

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**ISOLAMENTO, SELEÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DE
MICRORGANISMOS AERÓBIOS "*IN SITU*", COM HABILIDADE À
BIODEGRADAÇÃO DE LINAMARINA**

SUZAN PANTAROTO

Orientadora: Profa. Dra. Marney Pascoli Cereda

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da UNESP - Câmpus de Botucatu,
para obtenção do título de Mestre em Agronomia-
Área de Concentração em Energia na Agricultura.

BOTUCATU
JULHO -2001

Projeção

(Por Garibaldi José de Carvalho Filho)

*A quem as pedras
haverão de contar,
as angústias deste momento?*

*A quem a voz da Terra
se erguerá à vista,
para se segregar as coisas deste
presente?*

*Seremos histórias antigas,
no momento de outras civilizações,
no instante de outras gerações
que escarvarão o ventre da Terra
e escancararão sua boca,
para fazê-la falar de nós.*

*Aqui e ali,
ouvirão dizer o que fomos
e o que fizemos...
mas se nenhum de nós contar,
quem apagará as dúvidas
que pairarem
sobre as verdades
desses nossos tempos?*

*Dedico este trabalho à Deus, pela oportunidade oferecida,
pela inspiração e presença; aos meus queridos pais,
Ecydir e Marluce, por todo amor, carinho, compreensão
e apoio em todos os momentos de minha vida;
ao meu querido irmão e amigo, Maurício.*

AGRADECIMENTOS

- À Profa. Dra. Marney Pascoli Cereda, pela orientação do trabalho, pelo acolhimento, amizade, conselhos, atenção e muita paciência! Agradeço pelo exemplo de vida que se tornou para mim.
- Ao Dr. Gilson P. Manfio, pelo estímulo, atenção, amizade e força.
- Ao Dr. José Renato Cagnon, idealizador do trabalho, pela amizade e sem o qual nada teria sido realizado.
- Ao Prof. Dr. Sérgio Hugo Benez, pelo apoio, amizade e exemplo profissional.
- À Farinheira Plaza, Santa Maria da Serra/SP, e à Fecularia Halotech Fadel pela disponibilização das amostras coletadas no estudo.
- Ao Prof. Dr. Cláudio Cabello, sempre bem humorado, pelas dicas, atenção, amizade e apoio.
- À Yara, pela amizade, carinho, paciência e imensa ajuda tanto profissional como particularmente.
- À Dra. Magali Leonel, amiga e excelente profissional, pelo estímulo e companheirismo em todos os momentos.
- À Alessandra (Lê), por tudo e principalmente pela ótima amizade adquirida.
- Ao amigo Luís Henrique, pela amizade, força e toda ajuda nos experimentos práticos.
- Ao amigos, Marcelo (Marcelão), Tarcísio, Fábio (Fabinho), Maria e Aura, pela inestimável amizade e carinho.
- À Dra. Valéria Maia (Val) e Aline, pelo apoio, amizade, ajuda e atenção.

- À Dra. Mary Ann Foglio e todo o pessoal do Departamento de Fitoquímica do CPQBA, pela extração da linamarina, amizade e otimismo.
- Ao Prof. Dr. Adalberto José Crocci, do Departamento de Bioestatística, pela atenção e orientação quanto ao delineamento estatístico.
- Ao pessoal da Biblioteca da FCA, sempre prontos à ajudar.
- Ao pessoal do Departamento de Solos, pela amizade e carinho.
- Ao pessoal da Seção de Pós-Graduação, pela ajuda, eficiência e atenção.
- Ao Rodolfo, pelo amor, carinho, compreensão, ajuda, paciência e atenção, obrigada.
- Às amigas, Lizielle (Lizi), Suzy (Susequil), Celina, Nívea, Madalena e Érica, por todos os momentos legais que passamos juntas.
- Às amigas e companheiras de casa, Ana Paula (Shana) e Liziane (Liziana), pela paciência, carinho, ótima convivência, alegria e amizade.
- À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pela bolsa concedida ao desenvolvimento do trabalho.
- À todos aqueles, que de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

1. RESUMO.....	1
2. SUMMARY.....	3
3. INTRODUÇÃO.....	5
4. OBJETIVO.....	8
5. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	9
5.1 Linamarina, o glicosídeo tóxico da mandioca.....	9
5.2 Biodegradação de cianoglicosídeos.....	16
5.3 Metabolismo microbiano de cianeto.....	23
5.4 Biorremediação como ferramenta de destoxificação.....	26
6. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
6.1 Extração e purificação de linamarina.....	30
6.2 Obtenção de manipueira fresca e sua caracterização.....	31
6.3 Amostras para isolamento de microrganismos.....	32
6.4 Enriquecimento das amostras.....	38
6.5 Isolamento seletivo.....	38
6.6 Preservação das linhagens.....	39
6.7 Ensaio em meio mínimo.....	39
6.7.1 Avaliação do metabolismo microbiano de linamarina <i>in vitro</i>	40

6.7.2 Identificação taxonômica de bactérias e leveduras selecionadas quanto à atividade metabólica em meio mínimo.....	44
6.8 Ensaio em manipueira como meio de cultura.....	46
6.8.1 Efeito da concentração de inóculo, com concentração de manipueira fixa (50%).....	46
6.8.2 Efeito da concentração de manipueira, com concentração de inóculo fixa (10^8).....	47
6.8.3 Análises de acompanhamento.....	47
6.9 Delineamento estatístico experimental.....	49
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
7.1 Caracterização da manipueira (fresca).....	50
7.2 Isolamento de microrganismos.....	52
7.3 Ensaio em meio mínimo.....	53
7.3.1 Avaliação, seleção e identificação das linhagens.....	53
7.4 Ensaio em manipueira como meio de cultura.....	72
7.4.1 Efeito da concentração de <i>Serratia marcescens</i> B2, em concentração de manipueira fixa (50%).....	72
7.4.2 Efeito da concentração da manipueira, em concentração de inóculo fixa (10^8).....	83
8. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	97
9. CONCLUSÕES.....	99
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	101
ANEXOS.....	119

LISTA DE QUADROS

Quadro	Página
5.1: Composição química média dos resíduos líquidos originados na industrialização de raízes de mandioca para a produção de farinha.....	15
5.2: Exemplos da aplicação de microrganismos na destoxificação de compostos tóxicos.....	27
6.1: Descrição das coletas realizadas quanto aos objetivos das mesmas e locais utilizados como fontes de amostras.....	33
6.2: Pontos de coleta - Farinheira Plaza, Santa Maria da Serra, SP.....	34
6.3: Pontos de coleta - Fecularia Halotech Fadel, Palmital, SP.....	36
6.4: Análises de acompanhamento das amostras de manipueira, em diferentes concentrações.....	48
7.1 Caracterização físico-química da manipueira fresca, coletada na Farinheira Plaza, em Santa Maria da Serra, SP.....	51
7.2: Microrganismos sobreviventes e suas respectivas taxas de degradação de linamarina " <i>in vitro</i> ", em percentual (%) do total adicionado.....	54
7.3: Linhagens selecionadas e suas respectivas características morfológicas, locais de origem e identificação.....	55
7.4: Contagem total microbiana apresentada pelas amostras analisadas, ao início e término do período de incubação.....	73

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
5.1: Prensa da massa de raízes de mandioca para a produção de farinha da Farinheira Plaza, Santa Maria da Serra, SP.....	10
5.2: Cianogênese em mandioca.....	11
5.3: Vegetação em torno da lagoa de decantação de manipueira, Farinheira Plaza, Santa Maria da Serra –SP.....	15
6.1: Localização das fontes de amostragens: Farinheira Plaza, em Santa Maria da Serra, e Fecularia Halotech Fadel, em Palmital, no Estado de São Paulo.....	32
6.2: Lagoa de descarte de manipueira da Farinheira Plaza, utilizada para as coletas de amostras de solos e manipueira fermentada.....	35
6.3: Lagoa de descarte de água residual da Fecularia Halotech Fadel, utilizada como fonte de coleta de amostras de solos e resíduo fermentado.....	37
6.4: Procedimento empregado para análise de linamarina por HPLC.....	43
6.5: Esquema ilustrativo das etapas realizadas desde a coleta das amostras, às análises quanto ao desempenho microbiano em linamarina exógena.....	44
7.1: Variação da biomassa microbiana e metabolismo de linamarina apresentados pela bactéria B1.....	59
7.2: Variação da biomassa microbiana e metabolismo de linamarina apresentados pela bactéria B2.....	60

7.3: Variação da biomassa microbiana e metabolismo de linamarina apresentados pela bactéria B4.....	61
7.4: Variação da biomassa microbiana e metabolismo de linamarina apresentados pela bactéria B3.....	63
7.5: Variação da biomassa microbiana e metabolismo de linamarina apresentados pela bactéria B6.....	65
7.6: Variação da biomassa microbiana e metabolismo de linamarina apresentados pela bactéria B5.....	67
7.7: Variação da biomassa microbiana e metabolismo de linamarina apresentados pela bactéria B7.....	68
7.8: Variação da biomassa microbiana e metabolismo de linamarina apresentados pela <i>Rhodotorulla glutinis</i> L1.....	70
7.9: Curvas representativas do aumento da biomassa microbiana, das amostras avaliadas, apresentadas pela variação dos valores de absorvância (turbidez).....	75
7.10: Valores de pH apresentados pelas amostras de manipueira, durante 6 dias de incubação à 28°C.....	76
7.11: Teores de HCN total ao início e término do período de incubação (6 dias).....	77
7.12: Taxas de redução dos teores de HCN total das amostras de manipueira à 50% com e sem inóculo.....	78
7.13: Teores de HCN livre ao início e término do período de incubação (6 dias).....	79
7.14: Taxas de redução dos teores de HCN livre das amostras de manipueira à 50%, com e sem inóculo.....	79
7.15: Teores de carbono orgânico total nas amostras de manipueira ao início (0 dia) e	

término (6 dias) do período avaliado.....	81
7.16: Taxas de redução dos teores de carbono orgânico total das amostras de manipueira, ao término do período de incubação (6 dias).....	82
7.17: Variação da biomassa microbiana e pH apresentados pela amostra de manipueira CONTROLE, isenta de inóculo.....	84
7.18: Variação da biomassa microbiana e pH apresentados pela amostra de manipueira (100%).....	85
7.19: Variação da biomassa microbiana e pH apresentados pela amostra de manipueira diluída (75%).....	86
7.20: Variação da biomassa microbiana e pH apresentados pela amostra de manipueira diluída (50%).....	87
7.21: Variação da biomassa microbiana e pH apresentados pela amostra de manipueira diluída (25%).....	88
7.22: Teores de HCN total, iniciais e finais, presentes nas concentrações de manipueira avaliadas.....	91
7.23: Redução dos teores de HCN total presentes nas amostras de manipueira avaliadas.....	92
7.24: Teores de HCN livre (mg/l) iniciais e finais, presentes nas amostras de manipueira diluídas.....	93
7.25: Redução dos teores de HCN livre presentes nas amostras de manipueira diluídas.....	93
7.26: Teores de carbono orgânico total (mg/l) presentes nas amostras ao início e término do período de incubação (6 dias).....	95
7.27: Taxas de redução (%) dos teores de carbono orgânico total, apresentados pelas amostras de manipueira.....	96

1.0 RESUMO

Durante o processamento de raízes de mandioca para a produção de farinha e fécula, são geradas grandes quantidades de resíduos, dentre os quais destacam-se a *manipueira* como água proveniente da prensa da massa de mandioca ralada para a produção de farinha ou água residual de fecularia, neste caso a manipueira diluída com água de extração. A linamarina é um β -glicosídeo de acetona cianidrina e etil-metil-cetona cianidrina, presente em todas as células da planta de mandioca. A clivagem deste glicosídeo, em decorrência da lise das paredes celulares da planta, dá início à cianogênese, ou seja, a produção de ácido cianídrico. A linamarina é solúvel em água, sendo carregada juntamente com os efluentes líquidos, gerando problemas tanto ambientais quanto econômicos, no que se refere à disposição final e aproveitamento dos mesmos como sub-produtos do processamento de mandioca. Na literatura há relatos sobre a habilidade de microrganismos a metabolizar a linamarina, como única fonte de carbono e energia. O presente estudo teve por objetivo o isolamento, seleção e identificação de microrganismos aeróbios, provenientes de amostras de

manipueira e solo aos arredores de lagoas destinadas à decantação destes efluentes, avaliando-os quanto ao metabolismo de linamarina "*in vitro*", visando o emprego das linhagens selecionadas em estudos futuros de biorremediação dos resíduos. Das amostras foram isoladas 118 culturas, das quais 66 caracterizaram-se como morfotipos bacterianos e 52 como leveduras. Dentre estes microrganismos, 31 morfotipos, sendo 26 bactérias e 5 por leveduras, escolhidos aleatoriamente, foram avaliados em meio mínimo contendo linamarina como única fonte de carbono e energia. Sobreviveram 8 linhagens, constituídas por 7 bactérias e 1 levedura. As bactérias foram identificadas por análises filogenéticas, em 3 linhagens de *Serratia marcescens*, 2 do gênero *Bacillus*, 1 espécie de *Acinetobacter johnsonii*, e 1 do grupo Proteobactéria, ainda não identificada na literatura. A levedura foi caracterizada através de taxonomia convencional, sendo identificada como *Rhodotorulla glutinis*. A bactéria *Serratia marcescens*, por constituir espécie predominante dentre as selecionadas, foi avaliada em ensaios sobre manipueira, variando a concentração do inóculo e fixando a concentração da manipueira em 50% (v/v) e também para variação da concentração de manipueira fixando o inóculo em 15×10^8 UFC/ml. Os ensaios foram acompanhados por análises quanto ao aumento da biomassa celular, à redução do teor de carbono orgânico total, à variações de pH do meio e à redução dos teores de HCN total e livre. Como conclusões do trabalho obteve-se que as 8 linhagens selecionadas apresentaram-se como hábeis ao metabolismo de linamarina "*in vitro*", onde a *Serratia marcescens*, demonstrou-se adaptada à manipueira diluída à 50% e 75%, mantendo-se viável mesmo em presença da microbiota indígena.

Palavras-chave: Manipueira; Linamarina; Destoxificação

0 SUMMARY

During the processing of cassava roots to produce flour and starch, residues are generated, where stand out the liquid effluents. The linamarin is a β -glucoside of acetone cyanhydrin and ethyl-methyl-cetone cyanhydrin, it is present in all cassava plant. The cyanoglucoside broke begins the cyanogenesis, thus producing cyanidric acid. The linamarin is soluble in water, and it is carried with the liquid effluents, and it generates ambiental and economics problems. The literature describe some microorganisms ability to metabolite linamarin. The present work aims the isolament, the selection and the identification of aerobies microorganisms from cassava liquid effluents and from adjacent soils samples of stabilization lagoons. Microbial cultures isolated have been available for linamarin "*in vitro*" metabolism. 118 strains are isolated, that 66 was characterized as bacteria and 52 as yeasts. 31 morfotypes were selected, choosed by chance, in minimum medium (MM), with linamarin as

only carbon and energy source. Eight strains were selected (seven bacterias and one yeast). The bacterias were identified by phylogenetic analyses, as three strains of *Serratia marcescens*, two strains of *Bacillus*, one strain of *Acinetobacter johnnsonii*, and one microbial culture of *Proteobacteria* group. The last one was not yet identified by literature. The yeast have been characterized by conventional taxonomy as *Rhodotorulla glutinis*. The *Serratia marcescens*, was the predominate selectionated specie, it was evaluated in essay about cassava liquid effluent, variating the inoculum concentrate and fixing the cassava effluent concentration at 50% diluated, and the substrate concentration fixing the inoculum at 15×10^8 cells per ml. This tests were accomplished by cellular biomass increase, total organic carbon content, pH and free and total content HCN. The work's conclusions were that selected 8 strains showed as capable to linamarin "*in vitro*" metabolism. *Serratia marcescens*, when, diluated cassava liquid effluent at 50% and 75%, predominated about indigenus microorganisms and demonstrated ability of reduced cyanogenic content, acidity and organic content of medium, showing potentiality to future application in the cassava liquid effluent bioremediation. It's important to relate that *Serratia marcescens* different cellular densities, not influencied about its cassava liquid effluent activity.

Keywords: Cassava Liquid Effluent; Linamarin; Detoxification

3. INTRODUÇÃO

A mandioca, *Manihot esculenta* Crantz, é uma das maiores fontes de energia na dieta humana e de animais domésticos na maioria dos países tropicais. É consumida por cerca de 400 milhões de pessoas em muitos países tropicais da África, Ásia e América do Sul (Akoroda, 1995). Também constitui matéria-prima para o processamento de amido, principalmente na Ásia, Índia, Tailândia, Indonésia, China, e também no Brasil.

Durante o processamento de raízes de mandioca para a produção de farinha e fécula, são geradas grandes quantidades de resíduos, dentre os quais destacam-se a manipueira, água residual da prensa de mandioca para a produção de farinha, ou água residual de fecularia, sendo neste caso, diluída com água de extração. A cada tonelada de raízes processadas são gerados, aproximadamente, 300 litros de manipueira e 600 litros de água residual de fecularia (Fioretto, 1994). Mesmo com possíveis soluções ao aproveitamento destes efluentes, tais como tratamentos aeróbio ou anaeróbio, atualmente a solução mais frequente é o depósito em lagoas de decantação, a qual constitui alternativa barata, e que dispensa a utilização de mão-de-obra especializada.

Nas lagoas de estabilização, os efluentes permanecem depositados, sob a ação de agentes naturais, tais como fotodecomposição, precipitação e atividade microbiana local, sem haver qualquer tratamento adicional no sentido da otimização do processo para o aproveitamento destes efluentes como sub-produtos. Estes resíduos tendem à percolação alcançando lençóis freáticos, contaminando aquíferos e ainda produzindo odor desagradável e problemas com insetos vetores. Agravando a situação, estas indústrias costumam concentrar-se em determinadas regiões, geralmente próximas às fontes de matéria-prima, aumentando o volume de efluente disposto ao ambiente.

Linamarina é um β -glicosídeo de acetona cianidrina e etil-metil-cetona cianidrina, presente em todas as células da planta de mandioca. A clivagem deste glicosídeo dá início à um processo bioquímico, a cianogênese, com produção de glicose e hidroxinitrilas, as quais espontaneamente, ou sob ação enzimática, se dissociam em HCN (ácido cianídrico) e cetonas. A linamarina é solúvel em água, sendo carregada juntamente com os efluentes líquidos.

Na literatura, valores de 15 à 400 ppm (mg CN/Kg de peso fresco) de ácido cianídrico em raízes de mandioca, são relatados, no entanto, valores mais frequentes se encontram no intervalo entre 30 e 150 ppm. Segundo Resolução nº 20, de 18 de junho de 1986, do Ministério do Desenvolvimento Urbano e Meio Ambiente, os efluentes de qualquer fonte deverão possuir teor limite de cianeto de 0,2mg/L (Barana, 2000).

Sendo assim, a manipueira e a água residual de fecularia, geram problemas quanto à sua disposição e aproveitamento, não somente no que se refere ao volume gerado pelas indústrias, mas também quanto à linamarina contida nos efluentes, a qual proverá

ácido cianídrico, em teores que ultrapassam os limites permissíveis pela legislação vigente.

O isolamento, seleção e identificação de microrganismos presentes nos efluentes das indústrias processadoras de mandioca e locais adjacentes ao seu despejo é alternativa para o estudo da degradação da linamarina do material, no que diz respeito à obtenção de culturas hábeis à metabolização do conteúdo cianogênico dos resíduos, destoxificando-os. O emprego futuro em atividades de fertirrigação, constitui exemplo de forma racional de aproveitamento da manipueira e água residual de fecularia como subprodutos do processamento de raízes de mandioca, em virtude do volume gerado

Os microrganismos representam uma fonte de recursos naturais de fácil manipulação em laboratório, que tem sido utilizada no entendimento da natureza de vários processos vitais. Muitos dos processos industriais em larga escala utilizam-se de microrganismos, através da biotecnologia. Quando culturas microbianas são estudadas em seus habitats naturais, do ponto de vista da ecologia, constituem partes importantes do ecossistema, desenvolvendo papel crucial na transformação de energia e em processos biogeoquímicos (Fungaro & Vieira, 1998).

A utilização de microrganismos em saneamento básico e ambiental é prática comum desde os primórdios do desenvolvimento dos processos biológicos de tratamentos de águas residuárias e resíduos sólidos. Foi a capacidade microbiana de catabolizar diferentes compostos orgânicos, naturais ou sintéticos, e inorgânicos, extraindo destes compostos fontes nutricionais e, energéticas, que possibilitou o emprego desses agentes biológicos como solução aos problemas gerados pelos rejeitos lançados no meio ambiente (Vazoller, 1996).

4. OBJETIVO

O presente trabalho teve por objetivo principal a seleção da microbiota aeróbia, hábil ao metabolismo de linamarina como única fonte de carbono e energia, provinda de manipueira, água residual de fecularia e solos adjacentes aos locais destinados ao descarte destes efluentes.

Inserida neste objetivo encontra-se a proposição de uso futuro das linhagens selecionadas na biorremediação dos resíduos líquidos da industrialização de mandioca, através da disposição destes efluentes no solo por fertirrigação.

5. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A revisão bibliográfica terá como principal enfoque a apresentação de estudos descritos pela literatura quanto ao emprego de microrganismos na destoxificação de efluentes industriais, determinando a utilização dos mesmos como alternativa ou método adicional aos tratamentos existentes.

5.1 *Linamarina, o glicosídeo tóxico da mandioca*

Um dos sérios problemas ambientais em termos mundiais é a poluição dos recursos de água doce, principalmente se considerados os pequenos cursos d'água, onde acontecem os despejos dos resíduos líquidos de indústrias que utilizam raízes de mandioca como matéria-prima (Fioretto, 1994).

Manipueira é o nome técnico do composto aquoso extraído da prensagem da massa de raízes de mandioca para o processamento de farinha. No caso de fecularias, a água utilizada na extração de amido dilui a manipueira reduzindo sua carga orgânica e conteúdo cianogênico, porém aumentando o volume gerado.

A Figura 5.1 ilustra o processo industrial de prensagem da massa de raízes de mandioca para a produção de farinha, gerando manipueira, que escorre por tubulações e é depositada em tanques de decantação, sendo encaminhadas por caminhões às lagoas de decantação.



Figura 5.1: Prensa de raízes de mandioca para a produção de farinha da Farinheira Plaza, Santa Maria da Serra - SP.

A cada tonelada de raízes processadas são gerados, 300 litros de manipueira e 600 litros de água residual de fecularia, que na falta de melhor solução são depositados em lagoas de decantação, sem qualquer reaproveitamento (Fioretto, 1994).

Linamarina é um β -glicosídeo de acetona-cianidrina e etil-metil-cetona cianidrina. A linamarase, é a enzima endógena da mandioca, que possui habilidade ao catabolismo do cianoglicosídeo (Cereda, 1994).

A cianogênese, vem a ser a formação de HCN (ácido cianídrico) à partir de linamarina, a qual poderá ocorrer espontaneamente em pHs maiores ou iguais à 5,5, ou por ação de hidroxinitriliases gerando HCN e cetonas correspondentes (Sayre, 1995).

A Figura 5.2, apresenta as reações que ocorrem durante a cianogênese em mandioca.

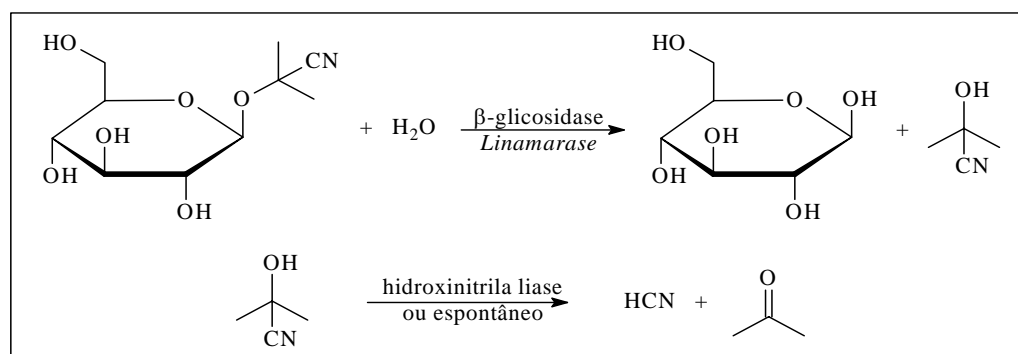


Figura 5.2: Cianogênese em mandioca (Cooke, 1978).

A linamarina está presente em todas as partes da planta, apresentando-se mais concentrada nas raízes e folhas. Todas as espécies de mandioca são conhecidas por conter cianeto. A toxicidade causada por CN^- tem sido reportada com frequência, enquanto a toxicidade causada pelo cianoglicosídeo não é descrita com grande ênfase (Cereda, 1994). O processamento da mandioca para alimentação no Brasil também gera problemas de toxicidade, pois o cianeto é um composto solúvel em água, onde poderá ser carregado através de resíduos sólidos e líquidos provindos das indústrias (Sobrinho, 1975).

No que diz respeito ao cultivar de *Manihot esculenta* Crantz, quanto ao seu conteúdo cianogênico, a maioria dos cultivares de mandioca apresentam carga cianogênica abaixo de 100 mg CN/Kg de peso fresco, mas algumas variedades se diferenciam, demonstrando valores que ultrapassam 500 mg/Kg, sendo denominadas como “mandioca brava”. Em contrapartida, existem cultivares totalmente isentos de qualquer resquício cianogênico (Mac Mahon et al., 1995).

Raízes de mandioca são classificadas em tóxicas e não tóxicas dependendo da quantidade de cianeto presente. A literatura cita valores de 15 a 400 mg/Kg (mg CN/Kg de peso fresco) de ácido cianídrico em raízes de mandioca, no entanto, valores mais frequentes se encontram no intervalo entre 30 à 150 mg/Kg (Carvalho & Carvalho, 1979). O limite de glicosídeos cianogênicos em farinha de mandioca recomendado pela WHO é de 10 mg/L (FAO/WHO, 1991).

Considerando-se o índice de equivalentes populacionais em DBO (5º dia, 20°C) de 54g/habitante/dia, uma usina que utilize cana-de-açúcar equivale à poluição ocasionada por 300 a 450 habitantes, para cada tonelada de cana moída (Fioretto, 1994). Num grau de tecnologia inferior, mas não menos poluente, destacam-se os efluentes líquidos resultantes do processamento da mandioca para a fabricação de farinha e fécula, os quais podem atingir vazões da ordem de 500 litros de água residual por tonelada de raiz processada.

O escoamento dessa água residual pode trazer sérios problemas de poluição em rios. Desta forma, as indústrias de amido são consideradas altamente poluidoras, de maneira que uma fecularia que utilize uma tonelada de raiz de mandioca/dia equivale à poluição ocasionada por 200 a 300 habitantes/dia, ao passo que as farinheiras, para cada

tonelada de raiz processada, correspondem a um equivalente populacional de 150 à 250 habitantes (Fioretto, 1994).

A carga orgânica da manipueira de indústria de farinha de mandioca, expressa na forma de DQO (demanda química de oxigênio), pode alcançar valores de 60.000 mg/L (Cereda, 1994). Comparando-se tal valor com a carga orgânica de um esgoto sanitário típico com DQO de aproximadamente 400 mg/L, pode-se avaliar o potencial poluidor da manipueira, fato este agravado pelo volume gerado.

Apesar da carga orgânica e da presença de linamarina, ocorre na manipueira um número de microrganismos nativos que promovem forte fermentação assim que ela é coletada (Cereda et al., 1990).

Microrganismos presentes em manipueira e água residual de fecularia, assim como em ambientes sujeitos a contínuos descartes destes efluentes líquidos, encontram-se naturalmente adaptados ao conteúdo cianogênico de seu habitat, degradando-o por atividade enzimática ou metabolismo alternativo à cadeia respiratória, podendo assim ser aplicados na destoxificação destes resíduos.

