

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN - TACNA

Facultad de Ciencias

Escuela Profesional de Biología - Microbiología

Evaluación de la capacidad degradadora de cianuro por bacterias aisladas de ambientes mineros de la provincia de Candarave, región de Tacna.

TESIS

Presentada por:

Bach. Sandra Luzbenia Gutierrez Acarapi

Para optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO - MICROBIÓLOGO

TACNA - PERÚ

2018

Acta de Sustentación N° 313

En la ciudad de Tacna, en el salón auditorium de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, siendo las 10:43 horas del 26 de Junio del 2018, estando presente el jurado calificador nominado por Resolución de Facultad N° 9094-2018-FACI-UN/JBG, conformado por los siguientes docentes :

Dr. Daladier Miguel Castillo Cotrina	Presidente
Mblgo Luis Lloja Lozano	Miembro
Mblga Liduvina Sulca Quispe	Secretaria

Acto seguido, se dio lectura a la Resolución correspondiente y del mismo modo se dio lectura al artículo 22 del Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad de Ciencias. A continuación el presidente del Jurado Calificador instó a la Bachiller Sandra Luzbenia Gutierrez Acarapi a exponer la tesis titulada: **Evaluación de la capacidad degradadora de cianuro por bacterias aisladas de ambientes mineros de la provincia de Candarave, región de Tacna.**

Siendo las 11:09 horas la tesista concluye la exposición, luego se procedió a la formación de las preguntas por parte de los miembros del Jurado calificador. Terminado este proceso, se invitó a que los miembros del jurado emitan su calificación de acuerdo al reglamento.

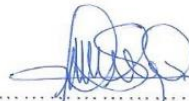
El promedio de la calificación dio el siguiente resultado:

APROBADO por **UNANIMIDAD** con el calificativo de 14 (bueno) de acuerdo al reglamento de Grados y Títulos de la Facultad de Ciencias.

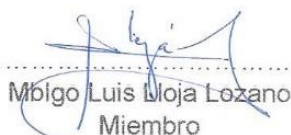
Siendo las 12:06 horas se dio por concluido el acto de Sustentación firmando los miembros del Jurado en señal de conformidad.



Dr. Daladier Miguel Castillo Cotrina
Presidente



Mblga Liduvina Sulca Quispe
Secretaria



Mblgo Luis Lloja Lozano
Miembro

AGRADECIMIENTO

A Dios por darme la vida, por cuidarme y estar conmigo en todo momento dándome las fuerza para llegar a cumplir mis metas y llegar a concluir esta etapa de mi vida.

A mis padres por su amor, apoyo y comprensión en cada etapa de mi vida, por sus consejos en los momentos más necesarios.

A mí querido esposo por su apoyo incondicional y por impulsarme a lograr mis sueños y deseo de superación día a día.

A Giselita por su amistad incondicional y estar siempre a mi lado apoyándome a seguir adelante.

A Milena por su amistad y ayuda desinteresada en la realización del presente trabajo.

A mi asesor de tesis Dr. César Cáceda Quiroz por su apoyo en la elaboración y ejecución del presente trabajo de investigación, además por su aporte científico, sus acertados consejos y su paciencia para conmigo que sirvieron de mucho en la elaboración del presente informe de tesis.

Al Mblo. Edwin, por su apoyo en la vida universitaria y el desarrollo de la tesis, quien con sus conocimientos me ayudó en el desarrollo de la tesis y quien me motivó valorar el tiempo y aprovechar a lo máximo cada día de mi vida.

A cada una de las personas que he conocido a lo largo de mi vida universitaria y han sido de gran apoyo, motivación y fortaleza para llegar al objetivo que me he permitido soñar.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS.....	VI
ÍNDICE DE CUADROS.....	VII
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	VIII
ÍNDICE DE ANEXOS.....	XI
RESUMEN.....	X
ABSTRACT.....	XI
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Planteamiento del problema.....	2
1.1.1. Antecedentes	5
1.1.2. Fundamento del problema.....	9
1.2. Hipótesis.....	12
1.3. Objetivos.....	13
1.3.1. Objetivo general.....	13
1.3.2. Objetivos específicos.....	13

1.4. Marco teórico.....	14
1.4.1. El cianuro.....	14
1.4.2. El cianuro en solución	14
1.4.3. Cianuro libre	15
1.4.4. Complejos de cianuro.....	17
1.4.5. Compuestos cianurados simples.....	18
1.4.6. Compuestos derivados del cianuro.....	19
1.4.7. Fuentes del cianuro.....	19
1.4.8. Bacterias degradadoras de cianuro.....	22
1.4.9. Contaminación por cianuro	25
1.4.10. Toxicidad del cianuro.....	26
1.4.11. Tratamientos biológicos de compuestos cianurados....	28
1.4.12. Vías metabólicas enzimáticas para la degradación del cianuro.....	32
1.4.13. Condiciones requeridas para la degradación microbiana del cianuro.....	33
II. MATERIALES Y MÉTODO.....	40
1.1. Ubicación y determinación del área de estudio.....	40
1.2. Material de estudio.....	40
1.3. Operacionalización de variables.....	41
1.4. Muestreo y toma de muestras.....	41

1.5. Tipo de investigación.....	43
1.6. Diseño de investigación.....	43
1.7. MÉTODO.....	44
1.7.1. Suspensión de la muestra	44
1.7.2. Enriquecimiento selectivo de bacterias degradadoras de cianuro.....	44
1.7.3. Aislamiento de bacterias degradadoras de cianuro.....	45
1.7.4. Caracterización microscópica y macroscópica	46
1.7.5. Identificación de bacterias degradadoras de cianuro....	46
1.7.6. Evaluación de la tolerancia a pH alcalino.....	47
1.7.7. Evaluación de la tolerancia a diferentes concentraciones de cianuro.....	48
1.7.8. Producción del inóculo bacteriano	49
1.7.9. Evaluación de la degradación del cianuro.....	50
1.7.10. Evaluación del crecimiento microbiano.....	50
1.7.11. Determinación del cianuro por volumetría	51
 III. RESULTADOS.....	 53
3.1. Selección e identificación de bacterias degradadoras de cianuro.....	 53

3.2. Evaluación de la tolerancia a pH alcalinos.....	57
3.3. Evaluación de la tolerancia a diferentes concentraciones de cianuro.....	58
3.4. Cuantificación de la capacidad degradadora de cianuro por <i>Micrococcus sp</i> y <i>Corynebacterium sp</i>	62
3.5. Análisis estadístico.....	67
IV. DISCUSIÓN.....	68
V. CONCLUSIONES.....	75
VI. RECOMENDACIONES.....	76
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77
VIII. ANEXOS.....	96

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Complejos cianurados.....	14
Tabla 2.	Ventajas y desventajas relacionadas con la degradación biológica del cianuro.	28
Tabla 3.	Comparación de las investigaciones sobre la biodegradación del cianuro.....	30
Tabla 4.	Categorías generales de las reacciones enzimáticas de degradación del cianuro.....	34
Tabla 5.	Ubicación de los puntos de muestreo.....	42
Tabla 6.	Caracterización microscópica y macroscópica de las cepas aisladas de los ambientes mineros de la Provincia de Candarave.....	53
Tabla 7.	Identificación bioquímica de la cepa bacteriana 7 aislada de los ambientes mineros de la Provincia de Candarave - <i>Micrococcus sp.</i>	56
Tabla 8.	Identificación bioquímica de la cepa bacteriana 12 aislada de los ambientes mineros de la Provincia de Candarave - <i>Corynebacterium sp.</i>	56

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1:	Evaluación de la tolerancia a pH alcalinos de las cepas aisladas de ambientes mineros de la Provincia de Candarave.....	57
Cuadro 2:	Evaluación del primer día de las cepas aisladas de ambientes mineros de la Provincia de Candarave en la tolerancia a diferentes concentraciones de cianuro	58
Cuadro 3:	Evaluación del segundo día de las cepas aisladas ambientes mineros de la Provincia de Candarave en la tolerancia a diferentes concentraciones de cianuro.....	59
Cuadro 4:	Evaluación del tercer día de las cepas aisladas de ambientes mineros de la Provincia de Candarave en la tolerancia a diferentes concentraciones de cianuro	60
Cuadro 5:	Evaluación del cuarto día de las cepas aisladas de ambientes mineros de la Provincia de Candarave en la tolerancia a diferentes concentraciones de cianuro	61
Cuadro 6:	Concentración de cianuro degradado y crecimiento microbiano por <i>Micrococcus sp</i> y <i>Corynebacterium sp</i> , con sus repeticiones en 10 días de evaluación (ppm)	62

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1:	Curvas de degradación de cianuro y crecimiento microbiano por bacterias aisladas de ambientes mineros en 10 días de evaluación.....	64
Gráfico 2:	Evaluación de <i>Micrococcus sp</i> en la degradación de cianuro en relación con el crecimiento microbiano en 10 días de evaluación.	65
Gráfico 3:	Evaluación de <i>Corynebacterium sp</i> en la degradación de cianuro en relación con el crecimiento microbiano en 10 días de evaluación	66

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Medios de Cultivo.....	96
Anexo 2: Panel Fotográfico.....	97
Anexo 3 : Determinación de Cianuro Libre (CN ⁻) por volumetría	102

RESUMEN

El cianuro es utilizado en el ámbito minero e industrial. El cual es muy tóxico y letal por su acción como un potente inhibidor del metabolismo celular.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad degradativa del cianuro por bacterias aisladas de ambientes mineros procedentes de la provincia de Candarave. Se tomaron 6 muestras de tierra de ambientes mineros procedente de la compañía Minera Apacheta Quella S.A. Minera del Norte S.A. Se aislaron 12 cepas, las cuales 2 cepas bacterianas se identificaron mediante pruebas bioquímicas, *Micrococcus sp* y *Corynebacterium sp*, los cuales obtuvieron un buen desarrollo en la evaluación de pH y tolerancia de cianuro hasta 100 mg/L de CN⁻.

En la evaluación de la capacidad de degradación de cianuro *Micrococcus sp* mostró una degradación a 9 ppm (91 %) y *Corynebacterium sp* 50 ppm (50 %) en 10 días conteniendo 100 mg/L CN a temperatura ambiente, pH 9,5 y en biorreactores aireados a 1,8 volumen de aire por volumen del medio por minuto (VVM).

ABSTRACT

Cyanide is used in the mining and industrial field. Which is very toxic and lethal because of its action as a powerful inhibitor of cellular metabolism.

The objective of this work was to evaluate the degradation capacity of cyanide by bacteria isolated from mine tailings from the province of Candarave. Six samples of soil from mining environments were taken from the company Minera Apacheta Quella S.A. Minera del Norte S.A. Twelve strains were isolated of which 2 bacterial strains were identified by biochemical tests, *Micrococcus sp* and *Corynebacterium sp*, which obtained a good development in the evaluation of pH and tolerance of cyanide up to 100 mg / L of CN⁻.

In the evaluation of the degradation capacity of cyanide *Micrococcus sp* showed degradation 9 ppm (91 %) and *Corynebacterium sp* 50 ppm (50 %) respectively in 10 days at 100 mg / L CN, room temperature and pH 9.5 in aerated bioreactors 1.8 volume of air per volume of medium per minute (VVM).

I. INTRODUCCIÓN

En América Latina, el Perú es el primer país en producir oro, estaño, molibdeno, zinc y plomo; asimismo, es el tercer país en producir cobre y plata a nivel mundial. El sector minero aurífero en el Perú tiene una producción activa en promedio entre los 5 y 6 millones de onzas por año. Asimismo, este sector se encuentra frente a la formalización de la pequeña minería, la cual representa un 20 % del oro producido en el país.

El cianuro es un compuesto tóxico que se utiliza por la industria minera para la extracción y recuperación de metales como el oro, plata, plomo, cobre y zinc; este compuesto es desechado en el ambiente, generando prejuicios irreversibles en las fuentes de agua, flora y fauna de nuestro país. Persistiendo en el ambiente y teniendo como producto final el ácido cianhídrico, compuesto muy volátil y letal, para todo tipo de seres vivos porque actúa sobre el sistema respiratorio, inhibiendo la enzima citocromo oxidasa, impidiendo el uso de oxígeno.

Algunos investigadores han realizado estudios con microorganismos y han encontrado diferentes rutas para la degradación de cianuro por parte de bacterias y hongos, conduciendo en la mayoría de los casos a la conversión del cianuro a amonio como producto final. (Castillo, 2005)

En este trabajo se hace mención del aislamiento de 12 cepas bacterianas degradadoras de cianuro que se aislaron de ambientes mineros de la provincia de Candarave, región de Tacna. Estas bacterias se aislaron y caracterizaron usando medios de cultivo enriquecidos y medios de cultivo selectivos, para poder evaluar la capacidad degradadora de cianuro. Estos resultados obtenidos podrán ser empleados como alternativas en futuros procesos de biorremediación en ambientes contaminados con cianuro.

1.1. Planteamiento del problema

En el Perú la industria minera es uno de los principales pilares de la economía nacional. Sin embargo, éstas generan pasivos mineros. La Ley N° 28271, que regula los pasivos ambientales de la actividad minera, define los PAM (Pasivos Ambientales Mineros) como: "... todas las instalaciones, efluentes, emisiones, restos o depósitos de residuos producidos por operaciones mineras, en la actualidad abandonadas o inactivas y que constituyen un riesgo permanente y potencial para la salud de la población, el ecosistema circundante y la propiedad" (Ley N° 28271.Fondo Nacional de Ambiente, Perú, 18 de febrero de 2004).

En la provincia de Candarave existe un población de 3 174 habitantes, aproximadamente. En el cual existen pequeñas mineras que se dedican a la explotación de azufre, actualmente los trabajos se encuentran paralizados. Las minas se encuentran cerca al volcán Tutupaca en el distrito y provincia de Candarave, en el límite de los departamentos de Tacna y Moquegua a unos 207 km de la ciudad de Tacna y sobre 4500 msnm.

Según la Dirección General de Minería en la actualización del inventario inicial de pasivos ambientales mineros, aprobado por Resolución Ministerial N° 535-2016-MEM/DM publicado en el diario oficial “El Peruano” el 22 de diciembre 2016, se han identificado 8 854 pasivos ambientales mineros (PAM) en el Perú entre los años 2006 – 2016 y en Tacna se han registrado 184 pasivos ambientales mineros (MINISTERIO DE ENERGÍA Y MINAS, PERU, 2006 - 2016, Actualización-Inventario de Pasivos Ambientales Mineros. (http://www.minem.gob.pe/_detalle.php?idSector=1&idTitular=5769&idMenu=sub5768&idCateg=961)).

El cianuro es un producto químico que usado en la extracción del oro y otros usos industriales. Los residuos que se producen por el uso del cianuro son descargados en grandes cantidades sin ningún tratamiento, los efluentes a ciertas concentraciones con

cianuro pueden llegar a ser peligrosos para el ser humano y ocasionar un gran impacto en el medio ambiente.

En aguas naturales no contaminadas, los compuestos de cianuro están raramente presentes en concentraciones medibles.

Sin embargo, el cianuro se encuentra masivamente en las aguas residuales de las industrias como el plástico, los fertilizantes, herbicidas, colorantes y farmacéutica. En estas aguas las concentraciones de cianuro pueden ser hasta 10 000 000 veces por litro mayores que en condiciones naturales (Gurbuz, F.; Hasan, C. & Akcil, A, 2009).

Por esta razón es de gran importancia tratar estos residuos, tal es el caso que existen varios métodos que se emplean en tratamientos físicos y químicos para la remediación de ambientes contaminados. Sin embargo, el uso de métodos biológicos es una alternativa que emplean para el tratamiento de los residuos contaminados con cianuro considerando el metabolismo de esos microorganismos (bacterias y hongos), los cuales se adaptan a diferentes condiciones de crecimiento.

La gran variedad de microorganismos que se encuentran en un lugar específico, informan acerca de cómo estos permiten

encontrar soluciones a problemas ambientales complejos, tales como: degradación y pérdida de suelos, regeneración de plantaciones forestales, contaminación ambiental, etc. El uso de tales agentes debe tener implícita una estrategia de conservación y preservación (Cornejo, 2016).

Por eso el aislamiento, caracterización e identificación de bacterias en ambientes mineros procedentes de zonas mineras, es una alternativa viable para encontrar microorganismos eficaces en la biorremediación de cianuro.

1.1.1. Antecedentes

La degradación microbiana del cianuro fue estudiada por primera vez a mediados de 1950. Según Mudder y Whitlock (1984), emplearon una cepa mutante de *Pseudomonas paucimobilis* para degradar cianuros, tiocianatos y complejos cianurados presentes en aguas residuales y cuya primera demostración comercial exitosa fue en la industria minera por la Homestake Gold Mine, USA a mediados de 1980 (Akcil & Mudder, 2003).

Según Fernández, Dolgih & Kunz, (2004) usaron la cepa *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764, con el objetivo de realizar la extracción y purificación de la enzima cianuro oxigenasa, a partir de un medio mínimo con glucosa y amonio, la inducción enzimática se realizó adicionando al medio 0,1 mM de KCN, para la obtención del inóculo las células fueron lavadas y resuspendidas en una solución de buffer fosfato a pH 7 (Fernandez, Dolgih, & Kunz., 2004).

