



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
CAMPUS ALTO PARAÓPEBA
CURSO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS

Bioprospecção de micro-organismos com potencial para degradação de cianeto em efluentes líquidos industriais

AUTORA: ANA FLÁVIA DE OLIVEIRA G. DE MATOS

ORIENTADORA: ISABEL CRISTINA BRAGA RODRIGUES

**Ouro Branco - MG
Dezembro/2016**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
CAMPUS ALTO PARAÓPEBA
CURSO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS

Bioprospecção de micro-organismos com potencial para degradação de cianeto em efluentes líquidos industriais

Ana Flávia de Oliveira G. de Matos

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
em cumprimento às exigências do Curso de
Bacharelado em Engenharia de Bioprocessos
da Universidade Federal de São João del-Rei.

**Ouro Branco - MG
Dezembro/2016**

Defesa do Trabalho de Conclusão de Curso da aluna Ana Flávia de Oliveira G. de Matos, intitulado: “**Bioprospecção de micro-organismos com potencial para degradação de cianeto em efluentes líquidos industriais**”, orientado pela Prof.^a Isabel Cristina Braga Rodrigues, apresentado à banca examinadora designada pelo Colegiado do Curso de Engenharia de Bioprocessos da UFSJ, em 02 de dezembro de 2016.

A Banca Examinadora, composta pelos membros abaixo, avaliou este TCC:

Isabel Cristina Braga Rodrigues – Orientadora

Mariana Dias Moreira – Examinador 1

Wesley Santiago da Silva – Examinador 2

Ouro Branco, 02/12/2016

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1 Cianeto.....	3
2.1.2 Toxicidade	4
2.1.3 Geração de efluentes contaminados por cianeto.....	6
2.1.4 Tratamento e efluentes contendo cianeto.....	7
2.2 Biodegradação do cianeto.....	8
2.3 Bioprospecção	11
2.4 Metodologias de caracterização microbiológica	12
2.4.1 Caracterização usando a microbiologia clássica	12
2.4.2 Caracterização usando a biologia molecular	14
3. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO TRABALHO	17
4. OBJETIVOS.....	18
4.1 Objetivo geral	18
4.2 Objetivos específicos	18
5. MATERIAL E MÉTODOS	19
5.1 Isolamento Microbiano	19
5.2 Análise de tolerância ao cianeto	19
5.3 Caracterização dos micro-organismos isolados.....	20
5.3.1 Caracterização Bacteriana	20
5.3.2 Caracterização de leveduras	22
5.4 Curva de crescimento microbiano	23
5.4.1 Crescimento bacteriano em meio LB.....	23
5.4.2 Crescimento em meio YMA	24

6. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	25
6.1 Isolamento microbiano	25
6.2 Análise de tolerância ao cianeto	27
6.3 Caracterização microbiológica	28
6.3.1 Caracterização bacteriana.....	28
6.3.2 Caracterização das leveduras	31
6.4 Curva de crescimento microbiano.....	32
7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	38
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

RESUMO

A diversidade das atividades industriais do setor metalúrgico, especialmente a siderurgia, geram diferentes composições de efluentes que contaminam o solo, a água e a atmosfera. Dentre os efluentes líquidos gerados por estas indústrias, chamam a atenção aqueles com altas concentrações de cianeto. Este contaminante é altamente tóxico para a vida aquática e para os seres humanos, podendo causar a morte em poucas horas após exposição. Dessa forma, torna-se indispensável o tratamento de efluentes contendo este íon antes da disposição final. A literatura relata diferentes tipos de micro-organismos que apresentam rotas conhecidas para degradação do cianeto, sendo a bioprospecção uma ferramenta importante para selecionar os micro-organismos com este potencial, tornando os processos biológicos uma aposta promissora para o tratamento destes efluentes. Em vista disso, o presente trabalho propõe a bioprospecção de leveduras, bactérias e fungos filamentosos a partir de uma amostra de reator de lodos ativados para selecionar as culturas com potencial para crescer na presença de cianeto. Neste trabalho, o isolamento ocorreu em meio YMA e LB, posteriormente fez-se o teste de tolerância em relação ao cianeto inoculando as culturas em meio líquido em pH 10,0, contendo 0,5 e 40 mg L⁻¹ de cianeto. Os micro-organismos que se mostraram resistentes à alta concentração do íon foram caracterizados morfológicamente e bioquimicamente. Os resultados deste trabalho foram promissores, obtendo boa adaptação de 7 culturas microbianas sendo 5 bactérias e 2 leveduras. Todas as bactérias encontradas foram Gram-negativas e apresentaram morfologia de bastonete e cocos. Os ensaios cinéticos mostraram que o isolado de bactéria (B5) e as leveduras (L5, L6) apresentaram maior velocidade de crescimento em meio contendo cianeto, sendo estes com maior potencial para biodegradação do íon em efluentes industriais.

Palavras chave: Cianeto, isolamento, leveduras, bactérias.

1. INTRODUÇÃO

O cianeto é um composto que possui uma ligação tripla entre o carbono e o nitrogênio. Pode se apresentar na forma de cianeto de hidrogênio que em pH inferior a 9,3 é volátil, também pode ser encontrado como cianeto de sódio e cianeto de potássio que são de uso comercial ou estão associados para uso direto em cadeias produtivas (SCHNEIDER, 2009).

O setor metalúrgico tem destaque no Brasil devido ao crescimento expressivo e a grande importância para a economia, uma vez que apresenta uma vasta cadeia produtiva. A diversidade das atividades industriais desse setor gera diferentes composições de efluentes que contaminam o solo, a água e a atmosfera. Alguns processos chamam a atenção por gerar efluentes com altas concentrações de cianeto (BOSON, 2008).

A siderurgia é uma das ramificações do setor metalúrgico, sendo a mais expressiva em termos de volume e diversidade de produtos. É considerado um setor altamente poluidor com uma demanda de 100 a 200 m³ de água por tonelada de aço produzido. O processo desse setor que contribui para gerar os efluentes com maiores cargas de compostos tóxicos é a coqueria, no qual uma mistura de carvões é aquecida a uma temperatura superior a 1.000°C para produzir o coque, importante combustível para a produção de ferro gusa (SANTOS, 2014).

A produção do coque gera grande quantidade de compostos voláteis que não podem ser lançados na atmosfera, dessa forma os gases emitidos nas coquerias são lavados, através do uso de jatos de água, resultando em uma água contaminada com cianeto, hidrocarbonetos, fenóis, entre outros compostos. Esse processo gera em média 0,5 m³ de efluente por tonelada de coque produzido. Além da produção de coque, a produção de ferro também gera efluentes líquidos com alta carga de compostos tóxicos, pois a água de lavagem do gás de alto forno também será contaminada por amônia, fenol e, principalmente, por cianeto (SANTOS, 2014).

Outra vertente do setor é a galvanoplastia, sendo este um processo altamente poluidor, já que os resíduos gerados podem conter metais como cádmio e chumbo, íons tóxicos como cianeto, sulfeto e fluoreto. Em efluentes desse setor, o cianeto pode

atingir concentrações de 20 a 30 mg L⁻¹, necessitando de tratamento para enquadrar aos padrões de lançamento exigidos pela legislação (SANTOS, 2010).

A principal preocupação em relação ao cianeto presente em águas residuárias deve-se ao fato de ser altamente tóxico. O cianeto livre (CN⁻), em concentrações da ordem de 0,005 a 0,007 mg L⁻¹ são absorvidos pelos animais aquáticos afetando a reprodução e nado, enquanto valores superiores a 0,200 mg L⁻¹ são letais para todo ecossistema aquático (EISLER, 1991; ZACARIAS, 2009).

Já o ácido cianídrico (HCN) é um composto volátil em pH menores que 9,3. Ele pode ser absorvido pelo corpo humano por inalação, ingestão e por contato. Doses de 50 mg L⁻¹ resultam em convulsões, confusão mental e quando superiores a 100 mg L⁻¹ levam à morte por bloqueio da cadeia respiratória (YOUNG e JORDAN, 1995).

A bioprospecção é uma ferramenta de grande importância para auxiliar no isolamento, seleção e padronização de micro-organismos, resultando em bancos de coleções essenciais para o desenvolvimento de novas tecnologias. Contribui para o desenvolvimento de áreas como saúde, alimentos e meio ambiente, com destaque para o tratamento de águas residuárias industriais que contém uma diversidade de contaminantes tóxicos e de difícil biodegradação (FERREIRA e SAMPAIO, 2013).

Dessa forma, como o cianeto é um composto altamente perigoso, o mesmo necessita ter suas concentrações reduzidas nos efluentes líquidos industriais antes do lançamento destes nos corpos receptores. Diversos processos físico-químicos são descritos, no entanto, possuem custos elevados e muitas vezes não eliminam o cianeto, apenas o transferem de fase ou geram compostos ainda mais tóxicos (SMITH e MUDDER, 1991; DUTRA *et al.*, 2002). Assim, as propostas para o desenvolvimento de um processo biológico de remoção de cianeto são atrativas, uma vez que estes processos, geralmente, possuem custos inferiores aos físico-químicos e também conduzem à mineralização do composto. Em vista disto, torna-se imperativa a busca por micro-organismos capazes de utilizar o cianeto em seu metabolismo. O presente trabalho buscou efetuar a bioprospecção de micro-organismos com potencial para degradar o cianeto, a partir de uma amostra de um reator de lodos ativados que trata efluentes da indústria siderúrgica.

2. REVISÃO DA LITERATURA

O Brasil é um país que promove alta exploração do setor minero-metalúrgico por ser abundante em matéria prima, com destaque para a indústria siderúrgica. Essas indústrias apresentam um grande potencial poluidor, especialmente a siderurgia, através dos processos de produção de coque e ferro gusa que, gera efluentes com elevadas concentrações de cianeto. Uma vez que a presença deste íon nos corpos de água causa uma série de danos ao ecossistema e que o mesmo pode ser letal aos seres humanos, os órgãos ambientais controlam a geração e disposição dos efluentes que o contenham, dispondo de parâmetros para enquadramento dessas águas residuárias antes de serem lançadas nos corpos receptores (SANTOS, 2010). Com isso, muitos estudos são elaborados com a intenção de mitigar o potencial poluidor desses segmentos de forma econômica e de fácil implementação, sendo os processos biológicos atrativos devido aos menores custos, em relação aos processos físico-químicos, e à possibilidade de consumo deste íon no metabolismo microbiano, incorporando seus átomos na produção de biomassa microbiana sem nenhuma toxicidade (SMITH e MUDDER, 1991; DUTRA *et al.*, 2002).

2.1 Cianeto

O cianeto (CN^-) é um composto que possui uma ligação tripla entre o carbono e o nitrogênio. As formas mais comuns de serem encontrados são cianeto de hidrogênio (HCN), cianeto de sódio (NaCN) e cianeto de potássio (KCN) (SCHNEIDER, 2009). O cianeto é dito livre quando o íon CN^- é liberado em soluções aquosas por dissolução. Os compostos de cianeto são considerados tóxicos e altamente letais para todo o tipo de vida. O pH igual ou inferior a 9,3 favorece a formação de HCN, que é volátil, e sua inalação também pode resultar em morte (DAS e SANTRA, 2011).

Outros compostos que contém o cianeto são divididos em grupos, os simples cianetados são sais alcalinos solúveis em água e que geram cátions alcalinos livres e ânions de cianeto. Esse grupo é composto por NaCN, KCN, $\text{Zn}(\text{CN})_2$. Já o grupo dos ciano-metálicos tem origem na complexação do íon cianeto e íons metálicos,

como zinco, ferro, ouro, mercúrio, entre outros, sendo estes menos solúveis e mais estáveis (ARELLANO, 2012).

2.1.1 Legislação para o cianeto

A legislação ambiental brasileira para descarte de efluentes é amparada por várias resoluções do Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA), entre elas destaca-se a Resolução nº 357, de 2005, atualizada pela Resolução nº. 430, de 2011, e que dispõe sobre a classificação dos corpos de água e as diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes (SANTOS, 2010).

Para efluentes contendo cianeto, a Resolução CONAMA nº 430, de 13 de Maio de 2011 determina que a concentração máxima desse composto para descarte em corpos receptores deve ser de 1,0 mg L⁻¹ de cianeto total e 0,2 mg L⁻¹ de cianeto livre. No estado de Minas Gerais a regulamentação é realizada pela Agência Reguladora de Serviços de Abastecimento de Água e de Esgotamento Sanitário do Estado de Minas Gerais (ARSAE-MG), que em sua Resolução nº 015, de 24 de janeiro de 2012, determina o limite de 5,0 mg L⁻¹ de cianetos totais para lançamento de efluentes não domésticos em sistema de esgotamento sanitário.

2.1.2 Toxicidade

O cianeto oferece risco para todas as formas de vida tanto se for inalado ou ingerido. Para os seres humanos, o contato com uma dose pequena pode causar dor de cabeça, náusea, desmaios e confusão mental. Já elevadas concentrações podem causar taquicardia, dispneia e ser fatal (EISLER, 1991). Quando o pH do meio atinge valores iguais ou inferiores a 9,3 a formação do HCN é favorecida, sendo este um composto volátil e letal para seres humanos quando inalado em concentrações entre 100 a 300 mg L⁻¹. Esse ácido liga-se ao Fe³⁺ da citocromo c oxidase bloqueando a cadeia respiratória. Assim, ocorre a competição com o oxigênio durante a sua absorção pelos tecidos, limitando as capacidades físicas do indivíduo (ZACARIAS, 2009).

