

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN

Facultad de Ciencias

Escuela Profesional de Biología - Microbiología

**Aislamiento y purificación de microorganismos
biodegradadores de cianuro obtenidos
de un pasivo ambiental minero
ubicado en el distrito
de Palca, Tacna.**

TESIS

Presentada por:

Bach. Gisela July Maraza Choque

**Para optar el Título Profesional de:
BIÓLOGO MICROBIÓLOGO**

TACNA - PERÚ

2022

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS N° 375

En la ciudad de Tacna, a través de la plataforma Google Meet, de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann; siendo las 12:00 horas del día 02 de diciembre del 2022. Estando presente el jurado calificador nominado por Resolución de Facultad N° 10394-2022-FACI-UN/JBG, conformado por los siguientes docentes:


Presidente: Msc. Luis Lloja Lozano
Secretario: Dr. Daladier Miguel Castillo Cotrina
Miembro: Dr. Roberto Castellanos Cabrera

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 instó a la (el) Bachiller: Gisela July Maraza Choque, a exponer la tesis: Aislamiento y purificación de microorganismos biodegradadores de cianuro obtenidos de un pasivo ambiental minero ubicado en el distrito de Palca, Tacna.

Siendo las 12:40 horas, el tesista concluye su exposición, luego se procedió a la formulación de las preguntas por parte de los miembros del jurado calificador. Terminando el proceso, se invitó a que los miembros del jurado emitan su calificación de acuerdo a reglamento. El promedio de calificación dio el siguiente resultado. Aprobado (por unanimidad), con el calificativo de diecisiete nota 17 de acuerdo al reglamento de Grados y Títulos de la Facultad de Ciencias.


Siendo las 13:30 horas, se dio por concluido el acto de sustentación de la tesis firmando los señores miembros del jurado calificador, en señal de conformidad.



Msc. Luis Lloja Lozano
Presidente



Dr. Daladier Miguel Castillo Cotrina
Secretario



Dr. Roberto Castellanos Cabrera
Miembro

DEDICATORIA

A Dios

Por ser mi guía bajo el cielo, mi fortaleza en medio de la debilidad.

A mis padres Silverio Maraza y Amalia Choque

Por su amor, paciencia y comprensión, en todo este periodo académico.

A mis queridos hermanos Verónica y Juan Carlos

Por darme el apoyo emocional cuando sentía que el camino se terminaba.

A mis grandes amigas Judy, Sarita, Anita, Mayumi, Sandrita, Galeska y

Milena

Por formar parte de este gran desafío.

Al Dr. César Julio Cáceda Quiroz, mi estimado asesor

Por orientar con sapiencia el desarrollo de la presente investigación.

A ustedes por siempre mi corazón y mi gratitud infinita

CONTENIDO

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN	1
1.1 Hipótesis	3
1.2 Objetivos	4
1.2.1 Objetivo General.....	4
1.2.2 Objetivos Específicos	4

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO.....	5
2.1 Pasivos ambientales mineros en el Perú.....	5
2.2 Contaminación de los Pasivos Ambientales	8
2.3 Pasivos Ambientales Mineros en el Distrito de Palca.....	11
2.3.1 Descripción Geográfica	11
2.3.2 Ex Unidades Mineras.....	12
2.4 El Cianuro.....	13
2.5 El pH en la Disociación del Cianuro.....	15
2.6 Fuentes Naturales de Cianuro	20
2.7 Fuentes Antropogénicas de Cianuro	24
2.7.1 Estándares de Calidad Ambiental	25

2.8 Intoxicación por Cianuro.....	27
2.9 Metabolismo del Cianuro en un Organismo Vivo	28
2.10 Tratamiento Químico del Cianuro	29
2.11 Degradación Biológica de Cianuro por Microorganismos.....	32
2.12 Rutas Metabólicas	42
CAPÍTULO III	
MATERIALES Y MÉTODO	52
3.1 Material biológico	52
3.2 Materiales y Equipos.....	52
3.3 Diseño de la investigación	53
3.4 Metodología	53
3.4.1 Lugar de Muestreo.....	53
3.4.2 Recolección de las Muestras.....	56
3.4.3 Aislamiento de los Microorganismos	57
3.4.4 Identificación	57
3.4.5 Preservación de Cultivos de Cepas Bacterianas	58
3.4.6 Medio Mineral 9M.....	59
3.4.7 Curva de Calibración	59
3.4.8 Tolerancia y Selección de los Microorganismos frente al NaCN	62
3.4.9 Parámetros para la Biodegradación del NaCN	63

3.4.10 Instalación de los Biorreactores	63
3.4.11 Titulación del NaCN	64
3.4.12 Eficiencia de Degradación	65
3.4.13 Proceso de Biodegradación de NaCN	66
3.4.14 Método Colorimétrico para Detectar Amonio	67
3.4.15 Análisis Estadístico	68
CAPITULO IV	
RESULTADOS.....	69
4.1 Características microbiológicas de bacterias aisladas.....	69
4.2 Identificación de las cepas aisladas por pruebas bioquímicas	76
4.3 Tolerancia y selección de las bacterias frente al NaCN.....	80
4.4 Evaluación de la degradación de las cepas seleccionadas	82
4.5 Eficiencia de degradación	103
CAPÍTULO V	
DISCUSIÓN	106
CONCLUSIONES	111
RECOMENDACIONES	112
REFERENCIAS	113
ANEXOS.....	132

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Situación de los pasivos ambientales mineros en la región de Tacna.....	7
Tabla 2 Concentración de cianuro en plantas	23
Tabla 3 Ventajas y desventajas de los métodos de tratamiento con cianuro	30
Tabla 4 Especies microbianas degradadoras de cianuro (parte 1)	35
Tabla 5 Especies microbianas degradadoras de cianuro (parte 2)	39
Tabla 6 Características de cianuro hidratasa de diferentes microorganismos.....	44
Tabla 7 Características de nitrilo hidratasa de diferentes microorganismos	45
Tabla 8 Características de cianidasa en diferentes microorganismos.	46
Tabla 9 Características de la nitrilasa en diferentes microorganismos	46
Tabla 10 Puntos de muestreo	54
Tabla 11 Descripción de los puntos de muestreo.....	55
Tabla 12 Conteo de células en la cámara de Petroff Hausser vs OD de 600 nm. .	60
Tabla 13 Identificación macroscópica y microscópica de las cepas	69
Tabla 14 Identificación de cepas seleccionadas por pruebas bioquímicas	77
Tabla 15 Cepas bacterianas preseleccionadas en Medio Mineral 9M con NaCN	80
Tabla 16 Concentración microbiana, cianuro y eficiencia de la cepa PP_26	83
Tabla 17 Concentración microbiana, cianuro y eficiencia de la cepa PP_33	85

Tabla 18	Concentración microbiana, cianuro y eficiencia de la cepa PP_20	87
Tabla 19	Concentración microbiana, cianuro y eficiencia de la cepa PP_04	89
Tabla 20	Concentración microbiana, cianuro y eficiencia de la cepa PP_37	91
Tabla 21	Concentración microbiana, cianuro y eficiencia de la cepa PP_13	93
Tabla 22	Concentración microbiana, cianuro y eficiencia de la cepa PP_36	95
Tabla 23	Concentración microbiana, cianuro y eficiencia de la cepa PP_02	97
Tabla 24	Concentración microbiana, cianuro y eficiencia de la cepa PP_34	99
Tabla 25	Concentración microbiana, cianuro y eficiencia de la cepa PP_11	101

