi necessário desenvolver novos métodos de tratamento químico e biológico (KUYUCAK; AKCIL, 2013).

Vários processos químicos de tratamento de efluentes contaminados com cianeto tem mostrado bom comportamento para produzir soluções tratadas ou suspensões com baixos níveis de cianeto, a continuação, serão descritos os processos mais usados industrialmente.

2.5.2.1 Cloração alcalina

Dentre os processos de destruição de cianeto, a cloração alcalina é o processo mais antigo e, ao mesmo tempo, o mais utilizado na destruição de cianeto livre e de complexos ciano-metálicos. O processo consiste na oxidação de compostos cianetados por ação do cloro gasoso ou de compostos de cloro ativo em condições alcalinas (MUDDER; BOTZ; SMITH, 1991).

O processo de cloração alcalina acontece em dois estágios. No primeiro as formas livres e WAD de cianeto, (*Weak Acid Dissociation*), reagem com o cloro gasoso (Cl_2) formando o composto intermediário cloreto de cianogênio (CNCl), conforme representado na reação da Equação 11 (COSTA, 1992).

Neste estágio as reações acontecem em uma faixa de pH entre 10,5 e 11,5. O cloreto de cianogênio é um composto tóxico e pode volatilizar em valores inferiores a pH 8. Nessas condições de pH acima de 10,5, o cloreto de cianogênio é transformado em cianato como visto na Equação 12.

O seguinte estágio do processo envolve a hidrólise do cianato e a conversão final em dióxido de carbono e nitrogênio conforme a Equação 13.

Na cloração alcalina pode-se empregar também hipoclorito de sódio e cálcio como agente oxidante. A ação oxidante dos hipocloritos não gera cloreto de cianogênio como produto intermediário nas primeiras etapas da reação (Equação 14 e Equação 15) (MUDDER; BOTZ; SMITH, 1991).

A principal desvantagem deste processo é que durante a reação pode ocorrer a formação de cloroaminas. Trata-se de um produto tóxico e solúvel no meio aquático (APHA 1998).

Outras limitações apresentadas pelo processo de cloração alcalina são:

- Consumo elevado de agente oxidante.
- Controle rigoroso do pH a fim de impedir a liberação de cloreto de cianogênio.
- Impossibilidade de degradar ferrocianetos.
- Formação de organoclorados durante o processo.

Mesmo com estas limitações, o processo apresenta uma série de características que justificam o uso do tratamento. As reações são completas e permitem remoção de até 99% do cianeto inicial, atingindo concentrações finais de $1,0\text{mgL}^{-1}$ (COSTA, 1992).

2.5.2.2 Oxidação com dióxido de enxofre/ar.

Existem duas versões patenteadas do processo de destruição do cianeto com dióxido de enxofre. O primeiro é o processo de tratamento de efluentes cianídricos com dióxido de enxofre (SO_2), também conhecido como processo INCO, pois foi desenvolvido e patentado pela *INCO Metals Company* na década de 1980 (BOTZ; MUDDER; AKCIL, 2016).

O processo INCO é baseado na conversão de cianeto em cianato, usando uma mistura de SO_2 e ar na presença de um catalisador de cobre solúvel sob condições de pH controlado. No processo INCO, as formas de cianeto WAD são convertidas a cianato, enquanto que os complexos cianó-metálicos de ferro são reduzidos ao estado ferroso e precipitados na forma de complexos insolúveis de cobre e de ferro (AKCIL et al., 2003; MUDDER; BOTZ; SMITH, 1991).

O segundo processo de tratamento com dióxido de enxofre foi desenvolvido pela *Heath Steel Mines Ltda*, e a patente foi atribuída a *Noranda Process*. Neste processo o dióxido de enxofre puro é alimentado em uma solução para diminuir o pH na faixa de 7 a 9. Posteriormente é adicionada uma solução de sulfato de cobre (MUDDER; BOTZ; SMITH, 1991).

Destes dois processos, o desenvolvido pela INCO tem sido o mais utilizado, sendo que aproximadamente 80 processos de mineração em todo o mundo adotaram o processo INCO (MUDDER; BOTZ; SMITH, 1991).

No processo INCO a oxidação pode ser realizada com dióxido de enxofre ou bissulfito de sódio (NaHSO_3) e um catalisador de cobre em solução. A reação

normalmente é realizada a um valor de pH entre 8 e 9. Na Equação 16 pode ser observada a reação de oxidação com dióxido de enxofre (BOTZ; MUDDER; AKCIL, 2016).

A relação teórica de dióxido de enxofre requerido durante o processo é de 2,46g de SO₂ para cada 1g de cianeto WAD oxidado, porém na pratica o uso real varia de 3 a 5g de SO₂ para cada 1g de cianeto WAD (PARGA; COCKE, 2001).

O cobre é utilizado em concentrações menores de 50mgL⁻¹ e o tempo de reação pode variar entre 20 e 90 minutos. O processo de tratamento com dióxido de enxofre reduz a concentração de cianeto total para valores inferiores a 1mgL⁻¹ (SCHNEIDER, 2009).

Devido à formação de ácido como produto da reação, normalmente é utilizada cal para controle do pH (Equação 17) (KUYUCAK; AKCIL, 2013).

2.5.2.3 Oxidação com peróxido de hidrogênio H₂O₂

O processo de tratamento de cianeto com peróxido de hidrogênio foi desenvolvido nos anos 1980, na atualidade é um processo muito usado na indústria devido ao fato do peróxido de hidrogênio ser um oxidante forte, solúvel em água e de fácil manuseio (KEPA; STANCZYK-MAZANEK; STEPNIAK, 2008).

A química do processo de destruição do cianeto com peróxido de hidrogênio consiste na oxidação do cianeto em cianato conforme a reação química apresentada na Equação 18.

A reação acontece normalmente no pH do efluente (pH=10). A diferença dos outros processos é que esse não requer estrito controle dos parâmetros,

principalmente do pH. Outra característica do processo é que os complexos de cobre e zinco também são oxidados (Equação 19). Uma vez completa a reação de oxidação, os metais complexados precipitam como hidróxidos metálicos (MUDDER; BOTZ; SMITH, 1991).

O processo de tratamento com peróxido de hidrogênio pode atingir valores abaixo de $1,0\text{mgL}^{-1}$ de cianeto. O cianato gerado é menos tóxico que o cianeto e pode ser convertido à amônia por meio de hidrólise ácida, como apresentado na Equação 20.

2.5.3 Degradação biológica de cianeto

Uma variedade de microrganismos se encontram presentes de maneira natural nos cursos d'água, nos efluentes residuais e nos efluentes industriais (ATA AKCIL, 2003). Muitos destes microrganismos têm a capacidade inerente para degradar compostos orgânicos tóxicos que se encontram no meio ambiente (DUBEY; HOLMES, 1995), a destruição do cianeto por microrganismos é um processo natural que pode ser avaliado e projetado para ser usado em grandes fluxos de efluentes contaminados com cianeto (ATA AKCIL, 2003).

De maneira geral, o princípio na maioria dos processos de tratamento biológico consistem em promover o crescimento das populações bacterianas essenciais para o tratamento de determinado resíduo (WONG-CHONG, 2006). As bactérias transformam os contaminantes orgânicos em energia, massa celular e outros subprodutos menos tóxicos (BOTZ; MUDDER; AKCIL, 2016; KUYUCAK; AKCIL, 2013).

Os microrganismos envolvidos no tratamento biológico de cianeto e tiocianato incluem uma mistura heterogênea de bactérias isoladas comumente em solos ou rejeitos que têm presença de cianetos (DASH; GAUR; BALOMAJUMDER,

2009). Na literatura, diversos microrganismos que incluem bactérias (ADJEI; OHTA, 2000; IONESCU et al., 2015; MANIYAM; SJAHRIR; IBRAHIM, 2011; MEKUTO et al., 2013, 2016; WATANABE et al., 1998), fungos (BARCLAY; TETT; KNOWLES, 1998; EZZI; LYNCH, 2005; ÖZEL et al., 2010) e algas (GURBUZ; CIFTCI; AKCIL, 2009) tem sido estudados no tratamento de efluentes contaminados com cianeto, destacando-se o uso de bactérias nos processos de biodegradação.

Dentre os principais trabalhos que a literatura apresenta, se encontram cepas de *Burkholderia* isoladas por Adjei e Ohta (ADJEI; OHTA, 2000), que foram avaliadas como potenciais degradadoras de cianeto usando soluções alcalinas de pH na faixa entre 8 e 10. A taxa de remoção de cianeto obtida foi de $1,85\text{mg h}^{-1}$.

Luque descreveu a degradação de cianeto com uso de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. No estudo foram avaliados efluentes alcalinos (pH 9,5) em concentrações de cianeto entre 1mM e 20mM e em ausência de glicose. A degradação de cianeto foi maior do que 85% (LUQUE, 2005).

Em trabalho recente, Razanamahandry et al, avaliaram a degradação de cianeto por espécies isoladas de minas de ouro artesanais. Os pesquisadores obtiveram remoção de cianeto livre na ordem de 95% para concentrações de cianeto de até 80mg L^{-1} em pH 9,5. Concentrações acima de 100mg L^{-1} de cianeto livre inibiram a degradação bacteriana. Na Tabela 5 pode ser observado um resumo das principais pesquisas realizadas com uso de microrganismos para degradação de cianeto (RAZANAMAHANDRY et al., 2016).

Tabela 5. Comparação de estudos de remoção bacteriana de cianeto.

Microrganismo	Concentração	pH	Temperatura °C	Referência
<i>Pseudomonas sp.</i>	100-400mgL ⁻¹	9.2 - 11.4	30	(AKCIL et al., 2003)
<i>Fusarium solani</i>	0.5 - 0.8mM	9.2 - 10.7	30	(DUMESTRE et al., 1997)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	4.0 - 7.0	25-35	(DURSUN; AKSU, 2000)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	100	5	25	(DURSUN; ÇALIK; AKSU, 1999)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	0.58mM	7	30	(KAO et al., 2003)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	25-100mM	7	30	(KAO et al., 2006)
Mix cultura bacterias	20 mgL ⁻¹	7	22	(WHITE; SCHNABEL, 1998)
<i>Pseudomonas putida</i>	100-400 mgL ⁻¹	6.7	25	(BABU; WOLFRAM; CHAPATWALA, 1992)
<i>Pseudomonas putida</i>	4mM	7.5	25	(CHAPATWALA et al., 1998)
<i>Fusarium oxysporum</i>	1-7mM	8	25-30	(CAMPOS; PEREIRA; ROSEIRO, 2006)
<i>Trichoderma spp</i>	2000 mgL ⁻¹	6.5	25	(EZZI; LYNCH, 2005)
<i>Pseudomonas sp</i>	1000 mgL ⁻¹	9.5 – 10.5	32 - 36	(MORILLO; GUEVARA, 2015)
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	2,8 mgL ⁻¹	10	30	(HUERTAS et al., 2010)
<i>Bacillus sp</i>	200 mgL ⁻¹	10.3	24 - 30	(WU et al., 2014)
<i>Bacillus pumilus</i>	100mgL ⁻¹	10.5	25	(MEYERS et al., 1991)

O primeiro tratamento biológico de eliminação de cianeto em escala industrial foi desenvolvido nos anos 80 e aplicado na mina Homestake de Dakota do sul nos Estados Unidos. O processo consta de uma primeira etapa de biodegradação de cianeto usando um cultivo misto de *pseudomonas*, posteriormente uma etapa de adsorção de metais e por ultimo a amônia formada durante o processo é eliminada com uso de bactérias nitrificantes (LUQUE, 2005).

Uma das principais vantagens do processo de degradação de cianeto com uso de microrganismos é o baixo custo operacional, comparado com os processos físicos e químicos (DASH; GAUR; BALOMAJUMDER, 2009). Nos últimos anos o uso de microrganismos e as técnicas de biorremediação estão permitindo desenvolver processos cada vez mais eficientes e menos custosos. Desta maneira a biodegradação de cianeto se torna uma alternativa de tratamento nos efluentes contaminados com cianeto (DUMESTRE et al., 1997).

2.6 Rotas de degradação biológica do cianeto

Os microrganismos têm desenvolvido ao longo da sua evolução rotas de degradação de cianeto, seja como mecanismo de detoxificação ou como mecanismo de assimilação de cianeto (LUQUE, 2005). Isto se deve, principalmente, ao fato de que alguns microrganismos tem produção de ATP alterna, enquanto que outros possuem uma oxidase diferente da citocromo C oxidase, (enzima inibida pelo cianeto) (SIEDOW; UMBACH, 1995).

A degradação do cianeto envolve enzimas específicas que atuam como catalizadores biológicos usando o cianeto presente no meio como fonte de carbono e nitrogênio (MOSQUERA, 2013) (LUQUE ALMAGRO et al., 2011). Apesar da literatura apresentar diversas rotas de degradação de cianeto, todas tem em comum a conversão final do cianeto em amônia, que é um composto facilmente assimilado pelos microrganismos (LUQUE, 2005).

As principais rotas de degradação de compostos de cianeto descritas na literatura são as rotas de hidrólise, oxidativa, redutora e de substituição ou adição (DASH; GAUR; BALOMAJUMDER, 2009; EBBS, 2004; GUPTA; BALOMAJUMDER; AGARWAL, 2010), a continuação se descreve cada uma delas, assim como a enzima que participa no mecanismo de degradação de cianeto.

2.6.1 Rotas de hidrólise

Nas rotas de hidrólise as reações são catalisadas pela ação enzimática de bactérias ou fungos. O mecanismo de degradação do cianeto consiste na quebra da tripla ligação entre o carbono e o nitrogênio pela ação destas enzimas (RAYBUCK, 1992).

Na degradação de cianeto por via de hidrólise é possível distinguir dois tipos de mecanismos; o de hidrólise e o de hidratação de cianeto. A diferença entre estes mecanismos radica na enzima que participa na reação. As enzimas que participam no processo de degradação por via de hidrólise são apresentadas na Figura 3.

Figura 3. Rotas metabólicas para a degradação do cianeto. Adaptada (GUPTA; BALOMAJUMDER; AGARWAL, 2010)

A enzima cianidase se encontra presente no mecanismo de degradação de cianeto por hidrólise, enquanto que as enzimas cianeto hidratase e dihidratase são enzimas que participam no mecanismo de degradação de hidratação do cianeto (GUPTA; BALOMAJUMDER; AGARWAL, 2010).

2.6.1.1 Hidrólise do cianeto

No mecanismo de hidrólise do cianeto, representado na Equação 21, a reação é catalisada pela enzima cianidase (EC. 3.5.5.1) na presença de duas

moléculas de água. Como resultado da reação, o cianeto é transformado em ácido fórmico e amônia (GUPTA; BALOMAJUMDER; AGARWAL, 2010).

A enzima cianidase, tem sido descrita como responsável pela degradação de cianeto em trabalhos realizados com bactérias dos gêneros *Alcaligenes xylosoxidans subsp. denitrificans* (INGVORSEN; HOJER-PEDERSEN; GODTFREDSSEN, 1991), *Pseudomonas stutzeri AK61* (WATANABE et al., 1998), *Burkholderia cepacia C-3* (ADJEI; OHTA, 2000), *Bacillus pumilus* (MEYERS et al., 1991) e *Pseudomonas pseudoalcaligenes* (LUQUE ALMAGRO et al., 2011).

2.6.1.2 Hidratação do cianeto

No mecanismo de hidratação do cianeto a reação acontece em dois estágios. No primeiro estágio o cianeto é transformado em formamida pela ação da enzima cianeto hidratase (EC 4.2.1.66), como representado na Equação 22.

No segundo estágio a formamida é posteriormente metabolizado através da enzima formamida hidratase (EC 3.5.1.49), resultando na formação de ácido fórmico e amônia, como pode ser observado na Equação 23.

A enzima cianeto hidratase se encontra principalmente em fungos. A literatura tem descrito esses processos de degradação de cianeto com espécies de *Fusarium oxysporum* N-10 (YANASE et al., 2000) e *Fusarium solani* (DUMESTRE et al., 1997). Estas reações acontecem principalmente em ambientes alcalinos com valor

de pH entre 9,2 e 10,7. Os fungos que possuem esta enzima podem tolerar concentrações de cianeto de até 100mM e durante o processo de degradação utilizam como fonte de energia o nitrogênio presente no cianeto (GUPTA; BALOMAJUMDER; AGARWAL, 2010).

2.6.2 Rota oxidativa

Na rota oxidativa de degradação do cianeto, os microrganismos utilizam oxigenase para catalisar a conversão de cianeto em amônia e dióxido de carbono. É possível distinguir dois mecanismos oxidativos, no primeiro mecanismo participa a enzima cianeto dioxigenase enquanto que no segundo mecanismo participa a enzima cianeto monoxigenase (EBBS, 2004).