Em plantas, a tolerância ao cianeto varia entre 0,018 mg L⁻¹ a 0,043 mg L⁻¹. Valores acima desse limite promovem a inibição da cadeia respiratória, uma vez que o cianeto compromete a fosforilação oxidativa (ARELLANO, 2012).

Além disso, o cianeto afeta diretamente a vida aquática, uma vez que o mesmo é solúvel em água liberando o CN⁻. Além disso, quanto menor o pH da água, mais HCN não dissociado estará presente. A exposição em concentrações da ordem de 0,005 a 0,007 mg L⁻¹ influenciam na mobilidade dos animais aquáticos e valores acima de 0,200 mg L⁻¹ são fatais para esses seres (EISLER, 1991; PANTAROTO, 2001).

A legislação em vigor estabelece o valor máximo em que esses compostos podem chegar ao corpo receptor. O maior rigor deve-se ao dano potencial que essas substâncias podem desencadear quando expostas ao meio ambiente (MILLER e PRITSOS, 2001). Vários acidentes envolvendo contaminação por cianeto já foram relatados na literatura, sendo alguns relatados a seguir.

A bacia de contenção da *Omai Gold Mines Ltd.* rompeu contaminando o rio Omai, na Guiana, com 2,9 milhões de toneladas de efluente contendo cianeto e metais pesados. Após a contaminação, toda a comunidade ao redor do rio precisou receber água potável. Não houve contabilização dos animais afetados (SIMAS, 2007).

Em Teberebie (África do Sul) uma barragem de rejeitos com alta carga de cianeto, oriundos da produção de ouro, rompeu, contaminando o rio Angonaben em 1997. Após quatro anos, a bacia da *South African Company* contaminou o rio Asuman. Ambos os rompimentos acarretaram a morte de milhões de animais e comprometeram as plantações próximas aos rios (Dutra *et al.*, 2002).

Nos anos 2000, uma empresa de mineração de ouro contaminou o rio Tisza localizado na Romênia. Cerca de 100 m³ de uma solução contendo cianeto causou a morte de 15 toneladas de peixes comprometendo todo o ecossistema do rio (DUTRA *et al.*, 2002).

A bacia hidrográfica do rio Sinos, em 2006, foi contaminada por cianeto causando a morte de vários animais e plantas aquáticas. A concentração do cianeto em alguns trechos atingiu valores de 0,750 mg L⁻¹, sendo que a ingestão de 0,5 mg de cianeto é suficiente para matar um adulto (SCHNEIDER, 2009).

Em 2010, a empresa húngara MAL Zrt., dona de uma unidade de fabricação de alumínio, viu a sua barragem de lama romper e atingir 320 km do rio Danúbio na Europa, contaminando o rio com concentrações elevadas de cianeto. A poluição ocasionou na morte de 4 pessoas e no comprometimento de toda a fauna e flora ao redor do rio (MILLER e PRITSOS, 2001).

Dessa forma, é notável que o despejo imprudente de efluentes cianetados, sem tratamento prévio, em corpos d'água acarreta na morte de peixes e plantas, podendo contaminar o solo e comprometer a vida humana.

Apesar dos riscos ofertados, muitas indústrias necessitam empregar o cianeto em sua cadeia de produção. Estima-se que são gerados 2,6 milhões de toneladas de produtos de cianeto por ano (SIMAS, 2007). Segundo Young e Jordan (1995) somente 20% do cianeto produzido é destinado às mineradoras, enquanto 80% de toda a produção são utilizados nas indústrias de corantes, tintas, pesticidas, fertilizantes entre outros processos e, inevitavelmente, parte do mesmo irá compor os efluentes gerados por estas atividades.

2.1.3 Geração de efluentes contaminados por cianeto

O cianeto pode ser aplicado em diferentes processos como insumo ou pode ser gerado como subproduto. A indústria de galvanoplastia é uma das indústrias que produz efluentes com maiores concentrações desse composto. Os processos empregados neste tipo de indústria consistem na deposição de uma camada de metal em uma superfície de forma a oferecer proteção contra corrosão e maior durabilidade dos produtos metálicos. O íon CN^- é adicionado como um sal básico, sendo usado como complexante associado ao ouro, zinco ou prata (WIERCINSKI, 2015). O processo de galvanoplastia usando cianeto apresenta como vantagem a elevada taxa de reposição metálica, facilidade de controle do processo e manuseio de equipamentos simples (SILVA *et al.*, 2006). Assim, a galvanoplastia gera efluentes tóxicos contendo resíduos de cianeto advindos de banhos de eletrodeposição e tanques de lavagem. O tratamento mais comum é baseado em métodos físico-químicos que apresentam como desvantagem a geração de lodo contaminado. A

oxidação com hipoclorito de sódio é uma alternativa de tratamento ineficiente, uma vez que essa metodologia não oxida o cianeto em sua totalidade (SANTOS, 2010).

Outro processo que faz uso do cianeto é a extração do ouro por lixiviação, no qual o cianeto atua como agente complexante, auxiliando na solubilização do ouro contido nas partículas minerais (ROENICK, 2013). Este processo gera um grande volume de cianeto residual. O resíduo contaminado com o cianeto pode ficar exposto no meio ambiente para que ocorra sua oxidação espontânea e posteriormente adicionam-se carbonatos que promovem a estabilização do cianeto oxidado. Essa metodologia apresenta como desvantagem a geração de uma lama tóxica e a cinética de oxidação extremamente lenta (ANDRADE e MARTINS, 2005). Como opção, alguns estudos indicam que o cianeto residual pode ser encaminhado para reatores biológicos onde serão oxidados pelos micro-organismos a CO₂ e ureia (MADIGAN *et al.*, 2010).

Em siderurgias os efluentes líquidos são gerados no processo de produção do coque e na produção de ferro gusa no alto forno. Em ambos processos, ocorre lavagem dos gases gerados sendo a água contaminada com hidrocarbonetos, fenóis, benzeno, amônia, entre outras substâncias, incluindo o cianeto (SANTOS, 2010).

2.1.4 Tratamento e efluentes contendo cianeto

Existem muitos processos para tratar efluentes contendo cianeto de forma a reduzir os seus impactos no meio ambiente (SMITH e MUDDER, 1991; DUTRA *et al.*, 2002). A Tabela 2.1 apresenta os principais métodos aplicados nas indústrias.

Muitos dos métodos expostos resultam em implicações ambientais ainda mais severas que a própria presença do cianeto em si. Outros demandam elevadas quantidades de reagentes, elevando o custo do processo ou apresentam uma cinética de reação lenta requerendo um longo tempo de residência. Nesse contexto, insere-se a importância de estudar métodos de tratamento de efluentes que possam garantir qualidade ambiental, aliando baixos custos e alta eficiência de remoção, podendo os métodos biológicos oferecerem todas estas vantagens (FEITOSA *et al.*, 2002).

TABELA 2.1: Principais métodos aplicados em indústrias para remover o cianeto presente no efluente (Adaptado de Schneider, 2009).

Metodologia	Princípio	Metodologia	Princípio
Volatilização	Neutralização da água através da absorção do CO ₂ atmosférico.	Cloração Alcalina	Oxidação do cianeto por cloro gasoso resultando em sua degradação gerando dióxido de carbono e nitrogênio.
Carvão Ativado	O carvão fornece sítios para adsorção do cianeto ou pode ser usado como catalisador do processo de oxidação.	Troca Iônica	A coluna apresenta um ligante para recuperar o cianeto. A eluição da resina é feita com ácido diluído em contato com uma solução cáustica para liberar os íons adsorvidos.
Biodegradação	Presença de uma população microbiana estável que possa metabolizar o cianeto.	Flotação Iônica	Adiciona-se coletores que dão caráter hidrofóbico a soluções de cianeto. Ao introduzir uma corrente gasosa, o complexo adsorve na interface líquido-gás e é removido fisicamente.

2.2 Biodegradação do cianeto

Muitos micro-organismos toleram a presença do cianeto e de outros compostos tóxicos em efluentes. Alguns fazem uso do cianeto através de assimilação e outros podem adquirir resistência a esse íon (LINARDI *et al.*, 1995). A Tabela 2.2 apresenta os principais micro-organismos, referenciados na literatura, com potencial para biodegradar o cianeto e compostos relacionados.

TABELA 2.2: Principais micro-organismos estudados que apresentaram potencial de biodegradação ou assimilação de compostos contendo cianeto (Adaptado de Pantaroto, 2001).

Micro-organismos	Autores
<i>Penincillum sclerotiu</i> , <i>Lactobacillus plantaru</i> , <i>Candida tropicalis</i>	LEI <i>et al.</i> , 1999
<i>Klebsiella planticola</i>	HOPE e KNOWLES, 1991
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	HARRIS e KNOWLES, 1983
<i>Aspergillus niger</i>	GOMES <i>et al.</i> , 1998
<i>Fusarium</i> , <i>sp.</i>	OLIVEIRA, 2003
<i>Rhodotorula rubra</i>	LINARDI <i>et al.</i> , 1995
<i>Rhodococcus</i>	MANIYAM <i>et al.</i> , 2013
<i>Firmicutes</i>	NOVAK <i>et al.</i> , 2013
<i>Methanosarcina sp.</i>	NOVAK <i>et al.</i> , 2013
<i>Rhizobium ORS571</i>	STAM <i>et al.</i> , 1985

A evolução de sistemas enzimáticos de células procariotas e eucariotas permitiu que os micro-organismos se adaptassem ao meio em que estão submetidos. Pode-se tomar como exemplo os micro-organismos presentes em sistemas de lodos ativados, eles permanecem em contato com diversas substâncias e podem induzir via respiratória alternada ou direcionar uma rota metabólica para uso de determinados compostos como fonte de carbono e energia (JENSEN e ABDEL, 1979; LINARDI *et al.*, 1995).

O metabolismo do cianeto é bem estudado em fungos. A literatura relata que este íon pode ser metabolizado por quatro diferentes rotas: (i) as reações hidrolíticas, para obtenção de formiato e amoníaco; (ii) as reações oxidativas que produzem amônia e dióxido de carbono; (iii) a via redutora que é derivada da ação da nitrogenase, e os produtos são amônia e metano e (iv) as reações de substituição e transferência que geram compostos intermediários (SCN^- e SO_3^-). Posteriormente, os produtos de cada via podem ser degradados a NH_3 e CO_2 (EBBS, 2004).

A literatura também descreve que bactérias podem desenvolver resistência ao cianeto, transformando-o à compostos não-tóxicos. Um exemplo desse processo ocorre devido a presença da enzima rodanase descrita em *Thiobacillus denitrificans*, *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli*. Esta enzima é responsável por catalisar a reação entre o cianeto e o tiosulfato gerando tiocianato e sulfito (PANTAROTO, 2001). *Klebsiella planticola* foi capaz de crescer em meio anaeróbio usando cianeto como fonte de nitrogênio, para isso, ela metabolizou o composto gerando a amônia para obtenção do nitrogênio (HOPE e KNOWLES, 1991).

Os principais micro-organismos, com potencial de utilização de cianeto e derivados, citados na literatura e suas faixas de pH ótimo de crescimento estão listados na Tabela 2.3 (KAO *et al.*, 2003 e DASH *et al.*, 2009).

TABELA 2.3: Micro-organismos com potencial para a biodegradação do cianeto e seu pH de atuação (KAO *et al.*, 2003 e DASH *et al.*, 2009).

Composto	Micro-organismo	pH
Cianeto	<i>Pseudomonas sp.</i>	9,2 - 11,4
	<i>Methylobacterium sp.</i>	8,0
Cianeto de potássio	<i>Fusarium solani</i>	9,2 - 10,7
	<i>Escherichia coli</i>	9,2
	<i>Stemphillum loti</i>	6,5 - 7,5
	<i>Pseudomonas acidovorans</i>	7,1 - 9,1
	<i>Bacillus pumilis</i>	8,5 - 9,0
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	7,0
	<i>B. stearothermophilus</i>	7,8
Cianeto de sódio	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	9,5
Complexo ciano-metálico	<i>Trichoderma spp.</i>	6,5

Dessa forma, é notável que a diversidade de micro-organismos, com potencial para a biodegradação de cianeto, é alta e o desenvolvimento de um processo biológico para remoção do mesmo de águas residuárias é atrativo.

2.3 Bioprospecção

Bioprospecção é o termo usado para definir qualquer atividade exploratória que visa identificar um componente pertencente ao patrimônio genético que tenha um valor econômico agregado (FERREIRA e SAMPAIO, 2013). A utilização da atividade biológica é amparada por tratados que se baseiam no uso sustentável dos recursos naturais e de estratégias de conservação e regulamentação ao acesso a esses recursos (AZEVEDO, 2003).