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Bocamina del pasivo ambiental ubicado en Palca.....	9
Figura 2 Pasivo ambiental de estudio en el Distrito de Palca	11
Figura 3 Ubicación de los pasivos ambientales del Distrito de Palca.....	13
Figura 4 Formación de cianuro libre.....	18
Figura 5 Especiación del cianuro en fase sólida, líquida y gaseosa.....	19
Figura 6 Degradación de cianuro en <i>Pseudomonas fluorescens</i>	41
Figura 7 Pasivo ambiental Chulluncane ubicado en el distrito de Palca.....	54
Figura 8 Curva de calibración cámara de Petroff Hausser vs OD de 600nm.	61
Figura 9 Biorreactores manuales.....	64
Figura 10 Titulación del cianuro con AgNO_3	65
Figura 11 Escala colorimétrica de amoníaco	67
Figura 12 Remoción de cianuro frente a la cepa PP_26	84
Figura 13 Remoción de cianuro frente a la cepa PP_33	86
Figura 14 Remoción de cianuro frente a la cepa PP_20	88
Figura 15 Remoción de cianuro frente a la cepa PP_04	90
Figura 16 Remoción de cianuro frente a la cepa PP_37	92
Figura 17 Remoción de cianuro frente a la cepa PP_13	94
Figura 18 Remoción de cianuro frente a la cepa PP_36	96

Figura 19 Remoción de cianuro frente a la cepa PP_02	98
Figura 20 Remoción de cianuro frente a la cepa PP_34	100
Figura 21 Remoción de cianuro frente a la cepa PP_11	102
Figura 22 Eficiencia de biodegradación de cianuro por cada cepa	103
Figura 23 Eficiencia de degradación - valores no paramétricos	104
Figura 24 Eficiencia de degradación - valores paramétricos	105

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1 Medio Mineral 9M modificado	132
Anexo 2 Recuento de bacterias en cámara Petroff Hausser.....	133
Anexo 3	134
Pasivos ambientales en la Ex Unidad Minera Chulluncane	134
Anexo 4 Etapa de pre enriquecimiento de las muestras de suelo	135
Anexo 5 Aislamiento microbiano de muestras de suelo y fango.....	136
Anexo 6 Protocolo para tolerancia al cianuro por la bacteria	137
Anexo 7 Protocolo de biodegradación	138
Anexo 8 Medición de amonio con reactivo	139
Anexo 9 Tolerancia al cianuro 50 y 200ppm en Agar Nutritivo.....	140
Anexo 10 Lectura en el Espectrofotómetro	140
Anexo 11 Pruebas bioquímicas.....	141
Anexo 12 Protocolo para la criopreservación de las cepas bacterianas	142
Anexo 13 Formato para el llenado del proceso de degradación.....	143

RESUMEN

El presente estudio de investigación tuvo como objetivo el aislamiento y purificación de microorganismos biodegradadores de cianuro obtenidos de un pasivo ambiental minero ubicado en el distrito de Palca, Tacna. El cianuro es uno de los productos químicos más tóxicos que se emplean para la extracción de minerales. La aplicación de especies microbianas en forma de bacterias, hongos, protozoos, algas y levaduras han ganado una atención considerable, debido a la robustez y el respeto al medio ambiente durante el proceso. Las bacterias nativas que viven dentro de los pasivos ambientales mineros han desarrollado mecanismos de adaptación y persistencia a estos ambientes tóxicos. En nuestra investigación, se aislaron, identificaron y se evaluaron la eficiencia de degradación de cianuro de un conjunto de bacterias provenientes de un pasivo ambiental ubicado en el distrito de Palca, departamento de Tacna, Perú. Los estudios se realizaron a nivel de laboratorio exponiendo las bacterias a condiciones alcalinas para comprobar su tolerancia, eficiencia y biodegradación al cianuro de sodio. Como resultado de esta, se obtuvieron varias cepas bacterianas con alta capacidad de degradar cianuro demostrando un gran potencial de aplicación a escala industrial.

ABSTRACT

The objective of this research was the isolation and purification of cyanide biodegrading microorganisms obtained from a mining environmental liability located in the district of Palca, Tacna. Cyanide is one of the most toxic chemicals used for mineral extraction. The application of microbial species in the form of bacteria, fungi, protozoa, algae and yeasts has gained considerable attention, due to the robustness and environmental friendliness during the process. The native bacteria that live within the mining environmental liabilities have developed mechanisms of adaptation and persistence to these toxic environments. In the present work, the efficiency of cyanide degradation of a set of bacteria from an environmental liability located in the district of Palca-Peru was isolated, identified and evaluated. The studies were carried out at the laboratory level exposing the bacteria to alkaline conditions to check their tolerance, efficiency and biodegradation to sodium cyanide. As a result, several bacterial strains with a high capacity to degrade cyanide will be needed, demonstrating great application potential at the industrial scale.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

El cianuro es uno de los productos químicos más tóxicos que las empresas de procesamiento de minerales de todo el mundo emplean para la extracción de oro y plata (Anning et al., 2019; Botz et al., 2016). En tales circunstancias, algunas industrias informales, además de ser grandes consumidoras de cianuro vierten a la naturaleza sus residuos sin ningún tratamiento, lo cual sobrepasa la capacidad de autorrecuperación del medio ambiente. Varios mecanismos para la eliminación de cianuro en estos residuos mineros se constituyen en objeto de investigación, entre ellos el uso de la biodegradación (Guamán & Nieto, 2018). Muchos estudios demuestran la susceptibilidad del cianuro para ser metabolizados por mecanismos biológicos, con el fin de satisfacer los criterios ambientales de descarga, debido a que los métodos convencionales generan altos costos en lo económico y ambiental. La aplicación de especies microbianas en forma de bacterias, hongos, protozoos, algas y levaduras han ganado una atención considerable, debido a la robustez y el respeto al medio ambiente durante el proceso (Razanamahandry et al., 2019). Además, el uso del sistema microbiano produce compuestos útiles que ayudan a eliminar la toxicidad en la mayoría de los procesos industriales (Alvillo-Rivera et al., 2021). Los pasivos ambientales mineros (PAM) contribuyen a la existencia de compuestos tóxicos en el suelo, haciendo de este un ambiente hostil para los microorganismos presentes. Sin embargo, en estos residuos mineros existen

bacterias con mecanismos que producen una biotransformación de estos compuestos. Por lo tanto, las bacterias nativas que viven dentro de estos pasivos han desarrollado mecanismos de adaptación y persistencia a estos ambientes tóxicos. A la fecha se han registrado 7 956 PAM distribuidos en diferentes zonas geográficas de Perú (Castillo et al., 2021). La actividad minera en la Región Tacna tiene un enorme potencial en la minería metálico y no-metálico, contando con 165 PAM (Minem, 2021). En el presente estudio de investigación, se aisló, identificó y se evaluó la eficiencia de degradación de cianuro de un conjunto de bacterias provenientes del pasivo ambiental “Chulluncane” ubicado en el distrito de Palca.

