

AValiação DA DEGRADAÇÃO BACTERIANA DE CIANETO COM USO DA BACTÉRIA *BACILLUS PUMILUS**

Carlos Gonzalo Alvarez Rosario¹
Amzy Tania Vallenias Arévalo²
Denise Crocche Romano Espinosa³
Jorge Alberto Soares Tenório⁴

Resumo

O presente trabalho avaliou a capacidade de degradação bacteriana de cianeto da cepa *Bacillus pumilus* em efluentes contaminados. Para isso foram realizados estudos de degradação bacteriana de cianeto em frascos agitados e incubados em agitador orbital durante 120 horas. Os ensaios aconteceram em três etapas; a primeira etapa consistiu na ativação e crescimento da bactéria em meio Luria Bertani, seguida da adaptação a ambientes alcalinos e por último a etapa de degradação de cianeto. A proporção de inóculo foi de 1:500. Utilizou-se tampão CAPS para manter o pH alcalino. Para avaliação da degradação de cianeto foi preparada uma solução sintética contendo 500mgL⁻¹ de cianeto de potássio pH 10. Foi avaliada a influência da temperatura na degradação bacteriana (27, 32 e 37°C). O controle do crescimento celular foi realizado por medidas de densidade óptica com comprimento de onda $\lambda=600\text{nm}$. A quantificação do cianeto livre foi realizada por polarografia utilizando-se o analisador voltamétrico (computrace control 797 Metrohm). Dos resultados obtidos foi possível determinar que a cepa *B. pumilus* obteve melhor desempenho na degradação de cianeto a temperatura de 27°C conseguindo degradar 100% do cianeto livre presente na solução. O tempo empregado para a degradação total do cianeto foi de 3 dias.

Palavras-chave: Cianeto; Degradação bacteriana; *B. pumilus*.

EVALUATION OF BACTERIAL DEGRADATION OF CYANIDE WITH *BACILLUS PUMILUS*

Abstract

The present study evaluated the ability for cyanide degradation of a *Bacillus pumilus* strain in contaminated effluents. In order to achieve that, cyanide degrading assays were performed in incubated flasks during 120 hours. Assays were performed in three stages. First stage consisted in the activation and growth of bacteria. Second stage, in the adaptation of strain to an alkaline medium. Finally, third stage was the cyanide degradation assay. Medium used for bacterial growth was Luria Bertani and the proportion for inoculum was 1:500. CAPS buffer was used to keep alkaline pH. For cyanide degradation assay, a 500mgL⁻¹ KCN pH 10 solution was prepared. Temperature influence in bacterial degradation was evaluated through assays at 27, 32 and 37°C. Cellular growth was analyzed using optical density at $\lambda=600\text{nm}$. A polarographic method using a voltammetric analysis instrument (Computrace Control 797 Metrohm) was employed to measure free cyanide concentration. Results obtained showed that *B. pumilus* strains degraded free cyanide better at 27°C. 100% of free cyanide was degraded in solution with *B. pumilus* after 3 days of incubation.

Keywords: Cyanide; Bacterial degradation; *B. pumilus*.

¹ Engenheiro Industrial, Doutorando, departamento de Engenharia Química, Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

² Engenheira Ambiental, Mestranda, departamento de Engenharia Química, Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

³ Engenheira Metalurgista, Doutora, Professora Associada, Departamento de Engenharia Química, Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

⁴ Engenheiro Metalurgista, Doutor, Professor Titular, Departamento de Engenharia Química, Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

1 INTRODUÇÃO

O cianeto é um composto químico que pode ser produzido de maneira natural no meio ambiente por diversas plantas, fungos, algas e bactérias [1,2]. O cianeto, também pode ser encontrado no ambiente como resultado de atividades antropogênicas que envolvem processos de galvanoplastia, produção de fibras sintética, extração de ouro e prata [3,4].

Os processos de extração de ouro e a galvanoplastia utilizam aproximadamente 20% do cianeto total produzido, sendo responsáveis pela produção de efluentes e resíduos sólidos contaminados com cianeto [5,6].