A bioprospecção é uma ferramenta importante para o desenvolvimento de processos biológicos de tratamento de efluentes, uma vez que vários resíduos descartados no meio ambiente podem ser degradados por diversos tipos de micro-organismos. A atividade microbiana pode gerar: (i) subprodutos com valor econômico agregado, como as lipases geradas por fungos filamentosos ao degradar óleo; (ii) insumos que retornam ao processo, como a degradação de matéria lignocelulósica direcionada à produção de etanol; (iii) reduções de problemas ambientais como a inserção da etapa biológica no tratamento de esgoto reduzindo as concentrações de matéria orgânica (PANTAROTO, 2001; MATIENZO, 2002).

A primeira etapa do processo de bioprospecção envolve a coleta de amostra ambiental, seguida do isolamento e seleção de micro-organismos, sua posterior identificação através da caracterização morfológica e fisiológica, a adaptação a diversos meios de cultivo e parâmetros de processo, como pH e temperatura, e o uso da cepa para a finalidade desejada (AMORIM, 2014). Os micro-organismos selecionados nestes processos podem ser fungos filamentosos, leveduras ou bactérias (QUEISSADA, 2009).

Os fungos são agrupados em diferentes classes de acordo com suas características, como os *Quitridiomicetos*, *Zigomicetos*, *Glomeromicetos*, *Ascomietos*, *Basidiomicetos*. São micro-organismos que têm como característica a secreção de enzimas extracelulares que digerem compostos orgânicos complexos, os produtos

dessa digestão são captados por suas células para obtenção de fontes de carbono, nitrogênio e energia (MADIGAN *et al.*, 2010).

As leveduras são fungos unicelulares da classe *Eumycota*, que têm como subgrupos os *Ascomycetes*, *Basidiomycetes*, *Deuteromyetes*. Apresentam reprodução por brotamento ou por fissão. Várias leveduras podem formar hifas ou pseudo-hifas, que são uma cadeia alongada de brotos (MATIENZO, 2002; AMORIM, 2014).

As Bactérias são seres procariotos encontradas na forma de cocos, bacilos, bacilos torcidos que originam os espirilos e algumas formas peculiares como as espiroquetas. São divididas em Gram positivas e Gram negativas através da diferenciação da parede celular, que caracteriza as bactérias Gram positivas devido à espessa camada de peptidoglicano (QUEISSADA, 2009).

O isolamento e a caracterização desses micro-organismos abrem portas para desenvolver os processos biológicos de tratamento de efluentes, que melhor se adequem às características e necessidades das águas residuárias geradas pelos mais diferentes tipos de indústrias.

2.4 Metodologias de caracterização microbiológica

O processo de caracterização de micro-organismos previamente isolados exige que a manipulação ocorra de forma estéril sendo necessário garantir as condições ideais de cada cultura. Existem duas formas de caracterizar os micro-organismos, através da microbiologia clássica dependente de cultivo ou usando técnicas de biologia molecular independentes de cultivo (MADIGAN *et al.*, 2010).

2.4.1 Caracterização usando a microbiologia clássica

A microbiologia clássica depende de meios de cultivo específicos para avaliar as reações bioquímicas dos organismos. Os meios podem ser classificados como (i) enriquecidos, que otimizam o crescimento de diversos micro-organismos; (ii) seletivos, que favorecem o crescimento de determinado micro-organismo, enquanto inibem o crescimento de outro e (iii) diferenciais, que se baseiam em indicadores, como

coloração da cultura ou formação de halos para identificação de espécies ou grupos microbianos (MADIGAN *et al.*, 2010). A Tabela 2.4 apresenta as principais metodologias usadas para caracterizar bactérias, baseadas em reações bioquímicas.

TABELA 2.4: Metodologias usadas para caracterização bioquímica de bactérias (Adaptado de MADIGAN *et al.*, 2010).

Método	Princípio	Método	Princípio
Fermentação de carboidratos	Inocula-se a cultura em meio contendo o açúcar de interesse em pH neutro, acrescido de vermelho de fenol. Alteração da coloração e produção de gás.	Indol	Meio contendo triptofano. Após 24 horas adiciona-se reagente de Kovac. A degradação do triptofano gera indol que produz um anel róseo na superfície da cultura.
Catalase	Adição de H ₂ O ₂ em uma lâmina com cultura bacteriana. Produção de bolhas.	Vermelho de metila	Meio rico em glicose acrescido com vermelho de metila. Alteração da coloração.
Citrato	Meio Citrato de Simmons acrescido de azul de bromotimol. O consumo de citrato alcaliniza o meio que altera a cor.	Urease	Meio uréia, após 24h adiciona-se vermelho de fenol. A presença de amônia indica a degradação da ureia e eleva o pH gerando coloração rosa.
Beta-galactosidase (ONPG)	Meio contendo ortonitrofenil-Beta-galactosídeo. A Beta-galactosidase origina o nitrofenol produzindo coloração amarela.	Voges-Proskauer	Caldo MR-VP. Identificação de acetoína devido a produção de um anel vermelho.

Segundo Mautone (2008) e Moreira *et al.*, (2010), os testes apresentados na Tabela 2.5 são indicados para caracterizar leveduras.

TABELA 2.5: Metodologias indicadas para caracterização bioquímica de leveduras (Adaptado de MAUTONE, 2008 e MOREIRA *et al.*, 2010).

Método	Princípio	Método	Princípio
Teste de fermentação	Meio rico em glicose contendo o tubo Durham. A fermentação da glicose leva a produção de gás que acumula no tubo.	Crescimento em diferentes temperaturas	Variação da temperatura em uma faixa que pode abranger de 28 a 45°C.
Assimilação de fontes de carbono	Inocula-se o micro-organismo em água destilada por 2 dias. Semeadura em placas com diferentes fontes de carbono por 21 dias.	Tolerância ao NaCl	Meio YEPG acrescido de NaCl em diferentes concentrações.
Assimilação de nitrogênio	Idem ao anterior variando as fontes de nitrogênio.	Tolerância a glicose	Meio YEPG acrescido de diferentes concentrações de glicose.
Produção de urease	Meio YCB-Ureia acrescido de fucsina até obter coloração rosa. A presença de urease vira a coloração de rosa para branco.		

Para fungos filamentosos indica-se a caracterização morfológica utilizando a técnica de microcultivo. Esta técnica é usada para identificação de pseudo-hifas ou hifas verdadeiras. Corta-se o ágar solidificado em uma placa de petri, em forma quadrada, inocula-se o fungo nas bordas deste quadrado e coloca-se uma lamínula previamente estéril sobre o meio cortado. Após 7 a 14 dias, analisa-se a lamínula através da microscopia óptica (MAUTONE, 2008).

2.4.2 Caracterização usando a biologia molecular

Com o avanço da genética, a biotecnologia e a biologia molecular ganharam espaço permitindo que os micro-organismos pudessem ser identificados e agrupados

de acordo com as ferramentas da engenharia genética (MADIGAN *et al.*, 2010 e FELESTRINO, 2013). Os avanços das metodologias de sequenciamento de DNA permitem que uma série de genomas sejam conhecidos e, dessa forma, diversas espécies microbianas podem ser identificadas independentemente de serem cultivadas em laboratório (AMORIM, 2014). Várias tecnologias de sequenciamento de DNA são descritas na literatura, sendo algumas delas apresentadas a seguir.

2.4.2.1 *Método didesoxi de Sanger*

Frederic Sanger desenvolveu uma metodologia para analisar fragmentos de DNA de diferentes tamanhos marcados radioativamente. Os fragmentos do DNA recebem os ddNTPs (didesoxirribonucleosídeos trifosfatados) de forma aleatória, e a sua incorporação provoca o término da polimerização da fita de DNA. Os fragmentos são separados por eletroforese e os géis são revelados por raio X, em quatro reações correspondentes ao término de cada uma das bases adenina, timina, guanina, citosina (MADIGAN *et al.*, 2010).

2.4.2.2 *Sequenciamento automático*

Baseia-se no método didesoxi, proposto por Sanger, fazendo a troca dos marcadores radioativos por corantes fluorescentes. A separação dos fragmentos ocorre por eletroforese capilar e a fluorescência dos ddNTPs é detectada por espectroscopia de fluorescência. Cada base é associada a uma cor distinta e o equipamento detecta a fluorescência indicando a sequência da cadeia que é complementar à usada como molde (MATIENZO, 2002).

2.4.2.3 *Pirossequenciamento*

O DNA é fragmentado em segmentos com cerca de 100 bases, cada fragmento é imobilizado em uma esfera que são depositadas em uma placa de fibra óptica contendo um milhão de poços e cada poço é suficiente para uma única esfera, posteriormente estes fragmentos são amplificados e após amplificação procede-se à reação de sequenciamento, na qual a identidade do nucleotídeo é revelada pelo

pareamento de bases. Os nucleotídeos são aplicados sobre a placa separadamente e as reações de sequenciamento ocorrem de forma simultânea. Cada vez que um nucleotídeo é incorporado na fita complementar, uma molécula de pirofosfato é liberada emitindo luz devido a ação da enzima luciferase (MATIENZO, 2002).

Nota-se que o cianeto é um composto de uso intensivo nas indústrias ao mesmo tempo que é um dos maiores poluentes ambientais. O risco iminente de barragens de contenção, contendo lama tóxica, torna imperativa a necessidade de tratamento destes efluentes contendo cianeto e seus derivados. Nos últimos anos, o tratamento biológico tem sido um processo difundido para tratar águas residuárias de diferentes composições e, dessa forma, a busca de espécies com capacidade de degradar compostos tóxicos, através da bioprospecção, é ponto fundamental no desenvolvimento destas tecnologias. Para isso, faz-se necessário isolar e caracterizar micro-organismos de áreas afetadas, aliando as técnicas da biologia molecular com a microbiologia clássica, gerando não só o conhecimento das espécies envolvidas, mas também avaliando a bioquímica e fisiologia das mesmas.

3. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO TRABALHO

O setor metalúrgico está em constante crescimento sendo um dos segmentos com maior demanda e geração de cianeto. Desde 2010, as indústrias siderúrgicas desfrutaram de um aumento na produção do aço que atingiu 1,5 bilhão de toneladas/ano em 2013. Esse aumento reflete diretamente no aumento de efluentes gerados por esse segmento (SOUZA, 2014).

A indústria siderúrgica é considerada como um dos ramos mais poluentes, quando comparada com todos os outros setores da metalurgia. E a coqueria é o potencial poluidor gerando efluentes líquidos com teor de cianeto na ordem de 10 a 50 mg L⁻¹, fenol de 500 a 1000 mg L⁻¹ e cloreto de 4.000 a 4.200 mg L⁻¹. A concentração de cianeto em efluentes que serão lançados nos corpos receptores deve ser adequada à Resolução CONAMA 430 de 2011 que determina um valor máximo de 0,2 mg L⁻¹ (PRASAD *et al.*, 1991).

O tratamento do cianeto presente no efluente siderúrgico é realizado por métodos físico-químicos que oxidam esse composto aplicando agentes oxidantes no meio. As soluções mais empregadas são cloreto de ferro(III) ou sulfato de ferro(III). No entanto, esses processos não atingem o limite de ideal para descarte, necessitando de metodologias que possam ser mais eficientes (SANTOS, 2010).

Uma alternativa ao tratamento físico-químico é o tratamento biológico. Para isso, deve-se selecionar micro-organismos tolerantes e que podem ter potencial de induzir vias de degradação do composto de interesse (LIMA, 2010). Dessa forma, a bioprospecção é uma ferramenta importante para isolar micro-organismos que tenham a capacidade de tolerar, adquirir resistência ou metabolizar esse composto. A seleção microbiana se torna atrativa para desenvolver mecanismos de remoção biológica, uma vez que são processos econômicos de elevada eficiência.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Isolar micro-organismos que apresentem potencial para crescer em meio contendo o cianeto a partir de amostra de reator biológico de lodos ativados de uma indústria siderúrgica.

4.2 Objetivos específicos

- ✓ Isolar micro-organismos de uma amostra de reator de lodos ativados de uma indústria siderúrgica, utilizando a técnica de esgotamento por estrias.
- ✓ Caracterizar as colônias isoladas em relação à sua morfologia e fisiologia.
- ✓ Testar a tolerância das culturas isoladas em meio contendo concentrações crescentes de cianeto, em pH 10,0.
- ✓ Avaliar o crescimento das culturas isoladas em meio contendo 40 mg L⁻¹ de cianeto, em pH 10,0.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Isolamento Microbiano

Inicialmente coletou-se uma amostra de 100 mL de um reator de lodos ativados de uma indústria siderúrgica. O crescimento microbiano foi realizado inoculando 1 mL da amostra biológica em placas de *Petri* contendo meio ágar YMA e LB (a composição dos meios está descrita em Anexo I). As placas foram incubadas a 30°C durante 7 dias.

Após o crescimento das culturas, os micro-organismos com características visuais distintas foram coletados de forma asséptica utilizando alça de platina e transferidos para os respectivos meios (YMA e LB). O isolamento foi realizado pela semeadura por estrias em placas de *Petri*.