Planteamiento del problema

El cianuro es el compuesto lixivante más utilizado en la industria metalúrgica, se libera en el medio ambiente debido a la combustión de carbón, la refinación de petróleo, la producción de hierro y acero, la quema de plásticos, la incineración de desechos domésticos, entre otros. (Kumar et al., 2016).

Los pasivos ambientales contribuyen a la existencia de compuestos tóxicos en el suelo, haciendo de éste un ambiente hostil para los microorganismos presentes, sin embargo, en estos residuos mineros existen bacterias con mecanismos que destacan la biotransformación de estos compuestos. Por lo tanto, las bacterias nativas que viven alrededor de estos pasivos, han desarrollado mecanismos de adaptación y persistencia a estos ambientes tóxicos.

Por tal motivo es necesario orientar la investigación a aislar y potencializar bacterias aerobias como una alternativa biológica en respuesta a la problemática ambiental.

En tal sentido, nos planteamos la siguiente pregunta:

¿Qué microorganismos aislados en el pasivo ambiental minero Chullancane, ubicado en el distrito de Palca, tendrán la capacidad de biodegradar cianuro?

1.1 Hipótesis

- Los microorganismos aislados del pasivo ambiental minero ubicado en el distrito de Palca, son tolerantes y biodegradan al compuesto tóxico cianuro de sodio.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo General

- Aislar y purificar microorganismos que biodegradan cianuro obtenidos de un pasivo ambiental minero ubicado en el distrito de Palca, Tacna.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Identificar las cepas aisladas mediante pruebas bioquímicas.
- Determinar el grado de tolerancia al cianuro en los microorganismos aislados.
- Evaluar, mediante un biorreactor aireado, la capacidad biodegradadora de las bacterias aisladas frente al cianuro.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Pasivos ambientales mineros en el Perú

Según la Ley 2827 “Ley que regula los pasivos ambientales de la actividad minera”, son considerados pasivos ambientales aquellas 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 (Minem, 2021).

El Riesgo se define como la posibilidad de que un contaminante pueda ocasionar efectos adversos a la salud humana, en los ecosistemas, en el suelo, en el agua, tomando en consideración el número de individuos, ecosistemas o bienes que, como consecuencia de la presencia de los contaminantes, podrían afectarse en el presente y futuro (Asociación de servicios de Geología y Minería iberoamericanas (ASGMI), 2010 ; Grufides, 2016).

El Perú posee una de las principales reservas mundiales de plata, cobre, zinc y oro. Sin embargo, la actividad minera ejerce en el ambiente un peligro asociado al Pasivo Ambiental Minero (PAM). Se afirmó lo siguiente:

Los PAM son resultado de un mal cierre de mina, es decir, sin un manejo ambiental apropiado y certificado por la autoridad competente; son instalaciones

efluentes, emisiones, restos o depósitos de residuos producidos por operaciones mineras abandonadas o inactivas que constituyen un riesgo permanente y potencial para la salud humana, el ambiente y la propiedad (Castillo et al., 2021, p 4).

Han acontecido muchos incidentes en todo el Perú debido a un manejo inadecuado o fallas durante el transporte, por ejemplo en el año 2001 en el departamento de Puno, se informó que colapsó parte del muro de contención de la Laguna de Relave (2m de ancho por 3m de alto), desembalsándose aproximadamente 15 000 m³, recorriendo 500 m para llegar finalmente al río Paratía (MINAM, 2006). De la misma manera en la región de Ancash, en el año 2019, se informó que aproximadamente 28 toneladas de relave minero desbordaron cerca al cauce de la quebrada Rahuar, cuyas aguas son aportantes al río Casma (ANA, 2019). En la región de Huancavelica, en el año 2020, se informó el derrame de 37 000 m³ de relave de la mina Cobriza afectando al río Mantaro (Newsletter, 2020). Nuevamente en la región Puno durante el presente año se informó un derrame minero por parte de la unidad minera El Cofre, afectando las cuencas del río del distrito de Paratía (ANDINA, 2022) y en la provincia limeña de Huarochirí del mismo año se informó el derrame de un reservorio de relave minero de la mina Huampar, afectando negativamente la flora y fauna del río Cashca (Tiempo Minero, 2022) .

Según fuentes de la propia empresa minera SOUTHERN, vertieron 785 millones de toneladas de relaves mineros durante 36 años (1960 hasta el año 1996),

en la bahía de Ite de la región Tacna, la minera utilizó 35 kilómetros del cauce del río Locumba para arrojar 119 mil toneladas de relaves de cobre al día (Moreno, 2015; Churata & Chambilla, 2019).

Por otro lado, el Ministerio de Energía y Minas, mediante la Ley N° 28271, tiene registrado desde el año 2006 hasta el año 2021, 7956 PAM distribuidos en diferentes ámbitos geográficos del país. Las regiones que presentan mayor número de pasivos son: Áncash (15,5%), Cajamarca (14,5%) y Puno (11,6%) catalogados como alto, medio, bajo e insignificante, Tacna ocupa el puesto número 12 con el 2,1% (Ver Tabla 1) (MINAM, 2020; Castillo et al., 2021).

Tabla 1

Situación de los pasivos ambientales mineros en la región de Tacna

Región	Muy alto	Alto	Medio	Bajo	Insignificante	Total	%
Ancash	54	107	385	535	154	1235	15,5
Cajamarca	32	251	470	265	138	1156	14,5
Puno	6	38	192	434	251	921	11,6
Lima	22	85	203	195	147	652	8,2
Tacna	0	1	3	63	98	165	2,1

Nota. Adaptado de *Pasivos ambientales mineros en el Perú: Resultados de la auditoría de desempeño sobre gobernanza para el manejo integral de los PAM* (p. 13), por Castillo, Satalaya, Paredes, 2021, Contraloría General de la República, I

2.2 Contaminación de los Pasivos Ambientales

Uno de los mayores peligros que emanan los pasivos ambientales es la contaminación de las aguas superficiales y subterráneas. La contaminación de las aguas se debe a la liberación de contaminantes tóxicos contenidos en los residuos mineros y desde las obras mineras, los tajos abiertos, las bocaminas, entre otros (Grufides, 2016).

El potencial de contaminación depende de las condiciones específicas del sitio, incluyendo el diseño y la operación de la extracción del procesamiento. Los principales mecanismos de transporte a las aguas superficiales y subterráneas son el escurrimiento superficial y la infiltración (Ver Figura 2). La formación de Drenaje Ácido de Mina (DAM) se debe a la oxidación de minerales sulfúricos en presencia del agua y oxígeno. Las aguas superficiales se pueden contaminar debido a la erosión y descarga de sedimentos provenientes de los tajos abiertos, tanques de relaves, desmontes, etc., hacia los cuerpos acuáticos (Luo, 2019; Shao et al., 2020).

Figura 1

Bocamina del pasivo ambiental ubicado en Palca



Nota. Posible proceso de infiltración al suelo y aguas subterráneas.

La región Tacna cuenta con un total de 165 (2,1%) pasivos ambientales, catalogados por diferentes subtipos entre ellos: Bocaminas, desmonte de mina, relaves, otras labores mineras, otras infraestructuras y otros residuos mineros (Castillo et al., 2021).

Bocamina: Es el espacio físico por donde se hace el ingreso a una mina subterránea. Es el límite entre el espacio exterior y el espacio interior donde se realizan las actividades mineras. Sus características están en función del tamaño (ancho x alto) que le dan facilidades para los accesos de los trabajadores, los equipos de transporte para la extracción del mineral y/o los camiones (Chávez, 2015).