O resultado da degradação de cianeto através destas enzimas é a produção de amônia e dióxido de carbono. Devido à volatilização do dióxido de carbono durante a reação enzimática do cianeto há necessidade do fornecimento de uma fonte adicional de carbono para manter a atividade microrbiana (RAYBUCK, 1992).

Na rota com participação da enzima cianeto dioxigenase o cianeto é convertido em amônia e dióxido de carbono, como pode ser visto na Equação 24.

Na segunda via oxidativa do cianeto participam duas enzimas. No primeiro estágio a enzima cianeto monoxigenase é a responsável pela conversão do cianeto em cianato. Posteriormente a enzima cianase converte o cianato em amônia e dióxido de carbono (Equação 25 e Equação 26) (Gupta et al. 2010).

A participação da enzima dioxigenase tem sido reportada principalmente em trabalhos de degradação de cianeto com *Escherichia coli* (FIGUEIRA et al., 2014) e *Pseudomonas fluorescens* (HARRIS; KNOWLES, 1983).

2.6.3 Rotas redutoras

A rota de degradação redutora acontece em condições anaeróbias. As enzimas necessárias para a redução de cianeto são encontradas em poucas espécies, motivo pelo qual a rota de redução do cianeto não é muito comum.

A reação acontece a partir do ácido cianídrico, com a atividade catalizadora da enzima nitrogenase, responsável pela conversão do ácido cianídrico para metano e amônia. A enzima nitrogenase é utilizada pelos microrganismos para fixar o nitrogênio atmosférico e tem a capacidade de reduzir variedade de substratos (N_2 , N_2O , CO , C_2H_2 , N_3 , HCN) (GUPTA; BALOMAJUMDER; AGARWAL, 2010; LUQUE-ALMAGRO et al., 2005).

As bactérias *Azotobacter chroococcum* (KELLY; POSTGATE; RICHARDS, 1967), *Azotobacter vinelandii* (LOWE et al., 1989) e *Klebsiella oxytoca* (LIU; LIU; LIN, 1997) degradam o cianeto através dessa enzima. O mecanismo de redução do ácido cianídrico acontece em duas etapas. A primeira inclui a formação de dois produtos intermediários parcialmente reduzidos: a metilenimina e a metilamina. Posteriormente ocorre a redução total destes produtos com formação de amônia e metano (Equação 27) (LI; BURGESS; CORBIN, 1982).

2.6.4 Rotas de substituição / adição

As vias de degradação de substituição são utilizadas pelos microrganismos para assimilar o cianeto, o qual é usado como fonte de nitrogênio e carbono. Existem dois tipos de enzimas que catalisam a assimilação do cianeto através desta via, a

rodanase e a mercaptopiruvato (EBBS, 2004; GUPTA; BALOMAJUMDER; AGARWAL, 2010).

Estas enzimas pertencem ao grupo das enzimas que se caracterizam pela transferência de enxofre. As rodanases são enzimas conhecidas como mecanismos para desintoxicação de cianeto, as quais catalisam a transferência de um átomo de enxofre ao cianeto, gerando compostos menos tóxicos como o tiocianato. Na Equação 28 é apresentada a reação enzimática da rodanase (GUPTA; BALOMAJUMDER; AGARWAL, 2010; LUQUE, 2005).

2.7 Determinação da concentração de cianeto

Existem três categorias de cianeto presentes em soluções e efluentes industriais que podem ser determinadas por métodos analíticos. Estas categorias são o cianeto total, o cianeto dissociável com ácido débil e o cianeto livre (Figura 4) (MUDDER; BOTZ; SMITH, 1991).

Figura 4. Compostos de cianeto presentes em soluções e efluentes industriais, adaptado (MUDDER; BOTZ; SMITH, 1991).

O cianeto total inclui todos os compostos de cianeto existentes em solução aquosa, incluindo o cianeto livre, os cianetos simples e os demais complexos ciano-

metálicos, com exceção do cobalto. O cianeto dissociável com ácido débil, também conhecido como cianeto WAD, inclui as formas de cianeto livre e os complexos fracos e moderadamente fortes de cianeto. Por último o cianeto livre, que inclui as formas não complexadas do cianeto, isto é, o ânion cianeto e o cianeto de hidrogênio molecular (EISLER, 2000).

A escolha de uma técnica adequada de análises químicas para determinação de cianeto depende de fatores tais como a concentração de cianeto da solução, as espécies de cianeto presentes, a interferência de outras substâncias e da precisão requerida (PIVELI, 2006).

Dentre as técnicas de análises químicas mais empregadas para a determinação do cianeto, as mais utilizadas são o método de destilação, o método potenciométrico e o método volumétrico (PARGA; COCKE, 2001), (ASTM INTERNATIONAL, 2015), (FEDERATION; AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION, 1999). Os principais métodos analíticos utilizados na determinação de cianeto em solução são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Principais métodos analíticos para determinação de cianeto (SCHNEIDER, 2009)

Técnica		Aplicação	LD
1. Titulação ou espectrofotometria (colorimétrico)	USEPA Método 9014 (Equivalente aos métodos USEPA 335.1 e 335.2)	Cianeto livre (não complexado) água potável, águas superficiais naturais, águas residuais domésticas e em extratos de solo	Titulação: 0,100 mgL ⁻¹ Colorimétrico: 0,020mgL ⁻¹
2. Injeção em fluxo. Troca de ligantes e amperometria.	USEPA OIA - 1677	Água e águas residuais	0,0005 mgL ⁻¹
3. Calorimetria semi-automática	USEPA Método 335.4 (equivalente ao Método USEPA 335.3)	Águas de consumo subterrâneas, superficiais, além de resíduos domésticos e industriais.	Deve ser determinado em cada laboratório.
4. Potenciometria em amostras aquosas e destilados com eletrodo íon-seletivo	USEPA Método 9213 (equivalente aos métodos ASTM D4646-87, D5233-92, ou D3987-85)	Cianeto livre (não complexado) e ácido cianídrico em água potável, águas superficiais naturais, águas residuais domésticas e industriais, e em extratos de solo.	0,050 mgL ⁻¹

3 OBJETIVO

O presente trabalho tem por objetivo avaliar a capacidade de degradação de cianeto em solução aquosa com uso de bactérias nativas. Para tanto, pretende-se identificar as bactérias isoladas de um rejeito de mineração de ouro, avaliar os parâmetros de crescimento e produção de biomassa para cada uma das cepas, e estudar a influência de parâmetros como temperatura, velocidade de rotação e meio de cultura na degradação bacteriana de cianeto.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho avaliou a capacidade de cepas nativas para degradação de cianeto. Para isso, três cepas isoladas de rejeito de mineração foram identificadas e posteriormente foram realizados ensaios de laboratório de degradação bacteriana usando uma solução sintética de cianeto de potássio.

O trabalho foi desenvolvido em quatro etapas principais, conforme mostrado na Figura 5, sendo a primeira etapa a ativação e o crescimento das cepas isoladas, seguido da identificação e a caracterização dos microrganismos, a adaptação das cepas a ambientes alcalinos e por último os ensaios de degradação bacteriana de cianeto.

Figura 5. Etapas realizadas no estudo de degradação bacteriana do cianeto.

Para esse trabalho foram usadas cepas nativas isoladas a partir de uma amostra coletada num rejeito de mineração de ouro localizado em San Mateo de Huanchor em Lima, Peru.

De um total de 20 cepas isoladas do rejeito de mineração, por enriquecimento seletivo, foram escolhidas três cepas (números 8, 12 e 17). As cepas escolhidas foram as que apresentaram maior crescimento celular em meio de cultura nutritivo suplementado com cianeto (MONGE et al., 2017).

As três cepas isoladas foram estocadas a temperatura de -80°C e transportadas ao Laboratório de Reciclagem de Tratamento de Resíduos e Extração - LAREX, para sua identificação.

4.1 Ativação das cepas

O processo de ativação e crescimento bacteriano foi realizado em meio de cultura Luria-Bertani (LB) (BERTANI, 1951), cuja composição pode ser verificada na Tabela 7. O pH do meio de cultura foi ajustado para o valor de pH 7 com solução de hidróxido de sódio 5M (NaOH). Os meios de cultura foram esterilizados em autoclave.

Tabela 7. Composição do meio de cultura LB (Luria Bertani).

Componente	Meio Líquido (gL^{-1})	Meio Sólido (gL^{-1})
Peptona	15	15
Extrato de Levedura	5	5
NaCl	10	10
Ágar		15

O material e as soluções empregados foram esterilizados usando uma das seguintes técnicas:

- autoclavagem a 121°C durante 30 minutos e 1atm;
- filtração por membrana de acetato de celulose de $0,2\mu\text{m}$;
- exposição direta a luz UV por 15 minutos;
- aplicação de álcool etílico 70% em volume.

A escolha da técnica levou em consideração o tipo de material a ser esterilizado.

A ativação propriamente dita das cepas ocorreu em quatro etapas, conforme mostrado na Figura 6.

Figura 6. Etapas realizadas para a ativação das cepas.

A primeira etapa de ativação das cepas ocorreu através do cultivo das cepas em placas de ágar contendo meio L.B sólido. O método empregado para esta ativação foi o de esgotamento por estrias em placas de ágar. As placas seguiram para a estufa de incubação onde permaneceram durante 24 horas em temperatura de 37°C.

Após o período de incubação e uma vez observado crescimento das colônias nas placas de ágar realizou-se o pré-inóculo de cada uma das cepas. Para isso, uma colônia das cepas ativadas em placas de ágar foi transferida para tubo tipo Falcon estéril de 15mL contendo 5mL de meio de cultura LB líquido. As cepas foram incubadas *overnight* em agitador orbital a temperatura de 37°C e velocidade de rotação de 190rpm.

Após observação do crescimento celular no pré-inóculo, um novo cultivo foi feito utilizando 0,2mL de pré-inóculo em 100mL de meio de cultura LB (relação 1:500). O cultivo realizou-se em triplicata em frascos erlenmeyers de 250mL e foi incubado em agitador orbital durante 24 horas a 37°C e 190rpm.

Durante o crescimento do cultivo, foram realizadas medidas de densidade óptica (OD) com comprimento de onda de 600nm (OD₆₀₀) a fim de determinar o crescimento das cepas. A determinação do método de densidade óptica será descrita no item 4.2.1.

Assim que o cultivo alcançou o valor de OD₆₀₀=0,8 realizou-se um novo repique da bactéria em meio LB. No total foram realizados três repiques sucessivos para as cepas 8, 12 e 17.

Com o objetivo de preservar as cepas originais para futuros trabalhos, foram produzidos estoques de células congeladas a partir das cepas ativadas e crescidas em meio de cultura LB. O procedimento para o congelamento dos estoques consistiu em colocar 750µL do cultivo bacteriano e 250µL de glicerol estéril em um microtubo de 2mL. Os microtubos foram armazenados a temperatura de -10°C durante 24 horas e posteriormente a -80°C. No total foram produzidos 50 microtubos para estoque de cada cepa bacteriana.

Ao realizar um novo ensaio, células congeladas contidas nos microtubos em estoque eram ativadas conforme procedimento descrito anteriormente.

4.2 Determinação da concentração celular

O método adotado para a determinação da concentração celular do cultivo foi o método da densidade óptica (OD_{600}) associada à massa seca. Para isso foi realizado um cultivo bacteriano com 1000mL de volume total e 2mL de inoculo bacteriano previamente crescido.

O cultivo foi incubado durante 48 horas sob agitação orbital a 37°C e 190rpm. Retiraram-se alíquotas do cultivo para medição de OD_{600} e da massa seca. Os intervalos de tempo em que foram retiradas as alíquotas, assim como também os volumes das alíquotas são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Intervalos de tempo e volumes das amostras para o cálculo da determinação celular.

Alíquota	Hora	OD_{600}	Massa Seca
1	0	2,5mL	10mL
2	0.5	2,5mL	10mL
3	1	2,5mL	10mL
4	2	2,5mL	10mL
5	4	2,5mL	10mL
6	8	2,5mL	10mL
7	16	2,5mL	10mL
8	32	2,5mL	10mL

O total das amostras não excedeu 10% do volume total do cultivo. O cultivo foi realizado em triplicata e o mesmo procedimento foi empregado para as três cepas.

4.2.1 Densidade Óptica

O aumento da biomassa da bactéria em crescimento foi monitorado com medidas de densidade óptica do meio de cultura. Foram retiradas alíquotas de 2,5mL em intervalos de tempo definidos na Tabela 8 para a medida da absorbância do cultivo bacteriano no comprimento de onda de 600nm (OD_{600}).

As amostras foram vertidas em cubeta de quartzo de 2,5mL com passo óptico de 10mm e analisadas no espectrofotômetro UV-VIS (Spectroquant, Pharo300). O meio de cultura sem inóculo foi considerado como o branco da análise. A medida do branco pelo espectrofotômetro faz parte do procedimento para zerar o equipamento antes do início das análises do crescimento bacteriano. As medidas de absorbância das alíquotas foram feitas em triplicata.

Com as medidas obtidas de absorbância (OD_{600}) do cultivo, construíram-se as curvas de crescimento celular em função do tempo para as cepas bacterianas a fim de determinar as fases de latência, crescimento exponencial e estacionário.

4.2.2 Massa seca

O procedimento de determinação da massa seca consistiu das seguintes etapas: coletar alíquotas de 10mL do cultivo bacteriano conforme Tabela 8. As alíquotas foram filtradas em sistema de filtração a vácuo através de membranas GS em éster de celulose (Merck, Millipore) com diâmetro de poro igual a 0,22 μ m. As membranas passaram por um processo de secagem em micro-ondas durante 15 minutos e potência de 20%. Uma vez secas, seguiram para armazenamento em dessecador até o resfriamento e posterior pesagem em balança de precisão. O cálculo para obtenção da massa seca das células é apresentado na Equação 29

$$m_{seca} = m_{total} - m_{membrana} \quad \text{Equação 29}$$

Onde:

m_{seca} = massa de célula seca (g).

m_{total} = massa das células + membrana após secagem (g).

$m_{membrana}$ = massa da membrana seca (g).

O valor da massa seca foi utilizado na Equação 31 para determinar o cálculo da concentração celular.

$$C_{\text{células}} = \frac{m_{\text{seca}}}{m_{\text{amostra}}} \cdot d_{\text{susp.}} \cdot 10^3 \quad \text{Equação 30}$$

Onde:

$C_{\text{células}}$ = concentração de células (g.L⁻¹).

m_{amostra} = massa total da amostra úmida (g).

d_{susp} = densidade da suspensão de células, considerada equivalente à densidade da água (1g.mL⁻¹).

4.3 Identificação das cepas

A identificação das três cepas foi feita através da técnica de espectrometria de massas MALDI-TOF e da técnica de sequenciamento do gene 16s RNA. Os resultados obtidos em cada uma das técnicas foram comparados e avaliada a similaridade das espécies.

4.3.1 Espectrometria de massas MALDI-TOF

As análises de identificação bacteriana das três cepas isoladas foram realizadas utilizando a técnica de espectrometria de massas por ionização e dessorção a laser por matriz assistida (Espectrômetro de massas MALDI-TOF, modelo Microflex LT, marca Bruker Daltonics).

Para a preparação das amostras utilizou-se o protocolo fornecido pelo fabricante do equipamento (DALTONICS, 2017), para isto foi necessário realizar cultivos de cada uma das bactérias em meio sólido. Estes cultivos foram crescidos em placas de ágar com meio LB sólido e incubados durante 24 horas a temperatura de 37°C.

Após o crescimento das colônias no meio sólido e com o auxílio de um palito esterilizado, uma colônia foi transferida diretamente para a placa de análise do espectrômetro de massas “*Placa Ground Steel*”. Posteriormente adicionou-se 1µL de

solução matriz sobre a amostra, na Figura 7 pode ser observado o esquema ilustrativo da preparação de amostra para análise de identificação no MALDI-TOF.

Figura 7. Esquema ilustrativo de preparação de amostras para identificação no MALDI-TOF, adaptado (CLARK et al., 2013).

A solução matriz foi composta por ácido alfa-ciano-4-hidroxicinamínico saturado em 2.5% de ácido trifluoracético 99%, 47,5% de acetonitrila e 50% de água ultrapura. Após a secagem da amostra, realizou-se à análise da amostra no equipamento MALDI-TOF. A partir destas análises foram obtidos espectros de massas de proteínas para cada uma das espécies analisadas.

O registro dos espectros ocorreu de modo linear positivo (frequência de laser 20Hz, íons de fonte de tensão de 20kV, fonte de íons de dois voltagens 18,6kV, tensão da lente de 7,5kV, faixa de massa de 2000 a 20000Da).

Os espectros foram analisados no programa *Biotyper* (versión 2.0, Bruker Daltonics), e classificados numa tabela. A classificação seguiu a comparação de padrões fornecidos pelo fabricante Biotyper MALDI-TOF (MT), variando as pontuações de ID de 0 até 3. Foi levado em consideração as faixas de valores de ID como sendo:

- valores menores de 1,70 são considerados de baixa confiabilidade;
- entre os valores 1,7 e 1,9 são considerados confiáveis para o gênero;
- os valores maiores que 1,9 são considerados confiáveis para identificação a nível de espécies.