5.2 Análise de tolerância ao cianeto

O teste de tolerância foi realizado adicionando aos meios YM e LB duas concentrações de solução de cianeto diferentes, sendo uma concentração mínima de 0,5 mg L⁻¹ e uma concentração máxima de 40 mg L⁻¹. Os micro-organismos que cresceram em 40 mg L⁻¹ de cianeto foram selecionados e adaptados. Como há risco de volatilização de HCN em pH abaixo de 9,3, todos os testes foram realizados em pH 10,0, sendo as culturas de bactérias e leveduras isoladas previamente adaptadas a esta condição.

As culturas de bactérias (B1, B5) e as leveduras (L5, L6) foram inoculadas em caldo YM de acordo com meio no qual foi realizado o isolamento. Enquanto as culturas bacterianas (B2, B3, B4 e B6) foram inoculadas em meio LB. Todas as culturas foram mantidas em *shaker* a 30°C e 180 min⁻¹. O crescimento foi avaliado pela determinação da densidade óptica a 560 nm, para o caldo YM acrescido de cianeto e a 600 nm para o caldo LB acrescido de cianeto. Os micro-organismos que toleraram o cianeto foram caracterizados de acordo com a morfologia e fisiologia.

5.3 Caracterização dos micro-organismos isolados

5.3.1 Caracterização Bacteriana

As colônias de bactérias isoladas foram cultivadas em meio YM e LB acrescidos de cianeto e identificadas utilizando a letra “B” seguida de numeração sequencial.

5.3.1.1 *Caracterização morfológica bacteriana*

Observou-se visualmente as principais características macroscópicas das colônias isoladas, segundo Matienzo (2002) *apud* Barnett *et al.*, (1990): cor da cultura, se possui brilho ou é opaca, com formato circular ou oval, podem apresentar margem regular, ramificada ou irregular. A superfície pode ser lisa ou rugosa, com uma elevação plana ou convexa, além de analisar a consistência (cremosa, membranosa, seca).

Posteriormente, fez-se a análise microscópica das colônias de bactérias através da técnica de coloração pelo método de Gram. O preparo das lâminas foi feito após higienização das mesmas com álcool 70% e flambagem em um bico de Bunsen. Colocou-se uma gota de solução salina e transferiu-se uma porção da colônia previamente isolada para a lâmina fazendo movimentos circulares. A lâmina ficou exposta ao ar por cerca de 3 minutos para secar e posteriormente foi flambada para fixar o esfregaço. Aplicou-se, sobre o esfregaço, cristal violeta com um tempo de reação de um minuto, lavou-se com água destilada e aplicou-se lugol por um minuto e meio, novamente lavou-se a lâmina com água, álcool acetonado, e água novamente e, em seguida, aplicou-se safranina durante 30 segundos, lavando com água novamente. A lâmina foi secada ao ar e levada ao microscópio óptico para identificação do teste Gram e análise da morfologia.

5.3.1.2 *Caracterização bioquímica*

De acordo com Matienzo (2002) *apud* Barnett *et al.*, (1990), as colônias foram repicadas 48 horas antes da realização dos testes bioquímicos. Todos os meios de cultura e reagentes utilizados para inocular as colônias estão descritos no Anexo I. Todos os meios foram previamente esterilizados e as colônias foram transferidas para

os mesmos de forma asséptica utilizando uma alça de platina. As amostras foram incubadas em estufa a 30°C durante dois dias.

- i) Produção de Indol: Preparou-se o caldo triptofano e verteu-se 5 mL em tubos de ensaio contendo tampa. Inoculou-se as culturas bacterianas nos tubos identificados e as amostras foram incubadas. Decorrido o tempo de incubação, adicionou-se três gotas do reagente de Kovacs e aguardou-se um minuto para leitura do resultado.
- ii) Vermelho de Metila: As bactérias foram inoculadas em tubos de ensaio identificados contendo 10 mL de caldo MR-VP e incubadas. Adicionou-se 5 gotas de solução de vermelho de metila ao meio e analisou-se a coloração formada.
- iii) Voges-Proskauer: O teste foi realizado em duas etapas denominadas A e B. Colocou-se 10 mL de caldo MR-VP em tubos de ensaio identificados, inoculou-se as colônias com alça de platina. No tubo A, acrescentou-se 7 gotas do reagente A, enquanto o tubo B recebeu 4 gotas do reagente B para cada mL de meio. Aguardou-se 15 minutos para analisar a coloração do meio.
- iv) Utilização do citrato: Preparou-se o meio ágar Citrato de Simmons em tubos de ensaio, inoculou-se a colônia e os tubos foram incubados. Analisou-se a coloração do meio ao fim do experimento.
- v) Metabolização da uréia: Inoculou-se e incubou-se a cultura em 10 mL de caldo ureia e analisou-se a alteração da cor do meio.
- vi) Catalase: Inicialmente higienizou-se as lâminas de vidro com álcool 70% e as mesmas foram flambadas em bico de Bunsen. Cada lâmina foi identificada de acordo com a cultura a ser analisada. Acrescentou-se uma gota de água

destilada sobre a lâmina e acrescentou-se, com o auxílio de uma alça de platina, uma porção da cultura previamente isolada através de movimentos circulares. Colocou-se uma gota de peróxido de hidrogênio a 5% v/v e analisou se houve formação de borbulhamento, devido à liberação de oxigênio pela catalase.

Os resultados foram anotados para posterior comparação com a literatura e determinação dos grupos microbianos.

5.3.2 Caracterização de leveduras

As colônias de leveduras isoladas foram cultivadas em meio YM e identificadas utilizando a letra “L” seguida de numeração sequencial.

5.3.2.1 *Caracterização morfológica*

Após o crescimento das leveduras em placas de *Petri*, as colônias foram analisadas de forma macroscópica seguindo os parâmetros de Moreira *et al.*, (2010). Para isso, considerou-se aspectos como a forma (irregular ou circular), tamanho (grande, médio, pequeno), superfície (granulosa, estria radial, estria concêntrica), bordas (lisa, ondulada, pregueada, filamentosa), perfil (lisa e convexa, lisa crateriforme, convexa pregueada, lisa e côncava, achatada e pregueada, achatada).

5.3.2.2 *Caracterização bioquímica*

As leveduras previamente isoladas foram repicadas e incubadas por 48 horas, a 30°C, antes de iniciar os testes bioquímicos. Os testes realizados foram feitos de acordo com as descrições de Mautone (2008) e Moreira *et al.*, (2010).

- i) Crescimento em diferentes temperaturas: As leveduras foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 10 mL do meio YEPG e incubadas por quatro dias para análise do crescimento a 42°C. Para testar o crescimento nas demais

temperaturas, foram preparadas placas de Petri contendo o mesmo meio e incubadas a 28°C e 37°C.

- ii) Secreção de ácido acético: Preparou-se placas de *Petri* contendo o meio YEPG acrescido de 0,5% (m/v) de CaCO₃. O meio esterilizado foi vertido em placas de *Petri*. Após a solidificação do meio, foram feitos furos na placa e aplicou-se suspensões de leveduras nestes furos e um controle contendo água destilada. As placas foram incubadas a 30°C durante 21 dias. As alterações do meio foram acompanhadas diariamente.
- iii) Tolerância a NaCl: Preparou-se o meio ágar YEPG acrescido com 10% e 16% de NaCl e verteu-se em tubos de ensaio. As amostras foram incubadas por 21 dias a 30°C.
- iv) Tolerância a glicose: Preparou-se o meio ágar YEPG acrescido com 40% e 60% de glicose e verteu-se em tubos de ensaio. As amostras foram incubadas por 21 dias a 30°C.

Os resultados foram anotados para posterior comparação com a literatura e determinação dos grupos microbianos.

5.4 Curva de crescimento microbiano

5.4.1 Crescimento bacteriano em meio LB acrescido de cianeto

Os isolados bacterianos identificados como B2, B3 e B4 foram mantidos nas mesmas condições do isolamento, ou seja, utilizando o caldo LB. As culturas foram inoculadas em 150 mL de caldo LB contendo 40 mg L⁻¹ de cianeto, uma alíquota de 1 mL do meio foi retirada diariamente para análise da densidade óptica a 600 nm, durante 12 dias, atentou-se para que o limite de retirada do meio não ultrapassasse 10% do volume total. Os valores de absorbância foram anotados para traçar a curva de densidade óptica *versus* tempo (dias). Paralelamente, foram feitas culturas nas

mesmas condições para avaliação diária do pH. Todos os cultivos foram mantidos em *shaker* a 30°C e agitação de 180 min⁻¹.

5.4.2 Crescimento em meio YM acrescido de cianeto

As bactérias (B1, B5) e as leveduras (L5, L6) foram mantidos nas mesmas condições do isolamento, ou seja, utilizando meio de cultura YM contendo 40 mg L⁻¹ de cianeto. As culturas foram inoculadas em caldo YM, uma alíquota de 1 mL do meio foi retirada em tempos pré-definidos em horas, durante 4 dias, para análise da densidade óptica a 560 nm. Atentou-se para que o limite de retirada do meio não ultrapassasse 10% do volume total. Os valores da absorbância foram anotados para traçar a curva de densidade óptica *versus* tempo (em horas). Paralelamente, foram feitas culturas nas mesmas condições para avaliação diária do pH. Todos os cultivos foram mantidos em *shaker* a 30°C e agitação de 180 min⁻¹.

Um resumo sobre a metodologia utilizada está representando através da Figura 5.1.

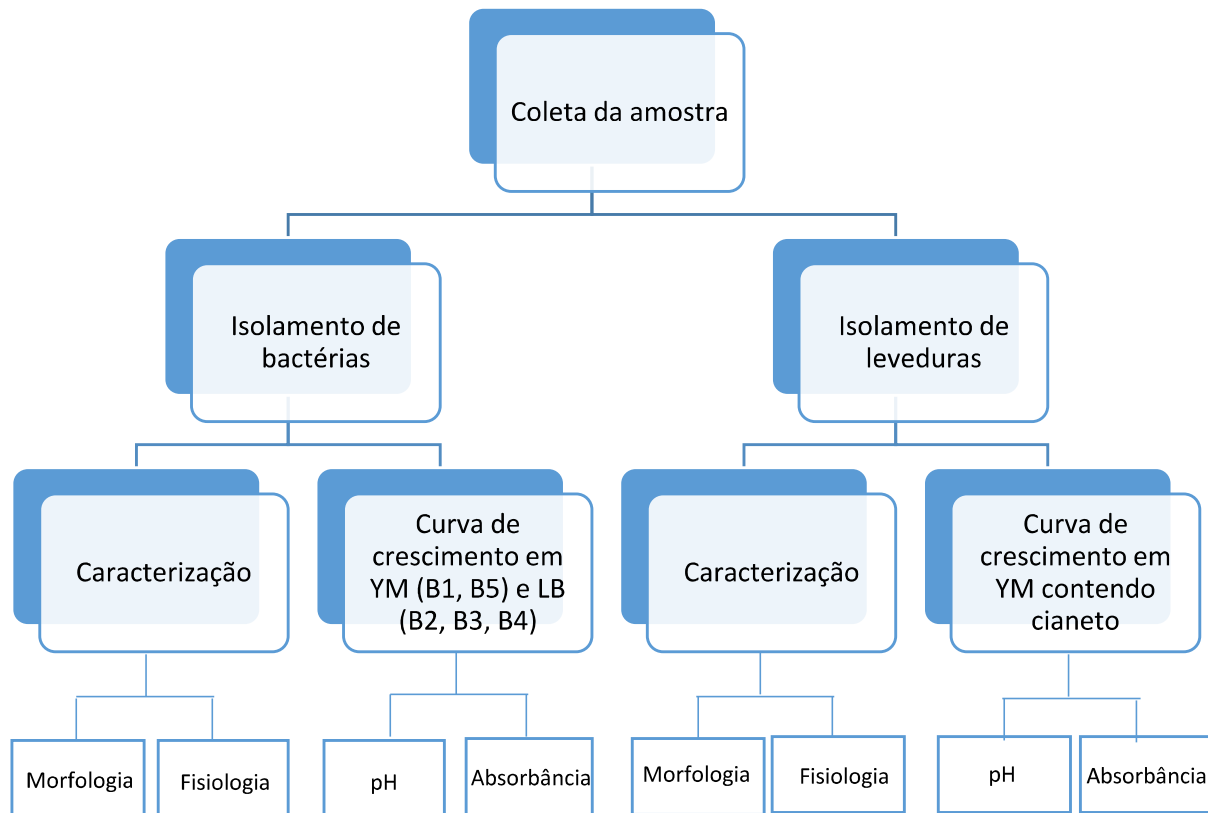


FIGURA 5.1: Fluxograma representando as principais etapas da metodologia usada para as bactérias e leveduras que apresentaram tolerância ao cianeto.

6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 Isolamento microbiano

A amostra de lodo biológico apresentou uma grande diversidade microbiana como mostra a Figura 6.1.