Según Luque Almagro, Huertas, M. J., Martínez, M., Moreno, C., Roldán, M. D.; García, L. J. Castillo, F. y Blasco, R., (2005), aislaron una cepa de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344, empleando un medio de cultivo mínimo preparado sin amonio y citrato, a pH 9,5 con 2 mM de NaCN y 50 mM de acetato como únicas fuentes de nitrógeno y carbono respectivamente (Luque - Almagro, V. M.; Huertas, M. J.; Martínez, M.; Moreno, C.; Roldán, M. D.; García, L. J.; Castillo, F. & Blasco, R., 2005).

El Grupo de Investigación de Procesos Ambientales y Biotecnológicos - GIPAB, de la Universidad EAFIT (“Foto degradación de cianuros libres presentes en una corriente residual” y “Tratamiento de aguas residuales contaminadas con cianuro”), obtuvieron un aislado nativo procedente del efluente de una empresa

de recubrimientos metálicos ubicada en el Valle de Aburrá, según las pruebas bioquímicas, fisiológica y morfológica resultó ser compatible con la especie *Pseudomonas fluorescens*, que fue cultivada en un medio de cultivo enriquecido con glucosa y cianuro a un pH de 9,5, con una buena respuesta de degradación, alrededor del 96 %, a las 72 horas, con una concentración inicial de cianuro de 15 mg/L y una velocidad de agitación de 200 rpm, se obtuvo una concentración final menor a 1 mg/L (Gil-Pavas Eh, Giraldo - Estrada C, Camargo Pa Y Ossa C.,2005).

Según Coley y Zapata (2006) lograron aislar 6 especies diferentes a partir de un efluente de una empresa de recubrimientos metálicos ubicada en el Valle de Aburrá , las cuales se adaptaron a una concentración máxima de cianuro de 150 mg/L. Los microorganismos identificados fueron como *Pichia ohmeri*, *Exophiala spp*, *Candida spp*, *Staphylococcus spp*, *Pseudomonas spp* y *Rhodotorula mucilaginosa*. Los microorganismos con mayores velocidades de degradación fueron *Pichia ohmeri*, *Exophiala spp*, con valores de 2,3166 mg/Lh y 2,3109 mg/Lh respectivamente y los de menores velocidades de degradación fueron *Candida spp* con una valor de 1,9747 mg CN/Lh y *Staphylococcus spp* con un valor de 1,7664 mg CN/Lh. Todos los microorganismos tuvieron un

porcentaje de remoción de cianuro cercano al 97 %; lo cual significa que son una buena alternativa para el tratamiento de aguas residuales contaminadas con cianuro (Coley Benjumea Tatiana & Zapata Zuluaga Diana, 2006).

Según la Dirección General de Minería en la actualización del inventario inicial de pasivos ambientales en el Perú entre el año 2006 hasta el 2016 se han identificado en Tacna 184 pasivos ambientales mineros de los cuales se ha identificado 52 residuos mineros (MINISTERIO DE ENERGÍA Y MINAS, PERÚ, 2006 - 2016, Actualización-Inventario de Pasivos Ambientales Mineros. http://www.minem.gob.pe/_detalle.php?idSector=1&idTitular=5769&idMenu=sub5768&idCateg=961).

Según Mosquera (2013) menciona que las bacterias que contienen la enzima nitrilo hidratasa tales como *Bacillus sp.* y *Corynebacterium sp C5*, se han utilizado en la industria para producir ácidos carboxílicos a partir del compuesto correspondiente nitrilado.

Según Calisaya (2015) menciona que se logró aislar y caracterizar molecularmente el ARNr 16S de un cepa degradadora de cianuro, en muestras de aguas residuales municipales e

industriales de Magollo, Tacna. La cepa seleccionada se identificó como *Klebsiella sp* ALL-1.

1.1.2. Fundamento del problema

El cianuro es empleado en la industria minera y en varios procesos industriales, tales como producción de nylon, plásticos acrílicos, producción de goma sintética, galvanoplastia, endurecimiento de metales, aplicaciones fotográficas, pesticidas, productos farmacéuticos, extracción minero metalúrgica de oro y otros metales.

Aunque el cianuro es considerado como una sustancia altamente tóxica para los seres vivos, se puede transformar en otras sustancias menos tóxicas mediante procesos físicos, químicos y biológicos, descomponiéndolo y haciéndolo no persistente en el ambiente (Logsdon, M. J., Hagelstein, K., & Mudder, T., 2001).

Dentro de las numerosas tecnologías existentes para la remediación del cianuro, la degradación biológica tiende a ser una buena alternativa. El empleo de microorganismos que proliferan en ambientes de lixiviación con cianuro y su capacidad para utilizar este

químico como fuente de nutrientes, específicamente de nitrógeno, convierte a esta tecnología en una valiosa herramienta natural para propósitos ambientales. Por lo tanto, estas tecnologías más limpias, en especial la biorremediación, requieren el conocimiento sobre microorganismos ambientales, ya que dan información que permite el desarrollo de actividades biotecnológicas de remediación. En un primer acercamiento, la ecología microbiana permite de forma inicial conocer qué microorganismos están presentes en cierto nicho y de esta forma caracterizar y conocer su papel en estos ambiente (Johnson, 2001; Torres-Cázares K.L., Casas-Flores S., García-Meza J.V.,2012).

La ecología microbiana en minas ha sido de gran interés en los últimos años, ya que ha dilucidado información del papel fundamental de los microorganismos en estos ambientes, que generalmente son hostiles como biolixiviación de minerales (Muñoz Echeverri, L. M., Márquez G., M. A., & Gallego Suarez, D. De J., 2015). La diversidad y distribución de microorganismos está influenciada por la composición de la matriz geoquímica de los microhabitats y la introducción de sustancias tóxicas o contaminantes que causa cambios en la estructura, diversidad y

función de la comunidad microbiana asociada al lugar (Dhal, P. K., Islam, E., Kazy, S. K., & Sar, P., 2011).

Las condiciones extremas de los ambientes mineros pueden referirse a condiciones físicas extremas como temperatura, presión o radiación y a condiciones geoquímicas extremas como la salinidad y el pH (Restrepo, O. J., Montoya, C. A., & Muñoz, N. A., 2006).

Algunos estudios demuestran que muchos de estos microorganismos pueden tolerar y sobrevivir a estos ambientes contaminados, considerando una buena opción para la biorremediación de ambientes contaminados debido a su capacidad de adaptarse a condiciones extremas. Asimismo, es importante recalcar que los ambientes o zonas mineras son espacios modificados por la intrusión del hombre, eliminando la existencia de cepas nativas y así alteran el nicho ecológico a los cuales estos están adaptados, es por ello que estos microorganismos son de importancia en el estudio de estos temas de biorremediación.

A pesar de que los terrenos mineros son ambientes creados por el ser humano, son gobernados por reglas ecológicas, tales como las relaciones simbióticas entre quimiolitótrofos y su ambiente (Torres- Cázares et al., 2012). Por esta razón, aislar e identificar las

cepas nativas presentes, requiere de un amplio estudio de métodos independientes y dependientes de cultivo. Por un lado, una ventaja del uso de métodos dependientes de cultivo es estudiar características fisiológicas y estructurales de los aislados, por otro lado, representa una herramienta invaluable para estudiar la biología y ecología asociada a bacterias (Vaz-Moreira, I., Egas, C., Nunes, O. C., & Manaia, C. M., 2013).

1.2. HIPÓTESIS

Las cepas bacterianas aisladas de los ambientes mineros de la provincia de Candarave tienen una buena capacidad degradadora de cianuro que pueden emplearse para tratar ambientes contaminados.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. Objetivo general

- Evaluar la capacidad degradadora del cianuro por bacterias aisladas de ambientes mineros procedentes de la provincia de Candarave.

1.3.2. Objetivos específicos

- Aislar y seleccionar bacterias degradadoras de cianuro en muestras de ambientes mineros procedentes de la provincia de Candarave.
- Identificar las bacterias con mayor tolerancia al cianuro por medio de pruebas bioquímicas.
- Evaluar a escala de laboratorio la capacidad degradadora del cianuro por bacterias aisladas con mayor tolerancia al cianuro.

1.4. MARCO TEÓRICO

1.4.1. El cianuro

El término cianuro sirve para designar a una familia de compuestos químicos que se caracterizan por la presencia de un átomo de carbono enlazado a un átomo de nitrógeno mediante un enlace triple ($-C\equiv N$). Más generalmente, se llama cianuro a una variedad amplia de compuestos que contienen este grupo químico (Álvarez, 2005).

1.4.2. El cianuro en solución

Entre los compuestos de cianuro presentes en las disoluciones y/o efluentes mineros u otros procesos de cianuración, figuran el cianuro libre, las sales alcalinotérreas y los complejos cianurados metálicos formados con oro, mercurio, cinc, cadmio, plata, cobre, níquel, hierro y cobalto (Smith y Mudder, 1991). Éstos se clasifican en cinco categorías generales (Tabla 1).

Tabla 1. Complejos cianurados

Clasificación	Compuesto
1. Cianuro Libre	CN^- , HCN

2. Cianuros Simples	
2.1. fácilmente solubles	NaCN, KCN, Ca(CN) ₂ , Hg(CN) ₂
2.2. sales neutras insolubles	Zn(CN) ₂ , Cd(CN) ₂ , Cu(CN), Ni(CN) ₂ , Ag(CN)
3. Cianuros complejos débiles	Zn(CN) ₄ ⁻² , Cd(CN) ₃ ⁻¹ , Cd(CN) ₄ ⁻²
4. Cianuros complejos moderadamente fuertes	Cu(CN) ₂ ⁻¹ , Cu(CN) ₃ ⁻² , Ni(CN) ₄ ⁻² , Ag(CN) ₂ ⁻¹
5. Cianuros complejos fuertes	Fe(CN) ₆ ⁻⁴ , Co(CN) ₆ ⁻⁴ , Au(CN) ₂ ⁻¹ , Fe(CN) ₆ ⁻³

Fuente: Smith y Mudder, 1991

1.4.3. Cianuro libre

“Cianuro libre” es el término utilizado para el ión de cianuro (CN⁻) y para el cianuro de hidrógeno (HCN) que se forma en la solución. Casi todo el cianuro libre está presente como HCN cuando hay abundantes iones de hidrógeno presentes, es decir, a un valor de pH de 9,3 o menos, por lo tanto, este producto puede volatilizarse y dispersarse en el aire. El cianuro libre, especialmente el gas HCN a un pH de 9,31 o menos es un agente tóxico para el medio ambiente (Mudder, T. I.; Botz, M. & Smith, A. 2001).

Cuando el pH es superior a 10,5, hay pocos iones de hidrógeno por lo que casi todo el cianuro libre está presente como CN^- ; en cambio en condiciones normales de temperatura y presión, las concentraciones de HCN y CN^- son iguales a un valor de pH de aproximadamente 9,4.

La medida en que esta reacción se desplace a uno u otro lado depende casi exclusivamente del pH de la solución (Figura 1). Si el pH no es muy elevado, la concentración de protones (H^+) en el agua será importante y la reacción (1) se encontrará desplazada a la derecha. Así, a valores de pH bajos, predominará el HCN (fase estable) sobre el CN^- . En cambio, si el pH es elevado, la concentración de protones será pequeña y la reacción (1) estará desplazada hacia la izquierda, predominando entonces la forma aniónica. En condiciones normales de temperatura y presión, las concentraciones de HCN y CN^- son iguales a un valor de pH de aproximadamente 9,24 (Álvarez, 2005; Dzombak, D. A.; Rajat, S.; Ghosh, G. M. & Wong-Chong, G. M., 2006).

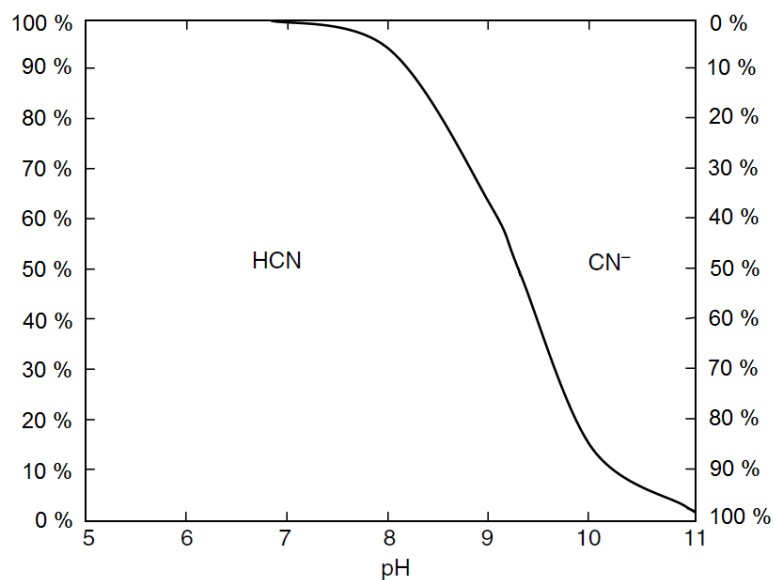


Figura 1. Distribución del HCN y el CN⁻ en una solución acuosa (pKa=9,24 a 25 °C) (Fuente: Dzombak et al., 2006)

Sólo el CN⁻ forma complejos con metales y únicamente el HCN es volátil a partir de soluciones acuosas, por esta razón los procesos de cianuración deben operar a pH alcalinos; de otra forma el CN⁻ se perdería por volatilización, ya que el punto de ebullición del HCN es de 25,7 °C (Smith y Mudder, 1991).

1.4.4. Complejos de cianuro

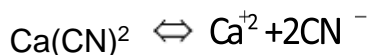
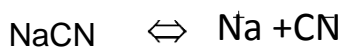
Aunque el cianuro se utiliza principalmente en la lixiviación del oro, también es capaz de reaccionar con otros metales. El mineral

aurífero casi siempre contiene otros metales, entre ellos hierro, cobre, zinc, níquel y plata, así como otros elementos, como el arsénico (Logsdon *et al.*, 1999).

Los metales pueden formar complejos estables de cianuro en presencia de un exceso de CN^- . La formación de complejos se limita casi totalmente a los metales de transición del bloque “d” de la tabla periódica y sus vecinos como son Zn, Cd y Hg (Cotton & Wilkinson, 1972). Se sabe que 28 elementos en diferentes estados de oxidación, pueden formar 72 complejos con el cianuro. El grado de formación de complejos solubles está determinado por la concentración de CN^- . Algunos complejos son muy estables, mientras que otros se destruyen fácilmente (Álvarez, 2005).

1.4.5. Compuestos cianurados simples

Los cianuros simples pueden definirse como sales del ácido cianhídrico (p. ej. KCN, NaCN, $\text{Ca}(\text{CN})_2$), que se disuelven completamente en disolución acuosa produciendo cationes alcalinos libres y el anión cianuro, por ejemplo:



Los cianuros simples son eléctricamente neutros y son idóneos para existir en forma sólida. Los compuestos cianurados simples son solubles en agua y se disocian o se ionizan fácilmente y por completo para producir cianuro libre y el ion metálico (Smith y Mudder, 1991).

1.4.6. Compuestos derivados del cianuro

Como resultado de la cianuración, de la degradación natural o del tratamiento de agua residual, se forman una diversidad de compuestos en disolución, relacionados con el cianuro, entre los que figuran el tiocianato, el cianato y el amoníaco (Álvarez, 2005).

1.4.7. Fuentes del cianuro

El cianuro de hidrógeno se formó en las primeras etapas del desarrollo de nuestro planeta como precursor de los aminoácidos, a partir de los cuales evolucionó la vida sobre la tierra (Logsdon *et al.*, 1999). En el ecosistema el cianuro se produce de manera natural, es utilizado en diferentes procesos industriales y mineros.

A. Fuentes naturales

La síntesis biológica de cianuro (cianogénesis), fue descubierta por primera vez en plantas en 1802. En la actualidad se sabe que los compuestos cianogénicos pueden encontrarse en más de 3 000 especies de plantas, animales, algas, bacterias y hongos. En la mayoría de los organismos, el cianuro se utiliza como un mecanismo para regular procesos bioquímicos específicos (Dzombak *et al.*, 2006).

Aproximadamente 2 650 especies de plantas, pertenecientes a alrededor de 550 géneros y más de 130 familias, producen cantidades significativas de glucósidos cianogénicos que se almacenan en vacuolas celulares (Lechtenberg & Nahrstedt, 1999). Entre las plantas se encuentran cultivos de gran importancia económica como la alfalfa, el sorgo, la linaza, el bambú, la papa, el algodón y el frijol, así como diferentes árboles frutales (Luque-Almagro, 2006; Dzombak *et al.*, 2006). En el reino animal la síntesis biológica de cianuro está restringida a artrópodos; algunos centípedos, milípedos e insectos (coleópteros, heterópteros y lepidópteros) capaces de producir cianuro (Duffey, 1981; Nahrstedt, 1988).