Atualmente, a manipueira tem sido estudada como sub-produto, passível de ser aproveitado em outras atividades. Na gama de opções para o seu aproveitamento, encontra-se a produção de biomassa lipídica utilizando este resíduo como substrato (Wosiacki, 1994), a produção de biogás (Fernandes Júnior & Takahashi, 1994), ácido cítrico (Cabello & Leonel, 1994), inseticida, nematicida (Ponte, 1992), produção de bioaromas a partir da levedura *Geotrichum fragrans*, isolada de manipueira (Damasceno, 1999), biosurfactantes, agentes tensoativos (Santos et al., 1999) e fertirrigação (Fioretto, 1994). A fertirrigação se apresenta como a alternativa viável pelo baixo custo e facilidade de

aplicação, dentre as propostas, no que diz respeito à incorporação da manipueira e água residual de fecularia ao ambiente, uma vez que a tendência dos estudos e projetos de irrigação e ambientais é a busca de novas alternativas para a economia de água.

A composição química da manipueira, sustenta a potencialidade do composto como nutriente, haja visto sua riqueza em Potássio, Magnésio, Fósforo, Cálcio e Enxôfre, além de Ferro e micronutrientes em geral. Por outro lado, a presença de cianetos sugere os efeitos nematicida e inseticida inerentes à manipueira (Cereda, 1994).

O cianeto atua sobre a fosforilação oxidativa das plantas, ou seja, na cadeia respiratória das mesmas. A Figura 5.3 apresenta o efeito causado em plantas aos arredores de lagoas de decantação de manipueira, pertencente à Farinheira Plaza, em Santa Maria da Serra, SP.



Figura 5.3: Vegetação em torno da lagoa de decantação de manipueira - Farinheira Plaza, Santa Maria da Serra - SP.

A composição da manipueira varia dentro de limites amplos, mas principalmente é influenciada pela época do ano.

O Quadro 5.1 apresenta a composição química da manipueira segundo Cereda (1994) e Barana (1996).

Quadro 5.1. Composição química média dos resíduos líquidos originados na industrialização de raízes de mandioca para produção de farinha.

<i>Variáveis</i>	<i>Cereda (1994)</i>	<i>Barana (1996)</i>
	<i>mg/L</i>	
Fósforo	160,84	300,00
Potássio	1.863,50	3.800,00
Cálcio	227,50	400,00
Magnésio	405,00	600,00
Enxofre	19,50	200,00
Ferro	15,35	6,40
Cobre	1,15	1,40
Zinco	4,20	5,00
Manganês	3,70	3,50
Nitrogênio total (%)	0,49	0,30
pH	4,10	-
DQO (g/L)	63,66	60,00
Cianeto total	444,00	140,68
Sólidos voláteis (% MS)	5,23	3,83

Fontes: Cereda (1994); Barana (1996).

A otimização da disposição de manipueira e água residual de fecularia no solo, inoculando-se o mesmo com microrganismos aeróbios, isolados dos efluentes e ao metabolismo do conteúdo cianogênico presente, incluindo linamarina autóctone e cianeto amostras de solo próximos às indústrias, selecionados como hábeis livre ou complexado, apresentam-se como ferramenta importante. O solo pode absorver bem as águas servidas nos meses secos, período em que se concentra a maior produção de mandioca industrial,

coincidindo com uma época de menor precipitação pluviométrica em que a baixa vazão dos cursos d' água acentua os efeitos da poluição. Através do emprego de efluentes líquidos do processamento de mandioca em fertirrigação, poderão ser recuperados minerais extraídos pelas culturas, os lodos, e, antes de tudo, a própria água, como forma de reciclagem forçada.

5.2 Biodegradação de Cianoglicosídeos

A cianogênese, ou seja, a formação de HCN a partir de glicosídeos cianogênicos ocorre em várias plantas de consumo na alimentação humana, tais como: aveia, maçã, mamão, trigo, milho, sorgo e mandioca. Glicosídeos cianogênicos correspondem à produtos secundários do metabolismo de plantas. Estes glicosídeos são compostos de α -hidroxinitrilas e açúcares, principalmente D-glicose. A planta de mandioca, como um todo, possui glicosídeos cianogênicos, linamarina e lotaustralina, nas proporções de 96% e 4%, respectivamente (Conn, 1994).

Na mandioca, a linamarina concentra-se principalmente na entrecasca. Comparando-se a mandioca à outras plantas contidas de glicosídeos cianogênicos, esta gera maiores problemas, pelo fato de que as raízes, a qual constitui a porção destinada ao processamento para a produção de produtos alimentícios, contém cianoglicosídeos, enquanto outras espécies, os apresentam em partes não comestíveis. Jones (1998) justifica tal afirmação citando que a maçã, por exemplo, apresenta glicosídeos cianogênicos em suas sementes, e o mamão, em suas folhas.

Diante desta constatação surge a preocupação com o resíduo gerado pelo processamento de raízes de mandioca, pois a linamarina, principal cianoglicosídeo da planta, é carregada juntamente à manipueira e à água residual de fecularia (Sobrinho, 1975).

O ácido cianídrico (HCN), como um produto da hidrólise de glicosídeos cianogênicos, foi primeiramente isolado por Scrade em 1802, a partir amêndoas amargas e folhas de pessegueiro (Vetter, 2000). Os glicosídeos cianogênicos podem ser agrupados de acordo com sua natureza química, cadeias alifáticas e grupamentos aromáticos. Alguns destes cianoglicosídeos são bem conhecidos por estarem presentes em espécies de plantas economicamente importantes, tais como a linamarina em *Manihot esculenta*, *Linum usitatissimum*, *Trifolium repens* e a lotaustralina em *Lotus corniculatus*.

No Brasil, o setor que mais se destaca quanto a problemas com resíduos contendo cianeto (complexado) é o da mineração, onde o composto é utilizado em razoável quantidade, gerando rejeitos líquidos contendo cianetos livres (CN⁻) e complexados à outros metais. No entanto, não é somente na mineração que se encontra este problema, pois estima-se que três milhões de toneladas por ano de cianetos livre e complexado, são utilizados não somente na lixiviação de minérios, mas também na produção de intermediários químicos, fibras sintéticas e borrachas, indústrias de galvanização, compostos farmacêuticos e outros. (Linardi, on-line)

Uma linhagem de *Pseudomonas*, identificada como *Pseudomonas diminuta*, foi isolada de efluentes da Mineração Morro Velho (Nova Lima, MG). O microrganismo, após sucessivos repiques, mostrou-se hábil ao crescimento em meio mineral acrescido de 300 ppm de tiocianato e 0,1% de glicose como única fonte de N e C, respectivamente. A *Pseudomonas diminuta*, foi capaz de metabolizar 69,6% do composto, após 48 horas de incubação, onde a determinação do tiocianato residual foi realizada por métodos de colorimetria (Machado et al., 1999).

Cianeto é um dos componentes básicos e indispensáveis em algumas indústrias e é produzido em larga escala para uso no setor automotivo, manufatura de circuitos impressos em placas, aço, mineração de ouro, polos químicos. Em todos os ramos de atividade a que foram citados os usos do cianeto, encontra-se um problema em comum, o descarte do efluente gerado. O método químico mais comumente empregado é a oxidação química através de um processo utilizando cloração alcalina (Ganczarzyk et al., 1985). Este é um procedimento de alto custo devido à grande utilização de cloro, havendo a desvantagem adicional da formação de um novo resíduo, o lodo, que por sua vez, traz problemas quanto à sua disposição final (Knowles, 1986).

Métodos químicos correntes de tratamento de resíduos líquidos contendo cianeto, englobam além da cloração, a ozonização, oxidação e técnicas à base de sulfonação (Palmer et al., 1988). Cada uma destas técnicas apresenta alto custo e dificuldades na disposição final do resíduo após o tratamento.

Efluentes da produção e processamento de alimentos também apresentam quantidade substancial de cianeto originado de glicosídeos potencialmente cianogênicos, presentes em vários tecidos vegetais, frutos e raízes, tais como mandioca, sorgo, amêndoas, pêssego, cereja, bambú (Linardi, on-line).

A presença de cianeto, ou compostos cianogênicos na água, tem efeito significativo sobre a atividade biológica dos ecossistemas. A legislação brasileira determina que a concentração máxima de cianeto para descarte é de 0,2 mg/l, mas não especifica em que forma, gás, dissolvido, líquido, livre ou complexado (Barana, 2000).

Para que sejam evitados impactos ambientais, é recomendado que efluentes líquidos carreadores de carga cianogênica, sejam destoxificados anteriormente ao

seu descarte. A maioria das indústrias, assim como as mineradoras, utilizam como única forma de tratamento a degradação natural, que consiste no confinamento do efluente sob a ação natural dos fatores: volatilização de HCN, hidrólise de CN^- e cianeto complexado, fotodecomposição (UV), precipitação de compostos insolúveis e ação microbiana local. Esta constitui processo lento, acarretando a retenção destes resíduos nos locais destinados ao seu depósito, durante longos períodos de tempo (Machado et al., 1999).

Em várias ocasiões, a presença do CN^- é causa de contaminação do solo por lixiviação do cianeto dissolvido, ou por contaminação do solo com resíduos sólidos do mesmo. Por sua alta toxicidade, a presença de cianeto no solo expõe riscos à saúde humana e meio ambiente, quando este entra no ciclo ecológico por lixiviação no lençol freático (Meeussen et al., 1995).

A biodegradação de compostos cianogênicos tem sido, juntamente com os tratamentos tradicionais, uma grande alternativa à degradação de efluentes (Machado et al., 1999). É importante destacar que a degradação natural é diferente da biodegradação, pois o termo “degradação natural” se aplica à ocorrência da volatilização do composto no ambiente, enquanto que a biodegradação engloba a atividade microbiana sobre o poluente ou substância a qual se deseja destoxificar.

Microrganismos podem crescer em substratos contendo cianeto através de metabolismo anaeróbio; usando cadeia respiratória em metabolismo alternativo (Cereda, 1981), ou ainda, através da destoxificação do cianeto, pela sua utilização como única fonte de carbono e nitrogênio (Jensen, 1979). Uma via respiratória alternada da respiração mitocondrial, insensível ao KCN e antimicina, está largamente distribuída na natureza, principalmente em certos órgãos de vegetais superiores, bactérias e fungos (Bendall & Bonner,

1971; Edwards, et al., 1974; Henry & Nyns, 1975). Brasil, et al. (1982), avaliaram a via alternada e sua indução em leveduras do gênero *Trichosporon* e bactérias do gênero *Klebsiella*. A via alternada estudada nos microrganismos, foi totalmente insensível ao KCN mostrando total inibição da via normal citocrômica. O estudo teve como conclusão que microrganismos sensíveis ao cianeto podem adquirir resistência ao íon, evidenciando a possibilidade de se induzir em laboratório a via alternada em leveduras e bactérias. As citações sobre destoxificação da linamarina por via microbiana é mais reduzida.

Linamarase, é a enzima com a habilidade de quebra da linamarina em cianeto livre e acetonacianidrina. Está presente em todas as partes da planta da mandioca, sendo liberada em condições de dilaceramento do vegetal (Sayre, 1995). Esta enzima também pode ser produzida por microrganismos presentes na natureza. Uma linhagem de *Mucor circinelloides* LU M40, foi capaz de produzir a enzima linamarase, que apresentou-se ativa ao seu emprego na destoxificação de mandioca, segundo ensaios realizados por Petruccioli et al. (1999).

A maioria dos estudos descritos pela literatura, foram conduzidos utilizando culturas puras em escala laboratorial. Mosher et al. (1996), propuseram o uso de um sistema de tratamento biológico de cianeto, pelo uso de culturas mistas, as quais foram avaliadas quanto ao potencial de destoxificação e requerimento nutricional.

A biodegradação de cianeto na forma de $K_2Fe(CN)_6$ 0,5mM e $K_2Ni(CN)_4$ 0,25mM, por culturas puras e mistas de fungos, foram descritas por Barclay et al. (1998). As linhagens foram isoladas à partir do enriquecimento de amostras de solo coletadas aos arredores de plantas industriais, em contato com resíduos cianogênicos. Os fungos foram cultivados em frascos erlenmeyers de 250 ml contendo 50 ml de meio de cultura

acondicionados em shaker à 200 rpm/25°C, onde glicose 20 mM foi adicionada como fonte de carbono e energia. Os consórcios das culturas foram avaliados em dois grupos: *Fusarium solani* (IMI 369371) + *Tucchodama polysporum* (IMI 370461); *Fusarium oxysporum* (IMI 370462) + *Penicillium miczynski* (IMI 370461) + *Scytalidium thermophilum* (IMI 370463). Como resultados do estudo, os autores obtiveram que o consórcio de *Fusarium solani* e *Tucchodama polysporum*, após 28 dias de incubação foram hábeis à degradar 95% do conteúdo cianogênico do meio. Após o mesmo período de incubação, o consórcio empregando *Fusarium oxysporum*, *Penicillium miczynski* e *Scytalidium thermophilum*, quando avaliados quanto ao teor de cianeto residual, através do monitoramento por análises de cianeto total em biomassa livre no meio de cultura, pelo uso de técnicas cromatográficas, acusaram 32% do composto presente na biomassa microbiana.

Cianetos podem ocorrer espontaneamente no ambiente como, por exemplo, na degradação espontânea de cianoglicosídeos de plantas. Muitos microrganismos do ambiente têm sido também descritos como hábeis à destoxificação ou utilização de formas simples de cianeto.

Linhagens de *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Candida tropicalis*, e *Penicillium sclerotium*, isoladas da fermentação de mandioca em estudo realizado por Amoa-Awua et al. (1996), foram avaliadas por Lei et al. (1999), quanto à habilidade à degradação de glicosídeos cianogênicos, incluindo linamarina, amidalina e uma mistura entre linustatina e neolinustatina. A atividade enzimática das culturas foi verificada através do kit comercial API zym (Bio Mérieux, Marcy - l'Etoile, France), o qual determina 19 atividades enzimáticas diferentes, incluindo β -glicosidases, atribuindo "scores" máximos e mínimos quanto ao desempenho das mesmas, variando de 1,0 à 5,0. As primeiras 3 culturas

descritas acima, apresentaram boa correlação entre a atividade de β -glicosidasas e a habilidade de metabolizar os cianoglicosídeos. A linhagem de *Penicillium sclerotium* exibiu alta atividade enzimática, apresentando "score 5,0", ou seja, atividade máxima segundo o kit aplicado, mas demonstrou-se ineficiente na destoxificação dos substratos cianogênicos. A linhagem de *Lactobacillus plantarum*, após 30 horas de fermentação, apresentou "score 4,0", quanto à atividade enzimática sobre os cianoglicosídeos, e a cepa de *Candida tropicalis* após 58 horas, apresentou "score 1,0", no que se refere à atividade enzimática sobre amidalina e após 96 horas, "score 1,5", quanto à linamarina (Lei et al., 1999).

A degradação de KCN sob condições anaeróbias, em presença de inóculo, foi descrita por Hope & Knowles (1991). O estudo relata o isolamento de uma linhagem de *Klebsiella planticola* a partir de lodo ativado proveniente de um reator anaeróbio. A cultura demonstrou-se capaz de crescer em condições anaeróbias, utilizando cianeto como única fonte de nitrogênio, sendo necessária a suplementação do meio de cultura por glicose e açúcares redutores, como fontes adicionais de carbono e energia. A *Klebsiella planticola* utilizou a amônia (NH_4), resultante do metabolismo do cianeto, como fonte de nitrogênio.

Stam et al. (1985) apresentaram uma cultura de *Rhizobium* ORS571 como hábil à assimilação de cianeto através do crescimento em succinato. O cianeto foi adicionado gradualmente alcançando a concentração de 7 mM, de modo a permitir a adaptação do microrganismo à fixação de nitrogênio a partir do cianeto. A degradação de cianeto por bactérias fixadoras de nitrogênio apresentou-se como uma possível alternativa à destoxificação do composto, merecendo estudos comprobatórios.

Os trabalhos publicados sobre a disposição de glicosídeos cianogênicos e cianetos no ambiente, e resultados sobre o emprego da biorremediação como

forma de destoxificação de locais e materiais, constata a crescente disponibilização de técnicas e a demanda de novos estudos que envolvam a utilização da biodiversidade microbiana no tratamento de resíduos tóxicos.

5.3 Metabolismo microbiano de cianeto

Estudos do metabolismo de compostos tóxicos por microrganismos vêm sendo descritos freqüentemente por vários autores. Em numerosos casos, os microrganismos possuem um potencial metabólico de versatilidade para a quebra de compostos químicos orgânicos sintéticos. Uma porção significativa da atividade de biodegradação de compostos antropogênicos pode envolver o cometabolismo, um processo no qual os microrganismos, enquanto desenvolvem-se pelo consumo de um determinado substrato, apresentam a capacidade de transformar outros compostos sem que haja qualquer benefício direto ao metabolismo (Taramani & Ahlertt, 1985, citado por Oliveira, 1998).

Um sistema anaeróbio para a degradação de cianeto foi proposto por Fallon (1992), onde a rota hidrolítica da destoxificação do composto foi evidenciada da seguinte forma: $\text{HCN} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HCONH}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HCOOH} + \text{NH}_3$, onde formiato foi o produto gerado da reação sendo convertido à bicarbonato. A formamida foi rapidamente hidrolizada à formato após ação da atividade microbiana anaeróbia, não sendo detectada a presença de cianeto nas reações intermediárias.

Segundo Holliger & Schumacher (1994), os microrganismos possuem várias rotas metabólicas que os levam à obtenção de energia para o crescimento, a qual é proveniente da degradação de compostos orgânicos. No processo de cometabolismo, segundo os mesmos autores, o composto degradado é considerado um substrato secundário, isto é, a

degradação deste composto pelos microrganismos não implica na obtenção de energia, e os metabólitos ou os produtos formados através da degradação podem ser utilizados por outros microrganismos como fonte energética. Sendo assim, compostos tóxicos podem ser destoxificados através de mecanismos microbianos que empreguem o cometabolismo.

Um composto pode ser degradado parcial ou totalmente, e sua toxicidade poderá ser eliminada, ou não. Quando obtida a eliminação completa da toxicidade tem-se a destoxificação, a qual não implica na total mineralização, isto é, redução total à compostos menores como dióxido de carbono (Oliveira, 1998).

O ácido cianídrico (HCN) é um dos biocidas mais poderosos, atuando como inibidor da cadeia respiratória, interferindo na fosforilação oxidativa pela combinação com a citocromo oxidase promovendo a inibição do transporte eletrônico e conseqüentemente a formação de ATP. A presença de uma via alternada à respiração, resistente ao cianeto, já foi descrita em alguns microrganismos (Bahr & Bonner, 1973). Através deste mecanismo continuaria havendo consumo de O₂ e formação de água mesmo em presença de KCN (cianeto de potássio), que inibiria a cadeia respiratória normal. Esta via é inibida pelo ácido salicílico hidroxâmico (SHAM).

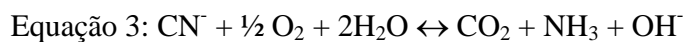
Muitos microrganismos são resistentes, ou podem induzir resistência ao cianeto, degradando-o à compostos não-tóxicos. Lang (1933) citado por Knowles (1976) relatou a existência da enzima rodanase, presente em uma variedade de tecidos celulares animais e em *E. coli*. O autor mostrou que a enzima catalisa a reação entre cianeto e tiosulfato, formando tiocianato e sulfito. A rodanase também tem sido descrita em espécies bacterianas, tais como *Thiobacillus denitrificans*, *Bacillus subtilis* e *Bacillus stearothermophilus* (Knowles, 1976).

A partir da realização de análises de acompanhamento da fermentação natural de água residual de fecularia, através da verificação de valores de pH, acidez titulável e aumento do número de células microbianas, Cereda et al. (1981) isolaram 12 microrganismos morfológicamente distintos, dos quais foram selecionadas 3 bactérias e 2 leveduras com respiração aeróbia e resistentes ao íon cianeto. Testes respiratórios efetuados, demonstraram a existência de uma via respiratória alternativa, resistente ao cianeto.

Harris & Knowles (1983), relataram que a bactéria *Pseudomonas fluorescens* NCIMB foi capaz de metabolizar cianeto livre por ação enzimática da cianeto oxigenase. Posteriormente, Kunz et al. (1992) constataram que a mesma bactéria possuía rotas alternativas no metabolismo de cianeto. Essas rotas dependem da concentração do composto no meio, onde em baixos teores, a degradação ocorre via cianeto oxigenase, e em concentrações maiores, podem haver dois mecanismos, os quais envolvem a ação da cianeto desidratase. Os dois mecanismos, os quais envolvem a atividade da enzima cianeto hidratase, são ilustrados pelas equações 1 e 2, como se segue:



Segundo Raybuck (1992), a degradação de cianeto livre via microbiana gera como produtos, dióxido de carbono e amônia, onde a reação pode ser descrita pela equação 3, sendo o processo de conversão realizado por bactérias.



Como pode ser visto várias são as rotas metabólicas utilizadas pelos microrganismos na degradação de cianeto, demonstrando a versatilidade microbiana e adaptação ao meio onde se encontram ou são inoculados.

5.4 Biorremediação como ferramenta de destoxificação

Segundo Griffiths (1992), a biorremediação vem a ser a recuperação, pelo tratamento "in situ" de ambientes danificados pela disposição de materiais poluentes tóxicos. A habilidade de degradação de compostos por microrganismos é consequência da evolução de sistemas enzimáticos de células procariotas e eucariotas, as quais vêm coexistindo durante bilhões de anos, com uma enorme variedade de substâncias naturais de diferentes origens. Esta diversidade de substratos potenciais ao crescimento microbiano resultou, então, na síntese de enzimas aptas a transformar moléculas orgânicas com estruturas bastantes distintas.

Estudos da atividade microbiana sobre compostos tóxicos vem sendo realizados, com o propósito de implantar a biorremediação como técnica útil na recuperação de ambientes danificados pelo depósito de contaminantes.

A biomassa microbiana é a principal responsável pela decomposição de resíduos orgânicos, pela ciclagem de nutrientes e pelo fluxo de energia dentro do solo (Jenkinson & Ladd, 1981). Sabe-se atualmente que microrganismos, tais como bactérias e leveduras, são responsáveis por importantes transformações metabólicas, pelo controle de doenças e pragas, pela fixação biológica de nitrogênio atmosférico, pela degradação de resíduos vegetais, industriais e outros produtos, inclusive tóxicos (Azevedo, 1998).

Os "arsenais" enzimáticos microbianos têm sido também capazes de atuarem sobre substâncias químicas sintéticas, oriundas de atividades antropogênicas. Esta resposta do metabolismo de certos microrganismos, sem dúvida, confere algumas vantagens adicionais às células microbianas, tais como a exploração de novos nichos ecológicos e fontes energéticas (Vazoller, 1996).

São numerosos os processos biotecnológicos que utilizam microrganismos, seja para a obtenção de produtos de valor comercial, ou a despoluição de ambientes contaminados. O uso de microrganismos isolados de fontes ambientais na degradação de substâncias tóxicas vem crescendo nos últimos anos. O Quadro 5.2, ilustra alguns dos possíveis empregos da biorremediação na destoxificação de compostos, apresentando dificuldades encontradas e providências a serem tomadas, em cada caso.

Quadro 5.2: Exemplos da aplicação de microrganismos na destoxificação de compostos tóxicos.

<i>Atividades microbianas</i>	<i>Dificuldades</i>	<i>Soluções</i>
Otimização da degradação de fenantreno ¹ em solos contaminados com óleos de alcatrão através da ação de <i>Phanerochaeta chysosporium</i>	Inexistência da população especializada “ <i>in situ</i> ”.	Inoculação com organismos externos
Otimização da mineralização de pireno, benzopireno, e carbazol por consórcios microbianos	Baixa população de agentes degradadores “ <i>in situ</i> ”	Seleção e enriquecimento “ <i>in situ</i> ”
Favorecimento do metabolismo anaeróbico para a ocorrência de reações de desalogenação redutiva (reações de redução de moléculas halogenadas, seguida de sua degradação)	Condições físico - químicas ambientais	Alteração de condições ambientais

Legenda: (1: Hidrocarboneto aromático policíclico)

Fonte: Vazoller (1996).

Microrganismos expostos à contaminantes orgânicos tendem à adaptar-se a sua presença e degradá-los utilizando-os como substrato para o crescimento. (Oliveira, 1998)

A degradação de herbicidas constitui tema de muitos estudos, onde destacando-se o problema do acúmulo de atrazina no solo, onde trabalhos relatam que alguns

fungos e bactérias, previamente selecionados, demonstraram capacidade de destoxificar o composto. Os microrganismos avaliados foram os fungos *Aspergillus niger* e *Rhizopus stolonifer*, e as bactérias dos gêneros, *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Bacillus* e *Pseudomonas* (Behki et al., 1993; Levanon, 1993).

Clorofenóis são compostos encontrados em efluentes industriais de diferentes fontes, tais como: petroquímicas; indústrias têxteis e químicas; cloração de água ou ainda como um produto do metabolismo de compostos orgânicos halogenados. A degradação de 2-clorofenol por *Alcaligenes* sp. foi descrita por Fortunato (1998), onde o microrganismo foi selecionado a partir do isolamento de água coletada de um rio poluído próximo à cidade de Buenos Aires, na Argentina.

A biodegradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) por uma cultura mista microbiana, foi descrita por Yuan et al. (2000). As culturas foram selecionadas de locais conhecidos por contínuos descartes de efluentes petroquímicos no sul de Taiwan e cultivadas em meio mineral mínimo, contendo como única fonte de carbono, o fenantreno.

Estudos sobre a degradação de tiocianato por microrganismos, foram relatados por Souza-Fagundes et al. (1998). Um “pool” (cultura mista) de culturas e uma linhagem bacteriana pura, identificada como BMU8, isolados do leito fixo de um biorreator destinado à remoção de tiocianato e cianeto, demonstraram-se hábeis à metabolizar tiocianato como única fonte de nitrogênio.

Através dos exemplos das atividades microbianas descritas, visando sempre a demonstração de algumas das múltiplas aplicações das técnicas de biorremediação, apresenta-se um amostragem do que pode ser obtido através da interação entre a

biodiversidade microbiana e o homem na destoxificação de compostos tóxicos dispostos no ambiente.

6. MATERIAL E MÉTODOS

O isolamento dos microrganismos foi realizado a partir de amostras de solos, manipueira e água residual de fecularia, na expectativa de que a população microbiana isolada, represente a biodiversidade de linhagens cultiváveis presentes no locais de depósito dos efluentes, obtendo-se maior probabilidade de seleção de linhagens hábeis e adaptadas à biodegradação de glicosídeos cianogênicos, e conseqüentemente, cianetos livres ou complexados.

6.1 Extração e purificação de linamarina

A linamarina utilizada foi extraída e purificada por pesquisadores do CPQBA (Centro de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas) - Unicamp, Campinas, SP, segundo metodologia proposta por Rodrigues et al.¹ (1999). Os extratos de linamarina

¹ Artigo submetido à publicação: Isolation and Quantification of Cyanoglycoside Linamarin.

utilizados foram obtidos de acordo com o rendimento do processo para sua extração, o que acarretou na variação dos teores de pureza dos mesmos entre 87,3% e 90,5%. A quantificação de linamarina extraída das raízes de mandioca, foi efetuada por HPLC em cromatógrafo Waters M-45, acoplado à detector de índice de refração Waters 410, injetor Rheodyne 7000 (injeção 20µL), utilizando-se uma coluna RP-18 (250 x 4,6mm x 5µm) com sistema eluente composto por água/ metanol (9:1), vazão de 1mL/ minuto.