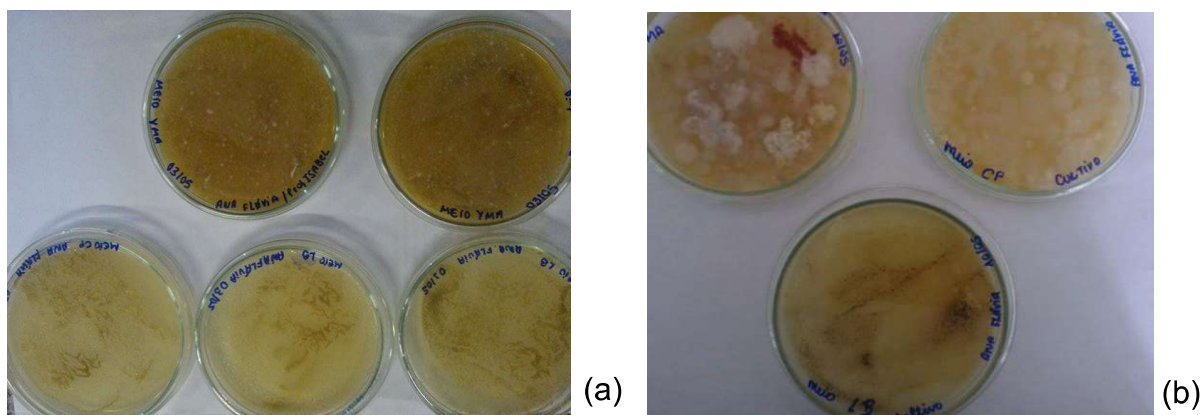


FIGURA 6.1: Micro-organismos obtidos de um reator de lodos ativados de uma indústria siderúrgica. (a) representa os micro-organismos em meio LB e (b) em meio YMA.

A partir destas culturas enriquecidas, foram isoladas 10 colônias, sendo duas leveduras, seis bactérias e dois fungos filamentosos. A Figura 6.2 apresenta os isolados de leveduras obtidos em meio YMA e denominados L5 e L6.

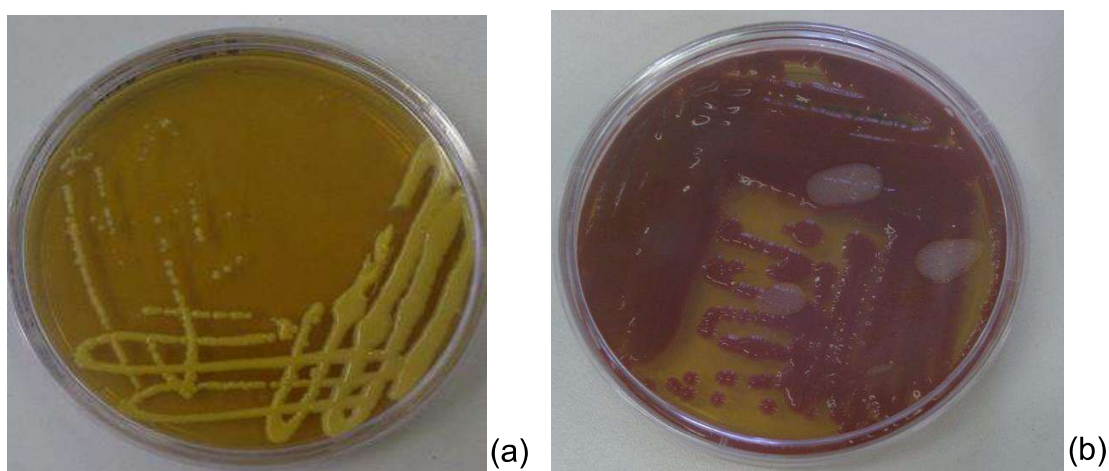


FIGURA 6.2: Isolados de leveduras obtidos do meio YMA. Em (a) está representada a levedura L5 e em (b) a levedura L6.

A Figura 6.3 mostra os isolados denominados B1 e B5 obtidos em meio YMA e a Figura 6.4 mostra os isolados de bactérias obtidos em meio LB e denominados como B2, B3, B4 e B6.

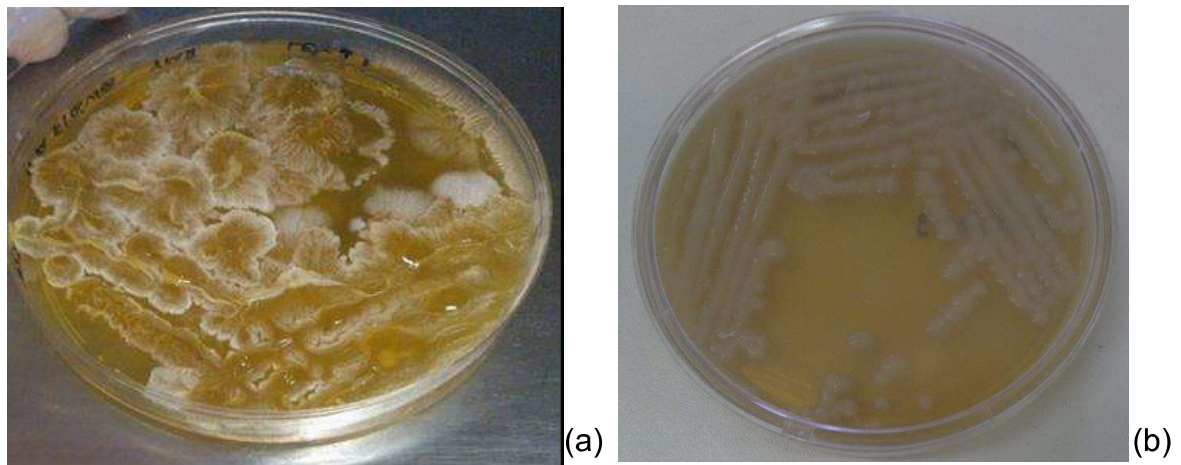


FIGURA 6.3: Isolados de bactérias em meio YMA. Em (a) está representada a bactéria B1 e em (b) está representada a bactéria B5.

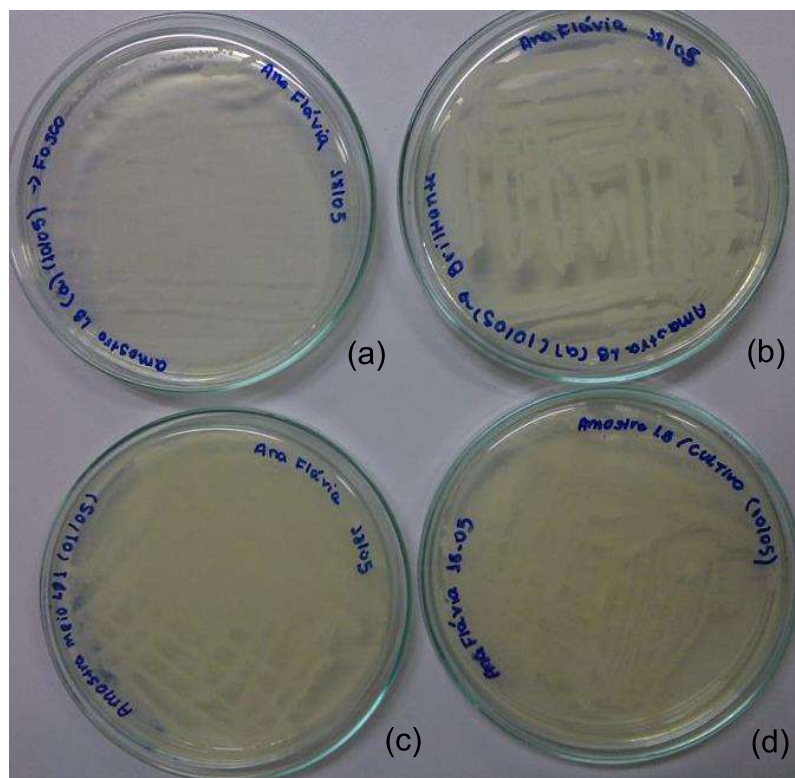


FIGURA 6.4: Isolados de bactérias obtidos em meio LB denominados B2 em (a), B3 em (b), B4 em (c) e B6 em (d).

A Figura 6.5 apresenta os isolados de fungos filamentosos intitulados como F3 e F4, crescidos em meio YMA. Neste trabalho, por questões relativas ao tempo, optou-se por não trabalhar com os isolados de fungos filamentosos.

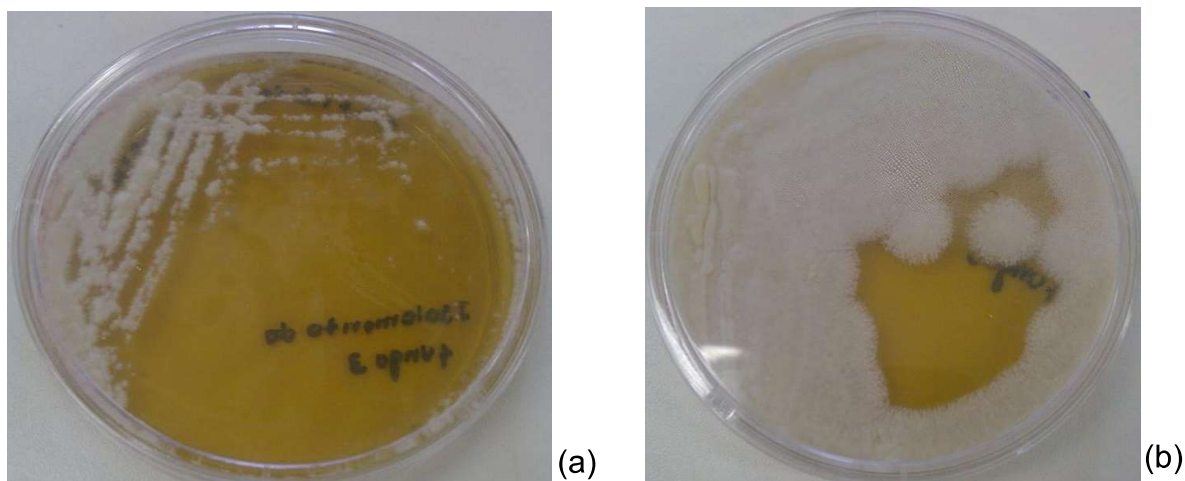


FIGURA 6.5: Isolados de fungos filamentosos crescidos em meio YMA. Em (a) está representado o fungo F3 e em (b) o fungo B4.

6.2 Análise de tolerância ao cianeto

Escolheu-se como concentração mínima $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de cianeto, que é indicado por Simas (2007) como valores recorrentes de serem encontrados em efluentes oriundos de processos como a galvanoplastia. Como concentração máxima foi selecionado o valor de 40 mg L^{-1} de cianeto, Pantaroto (2001) identificou essa concentração através da caracterização físico-química de manipueira fresca, sendo este um rejeito importante da produção de farinha de mandioca. Através da análise da densidade óptica, todos os micro-organismos isolados foram capazes de crescer em meio contendo $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de cianeto. Os micro-organismos que cresceram em 40 mg L^{-1} de cianeto, foram considerados resistentes e deram sequência ao desenvolvimento deste trabalho. As culturas resistentes foram das bactérias (B1, B5) e leveduras (L5, L6) cultivadas em meio YM contendo cianeto e as bactérias (B2, B3 e B4) cultivadas em meio LB contendo cianeto. Como dito anteriormente, os fungos filamentosos não foram testados.

6.3 Caracterização microbiológica

6.3.1 Caracterização bacteriana

6.3.1.1 Morfologia

A Tabela 6.1 apresenta as principais características macroscópicas das colônias de bactéria isoladas e que foram resistentes a 40 mg L⁻¹ de cianeto.

TABELA 6.1: Características macroscópicas das bactérias isoladas de lodo ativado e que apresentaram resistência a 40 mg L⁻¹ de cianeto.

Identificação	Cor	Brilho	Formato	Margem	Superfície	Consistência
B1	Amarela	Brilhante	Irregular	Irregular	Elevação	Membranosa
B2	Amarela	Opaco	Circular	Regular	Elevação	Seca
B3	Amarela	Opaco	Circular	Regular	Lisa	Seca
B4	Branca	Opaco	Oval	Irregular	Elevação	Membranosa
B5	Branca	Brilhante	Circular	Regular	Elevação	Cremonosa

Todas as colônias apresentaram características bem distintas. A bactéria B1 apresentou como característica evidente a produção de exopolissacarídeo (EPS), esse composto é produzido por bactérias que estão presentes em sistemas de lodos ativados por permitir aderência dos flocos microbianos gerados nesse processo. Além disso, esses EPS protegem esses organismos do estresse ambiental e contribuem para a fixação de nutrientes (SILVA, 2013). A cultura B5 apresentou colônias isoladas grandes, sendo inicialmente considerada como levedura. As demais culturas não apresentaram características particulares.

Além da caracterização dos aspectos das colônias, analisou-se a morfologia celular pela técnica da coloração diferencial de Gram em microscópio óptico, estes resultados são mostrados na Figura 6.6.