Depósito de relave: Es el área ocupada por los materiales (de grano fino) sin valor, que se obtiene, como producto de los procesos de concentración de minerales, estos relaves se han dispuesto en forma de pulpa, eliminando el agua después de la sedimentación de los sólidos (Chávez, 2015).

Chimenea: Es una perforación vertical que se ejecuta en la roca y que tiene la misión de comunicar a más de una galería en el interior de las minas subterráneas, las que salen a superficie generalmente sirven para la ventilación de la mina (Chávez, 2015).

Desmonte de mina: Es el área ocupada por los materiales extraídos del interior de la mina o del área de explotación a tajo abierto, que no contiene valores extraíbles o que su extracción no es económica, por lo que se han dispuesto en un lugar donde no se realizan actividades de explotación (Chávez, 2015).

Edificaciones e instalaciones: Son las construcciones como: planta concentradora, laboratorios, campamentos, oficinas, talleres, almacenes, suministro de energía y agua (Chávez, 2015).

Tajo abierto: Es la depresión o cavidad dejado por la explotación de minerales desde la superficie del suelo (Chávez, 2015).

2.3 Pasivos Ambientales Mineros en el Distrito de Palca

La presente investigación analiza el pasivo ambiental minero ubicado en el distrito de Palca, provincia de Tacna, Región Tacna, el cual está situado entre los 2 000 a 4 500 m.s.n.m., teniendo como límites por el norte a la provincia de Tarata; por el sur con los distritos de Pachía, Pocollay y Tacna; por el este, con las Repúblicas de Chile y Bolivia; por el oeste con los distritos de Pachía y Tarata. El distrito de Palca posee un clima templado y frígido; con una temperatura media anual de 12°C a 16°C y mínimo 7°C a - 5°C (Municipalidad Distrital de Palca, 2008).

2.3.1 Descripción Geográfica

Los pasivos ambientales ubicados en el distrito de Palca presentan en su geografía abruptas quebradas y planicies altiplánicas, junto a una variada y singular flora y fauna silvestre, además tienen como cuenca principal el río Caplina (Ver Figura 1).

Figura 2

Pasivo ambiental de estudio en el Distrito de Palca



Nota. Elaboración propia.

2.3.2 Ex Unidades Mineras

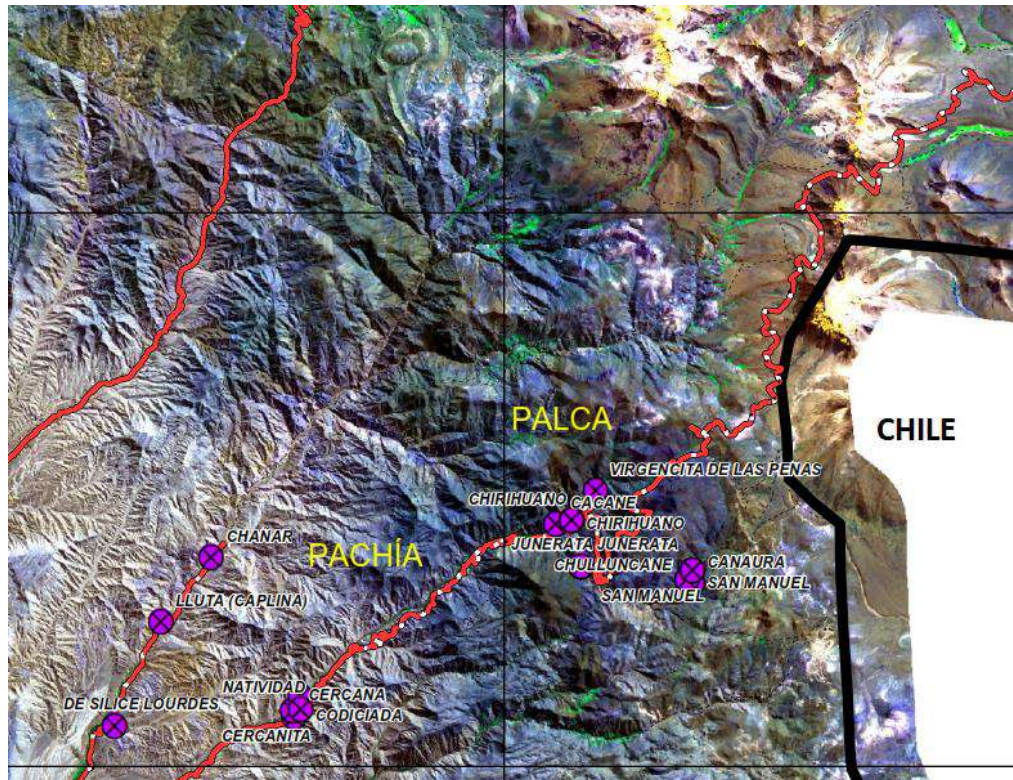
Las ex unidades mineras identificadas según el anexo del inventario de PAM, aprobado por Resolución Ministerial N° 238-2020-MEM/DM tienen los siguientes nombres: Junerata, Virgencita de las peñas, Chulluncane, Canaura, San Manuel, Ingenio, Quebrada Tocuco e Higuera (ver Figura 3).

A. Ex Unidad Minera Chulluncane

Se ubica a 24 km aproximadamente del distrito de Palca en carretera asfaltada y trocha carrozable hasta el cruce del denominado paradero “la portada”, seguidamente camino de herradura por el lecho del río a 4,5 km. debido a que el acceso está deteriorado (ver Anexo 4). Presenta pastoreo de animales camélidos a 50 m de los pasivos ambientales.

Figura 3

Ubicación de los pasivos ambientales del Distrito de Palca



Nota. Adatada de *Estudios especializados para los instrumentos técnicos sustentatorios para el ordenamiento territorial*, por Gerencia Regional de Recursos Naturales y Gestión del Medio Ambiente (GRRNGMA), 2015, Gobierno Regional de Tacna.

2.4 El Cianuro

Según Shriver (1966, citado por Anning et al. (2019), indica que: “El cianuro es un compuesto químico formado por un átomo de carbono y un átomo de nitrógeno, unidos por un triple enlace ($C \equiv N$)⁻”. El cianuro de hidrógeno o ácido

cianhídrico (HCN) es incoloro o de color azul claro, existe como líquido o gas, con un ligero aroma amargo, parecido a las almendras. Es un ácido débil con una masa molecular relativa de 27,03 mol. El cianuro tiene una constante de disociación (pka) de 9,22 a una temperatura de 25 °C (p. 2).

Es muy peligroso y tóxico, su toxicidad se debe a sus propiedades fisicoquímicas (Gurbuz et al., 2009). Hay tres clases de compuestos de cianuro que están disponibles en la solución de aguas residuales después del proceso de cianuración; cianuro libre, complejos de cianuro débil y complejos de cianuro fuertes (Botz et al., 2005).

El proceso de cianuración ha sido, y sigue siendo, un proceso rentable y altamente eficiente para la recuperación de metales preciosos a partir de minerales (Mekuto et al., 2016). La cianuración utilizada para la extracción de oro y otros metales en las actividades mineras generan cantidades de desechos que contienen cianuro (Gurbuz et al., 2009), éste a la vez requiere un tratamiento antes de ser liberado al medio ambiente (Luque-Almagro et al., 2017).