As principais espécies químicas de cianeto presentes nos resíduos incluem complexos metálicos que ao se degradar permitem a formação de cianeto livre [3]. O cianeto livre contém as espécies aniônicas (CN^-) e ácido cianídrico ou cianeto de hidrogênio (HCN), sendo este último a forma mais perigosa devido a sua toxicidade e alta taxa de volatilização [7].

Diversos processos físicos e químicos são empregados para a degradação do cianeto a compostos menos tóxicos, de maneira geral existem quatro tecnologias de oxidação química usadas na atualidade para a destruição do cianeto; o peróxido de hidrogênio catalisado pelo cobre, o ácido de caro, o processo de dióxido de enxofre e a cloração alcalina [3].

A legislação federal CONAMA 2005, modificada pela resolução No. 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 [8].

A degradação bacteriana de cianeto tem-se mostrado como um processo viável no tratamento de efluentes cianídricos [9]. 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 [10]. 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 cianato que posteriormente é convertido em amônia e dióxido de carbono [11,12,13].

Alguns estudos em laboratório tem sido realizados para avaliar a degradação bacteriana de cianeto em efluentes contaminados, Os principais microrganismos estudados correspondem aos gêneros *Bacillus sp* e *Pseudomonas* [14,15,16].

Tendo em vista que o uso de microrganismos representa uma vantagem no tratamento de efluentes contaminados, 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 da cepa bacteriana *Bacillus pumilus* em meio alcalino e em diferentes temperaturas.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho avaliou a capacidade de degradação bacteriana de cianeto em efluentes contaminados usando a cepa *B. pumilus*. Para isso, foram realizados ensaios em frascos agitados de degradação bacteriana usando uma solução sintética de cianeto de potássio (KCN) concentração 500mgL^{-1} .

A cepa de *B. pumilus* usada no presente trabalho foi isolada a partir de uma amostra coletada num rejeito de mineração de ouro localizado em San Mateo de Huanchor em Lima, Peru e identificada no Laboratório de Reciclagem de Tratamento de Resíduos e Extração - LAREX da Universidade de São Paulo [16].

O trabalho foi desenvolvido em três etapas principais, sendo a primeira etapa a ativação e o crescimento da cepa bacteriana, seguido da adaptação da cepa à ambientes alcalinos e por último a avaliação da de degradação bacteriana de cianeto.

2.1 Ativação e crescimento das cepas

O processo de ativação e crescimento bacteriano foi realizado em meio de cultura LB (Luria Bertani), cuja composição pode ser verificada na Tabela 1. O pH do meio de cultura foi ajustado para o valor de pH 7,0 com solução de Hidróxido de Sódio 5M (NaOH). Os meios de cultura foram esterilizados em autoclave durante 30 minutos a 121°C e 1atm.

Tabela 1. Composição do meio de cultura LB (Luria Bertani).

Componente	Meio liquido (g/L-1)	Meio Solido (g/L-1)
Peptona	15	15
Extrato de levedura	5	5
NaCl	10	10
Agar		15

A etapa de ativação da cepa iniciou-se com o descongelamento à temperatura ambiente da cepa de *B. pumilus*. Em seguida, realizou-se o cultivo dessa cepa em placas de ágar contendo meio de cultura LB sólido. As placas seguiram para a estufa de incubação onde permaneceram durante 24 horas em temperatura de 37°C. Uma vez observado o crescimento das colônias nas placas de ágar realizou-se o pré-inóculo da cepa. Para isso, uma colônia da cepa ativada em placa de ágar foi transferida para tubo tipo Falcon estéril de 15mL contendo 5mL de meio de cultura LB líquido. As cepas foram incubadas durante a noite em agitador orbital a 37°C e 190rpm.

Um novo cultivo foi feito utilizando 0,2mL de pré-inóculo em 100mL de caldo 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. A ativação das cepas ocorreu conforme mostrado na Figura 1.