6.2 Obtenção da manipueira fresca e sua caracterização

A manipueira fresca utilizada como adjunta a meios de cultura sintéticos (agar nutriente e agar extrato de malte para leveduras) e como meio de cultivo propriamente dito, foi obtida da linha de processamento de raízes de mandioca para a produção de farinha, na Farinheira Plaza, em Santa Maria da Serra, SP. A manipueira foi coletada diretamente das prensas em garrafas do tipo "pet", as quais foram acondicionadas em caixas térmicas com gelo, e encaminhadas aos laboratórios do CERAT (Centro de Raízes e Amidos Tropicais) - Unesp, Botucatu, SP.

A manipueira foi caracterizada segundo teores de macro e micronutrientes presentes, através de análises realizadas pelo Departamento de Recursos Naturais - Solo, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Unesp, Botucatu, SP, empregando metodologias descritas por Lanarv (1988). O substrato foi analisado também quanto às suas características físico-químicas, através de análises realizadas pelo CERAT - Unesp, Botucatu, SP, segundo metodologias descritas por AOAC (1975), Nelson (1944) e Somogy (1945).

6.3 Amostras para isolamento de microrganismos

As amostras de solo e de manipueira foram coletadas em 6 pontos distintos de 2 indústrias de processamento de mandioca: Farinheira Plaza, situada em Santa Maria da Serra – SP e Fecularia Halotech Fadel, em Palmital, SP (Figura 6.1)

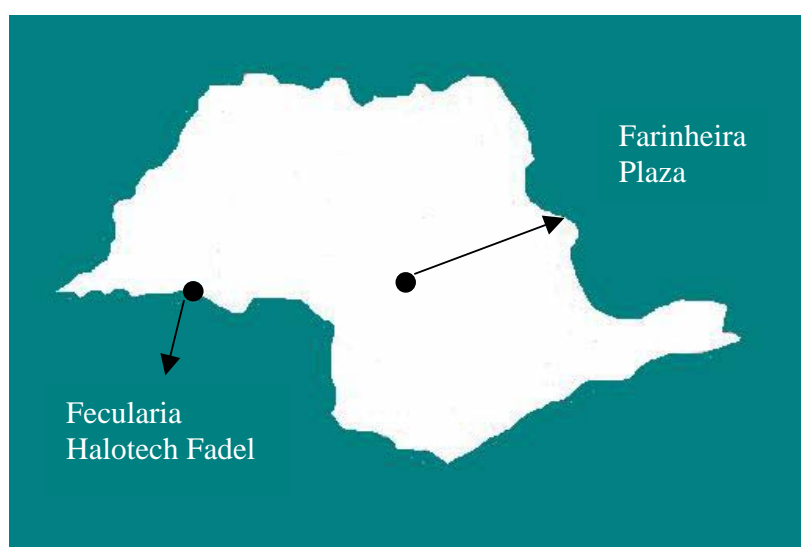


Figura 6.1: Localização das fontes de amostragem : Farinheira Plaza, em Santa Maria da Serra, e Fecularia Halotech Fadel, em Palmital, no Estado de São Paulo.

Para a obtenção de culturas microbianas, foram selecionados como pontos de coleta das amostras, os locais junto ao despejo de água residual concentrada (farinheira) e diluída (fecularia). As amostras foram coletadas após o período mínimo de 5 dias sem chuva, com o intuito de que a coleta representasse as condições naturais de umidade dos locais de origem. As amostras de solo foram retiradas superficialmente com espátula na profundidade de aproximadamente 4 cm, segundo proposto por Labeda (1990), uma vez que o objetivo foi o isolamento de apenas microrganismos aeróbios. As amostras de solo foram acondicionadas em sacos plásticos não estéreis e as de águas residuárias, em garrafas plásticas

do tipo “pet”, lavadas em água corrente. Uma vez coletadas as amostras foram acondicionadas em caixas térmicas contendo cubos de gelo, sendo encaminhadas às análises microbiológicas, nos laboratórios do CERAT - Unesp, Botucatu, SP.

Foram consideradas que três coletas eram suficientes para representar a amostragem, pelo fato do processamento de raízes de mandioca nas farinheiras e fecularias é diário. Sendo assim, o descarte de manipueira nas lagoas de decantação é semanal, e o de água residual de fecularia é simultâneo ao processamento das raízes. Diante disso, as condições dos locais onde são depositados estes resíduos, se mantêm estáveis ao longo do ano, não havendo a necessidade de sucessivas coletas para a determinação da flora microbiana presente. O Quadro 6.1, descreve as coletas realizadas.

Quadro 6.1: Descrição das coletas realizadas quanto aos objetivos das mesmas e locais utilizados como fontes de amostras.

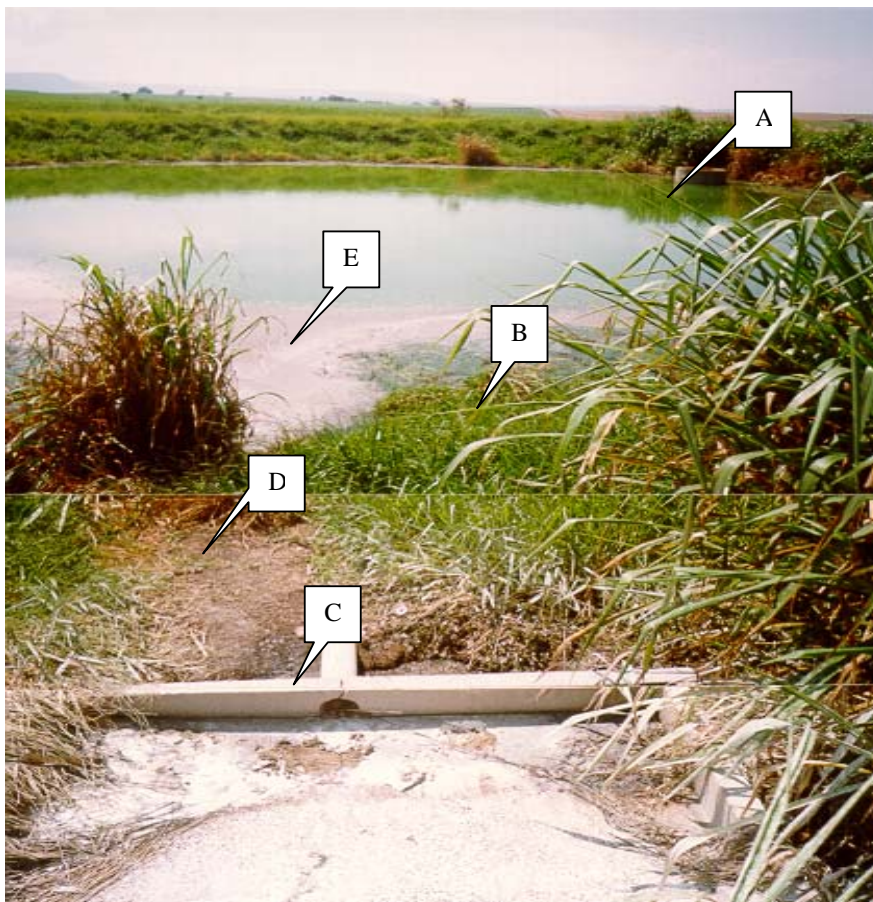
<i>Coletas</i>	<i>Objetivos</i>	<i>Datas das Coletas</i>	<i>Locais</i>
1	Isolamento de Bactérias	29/03/1999	Farinheira Plaza
2	Isolamento de Leveduras	19/04/1999	Farinheira Plaza
3	Isolamento de Bactérias e Leveduras	15/07/1999	Fecularia Halotech Fadel

O Quadro 6.2, apresenta a descrição das amostras coletadas na Farinheira Plaza - Santa Maria da Serra, incluindo as amostras de solo e de manipueira.

Quadro 6.2: Pontos de Coleta - Farinheira Plaza, Santa Maria da Serra, SP.

<i>Características das amostras</i>	<i>Procedência - Farinheira Plaza</i>
Solo 1	Borda da lagoa de decantação.
Lodo - lagoa de decantação	Água misturada ao solo, com odor putrefeito e cor esverdeada.
Solo	Solo próximo à caixa de cimento receptora da descarga de manipueira escoada à lagoa.
Solo	Solo parcialmente úmido pelo resíduo, em torno da borda da lagoa de decantação.
Manipueira fermentada	Manipueira depositada na lagoa.
Manipueira fresca	Manipueira diretamente da prensagem de raízes de mandioca na farinheira.

A Figura 6.2, demonstra os pontos de amostragem na lagoa de decantação utilizada pela Farinheira Plaza, em Santa Maria da Serra, SP .



Legenda: A, B, C, D e E , designam os pontos de coleta utilizados.

Figura 6.2: Lagoa de descarte de manipueira da Farinheira Plaza, utilizada para as coletas de amostras de solos e manipueira fermentada.

O Quadro 6.3, apresenta a origem das amostras coletadas na Fecularia Halotech Fadel, incluindo amostras de solo e água residual de fecularia.

Quadro 6.3: Pontos de coleta - Fecularia Halotech Fadel, Palmital / SP.

<i>Características das amostras</i>	<i>Procedência - Fecularia Halotech Fadel</i>
Solo 4	Solo da borda da lagoa de decantação.
Solo 5	Solo em torno da borda.
Solo 6	Solo em torno do canal de escoamento direto da fecularia para a lagoa de decantação.
Solo 7	Solo seco proveniente do fundo de lagoa de decantação inativada pela fecularia *.
Água residual de fecularia	Água residual diretamente do processamento de raízes para a extração de fécula.
Manipueira fermentada	Manipueira depositada há cerca de um ano, provinda de farinheira inativada pela fecularia *.

* Amostras provenientes da lagoa de decantação de manipueira de uma antiga indústria de farinha de mandioca, em Palmital, SP, desativada para se tornar fecularia.

A Figura 6.3 ilustra a lagoa de decantação de água residual provinda do processamento de raízes de mandioca para a produção de fécula, pertencente à Fecularia Halotech Fadel.

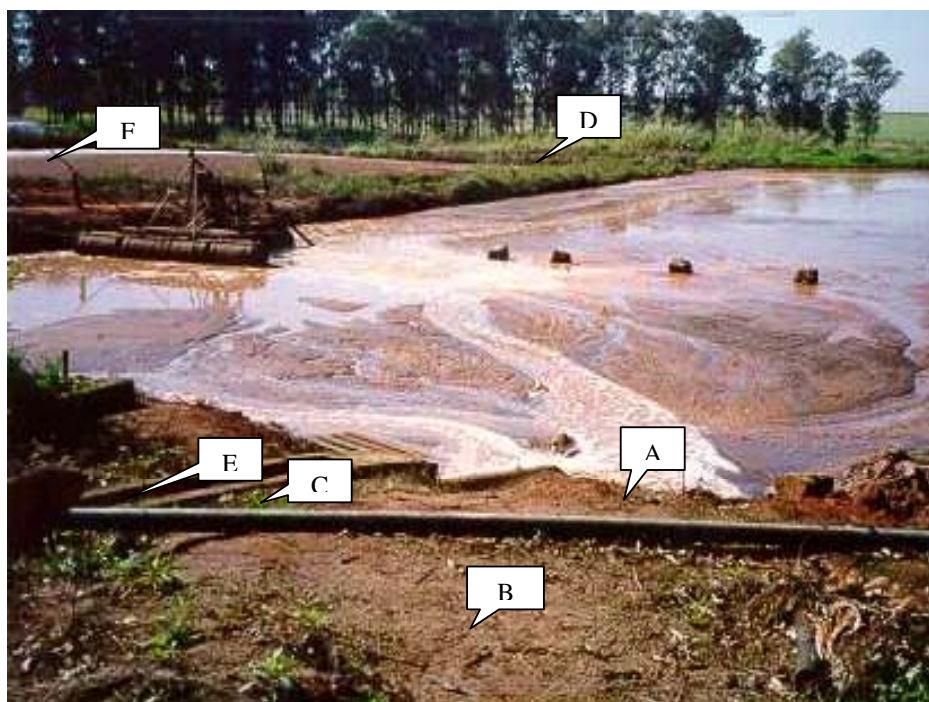


Figura 6.3: Lagoa de descarte de água residual da Fecularia Halotech Fadel, utilizada como fonte de coleta de amostras de solos e resíduo fermentado.

No laboratório, alíquotas de 1g de cada amostra foram diluídas seriadamente em 9mL de água destilada estéril. As diluições utilizadas nas análises foram 10^{-4} , 10^{-6} e 10^{-7} , as quais foram estabelecidas após plaqueamento experimental das amostras, para que houvesse a adequação do número de microrganismos passível de contagem e isolamento, entre 30 e 300 colônias (Pantaroto et al, 2000). A partir das diluições, utilizou-se o método de plaqueamento em superfície, utilizando-se 0,1 mL de cada amostra em duplicata (Labeda, 1990).



6.4 Enriquecimento das Amostras

O enriquecimento das amostras consistiu na incubação por 14 dias à 28°C, onde a cada 3 dias as amostras de solos foram umedecidas com manipueira ou água residual de fecularia, de acordo com a procedência da amostra, para que houvesse manutenção de sua umidade natural e enriquecimento da população microbiana. Após 7 e 14 dias de incubação as amostras foram plaqueadas segundo Labeda (1990), com o intuito de obtenção de culturas microbianas adaptadas às condições do meio, seja este manipueira, água residual de fecularia ou solos contidos das mesmas.

6.5 Isolamento Seletivo

Foram utilizados meios de cultura que permitiram selecionar cada tipo de microrganismo ao qual se desejava quantificar e isolar:

- **Ágar Nutriente (NA)** – meio de cultura destinado ao crescimento bacteriano, o qual foi acrescido de 50 µg/mL de nistatina e 50 µg/mL de ciclohexamida, como agentes antifúngicos (Labeda, 1990). O meio de cultura também foi acrescido de 2% de manipueira fresca (v/v), com o intuito de permitir o crescimento do microrganismo em ambiente próximo ao qual foi isolado.

- **Extrato de Malte Levedura (YMA)** – destinado ao crescimento de leveduras, em geral. O meio de cultura foi acrescido de 1% de solução de tetraciclina na concentração de 1g/100mL e de 1% de solução de cloranfenicol 1g/100mL, como agente inibitório do crescimento bacteriano, pois bactérias têm a capacidade de quebrar polissacarídeos e outros polímeros que servem como fontes de carbono para as leveduras, podendo assim competir ou impedir o

crescimento das mesmas (Labeda, 1990). Também foi adicionado 2% manipueira fresca (v/v), pelos mesmos motivos já expostos

Ambos os meios, suplementados pela manipueira, foram esterilizados em autoclave à 121°C durante 15 minutos.

O isolamento baseou-se na seleção de colônias visualmente distintas (cor, bordas, brilho, viscosidade, tamanho) através de técnica de semeadura em superfície e esgotamento do inóculo em placas de petri com meio à base de ágar (Pelczar, 1980). As placas foram incubadas à 28°C por um período variável entre 24 horas e 7 dias, de modo à garantir o isolamento de leveduras de crescimento tardio.

6.6 Preservação das linhagens

Após o crescimento microbiano, as culturas foram verificadas quanto à sua pureza em lâminas preparadas pelo método de Gram (Pelczar, 1980). As linhagens puras foram transferidas, através de repique, para “slants” (tubos de ágar inclinado), os quais, após o crescimento microbiano, foram preservados sob refrigeração à 4°C (Muro & Luchi, 1989).

6.7 Ensaios em meio mínimo

Os ensaios foram realizados com o intuito de avaliar a atividade dos microrganismos isolados, frente à condição do metabolismo de linamarina como única fonte de carbono e energia.

6.7.1 Avaliação do metabolismo microbiano de linamarina'' in vitro''

Em virtude de dificuldades encontradas na obtenção de linamarina, no que se refere à sua extração e purificação, optou-se pela avaliação das culturas que apresentassem maior aumento de sua biomassa quando cultivados “*in vitro*”. As linhagens foram analisadas quanto à capacidade de crescimento em meio mínimo, onde a linamarina constituiu única fonte de carbono e energia. Os microrganismos foram inoculados como suspensões na concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml (unidades formadoras de colônias por ml), segundo escala de Mac Farland proposta por Lennette, et al. (1985), de acordo com metodologia proposta por Labeda (1990). Foram utilizados erlenmeyers de 100ml contendo 40 mL de meio mineral líquido estéril pobre em nutrientes (MM), acrescido de 1% de linamarina em solução (1mg/ml). A linamarina foi estabelecida à diluição de 1%, em virtude da escassez, em quantidade e demanda do cianoglicosídeo extraído pelos pesquisadores do CPQBA - Unicamp e ainda, por constituir concentração passível de ser detectada por HPLC (cromatografia líquida de alta precisão), mesmo após a atividade metabólica microbiana sobre o composto. A formulação do MM foi elaborada segundo descrito por Roberts (1995): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (3g) + KH_2PO_4 (2g) + K_2HPO_4 (2g) + $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5g) + H_2O (1000 ml).

Os erlenmeyers inoculados foram incubados em shaker rotacional à 28°C / 200rpm durante 7 dias. Alíquotas de 750µl do MM foram avaliadas, diariamente, por espectrofotometria, onde através de variações dos valores de absorbância em comprimento de onda de 605nm, foram verificados os aumentos de biomassa, em base úmida, das culturas inoculadas (Legras, 1990, Hidayat, 2000). O período de 7 dias de incubação foi estabelecido em ensaios preliminares para a verificação do período de tempo necessário à multiplicação

celular microbiana e níveis quanto ao metabolismo de linamarina (Pantaroto et al., 2000). Sendo a linamarina a única fonte de carbono e energia do MM, o crescimento microbiano pode ser limitado pela escassez de nutrientes ou pelo não metabolismo do cianoglicosídeo. Quando foi observada tendência à queda ou estabilização do crescimento microbiano, fez-se adição de 0,2% de glicose como forma de comprovar a reação do microrganismo, ou a intolerância da linhagem ao consumo de linamarina como fonte de nutrientes (Damasceno, 1999; Machado et al., 1999; Entcheva, 2001).

Simultaneamente à verificação do crescimento microbiano em MM, foi realizada a quantificação do consumo de linamarina pelo microrganismo através do emprego de HPLC, segundo metodologia proposta por Korpraditskul (1993), utilizando-se HPLC em cromatógrafo "Varian Pro Star", acoplado à Auto Sampler "Varian Model 410" e detector de índice de refração "Varian Pro Star Model 350", coluna BIO-RAD HPX-42A (300 x 7,8 mm) tendo-se água destilada filtrada como eluente, na vazão de 0,6 ml/ minuto, e forno à 80°C, onde solução de linamarina "Sigma" (1mg/ml) foi utilizada como padrão de pureza e soluções de linamarina "CPQBA" (1mg/ml), como índice comparativo para avaliação da degradação do cianoglicosídeo pelo inóculo em meio mineral mínimo (MM).

Diariamente alíquotas de 1ml de MM inoculado pelos microrganismos avaliados, foram filtradas através de filtro holder contido de membrana "millipore" 0,22µm e acondicionadas em "vials". As alíquotas foram injetadas e analisadas à um fluxo de 0,6ml / min, à 80°C, por 35 minutos. O tempo de retenção de 35 minutos foi estabelecido por cromatogramas resultantes da injeção de padrões de linamarina "Sigma" e CPQBA. Após a obtenção dos cromatogramas, estes foram comparados com apresentados pelos padrões, obtendo-se os teores iniciais e finais de linamarina, avaliando a metabolização do composto

pelos microrganismos. As equações 4, 5 e 6 demonstram os cálculos realizados para a determinação da taxa de consumo microbiano de linamarina.

Equação 4: % de linamarina no MM = (área MMi x tp padrão) / (área do padrão)

Equação 5: quantia de linamarina (mg/ml) = (% de linamarina no MM x quantia (mg) de linamarina no extrato) / 100

Equação 6: % de linamarina remanescente = (% de linamarina no MMf x 100) / (% linamarina MMi)

onde:

MMi = porcentagem (%) de linamarina no meio mínimo imediatamente após a inoculação do microrganismo e adição de 1% linamarina.

MMf = porcentagem (%) de linamarina no meio mínimo após 7 dias da inoculação do microrganismo e adição de 1% linamarina.

tp padrão = teor de pureza (%) da solução padrão de linamarina empregada no ensaio.

A Figura 6.4, ilustra de forma sintetizada o procedimento utilizado para o preparo das amostras para análise em HPLC.

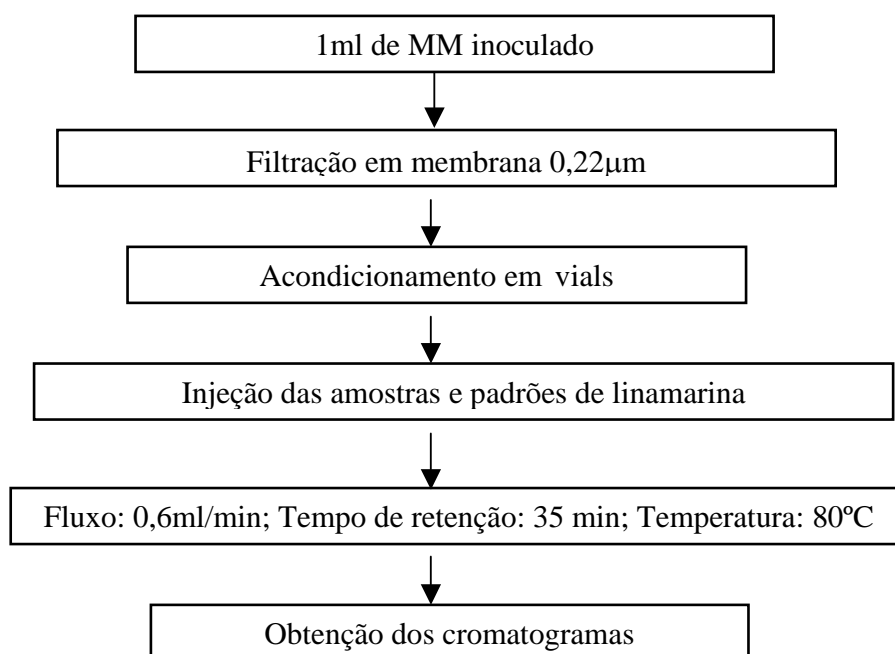


Figura 6.4: Procedimento empregado para análise de linamarina por HPLC.

A Figura 6.5 ilustra de forma esquemática e resumida as etapas desde a coleta das linhagens, às análises quanto ao potencial dos mesmos à destoxificação de linamarina "*in vitro*".

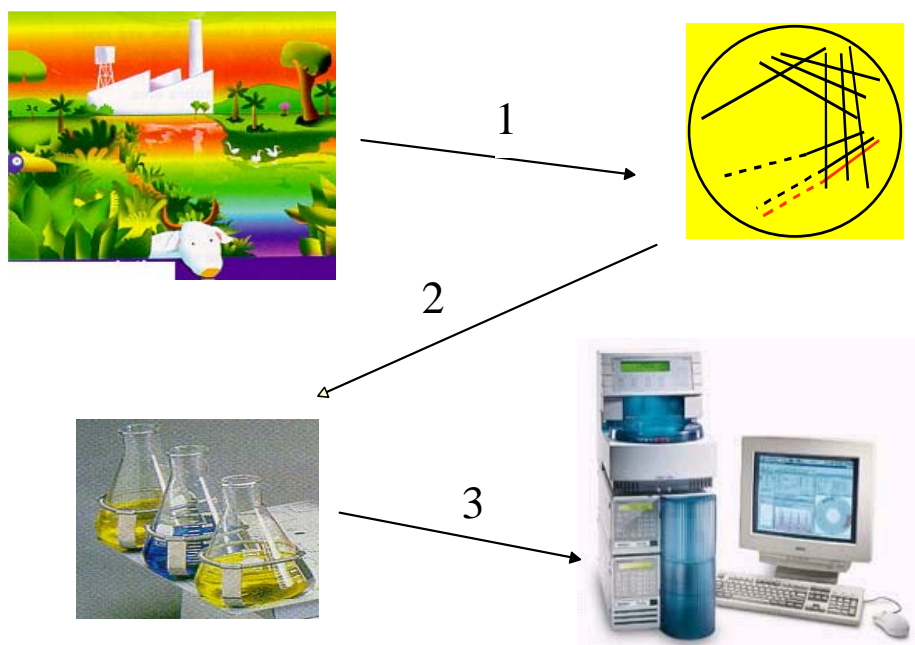


Figura 6.5: Esquema ilustrativo das etapas realizadas desde a coleta das amostras, às análises quanto ao desempenho microbiano em linamarina exógena.

6.7.2 Identificação taxonômica de bactérias e leveduras selecionadas quanto à atividade metabólica em meio mínimo

• Bactérias

O uso da técnica de PCR (Reação de Polimerase em Cadeia) oferece vantagens em relação aos métodos tradicionais de identificação, pois constitui-se como uma técnica rápida e versátil, possibilitando que um grande número de isolados possa ser caracterizado em curto espaço de tempo (Yano & Valarini, 1998).

A partir dos ácidos nucléicos extraídos das culturas microbianas segundo metodologias descritas por Pitcher et al. (1989), foram realizadas ampliações por PCR (Reação de Polimerase em Cadeia) de seqüências correspondentes a regiões específicas do gene que codifica para rRNA 16S onde utilizou-se *primers* específicos para Bacteria

(Heuer et al., 1997) os quais produzem fragmentos de aproximadamente 1.5 Kb. Para identificação taxonômica dos organismos a partir do rDNA 16S, os fragmentos resultantes da amplificação foram purificados e esse material seguiu, então, ao sequenciamento utilizando-se *primers* internos ao gene (Stackebrandt et al., 1992). Para o sequenciamento utilizou-se um sequenciador ALFExpress (Pharmacia)².

As seqüências de nucleotídeos foram comparadas com seqüências depositadas em bancos de dados de rDNA 16S. Os genes rRNA 16S sequenciados foram alinhados, utilizando o programa ClustalW, com seqüências relacionadas obtidas a partir do GenBank e RDP (Ribosomal Database Project) para a verificação de divergências moleculares. A inferência filogenética foi realizada através dos métodos de parsimônia e *maximum likelihood*, conforme recomendado por T. M. Embley (comunicação pessoal, 1997) e demonstrado em filogramas construídos a partir destas análises. As novas seqüências obtidas serão oportunamente depositadas no GenBank.

• *Leveduras*

A metodologia empregada, descrita por Kurtzman & Fell (1998), Kreger van Rij (1984) e Barnett *et al.* (1983 e 1990), foi baseada na análise comparativa de caracteres morfológicos (morfologia de colônia e de célula), fisiológicos e bioquímicos da linhagem pura com a descrição padrão da espécie encontrada na literatura de referência.

² O equipamento e instalações foram disponibilizados pelo Dr. Gilson Paulo Manfio, Fundação André Tosello – Campinas/SP.

6.8 Ensaio em manipueira como meio de cultura

Os ensaios tiveram por objetivo verificar se a capacidade do microrganismo se mantinha após cultivado em condições de laboratório, quando inoculado em manipueira em concentrações variáveis. Selecionou-se o microrganismo que apresentou maior taxa de consumo de linamarina "*in vitro*". As avaliações consistiram na análise da habilidade microbiana ao crescimento, competindo com a microflora indígena da manipueira, adaptando-se às condições físico-químicas do meio e metabolizando a linamarina autóctone ou cianeto (livre ou complexado).

6.8.1 Efeito da concentração de inóculo, com concentração de manipueira fixa (50%)

A concentração celular é importante, pois retratará a atividade ótima microbiana no que diz respeito ao crescimento microbiano, estabilização do pH do substrato (manipueira), redução de sua carga orgânica e metabolismo de cianoglicosídeos (Karpouzas et al., 2000). Os efeitos da variação da densidade celular do microrganismo foram avaliados utilizando como substrato a manipueira, à concentração de 50%, a qual equivale aproximadamente a de feculárias. Foram avaliadas as diluições 10^6 e 10^8 UFC/mL do microrganismo, segundo escala de Mac Farland, proposta por Lenette (1985) e ensaios prévios realizados por Pantaroto et al. (2000).