Se necesita aproximadamente 1,0 kg de cianuro de sodio o potasio para recuperar 1,5 g de oro (Sancho et al., 2007).

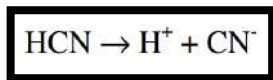
Los compuestos de cianuro son únicos debido a la presencia del grupo de triple enlace de carbono-nitrógeno ($C\equiv N$)⁻ (Mahendran et al., 2019). El cianuro se utiliza principalmente para el procesamiento de oro en las actividades mineras (Akcil, 2003; Luque-almagro et al., 2011).

El cianuro se utiliza ampliamente entre las diferentes industrias, tales como: nylon, plástico, adhesivos, cosméticos, fármacos, sales de carretera (Akcil et al., 2003; Huertas, 2006; Luque-almagro et al., 2011), industrias de hierro, acero, pesticidas, drogas químicas, revelado fotográfico y galvanoplastia (Mahendran et al., 2019), sin embargo, el humo ambiental del tabaco es la fuente más común de cianuro (Jaszczak et al., 2017).

2.5 El pH en la Disociación del Cianuro

Según Mudder et al., (2001) menciona que: “Los cianuros libres se definen como las formas de cianuro iónico y molecular liberados en una solución acuosa por la disolución y disociación (o ionización) de compuestos y complejos de cianuro”. Por lo tanto, el término cianuro libre se limita a dos especies, el ion cianuro (CN^-) y el ácido cianhídrico o cianuro de hidrógeno (HCN). La proporción relativa de estas dos formas depende del pH del sistema (p. 7).

El ácido cianhídrico es un ácido relativamente débil y su disociación en solución acuosa en el anión cianuro se expresa mediante la siguiente ecuación:



A cualquier pH y temperatura en particular, las cantidades relativas de cada uno de estos dos compuestos de cianuro libres presentes en el equilibrio se pueden determinar a partir de la siguiente expresión, donde los compuestos entre paréntesis

son concentraciones molares y K es la constante de equilibrio (National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme (NICNAS), 2010):

$$K = \frac{[H^+][CN^-]}{[HCN]} = 2.03 \times 10^{-10}, pK_a = 9.31 (20^\circ C)$$

El “cianuro libre” en el agua generalmente se considera como la suma de cianuro presente como HCN y CN⁻ (USEPA, 1980, como se citó por NICNAS, 2019). En la mayoría de las aguas naturales (pH de 6 a 8) predomina el HCN (Brix et al., 2000 como se citó por NICNAS, 2019). A cualquier pH y temperatura en particular, el sistema está en equilibrio.

Ghosh (2005), citado por Anning et al. (2019) mencionó que: “la disociación del cianuro en agua depende del pH de esa solución, es decir cuando el pH es inferior a 9,3 el cianuro total existirá como moléculas de cianuro de hidrógeno (HCN); por el contrario, cuando el pH es superior a 10,2 el cianuro total existirá como anión cianuro (CN⁻)” (Hagelstein, 1997, citado por Gurbuz et al., 2009).

Mudder et al. (2001) afirmó lo siguiente:

El comportamiento del pH del cianuro es importante en los procesos de extracción de oro-cianuro porque a un pH de 10,5 o mayor, la mayor parte del cianuro libre en el agua será el anión cianuro (CN⁻).

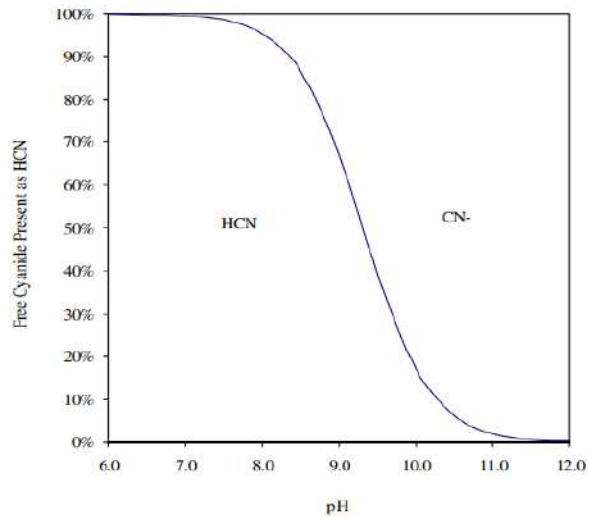
Dado que el contenido de HCN es bajo a este valor de pH, la capacidad de pérdida de cianuro por volatilización es limitada. El HCN molecular tiene un punto de ebullición bajo y una presión de vapor alta y puede perderse de la solución, particularmente donde hay una interfase agua/aire.

Desde un punto de vista práctico, económico o de seguridad, el pH de la solución debe ser superior a 10,0 para limitar la formación y pérdida de HCN de los sistemas acuosos (p. 8).

Pérez & Higuera, (2008) también recalcaron que la velocidad de volatilización depende de la concentración de (HCN⁻) en función de la concentración de cianuro total del pH (Figura 4), del área superficial, de la profundidad de la solución, la temperatura y de los fenómenos de transporte asociados con la mezcla. Por consiguiente, para minimizar la pérdida de cianuro, se debe en lo posible mantener el pH por encima de 10,0.

Figura 4

Formación de cianuro libre.



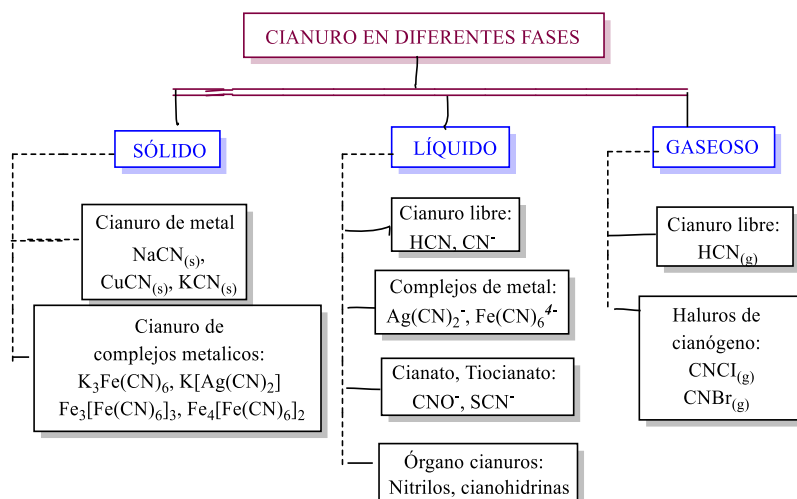
Nota. Formación de cianuro de hidrógeno (HCN) y cianuro libre (CN-) en soluciones acuosas en función del pH. Adaptada de *Comportamiento electroquímico del cianuro* (p. 66), por Pérez, Julio; Higuera, Óscar, 2008, *Revista Científica Ingeniería y Desarrollo* 24(24)

Las sales inorgánicas simples o los cianuros de metales alcalinos más comunes como, el cianuro de sodio y potasio (NaCN y KCN) pueden perderse de las aguas superficiales principalmente a través de la volatilización, mientras que los cianuros de metales poco solubles (cobre, níquel y zinc) se eliminan del agua predominantemente por sedimentación y biodegradación (USEPA (1992), citado por Gurbuz et al., 2009).