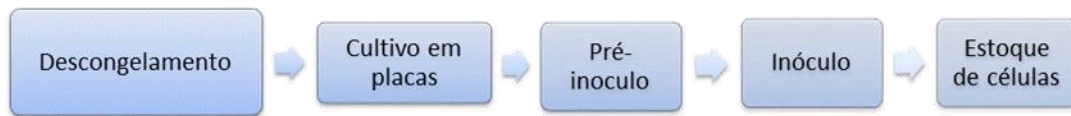


Figura 1. Etapas realizadas para ativação da cepa *B. pumilus*.

Foram realizadas curvas de crescimento para avaliar o tempo que a cepa tarda em atingir a fase de crescimento exponencial. Para isso, foi medido o crescimento celular em cada frasco em diferentes intervalos de tempo.

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 meio de cultivo L.B 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 o volume da alíquota são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Intervalos de tempo e volume das amostras para o calculo da determinação celular

Alíquota	Hora	OD600	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

2.2 Adaptação ao pH alcalino.

Para diminuir a volatilização durante o processo de remediação, é importante manter o pH alcalino, para desta forma evitar a formação de HCN. Motivo pelo qual foi necessário adaptar a cepa bacteriana às condições do efluente.

Durante esta fase de estudo, o principal objetivo foi adaptar a cepa bacteriana a meios alcalinos (pH = 10). A adaptação foi feita a partir da cepa ativada na etapa anterior, a qual se encontrava 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 durante 30min a 121°C e 1atm. Os meios de cultivo empregados nesta fase de adaptação foram LB, LBTRIS e LBCAPS.

A partir do inoculo obtido na fase de ativação, cultivou-se 0,2mL de inóculo em 100mL de meio de cultura em pH igual a 7,0. 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 ótica (OD_{600}) fosse atingido.

Ao atingir o valor de OD_{600} 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 7,0, mas agora com pH do meio de cultivo igual a 8,0. O processo de adaptação para os demais valores de pH foi realizado como descrito anteriormente até atingir pH =10. Com a cepa adaptada ao pH=10 foram produzidos estoques de células congeladas em microtubos de 2mL e armazenados a -80°C para a realização dos ensaios de degradação bacteriana de cianeto.

2.3 Ensaios de degradação e cianeto

Para os ensaios de degradação bacteriana de cianeto foi utilizada a cepa *Bacillus pumilus* adaptada ao pH 10,0. A fim de avaliar a eficiência na degradação de cianeto, 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.

A cepa foi cultivada 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 $OD=0,8$. O cultivo bacteriano com $OD=0,8$ 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 (shaker) durante 120 horas. A cada 24 horas uma alíquota de 5mL foi retirada para medição de OD_{600} , pH, concentração de cianeto livre e unidade formadora de colônia. As temperaturas de crescimento avaliadas foram 27, 32 e 37°C.

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

A solução sintética para o ensaio de degradação (CAPS50mM-pH10 – CN) de cianeto foi preparada a partir do sal cianeto de potássio (KCN). A concentração de cianeto livre na solução preparada foi de 500mgL^{-1} . O preparo da solução de ensaio consistiu na adição em água destilada previamente auto clavada de $11,066\text{gL}^{-1}$ de tampão CAPS (C9H19NO3S), 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 μm .

Para o lavado das células foi preparada uma solução tampão de (CAPS50mM-pH10) em pH 10.

A concentração de cianeto livre em solução foi determinada por polarografia utilizando-se o analisador voltamétrico Computrace Control 797 V.A. Metrohm.

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

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

Os ensaios de degradação foram realizados em triplicata. Realizou-se um controle negativo (abiótico). Medidas de pH, OD₆₀₀ e cianeto livre foram realizadas. O cálculo da degradação de cianeto foi realizada conforma a seguinte equação:

$$\%CNd = \frac{[CN]i - [CN]f}{[CN]i} * 100\%$$

Onde CNd é a porcentagem de cianeto degradado.