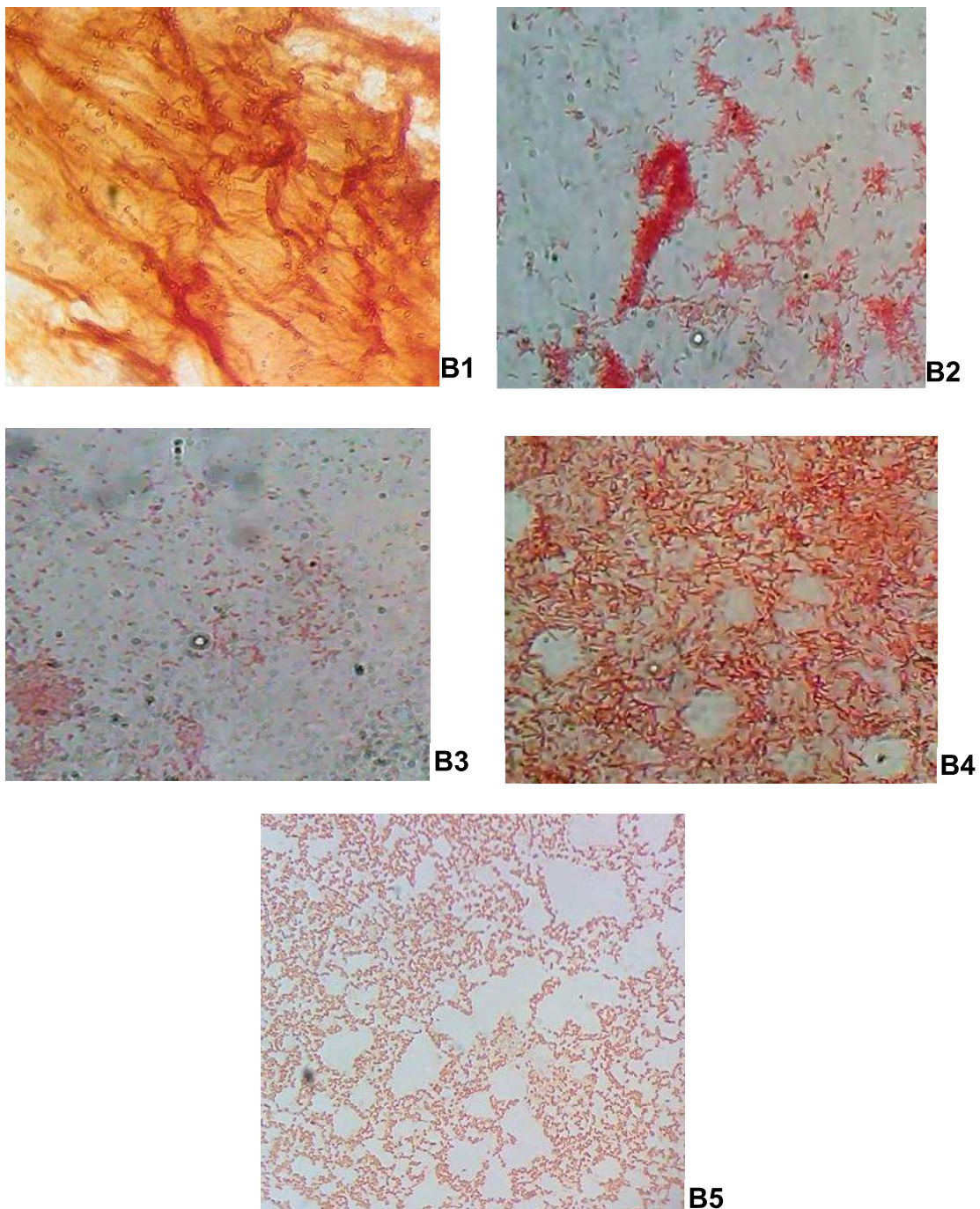


FIGURA 6.6: Coloração diferencial de Gram das culturas de bactérias isoladas de lodos ativados e resistentes ao cianeto. Aumento 1.000X.

Todas as bactérias isoladas foram Gram negativas, são bactérias que apresentam uma membrana externa à parede celular, composta por

lipopolissacarídeos (LPS) (MADIGAN *et al.*, 2010). As células B1 apresentaram a forma de bastonete médio, B2 e B4 são bastonetes pequenos, B3 são cocos e B5 são cocos-bacilos.

6.3.1.2 Caracterização Bioquímica

A Tabela 6.2 apresenta os resultados da caracterização bioquímica das bactérias B1, B2, B3, B4 a B5. Os testes estão ilustrados no Anexo II.

TABELA 6.2: Resultados bioquímicos para a caracterização bacteriana.

Testes	B1	B2	B3	B4	B5
Catalase	+	+	+	+	+
Vermelho de Metila	-	-	+	-	-
Indol	-	-	-	-	-
Voges-Proskauer	-	-	-	-	-
Uréia	+	+	-	+	-
Citrato	+	+	+	-	+

Pelos testes bioquímicos, os micro-organismos que mais se assemelham aos resultados obtidos pela caracterização são:

- i) B1 e B2 se aproximam dos grupos *Klebsiella* e *Proteus*;
- ii) B3 se aproximou dos gêneros *Salmonella*, *Arizona*, *Citrobacter*, *Liquefaciens*.

Todos os possíveis organismos apresentados são gram-negativos e classificados como bactérias entéricas (GUENTZEL, 1996).

Os resultados para B4 e B5 foram inconclusivos, uma vez que as características obtidas não estavam presentes na tabela comparativa utilizada por Guentzel, 1996. Porém, como a amostra utilizada foi obtida de lodo ativado pode-se considerar também como possíveis micro-organismos os grupos *Thiobacillus*,

Gallionella, *Leptothrix*, *Sulfobacillus* e *Pseudomonas* como gram-negativos e de alta incidência em efluentes de mineração e siderurgia (MADIGAN *et al.*, 2010).

6.3.2 Caracterização das leveduras

6.3.2.1 *Caracterização morfológica*

A Tabela 6.3 apresenta as principais características macroscópicas descritas por Moreira *et al.*, 2010 e observadas para os isolados L5 e L6.

TABELA 6.3: Características macroscópicas das leveduras isoladas de lodo ativado e que apresentaram resistência a 40 mg L⁻¹ de cianeto.

Identificação	Tamanho	Bordas	Formato	Perfil	Superfície
L5	Pequeno	Lisa	Circular	Lisa/Convexa	Concêntrica
L6	Grande	Lisa	Circular	Lisa/Elevada	Concêntrica

A cultura L5 apresentou coloração amarela e a L6 apresentou coloração vermelha, devido a produção de pigmentos. A Figura 6.7 apresenta a microscopia destas leveduras, a levedura L5 apresenta uma forma globosa, já a levedura L6 apresenta uma forma de pseudo-hifas.

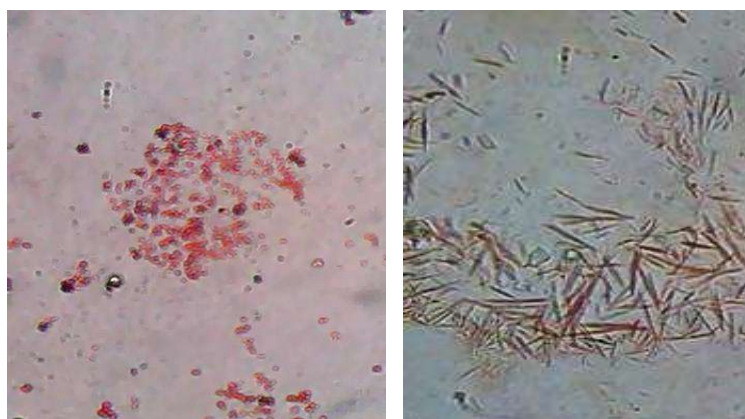


FIGURA 6.7: Microscopia das leveduras isoladas. À esquerda L5 e à direita L6. Coloração diferencial de Gram. Aumento 400X.

6.3.2.2 Caracterização Bioquímica

A Tabela 6.4 apresenta os resultados da caracterização bioquímica das leveduras L5 e L6. Os resultados dos testes estão ilustrados no Anexo II.

TABELA 6.4: Resultados bioquímicos para a caracterização das leveduras.

Testes	Secreção ácido acético	Tolerância NaCl		Tolerância Glicose		Temperatura		
		10%	16%	40%	60%	30°C	37°C	42°C
L5	-	+	+	+	+	+	+	+
L6	-	+	+	+	+	+	-	-

O teste bioquímico foi inconclusivo para selecionar os possíveis grupos de leveduras que poderiam representar L5 e L6. Observa-se pela Tabela 6.4 que ambos apresentam tolerância a altas concentrações de glicose e NaCl. A levedura L5 apresentou ainda crescimento em diferentes temperaturas chegando a crescer a uma temperatura máxima de 42°C, enquanto L6 foi capaz de crescer apenas a 30°C.

6.4 Curva de crescimento microbiano

As bactérias B2, B3 e B4 foram isoladas e adaptadas em meio LB. Foi observado que o início do crescimento dessas culturas ocorria a partir do terceiro dia. Assim, a curva de crescimento foi traçada com o tempo em dias, como mostra a Figura 6.8.

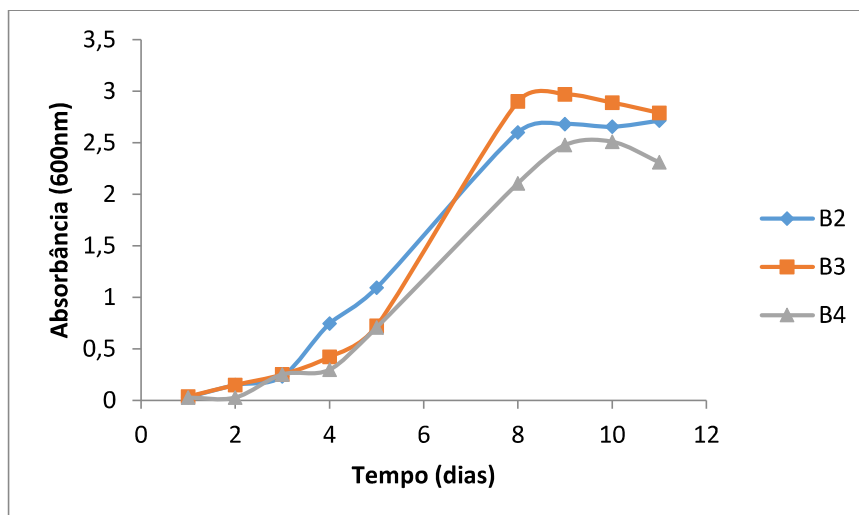


FIGURA 6.8: Curva de crescimento das bactérias em meio LB, densidade óptica a 600 nm *versus* tempo (dias), 40 mg L⁻¹ de cianeto, 30° e 180 min⁻¹.

Entre os dias 0 e 3 as bactérias apresentaram a fase *lag* (fase de adaptação) do crescimento microbiano. Isso pode ser justificado pela necessidade de ativação das vias de biossíntese das enzimas capazes de metabolizar os compostos presentes no meio aos quais a cultura não estava previamente adaptada. A partir do quarto dia observa uma fase de crescimento exponencial (fase log) para todas as culturas, esta fase se estende até o oitavo dia. Posteriormente as culturas entraram em fase estacionária que é limitada pelo consumo dos nutrientes ou por metabólitos excretados que podem inibir o crescimento (MADIGAN *et al.*, 2010). No décimo dia é possível observar uma fase de declínio celular para as bactérias B3 e B4, esta fase não foi observada para a bactéria B2 durante o tempo de desenvolvimento do experimento. Não foram observadas diferenças significativas nas curvas de crescimento destes micro-organismos indicando que os mesmos se comportam de forma semelhante na presença de cianeto.

Como as bactérias B1 e B5 foram isoladas em meio YMA optou-se por mantê-las em caldo YM acrescido com cianeto. Além disso, o comportamento destas culturas frente à velocidade de crescimento foi mais semelhante ao comportamento dos isolados L5 e L6. A Figura 6.9 apresenta a curva de crescimento das bactérias B1, B5 e das leveduras L5 e L6 em caldo YM acrescido de cianeto. O crescimento foi analisado em horas, durante 4 dias.