Estas densidades celulares do microrganismo foram estabelecidas de modo à avaliar a atividade microbiana. O ensaio foi acompanhado por análises do crescimento microbiano, variações físico-químicas e teor cianogênico.

As amostras de manipueira empregadas como substrato não foram submetidas a qualquer tratamento de esterilização, contendo sua flora microbiana indígena.

6.8.2 Efeito da concentração de manipueira, com concentração de inóculo fixa (10^8)

Foram estabelecidas 4 concentrações de manipueira: 25%, 50%, 75% e 100%, de modo a simular condições naturais do resíduo líquido diluído, como no caso de feculárias, ou não diluído, como em farinheiras. A cepa foi inoculada na forma de suspensão $1,5 \times 10^8$, segundo escala de Mac Farland proposta por Lennette et al. (1985), na proporção de 1mL de inóculo para 40 mL de manipueira ($3,7 \times 10^6$ UFC/mL), em suas respectivas diluições, em erlenmeyers de 100mL esterilizados (Metodologia adaptada de Roberts, 1995). A manipueira também foi utilizada sem qualquer processo de esterilização, preservando sua microflora natural. As amostras de manipueira foram avaliadas em triplicata. Uma amostra foi mantida como controle, a qual consistiu em erlenmeyers de 100 mL, em triplicata, esterilizados, contendo 40 mL de manipueira 100%, não estéril, isenta do inóculo, portanto constando apenas a população microbiana natural do efluente. As análises de acompanhamento foram realizadas segundo metodologias descritas no item 6.7.3.

6.8.3 Análises de acompanhamento

A verificação do crescimento microbiano, consumo do teor cianogênico do meio e modificações físico-químicas da manipueira advindas da inoculação do microrganismo, foi realizada, segundo adaptação de metodologia descrita por Karpouzas et al. (2000). O Quadro 6.4 apresenta as avaliações realizadas e sua periodicidade.

Quadro 6.4: Análises de acompanhamento das amostras de manipueira em diferentes concentrações.

<i>Análises realizadas</i>	<i>Periodicidade</i>
Contagem total	0 e 6 dias
Espectrofotometria	Diariamente
pH	Diariamente
Teor de HCN total e livre	0 e 6 dias
TOC (Teor de Carbono Orgânico Total)	0 e 6 dias

Foram utilizadas as seguintes metodologias para a realização das análises:

- **Contagem Total:** diluição seriada, segundo Labeda (1990). O plaqueamento foi realizado nas diluições 10^{-4} e 10^{-5} em Nutriente Agar acrescido de 2% de manipueira, onde as placas permaneceram incubadas à 28°C por 48 horas.
- **Espectrofotometria:** a verificação do crescimento microbiano foi realizada diariamente através da variação dos valores de absorbância, à 605nm, segundo metodologia proposta por Legras (1990) e Hidayat (2000). Quando verificada tendência à queda do crescimento microbiano, as amostras, incluindo a controle, foram suplementadas por 0,2% de glicose (Damasceno, 1999; Machado et al., 1999; Entcheva et al, 2001).
- **pH:** foi verificado através de fita indicadora de pH, segundo recomendações do fabricante, marca "Carlo Erba".
- **Teores de HCN Total e Livre:** segundo metodologia proposta por Essers (1993), a qual consiste em reações colorimétricas, empregando solução de ácido 1,3 dimetil barbitúrico e ácido isonicotínico, como agente revelador e determinante dos teores de HCN total (CN Livre e CN complexado) e HCN livre.

- **TOC (Teor de Carbono Orgânico Total):** foi verificado através do uso do equipamento TOC 5000A - Total Organic Carbon Analyser SHIMADZU, sob as seguintes condições: Fluxo da amostra de 250 μ L; Temperatura de 682°C; Gás de arraste da amostra: Ar Sintético "AGA".

6.8 Delineamento estatístico experimental

Os resultados foram analisados utilizando-se método estatístico descritivo dos dados obtidos, através da exposição dos mesmos por gráficos ilustrativos. Quando viável, foi empregada análise de regressão sobre os resultados, como forma comprobatória da reprodutibilidade dos mesmos.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 Caracterização de manipueira (fresca)

A manipueira utilizada como meio de cultura, e como complemento aos meios sintéticos utilizados no isolamento dos microrganismos, foi obtida da Farinheira Plaza, em Santa Maria da Serra, SP. Este substrato foi caracterizado quanto às suas características físico-químicas e teores de macro e micronutrientes. O Quadro 7.1, apresenta estas características.

Quadro 7.1: Caracterização físico-química da manipueira fresca, coletada na Farinheira Plaza, em Santa Maria da Serra, SP.

Componentes	Resultados
	(mg/L)
Cianeto (Acetona cianidrina)	262,41
Cianeto livre	44,34
	Base Seca (mg/Kg)
Zinco	263,00
Manganês	45,00
Cobre	10,00
Ferro	68,00
Sódio	2.750,00
Cálcio	3.800,00
Magnésio	5.000,00
Enxofre	1.000,00
Fósforo	7.500,00
Potássio	4.000,00
Umidade (110°C)	92,00
	Base Seca (%)
Matéria Orgânica (550°C)	6,50
Carbono Total	3,50
Amido	76,83
Açúcar redutor total	4,60
Matéria graxa	0,99
Proteína	10,27
Fibras	3,58
N total	2,63
pH	4,39
Acidez	8,40

Comparando-se as características da manipueira utilizada como substrato no presente estudo, às apresentadas pelo Quadro 5.1, o qual apresenta a caracterização das amostras de manipueira descritas por Cereda (1994) e Barana (1996),

observa-se que a amostra caracterizada apresenta semelhanças quanto ao pH e teores de cianeto, onde quanto aos demais componentes não se obteve correlação pelo fato de que os dados descritos pelos autores citados, não se encontram disponibilizados nas mesmas unidades apresentadas pelo Quadro 7.1, onde os mesmos foram calculados em base seca. Torna-se importante ressaltar sobre o teor de açúcares presentes no substrato, 46 g/L, que vem à constituir fonte de energia e carbono à microbiota indígena do mesmo, estando em acordo com dados relatados por Cereda (2001).

7.2 Isolamento de microrganismos

As coletas possibilitaram o isolamento de 118 culturas microbianas, as quais foram caracterizadas morfológicamente pelo método de Gram (Pelczar, 1980), onde 66 apresentaram-se como morfotipos de bactérias e 52 como leveduras. Leveduras têm sido descritas em grande variedade no solo, como um grande manancial de compostos que servirão como fontes de carbono e nitrogênio ao desenvolvimento microbiano, incluindo fungos, actinomicetos e numerosas espécies de bactérias (di Menna, 1962).

Segundo Labeda (1990), as bactérias apresentam-se em maior proporção no solo, se comparadas às leveduras, atuando com efeito inibitório sobre as mesmas, competindo pelos nutrientes presentes. Sendo assim, o fato de ter-se obtido maior número de isolados bacterianos justifica-se pelo fato de que foram realizadas coletas de amostras de efluentes líquidos de indústrias de processamento de mandioca, mas também de amostras de solos adjacentes aos locais de descarte destes resíduos, os quais tendem a possuir uma população bacteriana sobressaindo-se às leveduras presentes.

7.3 Ensaio em meio mínimo

São apresentados os resultados quanto ao desempenho de microrganismos isolados de amostras de manipueira diluída ou não, e de solos adjacentes à áreas de descarte deste material, frente à condição de linamarina como única fonte de carbono e energia.

7.3.1 Avaliação, seleção e identificação das linhagens

A partir dos 118 microrganismos isolados, 31 culturas foram selecionadas, em virtude da quantidade restrita de linamarina aos ensaios, onde o baixo rendimento quanto à sua extração a partir de raízes de mandioca, determinou fator limitante à avaliação das demais cepas.

As linhagens foram avaliadas quanto à capacidade de crescimento em presença de linamarina exógena, como única fonte de carbono e energia. Dentre as 31 culturas analisadas, 26 constituíam-se como morfotipos bacterianos e 5 leveduras, onde 8 microrganismos foram selecionados como hábeis ao crescimento em linamarina, metabolizando-a, e 23 linhagens não se adaptaram às condições restritas do meio mínimo, aeração e escassez de nutrientes, não se desenvolvendo como colônias.

O fato dos microrganismos terem sido isolados de locais sujeitos à contínuos descartes dos efluentes em estudo, manipueira e água residual de fecularia, deveria predispor à habilidade de sobrevivência em presença de linamarina. Ainda assim somente 8 culturas demonstraram capacidade ao metabolismo de linamarina como fonte de carbono e energia para o seu crescimento. Tratando-se das rotas metabólicas utilizadas pelos microrganismos, sendo linhagens aeróbias, pressupõe-se o consumo do cianoglicosídeo

através da cadeia respiratória normal, por atuação de enzimas, tais como rodanase (Knowles, 1976), linamarase (Petruccioli, 1999).

As 8 culturas microbianas selecionadas constituíram-se de 7 linhagens bacterianas, designadas aleatoriamente pelas siglas, B1, B2, B3, B4, B5, B6, e B7 e 1 levedura, denominada como L1.

O Quadro 7.2 apresenta os resultados quanto as taxas de degradação de linamarina demonstradas pelas bactérias (B1 à B7) e a levedura (L1) sobreviventes.

Quadro 7.2: Microrganismos sobreviventes e suas respectivas taxas de degradação de linamarina., expressas em porcentagem (%) do total adicionado ao meio.

<i>Microrganismos selecionados</i>	<i>Taxas de degradação de linamarina "in vitro" (%)</i>
B1	85,7
B2	91,7
B3	71,1
B4	68,9
B5	66,7
B6	89,2
B7	95,2
L1	95,2

A partir dos resultados descritos pelo Quadro 7.2, constata-se o poder de consumo do cianoglicosídeo pelas culturas, onde a bactéria B7 e a levedura L1, se diferenciaram das demais, por terem apresentado os maiores índices de consumo de linamarina no meio de cultura. As 8 linhagens apresentaram taxas de degradação de linamarina acima de 50%, se comparadas aos teores iniciais do composto no meio, na avaliação por HPLC.

O quadro 7.3 apresenta as 8 culturas microbianas selecionadas como hábeis à metabolização de linamarina *"in vitro"*, apresentando espécies bacterianas caracterizadas por técnicas filogenéticas e um morfotipo de levedura, identificado por taxonomia convencional, descrevendo suas respectivas características morfológicas e fontes de isolamento.

Quadro 7.3: Linhagens selecionadas e suas respectivas características morfológicas, locais de origem e identificação.

<i>Linhagem</i>	<i>Identificação</i>	<i>Forma</i>	<i>Gram</i>	<i>Procedência</i>
B1	<i>Serratia marcescens</i> (Bizio 1823)	Coco-bacilos	-	Fecularia Halotech Fadel
B2	<i>Serratia marcescens</i> (Bizio 1823)	Coco-bacilos	-	Fecularia Halotech Fadel
B3	<i>Bacillus anthracis</i> (Cohn 1872), <i>Bacillus cereus</i> (Frankland 1887), <i>Bacillus thuringiensis</i> (Berliner 1915)	Bastonetes	+	Farinheira Plaza
B4	<i>Serratia marcescens</i> (Bizio 1823)	Coco-bacilos	-	Fecularia Halotech Fadel
B5	α -proteobactéria (Stubner 1998)	Bastonetes	+	Fecularia Halotech Fadel
B6	<i>Bacillus subtilis</i> (Cohn 1872) <i>Bacillus pumilus</i> (Meyer & Gottheil 1901)	Bastonetes	+	Farinheira Plaza
B7	<i>Acinetobacter johnsonii</i> (Bouvet & Grimont 1906)	Bastonetes	-	Farinheira Plaza
L1	<i>Rhodotorulla glutinis</i> (Fresenius) F. C. Harison var. <i>glutinis</i> (1958))	Cocos-ovais	+	Fecularia Halotech Fadel

As citações entre parênteses, correspondem às citações proporcionadas através do Genbank, durante à análise do sequenciamento do rDNA 16S.

Com o advento da engenharia genética, tornou-se fundamental o investimento em métodos de extração de DNA em diferentes tipos de organismos, viabilizando técnicas de caracterização, identificação e análise de variações gênicas, bem como em estudos populacionais e ecológicos.

Vários são os métodos descritos para a extração de DNA genômico de bactérias, existindo variações no que se refere à bactérias gram-positivas e gram-negativas (Valadares-Inglis & Melo, 1998).

O uso da técnica de PCR oferece vantagens quando comparada aos métodos tradicionais de identificação de microrganismos, pois é rápida e versátil, possibilitando que um grande número de isolados possa ser caracterizado em curto espaço de tempo (Yamaoka-yano & Valarini, 1998).

Com as informações proporcionadas pela identificação filogenética das bactérias, constatou-se que as linhagens B1, B2 e B4, eram da mesma espécie, embora apresentassem resultados distintos quanto ao metabolismo de linamarina exógena, como descrito pelo quadro 7.2.

A sequência parcial do gene rDNA 16S, não distingue espécies pertencentes ao gênero *Bacillus* segundo Manfio G. P. (comunicação pessoal, 2000), o que justifica as linhagens B3 e B6 não terem sido identificadas quanto à similaridade à uma espécie única do gênero.

A linhagem bacteriana B7, apresentou 96% de similaridade à linhagens "tipo", ou seja cepas da mesma espécie autenticadas por coleções de culturas, descritas como *Acinetobacter johnsonii*. Davidson (1999) através de estudos filogenéticos sobre bactérias

presentes no ambiente, detectou as espécies do gênero *Acinetobacter* sp como sendo bactérias indígenas, cujo habitat natural é o solo

A sequência parcial do DNAr 16S da bactéria B5, apresentou entre 97 e 98% de similaridade com sequências de DNAr 16S de isolados de proteobactérias da subdivisão alfa (α) ainda não identificados. Apresentou também entre 94 e 96% de similaridade com sequências de DNAr 16S de linhagens de *Ancylobacter aquaticus*, *Methylorhabdus multivorans* e *Starkeya novella*. Através de árvore filogenética constatou-se que a cultura é praticamente idêntica, em nível de DNAr 16S, à α -Proteobactéria isolado TA12-21. Esta bactéria foi isolada de solo de cultivo de arroz e é capaz de oxidar tiosulfato (citação da base de dados Genbank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>; Stubner *et al.*, 1998). Sendo assim, a bactéria B5 pode representar uma espécie nova ainda não descrita na literatura, dentro da subdivisão α de Proteobacteria, cuja espécie mais proximamente relacionada é *Ancylobacter aquaticus* (Orskov 1928) Raj 1983.

A levedura selecionada, a *Rhodotorula glutinis* var. *glutinis*, tem ampla distribuição na natureza, tendo sido isolada em grande variedade de substratos sendo, provavelmente, a espécie predominante no gênero. Esta variedade é muito próxima à espécie *Rhodotorula graminis* segundo di Menna (1958). A linhagem, foi identificada através de taxonomia clássica de identificação de leveduras, onde apresentou resultados positivos para os testes de DBB e uréia. Trata-se de um heterobasidiomiceto. Como não apresentou basidiosporos, teliosporos ou basídio, pôde-se classificá-la como um anamorfo de basidiomiceto. Os resultados negativos para os testes de assimilação de inositol, produção de

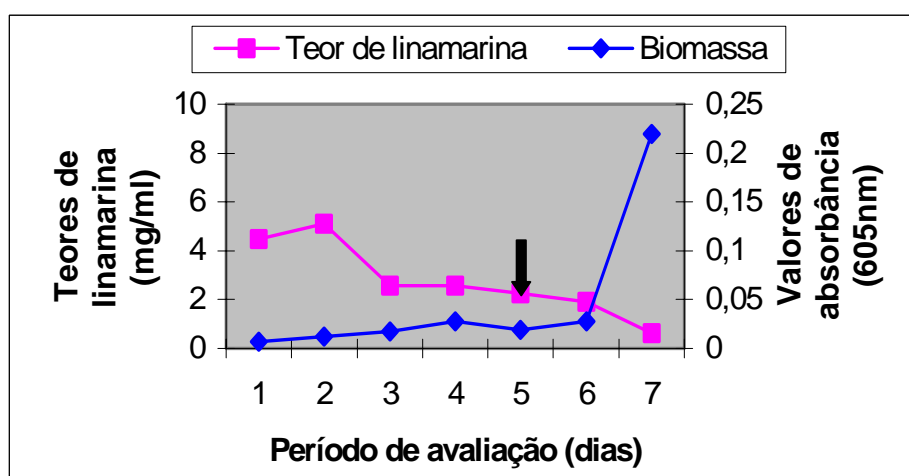
compostos amilóides extracelulares, fermentação da glicose, balistosporos e a presença de pigmentos carotenóides permitiram enquadrá-la no gênero *Rhodotorula*.

Os demais testes bioquímicos e fisiológicos permitiram identificá-la como *Rhodotorula glutinis* (Fresenius) F.C. Harrison var. *glutinis* (1958). A forte assimilação de nitrato de potássio definiu a escolha da variedade. A levedura L1 diferiu da descrição padrão desta espécie, encontrada em Kurtzman e Fell (1998), na assimilação de melezitose e salicina.

- *Quantificação do metabolismo de linamarina exógena das linhagens de Serratia marcescens*

Dentre as linhagens selecionadas, as bactérias denominadas como B1, B2 e B4, foram caracterizadas através de análises filogenéticas, como sendo da mesma espécie, *Serratia marcescens*. Observando as taxas (%) referentes ao metabolismo de linamarina exógena, apresentadas pelo Quadro 7.2, verifica-se que mesmo se tratando de linhagens de mesma espécie, as mesmas apresentaram níveis distintos de degradação do cianoglicosídeo no meio.

A Figura 7.1 ilustra a variação da biomassa microbiana relacionada ao metabolismo de linamarina exógena, apresentados pela bactéria **B1**.

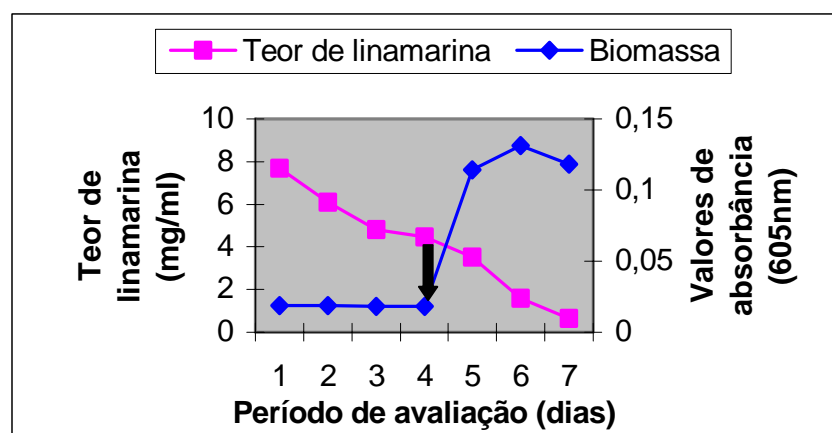


Legenda: A seta indica o período em que houve suplementação por glicose 0,2%.

Figura 7.1: Variação da biomassa microbiana e metabolismo de linamarina apresentados pela bactéria **B1**.

A linhagem de *Serratia marcescens* B1, apresentou aumento celular até 4 dias da incubação. Após este período apresentou tendência ao declínio, mas o crescimento microbiano foi retomado pela adição de solução de glicose 0,2% ao meio de cultura, demonstrando que a tendência à queda do crescimento foi devida provavelmente à escassez do substrato, e não a inibição do mesmo. Observa-se ainda, que o microrganismo avaliado se encontrava viável, mantendo sua capacidade de multiplicação e sua capacidade à metabolização de linamarina. Esta afirmação se complementa através do perfil demonstrado pela Figura 7.1, a qual apresenta a gradativa e constante degradação de linamarina pelo microrganismo, e aceleração do crescimento no 6º dia, concomitantemente ao consumo de linamarina.

A Figura 7.2 apresenta a variação da biomassa microbiana relacionada ao metabolismo de linamarina exógena, apresentados pela bactéria **B2** (*Serratia marcescens*).



Legenda: A seta indica o períodos em que houve suplementação por glicose 0,2%.

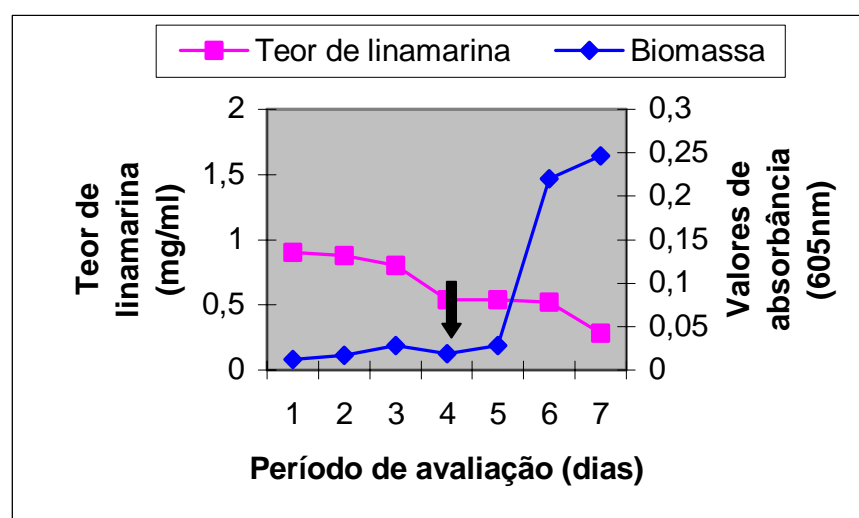
Figura 7.2: Variação da biomassa microbiana e metabolismo de linamarina, apresentados pela bactéria **B2**.

A adição de um inóculo a um novo meio de cultura comumente não é seguida pela duplicação da população de acordo com o tempo de geração. Assim, a população tende a permanecer estável, mas isto não significa que as células estejam em repouso ou latentes, mas é durante este período que as mesmas estão em adaptação. Os microrganismos no novo meio, podem se encontrar deficientes em mecanismos enzimáticos ou coenzimáticos, os quais deverão ser retomados e readaptados para que haja o ótimo funcionamento do metabolismo celular. Os ajustes relativos ao ambiente físico ao redor da célula podem exigir tempo, o qual constitui a fase lag do crescimento microbiano (Pelczar, 1980).

Na Figura 7.2, é possível constatar que a *Serratia marcescens* apresentou fase lag extensa, se comparada à B1, uma vez que se manteve em período de adaptação às condições restritas do meio, durante 4 dias, após o que apresentou crescimento exponencial. Tendência ao declínio foi observada quando o cianoglicosídeo estava próximo de ser exaurido do meio pelo microrganismo, a partir do 3º dia, onde a adição de glicose 0,2% ,

ao 4º dia, reativou o crescimento microbiano, ocorrendo a metabolização de 85,7% do conteúdo de linamarina adicionado.

A Figura 7.3 apresenta a variação da biomassa microbiana relacionada ao metabolismo de linamarina exógena, apresentados pela bactéria **B4** (*Serratia marcescens*).



Legenda: A seta indica o período em que houve suplementação por glicose 0,2%.

Figura 7.3: Variação da biomassa microbiana e metabolismo de linamarina, apresentados pela bactéria **B4**.

A *Serratia marcescens* (B4), demonstrou inicialmente crescimento exponencial, com tendência ao declínio após o período de 72 horas de incubação. A adição de 0,2% de glicose fez com que fosse retomada a multiplicação das células microbianas, paralelamente à diminuição do teor de linamarina no meio. A tendência ao declínio do crescimento microbiano demonstrou-se, tanto com relação à bactéria B4, quanto à bactéria B1, como uma resposta dos microrganismos ao consumo de linamarina como substrato no meio, onde pôde-se verificar a capacidade das linhagens à adaptarem-se à condição da necessidade de degradação do cianoglicosídeo para a obtenção de nutrientes vitais ao seu desenvolvimento.

A linhagem B4 apresentou 68,9% como índice de degradação de linamarina presente inicialmente no MM. As linhagens B1, B2 e B4, são da mesma espécie, *Serratia marcescens*, mas comparados os resultados quanto às taxas de linamarina "in vitro" metabolizada, constatou-se índices distintos, onde a linhagem B4, dentre as demais, apresentou menor eficiência.

A *Serratia marcescens*, é uma bactéria gram-negativa onde, cultivada em meio de cultura apropriado a seus requerimentos nutricionais, apresenta colônias de coloração vermelha (Kim & Kwon, 1999). Em contrapartida, quando em condições de estresse fisiológico a bactéria, assim como os demais microrganismos, pode perder algumas características inerentes à sua natureza, como a perda da cor da colônia. A bactéria B4, após isolada do seu habitat natural e cultivada "in vitro", apresentou o crescimento de colônias de tonalidade entre amarelo e creme, perdendo característica natural à linhagem, a coloração vermelha.

O isolado B4, *Serratia marcescens*, apresentou adaptação rápida ao metabolismo de linamarina "in vitro", mas a ausência de características naturais (cor) à sua composição celular, pode ter influenciado em sua atividade sobre o cianoglicosídeo, no que se refere ao metabolismo do composto como fontes de carbono e energia.

O isolamento de *Serratia marcescens* à partir de locais designados ao tratamento de lodos industriais foi relatado por Kim & Kwon (1999). Os mesmos autores descreveram a utilização da linhagem como biosensor microbiano em mecanismos para verificação de DBO (demanda bioquímica de oxigênio), partindo de resultados de análises preliminares onde a bactéria mostrou-se tolerante à zinco e metais pesados. Frederick & Lloyd

(1996), relataram o emprego de *Serratia marcescens* em sistemas de estabilização de resíduos diversos, em virtude de sua tolerância a pHs extremos.

• **Quantificação do metabolismo de linamarina exógena das linhagens do gênero *Bacillus* (B3 e B6)**

A bactéria B3, após caracterização filogenética foi identificada como pertencente ao gênero *Bacillus*, com similaridade de 98% às linhagens tipo, autenticadas por coleção de culturas (ATCC – American Type Culture Collection), *Bacillus anthracis*, *cereus*, *thuringiensis*.

A Figura 7.4 ilustra a variação da biomassa microbiana relacionada ao metabolismo de linamarina exógena, apresentados pelo *Bacillus* **B3**.

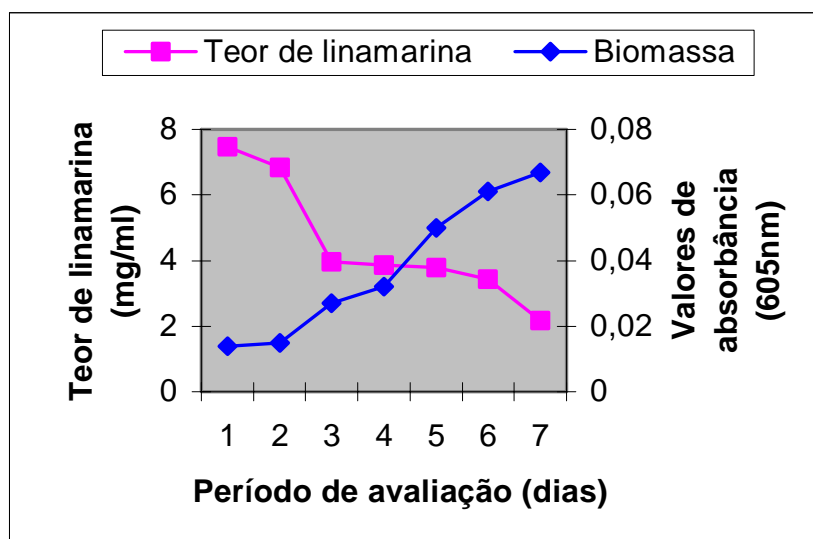


Figura 7.4: Variação da biomassa microbiana e metabolismo de linamarina, apresentados pela bactéria **B3**.