4.3.2 Sequenciamento do gene 16s

Para identificação das cepas 8, 12 e 17 mediante a técnica de sequenciamento do gene 16s, foram utilizadas cepas cultivadas em meio de cultura LB líquido e incubadas durante 24 horas a temperatura de 37°C e 190rpm.

O primeiro passo para determinar a espécie das bactérias consistiu na realização do PCR de uma colônia a fim de amplificar especificamente uma região do gene 16s. Para a reação de amplificação do gene 16s utilizou-se o iniciador direto (5'-GCACAAGCGGTGGAGCATGTGG-3') e o iniciador reverso (5'-GCCCGGGAACGTATTCACCG-3'). Esses iniciadores permitiram amplificar um fragmento das regiões variáveis V6, V7 e V8 do rDNA. O volume final da reação foi de 25µL contendo 1x do tampão da enzima Taq, 1,5mM de MgCl₂, 0,2mM de dNTPs, 25pmol de iniciador, e 1U da enzima Taq polimerase. A amplificação de DNA foi realizada em um termociclador, o programa de amplificação consistiu na desnaturização inicial a 94°C durante 5 segundos, seguido de 30 ciclos de 94°C para 45 segundos, 50°C para 45 segundos e 72°C para 1 segundo com extensão final de 10 segundos a 72°C.

Após a reação de PCR, o produto obtido foi usado para realizar a reação de sequenciamento. A reação de sequenciamento foi feita usando o kit de sequenciamento de ciclo *Big Dye Terminator*. A reação consistiu em 5µL produto de PCR, 1x tampão de sequência, 25pmol de iniciador direto ou reverso e 2µL de *Big Dye terminator* em uma reação de volume final de 20µL.

O programa para realizar a amplificação foi uma desnaturização inicial a 94°C durante 5 segundos, seguido de 40 ciclos de 94°C para 30 segundos, 50°C para 30 segundos e 60°C para 4 segundos. O produto obtido foi utilizado para a reação de precipitação. Para este procedimento 80µL de isopropanol 70% foram adicionados no produto obtido da reação de sequenciamento. O produto foi centrifugado a 4000rpm durante 40segundos e 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e a amostra foi injetada no equipamento sequenciador de DNA por eletroforese ABI PRISM 3130 Genetic Analyser. O sequenciamento 16s foi realizado no instituto de química da Universidade de São Paulo.

As sequências do gene 16s obtidas foram utilizadas para fazer uma pesquisa com a ferramenta *Blast* (Basic Local Alignment Search Tool) que permitiu

comparar as sequências obtidas com sequencias depositadas na base de dados NCBI Genbank e desta maneira obter a mais semelhante (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

4.4 Adaptação bacteriana

A adaptação bacteriana a meios alcalinos foi feita a partir das cepas armazenadas na etapa de ativação e crescimento que se encontravam em pH 7,0. Foram testados diferentes meios de cultura e avaliado o crescimento em cada meio. A preparação dos meios de cultura foi feita com água ultrapura e a esterilização dos meios realizou-se em autoclave. Os meios de cultivo empregados nesta fase de adaptação foram divididos nos grupos LB, LBTRIS e LBCAPS.

Solução de cultivo LB: O meio de cultivo LB utilizou-se para avaliar o crescimento das bactérias em valores de pH entre 7 e 11. O meio de cultura LB é composto por 15gL⁻¹ de peptona, 5gL⁻¹ de extrato de levedura, 10gL⁻¹ de cloreto de sódio (NaCl). O pH desejado para cada etapa foi ajustado com solução de hidróxido potássio 2M (KOH) sem adição de tampão.

Solução de cultivo LB-TRIS: Esse meio de cultivo foi utilizado para valores de pH entre 8 e 9. O meio de cultura foi produzido com 15gL⁻¹ de peptona, 5gL⁻¹ de extrato de levedura, 5gL⁻¹ de cloreto de sódio (NaCl) e 6,057gL⁻¹ de tampão Tris Hidroximetil Aminometano (C₄H₁₁NO₃). O Ajuste do pH quando necessário foi realizado com solução ácido clorídrico (HCl).

Solução de cultivo LB-CAPS: O meio LBCAPS foi utilizado para a fase de adaptação da bactéria a valores de pH entre 9 e 10, sendo a composição do meio composta por 15gL⁻¹ de peptona, 5gL⁻¹ de extrato de levedura, 5gL⁻¹ de cloreto de sódio (NaCl) e 11,066gL⁻¹ de tampão CAPS (C₉H₁₉NO₃S). Para o ajuste do pH foi utilizado solução de hidróxido potássio 2M (KOH).

A fase de adaptação bacteriana ao pH foi realizada em frascos erlenmeyers de 250mL incubados em agitador orbital. Na Tabela 9 se encontram as condições de trabalho para as cepas *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis* nos diferentes meios de cultura.

Tabela 9. Meios de cultura empregados na adaptação das bactérias ao pH.

Bactéria	pH	Meio de cultura		Temperatura (°C)	Agitação (rpm)
<i>Bacillus pumilus</i>	7	LB	LB	37	190
	8	LB TRIS8	LB8		
	9	LB TRIS9	LB9		
	10	LB CAPS10	LB10		
	11	LB CAPS11	LB11		
<i>Bacillus licheniformis</i>	7	LB	LB	37	190
	8	LB TRIS8	LB8		
	9	LB TRIS9	LB9		
	10	LB CAPS10	LB10		
	11	LB CAPS11	LB11		
<i>Bacillus subtilis</i>	7	LB	LB	37	190
	8	LB TRIS8	LB8		
	9	LB TRIS9	LB9		
	10	LB CAPS10	LB10		
	11	LB CAPS11	LB11		

Para o processo de adaptação bacteriana foram usadas as cepas que se encontravam em estoque congeladas previamente. O procedimento de ativação e crescimento foi o mesmo empregado na fase de ativação.

A partir do inóculo obtido na fase de ativação, cultivou-se 0,2mL de inóculo em 100mL de meio de cultura em pH igual a 7. O cultivo foi realizado em frascos erlenmeyers de 250mL incubados em agitador orbital a 37°C e 190rpm durante 48 horas ou até que o valor de 0,8 de densidade óptica (OD₆₀₀) fosse atingido.

Ao atingir o valor de OD₆₀₀ esperado, foram realizados três repiques sequenciais nas mesmas condições de pH para garantir a adaptação da cepa ao pH.

A seguinte etapa consistiu em realizar um novo cultivo bacteriano usando como inóculo a cepa adaptada anteriormente ao pH 7, mas agora com pH do meio de cultura igual a 8.

O processo de adaptação para os demais valores de pH foi realizado como descrito anteriormente para o cultivo em pH 7. Na Figura 8, pode ser observado as etapas de adaptação bacteriana.

Com as cepas adaptadas ao pH=10 foram produzidos estoques de células congeladas em microtubos de 2mL e armazenados a -80°C.

Figura 8. Etapas utilizadas na adaptação bacteriana a pH alcalino.

Alíquotas de 3mL foram retiradas a cada hora a fim de avaliar a densidade óptica (2,5mL).

O estudo de crescimento bacteriano em função do pH, foi avaliado através de curvas de crescimento celular usando o método da unidade formadora de colônia (UFC). Este método foi empregado para determinar o número de células viáveis nas diferentes faixas de pH.

O número de células viáveis foi determinado através da retirada de uma alíquota de 100µL de cada meio nos diferentes valores de pH estudados. As alíquotas foram transferidas para tubo tipo ependorf estéril e diluídas no meio de cultivo estéril nas seguintes relações: 1:10, 1:10³, 1:10⁴, 1:10⁶, 1:10⁸, 1:10¹⁰, 1:10¹² até 1:10¹⁷.

De cada diluição uma alíquota de 10µL foi cultivada em placa de ágar por triplicata. As placas foram incubadas em estufa a 37°C durante 24 horas ou até observar o crescimento das colônias. Para o cálculo das células viáveis foi empregada a formula da Equação 31.

$$\text{células viáveis (Cel./mL)} = \frac{N \cdot FD \cdot 10^3}{\text{Vol. Cultivo } (\mu\text{L})} \quad \text{Equação 31}$$

Onde:

N: Numero de colônias contadas.

FD: Fator de diluição.

Vol. cultivo: alíquota cultivada na placa

4.5 Biodegradação de cianeto

Para os ensaios de degradação bacteriana de cianeto foram utilizadas as cepas identificadas como *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis*. A fim de avaliar a eficiência na degradação de cianeto para cada uma das cepas, foi preparada uma solução sintética de cianeto de potássio com concentração de 500mgL⁻¹ (KCN). Durante os ensaios, o pH foi monitorado e mantido acima de 10 para evitar a formação de gás cianídrico.

4.5.1 Soluções para ensaio de biodegradação de cianeto

As soluções para os ensaios foram preparadas seguindo rigorosamente as normas de segurança para manipulação de substâncias com cianeto. Todas as soluções e os resíduos gerados de cianeto foram acondicionados para tratamento e posterior descarte. As soluções empregadas para o ensaio de degradação de cianeto são descritas a seguir:

Solução de cultivo (LB-CAPS50mM-pH10): Para o crescimento da bactéria a pH 10 preparou-se meio de cultura LB adaptado ao pH. O meio foi composto por 15gL⁻¹ de peptona, 5gL⁻¹ de extrato de levedura, 5gL⁻¹ de cloreto de sódio (NaCl) e 11,066gL⁻¹ de tampão CAPS (C₉H₁₉NO₃S), sendo o pH ajustado com uma solução de hidróxido potássio 2M (KOH). A solução foi preparada com água ultrapura e esterilizada em autoclave.

Solução tampão de ensaio (CAPS50mM-pH10-CN): A solução sintética para o ensaio de degradação de cianeto foi preparada a partir do sal cianeto de potássio (KCN). A concentração de cianeto livre na solução preparada foi de $0,5\text{gL}^{-1}$. O preparo da solução de ensaio consistiu na adição em água destilada previamente auto clavadada de $11,066\text{gL}^{-1}$ de tampão CAPS ($\text{C}_9\text{H}_{19}\text{NO}_3\text{S}$), e posterior ajuste do pH 10 com hidróxido de potássio 2M. Por último foi adicionado $1,25\text{gL}^{-1}$ de cianeto de potássio. A solução foi esterilizada em sistema de filtração utilizando membrana de $0,2\mu\text{m}$.

Solução tampão de lavagem (CAPS50mM-pH10): Para o lavado das células foi preparada uma solução tampão de CAPS 50mM em pH 10 através da adição de hidróxido de potássio 2M.

Solução de segurança: Foi preparada uma solução de hidróxido de sódio 5M (NaOH) para ser usada em caso de emergência durante os ensaios de cianeto.

Solução para limpeza de vidraria: Para a limpeza da vidraria usada nos ensaios de degradação de cianeto foi preparada uma solução de hidróxido de sódio 0,16%(NaOH) e hipoclorito de sódio 1% em pH >12 . Ao final do experimento, a vidraria foi pré-lavada com a solução de limpeza a fim de remover o cianeto remanescente.

4.5.2 Metodologia dos ensaios

Para os ensaios de degradação bacteriana, utilizou-se as cepas adaptadas ao pH 10. As cepas foram cultivadas em tubo tipo Falcon estéril de 50mL contendo meio de cultura CAPS50mM-pH10 e incubadas a 37°C e 190rpm durante 24 horas. Posteriormente foi retirada uma alíquota de 200 μL e transferida para erlenmeyer de 250mL contendo 100mL de meio de cultura LB-CAPS50mM-pH10 para processo de incubação a 37°C e 190 rpm até atingir $\text{OD}=0,8$.

O cultivo bacteriano com $\text{OD}=0,8$ foi transferido para tubo tipo Falcon, e centrifugado a 8000rpm durante 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado duas vezes com solução tampão CAPS de lavagem. O *pellet* obtido sofreu nova suspensão em erlenmeyer de 250mL contendo 100mL de solução tampão de ensaio.

A incubação da solução de ensaio ocorreu em erlenmeyers sob agitação orbital (tipo *shaker*) durante 120 horas nas condições apresentadas na Tabela 10. A cada 24 horas uma alíquota de 5mL foi retirada para medição de OD₆₀₀, pH, concentração de cianeto livre e unidade formadora de colônia.

Tabela 10. Condições de trabalho para os ensaios de degradação de cianeto.

Bactéria	pH	Meio de Cultura	Temperatura (°C)	Agitação (rpm)
<i>Bacillus pumilus</i>	10	CAPS50mM- pH10-CN	37/32/27	190/65
<i>Bacillus licheniformis</i>	10	CAPS50mM- pH10-CN	37/32/27	190/65
<i>Bacillus subtilis</i>	10	CAPS50mM- pH10-CN	37/32/27	190/65

Todos os ensaios de degradação bacteriana foram feitos em triplicata e para cada uma das condições de degradação de cianeto foi feito um controle abiótico ou branco que continha a solução sintética de cianeto nas mesmas condições de trabalho porem sem inóculo de bactérias.

4.5.3 Determinação do cianeto livre

A concentração de cianeto livre em solução foi determinada por polarografia utilizando-se o analisador voltamétrico (Voltammetric Analyzer, VA) Computrace Control 797, Metrohm.

Como eletrólito suporte, foi utilizada uma solução contendo ácido bórico 0,2M (H₃BO₃) e hidróxido de potássio 0,17M (KOH). O ajuste de pH a 10,2 foi feito com solução de hidróxido de potássio 0,01M.

O procedimento da análise química consistiu na adição de 0,1mL de amostra, 9,9mL de hidróxido de potássio 0,01M e 10mL da solução de eletrólito suporte numa célula eletroquímica de vidro.

A célula eletroquímica era constituída de três eletrodos, sendo eles: eletrodo de trabalho, eletrodo auxiliar e eletrodo de referência, conforme apresentado na Figura 9 (MACHADO, 2017).

Figura 9. Esquema da célula eletroquímica utilizada no Computrace Control VA 797 (MACHADO, 2017).

A determinação do cianeto livre na solução foi realizada pelo método de adição de padrão, utilizando-se uma solução padrão de cianeto de potássio de 1000mgL^{-1} (KCN).

A partir das análises químicas das amostras foram obtidos os polarogramas seguindo os parâmetros que constam na Tabela 11 (METROHM, 2017).

Tabela 11. Parâmetros utilizados na obtenção dos polarogramas para a determinação de cianeto livre em solução utilizando o Computrace Control VA 797 (METROHM, 2017).

Eletrodo de trabalho	Eletrodo gotejante de mercúrio
Velocidade de agitação	2000rpm
Modo	Pulso diferencial
Tempo de purga	300s
Tempo de equilíbrio	5s
Amplitude de pulso	50mV
Potencial inicial	0V
Potencial final	-500mV
Passo de potencial	8mV
Tempo do passo de potencial	0,8s
Taxa de varredura	10mV/s
Potencial de pico do CN-	-240mV

A faixa de detecção do cianeto livre foi de 0,01 a 10mgL⁻¹ (METROHM, 2017). Com os valores obtidos dos polarogramas, foram elaboradas as curvas de degradação do cianeto em diferentes condições de temperatura e agitação.

Devido à alta volatilidade do cianeto e a fim de diminuir riscos na manipulação deste reagente, a quantificação do cianeto realizou-se em capela com sistema de exaustor e seguindo as normas de segurança para manipulação de substâncias perigosas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Identificação dos microrganismos

A ativação das cepas foi realizada em placas de cultivo em meio LB sólido, para a identificação inicial as cepas conservaram a mesma numeração atribuída durante o isolamento, isto é, cepa 8, 12 e 17. Na Figura 10, pode ser observado o crescimento em placas das colônias para cada uma das cepas.

Figura 10. Imagem de cultivo em meio L.B sólido para as cepas isoladas: a) cepa 8; b) cepa 12; c) cepa 17.

Após 24 horas de incubação a 37°C, foi possível observar o crescimento das colônias para as três cepas. As cepas número 8 e 12 apresentaram morfologia similar, em ambas, o crescimento foi do tipo circular com margem irregular e

consistência seca, as duas colônias apresentaram cor creme. A cepa número 17 apresentou formato circular com bordas irregulares, com coloração creme amarelada.

As cepas foram observadas no microscópio óptico para identificar a morfologia e tamanho. De maneira geral as células bacterianas podem ocorrer individualmente ou em colônias com tamanhos que variam de 0,2 a 2µm de diâmetro e de 2 a 8µm de comprimento. Existem três formatos básicos de bactérias: cocos, bacilos e helicoidais (LOPES, SÔNIA GODOY BUENO CARVALHO; BRANDIMARTE, ANA LUCIA; HO, FANLY FUNGYI CHOW; LAHR, 2014).