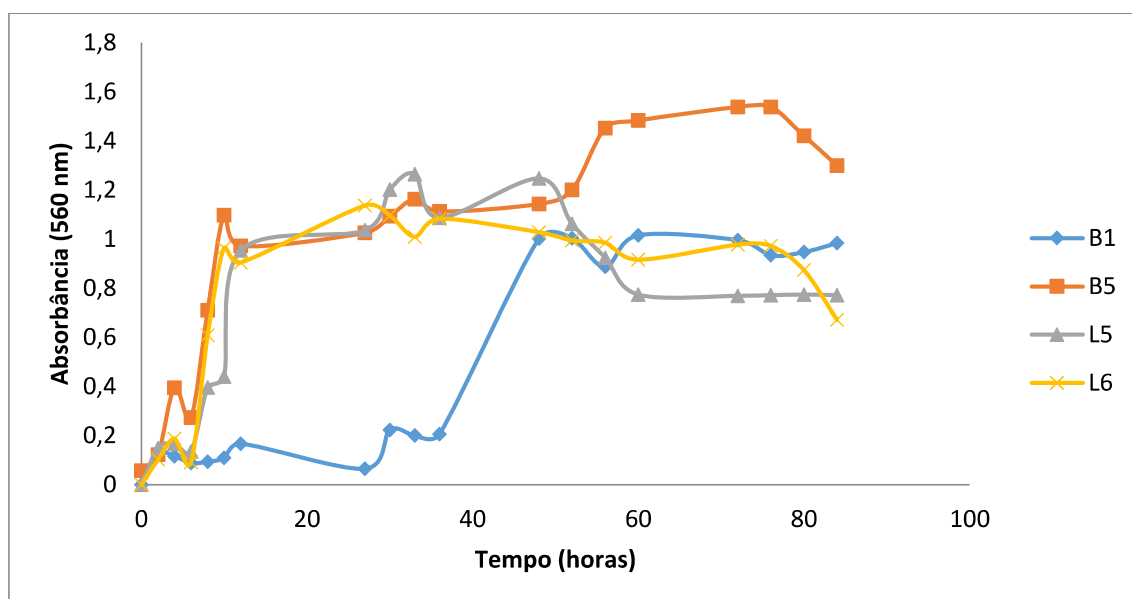


FIGURA 6.9: Curva de crescimento das bactérias e leveduras em caldo YM, densidade óptica a 560 nm *versus* tempo (horas), 40 mg L⁻¹ de cianeto, 30° e 180 min⁻¹.

Observou-se que B5, L5 e L6 não apresentaram fase *lag*, ou seja, houve um estabelecimento imediato das culturas levando ao crescimento exponencial. Em 20 horas estas culturas entraram em fase estacionária e permaneceram até aproximadamente 50 a 60 horas. L5 apresentou fase declínio em 60 horas e L6 após 80 horas. B1 apresentou uma fase *lag* até 30 horas, entrando em fase exponencial de crescimento e permanecendo em fase estacionária a partir de 50 horas. Estes resultados sugerem que as culturas B5, L5 e L6 utilizam o cianeto mais rapidamente que a cultura B1 e que provavelmente a cultura B5 é capaz de utilizar metabólitos secundários em seu desenvolvimento, mostrando ser a cultura mais bem adaptada à presença de cianeto no meio.

Ao comparar ambas as curvas, observa-se que as bactérias apresentaram uma maior sensibilidade ao meio, necessitando de uma fase *lag* maior. Os resultados abrem caminhos para possíveis análises considerando que as bactérias podem apenas tolerar a presença de cianeto no meio, enquanto as leveduras e a bactéria B5 podem metabolizar esse composto. Atenta-se ao fato dos meios LB e YM apresentarem fontes de carbono, nitrogênio e aminoácidos que podem interferir na análise do metabolismo do cianeto. Estudos aprofundados devem ser realizados considerando-se o uso do meio mínimo.

As Tabelas 6.5 e 6.6 apresentam as medidas de pH para esses cultivos.

TABELA 6.5: Variação do pH do meio para os cultivos em meio LB sem cianeto e meio LB com cianeto, pH inicial 10,0, 30°C, 180 min⁻¹.

Micro-organismo	pH sem cianeto	pH com cianeto
Segundo dia		
B2	8,88	9,43
B3	8,53	9,44
B4	9,25	9,43
Terceiro dia		
B2	8,56	9,30
B3	8,38	9,22
B4	8,97	9,28
Quarto dia		
B2	8,56	9,16
B3	8,24	9,10
B4	8,32	9,22
Sétimo dia		
B2	8,52	8,90
B3	8,21	8,90
B4	8,27	9,21

TABELA 6.6: Variação do pH do meio para os cultivos em meio YM sem cianeto e meio YM com cianeto, pH inicial 10,0, 30°C, 180 min⁻¹.

Micro-organismo	pH sem cianeto	pH com cianeto
Primeiro dia (após 12h de inoculação)		
B1	9,00	9,06
B5	6,56	6,84
L5	7,00	8,97
L6	9,30	9,09
Segundo dia		
B1	7,00	8,06
B5	6,15	6,18
L5	6,58	5,97
L6	7,90	6,74
Terceiro dia		
B1	7,66	7,00
B5	6,17	6,14
L5	5,69	5,79
L6	6,92	7,28
Quarto dia		
B1	6,68	7,60
B5	6,14	6,15
L5	5,77	6,05
L6	6,40	8,15

Para os cultivos em meio LB (Tabela 6.5) observa-se uma ligeira queda no pH do meio, após o segundo dia, sendo esta queda mais acentuada para os cultivos sem cianeto. A redução do pH do meio é oriunda do próprio metabolismo microbiano, no

qual o consumo de carboidratos gera íons H^+ . No entanto, o pH é posteriormente mantido ao longo de todo experimento. Por outro lado, os cultivos em meio YM mostram redução mais drástica nos valores de pH, sendo esta redução mais rápida para o cultivo B5. Estes dados corroboram com os dados da cinética de crescimento microbiano nos quais se observa taxas de crescimento mais rápidas para os cultivos em meio YM e uma melhor tolerância do cultivo B5 à presença de CN^- no meio. A redução do pH do meio favorece a formação de HCN e, consequentemente, a volatilização do cianeto, o que pode ter colaborado para o crescimento mais acelerado dos cultivos em meio YM. Um questionamento que pode ser levantado é se esta resposta está relacionada ao metabolismo microbiano ou à composição do meio de cultivo, experimentos futuros deverão ser conduzidos no sentido de responder à esta indagação.

O pH pode variar devido a um mecanismo de defesa ou através do crescimento microbiano devido às reações metabólicas, ou seja, produção de substâncias ácidas ou básicas. Como o meio apresenta o cianeto sabe-se que existem quatro vias gerais para a biodegradação desse composto, sendo: hidrolítica, oxidativa, redutiva e substituição/transferência. A via a ser utilizada depende das condições externas tais como oxigênio, pH e concentração de cianeto (EBBS, 2004). As reações hidrolíticas são catalisadas pela cianeto hidratase que produz formiato e amônia, sendo que as mesmas têm um intervalo ótimo de pH entre 7 e 9 (DASH *et al.*, 2009). Esta observação é relevante quando se observa a faixa de pH dos cultivos em meio YM com cianeto que ficaram entre 5,8 e 9,0 e apresentaram crescimento mais acelerado que os cultivos em meio LB. Estes últimos, apresentaram redução do pH para abaixo de 9,0 após o sétimo dia de experimento, coincidindo com o meio da fase *log*. Estas observações corroboram para aceitação da via hidrolítica de degradação do cianeto para estes micro-organismos.

Os valores de pH obtidos para todos os cultivos foram equivalentes aos valores descritos na Tabela 2.3, coincidindo o gênero *Klebsiella* com os resultados dos testes bioquímicos.

7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos permitiram concluir que das 10 culturas isoladas 7 apresentaram boa adaptação em meio contendo cianeto mostrando potencial para degradar esse composto, sendo duas leveduras e cinco bactérias. Todas as bactérias encontradas foram Gram negativas.

Os ensaios cinéticos mostraram que os isolados B5, L5 e L6 apresentaram maior velocidade de crescimento em meio contendo cianeto, com dados coerentes em relação à manutenção do pH do meio entre 7 e 9, justificando a utilização de uma via hidrolítica para remoção desse íon.

Dessa forma, este trabalho mostrou grandes perspectivas no estudo da biodegradação do cianeto e experimentos futuros devem ser conduzidos para responder a questionamentos, tais como:

- i. Realizar maior número de provas bioquímicas e técnicas moleculares a fim de identificar os isolados.
- ii. Avaliar a influência do meio na biodegradação do cianeto.
- iii. Avaliar se o cianeto é apenas tolerado ou metabolizado por esses micro-organismos. Caso seja metabolizado, confirmar a via de degradação.
- iv. Avaliar a concentração inicial e final do cianeto e quais os produtos do seu metabolismo. Além de associar o pH ao crescimento microbiano.
- v. Otimizar os processos de biodegradação de cianeto pelos micro-organismos isolados e em culturas mistas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA REGULADORA DE SERVIÇOS DE ABASTECIMENTO DE ÁGUA E DE ESGOTAMENTO SANITÁRIO DO ESTADO DE MINAS GERAIS (ARSAE). Disponível em:

<http://www.copasa.com.br/media2/ResolucaoArsae/resolucaoARSAE_15_2012_norma_tec_precend.pdf>. Acesso em 02 de outubro 2016.

AMORIM, S.S. Isolamento e caracterização de leveduras com potencial para a biorremediação do manganês. 2014. 103f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto.

ANDRADE, R.C.; AFONSO, H.M. Extração por solventes aplicada à recuperação de cianetos. *Revista Escola de Minas*, v.58, n.2, p.161-164, 2005.

ARELLANO, M.T.C. Tratamento de efluente contendo cianeto por oxigênio singlete gerado através da reação de peróxido de hidrogênio e hipoclorito de sódio. 2012. 138f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais e Processos Químicos e Metalúrgicos) – Departamento de Engenharia de Materiais, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

AZEVEDO, C.M.A. **Bioprospecção: Coleta de material biológico com a finalidade de explorar os recursos genéticos**. 2ed. São Paulo: CETESB, 2003. 35p.

BOSON, P. H. G. **Estudo Prospectivo do Setor Siderúrgico**. 1ed. Brasília: CGEE, 2008. 64p.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (CONAMA). Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>> Acesso em 02 de outubro 2016.

DAS, S.; SANTRA, S. C. Cyanide degradation by *Aspergillus niger* strain isolated from steel-plant wastewater. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, v. 10, n. 8, p. 2670-2675, 2011.

DASH, R.R.; GAUR, A.; BALOMAJUMDER, C. Cyanide in industrial wastewater and its removal: a review on biotreatment. *Journal of Hazardous Materials*, v.163, n.1, p.1-11, 2009.

DUTRA, A. J. B.; SOBRAL, L. G. S.; LEMOS, F. A.; SANTOS, F. H. S. O processo eletroquímico como alternativa para o tratamento de efluentes cianídricos. *Revista Escola de Minas*, v.55, n.4, p. 267- 272, 2002.

EBBS, S. Biological degradation of cyanide compounds. *Environmental Biotechnology*, v. 15, n.3, p. 231-236, 2004.

EISLER, R. Cyanide hazards to fish, wildlife, and invertebrates: asynoptic review. *Biological Report*, v. 58, n. 1/23, p. 1-58, 1991.

FEITOSA, J.; PIMENTEL, I. C.; BEUX, M. R.; DALKE, C. R.; PASTRO, F. Z.; TALAMINI, A. Isolamento de microrganismos degradadores de compostos lipídicos de origem vegetal de amostras de águas da barragem do rio Passaúna-Araucária. *Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, v. 21, n. 1, p. 41-48, 2002.

FELESTRINO, E.B. Isolamento e caracterização bioquímica e molecular de microrganismo associados à interação *Langsdorffia hypogaea* – Hospedeira-Rizosfera. 2013. 88f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto.

FERREIRA, S.N.; SAMPAIO, M.J.A.M. **Biodiversidade e conhecimentos tradicionais associados. Implementação da legislação de acesso e repartição de benefícios do Brasil.** 1 ed. Brasília: SBPC, 2013. 356 p.

GUENTZEL, M.N. *Escherichia, Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Citrobacter and Proteus*. 4ed. 1996. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8035/>> Acesso em 18 de novembro de 2016.

HOPE, K.M., KNOWLES, C.J. The anaerobic utilisation of cyanide in the presence of sugars by microbial cultures can involve a abiotic process. *FEMS Microbiology Lett.*, v.80, p.217-220, 1991.

JENSEN, H.L.; ABDEL-GHAFAR, A.S. Cyanuric acid as nitrogen sources for microorganisms. *Archives of Microbiology*, v.67, p.1-5, 1979.

KAO, C.M.; LIU, J.K.; LOU, H.R.; LIN, C.S.; CHEN, S.C. Biotransformation of cyanide to methane and ammonia by *Klebsiella oxytoca*. *Chemosphere*, v.50, n.8, p.1055-1061, 2003.

LIMA, R. A. Tratamento de efluentes líquidos de unidades produtoras de mandioca. 2010. 75f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de processos ambientais) – Programa de Pós Graduação em Tecnologia e Meio Ambiente, Universidade Católica de Pernambuco, Pernambuco.

LINARDI, V. R.; AMANCIO, M. C.; GOMES, N. C. M. Maintenance of *Rhodotorula rubra* isolated from liquid samples of gold mine effluents. *Folia Microbiologica*, v.40, n. 5, p. 487-489, 1995.

MADIGAN, M.T.; MARTINK, J.M.; DUNLAP, P.V.; CLARK, D.P. **Microbiologia de brok.** 12.ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1160p.

MATIENZO, P.A. Re-identificação e caracterização genética da levedura IZ-987 utilizando marcadores moleculares. 2002. 81f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia dos Alimentos), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

MAUTONE, J.N. Diversidade e potencial biotecnológico de leveduras e fungos semelhantes a leveduras isolados de folhas de figueiras do Parque de Itapuã, RS, Brasil. 2008. 124f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) –

Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

MILLER, G. C.; PRITSOS, C. A. *Unresolved problems with the use of cyanide in open pit precious metals mining*. In: CYANIDE: SOCIAL, INDUSTRIAL AND ECONOMIC ASPECTS. New Orleans, 2001.