En bacterias, la cianogénesis se encuentra limitada a *Chromobacterium violaceum* y varias especies del género *Pseudomonas* (*P. chlorophis*, *P. aeruginosa* y *P. fluorescens*) (Dubey y Holmes, 1995). En estos microorganismos la biosíntesis de cianuro tiene lugar durante la transición de la fase exponencial de crecimiento y la fase estacionaria, lo que indica que este proceso forma parte del metabolismo secundario (Askeland y Morrison, 1983; Knowles, 1976). Sólo algunas algas (*Chlorella vulgaris*, *Anacystis nidulans*, *Nostoc muscorum* y *Plectonema boyanum*) son capaces de producir cianuro (Dubey y Holmes, 1995). Aproximadamente 300 especies de hongos, pertenecientes a 52 géneros, son cianogénicos (Luque-Almagro, 2006).

B. Fuentes antropogénicas

El cianuro se utilizó comercialmente por primera vez en 1889 en Nueva Zelanda, en la extracción y recuperación de oro y plata. Debido a sus características químicas, disponibilidad, efectividad y costo, actualmente este compuesto se utiliza ampliamente en diversos tipos de industrias y es considerado esencial en el mundo moderno (Logsdon *et al.*, 1999). Las principales formas de cianuro producidas

por el hombre son el cianuro de hidrógeno gaseoso, el cianuro sólido de sodio y el cianuro de potasio (Mudder y Botz, 2004). Las industrias mineras emplean típicamente soluciones de NaCN entre 100 a 500 mg/L (Logsdon *et al.*, 1999).

Anualmente se utiliza más de un millón de toneladas de cianuro, que representan el alrededor del 80 % de la producción total, en la producción de químicos orgánicos, como nitrilos, nylon y plásticos acrílicos, así como en la fabricación de pinturas, adhesivos, cosméticos, colorantes, medicamentos, insecticidas, agentes quelantes, etc. Otras aplicaciones industriales incluyen la galvanoplastia, endurecimiento del acero. El 20 % restante de la producción de cianuro es empleado en la fabricación de cianuro de sodio, muy utilizado en la minería de todo el mundo (Logsdon *et al.*, 1999).

1.4.8. Bacterias degradadoras de cianuro

Las bacterias involucradas en los procesos de la degradación de cianuro, poseen varios sistemas enzimáticos específicos que les permite adaptarse en ambientes con alta concentración de cianuro.

Se sabe que la toxicidad del cianuro en altas concentraciones puede limitar la capacidad de los microorganismos para utilizarlo como sustrato para su crecimiento (Patil y Paknikar, 1999). Compuestos de cianuro (NaCN, KCN, entre otros), se transforman a otras formas químicas (NH₃, NH₄, NO₂, CO₂), por la acción microorganismos en el suelo (Diamond, J. M. ,2012).

La forma como se realiza la conversión de cianuro es muy variada. Una de las más frecuentes es que ciertas bacterias empleen cianuro hidratasa para degradar el cianuro pasando el cianuro a formamida y esta última es convertida a CO₂ y NH₃ como es el caso de la *Pseudomonas fluorescens*. En otras cepas bacterianas, el cianuro es transformado directamente a CO₂ y NH₃ con empleo de cianuro dioxigenasa, siendo producto intermedio el cianato. También el cianuro puede ser empleado como fuente de nitrógeno y/o carbono, como por ejemplo las cepas de *Citrobacter freundii*, *Enterobacater sp*, *Pseudomonas fluorescens* y *Bacillus spp*.

Pseudomonas aeruginosa también elimina el cianuro con niveles adecuados de aireación entre 100 y 120 rpm (Castric, P. A., Farnden, K. J., & Conn, E. E. 1972). *Pseudomonas paucimobilis* emplea

moderadamente fuertes complejos metálicos de cianuro como el [K, Ni (CN)] para transformar este químico en sustancias menos contaminantes (Barclay, M., Hart, A., Knowles, C.J., Meeussen, J.C.L., Tett, V.A. ,1998).

Para el desarrollo de un tratamiento biológico de degradación de cianuro se han identificado microorganismos con alto potencial de degradación del contaminante de hasta un 96% de remoción (Watanabe, A., Yano, K., Ikebukuro, K., & Karube, I. 1998), tales como: *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, y *Alcaligenes* (Ingvorsen *et al.*, 1991)

Dentro de los géneros que producen enzimas de conversión de cianuro (Ingvorsen, K., Hojer-Pedersen, B., & Godtfredsen, S. E., 1991), que pueden eliminar o degradar este compuesto están *Chromobacterium violaceum* (Ebbs *et al.*, 2004), *Klebsiella oxytoca* (Ebbs, 2004); *Burkholderia cepacia* (Adjei y Ohta, 2000). Otras especies identificadas previamente y que se destacan por su capacidad para degradar cianuro son *Enterobacter freundii*, *Bacillus subtilis*, *Cifrobacter freundii* y *Enterobacter*. Existen reportes de cepas de *Cifrobacter fiemdii* y *Enferobacter aerogenes*, las cuales juegan un

papel muy importante en la desintoxicación del cianuro de efluentes de minería (Porter y Knowles, 1979).

1.4.9. Contaminación por cianuro

El cianuro es un subproducto industrial o residual como compuestos de hierro-cianuro en fase sólida, cuya lixiviación con el tiempo puede dar lugar a la acumulación de cianuro en aguas subterráneas. En algunos sitios, como los de lixiviación galvanoplastia y extracción minera, otros complejos de metal-cianuro pueden ser formados debido a la presencia de otros metales como Cu y Ni. La distribución específica y los puntos críticos de cianuro a nivel industrial se dan por las características de los procesos de producción existentes, y también se determina por las condiciones ambientales que presenta el lugar en el pasado y el presente (Ghosh, Johannes, Meeussen David, Dzombak A, David, 2006).

Impactos en el suelo generados por cianuro se observan en muchos lugares industriales donde utilicen este químico. En la mayoría de los sitios contaminados se tiene la presencia de compuestos sólidos de cianuro de hierro (Ghosh *et al.*, 2006). Caso

contrario ocurre en los sitios de lixiviación de minerales y galvanoplastia donde el cianuro en el suelo es normalmente dominado por la mezcla de compuestos de metal - cianuro con unas concentraciones en gramos hasta de 5 000 000 más altas de las naturales (Ghosh *et al.*, 2006).

1.4.10. Toxicidad del cianuro

El cianuro es un potente inhibidor del crecimiento y el metabolismo celular incluyendo la respiración, el metabolismo del nitrógeno y fósforo (Knowles, 1976; Knowles & Bunch, 1986).

El cianuro impide a las células utilizar el oxígeno, lo cual causa hipoxia de los tejidos y “cianosis” (decoloración azulada de la piel). El sistema respiratorio deja de nutrir a las células con oxígeno, un estado que, si no se trata, causa respiración rápida y profunda seguida por convulsiones, pérdida del conocimiento y asfixia. El antídoto más común es el nitrito de amilo, que puede administrarse en forma oral o por inyección. Aunque hay muchas fuentes diarias de exposición al cianuro (escapes de los automóviles, humo de tabaco, incendios), el cianuro no se acumula en los tejidos porque el cuerpo transforma esas

pequeñas cantidades en un compuesto menos tóxico llamado tiocianato, que luego se excreta. No es conocido que el cianuro cause cáncer o defectos congénitos o que pueda afectar adversamente la reproducción. La forma más tóxica del cianuro es el HCN gaseoso. La Conferencia Norteamericana de Higienistas Industriales Gubernamentales (ACGIH) establece el límite de umbral tope de HCN en 4,7 mg/L. En concentraciones de 20 a 40 mg/L de HCN en el aire, se puede observar cierto malestar respiratorio después de varias horas. La muerte ocurre e pocos minutos con concentraciones de HCN por encima de aproximadamente 250 mg/L en el aire (Knowles, 1976).

En ambientes acuáticos, concentraciones muy bajas como 0,1 mg/L afectan la biota más sensible, peces y aves migratorias (Henny, C. J.; Hallock, R. J., & Hill, E.F., 1994). Por lo tanto, el cianuro y sus derivados pueden afectar la biodiversidad y la biomasa activa del ecosistema, provocando graves problemas en el ambiente (Knowles, 1976).

1.4.11. Tratamientos biológicos de compuestos cianurados

En comparación con la degradación natural y los métodos fisicoquímicos, los tratamientos biológicos son más rápidos, económicos y eficientes ya que requieren poco capital, bajos costos operativos y no produce productos intermediarios tóxicos (Akci *et al.*, 2003; Dash *et al.*, 2008; Nelson, M. G.; Kroeger E. B. & Arps P. J. ,1998). En la Tabla 2 se resume las ventajas relacionadas con el tratamiento biológico.

Tabla 2. Ventajas y desventajas relacionadas con la degradación biológica del cianuro.

Tratamiento	Ventaja	Desventaja	Remueve				¿Requiere tratamiento adicional?
			CN - libre	Tiocianato	CN WAD (complejo metal)	CN SAD (complejo metal)	
Oxidación biológica / Biodegradación	Aprovecha un proceso natural.	La tecnología no está totalmente establecida.	Sí	Sí	Sí	Sí	No
	Puede tratar CN ⁻ sin generar otro tipo de desecho.	Requiere la combinación de la metalurgia, biología y procesos de ingeniería.					
	No requiere el uso de químicos o controles extensos.	Se requieren evaluaciones y estudios específicos para cada tipo y sitio.					
	El costo es fijado por el volumen a tratar.	No remueve concentraciones altas.					

	Es amigable con el ambiente.						
--	------------------------------------	--	--	--	--	--	--

Fuente: Dash *et al.*, 2008

Las transformaciones biológicas envuelven procesos de biodegradación y asimilación del cianuro en formas de aminoácidos, tiocianato, β -cianolanina y vitaminas por plantas y microorganismos (Gupta, N.; Balomajumder, C. Y Agarwal, V. K., 2010). La biodegradación hace referencia a las reacciones que convierten el cianuro a moléculas orgánicas o inorgánicas más simples, las cuales pueden ser fácilmente metabolizadas a amonio y dióxido de carbono o metano. Las vías de biodegradación son utilizadas principalmente por organismos procariotas y probablemente representan una de las primeras respuestas evolutivas a la presencia de cianuro en el ambiente. La asimilación hace referencia a la incorporación del cianuro directamente en compuestos orgánicos. Las vías de asimilación están presentes tanto en procariotas como en eucariotas (Dzombak *et al.*, 2006). Todas las vías (degradativas o asimilativas) dependen de los mecanismos de tolerancia al cianuro que presenten los microorganismos. Entre estos mecanismos de tolerancia se encuentran: a) la existencia de rutas de degradación de cianuro y b) la presencia de una cadena de transporte de electrones insensible a cianuro (Luque-Almagro, 2006). Actualmente se pueden encontrar en la literatura numerosas

investigaciones sobre degradación microbiana del cianuro y derivados (Tabla 3).

Tabla 3. Comparación de las investigaciones sobre la biodegradación del cianuro.

Compuesto a ser removido	Parámetros dependientes				Referencias
	Microorganismo	Concentración	pH	T (°C)	
Cianuro WAD	<i>Pseudomonas sp.</i> (CM5, CMN2)	100-400 mg/L	9,2-11,4	30	Akcil <i>et al.</i> , 2003
Cianuro de Potasio	<i>Fusarium solani</i>	0,5-0,8 mM	9,2-10,7	30	Dumestre <i>et al.</i> , 1997
Complejo cianuro ferroso (II)	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	4,0-7,0	25-35	Dursun y Akzu, 2000
Complejo cianuro ferroso (II)	<i>P. fluorescens</i>	100 mg/L	5,00	25	Dursun <i>et al.</i> , 1999
Cianuro de Potasio	<i>Klebsiella oxytoca</i>	0,58 mM	7	30	Kao <i>et al.</i> , 2003
Nitrilos	<i>K. oxytoca</i>	25-100 mM	7	30	Kao <i>et al.</i> , 2006
Cianuros	Cultivo mixto	20 mg/L	7	22	White y Schnabel, 1998
Cianuro de Sodio	<i>Pseudomonas putida</i> inmovilizada	100-400 mg/L	6,7	25	Babu <i>et al.</i> , 1992
Cianuro de Sodio, cianatos y tiocianatos	<i>P. putida</i> inmovilizada	4 mM	7,5	25	Chapatwala <i>et al.</i> , 1998
Cianuro y formamide	<i>Fusarium oxyporum</i> inmovilizada	1-7 mM	8	25-30	Campos <i>et al.</i> , 2006
Cianuro metálico	<i>Trichoderma sp.</i>	2000 mg/L	6,5	25	Ezzi-Mufaddal y Lynch, 2002
Fenol y cianuro	<i>P. putida</i> inmovilizada	-	- 27		Konwalska <i>et al.</i> , 2002
Cianuro de cobre y zinc	<i>Citrobacter sp.</i> , <i>Pseudomonas sp.</i>	52 mg/L	7,5	35	Patil y Paknikar, 1998
Tetra-ciano-nichelato (II)	<i>P. fluorescens</i> inmovilizada	26 mg/L	-	30	Suh <i>et al.</i> , 1994

Cianuro de Potasio	<i>Burkholderia capita</i> cepa C-3	10 mM	8,0-10,0	30	Adjei y Ohta, 2000
Cianuro de Potasio	<i>Bacillus megaterium</i>	-	-	-	Castric y Strobel, 1969
Cianuro de Potasio	<i>Bacillus pumillus</i> C1	100 mg/L	10,5	30	Meyers <i>et al.</i> , 1991
Cianuro de Potasio	<i>Escherichia coli</i> BCN6	50, 100, 200 mg/L	9,2	30	Figueira <i>et al.</i> , 1996 Fry y Miller, 1972 Kang y Park 1997 Nazly <i>et al.</i> , 1983
Cianuro de Potasio	<i>Stemphylium loti</i>	2 mM	6,5-7,5	25	
Fenol, CN, Ni(CN) ₄ ²⁻	<i>P. fluorescens</i> NCIB11764	25, 26 mM/dm ³	-	30	
Cianuro de Potasio	<i>S. loti</i> , <i>G. sorgi</i>	70 mM	7,0; 5,0-5,7	28, 35	
Tetra-ciano-nickelato cianuro	<i>P. putida</i> BCN3	-	-	30	Silvos-Avilos <i>et al.</i> , 1990
Cianuro de Potasio	<i>B. pumilis</i>	2,5 M	8,0-9,0	40	Skowronski y Strobel, 1969
Cianuro de Potasio	<i>P. acidovorans</i>	31 mg/L	7,1; 7,9 y 9,1	30	Shivaraman y Parhad, 1985
Cianuro de Potasio	<i>K. oxytoca</i>	3 mM	7	30	Chen <i>et al.</i> , 2008
Cianuro de Potasio	<i>P. stutzeri</i> AK61	1 mM	7,6	30	Watanabe <i>et al.</i> , 1998
Cianuro de Potasio	<i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344	2 mM	9,5	30	Luque-Almagro <i>et al.</i> , 2005
Tetra-ciano-nickelato (II)	<i>Cryptococcus humicolus</i> MCN2	51 mM	7,5	25	Kwon <i>et al.</i> , 2002

Fuente: Dash *et al.*, 2008

Los microorganismos envueltos en los tratamientos biológicos del cianuro y compuestos cianurados incluyen usualmente una mixtura heterogénea de bacterias y hongos, encontrados comúnmente en el suelo y adaptados por exposición continua a estos compuestos (Mudder *et al.*, 2001). Sin embargo, la biodegradación del cianuro es una propiedad intrínseca de ciertos microorganismos y no

requiere necesariamente de una exposición previa para inducir esta propiedad (Patil y Paknikar, 2000).

1.4.12. Vías metabólicas enzimáticas para la degradación del cianuro

Según los estudios realizados sobre enzimática para la degradación del cianuro muestran que hay cinco vías metabólicas generales para la biodegradación/asimilación del cianuro: hidrolíticas, oxidativas, reductivas, sustitución/transferencia y de síntesis. (Tabla 4).

Las primeras tres son vías degradativas en las cuales las enzimas catalizan la conversión del cianuro en moléculas más simples (por ej. formamida, ácido fórmico y amoníaco) que luego pueden ser asimiladas como fuentes de carbono y nitrógeno para el crecimiento. Las últimas dos son vías asimilativas en las cuales los microorganismos utilizan el cianuro como fuente de carbono y/o nitrógeno para la formación de metabolitos primarios tales como aminoácidos o precursores (Gupta *et al.*, 2010; Dzombak *et al.*, 2006). Algunos microorganismos (por ej. *Chromobacterium violaceum*, *Bacillus megaterium* y *E. coli*), pueden utilizar más de una vía

metabólica para biodegradar el cianuro. Estos microorganismos y sus enzimas también presentan un potencial de desarrollo económico al ser usadas en procesos industriales. Por ejemplo las bacterias que contienen la nitrilo hidratasa *Bacillus sp.* y *Corynebacterium sp C5*, han sido usadas en la industria para producir ácidos carboxílicos a partir del compuesto correspondiente nitrilado (Mosquera,2013).

El uso de cierta vía metabólica está determinado por condiciones externas como el oxígeno, el pH y la concentración, biodisponibilidad y solubilidad de cianuro en el agua y/o suelo (Ebbs, 2004).