CNi equivale à concentração inicial de cianeto (500mgL⁻¹)

CNf é a concentração final após um período de tempo t.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Ativação e crescimento das cepas

Os resultados obtidos das medidas de densidade óptica no comprimento de onda $\lambda=600\text{nm}$ (OD₆₀₀) durante 30 horas em pH=7,0 temperatura 37°C e 190rpm de agitação para a cepa *B. pumilus* são apresentados na Figura 2. O meio de cultura empregado foi o LB líquido e a proporção de inóculo foi de 1:500.

É possível observar que na cepa *B. pumilus* a fase de aceleração inicia após meia hora de cultivo, o crescimento é rápido e a fase exponencial acontece entre a hora 0,5 e 4,5 de cultivo.

Esta informação de crescimento bacteriano é de muita utilidade para definir os intervalos de tempo durante os quais a cepa *B. pumilus* apresentam maior crescimento, pois será neste intervalo de tempo onde as bactérias apresentam maior multiplicação celular e conseqüentemente maior quantidade de microrganismos que possibilitam a degradação de cianeto.

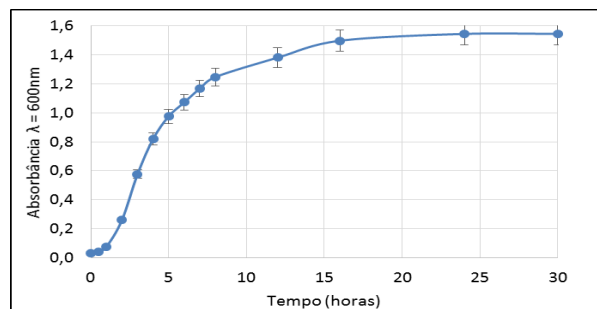


Figura 2. Densidade óptica da cepa *B. pumilus*

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 produzida pela cepa *B. pumilus* em função do tempo.

A medida da massa seca permitiu estabelecer a concentração celular para a cepa *B. pumilus*, a concentração celular é expressa em gramas de biomassa contidos em um litro de cultivo bacteriano (gL⁻¹).

Na Figura 3, é possível observar a curva de crescimento da cepa *B. pumilus* em função da quantidade de biomassa produzida. É possível observar que a maior produção de biomassa acontece no intervalo entre a primeira meia hora de cultivo e a quinta hora de cultivo.

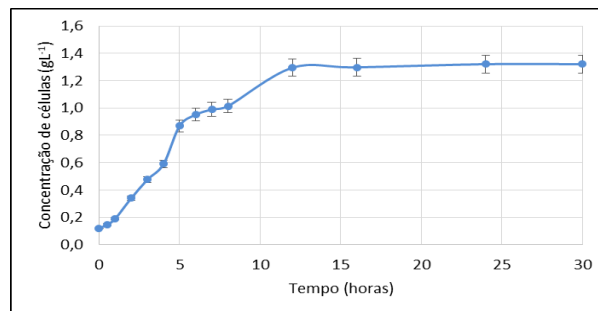


Figura 3. Curva de crescimento da massa seca para *Bacillus pumilus*.

As curvas de crescimento realizadas de maneira separada com a medida da densidade óptica e da massa seca mostraram que a fase de crescimento exponencial (fase de interesse) acontece no intervalo de tempo entre 0,5 e 5 horas de cultivo.

O cultivo bacteriano a ser inoculado nos ensaios de degradação bacteriana de cianeto serão obtidos durante as cinco primeiras horas de crescimento celular, aumentando desta maneira a atividade bacteriana no meio de cultivo.

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

A cinética de crescimento foi estudada por médio da relação entre a absorvância no comprimento de onda de 600nm e da quantidade de massa seca produzida. Na Figura 4 apresentam-se as medidas de absorvância correlacionadas com a massa seca para a cepa *B. pumilus*. O coeficiente de correlação (R^2) da regressão linear foi de 0,98 indicando um bom ajuste com os dados experimentais.