MOREIRA, F.M.S.; HUISING, E.J.; BIGNELL, D.E. **Manual de biologia dos solos tropicais: amostragem e caracterização da biodiversidade**. 1ed. Lavras:UFLA, 2010, 368 p.

PANTAROTO, S. Isolamento, seleção, identificação e avaliação de microrganismos aeróbios “*in situ*”, com habilidade à biodegradação de linamarina. 2001. 128f. Tese (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu.

PRASAD, B.; SHUKLA, A.K.; SINGH, G. Coke plants liquid effluents: characteristics and abatement. *Indian Journal Environmental Protection*. v.1, n.1, p.259-263, 1991.

QUEISSADA, D.D. Isolamento e seleção de microrganismos para remediação de efluente oleoso da indústria metal-mecânica. 2009. 115f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena.

ROENICK, F.S.F. Extração de ouro contido em minério de baixo teor empregando pilhas de lixiviação com cianeto. 2013. 151f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas) – Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SANTOS, A. L. Inventário dos Rejeitos, Efluentes e Sub-Produtos das Indústrias Siderúrgicas Integradas na Fabricação de Aço Líquido. 2010. 79f. Tese (Mestrado em Engenharia Metalúrgica), Escola Politécnica de Engenharia Metalúrgica e Materiais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

SANTOS, A.B. Reuso de Efluentes no Processo Industrial de Siderurgia. 2014. 91f. Tese (Mestrado em Engenharia Mecânica), Faculdade de Engenharia do Campus de Guaratinguetá, Universidade Estadual Paulista, São Paulo.

SILVA, F.G. *Produção de exopolissacarídeos por bactérias associadas a plantas de Atriplex numulária I*. XIII JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO – JEPEX. Recife, 2013.

SILVA, G.P., FREIRE, N.S., MATOS, D.E., CORREIA, A.N., NETO, P.L. Estudo eletroquímico de um novo banho galvânico de zinco alcalino livre de cianetos. *Revista Química Nova*, v.29, n. 1, p. 15-19, 2006.

SCHNEIDER, I. L. Modo alternativo de tratamento de efluentes com presença de cianeto. 2009. 42f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Química Industrial) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

SIMAS, R. Levantamento da geração de resíduos galvânicos e minimização de efluentes contendo cianeto. 2007. 135f. Tese (Mestrado em Engenharia de Recursos Hídricos e Ambiental), Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

SMITH, A., MUDDER, T. **The chemistry and treatment of cyanidation wastes**. 2ed. Londres: Mining Journal Books Limited, 1991. 333 p.

SOUZA, C.M.A. Biodegradação de cianeto em efluente siderúrgico utilizando lodo da estação de tratamento biológico e lodo liofilizado, em escala laboratorial e planta piloto. 2014. 84f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena.

WIERCINSKI, A. Galvanoplastia: Melhorias no processo de zincagem eletrolítica. 2015. 71f. Tese (Doutorado em Engenharia Industrial) – Departamento de Ciências Exatas e Engenharias, Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, Panambi.

YONG, C. A.; JORDAN, T. S. *Cyanide Remediation: Current and past technologies*. IN: CONFERENCE ON HAZARDOUS WASTE RESEARCH, Montana, 1995. Disponível em: <<https://www.engg.ksu.edu/HSRC/95Proceed/young.pdf>>. Acesso em: 20 de outubro 2016.

ZACARIAS, C. H. Exposição ocupacional a cianetos: uma breve revisão. *Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade*, v. 2, n.3, p. 42-50, 2009.

ANEXO I – Composição dos meios e reagentes

Meios de cultivo utilizados

Meio de cultivo	Composição
Ágar YEPG	2% glicose, 1% peptona, 0,5% extrato levedura, 2% ágar
Caldo YEPG	2% glicose, 1% peptona, 0,5% extrato levedura
Ágar YMA	0,3% extrato levedura, 0,3% extrato malte, 0,5% peptona, 1% glicose, 2% ágar
Caldo YMA	0,3% extrato levedura, 0,3% extrato malte, 0,5% peptona, 1% glicose
Tolerância a NaCl	2% glicose, 1% peptona, 0,5% extrato levedura, 10 ou 16% NaCl
Tolerância a glicose	2% glicose, 1% peptona, 0,5% extrato levedura, 40 ou 50% glicose
Meio LB	Comercial
Caldo Ureia	Comercial
Citrato de Simmons	Comercial

Reagente utilizados

Reagente	Composição
Kovacs	0,5 g de p-dimetil amino benzaldeído, 7,5 mL álcool isoamílico, 2,5 MI HCl
VM	0,01 g vermelho de metila, 30 mL álcool, 20 mL água
A	0,5 alfa-naftol, 10 mL álcool
B	20 g KOH ou NaOH, 50 mL água

ANEXO II- Testes bioquímicos

1. BACTÉRIAS

1.1 Teste da presença de catalase



FIGURA 1: Teste da presença de catalase devido a adição de peróxido de hidrogênio. Da esquerda para a direita está representado as bactérias B1, B2, B3, B4 e B5. O teste é positivo quando há borbulhamento devido a liberação de oxigênio.

1.2 Teste do vermelho de metila



FIGURA 2: Teste do vermelho de metila. Da esquerda para a direita está representado o controle, B1, B5, B2, B3 e B4 respectivamente. O teste positivo assume coloração vermelha indicando que houve oxidação da glicose e geração de produtos ácidos.

1.3 Teste do indol

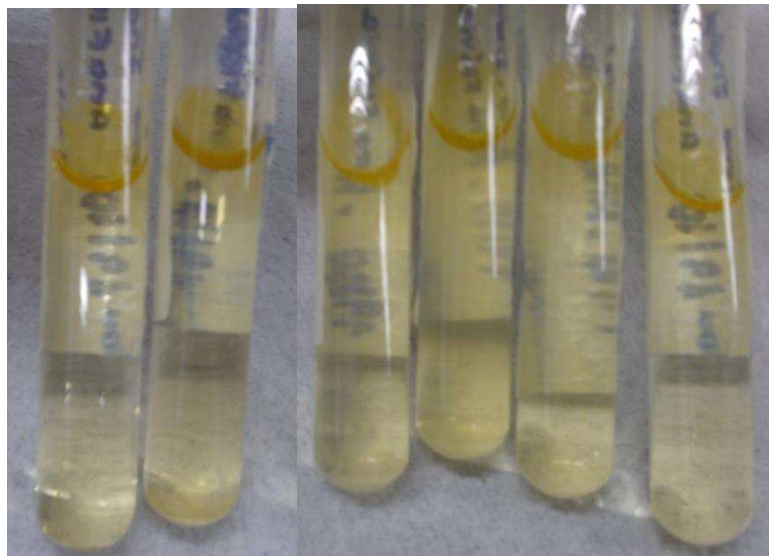


FIGURA 3: Teste do indol representado à esquerda pelo controle, B1, B5, B2, B3 e B4 respectivamente. O resultado positivo indica uma coloração rosa devido a presença da triptofanase que converte triptofano em indol.

1.4 Teste Voges-Proskauer

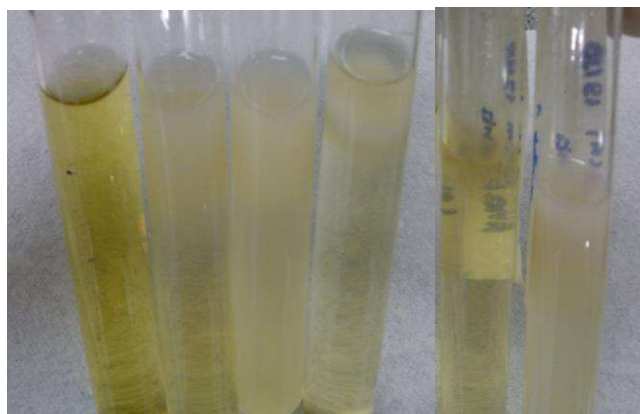


FIGURA 4: Teste Voges-Proskauer. O teste A é representado pelo controle, B1, B5, B2, B3 e B4 respectivamente. O resultado é positivo devido a formação de um anel vermelho devido a fermentação da glicose que gera acetoína e butilenoglicol.



FIGURA 5: Teste Voges-Proskauer. O teste B é representado por B1, B5, B2, B3 e B4 respectivamente. O teste positivo é indicado pela presença de um anel vermelho onde o reagente alfa-naftol catalisa a acetoína.

1.5 Teste de utilização da uréia



FIGURA 6: Teste de utilização da uréia. À esquerda está representado o cultivo B2, B3, B4, B1 e B5 respectivamente. O teste é positivo quando apresenta uma coloração rosa devido a presença quebra da uréia pela uréase que alcaliniza o meio.

1.6 Teste do metabolismo do citrato

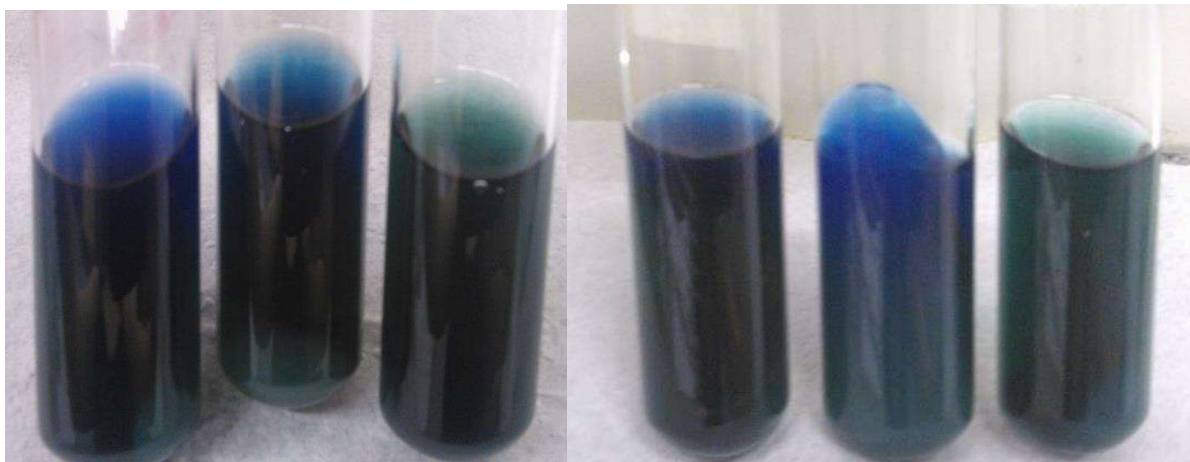


FIGURA 7: Teste do metabolismo do citrato. À esquerda representa as culturas B2, B3, B4, B1, B5 e o controle respectivamente. O resultado é positivo quando o micro-organismo usa o citrato como fonte de carbono, o seu consumo alcaliniza o meio alterando a cor de verde para azul.

2. LEVEDURAS

2.1 Teste de tolerância ao NaCl

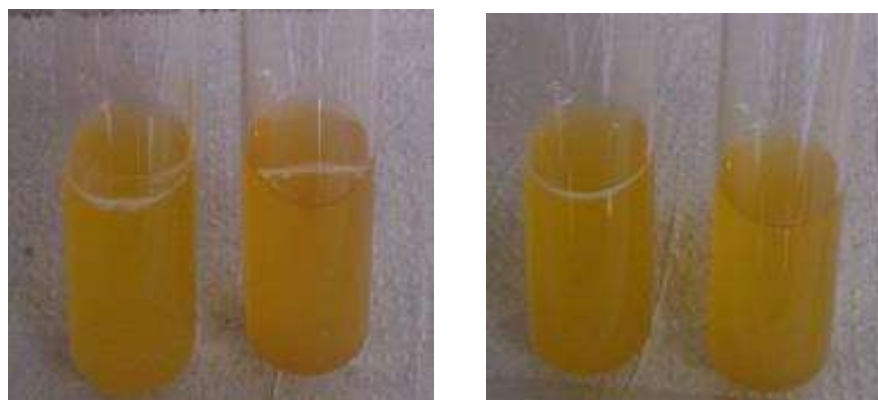


FIGURA 8: Teste de tolerância ao NaCl. À esquerda representa o teste com 10% de NaCl para L5 e L6. À direita representa o teste com 16% de NaCl para L5 e L6.

2.2 Teste de tolerância a glicose



FIGURA 9: Teste de tolerância a glicose. À esquerda representa o teste para o meio com 40% e glicose para L5 e L6. À direita representa o teste em meio com 60% de glicose para L5 e L6.

2.3 Crescimento em diferentes temperaturas



FIGURA 10: Crescimento das leveduras em 30°C. À direita crescimento da levedura L5 e à esquerda L6.



FIGURA 11: Avaliação do crescimento das leveduras em 37°C. À direita crescimento da levedura L5 e à esquerda ausência do crescimento de L6.



FIGURA 12: Avaliação do crescimento das leveduras em 42°C. À direita crescimento da levedura L5 e à esquerda ausência do crescimento de L6.

2.4 Teste de secreção de ácido acético



FIGURA 13: Teste de secreção do ácido acético utilizando água como controle. O resultado positivo é caracterizado por um halo branco.