1.4.13. Condiciones requeridas para la degradación microbiana del cianuro

La degradación microbiana envuelve reacciones enzimáticas y condiciones específicas de concentración de cianuro, niveles de oxígeno, temperatura, pH, nutrientes disponibles, iones metálicos etc. (Baxter & Cummings, 2006; Gupta *et al.*, 2010)

Tabla 4: Categorías generales de las reacciones enzimáticas de degradación del cianuro

Reacciones Hidrolíticas	Microorganismos
<p>Cianuro hidratasa $\text{HCN} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HCONH}_2$</p>	<p><i>Gloeocercospora sorghi</i>, <i>Fusarium oxysporum</i> CCMI 876, <i>Fusarium solani</i> IHEM 8026, <i>Sternphylium loti</i>.</p>
<p>Nitrilo hidratasa $\text{R-CN} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{R-CON H}_2$</p>	<p><i>Rhodococcus rhodochrous</i>, <i>Pseudonocardia thermophila</i>, <i>Pseudomonas marginales</i> MA32, <i>P. putida</i> MA113, <i>Klebsiella pneumoniae</i>, <i>Arthrobacter sp.</i>, <i>Fusarium sp.</i>, <i>Brevibacterium imperialis</i> CBS489-74.</p>
<p>Cianidasa $\text{HCN} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HCOOH} + \text{NH}_3$</p>	<p><i>Alcaligenes xylosoxidans</i>, <i>Bacillus pumillus</i>, <i>Pseudomonas stutzeri</i>.</p>

<p>Nitrilasa $R-CN + 2H_2O \rightarrow R-COOH + NH_3$</p>	<p><i>Rhodococcus rhodochrous</i>, <i>Klebsiella ozaenae</i>, <i>Arthrobacter sp.</i>, <i>Alcaligenes faecalis</i>, <i>Acinetobacter sp.</i>, <i>Fusarium solani</i>, <i>F. oxysporum</i>, <i>Nocardia sp.</i></p>
<p>Tiocianato hidrolasa $SCN^- + 2H_2O \rightarrow COS + NH_3 + OH^-$</p>	<p><i>Thiobacillus thioparus</i>, <i>Pseudomonas stutzeri</i>, <i>Acremonium strictum</i>.</p>
<p>Reacciones Oxidativas</p>	
<p>Cianuro monoxigenasa $HCN + O_2 + H^+ + NAD(P)H \rightarrow HCONH_2 + NAD(P)^+ + H_2O$</p>	<p><i>Pseudomonas sp.</i></p>
<p>Cianuro dioxigenasa $HCN + O_2 + H^+ + NAD(P)H \rightarrow CO_2 + NH_3 + NAD(P)^+$</p>	<p><i>Pseudomonas fluorescens</i> NCIMB11764, <i>E. coli</i> BCN6, <i>Bacillus pumillus</i>.</p>
<p>Cianasa $SCN^- + 3H_2O + 2O_2 \rightarrow CNO^- + HS^- \rightarrow HS^- + 2O_2 \rightarrow SO_4^{2-} + H^+$ ↓ $CNO^- + 3H^+ + HNO_3^- \rightarrow NH_4^+ + 2CO_2$</p>	<p><i>E. coli</i>, <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> CECT 5344.</p>
<p>Reacciones Reductivas</p>	
<p>Nitrogenasa $HCN + H^+ + 2e^- \rightarrow CH_2=NH + H_2O \rightarrow CH_2=O$ ↓ $CH_2=NH + 2H^+ + 2e^- \rightarrow CH_3NH + 2H^+ + 2e^- \rightarrow CH_4 + NH_3$</p>	<p><i>Klebsiella oxytoca</i>, <i>Rhodopseudomonas gelatinosa</i>, <i>Streptomyces thermoautotrophicus</i>, <i>Herbaspirillum</i></p>

	<i>seropedicae</i> , <i>Azotobacter sp.</i> , <i>Azospirillum sp.</i> , <i>Rhodospirillum rubrum</i>
Reacciones Sustitución/Transferencia	
Rodanasa (Cianuro sulfurotransferasa) $CN^- + S_2O_3^{2-} \rightarrow SCN^- + SO_3^{2-}$	<i>Azotobacter vinelandii</i> , <i>E. coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Ferrobacillus ferroxidans</i> , <i>Thermobacillus denitrificans</i> , <i>Desulfotomaculum nitrificans</i> , <i>Fusarium sp.</i>
Mercaptopiruvato sulfurotransferasa Pasos	
$HSCH_2COCOO^- + \text{Enzima} \leftrightarrow CH_2COCOO^- + HS\text{-Enzima} \text{ (1)}$ $HS\text{-Enzima} + CN^- \leftrightarrow \text{Enzima} + SCN^- \text{ (2)}$	<i>E. coli</i> , <i>Azotobacter vinelandii</i> , <i>Leishmania major</i> .
Vías de Síntesis	
β-Cianoalanina sintetasa $L\text{-Cisteína (o OAS)} + CN^- \leftrightarrow \beta\text{-cianoalanina} + H_2S \text{ (o } CH_3OO^-)$	<i>Chromobacterium violoaceum</i> , <i>Bacillus megaterium</i> , <i>Enterobacter sp.</i> , <i>E. coli</i> , <i>Pseudomonas sp.</i>
γ-Ciano-α-ácido aminobutírico sintetasa $Homocistina + 2CN^- \rightarrow \gamma\text{-Ciano-}\alpha\text{-ácido aminobutírico} + SCN^-$ + Homocisteína	<i>Chromobacterium violoaceum</i> , <i>Bacillus stearotherophilus</i>

Fuente: Ebbs, 2004; Dzombak *et al.*, 2006 y Gupta *et al.*, 2010

La disponibilidad del oxígeno es un factor importante en la mineralización del cianuro, ya que es consumido en varias vías degradativas del cianuro (O'Reilly & Turner, 2003).

La temperatura es un factor importante para la degradación del cianuro. Las enzimas responsables de la biodegradación/asimilación del cianuro son producidas generalmente por organismos mesófilos, aislados frecuentemente del suelo, con temperaturas óptimas entre 20 y 40 °C (Kao, C. M.; Liu, J. K.; Lou, H. R.; Lin C. S. & Chen S. C., 2003 ; Cowan, D.; Cramp, R. A.; Periera R.; Graham, D. Y Almatawah, Q., 1998, Akcil, A., & Mudder, T., 2003)

El pH es un factor importante en la biodegradación del cianuro. La mayoría de investigaciones señalan que la degradación microbiana del cianuro se produce a pH cercanos a la neutralidad. Sin embargo, la biodegradación del tiocianato y el cianuro también se produce bajo condiciones alcalinas (pH>9) (Adjei & Ohta, 2000; Luque-Almagro *et al.*, 2005). Mientras que la degradación de los complejos cianuro-metal se da bajo condiciones ácidas (pH 4,0) (Barclay, M.; Hart, A.; Knowles, C.J.; Meeussen, J. C. & Tett, V. A., 1998).

Los microorganismos que degradan cianuro pueden emplear una variedad de fuentes de carbono, estos pueden ser azúcares simples como la glucosa (Adjei & Ohta, 2000), acetato (Luque-Almagro *et al.*, 2005), melaza de caña (Patil y Paknikar, 2000), fenol. Según los estudios realizados, algunos microorganismos pueden emplear al cianuro como fuente de nitrógeno y carbono. Los microorganismos también pueden utilizar el cianuro (cianuro libre, nitrilos, tiocianato, complejos cianuro-metal, etc.), como única fuente de nitrógeno (Knowles, 1976; Ebbs, 2004; Adjei & Ohta, 2000). Cuando el cianuro es empleado junto con otras fuentes de nitrógeno, la biodegradación puede inhibirse completamente (Dursun, A. Y.; Calik, A. & Aksu, Z., 1999).

Las condiciones extremas de los ambientes mineros pueden referirse a condiciones físicas extremas como temperatura, presión o radiación y a condiciones geoquímicas extremas como la salinidad y el pH (Restrepo, Oscar J., Montoya C., Muñoz N., 2006). Además algunos microorganismos pueden sobrevivir en ambientes expuestos a sustancias químicas tóxicas, debido a las actividades realizadas por el hombre (Nawaz, M. S.; Chapatwala, K. D. & Wolfram, J. H., 1989). Es por ello que la biotecnología es una herramienta importante para la biorremediación de ambientes contaminados usando microorganismos con la capacidad de degradar sustancias tóxicas.

Es necesario conocer la diversidad microbiana como un componente conectado a su hábitat, el cual incluye otras formas de vida y ambientes interrelacionados e interdependientes y al darles un uso sostenible por medio de herramientas biotecnológicas (Torres-Cázares K.L., Casas-Flores S., García - Meza J.V., 2012).

A pesar de que los terrenos mineros son ambientes creados por el ser humano, son gobernados por reglas ecológicas, tales como las relaciones simbióticas entre quimiolitótrofos y su ambiente (Torres- Cázares *et al.*, 2012). Por esta razón, aislar e identificar las cepas nativas presentes, requiere de un amplio estudio de métodos independientes y dependientes de cultivo. Por un lado, una ventaja del uso de métodos dependientes de cultivo es estudiar características fisiológicas y estructurales de los aislados, por otro lado, representa una herramienta invaluable para estudiar la biología y ecología asociada a bacterias (Vaz-Moreira *et al.*, 2013).

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Ubicación y determinación del área de estudio

El área de estudio fue la planta de procesamiento de azufre y los relaves no activos de la Compañía Minera Apacheta Quella S.A. Esta compañía está ubicada en el sur del Perú; en el Distrito de Candarave, Provincia de Candarave, en la Región Tacna aproximadamente a 4593 msnm. Esta compañía minera se encuentra actualmente no operativa. En el Anexo 2 (Figura 5) se identifica la zona geográfica donde se encuentra la Compañía Minera.

2.2. Material de estudio

Es el suelo de la planta de procesamiento de azufre y los relaves de la Compañía Minera Apacheta Quella S.A.

2.3. Operacionalización de variables

TIPO DE VARIABLE	VARIABLE	INDICADOR
Independiente	Concentración de Cianuro de Sodio	100 ppm de NaCN
Dependiente	Crecimiento Microbiano	Recuento microscópico en cámara Petroff-Hausser
	Degradación de Cianuro	Cuantificación del cianuro mediante el análisis Volumétrico

2.4. Muestreo y toma de muestras

El muestreo se realizó según los Estándares de Calidad de suelo estipulada en la normativa vigente del Decreto Supremo N° 002-2013-MINAM.

Se seleccionaron 6 puntos de muestreo ubicados en la planta de procesamiento y los relaves que se encuentran actualmente inactivos. Las muestras sólidas (suelo) fueron tomadas de forma dirigida considerando zonas con actividad

microbiana (presencia de mineral de coloración amarillenta), en el mes de noviembre del año 2016, 03 muestras corresponden a las plantas de procesamiento y 03 a las zonas de relave minero. En la Tabla 5 se muestran las coordenadas (WGS84) con el GPS y ubicación de cada punto de muestreo. (Ver Anexo 2: Foto 1, 2, 3,4 y 5)

Tabla 5: Ubicación de los puntos de muestreo

PUNTO DE MUESTREO	COORDENADAS- WGS84		ZONA DE MUESTREO
	ESTE	NORTE	
1	358979	8113785	Plantas de procesamiento
2	358970	8113810	Plantas de procesamiento
3	358925	8113799	Plantas de procesamiento
4	359792	8113649	Relave
5	359783	9113638	Relave
6	359764	8113646	Relave

Fuente: Elaboración propia

Las muestras fueron tomadas a 10 cm de profundidad de la capa superficial del suelo, se colectaron aproximadamente 500 g de muestras sólidas (suelo) y que se colocaron en bolsas de plástico de polipropileno de primer uso. Las muestras fueron selladas herméticamente, rotulados y fueron transportadas en un cooler a temperatura ambiente al laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann para su procesamiento y estudio, donde se midió el pH de las muestras de suelo usando un PHmetro HANNA HI.

2.5. Tipo de investigación

Aplicada

2.6. Diseño de investigación

Experimental

2.7. MÉTODO

2.7.1. Suspensión de la muestra

Para la suspensión de la muestra se realizó según la metodología propuesta por Restrepo, Oscar J., Montoya C., Muñoz N., (2006), la cual se llevó a cabo en un matraz Erlenmeyer de 500 ml conteniendo 100 g de suelo procedente de la etapa del procesamiento y relave y 200 ml de agua estéril. Se agitó a 180 rpm durante una hora, luego se dejó reposar cada matraz Erlenmeyer con la muestra por 5 minutos y se añadió 10 ml de la solución clarificada en 90 ml de caldo peptonado y la cual se incubó durante 24 horas a temperatura ambiente (24 °C – 26 °C).

2.7.2. Enriquecimiento selectivo de bacterias degradadoras de cianuro

Para la selección de bacterias degradadoras de cianuro se siguió la metodología propuesta por Rainey y

Oren (2006). Se tomó 10 mL de cada matraz en la que se realizó suspensión de la muestra y se adicionó en 100 mL de un Medio Mineral tamponado con buffer carbonato-bicarbonato 0,1 M a pH 9,5 (ver Anexo 1). Los medios enriquecidos fueron incubados a temperatura ambiente (24 °C – 26 °C) por 3 días. Posteriormente se tomó 10 mL de cada cultivo y se inocularon en 90 mL del Medio Mineral suplementados con 25; 50; 100; 200; 300; 400 y 500 mg/L de CN^- . Los cultivos se incubaron durante 4 días a temperatura ambiente (24 °C – 26 °C).

2.7.3. Aislamiento de bacterias degradadoras de cianuro

Para el aislamiento bacteriano se siguió la metodología propuesta por Restrepo *et. al.*, 2006 en el cual se tomó 0,1 ml del cultivo en medio mineral y se sembró por duplicado mediante el método de diseminación en placas que contenían los siguientes medios de cultivo: Agar nutritivo y Agar Cetrimide. Previamente se ajustó el pH a los medios de cultivo a pH

9,5. Luego se incubaron a temperatura ambiente (24 °C – 26 °C) durante 5 días. (Ver Anexo 2: Foto 6 y 7)

2.7.4. Caracterización microscópica y macroscópica

Para la caracterización de las bacterias aisladas, se utilizó cultivos puros incubados por 24 horas en Agar nutritivo. Para el caso de la caracterización macroscópica se realizó detallando las formas, borde, elevación y color de las colonias bacterianas. Para la caracterización microscópica, se utilizaron muestras de cepas bacterias aisladas, coloreadas por tinción Gram, que fueron visualizadas en el microscopio óptico de luz blanca en inmersión con aceite de cedro.

2.7.5. Identificación de bacterias degradadoras de cianuro

Para la identificación bacteriana se realizaron pruebas bioquímicas de movilidad, catalasa, fermentación de manitol, Oxidasa, Urea, Nitrato y Voges Proskauer, teniendo como referencia el Manual de

Bacteriología Sistemática de Bergey - Segunda Edición (2004).

Las pruebas bioquímicas mencionadas anteriormente se realizaron únicamente sobre las cepas bacterianas que mostraron una mayor tolerancia a diferentes concentraciones de cianuro. (Ver Anexo 2: Foto 8, 9,10,11,14 y 15)

2.7.6. Evaluación de la tolerancia a pH alcalinos

Para la evaluación de la tolerancia a pH alcalinos se empleó la metodología propuesta por Tiago, I.; Chung, A. & Verissimo, A., (2004). En el cual se utilizó un cultivo de 24 horas en caldo nutritivo conteniendo la décima parte de cada uno de sus componentes, con el objetivo de otorgar las condiciones oligotróficas del suelo. Posteriormente se inoculó 0,1 mL de cada cultivo en 10 mL de caldo nutritivo ajustado con HCl 1N y NaOH 1N a los siguientes valores de pH: 9,5; 10,0; 10,5; 11,0; 11,5 y 12,0. Los cultivos fueron incubados a temperatura

ambiente (24 °C-26 °C) por 4 días. Se empleó la Escala de McFarland considerando la turbidez del medio como criterio de evaluación para el crecimiento microbiano: Sin crecimiento (-), Poco crecimiento: (+), Crecimiento moderado: (++) y Crecimiento abundante: (+++), el cual corresponde aproximadamente a 0; 0,5; 1 y 2, respectivamente. Los resultados obtenidos mediante esta prueba determinaron el nivel óptimo de pH para el buen crecimiento microbiano. (Ver Anexo 2: Foto 12)

2.7.7. Evaluación de la tolerancia a diferentes concentraciones de cianuro

Para determinar la tolerancia y concentración óptima de cianuro se siguió la metodología de Tiago *et al.*, 2004. Se utilizó un cultivo de 24 horas y un caldo nutritivo conteniendo la décima parte de cada uno de sus componentes (pluripeptona 0,5; extracto de carne 0,3 y agua 1000 ml) . Se inóculo 0,1 mL de cada cultivo 10 mL de un caldo nutritivo conteniendo concentraciones de 25; 50; 100; 200; 300; 400 y 500 mg/L de CN⁻. Los cultivos

fueron incubados a temperatura ambiente (24 °C - 26 °C) por 4 días. Se determinó la concentración óptima de cianuro en función al tiempo de incubación y el crecimiento microbiano, evidenciado por la turbidez en los tubos de prueba. Para ello se empleó el criterio descrito en la prueba anterior. (Ver Anexo 2: Foto 13)

2.7.8. Producción del inóculo bacteriano

Para la producción del inóculo bacteriano se siguió la metodología propuesta por Escalante, (2002). En el cual se preparó las cepas seleccionadas, adaptadas al cianuro y activadas en 25 mL de medio mineral (MM) con 75 ppm de cianuro de sodio y se incubó durante 48 horas a temperatura ambiente (24 °C - 26 °C) luego el volumen del medio incubado se mezcló con 50 mL de medio de cultivo nuevo y se incubó en las mismas condiciones que la de 25 mL y se continuó haciendo siembras sucesivas con 100 y 250 mL de medio mineral para obtener 250 mL de inóculo masificado hasta una concentración de 10^7

bacterias/mL. El conteo de bacterias se hizo con ayuda de una cámara de Petroff Hausser).