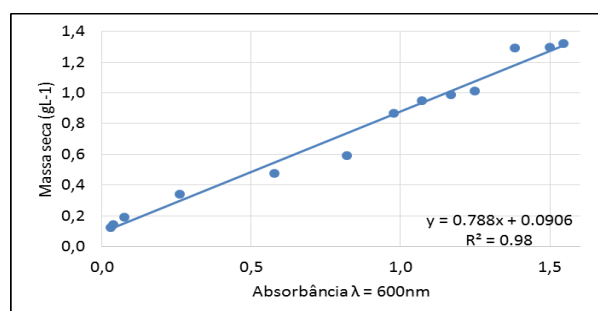


Figura 4. Correlação da densidade óptica (OD_{600}) com a massa seca.

3.2 Ensaios de degradação bacteriana de cianeto

Os estudos de degradação bacteriana visaram avaliar a influência da temperatura na degradação de cianeto. Os resultados obtidos nos ensaios mostraram que a degradação de cianeto apresentou melhores taxas de degradação para temperaturas mais baixas (Figura 5)

Após cinco dias de ensaios a temperatura de 37°C (Figura 5^a), a cepa *B. Pumilus* conseguiu degradar 84,% do cianeto livre presente na solução, porém o controle apresentou 64% de degradação de cianeto. A diferença de degradação entre o controle e a cepa *B. pumilus* após cinco dias de ensaio foi muito baixa (20%), quantidade degradada efetivamente por ação bacteriana. É importante observar que nos primeiros três dias de cultivo a taxa de degradação de cianeto foi maior para a cepa bacteriana (65%) do que no controle (33%) A taxa de degradação bacteriana efetiva foi de 32%.

A alta taxa de degradação de cianeto nestas condições se deve à influência da temperatura na volatilização do cianeto (37°C), nestas condições a taxa de degradação de cianeto livre por formação de ácido cianídrico é maior. A concentração final de cianeto livre na solução após seis dias de ensaio foi de 56,6 mgL⁻¹ já para o controle foi de 124mgL⁻¹.

Na temperatura de 32°C (Figura 5b), a degradação de cianeto no controle apresentou mais estabilidade que na faixa de temperatura anterior, sendo que a taxa de volatilização foi menor, após cinco dias de ensaio a cepa *B. pumilus* conseguiu degradar 82% do cianeto livre presente na solução enquanto que o controle apresentou degradação de 42%, a taxa de degradação efetiva de cianeto foi de 40%. As concentrações finais de cianeto livre foram de 87 mgL⁻¹ no cultivo com *B. pumilus* e 287,4mgL⁻¹ no controle.

Na temperatura de 27°C (Figura 5c) o cianeto livre apresentou mais estabilidade na volatilização, ao mesmo tempo que a cepa de *B. Pumilus* apresentou melhores taxas de degradação de cianeto livre, após quatro dias de ensaio a cepa *B. pumilus* conseguiu remover 100% do cianeto livre presente na solução enquanto que o controle apresentou 27% de degradação de cianeto no mesmo intervalo de tempo. A concentração de cianeto livre na solução com a cepa bacteriana no terceiro dia de ensaio atingiu o valor de 6,3 mgL⁻¹ equivalente a 94% de remoção de cianeto.

A maior taxa de degradação de cianeto pela cepa *B. pumilus* aconteceu nas primeiras doze horas com remoção efetiva de cianeto por degradação bacteriana de 82%.