A bactéria B3, do gênero *Bacillus*, apresentou crescimento logarítmico constante desde a sua inoculação. Os perfis das curvas representativas do aumento da

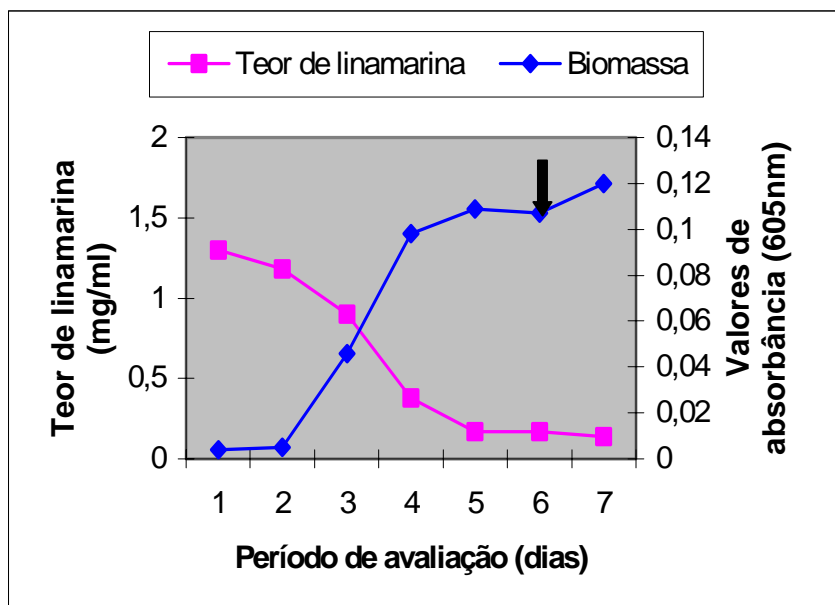
biomassa e teor de linamarina se correlacionam, demonstrando atividade microbiana lenta e gradativa, mas constante, com fase lag curta (2 dias), se comparada à bactéria B2 (*Serratia marcescens*). Em contrapartida, demonstrou menor índice metabólico do cianoglicosídeo, 71,1%, se comparada às linhagens B1 (85,7%) e B2 (91,7%), de *Serratia marcescens*. O *Bacillus* B3, não necessitou de suplementação por glicose, onde provavelmente a linamarina, por si só, foi suficiente à linhagem como fonte de carbono, nitrogênio e energia. Sendo assim, B3 apresentou além da capacidade de destoxificação de linamarina exógena, a habilidade à consumí-la como substrato ao seu desenvolvimento.

O gênero *Bacillus* é composto por espécies presentes com frequência na natureza, principalmente em amostras de solo, tendo sido descritas em trabalhos que relatam o isolamento de microrganismos em áreas de descarte de efluentes.

Tondo et al. (1998) descreveram o microrganismo como hábil à degradar rapidamente o composto organoclorado 4,5,6-tricloroguaiacol (4,5,6-TCG) "*in vitro*". *Bacillus cereus* foi relatado por Mc. Feters et al. (1970) citado por Meyers (1991), como uma linhagem isolada de locais sujeitos à contínuos descartes de efluentes contendo carga cianogênica, onde a linhagem apresentou-se altamente resistente ao cianeto.

A linhagem B6, foi caracterizada filogeneticamente como pertencente ao gênero *Bacillus* sp, onde apresentou entre 95 e 98% de similaridade às linhagens "tipo" de *Bacillus pumillus* e *Bacillus subtilis*, respectivamente.

A Figura 7.5 apresenta a variação da biomassa microbiana relacionada ao metabolismo de linamarina "*in vitro*", apresentados pelo *Bacillus* **B6**.



Legenda: A seta indica o período em que houve suplementação por glicose 0,2%.

Figura 7.5: Variação da biomassa microbiana e metabolismo de linamarina, apresentados pelo *Bacillus B6*.

O *Bacillus B6* metabolizou 89,2 % da conteúdo de linamarina disponível no meio mínimo, demonstrando-se mais eficiente se comparada ao *Bacillus B3*, o qual apresentou 71,1% de degradação do cianoglicosídeo no meio. Após 24 horas de incubação, a linhagem apresentou crescimento exponencial, seguida por fase estacionária e tendência ao declínio entre 5 e 6 dias de incubação. Após a adição de glicose 0,2%, foi retomada a multiplicação celular microbiana, onde o suplemento agiu somente como forma de reativação da atividade microbiana, pois ainda havia substrato, ou seja, linamarina a ser metabolizada no meio.

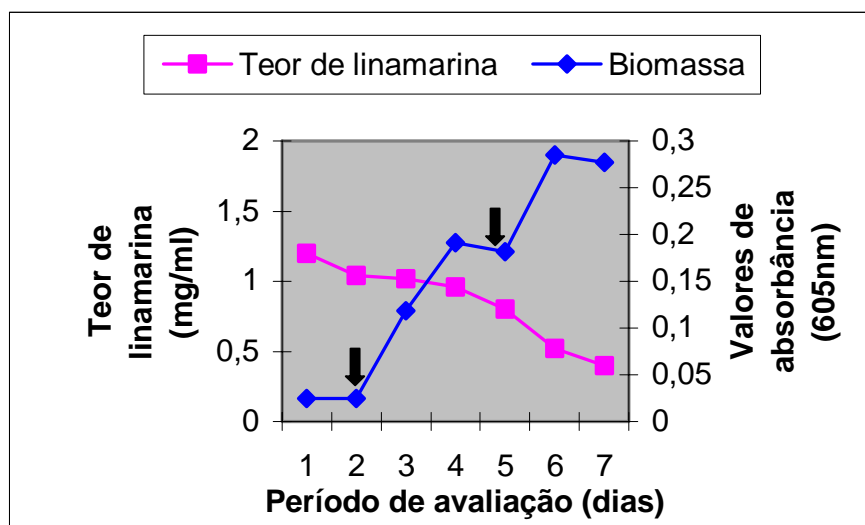
As curvas de crescimento microbiano e degradação de linamarina apresentam similaridade de perfil, onde ao mesmo momento em que o microrganismo apresentou-se em fase de crescimento exponencial, o consumo de linamarina também

alcançou os maiores níveis, reduzindo 73,85% do total do cianoglicosídeo metabolizado pelo microrganismo, 89,2%.

Bactérias pertencentes à espécie, *Bacillus subtilis*, caracterizam-se como bactéria aeróbica, gram-positiva, presentes no solo e capazes de expressar uma variedade de oxidases terminais em sua cadeia respiratória. Dentre este complexo enzimático encontra-se a menaquiol oxidase, uma enzima pertencente ao grupo da citocromo oxidase. (Hill & Peterson, 1998). Sendo assim, supõe-se o *Bacillus* B6, caracterizado, filogeneticamente, como semelhante à espécie descrita, possa ter destoxificado a linamarina presente no meio, consumindo-a como fonte de carbono e energia, pela ação deste complexo enzimático.

• *Quantificação do metabolismo de linamarina exógena da linhagem B5 do grupo Proteobactéria*

A Figura 7.6 ilustra a variação da biomassa microbiana relacionado ao metabolismo de linamarina exógena, apresentados pela bactéria **B5**.



Legenda: As setas indicam os períodos em que houve suplementação por glicose 0,2%.

Figura 7.6: Variação da biomassa microbiana e metabolismo de linamarina, apresentados pela Proteobactéria **B5**.

A Proteobactéria B5 conseguiu metabolizar 66,7% da linamarina do meio, apresentando aumento constante da biomassa, com tendência à queda da concentração celular somente após 5 dias de incubação. Através da Figura 7.6, observa-se que o crescimento microbiano foi retomado após a adição de glicose 0,2%, demonstrando que o microrganismo se mantinha viável ao crescimento, respondendo com produção de biomassa à adição de glicose.

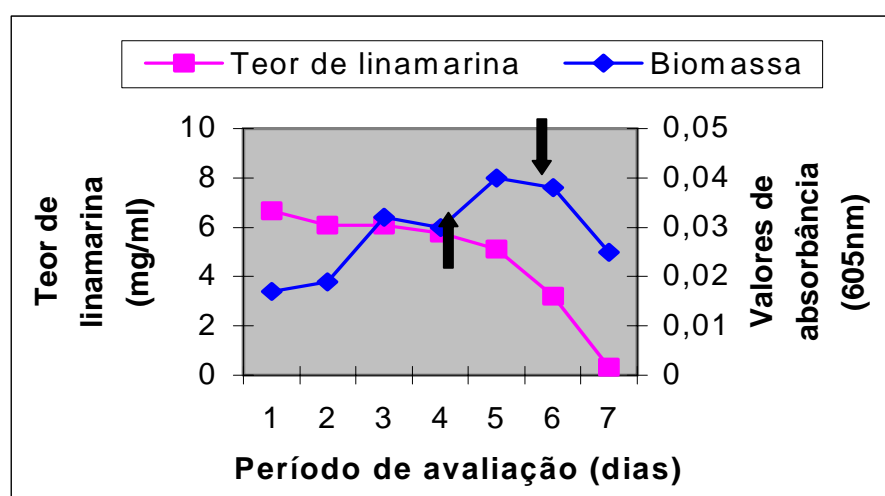
A biosfera é dominada por microrganismos, os quais em sua maioria não foram ainda identificados. Recentes avanços em técnicas de ecologia microbiana molecular, vêm provendo informações sobre a existência de novas espécies, muitas das quais não cultiváveis por métodos laboratoriais.

Blackall et al. (1998), à partir de análises filogenéticas para detecção da diversidade microbiana de lodo ativado proveniente de área industrial, descreveu a microflora dominante no resíduo, a qual era composta de bactérias ainda não identificadas,

pertencentes ao grupo Proteobacteria. A bactéria B5 é uma nova espécie, pertencente ao grupo Proteobacteria, já descrita quanto ao seu isolamento em áreas de depósito de efluentes industriais e ainda como hábil a metabolizar tiosulfato "in vitro" (Stubner et al, 1998). Estudos quanto às suas necessidades e habilidades metabólicas quanto ao consumo de cianoglicosídeos como forma de energia tornam-se necessários à sua projeção como uma linhagem hábil à destoxificação de linamarina.

• **Quantificação do metabolismo de linamarina exógena da *Acinetobacter johnsonii* (B7)**

A Figura 7.7 apresenta a variação da biomassa microbiana relacionada ao metabolismo de linamarina "in vitro", apresentados pela *Acinetobacter johnsonii* B7.



Legenda: As setas indicam os períodos em que houve suplementação por glicose 0,2%.

Figura 7.7: Variação da biomassa microbiana e metabolismo de linamarina, apresentados pela bactéria B7.

A bactéria *Acinetobacter johnsonii* apresentou fase de adaptação ao meio, de aproximadamente 48 horas (2 dias), seguida por crescimento variável, onde o aumento da multiplicação celular se alternou com sua redução, tendo havido a necessidade de

2 suplementações com glicose. Após a primeira suplementação, o microrganismo reagiu demonstrando retomada do crescimento, mas após a 2ª adição de glicose, a linhagem manteve tendência ao declínio da densidade celular. Ainda assim, a bactéria apresentou 95,2% como índice de degradação de linamarina, a maior taxa de consumo dentre as linhagens bacterianas selecionadas.

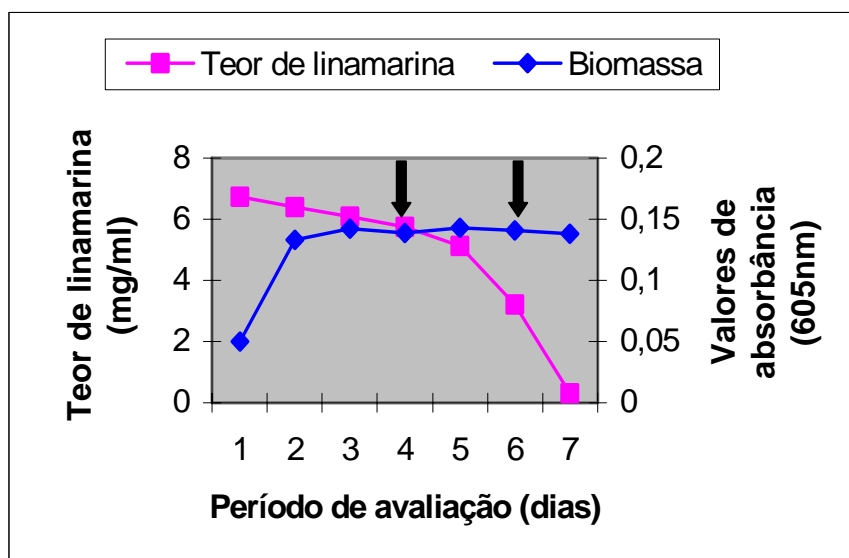
Davidson (1999) através de estudos filogenéticos sobre bactérias presentes no ambiente, detectou as espécies do gênero *Acinetobacter* sp como sendo bactérias indígenas, cujo habitat natural é o solo. Knowles (1988) e Silva-Avalos et al. (1990) afirmaram em seus estudos que as mesmas apresentam-se como bactérias hábeis à utilização de cianetos livres e complexados como única fonte de nitrogênio, demonstrando-se importantes contribuintes à destoxificação destes compostos. Finnegan et al. (1991) reportaram espécies de *Acinetobacter* capazes de degradar altas taxas de cianeto complexado, cianeto livre e nitrilas. Posteriormente, Dubey and Holmes (1995) descreveram o uso da linhagem de *Acinetobacter* RFB1, para a separação de ouro complexado à cianeto.

O potencial de biodegradação de hidrocarbonetos, utilizando microrganismos isolados de solos poluídos por estes compostos tóxicos, vem sendo descrita como prática de grande eficiência, baixo custo e crescente utilização. Dentre outras linhagens selecionadas, uma cultura do gênero *Acinetobacter* apresentou-se como efetiva na assimilação de hidrocarbonetos aromáticos e resinas em óleos. (Chaîneau et al., 1999).

Diante do breve histórico e resultados apresentados através do presente estudo pela linhagem de *Acinetobacter johsonii*, poderá ser útil por sua habilidade à destoxificação de do cianoglicosídeo, linamarina, merecendo maiores estudos quanto ao metabolismo envolvido.

• **Quantificação do metabolismo de linamarina exógena da *Rhodotorulla glutinis* L1**

A Figura 7.8 apresenta o aumento da biomassa microbiana relacionado ao metabolismo de linamarina "in vitro", apresentados pela levedura L1.



Legenda: As setas indicam os períodos em que houve suplementação por glicose 0,2%.

Figura 7.8: Variação da biomassa microbiana e metabolismo de linamarina, apresentados pela *Rhodotorulla glutinis* L1.

A *Rhodotorulla glutinis* L1 apresentou grande adaptação ao meio, com crescimento exponencial da biomassa microbiana entre 24 e 48 horas (1º e 2º dia) de incubação. Após este período, ocorreu o estacionamento do crescimento celular, o qual não foi retomado mesmo com a adição de glicose 0,2%. Em contrapartida, o metabolismo microbiano de linamarina foi mantido, onde a levedura consumiu, 95,2% do cianoglicosídeo presente, apresentando o mesmo índice de consumo da linhagem bacteriana *Acinetobacter johnsonii* B7. Através da Figura 7.8, observa-se ainda que a *Rhodotorulla glutinis* L1, apresentou-se adaptada ao metabolismo de linamarina, onde mesmo após seu consumo, manteve-se estável quanto à sobrevivência no meio.

Comparando-se os resultados obtidos pelas linhagens de *Rhodotorulla glutinis* L1 e *Acinetobacter johnsonii* B7, observa-se que a levedura, mesmo tendo obtido taxa de consumo de linamarina idêntica à apresentada pela bactéria, apresentou-se melhor adaptada ao metabolismo do cianoglicosídeo, uma vez que manteve-se estável durante o período de incubação em meio mínimo (MM), enquanto a bactéria demonstrou fases de crescimento microbiano alternando-se às fases de declínio. Ambas, *Rhodotorulla glutinis* L1 e *Acinetobacter johnsonii* B7, apresentaram mesmo perfil quanto às curvas representativas da diminuição do teor de linamarina no meio.

Realizando estudos sobre a diversidade de leveduras presentes em ambientes aquáticos e arredores dos mesmos, Hagler & Ahearn (1987) citado por Labeda (1990), relataram que leveduras de coloração avermelhada pertencentes ao gênero *Rhodotorula* e *Rhodospiridium* compreendem mais de 50% da população total de leveduras presentes. Diante da predominância do gênero *Rhodotorula* em ambientes aquáticos e solos adjacentes, pode-se inferir a seleção da linhagem de *Rhodotorula glutinis* em amostras de efluentes líquidos do processamento de raízes de mandioca e solos aos arredores de lagoas de decantação destes resíduos, pois trata-se de uma integrante da microbiota indígena presente no meio, estando adaptada às condições do local onde foi isolada, predominando sobre as demais espécies de leveduras presentes, e apresentando potencialidade ao emprego em ação conjunta com culturas que tenham a capacidade de metabolizar 100% de linamarina, aproveitando sua habilidade à adaptação rápida e consumo do cianoglicosídeo.

7.4 Ensaios em manipueira como meio de cultura

Diante da predominância da *Serratia marcescens*, dentre os isolados, a bactéria foi selecionada à avaliação quanto à adaptação à manipueira, principalmente no que se refere ao metabolismo de cianeto livre e complexado, resultante da clivagem espontânea do cianoglicosídeo, linamarina, no substrato. A linhagem B2, foi selecionada, por apresentar, dentre as cepas de *Serratia marcescens*, o maior índice quanto ao metabolismo de linamarina "in vitro", e ainda pela cor vermelha natural às suas colônias quando cultivada em ágar, a qual permitiu sua distinção, frente aos microrganismos indígenas da manipueira.

7.4.1 Efeito da concentração de *Serratia marcescens* B2, em concentração de manipueira fixa (50%)

Estudos sobre fatores influenciadores da atividade microbiana de linhagens descritas como hábeis degradadoras de compostos tóxicos, vem sendo reportados pela literatura.

Karpouzas & Walker (2000) descreveram sobre a habilidade da linhagem de *Pseudomonas putida* ePI na degradação do nematicida "ethoprophos" quando disposto no solo, sob a influência de variações de pH, temperatura e densidade do inóculo. Fatores biológicos tais como a competição com microrganismos indígenas presentes no substrato, antagonismo e predação também foram descritos como fatores intimamente relacionados à sobrevivência e atividade do inóculo. Os mesmos autores após a realização do estudo concluíram que quanto maior a densidade microbiana, melhor sua atividade metabólica quanto à degradação do composto no solo.

O presente ensaio teve como intuito a verificação do comportamento da bactéria *Serratia marcescens* B2, quando inoculada, em manipueira à 50%, sob a forma de suspensão em concentrações variadas: 10^6 e 10^8 . As concentrações das suspensões microbianas foram selecionadas de modo a avaliar o desempenho do inóculo quando em número de células inferior ao já avaliado, 10^8 , no ensaio anterior em meio mínimo e linamarina exógena (Ítem 7.1).

O substrato ao crescimento microbiano, a manipueira, foi fixada na concentração de 50% (50% de manipueira, 50% de água destilada estéril (v/v)). Foram realizadas avaliações quanto ao aumento da biomassa microbiana, variações de pH; teores de carbono orgânico total e teores de HCN livre e total.

• *Contagem total microbiana*

Através de técnicas de diluição seriada, plaqueamento e contagem total de colônias, segundo metodologia descrita por Labeda, 1990, foram obtidos os seguintes valores descritos pelo quadro 7.4, quanto à população microbiana inicial (0 dia) e final (após 6 dias) das amostras de manipueira à 50%.

Quadro 7.4: Contagem total microbiana apresentada pelas amostras analisadas, ao início e término do período de incubação.

<i>Amostras avaliadas</i>	<i>Contagem Total (0 dia)</i>	<i>Contagem Total (6 dias)</i>
	<i>UFC/mL*</i>	
Manipueira 50% + Inóculo (10^6)	10^6	10^8
Manipueira 50% + Inóculo (10^8)	10^7	10^8
Manipueira 50% (controle)	10^6	10^8

* UFC/ml : Unidades Formadoras de Colônias por mL

Observando-se os resultados expostos no quadro 7.10, pôde-se verificar aumento celular no decorrer do período de 6 dias de incubação das amostras, onde após este período todos valores foram de 10^8 UFC/mL, incluindo a controle.

• ***Avaliação da variação da biomassa microbiana por espectrofotometria (turbidez)***

A análise da variação da biomassa microbiana através de valores de absorbância, consiste na avaliação do aumento ou diminuição da turbidez do meio, onde o aumento da absorbância indica aumento da turbidez, que por sua vez pode ser atribuída à elevação da densidade de células microbianas no meio.

A análise da variação diária do conteúdo celular por espectrofotometria corresponde à um método eficiente e preciso, no que se refere à avaliação do crescimento microbiano, necessidades de suplementação do meio e ainda na detecção das fases de desenvolvimento em que o microrganismo se encontra: lag, crescimento exponencial, estacionária ou declínio.

A Figura 7.9 dispõe os perfis de aumento da biomassa microbiana das amostras avaliadas quando correlacionadas.

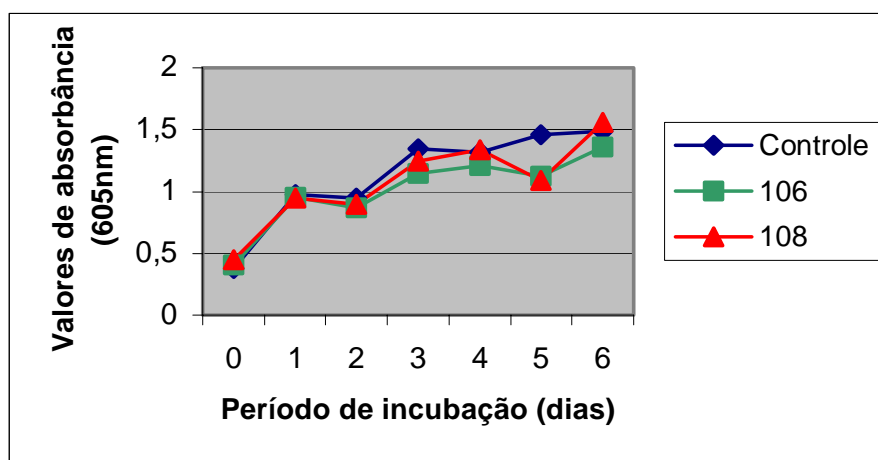


Figura 7.9: Curvas representativas do aumento da biomassa microbiana das amostras avaliadas, apresentadas pela variação dos valores de absorbância (turbidez).

Comparando-se os valores de absorbância obtidos no comprimento de onda de 605nm, observa-se que as amostras de manipueira inoculadas por *Serratia marcescens* e a amostra controle, isenta de inóculo, apresentaram, ao término do período de incubação, o mesmo perfil quanto à densidade de células no meio. Portanto a variação entre as densidades microbianas (10^6 e 10^8), comparada à população da microbiota indígena presente na manipueira, não apresentou diferenças significativas quanto ao inóculo sobressair-se ao microrganismo nativos, em aumento de biomassa.

• **Variações dos valores de pH no decorrer do ensaio**

Com o objetivo de analisar de mudanças físico-químicas no meio de cultura (manipueira à 50%) advindas do inóculo, foram realizadas verificações diárias do pH do substrato.

A Figura 7.10 ilustra as variações do pH do meio, manipueira à 50%, em presença ou ausência de inóculo (controle).

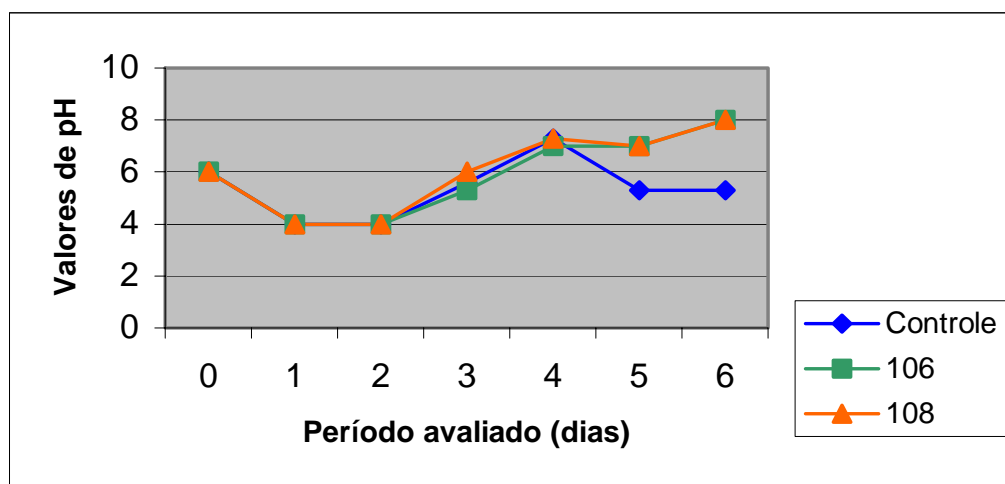


Figura 7.10: Valores de pH apresentados pelas amostras de manipueira, durante 6 dias de incubação à 28°C.

Ao início do ensaio o substrato apresentou pH 6,0. Com o aumento da biomassa microbiana ocorre a diminuição do pH, provavelmente pela liberação de ácidos orgânicos, até o pH 4,0. O mesmo perfil, ou seja, relação crescimento microbiano e pH, foi observado após 24 e 48 horas de incubação das amostras avaliadas. Após 3 dias de incubação, todas as amostras, incluindo a controle, apresentaram redução da acidez do meio, provavelmente por consumo dos mesmos ácidos. Ao 4º dia avaliado, a amostra de manipueira inoculada à concentração 10^8 e a controle, apresentaram pH 7,3, mas após 5 dias de incubação à 28°C, as amostras inoculadas demonstraram perfil semelhante com pH 7,0. A amostra controle, não inoculada por *Serratia marcescens*, mostrou os microrganismos nativos da manipueira com perfil diferente à esta característica, a diminuição da acidez, ficando o meio em pH 5,3.

Pode-se verificar que a presença do inóculo, independentemente da densidade a que o mesmo se encontra, promoveu a redução da acidez do meio, o que do ponto de vista do reaproveitamento das águas residuárias do processamento de mandioca no solo, apresenta-se como fator benéfico.

• *Teores de HCN total e livre*

Diversificando-se a densidade do inóculo pré-selecionado, objetivou-se também a determinação da concentração do microrganismo que demonstrasse maior adaptação ao meio, que diz respeito à redução do conteúdo cianogênico presente, metabolizando-o e conseqüentemente diminuindo a toxicidade da manipueira.

A Figura 7.11 ilustra os teores de HCN total iniciais e finais presentes nas amostras de manipueira à 50%, em presença ou ausência da atividade do inóculo avaliado (controle).

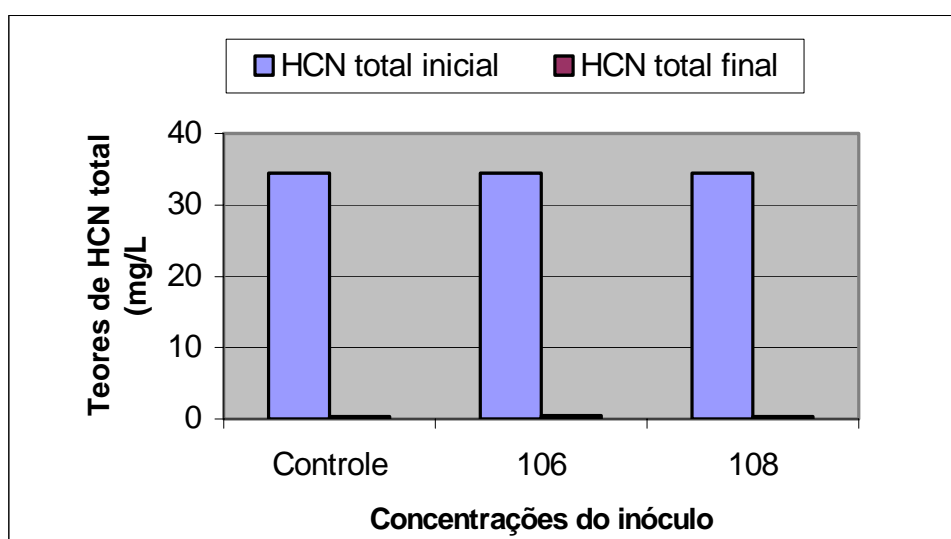


Figura 7.11: Teores de HCN total ao início e término do período de incubação (6 dias).