2.7.9. Evaluación de la degradación del cianuro

En esta evaluación se consideró la metodología propuesta por Restrepo *et al.*, (2006). Utilizando 40 mL de la última suspensión y se inoculó en 400 ml del Medio Mineral ajustado a un pH 9,5. Los parámetros óptimos de pH y concentración de CN^- para la evaluación de biodegradación fueron determinados en los ensayos anteriormente. Los cultivos se incubaron durante 10 días a temperatura ambiente (24 °C - 26 °C) y en agitación de 1,8 VVM, la evaluación se dio por triplicado.

Cada 24 horas se tomaron muestras de 10 mL para monitorear el crecimiento bacteriano mediante el conteo en la cámara de Petroff Hausser, pH y degradación del cianuro mediante el método volumétrico. (Ver Anexo 2: Foto 16 y 17)

2.7.10. Evaluación del crecimiento microbiano

El crecimiento microbiano fue evaluado a las 0; 24; 48; 72; 96; 120; 144; 168; 192; 216; 240 horas (cada 24 horas durante 10 días), mediante el recuento microbiano en la cámara de Petroff Hausser.

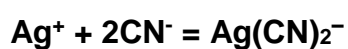
a) Camara Petroff-Hausser

Se tomó una pipeta pasteur con 12 ul de caldo de cultivo y fue colocado en la cámara Petroff-Hausser, el cual fue observado en el microscopio óptico para realizar el conteo de bacterias en la muestra y establecer su concentración.

2.7.11. Determinación del cianuro por volumetría

Para la determinación del cianuro por volumetría en las muestras se siguió la metodología descrita por Nava *et al.*, 2007 (ver Anexos).

La técnica se basa en la reacción del nitrato de plata con el ión cianuro en solución alcalina para formar el complejo soluble $\text{Ag}(\text{CN})_2^-$ según la reacción:



En el momento en que el cianuro libre se agota, el exceso de plata precipita como AgCN o reacciona con el indicador yoduro de potasio (KI) para formar AgI .

En ambos casos, el punto final de la titulación se evidencia mediante una turbidez permanente, blanca o amarillo opalescente. El análisis volumétrico del CN^- se realizó por triplicado y se sacó un promedio del resultado. (Ver Anexo 3)

III. RESULTADOS

3.1. Selección e identificación de bacterias degradadoras de cianuro

Se aislaron 12 cepas bacterianas de las muestras de suelo de la planta de procesamiento de azufre y los relaves. Los valores de pH de las muestras de suelo fueron de 2. En el siguiente cuadro se describen las características microscópicas, macroscópica y la tinción Gram de las cepas aisladas de los ambientes mineros de la Compañía Minera Apacheta Quella S.A. Minera ubicada en el distrito de Candarave, provincia de Candarave, departamento de Tacna.

Tabla 6. Caracterización microscópica y macroscópica de las cepas aisladas de los ambientes mineros de la Provincia de Candarave

TIPO DE MUESTRA	CEPA	Características Microscópicas		Características Macroscópicas coloniales
		Forma	Coloración	Características
SUELO	Cepa 1	Bacilos	Gram positivo	Colonias circular, borde entero, elevada, superficie lisa, consistencia cremosa

				pequeñas, blanquecinas.
Cepa 2	Bacilos	Gram positivo	Colonias circular, borde entero, elevada, superficie lisa, consistencia mucosa, pequeña, blanquecina.	
Cepa 3	Bacilos	Gram positivo	Colonias circular, borde entero, plana, superficie lisa, consistencia cremosa.	
Cepa 4	Bacilos	Gram positivo	Colonias circular, borde entero, elevada, superficie lisa, consistencia chiclosa, blanquecina.	
Cepa 5	Bacilos	Gram positivo	Colonias puntiformes, borde entero, elevada, superficie lisa, consistencia chiclosa, blanquecina.	
Cepa 6	Bacilos	Gram positivo	Colonias circular, borde regular, borde entero, superficie lisa, blanquecina.	
Cepa 7	Cocos	Gram positivo	Colonias circular, borde regular, borde entero, superficie lisa, amarilla verdosa.	
Cepa 8	Bacilos	Gram positivo	Colonias circular, borde lobulado, elevada, superficie lisa, consistencia mucosa, translucida.	
Cepa 9	Bacilos	Gram positivo	Colonias circular, borde entero, plana, superficie lisa, consistencia mucosa, pequeñas, blanquecina.	
Cepa 10	Bacilos	Gram negativo	Colonias irregular, borde filamentosos, plana, superficie lisa,	

				consistencia mucosa, pequeñas, blanquecina.
	Cepa 11	Cocobacilos	Gram negativo	Colonias circular, borde entero, elevada, superficie lisa, consistencia mucosa, blanquecina.
	Cepa 12	Bacilos	Gram positivo	Colonias puntiforme, borde entero, elevada, superficie lisa, consistencia mucosa, pequeñas, blanquecina.

FUENTE : Elaboración propia

En la Tabla 6 se muestra las cepas que fueron aisladas y seleccionadas, en total 12 cepas potencialmente degradadoras de cianuro. Estas corresponden a bacilos, coco y cocobacilos Gram positivo y Gram negativo, cuyas características macroscópicas se evaluaron en agar nutritivo tras 24 de incubación a temperatura ambiente.

Posteriormente se identificaron las bacterias que obtuvieron una mejor tolerancia a concentraciones altas de cianuro, estas fueron las cepas bacterias 7 y 12, tal como se muestra en la tabla 7 y 8.

Tabla 7. Identificación bioquímica de la cepa bacteriana 7
aislada de los ambientes mineros de la Provincia de
Candarave - *Micrococcus sp*

IDENTIFICACIÓN DE <i>Micrococcus sp</i>	
COLONIA	Amarilla verdosas
GRAM	Positivo
FORMA	Cocos
MOVILIDAD	No
CATALASA	Positivo
FERM. MANITOL	Negativo
OXIDASA	Positivo
UREA	Negativo
NITRATO	Positivo
VP	Positivo

FUENTE : Elaboración propia

Tabla 8. Identificación bioquímica de la cepa bacteriana 12
aislada de los ambientes mineros de la Provincia de
Candarave - *Corynebacterium sp*

IDENTIFICACIÓN DE <i>Corynebacterium sp</i>	
COLONIA	Blanquecina
GRAM	Positivo
FORMA	Cocobacilos
MOVILIDAD	No
CATALASA	Positivo
HIDROLISIS DEL ALMIDON	Positivo
OXIDASA	Negativo
UREA	Negativo
NITRATO	Positivo
ESPORAS	Negativo

FUENTE : Elaboración propia

3.2. Evaluación de la tolerancia a pH alcalinos

Cuadro 1: Evaluación de la tolerancia a pH alcalinos de las cepas aisladas de ambientes mineros de la Provincia de Candarave.

DIA 3												
	Cepas bacterianas											
Ph	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
9,5	++	+	-	+	+	+	+	+	+	++	+	+
10	+	+	+	++	+	+	+	++	+	++	+	+
10,5	++	+	+	-	+	+	+	+	+	++	+	+
11	++	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11,5	++	+	+	+	+	+	+	+	++	+	+	+
12	-	+	+	+	+	+	+	+	++	+	+	+

FUENTE: Elaboración propia

En el Cuadro 1 se evaluó las cepas aisladas en la tolerancia a pH alcalinos, para esto se empleó el criterio: Sin crecimiento (-), Poco crecimiento: (+), Crecimiento moderado: (++) y Crecimiento abundante: (+++), el cual corresponde aproximadamente a 0; 0,5; 1 y 2 de la Escala de McFarland, respectivamente. En todas las cepas aisladas se observaron que hubo crecimiento en pH alcalinos desde 9,5 hasta 12.

3.3. Evaluación de la tolerancia a diferentes concentraciones de cianuro

Cuadro 2: Evaluación del primer día de las cepas aisladas de ambientes mineros de la Provincia de Candarave en la tolerancia a diferentes concentraciones de cianuro

DIA 1												
Cepas bacterianas												
CN	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
25 mg/L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50 mg/L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
100 mg/L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
200 mg/L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
300 mg/L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
400 mg/L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
500 mg/L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

FUENTE: Elaboración propia

En el Cuadro 2 se evaluó a las cepas aisladas en la tolerancia a diferentes concentraciones de cianuro desde 25 mg/L hasta 500 mg/L. En el primer día de evaluación no se observó crecimiento en ninguna de las bacterias.

Cuadro 3: Evaluación del segundo día de las cepas aisladas ambientes mineros de la Provincia de Candarave en la tolerancia a diferentes concentraciones de cianuro

DIA 2												
Cepas bacterianas												
CN	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
25 mg/L	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
50 mg/L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
100 mg/L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
200 mg/L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
300 mg/L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
400 mg/L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
500 mg/L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

FUENTE: Elaboración propia

En el Cuadro 3 se evaluó a las cepas aisladas en la tolerancia a diferentes concentraciones de cianuro desde 25 mg/L hasta 500 mg/L. En el segundo día de evaluación se observó poco crecimiento en las bacterias 1; 2; 4 y 12 en concentración de 25 mg/L de CN.

Cuadro 4 : Evaluación del tercer día de las cepas aisladas de ambientes mineros de la Provincia de Candarave en la tolerancia a diferentes concentraciones de cianuro

DIA 3												
Cepas bacterianas												
CN	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
25 mg/L	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+
50 mg/L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
100 mg/L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
200 mg/L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
300 mg/L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
400 mg/L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
500 mg/L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

FUENTE: Elaboración propia

En el Cuadro 4 se evaluó a las cepas aisladas en la tolerancia a diferentes concentraciones de cianuro desde 25 mg/L hasta 500 mg/L. En el tercer día de evaluación se observó poco crecimiento en las bacterias 1; 2; 3; 4; 5; 7; 8; 10 y 12 en concentración de 25 mg/L de CN.

Cuadro 5: Evaluación del cuarto día de las cepas aisladas de ambientes mineros de la Provincia de Candarave en la tolerancia a diferentes concentraciones de cianuro

DIA 4												
Cepas bacterianas												
CN	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
25 mg/L	+	++	+	++	++	+	++	++	+	++	-	++
50 mg/L	-	-	+	+	+	+	++	+	-	-	-	++
100 mg/L	-	-	+	+	+	-	++	-	-	-	-	++
200 mg/L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
300 mg/L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
400 mg/L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
500 mg/L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

FUENTE : Elaboración propia

En el Cuadro 5 se evaluó a las cepas aisladas en la tolerancia a diferentes concentraciones de cianuro desde 25 mg/L hasta 500 mg/L. En el cuarto día de evaluación se observó crecimiento moderado en las bacterias 7 y 12 en concentración de 100 mg/L de CN, considerando que estas tuvieron una mayor tolerancia al cianuro.

3.4. Cuantificación de la capacidad degradadora de cianuro por *Micrococcus sp* y *Corynebacterium sp*

CUADRO 6: Concentración de cianuro degradado y crecimiento microbiano por *Micrococcus sp* y *Corynebacterium sp*, con sus repeticiones en 10 días de evaluación (ppm)

Nº de evaluaciones	Horas de evaluación	<i>Corynebacterium sp</i>						<i>Micrococcus sp</i>						Control	
		{1}	{2}	{3}	X̄ (ppm)	DEGRADACION (%)	Bacterias (UFC/ml)	{1}	{2}	{3}	X̄ (ppm)	DEGRADACION (%)	Bacterias (UFC/ml)	X̄ (ppm)	Bacterias (UFC/ml)
		(ppm)						(ppm)							
0	0	100	100	100	100	0	0	100	100	100	100	0	0	100	0
1	24	98	97	96	97	3	3,5 x 10 ²	96	95	94	95	5	1 x 10 ²	100	0
2	48	94	93	92	93	7	5,5 x 10 ³	85	89	87	87	13	9 x 10 ²	100	0
3	72	91	88	88	89	11	3,2 x 10 ⁵	78	80	76	78	22	4,9 x 10 ⁴	100	0
4	96	85	82	82	83	17	5,6 x 10 ⁶	65	68	62	65	35	8,2 x 10 ⁵	100	0
5	120	77	76	75	76	24	1,3 x 10 ⁷	47	45	49	47	53	2,5 x 10 ⁶	100	0
6	144	70	69	68	69	31	1,9 x 10 ⁷	27	25	29	27	73	6,5 x 10 ⁷	100	0
7	168	65	64	63	64	36	2,7 x 10 ⁷	20	18	22	20	80	9,8 x 10 ⁷	100	0
8	192	60	59	61	60	40	3 x 10 ⁷	16	15	17	16	84	1,2 x 10 ⁸	100	0
9	216	55	51	53	53	47	3,3 x 10 ⁷	12	11	13	12	88	1,55 x 10 ⁸	100	0
10	240	49	49	52	50	50	3,9 x 10 ⁷	9	7	11	9	91	1,5 x 10 ⁸	100	0

FUENTE: Elaboración propia

LEYENDA:

- **N° de evaluaciones** : 10 días de evaluación
- **R1, R2, R3** : Primera, segunda y tercera repetición
- **X̄ (ppm)** : Promedio de la repeticiones en Partes Por Millón
- **DEGRADACIÓN (%)**: Porcentaje de la degradación de cianuro por *Micrococcus sp* y *Corynebacterium sp*
- **Bacterias (UFC/ml)** : Crecimiento microbiano en UFC/ml
- **Control** : Muestra control

En el Cuadro 06 se observa las concentraciones de cianuro degradado por *Micrococcus sp*, *Corynebacterium sp* y muestra control con sus repeticiones en 10 días de evaluación (ppm). *Micrococcus sp* obtuvo una mayor concentración de degradación de cianuro de 9 ppm (91 %) a diferencia de *Corynebacterium sp* que obtuvo una concentración de 50 ppm (50 %). Asimismo, se observa que en la evaluación de la muestra control (blanco) no se observó crecimiento bacteriano o alguna alteración en el medio.

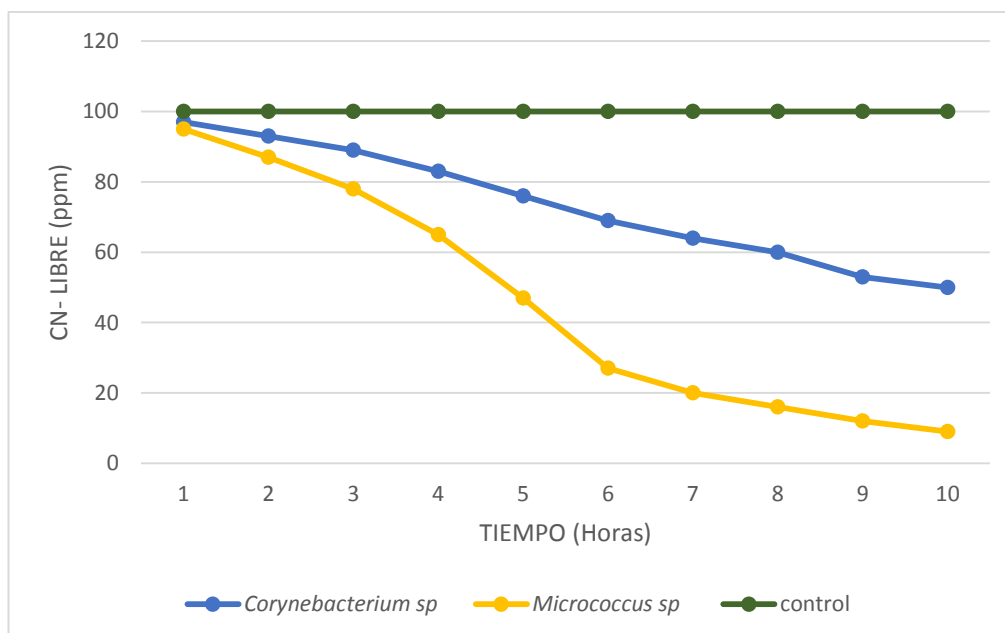


Gráfico 1: Curvas de degradación de cianuro por bacterias aisladas de ambientes mineros en 10 días de evaluación.

FUENTE: Elaboración propia

En Gráfico 1 se observa la curva de concentración de cianuro degradado por *Micrococcus sp*, *Corynebacterium sp* y de la muestra control en el cual la concentración inicial de cianuro degradado a través del tiempo de experimentación descendió a un valor significativo.