As três bactérias estudadas foram classificadas mediante a coloração de Gram, que permite dividir as bactérias em dois grandes grupos, a saber, Gram-positivos e Gram-negativos. Bactérias Gram-positivas reagem à coloração de Gram tornando-as com coloração violeta ou roxo, enquanto que as Gram-negativas apresentam coloração rosa (LOPES, SÔNIA GODOY BUENO CARVALHO; BRANDIMARTE, ANA LUCIA; HO, FANLY FUNGYI CHOW; LAHR, 2014).

5.1.1 Cepa número 8

Através das micrografias obtidas no microscópio óptico foi possível avaliar a morfologia e o tamanho das três bactérias. A micrografia apresentada na Figura 11 é referente à cepa 8. O formato se refere a um bacilo simples com tamanho aproximado de 1,2µm de diâmetro e 2,6µm de comprimento.

Figura 11. Imagem de microscópio óptico para a cepa 8.

Figura 12. Imagem de microscópio óptico da Coloração de Gram para a cepa 8.

Mediante a coloração de Gram realizada para a cepa 8 e apresentada na Figura 12, foi possível classificar a bactéria como Gram-positiva, devido a que a coloração obtida foi violeta.

5.1.2 Cepa número 12

A cepa 12 apresenta formato de bacilo alargado com dimensões de 1,1µm de diâmetro e 2,9µm de comprimento, como pode ser observado na Figura 13.

Figura 13. Imagem de microscópio óptico da Cepa 12.

Figura 14. Imagem de microscópio óptico Coloração de Gram para a Cepa 12.

Mediante a coloração de Gram realizada para a Cepa 12 e apresentada na Figura 14, foi possível constatar que a bactéria pertence ao grupo das Gram-positivas.

5.1.3 Cepa número 17

A Figura 17 apresenta a imagem ao microscópio óptico da cepa 17. Pode-se observar que o formato da cepa é característico dos estreptobacillus, a cepa possui tamanho aproximado de 1,4µm de diâmetro e 2,7µm de comprimento.

Figura 15. Imagem de microscópio óptico da Cepa 17.

Figura 16. Imagem de microscópio óptico Coloração de Gram para a Cepa 17.

A coloração de Gram realizada para a cepa 17 apresentada na Figura 18, permitiu classificar a bactéria como Gram-positiva.

As três bactérias apresentaram coloração violeta quando submetidas à coloração de Gram. Isto constatou que os três microrganismos são Gram-positivos, e apresentam parede celular composta por diversas camadas de peptidoglicanos.

5.1.4 Identificação por espectrometria de massas MALDI-TOF

A identificação das três cepas isoladas do rejeito de mineração foi realizada pela técnica de espectrometria de massa MALDI-TOF. A partir de uma colônia de células, colocada previamente em uma placa, o equipamento gerou um espectro de proteínas para cada espécie. Os espectros de proteínas obtidos para cada cepa são apresentados nas Figura 17, 18 e 19.

Figura 17. Espectro de proteínas obtido pela técnica de MALDI-TOF para a cepa número 8.

Figura 18. Espectro de proteínas obtido pela técnica de MALDI-TOF para a cepa número 12.

Figura 19. Espectro de proteínas obtido pela técnica de MALDI-TOF para a cepa número 17.

Os espectros de proteínas funcionam como uma impressão digital (*fingerprinting*) para cada espécie. Desta maneira diferentes microrganismos apresentam diferentes espectros de massa (BALTAZAR, 2017). Os espectros obtidos foram comparados com espectros previamente identificados e depositados em um banco de dados.

A classificação foi realizada mediante uma comparação de padrões fornecidos pelo fabricante Biotyper MALDI-TOF, com o qual é possível determinar pontuações para cada uma das cepas analisadas. A partir desta comparação de espectros foram obtidas as pontuações mostradas na Tabela Tabela 12. As análises foram realizadas em duplicata para as cepas número 8, 12 e 17.

Tabela 12. Resultados da identificação das cepas isoladas pela técnica de MALDI-TOF.

Identificação	Organismo	Pontuação	Organismo	Segunda melhor pontuação
Cepa 8	<i>Bacillus pumilus</i>	1,883	Identificação não confiável	1,679
Cepa 8	Identificação não confiável	1,472	Identificação não confiável	1,459
Cepa 12	<i>Bacillus licheniformis</i>	2,114	Identificação não confiável	1,691
Cepa 12	<i>Bacillus licheniformis</i>	1,963	Identificação não confiável	1,652
Cepa 17	<i>Bacillus subtilis</i>	2,151	<i>Bacillus subtilis</i>	2,142
Cepa 17	<i>Bacillus subtilis</i>	2,238	<i>Bacillus subtilis</i>	2,220

Para a cepa 8, pode ser observado que a maior pontuação obtida foi de 1,883. Esta pontuação permitiu classificar a cepa dentro do gênero dos *Bacillus*. Para determinação da espécie a pontuação obtida permitiu classificar a amostra pertence à espécie *pumilus*, porém com um nível de confiabilidade baixo.

Na identificação da cepa 12 pela técnica de MALDI-TOF foi obtida pontuação de 2,114 considerada de alto nível de confiabilidade na identificação para gênero e para espécie da bactéria *Bacillus licheniformis*.

Na identificação da cepa 17 o valor obtido foi de 2,238, considerada pontuação de alta confiabilidade para o gênero e a espécie *B. subtilis*. Na Tabela 13 apresenta-se o resumo dos resultados de identificação realizada pela técnica de MALDI-TOF para as três cepas isoladas.

Tabela 13. Resumo da identificação das cepas pela técnica de MALDI-TOF

Cepa	Bactéria	ID
8	<i>Bacillus pumilus</i>	1,883
12	<i>B. licheniformis</i>	2,114
17	<i>Bacillus subtilis</i>	2,238

5.1.5 Sequenciamento do gene 16s - RNA

A fim de confirmar a identificação das cepas isoladas realizou-se a identificação molecular por amplificação do gene 16s. As sequencias obtidas para as cepas número 8, 12 e 17 são apresentadas na Tabela 14.

Tabela 14. Sequências obtidas para as cepas 8,12 e 17.

Cepa	Sequência
8	<p>GACGAAagTCTGACGGAGCaACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTC GGATCGTAAAGCTCTGTTGTtagGGAAGAACAAGTGCGAGAGTAACT GCTCGCACCTTGACGGtACctAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGT GCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGgaaTT ATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAA AGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGAAACTTG AGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAaTTCCACGTGTAGCGGTGAAATGC</p>
12	<p>TCTGACGGAGCaACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTA AAACTCTGTTGttAGGGaaGAACAAGTACCGTTTGAATAGGGCGGCAC CTTGACGgtACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAG CCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCggaAttattgGGCGTAA AGCGCGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCT CAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGA GGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTgga ggaaCACCAGTGCGGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGA GGCGCGAAAGCG</p>
17	<p>TTTCACCGCTACACGTGGAATTCCACTCTCCTtctttgcactcaaGTTCCCC AGTTTCCAATGACCCTCCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAG ACTTAAGAAACcgCcTGcgAGCCCTTTACGCCCAATAATTCCGGACAA CGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCAGGTAGTTAGCC GTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTACCGCCCTATTCGAACG GTACTTGTCTTCCCTAACAACagagCTTTACGATCCGAAAACCTTCAT CACTCACGCGGCGTTGCTCCGTGAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGA TTCCCTACTGCAGCCACCCGTAGGAA</p>

As sequências obtidas na amplificação do gene 16s foram utilizadas para realizar uma pesquisa na base de dados NCBI, a fim de determinar as espécies com maior porcentagem de similaridade na sequência.

Para a cepa número 8 a sequência obtida permitiu identificar a cepa como pertence ao gênero *Bacillus pumilus* com 100% de similaridade com cinco cepas armazenadas na base de dados da NCBI. Na Tabela 15 é apresentada a identificação da cepa número 8.

Tabela 15. Identificação da cepa 8 pela técnica de sequenciamento 16s.

Descrição	Cepa 8			Identificação	Número de Acesso
	Max Pontuação	Pontuação Total	E Valor		
<i>Bacillus pumilus</i> m414	597	597	4e-167	100%	KU230026.1
<i>Bacillus pumilus</i> m363	597	597	4e-167	100%	KU230024.1
<i>Bacillus pumilus</i> m350	597	597	4e-167	100%	KU230023.1
<i>Bacillus pumilus</i> m116	597	597	4e-167	100%	KU230020.1
<i>Bacillus pumilus</i> mv81	597	597	4e-167	100%	KU230019.1

Para a cepa número 12, identificou-se 100% de similaridade no gene 16s com a espécie *Bacillus licheniformis* e com a espécie *Bacterium Bel*. Na Tabela 16 pode ser observada os resultados da sequencia para a cepa número 12.

Tabela 16. Identificação da cepa 12 pela técnica de sequenciamento 16s.

Descrição	Cepa 12			Identificação	Número de Acesso
	Max Pontuação	Pontuação Total	E Valor		
<i>Bacillus licheniformis</i> BGR 151	717	717	0.0	100%	KT074461.1
<i>Bacterium Bel</i> B9-16S	717	717	0.0	100%	KT382404.1
<i>Bacillus licheniformis</i> HRBL-15TDI7	717	5707	0.0	100%	CP014781.1

Nos resultados da cepa 17, apresentados na Tabela 17, a pesquisa encontrou regiões do gene 16s pertencentes às espécies *Bacillus subtilis*, *Bacillus mojavensis* e *Bacillus sp.* As três bactérias apresentaram 99% de similaridade.

Tabela 17. Identificação da cepa 17 pela técnica de sequenciamento 16s.

Cepa 17					
Descrição	Max Pontuação	Pontuação Total	E valor	Similaridade	Número de Acesso
<i>Bacillus subtilis</i> IHB B 4644	651	651	0.0	99%	KF475875.1
<i>Bacillus mojavensis</i> JG5	651	651	0.0	99%	KC415242.0
<i>Bacillus subtilis</i> WP1-21	651	651	0.0	99%	AY162129.1
<i>Bacillus subtilis</i> HAZ14	651	651	0.0	99%	AY162128.1
<i>Bacillus</i> sp E287	649	649	0.0	99%	FJ430065.1

Ao comparar as duas técnicas de identificação molecular (Tabela 18), foi possível observar que para as três cepas (8,12 e17) houve 100% de similaridade nos resultados obtidos. A cepa 8 foi identificada como pertence ao gênero *Bacillus pumilus*, a cepa 12 foi identificada como pertencente ao gênero *Bacillus licheniformis* e a cepa 17 foi classificada como do gênero dos *Bacillus subtilis*.

Tabela 18. Comparação dos resultados obtidos na identificação das cepas.

Cepa	Identificação	
	MALDI-TOF	Sequenciamento gene 16s
8	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Bacillus pumilus</i>
12	<i>B. licheniformis</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>
17	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>

As três cepas identificadas mediante as técnicas de MALDI-TOF e o sequenciamento 16s, pertencem ao gênero dos *Bacillus*. Os três microrganismos apresentaram formato de bacilos, sendo que a cepa *B. pumilus* e *B. licheniformis*

apresentaram formato característico de bacilo simples, enquanto que a cepa *B. subtilis* apresentou formato de bacilo do tipo estreptobacilo.

As células bacterianas podem ocorrer individualmente ou em colônias com tamanhos que variam de 0,2 a 2µm de diâmetro e de 2 a 8µm de comprimento. Existem três formatos básicos de bactérias: cocos, bacilos e helicoidais (LOPES, SÔNIA GODOY BUENO CARVALHO; BRANDIMARTE, ANA LUCIA; HO, FANLY FUNGYI CHOW; LAHR, 2014).

Das três cepas identificadas no presente estudo, a única cepa que apresenta estudos relacionados com degradação de cianeto é a cepa *Bacillus pumilus* (MEYERS et al., 1991), (JANDHYALA et al., 2003), (CRUM; TREVOR SEWELL; BENEDIK, 2016), A cepa *B. pumilus* é uma bactéria Gram-positiva, aeróbia e não patogênica. Cepas de *B. pumilus* tem sido usadas a nível industrial principalmente na produção de pesticidas (SKERMAN; MCGOWAN; SNEATH, 1980)

A bactéria *B. licheniformis* é um organismo Gram-positivo, saprófito, não patogênico, aeróbio e formador de endósporos, pode ser encontrada tanto no solo como em ambientes aquáticos (PALLADINO, 2008). Esta bactéria tem sido usada na produção industrial de protease alcalina, que é um tipo de enzima com ampla gama de aplicações biotecnológicas na manufatura de alimentos, fabricação de detergentes, processamento de cor e na indústria farmacêutica (AL-SHEHRI; MOSTAFA, 2004; SAYEM; ALAM; HOQ, 2006; VEITH et al., 2004).

A bactéria *B. subtilis* é um bacilo considerado como organismo modelo de estudo entre os Gram-positivos, é um dos organismos melhor caracterizados por estudos bioquímicos, genéticos e moleculares (MANABE et al., 2011; VOJCIC et al., 2012).

A alta taxa de crescimento, a capacidade de secreção de proteínas e sua condição de GRAS “geralmente considerado como seguro” o converte em um microrganismo atraente para uso industrial. O gênero *B. Subtilis* tem sido estudado na produção industrial de enzimas e de metabolitos com aplicação industrial como agente de controle biológico (DUBEY; HOLMES, 1995; POTOT, 2010).

5.2 Análise da biomassa

Os resultados obtidos das medidas de densidade óptica no comprimento de onda $\lambda=600\text{nm}$ (OD_{600}) durante 30 horas, em $\text{pH}=7$, temperatura 37°C e 190rpm de

agitação são apresentados na Figura 20. O meio de cultura empregado foi o LB líquido, sendo a proporção de inóculo na relação 1:500.

É possível observar que na cepa *B. pumilus* (Figura 20a) a fase de aceleração iniciou após meia hora de cultivo. O crescimento da fase exponencial aconteceu entre a hora 0,5 e 8 de cultivo. A maior densidade óptica na fase de crescimento exponencial foi de $OD_{600} = 1,25$ após 7,5 horas de cultivo.

Na cepa *B. licheniformis* (Figura 20b) o crescimento foi mais lento quando comparado com o crescimento das outras cepas. A fase exponencial iniciou após duas horas de cultivo e transcorreu durante dez horas. Após doze horas de crescimento a OD_{600} foi de 1,35.

Para a cepa *B. subtilis* (Figura 20c) a fase de crescimento exponencial começou a partir da primeira hora de cultivo e aconteceu até a hora 7 de cultivo quando o valor de OD_{600} foi de 0,99.

a)

b)

c)

Figura 20. Crescimento celular com medida de densidade óptica para as cepas: a) *Bacillus pumilus*. b) *Bacillus licheniformis*. c) *Bacillus subtilis*.

Avaliando o perfil de crescimento obtido pela técnica de densidade óptica para as três cepas foi possível observar que na cepa *B. pumilus* o crescimento ocorreu

numa velocidade maior em comparação com as outras duas cepas estudadas (Figura 21).

Figura 21. Comparação da densidade óptica para as três bactérias.

Observou-se, que o maior tempo de crescimento exponencial foi para a bactéria *B. licheniformis* e teve duração de dez horas enquanto que na bactéria *B. subtilis* a fase de crescimento exponencial apresentou duração de seis horas.

A densidade óptica por si só não permite determinar um valor de crescimento exato, pois é uma medida indireta do crescimento bacteriano. Além disso, o fato de ser uma medida da turbidez do meio de cultivo não permite diferenciar entre células vivas e células mortas participantes no processo biológico. A medição da densidade óptica é uma técnica de medição rápida e, quando associada à medida de massa seca, permite estabelecer a quantidade de biomassa disponível em função do tempo.

Sendo assim, as medidas de densidade óptica permitiram ter uma ideia preliminar do crescimento bacteriano para cada uma das cepas, assim como também, permitiram determinar a velocidade de crescimento para cada uma das cepas.

Em todo bioprocessamento a medição e determinação da concentração de biomassa é fundamental pois normalmente se deseja maximizar o crescimento da biomassa e aumentar a atividade bacteriana (TONSO, 2011).

Os estudos de crescimento celular permitiram avaliar a cinética de crescimento para as cepas *B. pumilus*, *B. licheniformis* e *B. subtilis*. Por meio destes estudos foi possível definir parâmetros importantes para o processo, tais como quantidade de biomassa produzida, velocidade específica de crescimento e número de células viáveis que participam no processo biológico.

Para analisar essas variáveis são construídas curvas de crescimento celular através do estudo da densidade óptica (OD_{600}), da massa seca e da unidade formadora de colônias (UFC). Com as curvas de crescimento é possível determinar as fases de crescimento bacteriano (Figura 22).

Figura 22. Fases do crescimento bacteriano. (1) fase lag; (2) fase de aceleração; (3) fase exponencial; (4) fase de desaceleração; (5) fase estacionária e (6) fase de declínio (LOPES, SÔNIA GODOY BUENO CARVALHO; BRANDIMARTE, ANA LUCIA; HO, FANLY FUNGYI CHOW; LAHR, 2014)

As quatro fases principais são as fases Lag, exponencial, estacionária e a fase de declínio. As outras três fases são consideradas de fases de transição.