En determinadas condiciones alcalinas el cianuro puede persistir al menos un siglo en el agua subterránea, los relaves de las minas y en los montones de lixiviación abandonados (Eisler & Wiemeyer, 2004). El cianuro puede estar en diferentes estados: sólido, líquido y gaseoso (Figura 5), se originan por actividades naturales y antropogénicas, siendo altamente tóxica, cancerígena y mutagénica (Kumar et al., 2016).

Figura 5

Especiación del cianuro en fase sólida, líquida y gaseosa



Nota. Adaptada de *Remediation of cyanide-contaminated environments through microbes and plants: a review of current knowledge and future perspectives* (p. 3), por Kumar, Saha, Dhaka, Kurade, 2016, Geosystem Engineering.

La volatilidad del gas HCN en los suelos tiene tres destinos posibles (Chatwin et al., 1987, citado por NICNAS, 2019):

- Volatilización de HCN a la superficie y luego a la atmósfera.
- Biodegradación y metabolismo por microorganismos.
- Reacciones con los constituyentes del suelo en el subsuelo, particularmente cuando el contenido de humedad del suelo es bajo.

Es poco probable que la volatilización de las aguas subterráneas sea un proceso importante de transformación. El HCN es más liviano que el aire y se eleva desde las superficies, por lo tanto, el cianuro llega al medio ambiente a través de dos rutas principales: fuente natural y fuente antropogénica (Frakes et al., 1985) y no se espera que el HCN volatilizado se acumule en el ambiente externo, su inflamabilidad no es una preocupación ambiental.

2.6 Fuentes Naturales de Cianuro

2.6.1 Aire

El cianuro está disponible en la atmósfera como gas traza y forma parte integral del aire que respiramos, entra a la atmósfera como consecuencia de los procesos industriales, incendios forestales, casas; el HCN⁻ se produce durante la combustión de combustibles en motores de autos como resultado de la reducción catalítica de óxido de nitrógeno (NO₂) y de la combustión de polímeros sintéticos, lana y seda (Karlsson, 2004).

Aunque el cianuro libre no es persistente en el medio ambiente, este reacciona con componentes químicos que están presentes en el ambiente contaminado para formar una variedad de complejos, que bajo ciertas condiciones ambientales se disocian para formar cianuro libre [CN⁻], el cual es altamente tóxico (Mekuto et al., 2016).

Bolstad et al. (2010) también mencionaron que, en el aire, los iones de cianuro están presentes como cianuro de hidrógeno (HCN), los mineros, los bomberos y los trabajadores de las industrias metalúrgicas químicas y galvánicas están expuestos en gran medida al envenenamiento por éste. Cuando el pH de la solución está cerca del 10,5 se puede evitar la volatilización, limitando el riesgo de que los trabajadores inhalen grandes concentraciones de gas HCN en un espacio confinado (Logsdon et al., 2001).

2.6.2. Agua

Puede ser contaminado a través de descargas de desechos de fábrica y trasladados hacia los campos y áreas urbanas. Sus componentes de aguas residuales, están presentes en los efluentes de los procesos de galvanoplastia, extracción de oro, plata, producción de medicamentos y plástico (Barclay et al., 1998).

La contaminación por cianuro en ríos, lagos y mares pueden causar daños permanentes a algunas especies; los estudios toxicológicos han indicado que la

exposición a corto plazo a altos niveles de cianuro pueden dañar el sistema nervioso, respiratorio y cardiovascular de los animales (Gurbuz et al., 2009).

2.6.3. Suelo

El cianuro está presente en más de 2 000 especies de plantas, las cuales en su mayoría liberan una mínima cantidad de cianuro. Jaszczak et al., (2017) nos menciona que el glucósido cianogénico más común es la amígdalina y se puede encontrar en semillas, pepitas, granos de frutas como manzanas, duraznos, brotes de bambú, almendras, cerezas, ciruelas, albaricoques, sorgo y en la yuca (*Manihot esculenta*) como tapioca, mandioca. En el corazón de la almendra amarga hay aproximadamente 1 mg de HCN en forma de amígdalina (Logsdon et al., 2001).

La amígdalina, linamarina, prunasina, durrina, lotaustralina y taxifilina son algunos de los compuestos glucósidos cianogénicos identificados en especies vegetales (Guy et al., 1989). La razón de las intoxicaciones por cianuro es a consecuencia del consumo de alimentos con glucósidos cianogénicos en las plantas, ver Tabla 2.

El nivel de toxina depende de las condiciones de crecimiento como el clima y las partes consumidas de la planta. Una causa común de intoxicación por cianuro es el consumo inconsciente de grandes cantidades de alimentos mal procesados, como la yuca (Jaszczak et al., 2017).

Gupta et al., (2010) hace mención que los cultivos producen glucósidos cianogénicos durante condiciones de estrés o cuando los tejidos vegetales están dañados, estos se liberan como fuente de nitrógeno. Levin (1976), citado por Anning et al. (2019) mencionó que algunas plantas producen HCN como mecanismo de defensa contra las hierbas y toman un sabor desagradable, de esa manera ahuyentan a los depredadores a no comérselas.

Tabla 2

Concentración de cianuro en plantas

Especies de plantas		Concentración (mg/kg ⁻¹)
Yuca (variedades dulces)	Hojas	377 - 500
	Raíces	138
	Raíces secas	46 - < 100
	Puré	81
Punta de bambú		Máx. 8 000
Poroto blanco (judía) (Birmania)		2 100
Almendra (amarga)		280–2 500
Sorgo (planta joven, entera)		Max. 2 500

Nota. Adaptado de *Determination and detoxification of cyanide in gold mine tailings: A review* (p. 4), por Anning et al. (11).

El cianuro en el suelo, con elementos metálicos, forma compuestos de cianuro estables que son menos tóxicos. Aunque la flora microbiana contribuye a

la degradación del cianuro, éste libera de manera gradual el cianuro libre durante períodos prolongados (Mekuto, et al., 2016).

2.7 Fuentes Antropogénicas de Cianuro

La presencia de iones de cianuro en el suelo es causada por manifestaciones antropogénicas como la industria galvánica y metalúrgica. Su toxicidad es baja, pero debido a la luz se convierten en cianuros libres altamente tóxicos y volátiles. Sin luz, este proceso es muy lento (Meussen et al. 1995).

La quema de biomasa también contribuye a la disponibilidad de cianuro en el medio ambiente (Holzinger et al., 1999). Otras fuentes antropogénicas de cianuro son los gases de escape de los vehículos; algunos productos agrícolas como pesticidas, herbicidas, insecticidas y fertilizantes.

La acumulación de aguas residuales que contienen cianuro en el medio ambiente, se convierte en un riesgo potencial para los ecosistemas (Luque-Almagro et al., 2017).

Algunas industrias mineras liberan miles de aguas residuales tóxicas que además de cianuro, contienen arsénico, plomo, mercurio, cadmio, cromo y ácido sulfúrico (Luque-almagro et al., 2011).

El Consejo Internacional de Minería y Metales (ICMM) ha aplicado códigos de prácticas que obligan a las industrias a implementar prácticas alternativas de

gestión de desechos a fin de minimizar la contaminación ambiental por tales industrias (Gibbons, 2005; Akcil, 2010).