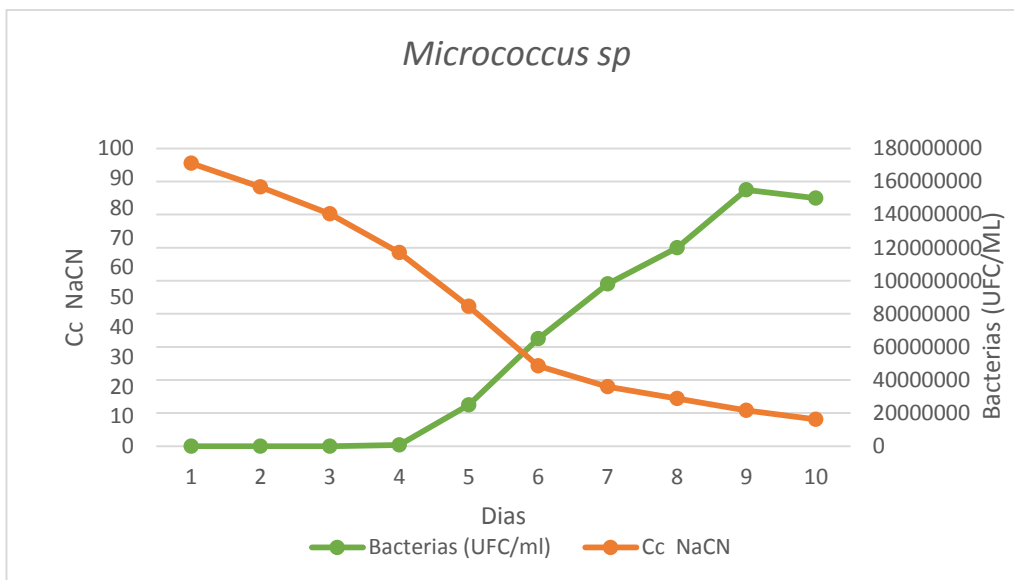


Gráfico 2: Evaluación de *Micrococcus sp* en la degradación de cianuro en relación con el crecimiento microbiano en 10 días de evaluación.

FUENTE : Elaboración propia

En el Gráfico 2 se observa que *Micrococcus sp* mostró un buen rendimiento durante la prueba de degradación, llegando a remover hasta 91 % de CN^- respectivamente en 10 días. Asimismo, se observa que en la Gráfica se visualizan la relación de los datos de las curvas de crecimiento microbiano y degradación de cianuro.

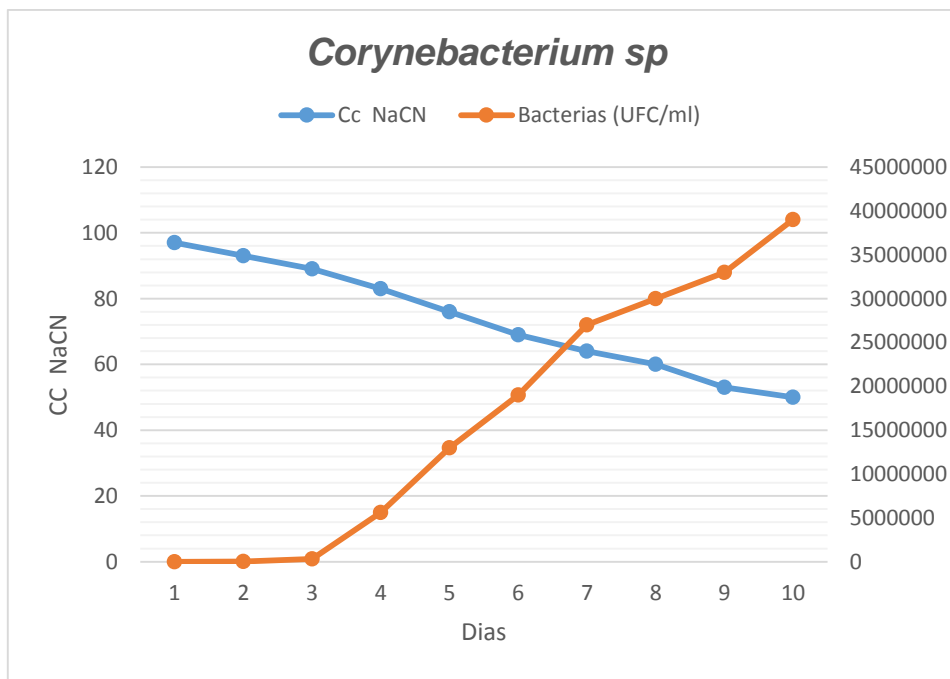


Gráfico 3: Evaluación de *Corynebacterium sp* en la degradación de cianuro en relación con el crecimiento microbiano en 10 días de evaluación

FUENTE : Elaboración propia

En el Gráfico 3 se observa que *Corynebacterium sp* mostró un buen rendimiento durante la prueba de biodegradación, llegando a remover hasta 50 % de CN^- , respectivamente. Asimismo, se observa que en la Gráfica se visualizan la relación de los datos de las curvas de crecimiento microbiano y degradación de cianuro.

3.5. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se empleó la Prueba de t Student para muestras relacionadas con un nivel de confianza del 95 %.

Estadísticas de muestras emparejadas					
Cepa Bacteriana		Media	N	Desviación estándar	Media de error estándar
Par 1	<i>Corynebacterium sp</i>	73,6000	10	16,48029	5,21153
	<i>Micrococcus sp</i>	45,4000	10	33,00236	10,43626

P-valor=0,01 α 0,05

La prueba de t para muestras relacionadas señala que *Corynebacterium sp* logró el mayor promedio con 73,600 con una desviación estándar que se desvía de la media en 16,480 superando estadísticamente a *Micrococcus sp* que obtuvo un promedio de 45,400 cuya desviación estándar se desvía de la media en 33,002 respectivamente. Al aplicar la prueba de T student el p – valor fue de 0,01 inferior al α 0,05 por lo tanto existe relación significativa entre ambos grupos con un nivel de confianza del 95 % .

IV. DISCUSIÓN

El cianuro pese a su toxicidad, según Ebbs, 2004; Dubey y Holmes, 1995; Raibuck 1992; Knowles, (1976), es un compuesto natural altamente toxico que es utilizado como fuente de nitrógeno y carbono por diferentes microorganismos desde el principio de la vida, esta molécula coexiste con los seres vivos, haciendo posible el desarrollo de mecanismos de resistencia y rutas asimiladoras de cianuro.

Las muestras de suelo fueron obtenidas de los ambientes mineros de la mina de azufre inactiva de la Compañía Minera Apacheta Quella S.A , con valores de pH 2, estas fueron utilizadas para el estudio de bacterias nativas con capacidad degradadora de cianuro presente en este tipo de ecosistema. Resultados similares fueron reportados en estudios por Akcil A., Karahan A.G., Ciftci H., Sagdic O., (2003), en el cual se aisló e identificó nueve cepas de *Pseudomonas sp.* de una mina de cobre de Ovacik, Turquía, con un pH 5. Dos (CM5 y CMN2) de las nueve cepas bacterianas se usaron en tratamientos con cianuro teniendo como resultado una degradación de cianuro de 100 - 400 ppm con un pH 09,02 a 11,04, temperatura 30 °C y la población bacteriana 1×10^4 - 1×10^9 ufc / ml en un tiempo de 45 y 70 horas. Asimismo, reportó

Cornejo la Torre Melitza (2016) aisló e identificó molecularmente 89 cepas microbianas, siendo los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Alcaligenes* los más abundantes. Estas cepas bacterianas se aislaron de suelos y aguas contaminados por residuos de cianuro producto de la actividad minera en la Región La Libertad con valores de pH neutros, respectivamente 6,81 y 7,69.

En el presente estudio se colectaron 6 muestras de suelos de ambientes mineros (planta de procesamiento de azufre y relaves) las cuales fueron sembradas en caldo peptonado inicialmente y posteriormente en Medio Mineral tamponado con Buffer carbonato - bicarbonato en presencia de cianuro, esto se dio con el fin de obtener un buen crecimiento bacteriano y el aislamiento de colonias degradadoras de cianuro, asimismo de favorecer la expresión de las enzimas implicadas en el metabolismo de degradación del cianuro. Según Rodallega (2015), Tuya (2014) y Hernández (2010) recomiendan que es necesario que los cultivos bacterianos sean expuestos a un pre-enriquecimiento en medio líquido para obtener mejores resultados en el crecimiento de microorganismos.

Se lograron aislar 12 cepas bacterianas de muestras de suelo de ambientes mineros, en Medio Mineral tamponado con buffer carbonato-bicarbonato 0,1 M a pH 9,5. Según Babu, G. R. V.; Wolfram J. H., & Chapatwala K. D (1992), mencionaron que el uso de metales traza en los cultivos, permite una mejor recuperación de microorganismos que utilizan cianuro como fuente energética. Khamar (2015), y Hernández (2010) y Akcil *et.al.*; (2003) muestran que un gran porcentaje de microorganismos que habitan en ambientes contaminados tienen la capacidad de adaptarse y poder resistir a la toxicidad de estos contaminantes.

Se seleccionaron las bacterias que obtuvieron un mejor crecimiento en la evaluación de tolerancia de pH 9,5 y a 100 mg/L de CN⁻ en un tiempo de 4 días. *Micrococcus sp* y *Corynebacterium sp* fueron las bacterias que se identificaron mediante pruebas bioquímicas según el Manual de Bergey, (2005). Las demás 10 cepas aisladas no evidenciaron mucha tolerancia a concentraciones de CN. Esto podría ser debido a los factores tales como el pH y la concentración de cianuro empleada en la evaluación la cual resultaría ser inhibitoria para estas cepas, la necesidad de formar consorcios para lograr una mejor

asimilación o de incorporar, además del cianuro, otras fuentes de carbono o nitrógeno (Patil & Paknikar 2000).

En trabajos como los de Meyers *et al.* (1991), Dumestre *et al.* (1997), Akcil *et al.* (2003), Luque - Almagro *et al.* (2005) y el presente, se emplean microorganismos capaces de degradar el cianuro bajo condiciones alcalinas ($\text{pH} > 9,5$). Se emplearon estos valores de pH para evitar la volatilización del CN. Asimismo, favorecer el crecimiento adecuado de las bacterias y facilitar su actividad degradadora de cianuro.

Según Dursun, A, & Z Aksu (2000), Luque - Almagro (2005), Shumei, Xilong y Chunyan (2013), la temperatura es un factor importante para la degradación de cianuro. Las enzimas que degradan el cianuro generalmente producidas por microorganismos mesófilos, tienen una temperatura óptima de crecimiento entre 20 - 40 °C. Todas las cepas bacterianas seleccionadas para la presente evaluación evidenciaron mejor crecimiento en el rango de 23 °C a 28 °C.

El tamaño del inóculo fue unos parámetros claves para el adecuado crecimiento de los microorganismos y la degradación de cianuro,

existen muchos estudios en los cuales el tamaño del inóculo utilizado para una eficiente degradación de cianuro es del 10 % (v/v) (Akcil *et al.* 2003) (Huertas *et al.* 2010) (Tuya 2014). El mismo que fue empleado en el presente trabajo y se obtuvo una eficiente degradación de cianuro.

Las bacterias que degradan cianuro poseen varias rutas enzimáticas y condiciones específicas como el pH, temperatura, concentración de cianuro, etc. que les permiten desarrollar y permanecer en ambientes con alta concentración de cianuro. Diversos estudios muestran cómo los microorganismos utilizan estas diferentes vías para la degradación de cianuro (Gupta, N.; Balomajumder, C. & Agarwal, V. K., 2010).

Según Rosenberg, E., DeLong, E. F., Lory, S., Stackebrandt, E., & Thompson, F. (2014) reportaron que algunas cepas de *Rhodococcus* presentan diversidad metabólica notable que puede ser explotada para una amplia gama de fines biotecnológicos. Esta bacteria está estrechamente relacionada con *Mycobacterium* y *Corynebacterium*. Para el género *Rhodococcus* sp. se ha reportado que la ruta probable de degradación de cianuro es por medio de la ruta hidrolítica por medio de la enzima nitrilo hidratasa y la amidasa (Gupta, N.; Balomajumder,

C. & Agarwal, V. K., 2010), donde ambas son responsables del metabolismo del cianuro.

Según Gupta *et al.*, (2010) menciona que *Corynebacterium sp*, convierte el cianuro en β -cianoalanina (un nitrilo), la cual puede ser utilizada como fuente de carbono y nitrógeno por acción de la nitrilo hidratasa. Es probable que la cepa aislada en el presente estudio desarrolle esta ruta metabólica para la degradación del cianuro

Según Rodallega (2015) aisló una cepa bacteriana Gram positivo, que se identificó como del género *Streptococo*. Coley y Zapata (2006) aislaron e identificaron a *Staphylococcus spp*, ambas con capacidad degradadora de cianuro, sin embargo se desconoce la ruta metabólica que estas bacterias emplean para la degradación del cianuro. Asimismo, es importante resaltar la capacidad de adaptarse a sobrevivir en lugares con presencia de cianuro y metales pesados, esta característica de adaptación es común en bacterias gram positivas. (Narancic, T., Djokic, L., Kenny, S. T., O'Connor, K. E., Radulovic, V., Nikodinovic-Runic, J., & Vasiljevic, B., 2012)

Considerando que en la actualidad se han descrito varias rutas de degradación de cianuro, sería importante considerar en futuros estudios determinar cuál es la ruta bioquímica que *Micrococcus sp* emplea para degradar el cianuro; los resultados del presente estudio indican que

realmente se encontró una cepa bacteriana con capacidad biodegradadora de cianuro.

Los ensayos de degradación de cianuro en el laboratorio mostraron una capacidad para degradadora para *Micrococcus sp* en 9 ppm (91 %) y *Corynebacterium sp* 50 ppm (50 %) respectivamente en un periodo de 10 días a 100 mg/L CN a temperatura ambiente, pH 9,5 en biorreactores aireados 1,8 VVM. Estos resultados son similares a los mostrados por Deloya (2012), en el cual la reducción del cianuro se dio en aproximadamente un 95 % en 15 días de evaluación, la estrategia para la biorremediación de cianuro en la investigación consistió en la capacidad de adaptación de los microorganismos al contaminante. Es importante considerar que las bacterias en estudio solo puedan degradar ese porcentaje de cianuro, teniendo en cuenta que así puede tolerar el resto sin afectar su supervivencia.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo proponen una importancia de la investigación dirigida a hallar microorganismos aptos de degradar cianuro y concebir el mecanismo del proceso como una opción factible de biorremediación de ambientes contaminados. (Tuya , 2014).

V. CONCLUSIONES

- Se aislaron 12 cepas bacterianas de ambientes mineros procedentes de la Compañía Minera Apacheta Quella S.A. Minera del Norte S.A. ubicada en el distrito de Candarave, región de Tacna.
- Se identificó la cepa N°7 (*Micrococcus sp*) y la cepa N°12 (*Corynebacterium sp*), mediante pruebas bioquímicas, las cuales obtuvieron un mejor rendimiento en la tolerancia de cianuro.
- *Micrococcus sp* obtuvo un 91 % en la degradación de cianuro a diferencia de *Corynebacterium sp* que obtuvo un 50 % en la degradación de cianuro, teniendo a *Micrococcus sp* como la cepa bacteriana con mayor capacidad degradadora de cianuro a 100 ppm.

VI. RECOMENDACIONES

- Continuar con la identificación microbiológica de las bacterias aisladas de los ambientes mineros en la Provincia de Candarave.
- Emplear las bacterias aisladas para la formación de consorcios microbianos de degradación de cianuro y así aumentar la eficiencia en el proceso de biodegradación.
- Continuar con la búsqueda y aislamiento de nuevas cepas procedentes de ambientes y relaves mineros, lo cual permitirá un porcentaje mayor de acierto en cuanto a la identificación de las cepas más eficientes en la degradación del CN.
- Realizar estudios para determinar cuál es la ruta bioquímica que *Micrococcus sp.* utiliza para la degradación del cianuro.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA

- **Adjei, M. D. & Ohta, Y.** (2000) Factors affecting the biodegradation of cyanide by *Burkholderia cepacia* strain C-3. *J. Biosci. Bioengineer.*, vol. 89, p. 274–277.
- **Akcil, A.** (2003). Destruction of cyanide in gold mill effluents: Biological versus chemical treatments. *Biotechnol. Adv.* vol. 21, p. 501–510.
- **Akcil, A., & Mudder, T.** (2003). Microbial destruction of cyanide wastes in gold mining: process review. *Biotechnology Letters*, 25 (6), 445-450.
- **Akcil, A.; Karahan A. G.; Ciftci, H. & Sacdig, O.** (2003). Biological treatment of cyanide by natural isolated bacteria (*Pseudomonas sp.*). *Minerals Engineering.*, col. 16, p. 643–649.
- **Álvarez, G. R.** (2005). “Aplicación de sistemas pasivos para el tratamiento de soluciones residuales de procesos de cianuración en minería de oro”. Tesis doctoral. Universidad de Oviedo, Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Minas de Oviedo, Oviedo,

- **Askeland, R. A. & Morrison S. M.** (1983). Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 45, p. 1802–1807.
- **Babu, G. R. V.; Wolfram J. H., & Chapatwala K. D.** (1992). Conversion of sodium cyanide to carbon dioxide and ammonia by immobilized cells of *Pseudomonas putida*. *Journal of Industrial Microbiology.*, vol. 9, p. 235–238.
- **Barclay, M.; Hart, A.; Knowles, C.J.; Meeussen, J. C. & Tett, V. A.** (1998). Biodegradation of Metal Cyanide by Mixed and Pure Cultures of Fungi. *Enzyme and Microbial Technology.*, vol. 22, p. 223–231.
- **Baxter, J. & Cummings, S. P.** (2006). The Current and Future Applications of Microorganism in the Bioremediation of Cyanide Contamination. *Antonie van Leeuwenhoek.* , vol. 90, p. 1–17
- **Bhalla, T. C.; Sharma, N. & Bhatia R.** (2012). Microorganisms in Environmental Management: Microbes and Environment. Chap. 25: Microbial degradation of cyanides and nitriles, 1 s. t. Edition. Ed. T. Satyanarayan et al., p. 569–587.
- **Boucabeille, C., Bories, A., Ollivier, P., Michel, G.** (1994). Microbial degradation of metal complexed cyanides and thiocyanate from mining wastewaters. *Environ. Pollut.* 84, 59-67.