A Figura 7.12 apresenta as taxas de redução dos teores de HCN total, demonstradas pelas amostras de manipueira à 50%, em presença ou ausência (controle) de inóculo.

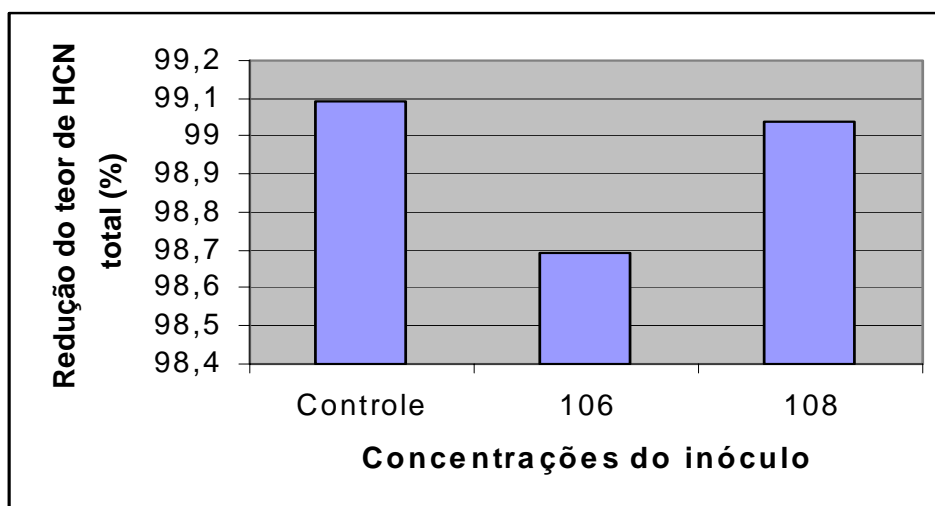


Figura 7.12: Taxas de redução dos teores de HCN total das amostras de manipueira à 50%, com e sem inóculo.

Diante dos resultados obtidos quanto à atividade microbiana sobre o teor de HCN total do meio, constata-se que não houve diferença marcante entre as densidades do inóculo, e destas comparadas ao controle, onde a microbiota indígena da manipueira apresentou resultados semelhantes às amostras inoculadas por *Serratia marcescens*.

A Figura 7.13 ilustra os teores de HCN livre iniciais e finais presentes nas amostras de manipueira à 50%, em presença ou ausência da atividade do inóculo avaliado (controle).

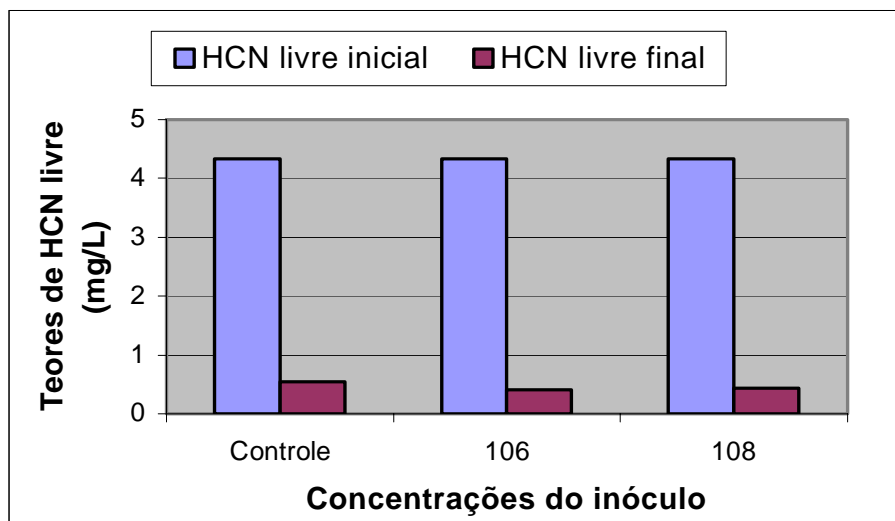


Figura 7.13: Teores de HCN livre ao início e término do período de incubação (6 dias).

A Figura 7.14 ilustra as taxas de redução dos teores de HCN livre ao início e término do período de incubação das amostras de manipueira à 50%, em presença ou ausência (controle) do inóculo avaliado.

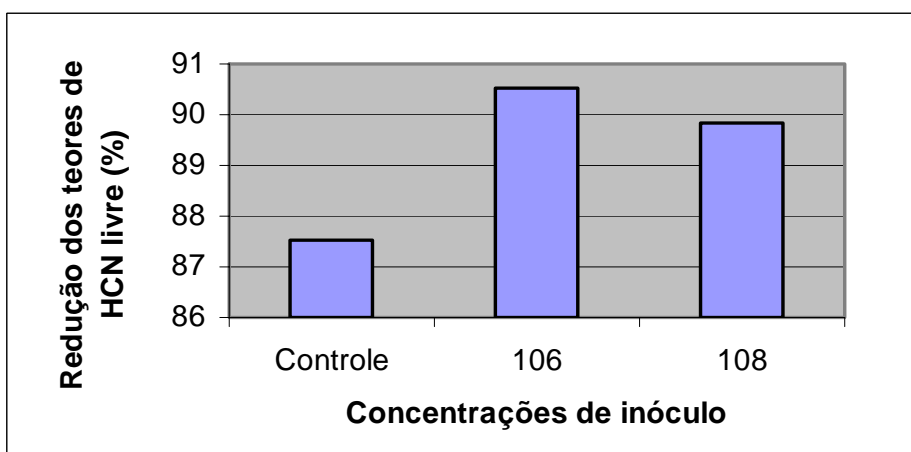


Figura 7.14: Taxas de redução dos teores de HCN livre das amostras de manipueira à 50%, com e sem inóculo.

A amostra controle, somente com a microbiota indígena da manipueira, metabolizou 87,53% do HCN livre no substrato, apresentando a menor taxa de metabolismo do composto entre as amostras avaliadas. Kang et al. (1993), relataram uma cultura microbiana mista composta por cepas dos gêneros *Klebsiella*, *Serratia*, *Moraxella* e *Pseudomonas*, isoladas de lodo ativado de resíduo líquido contendo cianeto. Como resultados obteve que as culturas microbianas quando cultivadas em meio mineral contendo CN^- como única fonte de nitrogênio, apresentaram após 8 horas de incubação, o metabolismo de todo conteúdo adicionado (100 mg/l de CN^-), onde somente à concentração de 560 mg/l de CN^- , a microbiota tendeu à redução do crescimento. O pH ótimo para a degradação do CN^- no meio, foi determinado como pH 8,0.

Sendo assim a adição do inóculo exerce efeito sobre a redução do HCN livre na manipueira, mas a variação da densidade do inóculo, não influenciou sobre o aumento da eficiência do mesmo. Pôde-se verificar através dos resultados quanto ao crescimento microbiano, pH e redução dos teores de HCN livre e total, que o inóculo foi capaz de interagir com a microbiota indígena do meio, coexistindo com a mesma.

• ***Eficiência microbiana na redução do teor de carbono orgânico total (TOC)***

Para a análise do comportamento da bactéria pré-selecionada, *Serratia marcescens* (B2), em densidades celulares diversas, foi feita a avaliação do comportamento microbiano quanto à redução da carga orgânica do meio, avaliando sua adaptação ao substrato e interação com a microbiota nativa do mesmo.

A Figura 7.15 ilustra os teores (mg/L) de carbono orgânico total (TOC) presentes nas amostras de manipueira, incluindo a controle, ao início (0 dia) e término do estudo (após 6 dias de incubação).

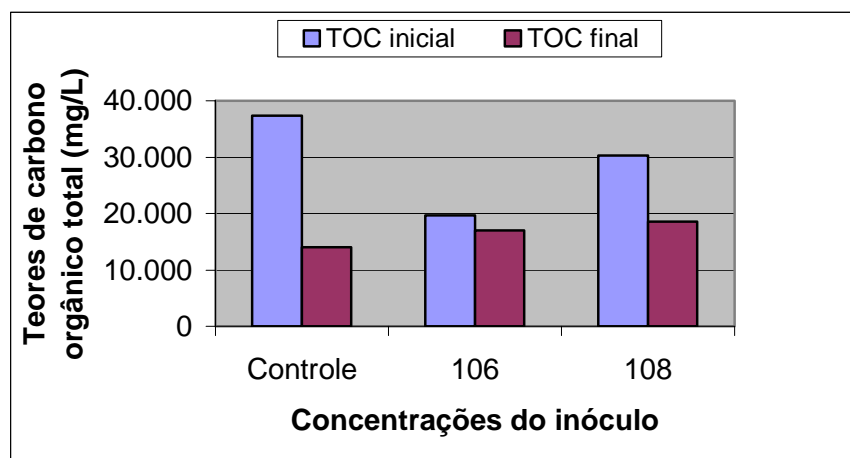


Figura 7.15: Teores de carbono orgânico total nas amostras de manipueira ao início (0 dia) e término (6 dias) do período avaliado.

Através da Figura 7.15, verifica-se que a manipueira controle, não inoculada por *Serratia marcescens*, apresentou melhor desempenho frente às amostras adicionadas do inóculo, no que se refere à redução do teor de carbono orgânico total do meio.

A Figura 7.16, ilustra as taxas de redução (%) dos teores de carbono orgânico total apresentados pelas amostras após o período de incubação das amostras.

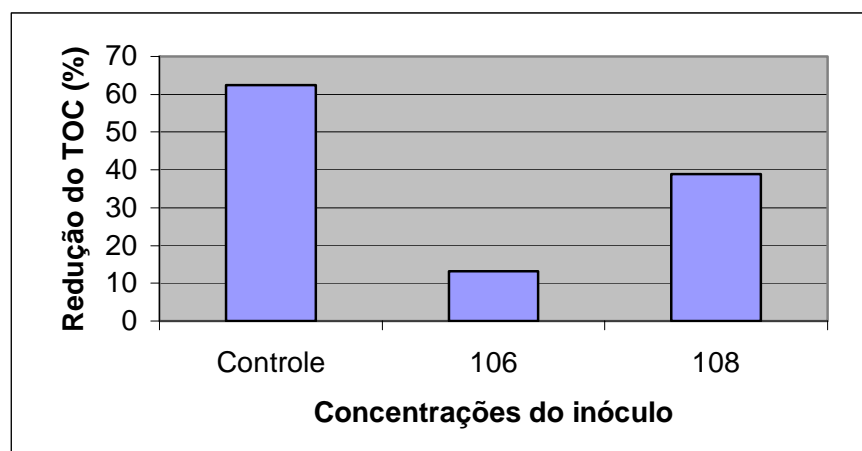


Figura 7.16: Taxas de redução dos teores de carbono orgânico total das amostras de manipueira, ao término do período de incubação (6 dias).

De acordo com os resultados apresentados, constata-se que os microrganismos indígenas, se comparados ao inoculo, encontraram-se mais adaptados ao metabolismo da carga orgânica do substrato, reduzindo 62,35% do teor de carbono orgânico total (TOC), inicialmente presente no meio. Tal fato pode ser justificado pela pré-existência da microbiota indígena na manipueira, tida como substrato, onde os microrganismos nativos provavelmente apresentam-se condicionados ao consumo dos nutrientes do meio para sua sobrevivência. Isso não significa que estas culturas naturais ao meio, manterão o mesmo comportamento se isoladas do mesmo e avaliadas quanto à sua atividade, quando em cultura pura. Torna-se importante ressaltar que o intuito do ensaio foi a avaliação da capacidade de adaptação do inoculo ao meio, e não suas habilidades à redução da carga orgânica presente.

7.4.2 Efeito da concentração de manipueira, em concentração de inoculo fixa (10^8)

O resíduo líquido constituído pela água de extração de fécula de mandioca é composto pela mistura da água captada pela indústria, com o líquido de constituição das raízes de mandioca. Constitui pois uma diluição do efluente líquido denominado tecnicamente como manipueira (Cereda, 1994). A água residual de fecularia encontra-se diluída, se comparada à manipueira, mas sua carga orgânica não é baixa, onde isso se deve à solubilização parcial da fécula residual por enzimas endógenas ou originárias de microrganismos (Cereda, 1994).

O presente ensaio visou a avaliação da linhagem de *Serratia marcescens* B2, previamente selecionada como hábil à metabolização de linamarina “*in vitro*”, quanto à sua adaptação à microbiota indígena e linamarina autóctone, em manipueira à concentrações variáveis (100%, 75%, 50%, 25%).

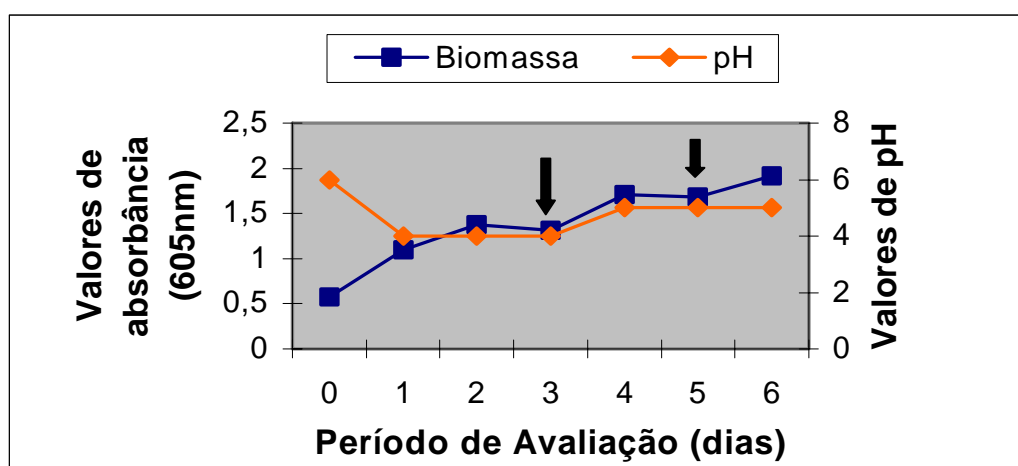
• Contagem total microbiana

Através de técnicas de diluição seriada, plaqueamento e contagem total microbiana descrita no item 6.2, obteve-se a população microbiana inicial de 10^6 UFC/mL (unidades formadoras de colônia por mL), para todas as concentrações de manipueira, incluindo as amostras controle, isentas de inóculo (*Serratia marcescens*). Após 6 dias de incubação a concentração celular apresentou aumento, tendo sido obtida a população de 10^8 UFC/mL, igualmente encontrada no ensaio descrito pelo item 7.4.1, quanto à contagem microbiana, podendo-se supôr que a diluição da manipueira não interfere sobre o aumento da biomassa microbiana. O mesmo valor (10^8), quanto à população microbiana ocorreu em todas

as amostras avaliadas, incluindo a amostra controle, o que não permitiu inferir uma eficiência maior do inóculo perante as condições do meio e microflora indígena presente.

• *Aumento da biomassa microbiana avaliado por espectrofotometria*

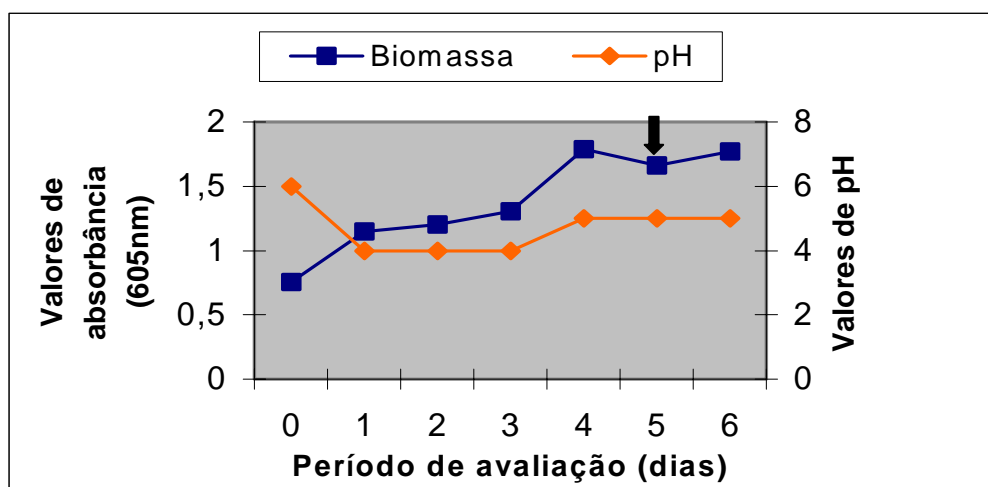
A Figura 7.17 ilustra as curvas representativas da variação da biomassa microbiana, e alterações de pH do meio, no decorrer do período de 6 dias de incubação à 28°C, à partir de verificações diárias das variações dos valores de absorbância das amostras à 605nm, apresentada pela amostra Controle, isenta de inóculo.



Legenda: As setas indicam os períodos em que houve suplementação por glicose 0,2%.

Figura 7.17: Variação da biomassa microbiana e pH apresentados pela amostra de manipueira **CONTROLE**, isenta de inóculo.

A Figura 7.18 apresenta variação da biomassa microbiana e pH demonstrados pela amostra de manipueira (100%).

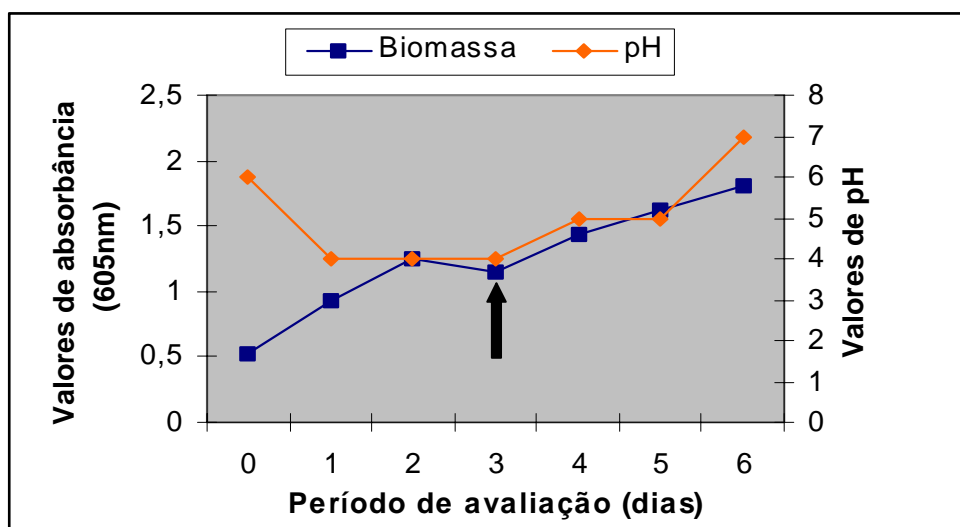


Legenda: A seta indica o período em que houve suplementação por glicose 0,2%.

Figura 7.18: Variação da biomassa microbiana e pH apresentados pela amostra de **manipueira (100%)**.

Através das análises realizadas pelo CERAT - Unesp, Botucatu, SP, da manipueira coletada na Farinheira Plaza, e utilizada como substrato ao presente estudo, obteve-se o teor de 46,03 g/L de açúcares redutores, podendo-se pressupor que o inóculo e/ ou a microflora indígena da manipueira, durante o período avaliado, demonstraram tendência à queda do crescimento microbiano, onde provavelmente a glicose presente no meio, foi exaurida, pelos microrganismos, havendo a necessidade de suplementação do meio por glicose 0,2%, como forma de retomada do aumento da biomassa celular.

A Figura 7.19, apresenta a variação da biomassa microbiana e pH, demonstrados pela amostra de manipueira diluída (75%).



Legenda: A seta indica o período em houve suplementação por glicose 0,2%.

Figura 7.19: Variação da biomassa microbiana e pH apresentados pela amostra de **manipueira diluída (75%)**.

Após 3 dias de avaliação houve tendência à queda do crescimento microbiano. Após a suplementação por glicose o aumento da biomassa foi retomado. Com a diluição da manipueira à 75%, houve também diluição dos açúcares presentes, o que acarretou como resposta microbiana na exaustão dos açúcares no meio, mais rápida, se comparada à manipueira não diluída (100%).

A Figura 7.20, apresenta a variação da biomassa microbiana e pH, demonstrados pela amostra de manipueira diluída (50%).

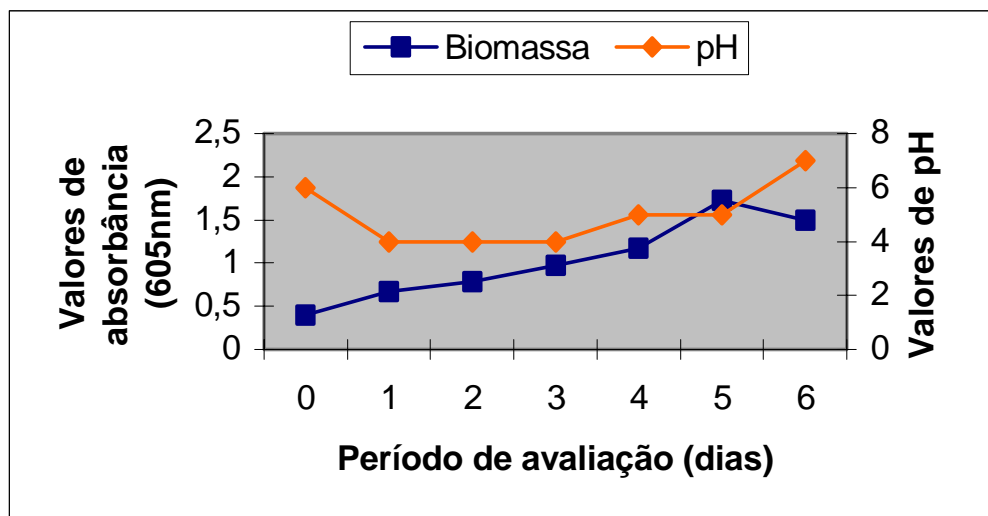
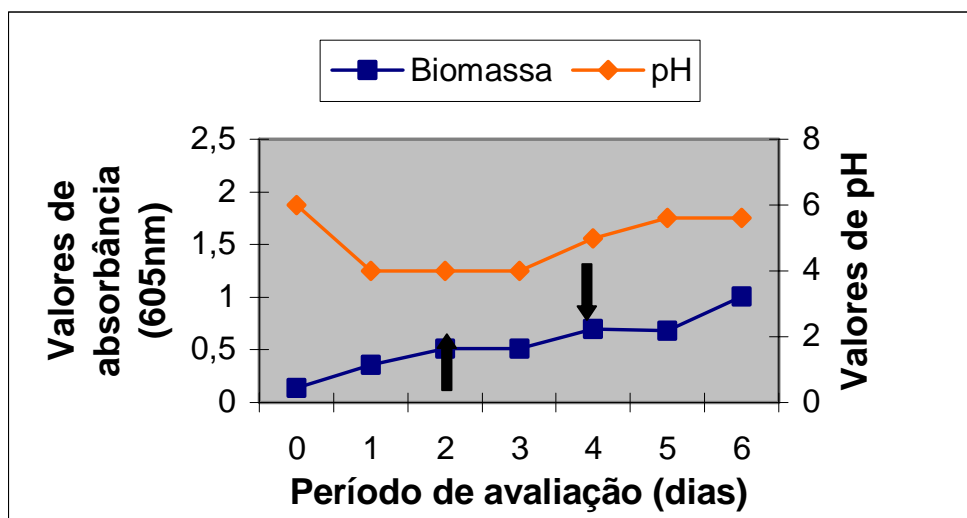


Figura 7.20: Variação da biomassa microbiana e pH, apresentados pela amostra de **manipueira diluída (50%)**.

Após 6 dias de incubação à 28°C, a população microbiana, apresentou tendência à queda do crescimento, demonstrando adaptação da microbiota indígena somada ao inóculo às condições de manipueira diluída à 50%.

A Figura 7.21 apresenta a variação da biomassa microbiana e pH demonstrados pela amostra de manipueira diluída (25%).



Legenda: As setas indicam os períodos em que houve suplementação por glicose 0,2%.
 Figura 7.21: Variação da biomassa microbiana e pH, apresentados pela amostra de **manipueira diluída (25%)**.

A manipueira diluída à 25%, apresentava teor de açúcares em concentrações menores, se comparada às demais concentrações do substrato, avaliadas, havendo tendência à queda do crescimento microbiano após 3 dias de incubação à 28° C. Após suplementação do meio por glicose 0,2%, o aumento celular foi retomado. Após 5 dias de avaliação o desenvolvimento microbiano tendeu novamente à queda, mas a adição de glicose restaurou o crescimento celular. Comparando-se os perfis apresentados pelas amostras de manipueira controle (isenta de inóculo) e diluída à 25%, observa-se que ambos são aparentemente semelhantes, mas ressalta-se que a densidade celular microbiana expressa através de valores de absorbância da manipueira controle, apresentaram-se como o dobro dos demonstrados pela amostra diluída à 25%.

Diante dos resultados apresentados pelas Figuras 7.17 à 7.21, observou-se que a *Serratia marcescens*, quando em manipueira diluída 50%, cresceu

continuamente, com tendência ao declínio do crescimento após 5 dias de incubação da amostra.

Comparada às demais concentrações avaliadas, a manipueira diluída à 50% apresentou-se como a concentração em que o inóculo melhor se adaptou, uma vez que manteve constante multiplicação celular, não havendo a necessidade de suplementação do substrato por glicose, como forma de retomada do crescimento microbiano. A água residual de fecularia é gerada durante o processamento de raízes de mandioca para a produção de fécula, e corresponde, aproximadamente, à manipueira 50% diluída, portanto essa concentração corresponde a uma realidade industrial. A *Serratia marcescens* B2, foi isolada de amostras coletadas na Fecularia Halotech Fadel, podendo-se supôr sua pré-adaptação às condições que simulem a água residual de fecularia, ou seja, manipueira diluída.

Sendo assim, a adaptação da linhagem bacteriana inoculada, *Serratia marcescens*, às condições da manipueira à 50%, incluindo população microbiana indígena e fatores intrínsecos do meio, pH, salinidade, teor cianogênico, mostra potencialidade da cepa à estudos futuros quanto ao seu emprego na biorremediação de água residual de fecularia.

De acordo com Cereda (1994) e Fioretto (1994), os resíduos líquidos originados da produção de mandioca apresentam pH entre 4,03 e 4,10, classificando-se como efluentes de pH levemente ácido, constituindo um dos problemas quanto à sua disposição no solo. Correlacionando o aumento da biomassa microbiana ao pH do meio torna-se possível observar que, à medida em que houve crescimento, paralelamente, ocorreu o decréscimo do pH, o qual tendeu ao aumento após a diminuição da concentração de biomassa (Damasceno, 1999).

O aumento de pH da manipueira, nas concentrações, 50% e 75%, inoculada por *Serratia marcescens*, pode ser um aspecto favorável do ponto de vista agrônomo de aproveitamento do resíduo em fertirrigação, pois acidificação é um dos impecilhos encontrados à sua aplicação no solo.