En consecuencia, Estados Unidos ha sugerido que las industrias mineras deberían reducir las concentraciones de cianuro libre presentes en las aguas residuales a $< 0,1$ mg / L antes de su descarga (Donato et al., 2008).

En el Perú para las actividades Minero-Metalúrgicas, el Límite Máximo permisible para la descarga de Cianuro total como efluente líquido en cualquier momento es de 1 mg/L y 0,8 mg/L por promedio anual (Ministerio del Ambiente, 2010).

2.7.1 Estándares de Calidad Ambiental

El Ministerio del Ambiente (2017), con D. S. N°007-2017-MINAM, en el artículo 3 indica los siguientes valores estándares:

A. Estándares de Calidad Ambiental (ECA, 2017) para el Agua:

Categoría 1: Poblacional y recreacional.

Subcategoría A: Aguas superficiales destinadas a la producción de agua potable, Cianuro Libre: 0,2 mg/L pueden ser potabilizadas con tratamiento convencional y con tratamiento avanzado.

Subcategoría B: Aguas superficiales destinadas para recreación, Cianuro Libre: 0,022 mg/L contacto primario y secundario.

Categoría 2: Extracción, cultivo y otras actividades marino costeras y continentales.

- Cianuro Wad: 0,004 mg/L, para extracción, cultivo y otras actividades marino costeras y continentales

Categoría 3: Riego de vegetales y bebida de animales

- Cianuro Wad: 0,1 mg/L para riego restringido y bebida de animales.

Categoría 4: Conservación del ambiente acuático

- Cianuro libre: 0,0052 mg/L

El Ministerio del Ambiente (2017), con D. S. N° 011-2017-MINAM, en el artículo 1, Aprueban los Estándares de Calidad Ambiental para el Suelo

B. Estándares de Calidad Ambiental (ECA, 2017) para Suelo

Suelo Agrícola:

- Cianuro libre: 0,9 mg/Kg.

Suelo Residencial/Parques:

- Cianuro libre: 0,9 mg/Kg.

Suelo Comercial / Industrial Extractivo (actividades mineras, hidrocarburos, entre otros):

- Cianuro libre: 8 mg/Kg.

La naturaleza tóxica del cianuro ha obligado a muchos países e instituciones a establecer un límite permisible de concentración de cianuro dentro de los diferentes medios que se encuentran en el ecosistema (Anning et al., 2019).

2.8 Intoxicación por Cianuro

El cianuro se conoce tradicionalmente como un veneno y se ha utilizado en homicidios masivos y como arma de guerra (Hall et al., 2007; Hamel, 2011).

La dosis letal estimada para un humano adulto es de 1,5 mg CN⁻/kg de peso corporal. Los síntomas de envenenamiento severo por inhalación se observan a partir de 53 mg de HCN, mientras que la dosis letal ingerida con los alimentos es de aproximadamente 200–300 mg. (Oluwole et al., 2003). La exposición prolongada al cianuro puede provocar debilidad corporal y diversas enfermedades como hipotiroidismo, daño renal y abortos espontáneos.

La presencia del ion cianuro en el cuerpo inhibe la absorción de oxígeno de la célula, esto resulta en hipoxia, lo cual permite la acumulación de ácido láctico dentro de la misma. Esto ocurre cuando el cianuro se combina con el citocromo c

oxidasa para evitar que reaccionen las enzimas, seguidamente la respiración celular ya no tiene lugar (Cleven et al., 2000).

El cianuro causa hipoxia intracelular al unirse reversiblemente a la citocromo oxidasa a₃ mitocondrial (Hamel, 2011).

El cianuro puede ser una sal, un líquido o un gas, una vez que ingresa al torrente sanguíneo reacciona rápidamente con metales como los iones férricos, uniéndose y deteniendo cascadas enzimáticas críticas, lo que lleva a un deterioro del Sistema Nervioso Central y cardiovascular (Hall et al., 2007).

2.9 Metabolismo del Cianuro en un Organismo Vivo

El componente orgánico del cianuro es la base de toda la vida, porque forma la base de los aminoácidos (Wong et al., 2005).

La vitamina B12, un medicamento contra la anemia es una sustancia química natural con cierto nivel de cianuro. El cianuro se adhiere en la vitamina B12 para evitar que el cuerpo se exponga a efectos dañinos (Makuc et al., 1991).

Los medicamentos contra el cáncer y la presión arterial alta también se producen a partir del cianuro y compuestos relacionados con el mismo (Kuyucak y Akcil, 2013).

La pterina es uno de los cofactores para la degradación del cianuro (Mahendran et al., 2019). Las pterinas se informaron por primera vez en las cianobacterias (Raemakers et al., 1991). Identificaron propionilpterina aislada de

Bacillus subtilis y derivados de bioterina de *Bacillus pumilus* (Mahendran et al., 2018).

El compuesto de pterina más conocido es el ácido fólico, comúnmente conocido como vitamina B9. El ácido fólico tiene un papel importante en el metabolismo de un carbono, como la formación de aminoácidos y ácido nucleico porque lleva un grupo metilo activado en N5 que puede transferirse al sustrato (Mahendran et al., 2019).

2.10 Tratamiento Químico del Cianuro

Los procesos de oxidación química más conocidos para el tratamiento del cianuro incluyen el proceso con SO₂/Aire (desarrollado por la compañía minera canadiense INCO) y el proceso de tratamiento con H₂O₂ (peróxido de hidrógeno) iniciado por la empresa minera Degussa (Gómez Leiva, 2012). El proceso de cloración alcalina es la oxidación química más antigua, se utiliza rara vez en la industria minera en la actualidad. En la Tabla 3 se hace un resumen de dichos métodos indicando ventajas e inconvenientes más relevantes (Akcil et al., 2003; Gupta et al., 2010; Gómez Leiva, 2012; Mekuto et al., 2016).

Para un uso seguro, los reactivos de cianuro deben disolverse en soluciones alcalinas para evitar la volatilización del mismo (Luque-Almagro et al., 2011).

Estas técnicas solo son efectivas para cianuros libres (HCN, CN⁻) y cianuros que están débilmente unidos a metales. Los cianuros que están fuertemente unidos

o forman complejos con metales no pueden tratarse con estos métodos. Todos estos métodos se basan en la recuperación de cianuro por acidificación y/o destrucción por oxidación química (Akcil, 2003).

Tabla 3

Ventajas y desventajas de los métodos de tratamiento con cianuro

Método de tratamiento	Objetivo	Ventajas	Desventajas
Cloración alcalina	Oxidación de CN ⁻ en dos etapas: CN ⁻ → CNO ⁻ CNO ⁻ → CO ₂ +NO ₂	De fácil manipulación y control de dosificación	*La reacción es exotérmica a altas concentraciones de cianuro, pueden producir combinaciones gaseosas tóxicas. *CNSAD, amoníaco y cloruros no se eliminan. *Agrega metales peligrosos al agua. *Un control deficiente del proceso conduce a productos intermedios tóxicos. *Reacciona preferentemente con SCN.
Ozonización	CN ⁻ +O ₃ (aq)→ OCN ⁻ +O ₂ (aq) 3CN ⁻ +O ₃ (aq)→ 3OCN ⁻	Adicionalmente el ozono oxida fenoles y cromóforos y los transforma en sustancias no tóxicas e incoloras.	*Incapaz de tratar CNSAD y amoníaco. *Mal desempeño del tratamiento.
Peróxido de hidrógeno	Oxidación de cianuros a cianatos	Simple de operar. Alta eficiencia	*Incapaz de tratar SCN y amoníaco. *Acumulación excesiva de precipitado.