- **Botz, M.; Mudder, T. & Akcil, A.** (2005). Advances in Gold Ore Processing. Chap. 28: Cyanide treatment: physical, chemical and biological processes. Ed. M. Adams, Elsevier Ltd., Amsterdam, p. 672–702.
- **Brenner Don J.; Krieg Noel R.; Staley James T.** (2005). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Springer (New York). Second Edition
- **Calisaya Calderón, Jesús Miguel.** (2015). Aislamiento y caracterización molecular del ARNr 16S de una cepa bacteriana de cianuro de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Magollo, Tacna - Perú. Tesis para optar el título de Biólogo – Microbiólogo, Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann.
- **Castillo, F.** (2005). "Biotecnología Ambiental", Madrid- España: Tébar, S.L. Pág. 410-411.
- **Castric, P. A., Farnden, K. J., & Conn, E. E.** (1972). Cyanide metabolism in higher plants: V. The formation of asparagine from β -cyanoalanine. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 152 (1), 62-69.
- **Chen, J. L. & Kunz, D. A.** (1997). Cyanide utilization in *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764 involves a putative siderophore, FEMS Microbiol. Lett., vol. 156, p. 61.

- **Coley Benjumea Tatiana y Zapata Zuluaga Diana** (2006), Aislamiento y purificación de microorganismos degradadores de Cianuro, Universidad Eafit, Medellín.
- **Cornejo La Torre Melitza.** (2016). Biorremediación de relaves mineros con un consorcio microbiano nativo caracterizado molecularmente y productor de enzimas degradadoras de cianuro y derivados, Tumbes –Perú.
- **Cotton, F. A. & Wilkinson, G.** (1972) *Advanced Inorganic Chemistry*. 3rd Ed., Interscience. John Wiley & Sons, Inc.. ISBN 0-471-17560-9.
- **Cowan, D.; Cramp, R. A.; Periera R.; Graham, D. & Almatawah, Q.** (1998) Biochemistry and biotechnology of mesophilic and thermophilic nitrile metabolizing enzymes. *Extremophiles.*, vol. 2, p. 207–216.
- **Crison.** (2012). Electrodo selectivo de cianuro. www.Downloads/96_53.pdf.
- **Das, S., & Santra, S. C.** (2011). Cyanide degradation by *Aspergillus niger* strain isolated from steel-plant wastewater. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 10 (7), 2516-2522.

- **Deloya, A.**, (2012), «Tratamiento de desechos del cianuro por bioremediación» *Tecnología en Marcha* 25: 61-72.
- **Dhal, P. K., Islam, E., Kazy, S. K., & Sar, P.** (2011). Culture-independent molecular analysis of bacterial diversity in uranium-ore/-mine waste-contaminated and non-contaminated sites from uranium mines. *3 Biotech*, 1(4), 261–272. <http://doi.org/10.1007/s13205-011-0034-4>
- **Diamond, J. M.** (2012). *Collapse: How societies choose to fail or succeed*. p. 464.
- **Duffey, S. S.** (1981) Cyanide and arthropods. Vennesland, B., Conn, E. E., Knowles, C. J., Westerley, J., & Wissing, F., Eds. *Cyanide in Biology*. Academic Press, London., p. 385–414.
- **Dubey, S. K. & Holmes, D. S.** (1995) Biological cyanide destruction mediated by microorganisms. *World J Microbiol Biotechnol.*, vol. 11, p. 257.
- **Dumestre, A.; Chone, T.; Portal, J. M.; Gerard, M. & Berthelin, J.** (1997) Cyanide Degradation under Alkaline Conditions by a Strain of *Fusarium solani* Isolated from Contaminated Soils. *Applied and Environmental Microbiology.*, vol. 63, No. 7, p. 2729-2734.

- **Dursun, A. y.; Calik, A. & Aksu, Z.** (1999) Degradation of ferrous (II) cyanide complex ions by *Pseudomonas fluorescens*, Proc. Biochem., vol. 34, p. 901.
- **Dursun, A. & Z Aksu.** (2000). «Biodegradation kinetics of ferrous(II) cyanide complex ions by immobilized *Pseudomonas fluorescens* in a packed bed column reactor» *Process Biochemistry* 35(6):615–622. DOI:10.1016/S0032-9592(99)00110-7
- **Dzombak, D. A.; Rajat, S.; Ghosh, G. M. & Wong-Chong, G. M.** (2006). Cyanide in water and soil - Chemistry, Risk, and Management. CRC Press, Taylor & Francis Group., p. 237–308.
- **Ebbs, S.** (2004) Biological degradation of cyanide compounds. In: Environmental biotechnology., vol. 15, p. 231–236.
- **Escalante, R.** (2002) Biodegradación de crudo de petróleo en terrarios, tesis para optar el grado de magister en biotecnología UNMSA Facultad de Farmacia y Bioquímica, 20-22.
- **Fernandez, Dolghih, & Kunz.** (2004). Enzymatic Assimilation of Cyanide via Pterin-Dependent Oxygenolytic Cleavage to Ammonia and Formate in *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764. Applied and Environmental Microbiology, 121-128.

- **Fernández P.** (2007). Desarrollo de un Nuevo Método para la Eliminación de Cianuro de Aguas Residuales de Mina (Tesis Doctoral)
- **Garcés Molina. M, A., Betancur, L. M. A., Mazo, K. I. M. Og Natalia Andrea Salinas, A.** (2006). Aislamiento de consorcio de microorganismos degradadores de cianuro. (Spanish). Revista Lasallista de Investigación, 3(1), 7-12. Recuperado de: <http://search.ebscohost.com/login>.
- **Ghosh, Johannes , Meeussen David, Dzombak A, David.** (2006). Fate and transport of anthropogenic cyanide in soil and groundwater In: Cyanide in water and soil: chemistry, risk, and management. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, p 191–198.
- **Gil-Pavas Eh, Giraldo-Estrada C, Camargo Pa Y Ossa C.** (2005). Proceso “Acoplado” Físico-Químico y Biotecnológico para el Tratamiento de Aguas Residuales Contaminadas con Cianuro. Cuaderno de Investigación N°38. Grupo de Investigación en Procesos Ambientales y Biotecnológicos – GIPAB. Universidad EAFIT. Medellín.
- **Gil Pavas, E y Giraldo Estrada, C.** (2008), Método acoplado fisicoquímico y biológico para la degradación de cianuro *en*

galvanoplastía, Universidad EAFIT, Medellín, Colombia, publicado en la Revista Ingeniería Química N° 463 Año XL Octubre Páginas 156-163

- **González, S.** (2004). “El cianuro es toxico y Letal “. Por la séptima Digital Tuesday July 27, 2004 at 01:09 AM. Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. <http://argentina.indymedia.org/new/2004/07/212476.php>
- **González, L., Pulido J.** (2005). Análisis de alternativas para la degradación del cianuro en la planta de beneficio de las empresas Mineras Nacionales. Universidad Nacional de Colombia.
- **Grufides** (2007), (Grupo de Formación e Intervención para el Desarrollo Sostenible Servicio). Minería en Algamarca: Sacando provecho del dolor de un Pueblo. http://grufidesinfo.blogspot.com/2007/03/el-objetivo-de-este-blog-esdifundir_6673.html
- **Gupta, N.; Balomajumder, C. & Agarwal, V. K.** (2010). Enzymatic Mechanism and Biochemistry for Cyanide Degradation: A Review. J. Hazard. Mater., vol. 176, p.1–13.
- **Gurbuz, F., Ciftci, H., Akcil, A., & Karahan, A. G.** (2004). Microbial detoxification of cyanide solutions: a new

biotechnological approach using algae. *Hydrometallurgy*, 72(1), 167-176.

- **Gurbuz, F.; Hasan, C. & Akcil, A.** (2009). Biodegradation of cyanide containing effluents by *Scenedesmus obliquus*, *J. Hazard. Mater.*, vol. 16(1), p. 74–79.
- **Harris, H. E. & Knowles, C. J.** (1983). Isolation and growth of a *Pseudomonas* species that utilizes cyanide as a source of nitrogen. *J. Gen. Microbiol.*, vol. 129, p. 1005-1011.
- **Henny, C. J.; Hallock, R. J., & Hill, E.F.**(1994). Cyanide and migratory birds at gold mines in Nevada, USA. *Ecotoxicology.*, vol. 3, p. 45–58
- **Hernández L.** (2010) .Evaluación de la capacidad de un aislado bacteriano nativo de *Pseudomonas sp.* como potencial degradador de compuestos cianurados. Tesis de Magister en biotecnología, pag. 27.
- **Hruschka F.** (1998). “Manejo Ambiental en la Pequeña Minería”. Agencia Suiza para el desarrollo y la Cooperación. Bolivia.
- **Huertas M., Luque V. García M.** (2009). Análisis proteómico de la degradación de cianuro. III Jornadas de Divulgación de la Investigación en Biología Molecular, Celular y Biotecnología. Universidad de Córdoba.

- **Huertas, M. J.; Saez, L. P.; Roldan, M. D.; Luque-Almargo, V. M.; Martinez-Luque, M.; Blasco, R.; Castillo, F.; Moreno-Vivian, C.; & Garcia-Garcia, I.** (2010). Alkaline cyanide degradation by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 in a batch reactor: Influence of pH, *Journal of Hazardous Materials.*, vol. 179(13), p. 72–78.
- **Ingvorsen, K., Hojer-Pedersen, B., & Godtfredsen, S. E.** (1991). Novel cyanide-hydrolyzing enzyme from *Alcaligenes xylosoxidans* subsp. *denitrificans*. *Applied and environmental microbiology*, 57 (6), 1783-1789.
- **Jiménez, M.R., Zamora, C.J., Zúñiga, C.G.** (2015). Determinación del flujo de agua para la biorremediación en sistemas recirculados acuoculturales utilizando tapetes microbianos construidos
- **Johnson, D. B.** (2001). Importance of microbial ecology in the development of new mineral.pdf, 59(2-3), 147–157. [http://doi.org/10.1016/S0304-386X\(00\)00183-3](http://doi.org/10.1016/S0304-386X(00)00183-3)
- **Johnson, C. A.** (2014). The fate of cyanide in leach wastes at gold mines: An environmental perspective. *Applied Geochemistry*.

- **Johnson, C. A.** (2015). The fate of cyanide in leach wastes at gold mines: An environmental perspective. *Applied Geochemistry*, 57, 194-205.
- **Kao, C. M.; Liu, J. K.; Lou, H. R.; Lin C. S. & Chen S. C.** (2003) Biotransformation of cyanide to methane and ammonia by *Klebsiella oxytoca.*, *Chem.* 50: 1055 –1061.
- **Knowles, C. J.** (1976) Microorganisms and cyanide. *Bacteriol. Rev.*, vol. 40, p. 652–680.
- **Knowles, C. J., & Bunch, A. W.** (1986). Microbial cyanide metabolism. *Advances in microbial physiology*, 27, 73-111.
- **Kunz, R. G. & Casey, J. P.** (1980) *Environmental Management Handbook for the Hydrocarbon Processing Industries*, Gulf Publishing Co., Houston, Tex., p. 20-28.
- **Lechtenberg, M. & Nahrstedt, A.** (1999). Naturally occurring glycosides, in *Cyanogenic Glycosides*, Ikan, R., Ed., John Wiley & Sons, Chichester, U.K.. Chapter 5.
- **Ley Nº 28271.** (2004) .Fondo Nacional de Ambiente, Perú
- **Logsdon, M. J., Hagelstein, K., y Mudder, T.** (2001). El manejo del cianuro en la extracción de oro. *International Council on Metals and the Environment*. p 3.

- **Logsdon Mark J., Hagelstein Karen, Mudder Terry I., (2003),**
El manejo del cianuro en la extracción de oro,
<http://www.ilustrados.com/publicaciones/EpZpVpEpkkjxcfwDzo.php>. (Consultado: Mayo 22 de 2006).
- **Luque-Almagro, V. M.; Huertas, M. J.; Martínez, M.; Moreno, C.; Roldán, M. D.; García, L. J.; Castillo, F. & Blasco, R.**
(2005). Bacterial Degradation of Cyanide and Its Metal Complexes under Alkaline Conditions. *Applied and Environmental Microbiology.*, vol. 71(2), p. 940–947.
- **Luque-Almagro, V. M. (2006).** Metabolismo del cianuro y del cianato en *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344: Aplicaciones biotecnológicas. *Analistas Económicos de Andalucía. VII Premio Unicaja de Investigación sobre Desarrollo Económico y Estudios Agrarios.* ISBN: 84-95191-81-4.
- **Meyers, P. R.; Gokool, P.; Rawlings, D. E. & Woods, D. R.**
(1991). An efficient cyanide-degrading *Bacillus pumilus* strain, *J. Gen. Microbiol.*, vol. 137(6), p. 1397–1400.
- **Minam (2014).** «Ministerio del Ambiente.» *Ministerio del Ambiente.* Disponible en: http://www.minam.gob.pe/wp-content/uploads/2014/04/GUIA-MUESTREO-SUELO_MINAM1.pdf (último acceso: 3 de 2 de 2016).

- **Ministerio de Energía y Minas.** (2006-2016), Actualización-Inventario de Pasivos Ambientales Mineros. PERÚ. http://www.minem.gob.pe/_detalle.php?idSector=1&idTitular=5769&idMenu=sub5768&idCateg=961
- **Minem.** «**Ministerio de Energía y Minas** (2016).» *Ministerio de Energía y Minas.* s.f. <http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/cd27/compendio-manejo.pdf>. (último acceso: 3 de 3 de 2016).
- **Mosquera Salcedo Catalina** (2013), Aislamiento e identificación de bacterias capaces de degradar cianuro presentes en muestras obtenidas del proceso de extracción de almidón de yuca, Universidad Icesi, Santiago de Cali
- **Montoya C.** (2001). Cianuro, oro y medio ambiente en la minería del nordeste antioqueño. *Revista Facultad de Ingeniería*,;43-49.
- **Mudder** (1997). Referenciado por: Anónimo, 2006, Martha Mine, New Zeland. <http://www.marthamine.co.nz/cyanide.html>. (Consultado: Mayo 22 de 2006).
- **Mudder, T, & J Whitlock.** (1984). Strain of *Pseudomonas paucimobilis*. USA Patente 4,461,834. 24 de Julio de 1984.
- **Mudder, T. I.; Botz, M. & Smith, A.** (2001). *Chemistry and Treatment of Cyanidation Wastes*, 2nd ed., Mining Journal Books

Ltd., London, UK, , ISBN 0-900117-51-6. Disponible
[http://dana6.free.fr/3%20060713%20English%20Compendium.p
df](http://dana6.free.fr/3%20060713%20English%20Compendium.pdf)

- **Mudder, T. I. & Botz, M. M.** (2004). Cyanide and society: A critical review. *The European Journal of Mineral Processing and Environmental Protection.*, vol. 4, p. 62–74.
- **Muñoz Echeverri, L. M., Márquez G., M. A., & Gallego Suarez, D. De J.** (2015). Escalado de un proceso de biooxidación de residuos de minería ricos en sulfuros usando reactores de tanque agitado. Universidad Nacional de Colombia-Sede Medellín. Consultado de <http://www.bdigital.unal.edu.co/50297/>
- **Nahrstedt, A.** (1988). Cyanide compounds in biology: Cyanogenesis and the role of cyanogenic compounds in insects. *Ciba Foundation Symposium* 140.
- **Narancic, T., Djokic, L., Kenny, S. T., O'connor, K. E., Radulovic, V., Nikodinovic-Runic, J., & Vasiljevic, B.** (2012). Metabolic versatility of Gram-positive microbial isolates from contaminated river sediments. *Journal of Hazardous Materials*, 215-216, 243–251. <http://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.02.059>

- **Nawaz, M. S.; Chapatwala, K. D. & Wolfram, J. H. (1989).** Degradation of acetonitrile by *Pseudomonas putida*. Appl. Environ. Microbiol., vol. 55, p. 2267-2274
- **Nelson, M. G.; Kroeger E. B. & Arps P. J. (1998).** Chemical and biological destruction of cyanide: comparative costs in a cold climate. Mineral Processing and Extractive Metallurgy Review., vol. 19, p. 217–26.
- **Novak, D., Franke-Whittle, I. H., Pirc, E. T., Jerman, V., Insam, H., Logar, R. M., & Stres, B. (2013).** Biotic and abiotic processes contribute to successful anaerobic degradation of cyanide by UASB reactor biomass treating brewery waste water. water research, 47 (11), 3644-3653.
- **O'reilly, C. & Turner P. D. (2003).** The nitrilase family of CN hydrolysing enzymes—a comparative study. J. Appl. Microbiol., vol. 95, p. 1161–1174.
- **Patil, Y.B., Panikar, K.M., (1999).** Removal and recovery of metal cyanides using a combination of biosorption and biodegradation processes. Biotechnology Letters 21 (10), 913-919.