Através de estudos realizados por Lei et al. (1999), sobre a degradação de glicosídeos cianogênicos por linhagens de *Lactobacillus plantarum* e outros microrganismos durante a fermentação espontânea de raízes de mandioca, foram constatados valores de pHs entre 5,5 e 7,0. O ensaio descrito pelo autor confirma os valores apresentados pelo presente estudo, onde a *Serratia marcescens*, foi inoculada à manipueira que, por sua vez, permaneceu incubada durante 6 dias à 28°C, propiciando a fermentação do meio e consequentemente perfis semelhantes aos apresentados por Lei et al. (1999).

• *Teores de HCN total e livre*

Microrganismos presentes em manipueira e água residual de fecularia, assim como em ambientes sujeitos à contínuos descartes destes efluentes líquidos, encontram-se naturalmente adaptados ao conteúdo cianogênico de seu habitat, degradando-o por atividade enzimática, constituindo fontes exógenas de linamarase, podendo assim ser aplicados na destoxificação destes resíduos, ou ainda, sobrevivendo através de rotas metabólicas alternativas ao consumo de linamarina. A cianogênese poderá ocorrer espontaneamente em pHs maiores ou iguais à 5,5, ou por ação de hidroxinitrilalases gerando HCN e cetonas correspondentes (Sayre, 1995).

As análises dos teores de HCN inicial e residual mostram-se necessárias, pois determinam, através da indução da quebra de linamarina, presente ou

remanescente, a ocorrência da cianogênese, quer seja espontânea ou por atividade enzimática microbiana.

A Figura 7.22 ilustra os teores de HCN total ao início (tempo 0) e ao término do período de incubação (6 dias), das amostras de manipueira avaliadas, em suas respectivas concentrações.

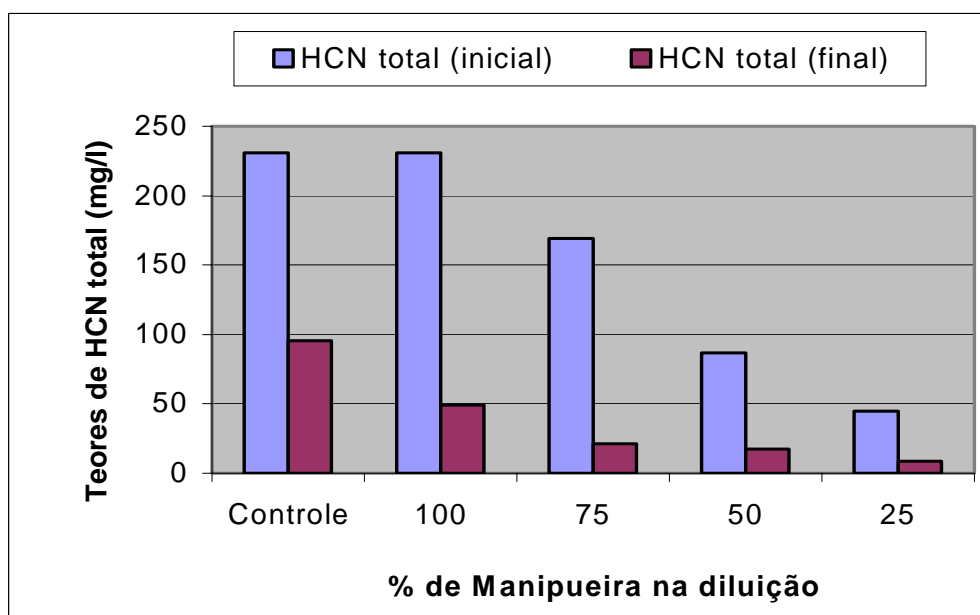


Figura 7.22: Teores de HCN total, iniciais e finais, presentes nas concentrações de manipueira avaliadas.

Observando a figura 7.22, torna-se possível constatar a atividade microbiana da *Serratia marcescens* B2, no que diz respeito à degradação do teor de HCN total presente nas amostras, incluindo a controle, onde em todas as concentrações de manipueira avaliadas, foi verificada a redução do composto no meio.

A figura 7.23 ilustra a redução do teor de HCN total inicialmente presente nas amostras de manipueira nas concentrações avaliadas, incluindo a controle.

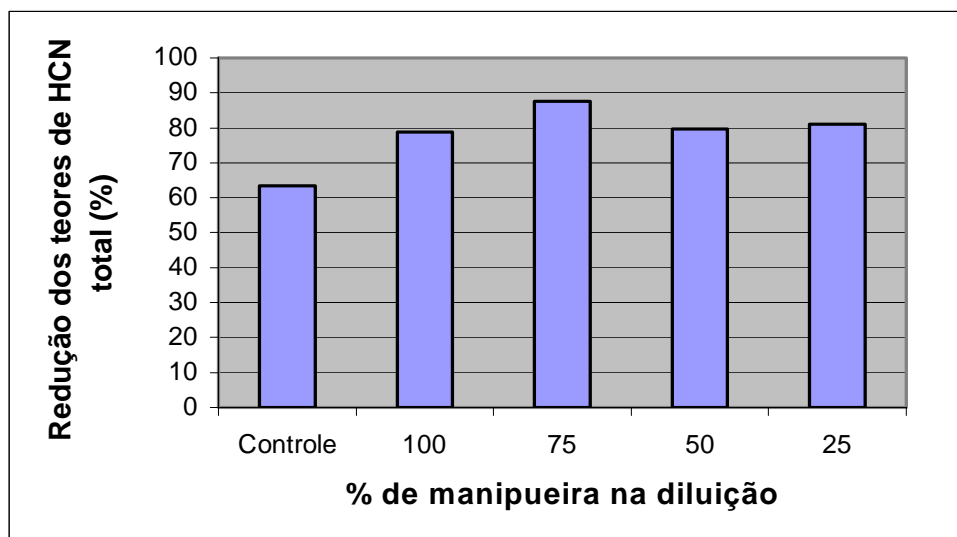


Figura 7.23: Redução dos teores de HCN total presente nas amostras de manipueira avaliadas.

A amostra diluída à 75%, quando comparada às demais, apresentou a melhor taxa de degradação do teor de HCN total presente no meio, atingindo 87,52% de redução do conteúdo inicial. É de se ressaltar a diferença apresentada entre o valor de redução de HCN total na manipueira pura (100%) inoculada, em relação à amostra controle, pois trata-se da mesma concentração de substrato. A manipueira pura, inoculada, apresentou taxa de redução do teor de HCN total inicial de 15,17% a mais, se comparada à amostra controle. Este resultado comprova que a soma do inóculo à flora microbiana indígena, foi efetiva na metabolização do conteúdo cianogênico da manipueira, seja por ação enzimática sobre o composto, ou via alternada à cadeia respiratória.

A Figura 7.24, apresenta os teores de HCN livre ao início e término do período de incubação das amostras de manipueira.

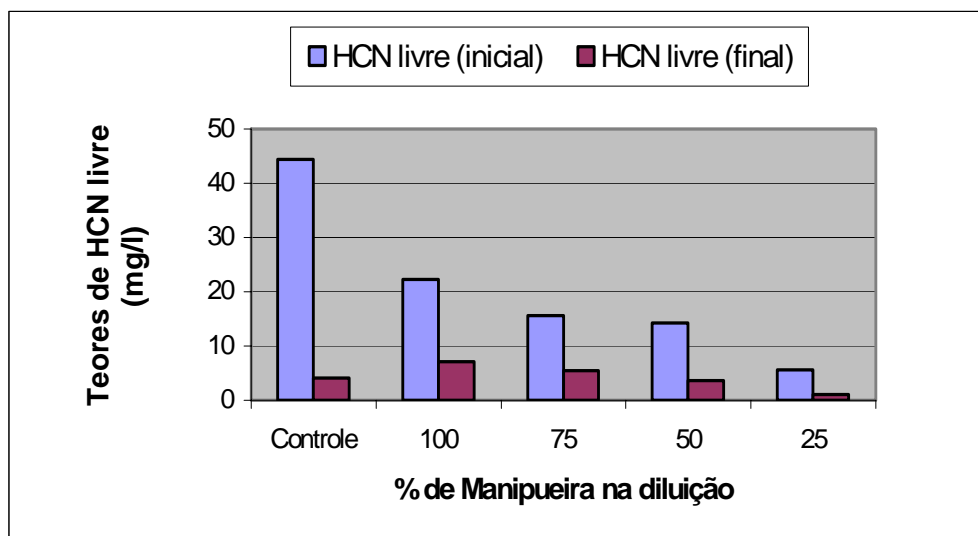


Figura 7.24: Teores de HCN livre (mg/l) iniciais e finais, presentes nas amostras de manipueira diluídas.

A Figura 7.25 ilustra a redução dos teores de HCN livre nas amostras de manipueira avaliadas.

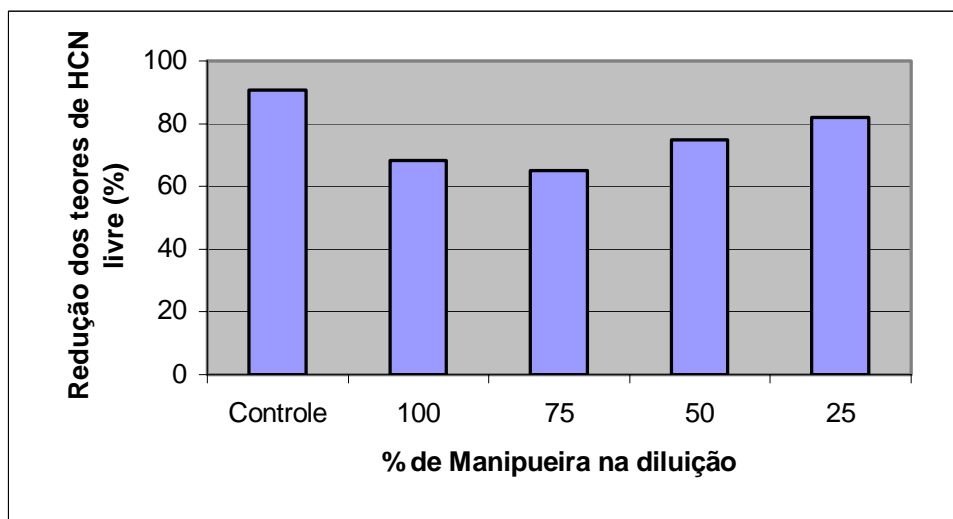


Figura 7.25: Redução dos teores de HCN livre presentes nas amostras de manipueira diluídas .

O cianeto livre é complementar ao teor de cianeto total, e parte do composto pode volatilizar-se, e o restante complexar-se à metais presentes na manipueira, reduzindo assim seu teor final no meio.

Diante dos resultados obtidos nas análises dos teores de HCN livre, iniciais e finais, constatou-se que a amostra controle, a qual continha somente os microrganismos indígenas apresentou, se comparada às amostras inoculadas pela *Serratia marcescens*, o melhor índice de degradação do composto no meio, apresentando 90,74% de redução do conteúdo inicial presente. Da mesma forma, um consórcio mais eficiente entre culturas foi relatado por Patil e Paknikar (1999), como hábil à degradar 99,9% de CN⁻ (cianeto livre) após 120 horas da inoculação, enquanto uma cultura pura, isolada dentre os microrganismos constituintes do "pool" avaliado, degradou apenas 46,8% do composto, no mesmo período de tempo.

- ***Redução do Teor de Carbono Orgânico Total (TOC)***

As análises de redução do teores de carbono orgânico total nas amostras de manipueira, tiveram o intuito de verificar a eficiência do inóculo, diante das condições do substrato contendo microflora indígena, além de adaptação às características físico-químicas da manipueira, no que diz respeito ao consumo microbiano da carga orgânica do meio.

A Figura 7.26, ilustra os valores encontrados quanto aos teores de carbono orgânico total (TOC) ao início (0 dia) e término (6 dias) do período avaliado, presentes nas amostras de manipueira em suas respectivas concentrações.

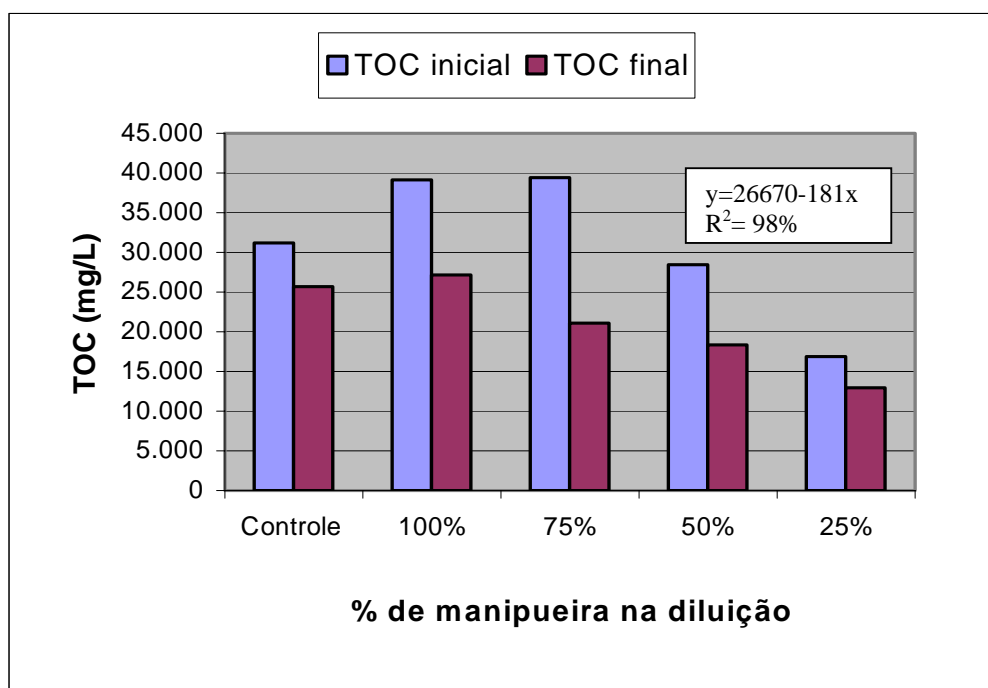


Figura 7.26: Teores de carbono orgânico total (mg/l) presentes nas amostras ao início e término do período de incubação (6 dias).

A redução da carga orgânica não é característica diferencial para a avaliação do agente de biodegradação da linamarina, mas uma forte redução da carga demonstra boa adaptação ao meio complexo da manipueira.

A Figura 7.27, ilustra as taxas de redução do teor de carbono orgânico total atingidas no decorrer do período de incubação das amostras.

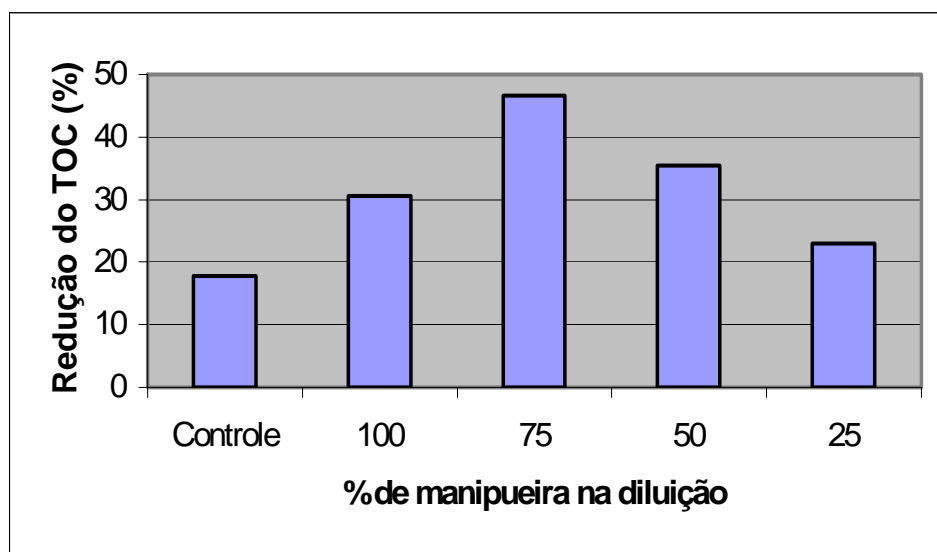


Figura 7.27: Taxas de redução (%) dos teores de carbono orgânico total, apresentados pelas amostras de manipueira.

De acordo com os resultados obtidos, a manipueira diluída à 75% e inoculada pela *Serratia marcescens* B2, apresentou o maior consumo de carbono orgânico total, se comparada às demais amostras, incluindo a controle, com redução de 46,61% do teor inicial, o que equivale à variação de 39.390 mg/l (teor de carbono orgânico total inicial) para 21.030 mg/l, ao término do período de incubação do substrato (6 dias). A *Serratia marcescens* B2, demonstrou maior habilidade ao consumo da carga orgânica presente quando em manipueira diluída à 75%, demonstrando que além de degradar cianeto, poderá ser uma potencial despoluidora do substrato, em interação com a microflora nativa presente.

É importante ressaltar que a bactéria analisada, foi selecionada de amostras da Fecularia Halotech Fadel (Quadro 7.2), o que predispõe à sua adaptação e multiplicação em amostras diluídas, como a condição natural de água residual de fecularia, ou seja, manipueira diluída com água de extração.

8. CONSIDERAÇÕES GERAIS

O desenvolver do projeto de pesquisa permitiu estabelecer uma metodologia que constou de isolamento, seleção, identificação e avaliação "*in vitro*" da ação microbiana sobre linamarina e finalmente, sua adaptação à manipueira, com linamarina, minerais e microflora autóctones.

A metodologia adotada permitiu isolar 118 culturas, dentre as quais apenas 33 linhagens foram avaliadas. As culturas restantes deverão ser também avaliadas para a determinar o potencial destas cepas em metabolizar linamarina "*in vitro*" e sua readaptação à manipueira. Na continuidade da pesquisa, será importante estabelecer o desempenho das cepas selecionadas, em culturas puras ou mistas, na destoxificação de manipueira e água residual de fecularia, quando dispostas no solo através de fertirrigação. Será importante estabelecer uma forma de rastreamento das mesmas, no que se refere à sobrevivência e atividade metabólica das linhagens, constituindo parte dos objetivos de trabalho futuro para aplicação destes microrganismos na biorremediação de efluentes líquidos da indústria de processamento de mandioca.

Como complemento do presente trabalho, deverão ser esclarecidas as rotas metabólicas utilizadas pelos microrganismos no consumo de linamarina como única fonte de carbono e energia, como subsídios à trabalhos futuros que visem a aplicação das linhagens selecionadas, determinando enzimas atuantes, restrições e respiração microbianas.

9. CONCLUSÕES

- Foi possível selecionar linhagens hábeis à metabolizar linamarina "*in vitro*", usando culturas microbianas aeróbias, isoladas de amostras de manipueira, água residual de fecularia e solos adjacentes aos locais de descarte dos efluentes. Do total isolado, de 118 culturas, 33 linhagens foram avaliadas quanto à degradação de linamarina "*in vitro*". como única fonte de carbono e energia. Das 33 linhagens, 8 apresentaram capacidade de degradação de linamarina.
- A *Serratia marcescens*, predominou dentre os microrganismos avaliados, com 3 linhagens, entre as 8 selecionadas pela capacidade de sobrevivência metabolizando linamarina "*in vitro*".
- As diluições da manipueira à 50% e 75%, propiciaram melhor adaptação da *Serratia marcescens* B2, ao meio.
- O desempenho da *Serratia marcescens* B2, caracterizou-se pela adaptação em manipueira diluída, reduzindo teores de cianeto livre e complexado, acidez e carga orgânica do meio.

- A densidade celular de *Serratia marcescens* B2, inoculada em manipueira, não exerceu influências significativas sobre a adaptabilidade do microrganismo no meio.
- As características dos microrganismos selecionados, potencializam a futura aplicação dos mesmos, em estudos que envolvam a biorremediação e incorporação de manipueira diluída ao solo.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKORODA, M. O. Alleviating hunger in Africa with root and tuber crops. *Afric. J..l of Root Crops*, v.41, p.43, 1995.

AMOA-AWUA, W.K.A., APPOH, F.E., JAKOBSEN, M. Lactic acid fermentation of cassava dough into agbelima. *Int. J. Food Microbiol.*, v.31, p.87-98, 1996.

AOAC. *Official methods of analysis of the Associaton of Analytical Chemists*. 12.ed, Washington, 1975. 1094p.

AZEVEDO, J.L. Biodiversidade microbiana e potencial biotecnológico. In: MELO, I.S., AZEVEDO, J.L. *Ecologia microbiana*. 1.ed. Jaguariúna: Embrapa - CNPMA, 1998. p.445-461.

BAHR, J.T., BONNER, J.W.D. *J. Biol. Chem.*, v.248, 3441p., 1973.

BARANA, A.C. Estudo de carga orgânica de manipueira em fase metanogênica em reator anaeróbio de fluxo ascendente e leito fixo. Botucatu, 1996. 80p. Dissertação (Mestrado em Agronomia / Energia na Agricultura) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.

BARANA, A.C. Avaliação de tratamento de manipueira em biodigestores fase acidogênica e metanogênica. Botucatu, 2000. 96p. Tese (Doutorado em Agronomia / Energia na Agricultura), Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.

BARCLAY, M., HART, A., KNOWLES, C.J., MEEUSSEN, J.C.L., TETT, V.A. Biodegradation of metal cyanides by mixed and pure cultures of fungi. *Enz. and Microbiol. Technol.*, v.22, p.223-231, 1998.

BARNETT, J.A., PAYNE, R.W., YARROW, A. *Yeasts: characteristics and identification*. Cambridge University Press, 1983, 811p.

BEHKI, R.M., TOPP, E., DICK, W., GERMON, P. Metabolism of the herbicide atrazine by *Rhodococcus* strain. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.59, p.1955-1959, 1993.

BENDALL, D.S, BONNER Jr., W.D. *Plant Physiol.*, v.47, p.236, 1971.

BLACKALL, L.L., BURRELL, L.C., GUILLIAM, H., BRADFORD, D., BOND, P.L., HUGENHOLTZ, P. The use of 16S rDNA clone libraries to describe the microbial diversity of activated sludge communities. *Wat. Sci. Tech.*, v.37(4-5), p.451-454, 1998.

BRASIL, O.G., CEREDA, M.P., FIORETTO, A.M.C. Indução da respiração resistente ao cianeto em microrganismos pela presença de inibidores de crescimento microbiano. *Yton*, v.42(1), p.49-53, 1982.

CARVALHO, V.D., CARVALHO, J.G. Princípios tóxicos da mandioca. *Inf. Agropec.*, v.5, p.82-88, 1979.

CABELLO, C., LEONEL, M. Produção de ácido cítrico a partir da manipueira. In: CEREDA, M.P. *Resíduos da industrialização de mandioca no Brasil*. 1ed. São Paulo: Editora Paulicéia, 1994, p.109-118.

CEREDA, M.P., BRASIL, O.G., FIORETTO, A.M.C. Microrganismos com respiração resistente ao cianeto isolados de líquido residual de fecularia. *YTON*, v.41(1/2), p.197-201, 1981.

CEREDA, M.P., BONET, A.F., VALLES, S., ALBEROLA, J. Tratamento anaeróbio em duas fases, de suspensões amiláceas II. Fase metanogênica. Influência da adição de CN⁻. *Ver. Microbiol.*, v.21(1), p.73-78, 1990.

CEREDA, M.P. Caracterização dos resíduos da industrialização da mandioca. In:____. *Resíduos da industrialização da mandioca no Brasil*. 1.ed. São Paulo: Paulicéia, 1994. p.11-50.

CHAÎNEAU, C.H., MOREL, J., DUPONT, J., BURY, E., OUDOT, J. Comparison of fuel oil biodegradation potential of hydrocarbon-assimilating microorganisms isolated from a temperate agricultural soil. *The Sci. of the T. Environ.*, v.227, p.237-247, 1999.

CONN, E. E. Cyanogenesis - personal perspective. *Acta Hort.*, v.375, p.31-41, 1994.

COOKE, R.D. An enzymatic assay for the total cyanide content of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *J.Sci. Fd. Agric.*, v.29, p.345-352, 1978

DAMASCENO, S. *Manipueira como substrato para o desenvolvimento de Geotrichum fragrans*. Botucatu, 1999. 117p. Tese (doutorado em Agronomia/Energia na Agricultura) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.

DAVIDSON, J. Genetic exchange between bacteria in the environment. *Plasmid*, v.42, p.73-91, 1999.

DIMENNA, M.E. The antibiotic relationships of some yeasts from soil and leaves. *J. Gen. Microbiol.*, v.27, p.249-257, 1962.

DUBEY, S.K., HOLMES, D.S. Biological cyanide destruction mediated by microorganisms. *World J. of Microbiol. & Biotechnol.*, v.11, p.257-265, 1995.

EDWARDS, D.L., ROSENBERG, E., MARONEY, P.A. *J. Biol. Chem*, v.249, 1974, 3551p.

ENTCHEVA, P., LIEBL, W., JOHANN, A., HARTSCH, T., STREIT, W.R. Direct cloning from enrichment cultures, a reliable strategy for isolation of complete operons and genes from microbial consortia. *Appl. and Environ. Microbiol.*, v.67(1), p.89-99, 2001.

ESSERS, S. Assay for the cyanogen content in cassava products: version preliminary. Wageningen, 1993. 9p.

FALLON, R.D. Evidence of a hydrolytic route for anaerobic cyanide degradation. *Appl. and Environ. Microbiol.*, v.58(9), p.3163-3164.

FERNANDES JR., A., TAKAHASHI, M. Tratamento da manipueira por processos biológicos - aeróbio e anaeróbio. In: CEREDA, M.P. *Resíduos da industrialização de mandioca no Brasil*, 1.ed. São Paulo: Paulicéia, 1994. p.131-149.

FINNEGAN, L., TOERIEN, S., ABBOT, L., SMIT, F., RAUBENHEIMER, H.G. Identification and characterisation of an *Acinetobacter* sp. capable of assimilation of a range of cyano-metal complexes, free cyanide ions, and simple organic nitriles. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 36, p.142-144, 1991.

FIORETTO, R. A. Uso direto da manipueira em fertirrigação. In: *Resíduos da industrialização de mandioca no Brasil*. 1.ed. São Paulo: Paulicéia, 1994. p.51-80.

FORTUNATO, M.S., GALLEGO, A., BEVILACQUA, S., ROSSI, S., D'AQUINO, M., KOROL, S. Degradação de 2-clorofenol por *alcaligenes* sp isolados de fontes naturais. In: "LATIN AMERICAN BIODEGRADATION & BIODETERIORATION SYMPOSIUM (LABS), 3, Florianópolis, 1998. Florianópolis, SC: Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), 1998. CD.

FREDERICK, G.L., LLOYD, B.J. An evaluation of retention time and short-circuiting in waste stabilisation ponds using *Serratia marcescens* bacteriophage as a tracer. *Wat. Sci. Tech.*, v.33(7), p.49-56, 1996.

FUNGARO, M.H.P., VIEIRA, M.L.C. Aplicações da PCR em ecologia molecular. In: MELO, I.S., AZEVEDO, J.L. *Ecologia microbiana*. 1.ed. Jaguariúna: Embrapa - CNPMA, 1998. p.205-227.

GANCZARCZYK, J.J., TAKOAKA, P.T., OHASHI, D.A. Application of polysulfide for pretreatment of spent cyanide liquors. *J. Water Pollut Control Fed*, v.57, p.1089-1093, 1985.

GRIFFITHS, M. *Biotechnology for a clean environment*. Inglaterra: Mike Griffiths Associates, 1992. "não pag".

HAGLER, A.N., AHEARN, D.G. Ecology of aquatic yeasts. In: ROSE, A.H., HARRISON, J.S. *The yeasts*. 2.ed. London: Academic Press, 1987. p.181-205.

HARRIS, R., KNOWLES, C.J. Isolation and growth of a *Pseudomonas* species that utilises cyanide as a source of nitrogen. *J. Gen. Microbiol.*, v.129, p.1005-1011, 1983.

HENRY, M.F., NYNS, E.J. *Subcell Biochem*, v.4, 1975, 1p.