O objetivo desta etapa foi definir o período de tempo para cada bactéria no qual aconteceu a fase exponencial. A fase exponencial é o período onde as células começam a se dividir e o número de células na população aumenta exponencialmente.

No presente trabalho a eficiência na degradação de cianeto depende da avaliação preliminar do cultivo bacteriano e da definição das condições de crescimento com maior concentração celular de cada uma das bactérias. A seguir são apresentados os resultados obtidos do estudo de crescimento bacteriano.

5.2.1 Velocidade de crescimento

Com as medidas de densidade óptica (OD_{600}), foi realizado a determinação da velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) para cada as bactérias estudadas.

Os valores de $\mu_{\text{máx}}$ correspondem à máxima inclinação obtida na fase de crescimento exponencial das medidas da densidade óptica e foram determinadas através da construção do gráfico $\text{Ln}(\text{Abs.})$ em função do tempo.

O valor de $\mu_{\text{máx}}$ pode ser obtido do coeficiente angular da reta ajustada aos dados experimentais na fase exponencial se crescimento conforme a Equação 32.

$$\text{Ln}(\text{Abs.}) = \mu_{\text{máx}}.t \quad \text{Equação 32}$$

Nas Figura 23 é apresentado o gráfico utilizado para a determinação da velocidade máxima $\mu_{\text{máx}}$ das bactérias *B. pumilus*, *B. licheniformis* e *B. subtilis*. Pode ser observado que não existe diferença significativa entre a velocidade máxima de crescimento das bactérias *B. pumilus* e *B. subtilis*, $0,89\text{h}^{-1}$ e $0,87\text{h}^{-1}$ respectivamente.

A velocidade de crescimento obtida para a bactéria *B. licheniformis* foi de $0,78\text{h}^{-1}$ apresentando o menor valor de velocidade de crescimento na fase exponencial.

Os valores do coeficiente de correlação (R^2) das regressões lineares foram de 0,953 para *B. pumilus*, 0,918 para *B. licheniformis* e 0,959 para *B. subtilis*, indicando um bom ajuste aos dados experimentais.

a)

b)

c)

Figura 23. Velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) para as cepas: a) *Bacillus pumilus*. b) *Bacillus licheniformis*. c) *Bacillus subtilis*.

5.2.2 *Massa seca*

A medida da massa seca permitiu estabelecer a concentração celular para cada uma das cepas em um determinado intervalo de tempo. A concentração celular é expressa em gramas de biomassa contida em um litro de cultivo bacteriano (gL^{-1}).

Na Figura 24 é possível observar as curvas de crescimento para as três cepas bacterianas usando como medida a quantidade de massa seca produzida. A bactéria *B. licheniformis* (Figura 24b) foi a que apresentou maior concentração de biomassa na fase exponencial dentre as três bactérias, atingido o valor de $1,140\text{gL}^{-1}$ de massa produzida durante as primeiras seis horas de cultivo bacteriano. As cepas *B. pumilus* (Figura 24a) e *B. subtilis* (Figura 24c) apresentaram quantidades de massa seca produzida muito similar com valores de $0,869$ e $0,820\text{gL}^{-1}$, respectivamente.

(a)

(b)

(c)

Figura 24. Curvas de crescimento em função da massa seca: a) *Bacillus pumilus*. b) *Bacillus licheniformis*. c) *Bacillus subtilis*.

A cepa *B. licheniformis*, além de apresentar a maior produção de biomassa, também se caracterizou por atingir valores maiores de biomassa em intervalos de tempo mais curtos, quando comparado com *B. pumilus* e *B. subtilis*. A bactéria *B. licheniformis* conseguiu produzir em cinco horas a quantidade de biomassa que as

outras duas cepas produziram em dez horas (Figura 25). A *Bacillus licheniformis* produziu aproximadamente 1gL^{-1} em apenas cinco horas, enquanto que a *B. pumilus* e a *B. subtilis* produziram $0,5$ e $0,6\text{gL}^{-1}$ de biomassa nas mesmas cinco horas, respectivamente.

Figura 25. Produção de biomassa para as três cepas bacterianas.

A determinação da quantidade de biomassa produzida por cada uma das cepas permitiu estabelecer que a cepa *B. licheniformis* requereu menor tempo de crescimento nas condições estabelecidas (pH 7, 37°C e 190rpm).

Com os resultados da densidade óptica e da massa seca foi possível determinar as fases de crescimento para as três bactérias. Na Tabela 19 apresenta-se o resumo com as principais características de crescimento celular para as três bactérias.

Tabela 19. Resumo dos dados de crescimento bacteriano

	<i>B. pumilus</i>		<i>B. licheniformis</i>		<i>B. subtilis</i>	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
Fase Exponencial (h)	0,5	5	1	6	1	7
OD ₆₀₀	0,074	0,976	0,036	1,357	0,058	0,996
Biomassa produzida (g/L ⁻¹)	0,045	0,869	0,056	1,140	0,220	0,820
μ _{máx.} Crescimento (h ⁻¹)	0,897		0,780		0,872	

A bactéria *B. licheniformis* apresentou maior produção de biomassa durante a fase exponencial (1,140g/L⁻¹) comparada com a *B. pumilus* (0,869 g/L⁻¹) e *B. subtilis* (0,820 g/L⁻¹). Estes valores de produção de biomassa foram relacionados com a densidade óptica para definir as condições de crescimento e preparação de biomassa nos ensaios de degradação de cianeto.

5.2.3 Curva de massa seca correlacionada com absorbância

As medidas de absorbância correlacionadas com as de massa seca permitiram determinar de maneira rápida e simples a quantidade de biomassa produzida pela bactéria em função do tempo.

A cinética de crescimento foi estudada por meio da relação entre a absorbância no comprimento de onda 600nm e da quantidade de massa seca produzida em função do tempo. Na Figura 26 apresentam-se as medidas de absorbância correlacionadas com a massa seca para as cepas *B. pumilus*, *B. licheniformis* e *B. subtilis*.

(a)

(b)

(c)

Figura 26. Correlação da densidade óptica (OD₆₀₀) com a massa seca para as bactérias: a) *B. pumilus*; b) *B. licheniformis* e c) *B. subtilis*.

Os coeficientes de correlação (R^2) das regressões lineares foram acima de 0,9 para as cepas *B. pumilus* e *B. subtilis* e 0,87 para *B. licheniformis*, indicando um bom ajuste com os dados experimentais.

As equações de correlação linear obtidas para cada uma das bactérias são apresentadas na Tabela 20

Tabela 20. Resumo dos resultados de correlação entre OD₆₀₀ e massa seca.

Bactéria	Função	R ²	Quantidade de biomassa para OD (0,8) (gL ⁻¹)
<i>B. pumilus</i>	$Y = 0,788x + 0,0906$	0,98	0,721
<i>B. licheniformis</i>	$Y = 0,758x + 0,2042$	0,87	0,781
<i>B. subtilis</i>	$Y = 0,776x + 0,1456$	0,93	0,766

5.3 Ensaios de adaptação a ambiente alcalino

Visando a degradação de cianeto em soluções alcalinas foram realizados testes com diferentes meios de cultura para definir o meio de trabalho nos ensaios de degradação de cianeto.

Foi necessário realizar uma etapa adicional de adaptação ao pH, pois os testes de crescimento realizados em soluções alcalinas não apresentaram crescimento bacteriano.

5.3.1 Crescimento em pH 8.0

Os ensaios de adaptação a soluções alcalinas foram realizados a partir dos cultivos realizados em pH 7. O crescimento bacteriano foi acompanhado por medidas de densidade óptica e de crescimento celular. Na Figura 27 são apresentados os resultados de crescimento celular em pH 8 para as três bactérias.

Para a cepa *B. pumilus* (Figura 27a) a fase de aceleração iniciou após quatro horas de cultivo. O crescimento da fase exponencial aconteceu entre a hora 4 e 10 de cultivo. A densidade óptica atingiu valores de OD₆₀₀ = 1,60 após seis horas de cultivo. O número de células viáveis após 10 horas de cultivo, maior valor de OD, foi de 4×10^{15} cel mL⁻¹.

Na cepa *B. licheniformis* (Figura 27b) o crescimento foi mais lento quando comparado com o crescimento das outras cepas. A fase exponencial iniciou após quatro horas de cultivo e transcorreu durante seis horas. Após seis horas de crescimento a OD₆₀₀ foi de 1,50 e o número de células viáveis por mL foi de $6,8 \times 10^{11}$.

Para a cepa *B. subtilis* (Figura 27c) a fase de crescimento exponencial começou a partir de quatro horas de cultivo e a fase de crescimento exponencial aconteceu até a hora 10 de cultivo quando o valor de OD₆₀₀ foi de 1 e o número de células viáveis foi da ordem de $2,5 \times 10^{11}$.

Observou-se que em condições de pH 8 o crescimento das bactérias foi muito mais lento que o crescimento apresentando em pH 7. Ao mesmo tempo foi observado que os valores de densidade óptica foram maiores que os apresentados em pH 7. A bactéria *B. pumilus* apresentou o maior OD e ao mesmo tempo a maior concentração celular, com $4 \times 10^{15} \text{ cel mL}^{-1}$ enquanto que nas bactérias *B. licheniformis* e *B. subtilis* a ordem de grandeza foi de 10^{11} .

a)

b)

c)

Figura 27. Crescimento bacteriano em pH 8.0 das cepas a) *B. pumilus*, b) *B. licheniformis* e c) *B. subtilis*.

5.3.2 Crescimento em pH 9.

Na Figura 28 são apresentados os resultados de crescimento celular em pH 9 para as três bactérias.

Para a cepa *B. pumilus* (Figura 28a) a fase de aceleração iniciou após 7,5 horas de cultivo. O crescimento da fase exponencial aconteceu no intervalo de tempo entre a hora 7,5 e 12,5 do cultivo. A densidade óptica atingiu valores de $OD_{600} = 1,25$ após 12,5 horas de cultivo. O número de células viáveis durante a fase de crescimento exponencial foi de $2,4 \times 10^{14} \text{ cel.mL}^{-1}$.

Na cepa *B. licheniformis* (Figura 28b) a fase exponencial iniciou após 7,5 horas de cultivo e transcorreu durante cinco horas. Após estas 12,5 horas de cultivo o valor de OD_{600} foi de 0,44. Neste intervalo de tempo a maior concentração de células viáveis foi de $1,2 \times 10^{12} \text{ cel.mL}^{-1}$. Pode ser observado que após a fase de crescimento exponencial a OD continuo aumentando, porém, o número de células viáveis no apresentou o mesmo crescimento, isto indica que a maior quantidade de células viáveis para pH 9 se encontram em valores de OD igual a 0,44.

Para a cepa *B. subtilis* (Figura 28c) foi observado um crescimento irregular ao comparar o valor de OD_{600} com o número de células viáveis. A fase de crescimento exponencial em função do número de células viáveis começou a partir de seis horas de cultivo e terminou na hora 17 com concentração celular de $3 \times 10^9 \text{ cel.mL}^{-1}$, porém os valores de OD_{600} neste intervalo de tempo não apresentaram aumento.

Observou-se que em condições de pH 9 o crescimento da fase exponencial acontece após 7,5 horas para a *B. pumilus* e *B. licheniformis* e de 6 horas para a *B. subtilis*.

a)

b)

c)

Figura 28. Crescimento bacteriano em pH 9 das cepas a) *B. pumilus*, b) *B. licheniformis* e c) *B. subtilis*

5.3.3 Crescimento em pH 10.

Para a cepa *B. pumilus* (Figura 29a) a fase de crescimento exponencial aconteceu no intervalo de tempo entre a hora 14 e 26 de cultivo. O valor de densidade óptica na hora 26 de cultivo foi de $OD_{600} = 2,4$ e o número de células viáveis durante a fase de crescimento exponencial foi de $1,2 \times 10^{12} \text{ cel mL}^{-1}$.

Na cepa *B. licheniformis* (Figura 29b) a fase exponencial iniciou após 6 horas de cultivo e o crescimento continuou até a hora 22, período no qual o valor de OD_{600} foi de 2,26. Neste intervalo de tempo a maior concentração de células viáveis foi de $4 \times 10^8 \text{ cel mL}^{-1}$.

Para a cepa *B. subtilis* (Figura 29c) a fase de crescimento começou a partir de doze horas de cultivo e terminou na hora 22 com concentração celular de $4 \times 10^{12} \text{ cel mL}^{-1}$, o valor de OD_{600} neste intervalo de tempo foi de 2,6.

a)

b)

c)

Figura 29. Crescimento bacteriano em pH 10 das cepas a) *B. pumilus*, b) *B. licheniformis* e c) *B. subtilis*

Observou-se que em condições de pH 10 o tempo de crescimento empregado pelas bactérias aumenta consideravelmente. A fase de crescimento exponencial, fase de interesse no estudo, acontece após doze horas para as bactérias

B. pumilus e *B. subtilis*. Enquanto que para bactéria *B. licheniformis* acontece após seis horas.

Esses tempos de crescimento obtidos na fase de adaptação a pH 10 serão levados em consideração para realizar o crescimento das bactérias que servira como inóculo na etapa de degradação de cianeto.

5.4 Estudo de degradação bacteriana de cianeto

Os estudos de degradação bacteriana visaram avaliar a influência da temperatura e agitação sobre a degradação bacteriana de cianeto. A solução sintética empregada foi preparada com concentração de 500mgL^{-1} de CN^- e o pH da solução ajustado para 10. As variáveis avaliadas foram temperatura e a velocidade de rotação.

O efeito da temperatura na degradação bacteriana para as cepas *B. pumilus*, *B. licheniformis* e *B. subtilis* foi estudada em três faixas distintas de temperaturas (37, 32 e 27°C). Os experimentos foram realizados usando 190rpm de velocidade de agitação e concentração de 500mgL^{-1} de cianeto. O pH inicial da solução sintética foi de 10 e durante o ensaio não houve ajuste do pH.

Para avaliar as espécies de cianeto livre formadas em solução aquosa foi realizado o diagrama de predominância para o cianeto de potássio, conforme apresentado na Figura 30.

Figura 30. Diagrama de predominância para o cianeto de potássio em água, KCN – H₂O temperatura de 25°C.

Na Figura 30, pode-se observar que o cianeto de potássio em solução aquosa pode formar as espécies ácido cianídrico (HCN) e o ânion (CN⁻) principalmente. Em valores de pH igual ou menor a 9.4 a predominância do sistema é a formação de ácido cianídrico. 100% do cianeto livre em solução se encontra na forma de HCN. Para diminuir a formação de ácido cianídrico é necessário manter a solução em valores de pH entre 10 e 11, onde 100% do cianeto livre se encontra na forma da espécie CN⁻.

A partir Figura 30 pode-se observar que para o valor de pH empregado nos ensaios de degradação bacteriana de cianeto, pH 10, a predominância é pela formação de CN⁻. Porém, deve-se ter controle rigoroso do pH para assim evitar a formação de HCN.

Na fase de adaptação à ambientes alcalinos, nenhuma das três cepas apresentou tolerância e crescimento em valores de pH acima de 10, motivo pelo qual se decidiu trabalhar em pH 10.

Os primeiros ensaios de degradação de cianeto foram realizados utilizando as condições de trabalho obtidas na fase de crescimento bacteriano com maior concentração celular, isto é, temperatura de 37°C e 190rpm de agitação. Posteriormente foram realizados ensaios com diminuição da temperatura e com variação da velocidade de agitação.

5.4.1.1 Degradação de cianeto com *B. pumilus*.

Temperatura de 37°C e velocidade de rotação de 190 e 65rpm.

Como pode ser observado na Figura 31, após cinco dias de ensaio, ainda existia presença de cianeto na solução. Para a velocidade de rotação de 190rpm a concentração final de cianeto foi de 78mgL^{-1} enquanto que para a velocidade de rotação de 65rpm a concentração final de cianeto foi de 102mgL^{-1} .

As concentrações finais de cianeto apresentaram diferenças de apenas 24mgL^{-1} de cianeto livre nas duas condições avaliadas. A porcentagem de degradação apresentou diferença de 4,8% entre as duas condições de trabalho (65 e 190rpm) motivo pelo qual pode-se afirmar que a velocidade de rotação não foi fator fundamental para a degradação de cianeto quando avaliada a bactéria *B.pumilus* a 37°C.

Figura 31. Degradação de cianeto para *B. pumilus* a temperatura de 37°C e velocidade de rotação de 190 e 65rpm.

Por outro lado, foi observado que os controles apresentaram taxas de volatilização de aproximadamente 60% de cianeto livre. Para a velocidade de rotação de 190rpm a taxa de volatilização de cianeto no controle foi de 64,2% contra 84,4%

de degradação no ensaio com bactéria. Desta maneira observou-se que aproximadamente 20% da degradação do cianeto aconteceu por ação bacteriana, enquanto que a maioria de cianeto volatilizou naturalmente.