- **Patil, Y. B. & Paknikar, K. M.** (2000). Development of a process for biotransformation of metal cyanides from waste waters. *Process Biochemistry.*, vol. 35, p. 1139–1151.
- **Perú, Minem.** (1996) Resolución Directoral N° 025-96-EM/DGAA, aprueba la publicación de las siguientes Guías Ambientales: Guía para el manejo de cianuro y Guía Ambiental para el manejo de reactivos y productos químicos. 09/10/1996.
- **Porter & Knowles.** (1979). Referenciado por: Dubey S.K., Holmes D.S. 1995. Biological cyanide destruction mediated by microorganisms. *World Journal of Microbiology & Biotechnology.* 11: 257-265.
- **Raybuck.** (1992), Biotransformation of cyanide to methane and ammonia by *Klebsiella oxytoca*. *Chemosphere.* 50: 1055-1061.
- **Rainey, F. & Oren, A.** (2006). *Methods in Microbiology: Extremophiles*, 1 s.t. Edition, vol. 35, Chap. 18, 19. Academic Press, London., p. 439–510. ISBN: 978-0-12-521537-4.
- **Restrepo, Oscar J., Montoya C., Muñoz N.** (2006). Degradación microbiana de cianuro procedente de plantas de beneficio de oro mediante una cepa nativa de *P. fluorescens* Dyna, julio, año/vol. 73, 149, Universidad Nacional de Colombia

Medellín, Colombia pp. 46-51

<http://redalyc.uaemex.mx/pdf/496/49614905.pdf>, 2010

- **Riseman J.H.** (1972) American Laboratory 63- 67
- **Rodallega Nazarit Sara E.** (2015) , Aislamiento y caracterización de bacterias capaces de degradar cianuro presentes en tanques de almacenamiento de cianuro en una mina de oro del municipio de Buenos Aires Cauca, Trabajo de grado para optar al título de pregrado en Química Farmacéutica, Universidad Icesi - Facultad de Ciencias Naturales.
- **Rosenberg, E., DeLong, E. F., Lory, S., Stackebrandt, E., & Thompson, F.** (2014). The Prokaryotes. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. Retrieved from <http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-30138-4>
- **Smith, A. & Mudder, T.** (1991). The Chemistry and Treatment of Cyanidation Wastes, Mining Journal Books Ltd, London, p. 345.
- **Smith, A. Y Mudder, T.** (1996). Tratamiento de Residuos de Cianuración Pag. 6-239
- **Steel Y Torrie.** (1986). Bioestadística, Segunda edición.
- **Shumei, F, L Xilong, & L Chunyan.** (2013). «Bioremediation of Cyanide Contamination and Its Applications» Biotechnology Bulletin, 36-42.

- **Tiago, I.; Chung, A. & Verissimo, A.** (2004) bacterial diversity in a nonsaline alkaline environment: heterotrophic aerobic populations. *Appl. Environ. Microbiol.* vol. 70, p. 7378–7387.
- **Torres-Cázares K.L., Casas-Flores S., Garcia-Meza J.V.** (2012). Diversidad Microbiana asociada a terrenos mineros: Diferentes nichos biogeoquímicos (pp. 1–13). México: Instituto de Metalurgia
- **Torres.G.J, Pinzón.S.M, Esquivia.Z.M, Parra. P.A, Espitia.J.E.** (2013). La explotación ilícita de recursos minerales en Colombia. Casos Valle del Cauca (Rio Dagua)- Chocó (Rio San Juan). Efectos sociales y ambientales. Recuperado de: <http://www.contraloriagen.gov.co/...Minerales...Colombia.../49219b35-39ed->.
- **Tuya, Jonathan.** (2014). Evaluación de la capacidad degradativa de cianuro por bacterias alcalófila aisladas de los relaves de la planta concentradora de metales Mesapata Cátac - Ancash. Tesis Biólogo Microbiólogo Parasitólogo, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- **Vaz-Moreira, I., Egas, C., Nunes, O. C., & Manaia, C. M.** (2013). Bacterial diversity from the source to the tap: a comparative study based on 16S rRNA gene-DGGE and culture-dependent

methods. FEMS Microbiology Ecology, 83(2), 361–374.
<http://doi.org/10.1111/1574-6941.12002>

- **Watanabe, A., Yano, K., Ikebukuro, K., & Karube, I.** (1998). Cloning and expression of a gene encoding cyanidase from *Pseudomonas stutzeri* AK61. *Applied microbiology and biotechnology*, 50 (1), 93-97.
- **White and Schnabel, 1997,** (2000) . Biological gold recovery from gold–cyanide solutions. *Int. J. Miner. Process.* 76: 33-42.
- **White and Schnabel,** (1995). Biological cyanide destruction mediated by microorganisms. *World Journal of Microbiology & Biotechnology.* 11: 257-265.
- **Wild,** (1996). Isolation, Selection and Characterization of a Cyanide-Degrading Fungus from an Industrial Effluent. *International Biodeterioration & Biodegradation.* 45-52.

ANEXOS

Anexo 1: Medios de Cultivo

Medio Mineral Buffer carbonato-bicarbonato con Modificaciones

K_2HPO_4	1,0 g/L
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2 g/L
Minerales traza	0,2 mL
Buffer carbonato-bicarbonato	1000 mL

Ajustar pH 9,5 con HCl 1N y NaOH 1N..

Buffer carbonato-bicarbonato 0,1 M:

$NaHCO_3$	8,40 g/700 mL
Na_2CO_3	10,62 g/300 mL

Minerales traza (modificado de Nawaz et al., 1989) en mg/L:

$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	1,0
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,6
$CaCl_2 \cdot H_2O$	2,6
$NaMoO_4 \cdot 2 H_2O$	6,0

Ajustar previamente con HCl 1N a pH 2,5

Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos.

Fuente: Rainey & Oren (2006).

Anexo 2 : Panel Fotográfico

RECONOCIMIENTO Y TOMA DE MUESTRA



Foto 1 : Reconocimiento del terreno



Foto 2 : Reconocimiento de relaves mineros



Foto 3 : Toma de Muestra



Foto 4 : Georeferenciación de Muestra

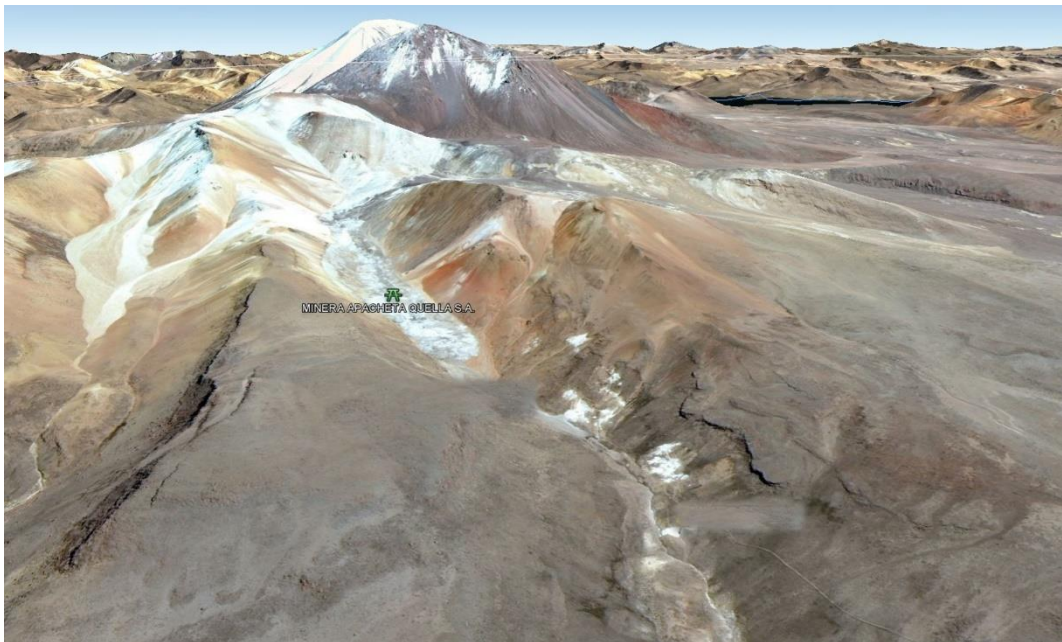


Foto 5 : Vista geográfica de la toma de Muestras

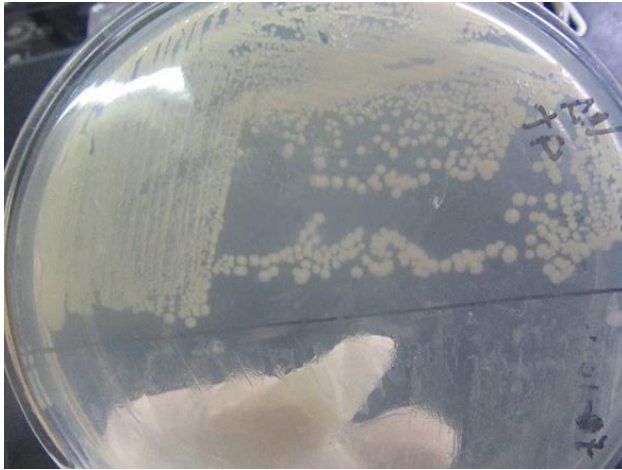


Foto 6 : Aislamiento bacteriano de cepas en agar nutritivo

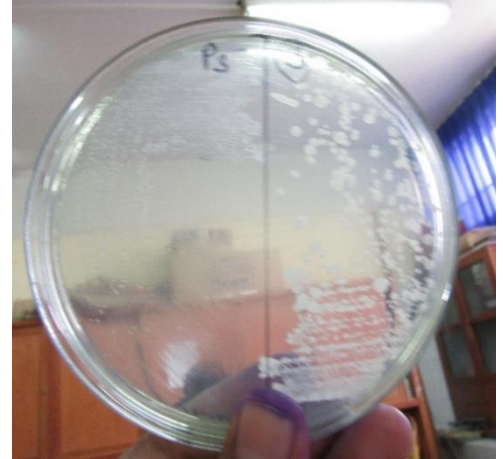


Foto 7 : Caracterización morfológica de bacterias aisladas

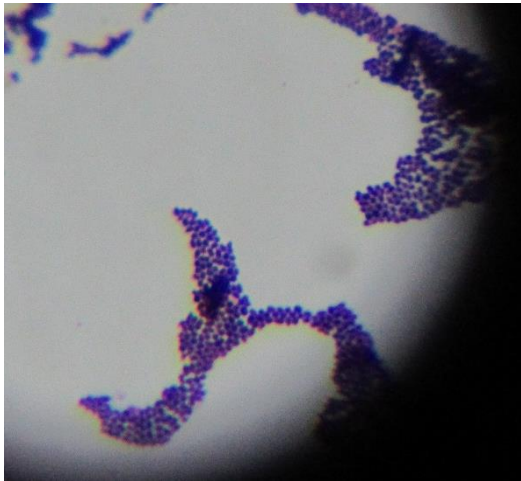


Foto 8 : Cepa 7 (Cocos Gram +)

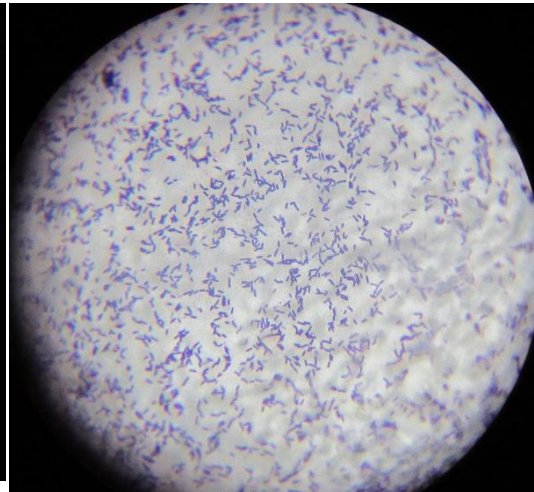


Foto 9 : Cepa 12 (Bacilos Gram +)

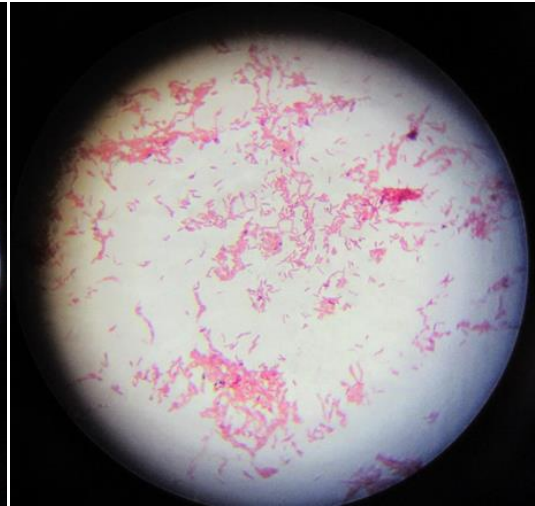
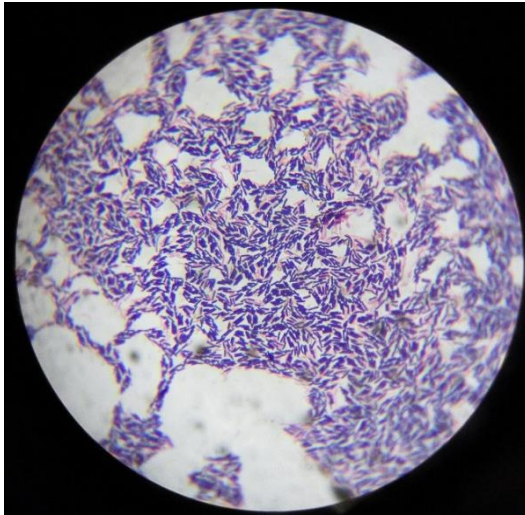


Foto 10 :Tinción Gram de las bacterias aisladas - bacilos gram+.

Foto 11 : Tinción Gram de las bacterias aisladas -bacilos gram –



Foto 12 : Evaluación de la tolerancia a pH alcalinos

Foto 13 : Evaluación de la tolerancia a diferentes concentraciones de cianuro

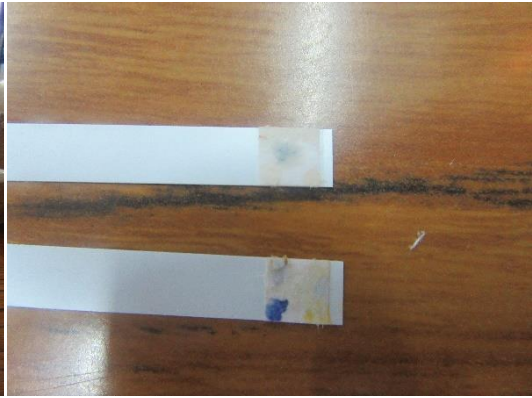


Foto 14 : Identificación de pruebas Bioquímicas **Foto 15 :** Prueba de la Oxidasa



Foto 16 : Instalacion de Biorreactores para la evaluación de degradación de Cianuro **Foto 17 :** Medicion del Ph de la muestra de los biorreactores

Anexo 3 : Determinación de Cianuro Libre (CN⁻) por volumetría

A. Reactivos:

- Solución indicadora de yoduro de potasio al 5%.
- Solución estándar de nitrato de plata: Disolver 0,6522 g de AgNO₃ en agua y aforar a un litro. Mezclar bien. Guardar en botella oscura y proteger de la luz.
- Solución de hidróxido de sodio 1 M.

B. Procedimiento:

1. Verificar que las muestras a las que se va a medir el cianuro estén alcalinas (pH>11). Si no es el caso, adicionar gotas de la solución de NaOH 1 M.
2. Verter con una pipeta volumétrica 10 ml de la muestra en un vaso de precipitado y adicionar tres gotas del indicador KI al 5%.
3. Titular con la solución estándar de nitrato de plata hasta cambio de color de transparente incoloro a amarillo claro opaco si está utilizando.

4. Registrar el volumen de solución utilizado.
5. Repetir el análisis en blanco (utilizando agua destilada como muestra).

C. Interpretación:

1 mL de la solución de nitrato de plata equivale a 20 mg/L de cianuro cuando se toma una alícuota de 10 ml de la muestra problema.

D. Cálculos:

$$\text{Concentración de cianuro (mg/L)} = (A - B) \times 20$$

A = mL de nitrato de plata empleados en titular 10 mL de la muestra problema.

B = mL de nitrato de plata empleados en titular 10 mL de agua.

Dr. César Cáceda Quiroz

ASESOR

Sandra L. Gutierrez Acarapi

Tesista