HEUER, H., KRSEK, M., BAKER, P., SMALLA, K., WELLINGTON, E.M.H. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16s rRNA and gel electrophoresis separation in denaturing gradient. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.63, p.3233-3241, 1997.

HIDAYAT, A., ZUARAIDA, N., HANARIDA, I., DAMARDJATI, D.S. Cyanogenic content of cassava root of 179 cultivars grown in Indonesia. *J. of Food Compos. and Analys.*, v.13, p.71-82, 2000.

HILL, B.C., PETERSON, J. Spectral and cyanide binding properties of the cytochrome aa₃ (600nm) complex from *Bacillus subtilis*. *Arch. of Biochem. and Biophys.*, v.350(2), p.273-282, 1998.

HOLLIGER, C.G., SCHUMACHER, W. Reductive dehalogenation as a respiratory process. *Antonie van Leeuwenhock*, v.66, p.239-246, 1994.

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

JENKINSON, D.S., LADD, J.N. Microbial biomass in soil: measurement and turnover. In: PAUL, E.A., LADD, J.N. *Soil Biochemistry*. New York: Marcel Dekker, 1981. v.5, "não pag."

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

JONES, D.A. Why are so many food plants cyanogenic? *Phytochemistry*, v.47, p.155-162, 1998.

KANG, M.S., KIM, D.J. Degradation of cyanide by a bacterial mixture composed of new types of cyanide-degrading. *Biotechnol. Lett.*, v.15(2), p.201-206, 1993.

KARPOUZAS, D.G., WALKER, A. Factors influencing the ability of *Pseudomonas putida* epl to degrade ethoprophos in soil. *Soil Biol & Biochem.*, v.32, p.1753-1762, 2000.

KIM, M.N, KWON, H.S. Biochemical oxygen demand sensor using *Serratia marcescens* LSY 4. *Bios. & Bioelectr.*, v.14, p.1-7, 1999.

KNOWLES, C.J. Microorganisms and cyanide. *Bacteriol. Rev.*, v.40, p.652-680, 1976.

KNOWLES, C.J., BUNCH, A.W. Microbial cyanide metabolism. *Adv. Microb. Physiol.*, v.27, p.73-111, 1986.

KNOWLES, C.J. Cyanide utilization and degradation by microorganisms. In: EVERED, D., HARNETT, S. *Cyanide compounds in biology*. Chichester: John Willey & Sons, Ltd, 1988. p.3-15.

KORPRADITSKUL, R., KATAYAMA, A., KUWATSUKA, S. Degradation of atrazine by soil bacteria in stationary phase. *J. Pesticide Science*, v.18, p.293-298, 1993.

KREGER-VAN RIJ, N.J. *The yeast: a taxonomic study*. Elsevier, 1984. 1082p.

KUNZ, D.A., CHEN, J., PAN, G. Accumulation of α -keto acids as essential components in cyanide assimilation by *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764. *Appl. and Env. Microbiol.*, v.64(11), p.4452-4459.

KURTZMAN, C.P., FELL, J.W. *The yeast: a taxonomic study*. Elsevier, 1998. 1055p.

LABEDA, D.P. *Isolation of biotechnological organisms from nature*. McGraw Hill Publishing, 1990. p.21-76.

LANARV Laboratório Nacional de Referência Vegetal. Métodos oficiais. Brasília, Ministério da Agricultura, 1988. 104p.

LANG, K. Die rhodabildung in tierkorpier. *Biochem. Z.*, v.259, p.243-256, 1933.

LEGRAS, J. L., JORY, M., GALZY, P. Detoxification of cassava pulp using *Brevibacterium* sp R312. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.33, p.529-533, 1990.

LEI, V., AMOA-AWUA, W.K.A., BRIMER, L. Degradation of cyanogenic glycosides by *Lactobacillus plantarum* strains from spontaneous cassava fermentation and other microorganisms. *Intern. J. of Food. Microbiol.*, v.53, p.169-184, 1999.

LENNETTE, E.H., BALLOWS, A., HAUSLER, W.J., SHADOMY, H.J. *Manual of clinical microbiology*. Washington DC: American Society for Microbiology, 1985. "não pag."

LEVANON, D. Roles of fungi and bacteria in the mineralization of the pesticides atrazine, alachlor, malathion and carbofuran in soil. *Soil Biol. Biochem.*, v.25(8), p.1097-1105, 1993.

LINARDI, V.R. Degradação biológica de cianetos. A importância do desenvolvimento de tecnologia para obtenção de um tratamento biológico. [on line]. Available from world wide web: UR: <http://www.biotecnologia.com.br>. [2000, jun.03].

MACMAHON, J.M., WHITE, W.L.B., SAYRE, R.T. Cyanogenesis in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *J. of Exper. Botany*, v.46, p.371-741, 1995.

MACHADO, J.S., LINARDI, V.R., DIAS, J.C.T. Biodegradação de cianetos por uma linhagem de *Pseudomonas*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 20, 1999, Salvador. *Resumos...*Rio de Janeiro, Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1999, p.256.

MCFETERS, G.A., WILSON, D.F., STROBEL, G.A. Cytochromes in a cyanide-resistant strain of *Bacillus cereus*. *Canadian J. of Microbiol.*, v.16, p.1221-1226, 1970.

MEYERS, P., GOKOOL, P., RAWLINGS, D.E., WOODS, D.R. An efficient cyanide degrading *Bacillus pumilus* strain. *J. of Gen. Microbiol.*, v.137, p.1397-1400, 1991.

MEEUSSEN, J.C.L., VAN RIEMSDIJK, W.H., VAN DER ZEE, S.E.A.T.M. Transport of complexed cyanide in soil. *Geoderma*, v.67, p.73-85, 1995.

MOSHER, J.B., FIGUEROA, L. Biological oxidation of cyanide: a viable treatment option for the minerals processing industry? *Minerals Eng.*, v.9(5), p.573-581, 1996.

MURO, M.A., LUCHI, M.R. Métodos de preservação. In:___*Preservação de microrganismos*. 1.ed. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello", 1989. p.3-24.

NELSON, N.A. Phtometric adaptation of the Somogy method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.*, V.153, p.375-380, 1944.

OLIVEIRA, S.S. *Avaliação do potencial de um lodo anaeróbio termófilo na biodegradação do composto pentaclorofenol (PCP)*. São Carlos, 1998. 132p. Dissertação (mestrado em Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, Universidade de São Paulo.

PALMER, S.S.K., BRETON, M.A., NUNNO, T.J., SULLIVEN, D.M., SURPRENANT, N.F. Metal / cyanide containing wastes: treatment technologies. *Noyes Data Corp*, Park Ridge, NJ, 1988.

PANTAROTO, S.; CEREDA, M. P.; MANFIO, G. P.; CEZAR, V.R.S.; LEONEL, M. Destoxificação microbiana de manipueira (resíduo líquido das indústrias de mandioca) -

etapa inicial. In: FERTBIO 2000 - REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO, XXIV; REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, VIII; SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA DO SOLO, VI; REUNIÃO BRASILEIRA DE BIOLOGIA DO SOLO, III, Santa Maria, 2000. **Anais dos resumos**. Santa Maria, RS: SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIÊNCIA DO SOLO E SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA, 2000. p.22.

PATIL, Y.B., PAKNIKAR, K.M. Development of a process for biodegradation of metal cyanides from waste waters. *Proc. Biochem.*, v.35, p.1139-1151, 2000.

PELCZAR, M., REID, R., CHAN, E.C.S. *Microbiologia* Volume 1. 5.ed. São Paulo: McGraw-Hill do Brasil, 1980. p.130-145.

PETRUCCIOLI, M., BRIMER, L., CICALINI, A.R., FEDERICI, F. The linamarase of *Mucor circinelloides* LU M40 and its detoxifying activity on cassava. *J of Appl. Microbiol.*, v.86, p.302-310, 1999.

PITCHER, D.G., SAUNDERS, N.A., OWEN, R.J. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidim thiocyanate. *Lett. in Appl. Microbiol.*, v.8, p.151-156, 1989.

PONTE, J.J. Utilização de manipueira como defensivo agrícola. *Fitopatol. Venez.*, v.5(1), p.2-5, 1992.

RAYBUCK, S. A. Microbes and microbial enzymes for a cyanide degradation. *Biodegradation*, v.3, p.3-18, 1992.

ROBERTS, R. M., TURNER, N. J., WILLETTS, A.J., TURNER, M.K. *Introduction to biocatalysis using enzymes and microorganisms*. Cambridge University Press, 1995. "não pag."

SANTOS, C.F.C, PASTORE, G.M, DAMASCENO, S., CEREDA, M.P. Produção de biosurfactantes por linhagens de *Bacillus subtilis* utilizando manipueira como substrato. *Boletim da Soc. Bras. Cien. Tecnol. Alim.*, v.33(2), p.157-161, 1999.

SAYRE, R.T., WHITE, W.L.B., MCMAHON, J.M. Cyanogenesis in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *J. Exp. Botany*, v.46, p.731-741, 1995.

SILVA-AVALOS, J., RICHMOND, M.G., NAGAPPAN, O., KUNZ, D.A. Degradation of the metal-cyano complex tetracyanonickelate (II) by cyanide-utilizing bacterial isolates. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.56, p.3664-3670, 1990.

SOBRINHO, P.A. Autodepuração dos corpos d'água. In: *Curso de poluição das águas*. São Paulo, 1975. São Paulo: CETESB/ABES/BNH, 1975. Cap.8, p.6-9. (apostila)

SOMOGY, M. Determination of blood sugar. *J. Biol. Chem.*, v.160, p.69-73, 1945.

SOUZA-FAGUNDES, E.M., GOMES, N.C.M., PIMENTEL, P.F., SANTOS, M.H., HAGLER, L.C.S.M. Estudos da degradação de tiocianato por microrganismos. In: LATIN AMERICAN BIODEGRADATION & BIODETERIORATION SYMPOSIUM (LABS), 3, 1998, Florianópolis.

STACKEBRANDT, E., LIESACK, W., WITT, D. Ribosomal RNA and rDNA sequence analysis. *Gene*, v.115, p.255-260, 1992.

STAM, H., STOUTHAMER, A.H., VAN VERSEVELD, H.W. Cyanide assimilation in *Rhizobium* ORS 571: influence of the nitrogenase catalysed hydrogen production on the efficiency of growth. *Arch. Microbiol.*, v.143, p.196-202, 1985.

STUBNER, S., WIND, T., CONRAD, R. Sulfur oxidation in rice field soil: activity, enumeration, isolation and characterization of thiosulfate-oxidizing bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.*, v.21, p.569-578, 1998.

TARAMANI, V., AHLERT, R.C. Role of cometabolism in biological oxidation of synthetic compounds. *Biotech. and Bioeng.*, v.27, p.1306-1311, 1985.

TONDO, E.C., ANDRETTA, C.W.S, SOUZA, C.F.V., MONTEIRO, A.L., HENRIQUES, J.A.P., AYUB, M.A.Z. High biodegradation levels of 4,5,6-trichloroguaiacol by *Bacillus* sp. isolated from cellulose pulp mill effluent. *Rev. Microbiol.*, v.29(4), p.1-11, 1998.

U.S. FAO / WHO, 1991.

VALADARES-INGLIS, M.C., MELO, I.S. Métodos de extração de DNA e sua aplicação em estudos genéticos e ecológicos. In: Melo, I.S., Azevedo, J.L. *Ecologia microbiana*. 1.ed. Jaguariúna: Embrapa - CNPMA, 1998. p.187-204.

VAZOLLER, R.F. Diversidade microbiana e desenvolvimento sustentável: microbiologia e saneamento ambiental. In: BIODIVERSIDADE: PERSPECTIVAS E OPORTUNIDADES TECNOLÓGICAS - WORKSHOP, 1996, Campinas. Campinas: Fundação André Tosello, 1996. 15p.

VETTER, J. Plant cyanogenic glycosides. *Toxicon*, v.38, p.11-36, 1999.

WOSIACKI, G., FIORETTO, A.M.C., CEREDA, M.P. Utilização da manipueira para produção de biomassa oleaginosa. In: CEREDA, M.P. *Resíduos da industrialização de mandioca no Brasil*, 1.ed. São Paulo: Paulicéia, 1994. p.151-162.

YAMAOKA-YANO, D. M., VALARINI, P.J. Métodos de identificação de bactérias. In: MELO, I.S., AZEVEDO, J.L. *Ecologia microbiana*. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. p.369-390.

YUAN, S.Y., WEI, S.H, CHANG, B.V. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a mixes culture. *Chemosphere*, v.41, p.1463-1468, 2000.

ANEXOS

Anexo 1: Áreas dos picos de linamarina, apresentados por cromatogramas expressos pelo HPLC, no decorrer de 7 dias de desenvolvimento das linhagens de *Serratia marcescens*.

		<i>Período avaliado (dias)</i>						
		<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>
<i>Linhagens</i>		<i>Áreas dos picos (HPLC)</i>						
<i>Padrão de Linamarina: 5.921.678 Pureza: 80,7%</i>								
B1		107.526	115.570	63.573	63.349	50.451	46.234	15.323
B2		176.715	136.035	113.623	108.045	78.131	36.009	14.416
<i>Padrão de Linamarina: 2.929.605 Pureza 83,8%</i>								
B4		15.507	15.410	14.026	10.752	9.397	8.920	4.835

Anexo 2: Valores de Absorbâncias à 605nm, no decorrer de 7 dias de avaliação do desenvolvimento microbiano das linhagens de *Serratia marcescens*.

		<i>Período avaliado (dias)</i>						
		<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>
<i>Linhagens</i>		<i>Valores de absorbância (605nm)</i>						
B1		0,007	0,012	0,017	0,028	0,019	0,028	0,220
B2		0,019	0,019	0,018	0,018	0,114	0,131	0,118
B4		0,012	0,017	0,028	0,019	0,028	0,220	0,246

Anexo 3: Áreas dos picos de linamarina, apresentados por cromatogramas expressos pelo HPLC, e valores de absorvâncias à 605nm da linhagem B3, do gênero *Bacillus*.

Período Avaliado (dias)	Valores de absorvância (605nm)	Áreas dos picos (HPLC)
<i>Padrão de Linamarina: 2.498.918 Pureza: 87,3%</i>		
1	0,014	240.130
2	0,015	218.463
3	0,027	125.254
4	0,032	123.445
5	0,050	122.452
6	0,061	110.177
7	0,067	70.143

Anexo 4: Áreas dos picos de linamarina, apresentados por cromatogramas expressos pelo HPLC, e valores de absorvâncias à 605nm do *Bacillus* B6.

Período Avaliado (dias)	Valores de absorvância (605nm)	Áreas dos picos (HPLC)
<i>Padrão de Linamarina: 2.929.605 Pureza 83,8%</i>		
1	0,004	23.001
2	0,005	20.976
3	0,046	15.947
4	0,098	6.670
5	0,109	6.152
6	0,107	6.067
7	0,120	2.326

Anexo 5: Áreas dos picos de linamarina, apresentados por cromatogramas expressos pelo HPLC, e valores de absorvâncias à 605nm da Proteobactéria B5.

Período Avaliado (dias)	Valores de absorvância (605nm)	Áreas dos picos (HPLC)
<i>Padrão de Linamarina: 2.929.605 Pureza 83,8%</i>		
1	0,025	21.017
2	0,025	18.287
3	0,118	17.878
4	0,191	17.100
5	0,182	13.980
6	0,285	9.007
7	0,277	6.927

Anexo 6: Áreas dos picos de linamarina, apresentados por cromatogramas expressos pelo HPLC, e valores de absorvâncias à 605nm, da *Acinetobacter johnsonii* B7.

Período Avaliado (dias)	Valores de absorvância (605nm)	Áreas dos picos (HPLC)
<i>Padrão de Linamarina: 5.921.678 Pureza: 80,7%</i>		
1	0,017	153.904
2	0,019	147.660
3	0,032	142.753
4	0,030	138.679
5	0,040	115.570
6	0,038	76.970
7	0,025	9.383

Anexo 7: Áreas dos picos de linamarina, apresentados por cromatogramas expressos pelo HPLC, e valores de absorvâncias à 605nm da *Rhodotorulla glutinis* L1.

Período Avaliado (dias)	Valores de absorvância (605nm)	Áreas dos picos (HPLC)
<i>Padrão de Linamarina: 5.921.678 Pureza: 80,7%</i>		
1	0,050	455.373
2	0,133	166.077
3	0,142	66.048
4	0,139	64.414
5	0,143	55.250
6	0,141	54.344
7	0,138	54.047

Anexo 8: Teores de linamarina em meio mínimo expressos em (%), apresentados pelos microrganismos selecionados, durante o período avaliado, 7 dias.

	<i>Período avaliado (dias)</i>						
	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>
<i>Linhasgens</i>	<i>Teores de Linamarina (%)</i>						
B1	14,0	16,0	8,0	8,0	7,0	6,0	2,0
B2	2,4	1,9	1,5	1,4	1,1	0,5	0,2
B3	8,3	7,6	4,4	4,3	4,2	3,8	2,4
B4	0,5	0,4	0,4	0,3	0,3	0,2	0,1
B5	0,6	0,5	0,5	0,4	0,4	0,3	0,2
B6	0,7	0,6	0,5	0,2	0,2	0,2	0,1
B7	2,1	1,9	1,9	1,8	1,6	1,0	0,1
L1	2,1	2,0	1,9	1,8	1,6	1,0	0,1

Anexo 9: Teores de linamarina em meio mínimo expressos em (mg/ml), apresentados pelos microrganismos selecionados, durante o período avaliado, 7 dias.

	<i>Período avaliado (dias)</i>						
	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>
<i>Linhagens</i>	<i>Teores de Linamarina (mg/ml)</i>						
B1	4,5	5,1	2,6	2,6	2,2	1,9	0,6
B2	7,7	6,1	4,8	4,5	3,5	1,6	0,6
B3	74,7	68,4	39,6	38,7	37,8	34,2	21,6
B4	0,9	0,9	0,8	0,5	0,5	0,5	0,3
B5	1,2	1,0	1,0	0,9	0,8	0,5	0,4
B6	1,3	1,2	0,9	0,4	0,2	0,2	0,1
B7	6,7	6,1	6,1	5,8	5,1	3,2	0,3
L1	6,7	6,4	6,1	5,8	5,1	3,2	0,3

Anexo 10: Valores de absorvância apresentados pelas amostras de manipueira à 50% inoculadas pelas diferentes concentrações de *Serratia marcescens*, e amostra controle, isenta de inóculo.

<i>Inóculo</i>	<i>Período Avaliado (dias)</i>						
	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>
0,5x10 ⁸	0,4032	0,9531	0,8663	1,1439	1,2068	1,1258	1,3594
15x10 ⁸	0,4487	0,9496	0,8966	1,2421	1,3402	1,0865	1,5575
Controle	0,3794	0,9763	0,9492	1,3455	1,3200	1,4598	1,4890

Anexo 11: Variações do pH do meio no decorrer do período de 6 dias de incubação à 28°C.

<i>Inóculo</i>	<i>Período Avaliado (dias)</i>						
	<i>0</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>
0,5x10 ⁸	6,0	4,0	4,0	5,3	7,0	7,0	8,0
15 x10 ⁸	6,0	4,0	4,0	6,0	7,3	7,0	8,0
Controle	6,0	4,0	4,0	5,6	7,3	5,3	5,3

Anexo 12: Teores de HCN total ao início (0 dia) e término (6 dias) do período de incubação das amostras e taxas de redução destes teores.

<i>Concentrações de inóculo</i>	<i>Teor de HCN total - inicial</i>	<i>Teor de HCN total - final</i>	<i>Redução do teor de HCN total</i>
	<i>mg/l</i>	<i>mg/l</i>	<i>%</i>
0,5x10 ⁸	34,42	0,45	98,69
15 x10 ⁸	34,42	0,33	99,04
Controle	34,42	0,31	99,09

Anexo 13: Teores de HCN livre ao início (0 dia) e término (6 dias) do período de incubação das amostras e taxas de redução destes teores.

<i>Concentrações de inóculo</i>	<i>Teor de HCN livre inicial</i>	<i>Teor de HCN livre final</i>	<i>Redução do teor de HCN livre</i>
	<i>mg/l</i>	<i>mg/l</i>	<i>%</i>
0,5x10 ⁸	4,33	0,41	90,53
15 x10 ⁸	4,33	0,44	89,84
Controle	4,33	0,54	87,53

Anexo 14: Teores de carbono orgânico total presente nas amostras de manipueira à 50%, em presença de concentrações diversas de inóculo, ou isentas do mesmo (controle), ao início e término do período de incubação.

<i>Amostra</i>	<i>TOC - Inicial</i>	<i>TOC - Final</i>	<i>Redução do TOC</i>
	<i>mg/l</i>	<i>mg/l</i>	<i>%</i>
0,5x10 ⁸	19.630	17.040	13,19
15x10 ⁸	30.280	18.530	38,80
Controle	37.320	14.050	62,35

Anexo 15: Descrição dos valores de absorvância obtidos no decorrer do período de incubação das amostras de manipueira.

<i>Amostras</i>	Período de incubação (dias)						
	<i>0</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>
100%	0,7581	1,1496	1,2017	1,3044	1,7911	1,6623	1,7694
75%	0,5239	0,9223	1,2511	1,1546	1,4311	1,6248	1,7991
50%	0,3939	0,6705	0,7851	0,9704	1,1743	1,7285	1,4999
25%	0,1380	0,3541	0,5135	0,5130	0,6957	0,6831	1,0075
Controle	0,5740	1,0941	1,3721	1,3106	1,7128	1,6825	1,9196

Anexo 16: Valores de pH apresentados pelas amostras de manipueira, em suas respectivas concentrações, no decorrer de 6 dias avaliados.

<i>Amostras</i>	0 dia	1 dia	2 dias	3 dias	4 dias	5 dias	6 dias
100%	6,0	4,0	4,0	4,0	5,0	5,0	5,0
75%	6,0	4,0	4,0	4,0	5,0	5,0	7,0
50%	6,0	4,0	4,0	4,0	5,0	5,0	7,0
25%	6,0	4,0	4,0	4,0	5,0	5,6	5,6
Controle	6,0	4,0	4,0	4,0	5,0	5,0	5,0

Anexo 17: Teores de HCN total presentes nas amostras ao início e término do período de avaliação e a porcentagem de redução dos mesmos.

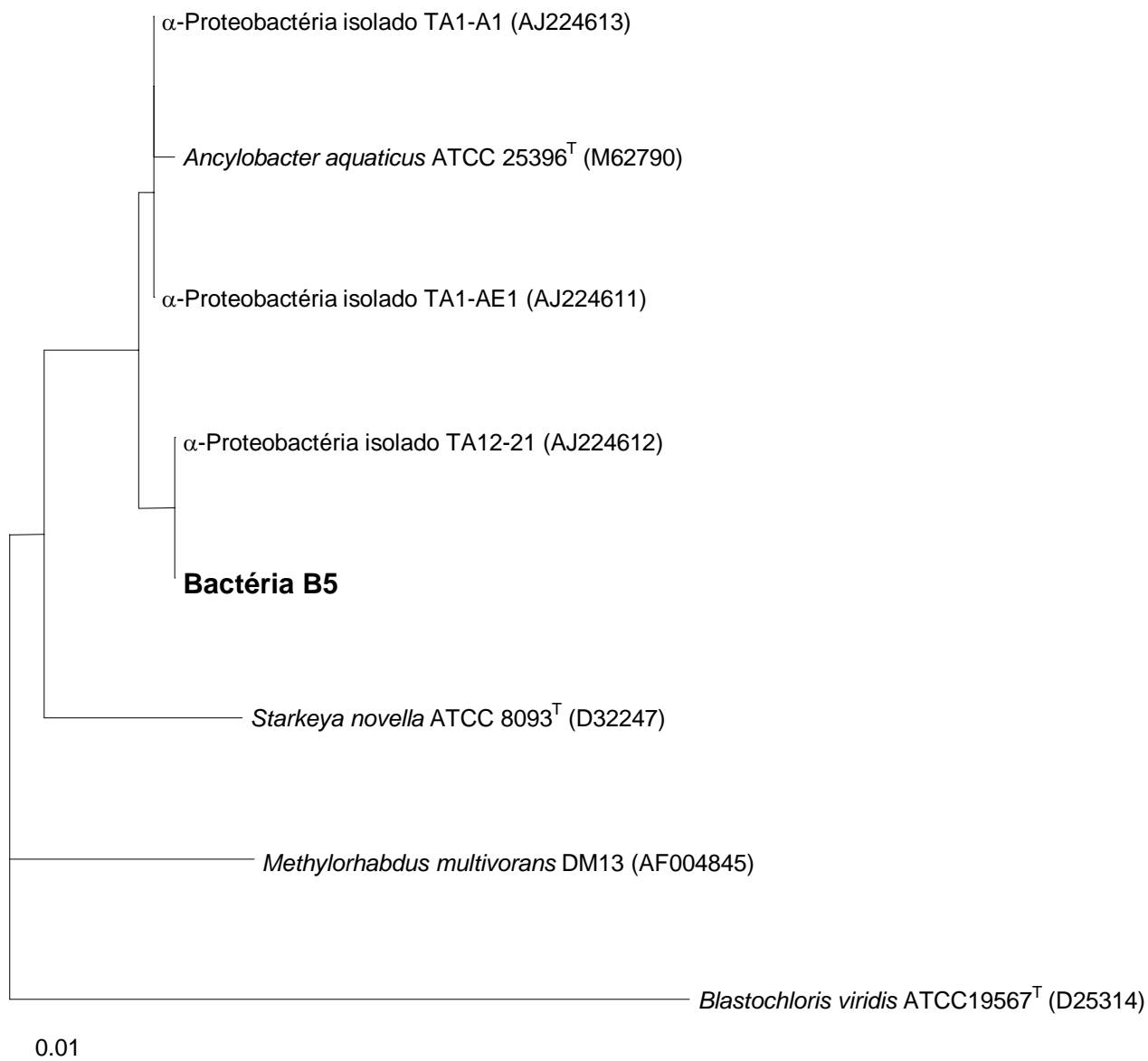
<i>Concentrações de manipueira</i>	<i>Teor de HCN total inicial</i>	<i>Teor de HCN total final</i>	<i>Redução do teor de HCN total</i>
	<i>mg/l</i>	<i>mg/l</i>	<i>%</i>
100%	230,88	49,15	78,71
75%	169,00	21,09	87,52
50%	86,98	17,73	79,62
25%	44,75	8,52	80,96
Controle (100%)	262,41	95,68	63,54

Anexo 18: Teores de HCN livre presentes nas amostras ao início e término do período de avaliação e a porcentagem de redução dos mesmos.

<i>Concentrações de manipueira</i>	<i>Teor de HCN livre inicial</i>	<i>Teor de HCN livre final</i>	<i>Redução do teor de HCN livre</i>
	<i>mg/l</i>	<i>mg/l</i>	<i>%</i>
100%	22,21	7,06	68,21
75%	15,62	5,45	65,11
50%	14,26	3,57	74,96
25%	5,60	1,00	82,14
Controle (100%)	44,34	4,11	90,74

Anexo 19: Teores de carbono orgânico total ao início(0 dia) e ao término do período de incubação (6 dias), e taxas de redução dos mesmos.

<i>Amostra</i>	<i>TOC - Inicial</i>	<i>TOC - Final</i>	<i>Redução do TOC</i>
	<i>mg/l</i>	<i>mg/l</i>	<i>%</i>
100%	39.160	27.170	30,62
50%	39.390	21.030	46,61
75%	28.450	18.350	35,50
25%	16.840	12.980	22,92
Controle	31.200	25.660	17,76



Anexo 20: Árvore filogenética baseada na análise de sequências parciais do rRNA 16S da bactéria B5. Os números entre parênteses correspondem ao acrônimo de acesso na base de dados Genbank. ATCC: *American Type Culture Collection* (Coleção Americana de Culturas Puras, EUA).