Quando realizados os ensaios a 65rpm, a quantidade de cianeto volatilizada no controle foi menor, 59,6%. Na amostra com a bactéria a degradação final de cianeto foi de 79,6% representando uma diferença de degradação de cianeto entre o controle e a ação bacteriana de 20%.

No entanto, é possível observar que nos primeiros três dias a degradação bacteriana apresentou taxas maiores de degradação. A concentração de cianeto após três dias de ensaio para 190rpm foi de 164mgL^{-1} e 335mgL^{-1} no ensaio com bactéria e no controle, respectivamente. Para a rotação de 65rpm a concentração final de cianeto é 207mgL^{-1} na solução bacteriana e 346mgL^{-1} no controle.

Na Figura 32 observa-se que o comportamento da cepa *B. pumilus* a 37°C apresentou a mesma tendência de degradação do cianeto nas duas velocidades de rotação.

Figura 32. Porcentagem de degradação de cianeto para *B. pumilus* a 37°C e velocidade de rotação e 190 e 65rpm.

A máxima porcentagem de degradação de cianeto foi de 84,5%, o qual aconteceu nos ensaios realizados a 190rpm. A taxa de degradação de cianeto a 65rpm foi de 79,6%.

Observou-se que as taxas de degradação para a bactéria foram muito próximas nas duas condições avaliadas, com diferença de apenas 5 pontos percentuais.

Temperatura de 32°C e velocidade de rotação de 190 e 65rpm.

Na Figura 33 são apresentados os resultados obtidos nos ensaios de degradação da bactéria *B. pumilus* a 32°C e velocidades de rotação de 190 e 65rpm. Dos resultados obtidos nos ensaios foi possível observar que na temperatura de 32°C a bactéria *B. pumilus* não conseguiu degradar a totalidade do cianeto presente na solução.

Figura 33. Degradação de cianeto para *B. pumilus* a temperatura de 32°C e velocidade de rotação de 190 e 65rpm

Nos ensaios a 190rpm, após cinco dias, a solução com bactéria apresentou 82,5mgL⁻¹ de cianeto remanescente, enquanto que no controle havia 287mgL⁻¹. A diferença entre a degradação bacteriana de cianeto e a taxa de volatilização de cianeto no controle foi de 205mgL⁻¹. A porcentagem de degradação na solução com bactéria foi de 84% contra 42% volatilizado no controle, desta maneira a bactéria foi responsável por 42% de degradação bacteriana e o restante 42% foi volatilizado naturalmente.

Para os ensaios a 65rpm, a concentração final de cianeto foi de 97,3mgL⁻¹ na solução com bactéria e 204mgL⁻¹ no controle, apresentando diferença de

degradação do cianeto de 107mgL^{-1} . Em termos de porcentagem degradação bacteriana foi de 81% e a volatilização foi de 60%. Desta maneira a taxa efetiva de degradação bacteriana foi de 21%.

Na Figura 34 são apresentadas as porcentagens de degradação total de cianeto para a cepa *B. pumilus* a 32°C nas velocidades de rotação de 190rpm e 65rpm.

Figura 34. Porcentagem de degradação de cianeto para *B. pumilus* a 32°C e velocidade de rotação e 190 e 65rpm.

As taxas de degradação de cianeto para 190 e 65rpm foram próximas e mantiveram o mesmo comportamento durante o ensaio. Não houve incremento na degradação de cianeto em função da velocidade de rotação. A única diferença observada em função da velocidade de rotação tem a ver com a menor taxa de volatilização do cianeto no controle quando a velocidade de rotação foi de 190rpm.

Temperatura de 27°C e velocidade de rotação de 190 e 65rpm.

Os resultados apresentados na Figura 35 mostraram que para a cepa *B. pumilus* em temperatura de 27°C a taxa de degradação de cianeto livre foi de 100% nas duas condições de agitação.

Figura 35. Degradação de cianeto para *B. pumilus* a temperatura de 27°C e velocidade de rotação de 190 e 65rpm.

Foi possível observar também, que nos ensaios realizados com velocidade de rotação de 65rpm e após doze horas de ensaio houve remoção de 390 mgL⁻¹ de cianeto livre, equivalente a 78% de degradação (Figura 36). A degradação total de cianeto nessas condições aconteceu em três dias de ensaio. No entanto, após 24 horas de ensaio 93% do cianeto tinha sido degradado.

Na Figura 35 também pode ser observado que, com velocidade de agitação de 190rpm, a cepa *B. pumilus* conseguiu degradar 433mgL⁻¹ de cianeto durante as primeiras doze horas de ensaio, o que equivale a 86% do cianeto inicial (Figura 36). Para degradar a totalidade do cianeto foram necessários quatro dias de ensaio, sendo que no terceiro dia 99% do cianeto estava degradado.

O controle apresentou volatilização de cianeto de 34% durante os cinco dias de ensaio a 190rpm. Para a velocidade de rotação de 65rpm a volatilização no controle foi de 29%. Nas primeiras 24 horas a degradação no controle foi inferior a 10% nas duas condições de trabalho, sendo 5% para 190rpm e 7% para 65rpm.

Pode-se afirmar que 30% da degradação de cianeto aconteceu por volatilização natural, e os 70% restantes aconteceram por degradação bacteriana.

Figura 36. Porcentagem de degradação de cianeto para *B. pumilus* a 27°C e velocidade de rotação e 190 e 65rpm.

Nos ensaios de degradação de cianeto a 27°C em 190 e 65rpm, determinou-se que a degradação de cianeto apresentou o mesmo comportamento. As taxas de degradação ficaram acima de 90% durante as primeiras 24 horas, como apresentado na Figura 36.

Na Tabela 21 apresenta-se o resumo dos resultados de degradação de cianeto para a bactéria *B. pumilus* para as três temperaturas e duas velocidades de rotação avaliadas.

Tabela 21. Resumo dos resultados de degradação de cianeto para a bactéria *Bacillus pumilus*.

Temp.	Vel. de rotação	Concentração Final CN	Taxa de remoção	Taxa de volatilização	Taxa de degradação bacteriana
°C	rpm	mgL ⁻¹	%	%	%
37	190	78	84,5	64,4	20,1
	65	102	79,6	59,4	20,2
32	190	87	82,5	42,4	40,1
	65	97	80,7	59,4	21,3
27	190	0	100	28	72
	65	0	100	12,8	87,2

A partir da avaliação da influência da velocidade de rotação observou-se que para velocidades de rotação de 65rpm a degradação de cianeto apresentou taxas de degradação próximas das obtidas na velocidade de rotação inicial de 190rpm. Não houve uma tendência definida para a volatilização do cianeto em função da velocidade de rotação, para a velocidade de rotação de 65rpm houve menor volatilização a 27°C e a 37°C, porém a 32°C a menor volatilização aconteceu na velocidade de rotação de 190rpm.

Nas temperaturas de 37°C e 32°C a solução contendo bactérias não conseguiu degradar todo o cianeto durante os cinco dias de ensaio. As taxas de degradação de cianeto nessas temperaturas foram próximas, em torno de 80% de degradação durante os cinco dias.

A cepa *B. pumilus* apresentou a melhor condição de degradação de cianeto na temperatura de 27°C e velocidade de rotação de 65rpm. Nesses parâmetros de trabalho a degradação do cianeto foi de 100% e o tempo empregado foi de três dias.

Nessas mesmas condições de trabalho, e no terceiro dia de ensaio, a taxa de volatilização de cianeto para o controle foi de 12.8%. Desta maneira observou-se que a bactéria foi responsável pela degradação de 87.2% do cianeto livre presente na solução.

É importante também ressaltar que durante as primeiras 24 horas de ensaio, a taxa de degradação de cianeto foi de 93%, o qual pode ser explicado em função da alta concentração celular nesse intervalo de tempo.

5.4.1.2 Degradação de cianeto com *B. licheniformis*.

Temperatura 37°C e velocidade de rotação de 190 e 65rpm.

Os resultados da degradação bacteriana de cianeto para a cepa *B. licheniformis* a 37°C são apresentados na Figura 37. A menor concentração de cianeto livre obtida após cinco dias de ensaio aconteceu quando foi utilizada como velocidade de rotação 190rpm, sendo que a concentração final de cianeto obtida nestas condições foi de 74mgL⁻¹. A concentração de cianeto livre obtida nas mesmas condições de temperatura pero a 65rpm de velocidade de rotação após cinco dias foi de 124mgL⁻¹.

Figura 37. Degradação de cianeto para *B. licheniformis* a temperatura de 37°C e velocidade de rotação de 190 e 65rpm.

O controle apresentou degradação do cianeto em taxas muito próximas das obtidas com a bactéria *B. licheniformis*. Para a velocidade de rotação de 190rpm o controle teve concentração final de 179mgL⁻¹ e quando foi empregada a velocidade de 65rpm a concentração final de cianeto foi de 204 mgL⁻¹.

Em termos de porcentagens a degradação de cianeto para a velocidade de rotação de 190rpm foi de 85.2%, dos quais 64.4% foram atribuídos à volatilização natural que aconteceu no controle. A parcela degradada diretamente pela bactéria foi de 20.8%. Para os ensaios realizados a 65rpm, a degradação foi de 75.2% na solução com bactérias e no controle foi de 59.4%, com apenas 15.8% de degradação por ação bacteriana.

A maior porcentagem de degradação de cianeto para a bactéria *B. licheniformis* a 37°C foi de 85% na velocidade de rotação de 190rpm. Enquanto que para a velocidade de rotação de 65rpm a máxima degradação de cianeto foi de 75%, como pode ser observado na Figura 38.

Ao comparar a degradação de cianeto em função da velocidade de rotação é possível observar que na velocidade de 190rpm a taxa de degradação apresentou aproximadamente 5 pontos percentuais a mais da degradação do que a 65rpm, mesmo com essa diferença, não é possível atribuir a menor volatilização de cianeto à baixa velocidade de rotação, pois as taxas de volatilização foram acima de aproximadamente 60%.

Figura 38. Porcentagem de degradação de cianeto para *B. licheniformis* a 37°C e velocidade de rotação e 190 e 65rpm.

Na Figura 38 pode-se observar que para a cepa *B. licheniformis* na temperatura de 37°C não foi possível degradar o todo o cianeto presente em solução, mesmo em 5 dias e usando duas condições de velocidade diferentes.

Temperatura de 32°C e velocidade de rotação de 190 e 65rpm.

Os resultados obtidos para a *B. licheniformis* em temperatura de 32°C e velocidade de rotação de 190 e 65rpm são apresentados na Figura 39. É possível observar que para a velocidade de rotação de 190rpm a concentração final de cianeto obtida foi de 2,6mgL⁻¹, equivalente a 99.5% de remoção e para a velocidade de rotação de 65rpm, a concentração final de cianeto foi de 107mgL⁻¹, que corresponde a 78.7% de remoção de cianeto.

As taxas de volatilização de cianeto nos controles foram de 42.4% e de 59.4% para as velocidades de rotação de 190rpm e 65rpm respectivamente.

Figura 39. Degradação de cianeto para *B. licheniformis* a temperatura de 32°C e velocidade de rotação de 190 e 65rpm.

Pode ser observado que a taxa de remoção do cianeto foi maior em velocidades de rotação maiores (Figura 40), nessa condição de trabalho a degradação de cianeto foi de 99.5%, dos quais 42.4% degradaram por volatilização natural, sendo que a taxa de degradação de cianeto por ação

bacteriana foi de 55.6%. O tempo empregado para atingir esta degradação foi de cinco dias.

Quando avaliada a degradação de cianeto para a velocidade de rotação de 65rpm, a bactéria apresentou menor taxa de remoção de cianeto, conseguindo degradar apenas 78% no mesmo intervalo de tempo, dos quais 59.4% foram volatilizados no controle, restando 19.3% de degradação bacteriana.

Figura 40. Porcentagem de degradação de cianeto para *B. licheniformis* a 32°C e velocidade de rotação e 190 e 65rpm.

Na Figura 40 pode ser observado que na solução contendo a bactéria *B. licheniformis* houve remoção de 99.5% do cianeto livre presente. A degradação de cianeto em condições de 190rpm e 32°C foram as melhores durante todos os ensaios realizados com a bactéria *B. licheniformis*.

Temperatura de 27°C e velocidade de rotação de 190 e 65rpm.

Os resultados obtidos nos ensaios de degradação bacteriana de cianeto livre para a bactéria *B. licheniformis* a 27°C e velocidades de rotação de 190 e 65rpm são apresentados na Figura 41 onde é possível observar que nenhuma das duas condições conseguiu degradar 100% do cianeto livre.

Figura 41. Degradação de cianeto para *B. licheniformis* a 27°C e velocidade de rotação de 190 e 65rpm.

A concentração final de cianeto livre nos ensaios realizados a 190rpm foi de 107mgL^{-1} , o qual indica que a taxa de remoção de cianeto foi de 78.6%. O controle para este ensaio apresentou 33.7% de volatilização de cianeto, atingindo desta maneira uma taxa de degradação de cianeto de 44.9% por ação bacteriana.

Para a velocidade de rotação de 65rpm, a concentração final de cianeto livre foi de 289mgL^{-1} para uma taxa de degradação de cianeto de 42.2%. Descontando a taxa de volatilização (29.2%), pode-se observar que a degradação por ação direta da bactéria foi de apenas 13%.

Os ensaios realizados com presença da bactéria *B. licheniformis* na temperatura de 27°C apresentaram taxas de remoção de cianeto livre de 79% para velocidade de rotação de 190rpm e de 42% para velocidade de rotação de 65rpm, (Figura 42).

Na velocidade de rotação de 190rpm a taxa de remoção de cianeto foi aproximadamente o dobro da obtida a 65rpm. É importante observar que a taxa de remoção a 65rpm foi muito próxima da atingida no controle, o qual indica que temperaturas baixas (27°C) e baixas velocidades de rotação (65rpm) não favorecem o desempenho da bactéria *B. licheniformis*.

Figura 42. Porcentagem de degradação de cianeto para *B. licheniformis* a 27°C e velocidade de rotação e 190 e 65rpm.

Na Tabela 22 é apresentado o resumo dos resultados de degradação bacteriana de cianeto para a bactéria *B. licheniformis*. É possível observar as taxas de degradação de cianeto foram maiores para a velocidade de rotação de 190rpm em todas as temperaturas avaliadas.

A melhor condição de degradação bacteriana aconteceu na temperatura de 32°C e 190rpm. A taxa de remoção de cianeto nessas condições foi de 99,5%, a concentração final de cianeto foi 2,6mgL⁻¹, valor próximo aos estabelecidos como padrão de lançamento de efluentes no Brasil (1,0mgL⁻¹) (CETESB, 2014).

Tabela 22. Resumo dos resultados da degradação de cianeto para a bactéria *Bacillus licheniformis*.

Temp.	Vel. de rotação	Concentração Final CN	Taxa de remoção	Taxa de volatilização	Taxa de degradação bacteriana
oC	rpm	mgL-1	%	%	%
37	190	74	85,2	64,4	20,8
	65	124	75,2	59,4	15,8
32	190	2,6	99,5	42,4	55,6
	65	107	78,7	59,4	19,3
27	190	107	78,6	33,7	44,9
	65	289	42,2	29,2	13

5.4.1.3 Degradação de cianeto com *B. subtilis*

Temperatura de 37°C e velocidade de rotação de 190 e 65rpm.

Como pode ser observado na Figura 43, após cinco dias de ensaio, para a velocidade de rotação de 190rpm a concentração final de cianeto foi 81mgL⁻¹ enquanto que para a velocidade de rotação de 65rpm a concentração final de cianeto foi 137mgL⁻¹.

As concentrações finais de cianeto apresentaram diferença de 56mgL⁻¹ de cianeto livre nas duas condições avaliadas. A porcentagem de remoção de cianeto foi 83.9% para 190rpm e 62.2% para 65rpm. Os controles apresentaram altas taxas de volatilização ao ser comparados com a remoção final. Os valores das taxas de volatilização foram 64% e 59.4% para 190 e 65rpm respectivamente.

Ao calcular a taxa efetiva de degradação bacteriana foi observado que apenas 19.9% e 2.8% foi degradado por ação bacteriana, a maior parte do cianeto removido aconteceu por volatilização.

Figura 43. Degradação de cianeto para *B. subtilis* a temperatura de 37°C e velocidade de rotação de 190 e 65rpm.

As porcentagens de remoção de cianeto são apresentadas na Figura 44, onde pode ser observado que a maior taxa de degradação de cianeto foi de 83.9%

para a velocidade de rotação de 190rpm. A taxa de remoção de cianeto a 65rpm foi 62.2%.

Figura 44. Porcentagem de degradação de cianeto para *B. subtilis* a 37°C e velocidade de rotação e 190 e 65rpm.