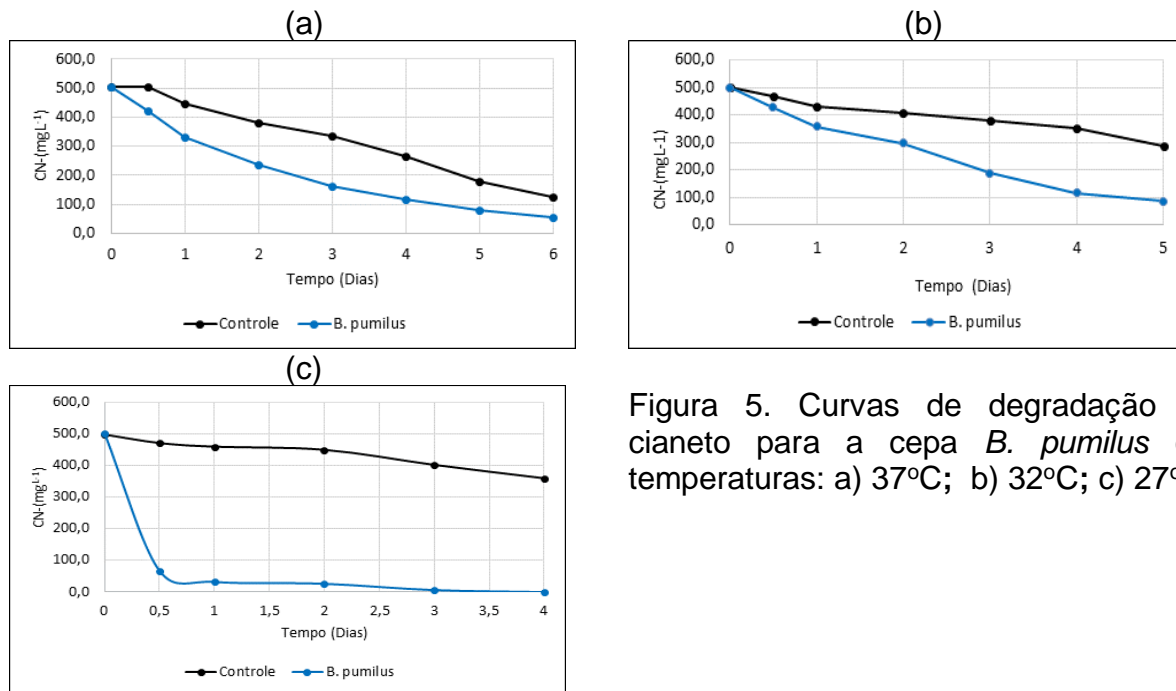


Figura 5. Curvas de degradação de cianeto para a cepa *B. pumilus* em temperaturas: a) 37°C; b) 32°C; c) 27°C.

4 CONCLUSÃO

Do crescimento bacteriano da cepa *B. pumilus* foi possível determinar que o período de crescimento exponencial se encontra no intervalo de tempo entre 0,5 e 5 horas, em pH 7,0 a 37°C e 190rpm.

O ensaio de degradação bacteriana de cianeto na presença da cepa *B. Pumilis* permitiu concluir que a cepa conseguiu remover 100% do cianeto livre presente na solução. O tempo empregado para a remoção do cianeto livre foi de quatro dias, porém foi observado que durante as primeiras doze horas houve remoção de 82% do cianeto livre.

As melhores condições de degradação do cianeto para a cepa *B. pumilus* na solução de cianeto de potássio concentração 500mgL⁻¹ foram obtidas a 27°C e 190rpm de agitação. O pH da solução e a temperatura do ensaio são duas variáveis a serem controladas rigorosamente na degradação bacteriana de cianeto, valores iguais ou maiores de pH=10 e temperaturas próximas a 25°C diminuem a formação do HCN e, conseqüentemente, a taxa de volatilização de cianeto.

O presente trabalho confirmou a capacidade de degradação bacteriana de cianeto em escala laboratorial da bactéria *B. pumilus* atingindo valores de cianeto acordes aos limites impostos pelos órgãos Brasileiros para o lançamento de efluentes em cursos de água.

O presente trabalho mostrou que a degradação bacteriana de cianeto é um método eficiente em termos de remoção de cianeto e pode ser desenvolvido no futuro como um processo industrial alternativo no tratamento de efluentes contaminados.

Agradecimentos

Os autores agradecem pelo suporte financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) processo: 141246/2015-4.