Desta maneira pode-se afirmar que a melhor condição de trabalho para a bactéria *B. subtilis* a 32°C aconteceu a 190rpm de velocidade de rotação.

Nestas condições de trabalho as taxas de volatilização de cianeto dos controles foram de aproximadamente 60%, o que indica que a maior parte do cianeto foi removido em função da volatilização e não da degradação bacteriana.

Temperatura de 32°C e velocidade de rotação de 190 e 65rpm.

Os resultados obtidos para a bactéria *B. subtilis* em temperatura de 32°C e velocidades de rotação de 190 e 65rpm são apresentados na Figura 45. É possível observar que as concentrações finais de cianeto foram muito próximas nas duas condições de trabalho.

Figura 45. Degradação de cianeto para *B. subtilis* a temperatura de 32°C e velocidade de rotação de 190 e 65rpm.

Para a velocidade de rotação de 190rpm a concentração final de cianeto foi de 105gmL⁻¹ e para 65rpm a concentração final de cianeto foi de 119gmL⁻¹.

A porcentagem de remoção foi de 79 e 76,4% para 190 e 65rpm respectivamente, porém foi observado que o controle também apresentou altas taxas de volatilização de cianeto, 42.4% para velocidade de rotação de 190rpm e 59.4% para velocidade de rotação de 65rpm.

Ao descontar a taxa de volatilização da taxa de remoção de cianeto, foi observado que 36.6% foi degradado por ação bacteriana em 190rpm e 17% foi degradação bacteriana em 65rpm.

Na figura 46 apresenta-se a porcentagem de remoção de cianeto livre na solução com bactéria *B. subtilis* a 32°C nas duas velocidades de rotação.

Figura 46. Porcentagem de degradação de cianeto para *B. subtilis* a 32°C e velocidade de rotação e 190 e 65rpm.

É possível observar que a degradação de cianeto nestas condições de trabalho para a bactéria *B. subtilis* apresentou a mesma tendência durante os cinco dias de ensaio, obtendo taxas de remoção próximas a 190 e 65rpm.

Temperatura de 27°C e velocidade de rotação de 190 e 65rpm.

Na Figura 47 são apresentados os resultados obtidos na degradação de cianeto para a *B. subtilis* em temperatura de 27°C. Nas condições de trabalho determinadas para essa etapa, a bactéria conseguiu degradar a totalidade do cianeto livre.

Figura 47. Degradação de cianeto para *B. subtilis* a temperatura de 27°C e velocidade de rotação de 190 e 65rpm.

A melhor taxa de degradação de cianeto para a temperatura de 27°C aconteceu na velocidade de rotação de 65rpm, na qual 100% do cianeto foi degradado em um período de três dias (Figura 48). Para a velocidade de rotação de 190rpm a bactéria *B. subtilis* também degradou 100% do cianeto livre, porém a degradação do cianeto aconteceu em quatro dias.

Figura 48. Porcentagem de degradação de cianeto para *B. subtilis* a 27°C e velocidade de rotação de 190 e 65rpm.

Na Tabela 23 é apresentado o resumo dos resultados de degradação bacteriana de cianeto para a bactéria *B. subtilis*. A melhor condição de degradação bacteriana aconteceu na temperatura de 27°C e 65rpm de velocidade de rotação. A taxa de degradação de cianeto nestas condições foi de 100% durante três dias de ensaio. Para velocidade de rotação de 190rpm também houve degradação de 100% de cianeto, porém esta degradação aconteceu em quatro dias.

É possível observar que na velocidade de rotação de 65rpm as taxas de degradação de cianeto foram maiores que na velocidade de rotação de 190rpm.

Nas faixas de temperatura de 37°C e 32°C a bactéria *B. subtilis* não conseguiu degradar a totalidade do cianeto presente na solução. As melhores taxas de degradação de cianeto aconteceram quando a velocidade de rotação foi de 190rpm. Na temperatura de 27°C a melhor degradação de cianeto foi em velocidade de rotação de 65rpm. A degradação do cianeto em função da velocidade não apresentou o mesmo comportamento, desta maneira não é possível afirmar que a degradação do cianeto é favorecida pela velocidade de rotação.

Tabela 23. Resumo dos resultados de degradação de cianeto para a bactéria *Bacillus subtilis*.

Temp.	Vel. de rotação	Concentração Final CN	Taxa de remoção	Taxa de volatilização	Taxa de degradação bacteriana
(°C)	(rpm)	mgL ⁻¹	%	%	%
37	190	81	83,9	64	19,9
	65	137	62,2	59,4	2,8
32	190	105	79	42,4	36,6
	65	119	76,4	59,4	17
27	190	0	100	27,9	72,1
	65	0	100	12,8	87,2

5.4.2 Influência da temperatura

Os resultados de degradação de cianeto obtidos nas diferentes temperaturas (27°C, 32°C e 37°C) a 190rpm, são apresentados na

Figura 49.

Na

Figura 49a, pode ser observado que a bactéria *B. pumilus* apresentou a melhor taxa de degradação de cianeto em temperaturas de 27°C. Nesta faixa de temperatura a bactéria conseguiu degradar 100% do cianeto em quatro dias.

Para faixas de temperatura de 32 e 37°C a bactéria *B. pumilus* não conseguiu degradar a totalidade do cianeto, mesmo em cinco dias de ensaio, a maior taxa de degradação alcançada foi de 85% de degradação de cianeto para a temperatura de 37°C.

A bactéria *B. licheniformis*

Figura 49b, apresentou a melhor taxa de degradação a temperatura de 32°C, conseguindo degradar 98% de cianeto em um intervalo de tempo de cinco dias.

A bactéria *B. subtilis*

Figura 49c, apresentou a melhor degradação de cianeto na temperatura de 27°C, apresentando 100% de degradação em quatro dias de ensaio.

Foi observado que para as cepas *B. pumilus* e *B. subtilis* a diminuição da temperatura favoreceu a taxa de degradação de cianeto, e, ao mesmo tempo, diminuiu a taxa de volatilização do cianeto nos controles abióticos, O controle abiótico apresentou as menores taxas de volatilização do cianeto para a temperatura de 27°C nas três bactérias.

As melhores taxas de degradação de cianeto a 27°C foram obtidas para as bactérias *B. subtilis* e *B. pumilus* que conseguiram degradar aproximadamente 94% de cianeto após 1 dia de ensaio. A maior taxa de degradação de cianeto a 27°C durante as primeiras 24 horas, aconteceu no período no qual havia maior concentração celular.

Enquanto que para temperaturas de 32°C e 37°C não houve degradação total de cianeto, mesmo após 5 dias de ensaio, a máxima porcentagem de degradação foi de 98% para a bactéria *B. licheniformis* a 32°C.

Dos resultados obtidos a diferentes temperaturas, foi possível observar que o menor valor de temperatura (27°C), além de favorecer a degradação bacteriana de

cianeto nas bactérias *B. pumilus* e *B. subtilis*, também diminui a volatilização do cianeto de maneira natural.

Figura 49. Degradação de cianeto a 190rpm utilizando 37°C, 32°C e 27°C de temperatura para as cepas: a) *B. pumilus*, b) *B. licheniformis* e c) *B. subtilis*.

5.4.3 Influência da velocidade de rotação

Realizou-se um estudo avaliando a influência da velocidade de rotação na degradação de cianeto, para isto, avaliou-se a velocidade de rotação de 65 e 190rpm, na Figura 50, apresenta-se o resultado de degradação bacteriana de cianeto para as bactérias *B. pumilus*, *B. licheniformis* e *B. subtilis* a 65 e 190rpm.

As bactérias *B. pumilus* e *B. subtilis* apresentaram valores muito próximos de degradação para ambas velocidades de rotação. A velocidade de rotação de 65rpm apresentou degradação de 100% em três dias de ensaio, nesse mesmo instante de tempo a degradação de cianeto para a velocidade de 190rpm era de 99%, como pode ser observado na Figura 50a para *B. pumilus* e na Figura 50c para *B. subtilis*.

A taxa de degradação para as bactérias *B. licheniformis* foi maior para a velocidade de rotação de 190rpm, a degradação nessas condições foi de 79% enquanto que para 65rpm a taxa de degradação foi de apenas 42%.

A única diferença considerável na degradação de cianeto para as duas velocidades de rotação aconteceu na cepa *B. licheniformis*, porém mesmo na melhor condição de degradação (190rpm) a bactéria apenas degradou 79% de cianeto.

Os resultados não apresentaram mudanças significativas quando avaliadas as duas velocidades de rotação. O fornecimento de oxigênio através da agitação, não foi fundamental na avaliação da degradação.

Figura 50. Degradação de cianeto a 27°C utilizando 65 e 190rpm para as cepas:
a) *B. pumilus*, b) *B. licheniformis* e c) *B. subtilis*.

Após avaliar o comportamento das três bactérias, é possível afirmar que as melhores taxas de degradação foram obtidas nas cepas *B. pumilus* e *B. subtilis* (Figura 51). Estas duas bactérias conseguiram degradar 100% do cianeto presente na solução. As melhores condições de degradação para *B. pumilus* e *B. subtilis* foram determinadas a 27°C e 65rpm. O tempo empregado para a degradação do cianeto foi de três dias.

A bactéria *B. licheniformis* apresentou a melhor taxa de degradação de cianeto a 32°C e 190rpm, degradando 99.5% do cianeto presente na solução.

Figura 51. Degradação de cianeto para as melhores condições das bactérias *B. pumilus*, *B. licheniformis* e *B. subtilis*.

5.4.4 Degradação de cianeto para o controle abiótico

Nos ensaios de degradação de cianeto foi observado que mesmo em pH 10 e com adição de tampão no meio de cultura, a degradação de cianeto no controle abiótico aconteceu de maneira natural.

A degradação de cianeto nos controles abióticos, apresentou taxas de degradação natural de aproximadamente 30% durante os cinco dias na temperatura

de 27°C. Para as faixas de temperaturas de 32°C e 37°C a as taxas de degradação aumentaram atingindo valores próximos a 60% de degradação de cianeto (Figura 52).

Figura 52. Degradação de cianeto para os controles abióticos nas diferentes condições de trabalho em pH 10.

A menor taxa de degradação para os controles aconteceu na temperatura de 27°C e velocidade de rotação de 65rpm. A concentração final após cinco dias foi de 354mgL⁻¹ de cianeto.

A diminuição da temperatura permitiu obter maior estabilidade do cianeto, evitando a volatilização desse devido à formação do ácido cianídrico.

A degradação do cianeto no controle, pode ser explicada por meio do diagrama de especiação realizado para o cianeto livre e apresentado na Figura 53.

Figura 53. Diagrama de especiação para o cianeto de potássio concentração 50mM.

No diagrama de especiação é possível observar que mesmo em valores de pH 10 a degradação de cianeto por volatilização de HCN pode apresentar taxas de 10% de degradação de cianeto.

6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho, pode-se concluir que:

1. As três cepas isoladas do rejeito de mineração de ouro pertencem aos gêneros *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis*.
2. A maior produção de biomassa das cepas *B. pumilus*, *B. licheniformis* e *B. subtilis* foi obtida utilizando meio de cultura L.B em pH 7 a 37°C e velocidade de rotação de 190rpm.
3. Para executar os ensaios de degradação de cianeto foi necessário realizar um processo de adaptação bacteriana a ambientes alcalinos (pH10) usando o meio de cultura modificado LB-CAPS.
4. As melhores condições de remoção de cianeto livre para a bactéria *B. pumilus* aconteceram em pH 10, temperatura de 27°C e 65rpm de velocidade de rotação. Nestas condições a bactéria degradou 100% do cianeto livre que não volatilizou. O tempo empregado para a remoção de cianeto foi três dias.
5. A bactéria *B. licheniformis* apresentou 99.5% de degradação de cianeto livre que não volatilizou. As condições de degradação foram pH 10, 32°C e 190rpm. O tempo empregado para a degradação foi de cinco dias.
6. As melhores condições de remoção de cianeto livre para a bactéria *B. subtilis* aconteceram em pH 10, temperatura de 27°C e 65rpm de velocidade de rotação. Nestas condições a bactéria degradou 100% do cianeto livre que não volatilizou. O tempo empregado para a remoção de cianeto foi três dias.
7. A degradação de cianeto nas bactérias *B. pumilus* e *B. subtilis* é favorecida com a diminuição da temperatura. A melhor taxa de degradação se obteve a 27°C.
8. Através dos ensaios de degradação bacteriana de cianeto, verificou-se que as bactérias *B. pumilus*, *B. licheniformis* e *B. subtilis* apresentaram potencial de degradação de cianeto e se tornam uma alternativa viável no tratamento de efluentes contaminados com cianeto.

REFERÊNCIAS

- ADJEI, M. D.; OHTA, Y. Factors affecting the biodegradation of cyanide by Burkholderia cepacia strain C-3. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 89, n. 3, p. 274–277, 2000.
- AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ATSDR). **Cyanide ToxFAQ** Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Atlanta, GA: U.S.: [s.n.].
- AKCIL, A. Destruction of cyanide in gold mill effluents: Biological versus chemical treatments. **Biotechnology Advances**, v. 21, n. 6, p. 501–511, 2003.
- AKCIL, A. et al. Biological treatment of cyanide by natural isolated bacteria (Pseudomonas sp.). **Minerals Engineering**, v. 16, n. 7, p. 643–649, 2003.
- AL-SHEHRI, M. A.; MOSTAFA, S. Y. Production and some properties of protease produced by Bacillus licheniformis isolated from Tihamet Aseer, Saudi Arabia. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 7, n. 9, p. 1631–1635, 2004.
- ASTM INTERNATIONAL. ASTM D2036-09(2015). In: **Standard Test Methods for Cyanides in Water**. West Conshohocken: [s.n.].
- ATA AKCIL, T. M. Microbiological destruction of cyanide wastes in gold mining: process review. **Biotechnology Letters**, v. 25, n. January, p. 445–450, 2003.
- ATSDR. Toxicological profile for dichlorobenzenes. n. August, 2006.
- BABU, G. R. V; WOLFRAM, J. H.; CHAPATWALA, K. D. Conversion of sodium cyanide to carbon dioxide and ammonia by immobilized cells of Pseudomonas putida. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 9, n. 3–4, p. 235–238, 1992.
- BALTAZAR, M. DOS PASSOS GALLUZZI. **Estudo do potencial de bioissorção de cobre por Rhodococcus erythropolis e Enterobacter cloacae isoladas de uma área de mineração**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2017.
- BARCLAY, M.; TETT, V. A.; KNOWLES, C. J. Metabolism and enzymology of cyanide/metallocyanide biodegradation by Fusarium solani under neutral and acidic conditions. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 23, n. 5, p. 321–330, 1998.
- BERTANI, G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic Escherichia coli. **Journal of Bacteriology**, v. 62, n. 3, p. 293–300, 1951.
- BOTZ, M. M.; MUDDER, T. I.; AKCIL, A. U. Cyanide Treatment: Physical, Chemical, and Biological Processes. In: ADAMS, M. (Ed.). **Gold Ore Processing**. Second ed. [s.l.] Elsevier B.V., 2016. p. 619–645.
- CAMPOS, M. G.; PEREIRA, P.; ROSEIRO, J. C. Packed-bed reactor for the integrated biodegradation of cyanide and formamide by immobilised Fusarium oxysporum CCMI 876 and Methylobacterium sp. RXM CCMI 908. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, n. 6, p. 848–854, 2006.
- CETESB. **Ficha de informação toxicológica Cianetos**. São Paulo: Divisão de Toxicologia Humana e Saúde Ambiental, 2014.
- CHAPATWALA, K. D. et al. Biodegradation of cyanides, cyanates and thiocyanates to ammonia and carbon dioxide by immobilized cells of Pseudomonas putida. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 28–33, 1998.

- CLARK, A. E. et al. Matrix-Assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: A fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 3, p. 547–603, 2013.
- COLLINS, F. et al. 1. Introduction. In: **Cyanide in Water and Soil**. [s.l.: s.n.]. p. 2–7.
- CONAMA. **Resolução No. 357 de 17 de Março de 2005** Brasil, 2005.
- CONAMA. Resolução CONAMA 430/2011. **Diário Oficial da União**, p. 9, 2011a.
- CONAMA. **Portaria MS Nº 2914 DE 12 de Dezembro de 2011** Portaria MS Nº 2914 DE 12 de Dezembro de 2011, 2011b.
- COSTA, A. C. A. DA. **Degradação de Cianetos por Hipoclorito de Sódio**. 1. ed. Rio de Janeiro: CETEM, 1992.
- CRUM, M. A.; TREVOR SEWELL, B.; BENEDIK, M. J. Bacillus pumilus cyanide dihydratase mutants with higher catalytic activity. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. AUG, p. 1–10, 2016.
- DALTONICS, B. **MALDI preparation protocols**, 2017.
- DASH, R. R.; GAUR, A.; BALOMAJUMDER, C. Cyanide in industrial wastewaters and its removal: A review on biotreatment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 163, n. 1, p. 1–11, 2009.
- DOMÍNGUEZ, J.; COBOS, Ó. Comportamiento electroquímico del cianuro. **Ingeniería y desarrollo**, v. 24, p. 63–76, 2008.
- DUBEY, S. K.; HOLMES, D. S. Biological cyanide destruction mediated by microorganisms. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 11, n. 3, p. 257–265, maio 1995.
- DUMESTRE, A. et al. Cyanide Degradation under Alkaline Conditions by a Strain of Fusarium solani Isolated from Contaminated Soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 7, p. 2729–2734, 1997.
- DURSUN, A. .; ÇALIK, A.; AKSU, Z. Degradation of ferrous(II) cyanide complex ions by Pseudomonas fluorescens. **Process Biochemistry**, v. 34, n. 9, p. 901–908, out. 1999.
- DURSUN, A. Y.; AKSU, Z. Biodegradation kinetics of ferrous(II) cyanide complex ions by immobilized Pseudomonas fluorescens in a packed bed column reactor. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 6, p. 615–622, 2000.
- DUTRA, A. et al. O processo eletroquímico como alternativa para o tratamento de efluentes cianídricos. **Rem: Revista Escola de ...**, v. 55, n. 4, p. 267–272, 2002.
- DZOMBAK, D. A.; GHOSH, R. S.; WONG-CHONG, G. M. **Cyanide in water and soil, Chemistry, Risk, and Management**. [s.l.] CRC Press, 2006.
- DZOMBAK, D. A.; GHOSH, R. S.; YOUNG, T. C. 5. Physical–Chemical Properties and Reactivity of Cyanide in Water and Soil. **Cyanide in Water and Soil Chemistry, Risk and Management**, p. 58–88, 2006.
- EBBS, S. Biological degradation of cyanide compounds. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 15, n. 3, p. 231–236, 2004.
- EISLER, R. Cyanate. In: **Handbook of Chemical Risk Assessment**. [s.l.: s.n.]. v. 14p. 2–3.

EISLER, R. Thiocyanate. In: **Handbook of Chemical Risk Assessment**. [s.l: s.n.]. p. 6–8.

EISLER, R. Cyanide. In: PRESS, C. (Ed.). . **Handbook of Chemical Risk Assessment: Health hazards to humans, plants, and animals**. Boca Raton: Lewis Publisher, 2000. p. 4141.

EISLER, R.; WIEMEYER, S. N. Cyanide hazards to plants and animals from gold mining and related water issues. **Reviews of environmental contamination and toxicology**, v. 183, n. 1, p. 21–54, 2004.

EZZI, M. I.; LYNCH, J. M. Biodegradation of cyanide by *Trichoderma* spp. and *Fusarium* spp. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, n. 7, p. 849–854, 2005.

FEDERATION, W. E.; AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. [s.l: s.n.].

FIGUEIRA, M. M. et al. Cyanide degradation by an *Escherichia coli* strain Cyanide degradation by an *Escherichia coli* strain. n. March, 2014.

FOOLADI, T. et al. Characterization, production and optimization of lipopeptide biosurfactant by new strain *Bacillus pumilus* 2IR isolated from an Iranian oil field. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 145, p. 510–519, 2016.

GENSEMER, R. W. et al. 14 Aquatic Toxicity of Cyanide. In: **Cyanide in Water and Soil**. [s.l: s.n.].

GHOSH, R. S.; DZOMBAK, D. A.; WONG-CHONG, G. M. 2. Physical and Chemical Forms of Cyanide. In: PRESS LLC, C. (Ed.). . **Cyanide in Water and Soil Chemistry, Risk and Management**. 1a. editio ed. Boca Raton: [s.n.]. p. 17–23.

GUO, B.; PENG, Y.; ESPINOSA-GOMEZ, R. Cyanide chemistry and its effect on mineral flotation. **Minerals Engineering**, v. 66, p. 25–32, 2014.

GUPTA, N.; BALOMAJUMDER, C.; AGARWAL, V. K. Enzymatic mechanism and biochemistry for cyanide degradation: A review. **Journal of Hazardous Materials**, v. 176, n. 1–3, p. 1–13, 2010.

GURBUZ, F.; CIFTCI, H.; AKCIL, A. Biodegradation of cyanide containing effluents by *Scenedesmus obliquus*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 162, n. 1, p. 74–79, 2009.

HARRIS, R. E.; KNOWLES, C. J. The conversion of cyanide to ammonia by extracts of a strain of *Pseudomonas fluorescens* that utilizes cyanide as a source of nitrogen for growth. **FEMS Microbiology Letters**, v. 20, n. 3, p. 337–341, 1983.

HUERTAS, M. J. et al. Alkaline cyanide degradation by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 in a batch reactor. Influence of pH. **Journal of Hazardous Materials**, v. 179, n. 1–3, p. 72–78, 2010.

INGVORSEN, K.; HOJER-PEDERSEN, B.; GODTFREDSEN, S. E. Novel cyanide-hydrolyzing enzyme from *Alcaligenes xylosoxidans* subsp. *denitrificans*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 6, p. 1783–1789, 1991.

IONESCU, R. et al. Flow Cytometry Based Method for Evaluation of Biodegradative Potential of *Pseudomonas fluorescens*. **Agriculture and Agricultural Science Procedia**, v. 6, p. 567–578, 2015.

JANDHYALA, D. et al. CynD , the Cyanide Dihydratase from *Bacillus pumilus* : Gene Cloning and Structural Studies CynD , the Cyanide Dihydratase from *Bacillus*

pumilus : Gene Cloning and Structural Studies. **Society**, v. 69, n. 8, p. 4794–4805, 2003.

KANDASAMY, S. et al. Aerobic cyanide degradation by bacterial isolates from cassava factory wastewater. **Brazilian Journal of microbiology**, v. 46, n. 3, p. 659–66, 2015.

KAO, C. M. et al. Enzymatic degradation of nitriles by *Klebsiella oxytoca*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 71, n. 2, p. 228–233, 2006.

KAO, C. M. M. et al. Biotransformation of cyanide to methane and ammonia by *Klebsiella oxytoca*. **Chemosphere**, v. 50, n. 8, p. 1055–1061, mar. 2003.

KELLY, M.; POSTGATE, J. R.; RICHARDS, R. L. Reduction of cyanide and isocyanide by nitrogenase of *Azotobacter chroococcum*. **The Biochemical journal**, v. 102, n. 1, p. 1C–3C, jan. 1967.

KENT R. OLSON. **Manual de Toxicologia Clínica**. 6. ed. Porto Alegre: [s.n.].

KEPA, U.; STANCZYK-MAZANEK, E.; STEPNIAK, L. The use of the advanced oxidation process in the ozone + hydrogen peroxide system for the removal of cyanide from water. **Desalination**, v. 223, n. 1–3, p. 187–193, mar. 2008.

KNOWLES, C. J. Microorganisms and Cyanide. **American Society for Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 652–680, 1976.

KUYUCAK, N.; AKCIL, A. Cyanide and removal options from effluents in gold mining and metallurgical processes. **Minerals Engineering**, v. 50–51, p. 13–29, 2013.

LI, J.; BURGESS, B. K.; CORBIN, J. L. Nitrogenase reactivity: cyanide as substrate and inhibitor. **Biochemistry**, v. 21, n. 18, p. 4393–4402, ago. 1982.

LINARDI, V. R. Degradação biológica de Cianetos. **Biotecnologia Ciências & Desenvolvimento**, v. 1, n. 4, p. 44–45, 1998.

LIU, J. K.; LIU, C. H.; LIN, C. S. The role of nitrogenase in a cyanide-degrading *Klebsiella oxytoca* strain. **Proceedings of the National Science Council, Republic of China. Part B, Life sciences**, v. 21, n. 2, p. 37–42, abr. 1997.

LOGSDON, M. J.; HAGELSTEIN, K.; MUDDER, T. I. **El manejo del cianuro en la extracción de oro. The management of cyanide in gold extraction**. [s.l: s.n.].

LOPES, SÔNIA GODOY BUENO CARVALHO; BRANDIMARTE, ANA LUCIA; HO, FANLY FUNGYI CHOW; LAHR, D. Diversidade biológica e filogenia. In: USP/UNIVESP/EDUSP (Ed.). **Diversidade Biológica, História da vida na terra e Bioenergética**. 1. ed. ed. São Paulo: [s.n.]. p. 400.

LOWE, D. J. et al. Kinetics and mechanism of the reaction of cyanide with molybdenum nitrogenase from *Azotobacter vinelandii*. **Biochemistry**, v. 28, n. 21, p. 8460–8466, out. 1989.

LUQUE-ALMAGRO, V. M. et al. Bacterial Degradation of Cyanide and Its Metal Complexes under Alkaline Conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 2, p. 940–947, 1 fev. 2005.

LUQUE, M. **Metabolismo del cianuro y del cianato en Pseudomonas pseudoalcaligenes CECT5344 . Aplicaciones biotecnológicas**. [s.l: s.n.].

LUQUE ALMAGRO, V. M. et al. Cyanide degradation by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 involves a malate: Quinone oxidoreductase and an associated cyanide-insensitive electron transfer chain. **Microbiology**, v. 157, n. 3, p.

739–745, 2011.

MACHADO, P. G. **Analizador Voltamétrico**. Analizador Voltamétrico 797 VA. **Anais...**São Paulo: 2017

MANABE, K. et al. Combined effect of improved cell yield and increased specific productivity enhances recombinant enzyme production in genome-reduced *Bacillus subtilis* strain MGB874. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 23, p. 8370–8381, 2011.

MANIYAM, M. N.; SJAHRIR, F.; IBRAHIM, A. L. Bioremediation of Cyanide by Optimized Resting Cells of *Rhodococcus* Strains Isolated from Peninsular Malaysia. **International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics**, v. 1, n. 2, p. 98–101, 2011.

MARIA, C. Toxicity of cyanide. In: **Environmental Sampling and Analysis for Metals**. [s.l: s.n.]. p. 333.

MEKUTO, L. et al. Biodegradation of Free Cyanide Using *Bacillus* Sp . Consortium Dominated by *Bacillus Safensis* , *Lichenformis* and *Tequilensis* Strains : A Bioprocess Supported Solely with Whey. **Bioremediation & Biodegradation**, n. 18, p. 1–7, 2013.

MEKUTO, L. et al. Free cyanide and thiocyanate biodegradation by *Pseudomonas aeruginosa* STK 03 capable of heterotrophic nitrification under alkaline conditions. **3 Biotech**, v. 6, n. 1, p. 6, 2016.

METROHM. **Polarographic determination of free cyanide** **Application Bulletin**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:AC+COUPLING+INSTRUMENTATION+AND+DIFFERENCE+AMPLIFIERS#1>>.

MEYERS, P. R. et al. An efficient cyanide-degrading *Bacillus pumilus* strain. **Journal of general microbiology**, v. 137, n. 6, p. 1397–1400, 1991.

MINERAL POLICY CENTER. **Cyanide Leach Mining Packet** Washington, D.C, 2000. Disponível em: <www.mineralpolicy.org>

MONGE, C. et al. **Isolation and characterization of cyanide degrading bacteria from artisanal gold mine tailings**. The 32nd International Conference on Solid Waste Technology and Management. **Anais...**Philadelphia: 2017

MORILLO, J.; GUEVARA, J. Degradación de cianuro de sodio por *Pseudomonas* sp. a dos temperaturas y tres pH. **Revista Científica de Estudiantes. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo.**, v. 1, n. 3, 2015.

MOSQUERA, C. **Aislamiento e Identificación de Bacterias Capaces de Degradar Cianuro Presentes En Muestras Obtenidas Del Proceso de Extracción de Almidón de Yuca**. [s.l: s.n.].

MUDDER, T.; BOTZ, M. M.; SMITH, A. **Chemistry and Treatment of Cyanidation Wastes**. Second. ed. London: [s.n.].

MUDDER, T. I.; BOTZ, M. M. Cyanide and society: a critical review. **The European Journal of Mineral Processing and Environmental Protection**, v. 4, n. 1, p. 62–74, 2004.

NWOKORO, O.; DIBUA, M. E. U. Degradation of soil cyanide by single and mixed cultures of *Pseudomonas stutzeri* and *Bacillus subtilis*. **Arhiv za higijenu rada i toksikologiju**, v. 65, n. 1, p. 113–9, 2014.

- ÖZEL, Y. K. et al. New fungal biomasses for cyanide biodegradation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 110, n. 4, p. 431–435, 2010.
- PALLADINO, F. **Estudo da síntese de enzimas por Bacillus licheniformis E-44 em meio formulado à base de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar**. [s.l.: s.n.].
- PARGA, J. R.; COCKE, D. L. Oxidation of cyanide in a hydrocyclone reactor by chlorine dioxide. **Desalination**, v. 140, p. 289–296, 2001.
- PATNAIK, P. 2.6 Cyanide, Total. In: **Handbook of Environmental Analysis**. [s.l.] CRC Press, 1997.
- PIVELI, R. P. M. T. K. Capítulo 7 - Ânions de interesse em estudos de controle de qualidade das águas: sulfato, sulfeto, cloreto, cianeto. In: ABES (Ed.). **Qualidade das águas e poluição: aspectos físico-químicos**. São Paulo: [s.n.]. p. 285.
- POTOT, S. **Metabolic and Morphogenetic Engineering of Bacillus subtilis : Biotechnology for Industry**. [s.l.] Universidad Nova de Lisboa, 2010.
- POULTON, J. E. Cyanogenesis in plants. **Plant physiology**, v. 94, n. 2, p. 401–405, out. 1990.
- RAYBUCK, S. A. Microbes and microbial enzymes for cyanide degradation. **Biodegradation**, v. 3, n. 1, p. 3–18, 1992.
- RAZANAMAHANDRY, L. C. et al. Biodegradation of free cyanide by bacterial species isolated from cyanide-contaminated artisanal gold mining catchment area in Burkina Faso. **Chemosphere**, v. 157, p. 71–78, 2016.
- SAYEM, S. M. A.; ALAM, M. J.; HOQ, M. EFFECT OF TEMPERATURE , pH AND METAL IONS ON THE ACTIVITY AND STABILITY OF ALKALINE PROTEASE FROM NOVEL BACILLUS LICHENIFORMIS MZK03. **Science**, v. 43, n. 4, p. 257–262, 2006.
- SCHNEIDER, I. **Modo alternativo de tratamento de efluentes com presença de cianeto**. [s.l.: s.n.].
- SERVICES, U. S. D. OF HEALTH AND HUMAN. **Toxicological Profile for Cyanide** US Department of Health and Human Services. Atlanta, GA: U.S.: Public Health Service, 2006.
- SIEDOW, J.; UMBACH, A. Plant Mitochondrial Electron Transfer and Molecular Biology. **The Plant cell**, v. 7, n. 7, p. 821–831, 1995.
- SKERMAN, V. B. D.; MCGOWAN, V.; SNEATH, P. H. A. Approved Lists of Bacterial Names. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 30, n. 1, p. 225–420, 1980.
- SOBRAL, L. G. S.; GRANATO, M. Degradação de cianetos através do par peróxido de Hidrogênio/Hipoclorito. **Departamento de Metalurgia Extrativa. CETEM**, p. 381–396, 1990.
- TENDULKAR, S.R.; AGNIHOTRI, V. . Use of Hydrogen Peroxide in Treatment of Cyanide. **National Peroxide Ltd**, 1992.
- TONSO, A. **Monitoramento de cultivos de células animais em biorreator**. [s.l.] Universidade de São Paulo., 2011.
- VEITH, B. et al. The Complete Genome Sequence of Bacillus licheniformis DSM13, an Organism with Great Industrial Potential. **Journal of Molecular Microbiology**

and Biotechnology, v. 7, n. 4, p. 204–211, 17 set. 2004.

VOJCIC, L. et al. An efficient transformation method for bacillus subtilis DB104. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 94, n. 2, p. 487–493, 2012.

WATANABE, A. et al. Cyanide hydrolysis in a cyanide-degrading bacterium, *Pseudomonas stutzeri* AK61, by cyanidase. **Microbiology**, v. 144, n. 6, p. 1677–1682, 1998.

WHITE, D. M.; SCHNABEL, W. Treatment of cyanide waste in a sequencing batch biofilm reactor. **Water Research**, v. 32, n. 1, p. 254–257, 1998.

WONG-CHONG, G. M. JEANNE M. V. Microbiological Technologies for Treatment of Cyanide. In: FRANCIS, T. & (Ed.). . **Cyanide in Water and Soil**. Florida: [s.n.]. p. 459–477.

WU, C.-F. et al. An effective method for the detoxification of cyanide-rich wastewater by *Bacillus* sp. CN-22. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 8, p. 3801–3807, 14 abr. 2014.

YANASE, H. et al. Degradation of the metal-cyano complex tetracyanonickelate (II) by *Fusarium oxysporum* N-10. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 53, n. 3, p. 328–334, 2000.