REFERÊNCIAS

- 1 J. E. Poulton, "Cyanogenesis in plants.," *Plant Physiol.*, vol. 94, no. 2, pp. 401–405, Oct. 1990.
- 2 V. M. Luque-Almagro, M.-J. Huertas, M. Martinez-Luque, C. Moreno-Vivian, M. D. Roldan, L. J. Garcia-Gil, F. Castillo, and R. Blasco, "Bacterial Degradation of Cyanide and Its Metal Complexes under Alkaline Conditions," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 71, no. 2, pp. 940–947, Feb. 2005
- 3 T. Mudder and M. Botz, "Cyanide and society: a critical review," *ejmp ep (European J. Miner. Process. Environ. Prot.*, vol. 4, no. 1, pp. 62–74, 2004
- 4 M. J. Huertas, L. P. Sáez, M. D. Roldán, V. M. Luque-Almagro, M. Martínez-Luque, R. Blasco, F. Castillo, C. Moreno-Vivián, and I. García-García, "Alkaline cyanide degradation by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 in a batch reactor. Influence of pH," *J. Hazard. Mater.*, vol. 179, no. 1–3, pp. 72–78, 2010.
- 5 Mineral Policy Center, "Cyanide Leach Mining Packet," 2000.
- 6 Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), "Cyanide ToxFAQ," Atlanta, GA: U.S., 2006
- 7 F. Gurbuz, H. Ciftci, and A. Akcil, "Biodegradation of cyanide containing effluents by *Scenedesmus obliquus*," *J. Hazard. Mater.*, vol. 162, no. 1, pp. 74–79, 2009.
- 8 CONAMA, "Resolução CONAMA 430/2011," *Diário Of. da União*, p. 9, 2011.
- 9 G. M. Wong-chong and J. M. Vanbriesen, "Microbiological Technologies for Treatment of Cyanide," in *Cyanide in Water and Soil*, T. & Francis, Ed. Florida, 2006, pp. 459–477.
- 10 R. S. Ghosh, D. A. Dzombak, and G. M. Wong-Chong, "Physical and Chemical Forms of Cyanide," *CYANIDE WATER SOIL Chem. Risk, Manag.*, pp. 17–23, 2006.
- 11 N. Gupta, C. Balomajumder, and V. K. Agarwal, "Enzymatic mechanism and biochemistry for cyanide degradation: A review," *J. Hazard. Mater.*, vol. 176, no. 1–3, pp. 1–13, 2010.
- 12 A. Watanabe, K. Yano, K. Ikebukuro, and I. Karube, "Cyanide hydrolysis in a cyanide-degrading bacterium, *Pseudomonas stutzeri* AK61, by cyanidase," *Microbiology*, vol. 144, no. 6, pp. 1677–1682, 1998.
- 13 S. Ebbs, "Biological degradation of cyanide compounds," *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 15, no. 3, pp. 231–236, 2004
- 14 L. C. Razanamahandry, H. A. Andrianisa, H. Karoui, K. M. Kouakou, and H. Yacouba, "Biodegradation of free cyanide by bacterial species isolated from cyanide-contaminated artisanal gold mining catchment area in Burkina Faso," *Chemosphere*, vol. 157, pp. 71–78, 2016.
- 15 S. Kandasamy, B. Dananjeyan, K. Krishnamurthy, and G. Benckiser, "Aerobic cyanide degradation by bacterial isolates from cassava factory wastewater.," *Braz. J. Microbiol.*, vol. 46, no. 3, pp. 659–66, 2015.
- 16 M. Luque, *Metabolismo del cianuro y del cianato en Pseudomonas pseudoalcaligenes CECT5344 . Aplicaciones biotecnológicas.* 2005.
- 17 C. Monge, C.G.A. Rosario, A. Vallenias, J.C. Coleti, S. Justo, J.A.S. Tenório. Isolation and characterization of cyanide degrading bacteria from artisanal gold mine tailings. In *The 32nd International Conference on Solid Waste Technology and Management.* Philadelphia, 2017 pp. 641–648.