Método de tratamiento	Objetivo	Ventajas	Desventajas
Proceso de AVR (proceso de acidificación-volatilización-reneutralización)	-	Proceso altamente eficiente	*Reactivo caro. *Requiere la eliminación del catalizador después de completar el proceso. *Proceso muy costoso.
SART (proceso de sulfuración-acidificación-reciclaje-espesamiento)	-	*Altas recuperaciones de cianuro *Recupera cianuro de CN_{WAD} *El cianuro se puede regenerar *Viable económicamente *Proceso altamente eficiente. *Seguro, el escape de HCN está restringido	*El gas HCN podría escapar y causar situaciones que pongan en peligro la vida. *Problemas de manejo de lodos. *Dificultades con el dimensionamiento de equipos de separación sólido-líquido. *Uso de productos químicos peligrosos.
GFMA (proceso de absorción de membranas llenas de gas)	-	*Aplicado en aguas residuales cianuradas de diferentes industrias. *No se producen metabolitos secundarios. *Operación simple.	*Eficiencia reducida con soluciones que contienen sólidos (N50 mg/L).
Dióxido de azufre	-	*Uso económico de reactivos. *Tasas de degradación más rápidas. *Eficaz en el tratamiento de lodos.	*El uso de reactivos requiere pagos de licencia. *El proceso agrega sulfatos al agua tratada. *Acumulación excesiva de precipitado.
Ácido de caro	$H_2SO_2 + CN^- \rightarrow OCN^- + 2H^+$	Tasas de degradación más rápidas	*Reactivos caros

Método de tratamiento	Objetivo	Ventajas	Desventajas
Sulfato ferroso	Formación de un complejo que es eliminado en forma de lodo	<ul style="list-style-type: none"> *Bajo costo de operación. *La solución de sulfato ferroso proviene del baño agotado de decapado. *Fácil manipulación y control de dosificación. *Método eficiente que reduce el cianuro por debajo de 1ppm. *No requiere el uso de reactivos químicos. 	<ul style="list-style-type: none"> *Problemas de acumulación de lodos *Formación de gran cantidad de lodos. *Efluente de color azul. *El ferrocianuro se descompone en cianuro libre en presencia de luz solar.
Oxidación electrolítica	Oxidación de cianuros a cianatos		<ul style="list-style-type: none"> *Elevado costo de tratamiento. *Aplicable a volúmenes de aguas menores de 100L.

Nota. Adaptado de *An integrated biological approach for treatment of cyanidation wastewater* (p. 5), por Mekuto, L., Ntwampe, S. K. O., & Akcil, A., 2016, *Science of the Total Environment*.

2.11 Degradación Biológica de Cianuro por Microorganismos

A pesar de la toxicidad del cianuro, muchos organismos, incluyendo bacterias, hongos, plantas y ciertos animales, sintetizan cianuro, como un mecanismo de defensa (organismos cianógenos), y algunos microorganismos pueden asimilar el cianuro, como fuente de nitrógeno para su crecimiento (organismos cianotróficos) (Luque et al., 2016).

Gupta et al., (2010) y Luque et al., (2016) sostienen que la degradación microbiana del cianuro produce fuentes de carbono y nitrógeno. Alrededor de 3 000 especies de plantas, animales, microbios y hongos contienen cianuro. Hay muchos factores que afectan la degradación de este compuesto, como la disponibilidad de nutrientes, la aireación, la toxicidad del cianuro y la existencia de otros contaminantes. El uso del sistema microbiano produce compuestos útiles y ayuda a eliminar la toxicidad en la mayoría de los procesos industriales.

Durante los últimos veinte años, la aplicación de especies microbianas en forma de bacterias, hongos, protozoos, algas y levaduras han ganado una atención considerable debido a la robustez y el respeto al medio ambiente durante el proceso de biodegradación (Mekuto et al., 2016). Akcil et al., (2003) sostiene que aquel proceso para la eliminación de cianuros es mejor que los métodos físicos y químicos.

La transformación biológica implica la degradación y asimilación de cianuro en forma de aminoácidos, tiocianato, cianoanalina y vitaminas por los microorganismos y las plantas.

La Compañía minera Homestake ha demostrado ser el líder en el desarrollo e implementación de sistemas de tratamiento biológico para la destrucción de las aguas residuales de cianuro (Mudder et al., 2001; Stott et al., 2001).

Van Buuren et al., (2011), mencionaron que Gold Fields Limited ha desarrollado una planta piloto que trata las aguas residuales que contienen tiocianato a través del proceso de remediación de efluentes de lodos activados (ASTER™) con el objetivo general de reciclar el agua de proceso al Proceso BIOX®. Sin embargo, este proceso se limita a la destrucción de tiocianato y se basa en métodos químicos para remediar los contaminantes restantes. Otra empresa, ICI Bioproducts, desintoxica el cianuro con la cepa del hongo *Fusarium lateritium* (Mudder et al., 2001).

En Colombia, Montoya (2001) realizó una propuesta de detoxificación de ambientes mineros mediante métodos químicos y biológicos, considerando concentraciones de NaCN de hasta 700 ppm.

Estas aplicaciones industriales demuestran que los procesos biológicos son sostenibles y económicamente viables, pueden operarse por períodos más largos ya que las especies microbianas son adaptables y pueden ser manipuladas para adaptarse a diferentes condiciones y ambientes permitiendo así la absorción, el tratamiento, la sorción y/o la precipitación de tiocianato, cianuro, amoníaco, metales pesados y sulfatos, ver Tabla 4 (Mekuto et al., 2016).

Tabla 4*Especies microbianas degradadoras de cianuro (parte 1)*

Microorganismo	Operación	Fuente-C	Fuente-N	Productos	Temp. (°C)	pH	Referencias
<i>Pseudomonas</i> sp.	Batch	Suero	CN _{WAD}	NH ₄ , CO ₂	30	9,2–11,4	Akcil et al. (2003)
<i>Bacillus pumilus</i> C1	Batch/fed-batch	Caldo nutritivo	NaCN	–	25	10,5	Meyers et al. (1991)
<i>Fusarium solani</i>	Batch	Glucosa	K ₂ Ni(CN) ₄ , KCN	NH ₄ , HCOOH	25	7,0	Barclay et al. (1998)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Batch	NaCN	NaCN	NH ₄ , CO ₂	–	10,3	Gurbuz et al. (2009)
<i>Burkholderia cepacia</i> C-3	Batch	Glucosa, fructosa	KCN, KSCN, nitrilos	NH ₃ , HCOOH	30	10	Adjei and Ohta (1999)
<i>Azotobacter vinelandii</i>	Continuo	Mandioca	NaCN	NH ₃ , CH ₄	30	7,7–8,5	Kaewkannetra et al. (2009)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Batch	Glucosa	CN, SCN	NH ₄ , CH ₄	30	7,0	Kao et al. (2003)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Batch	Glucosa	Fe(CN) ₆	NH ₄ , CO ₂	25	5,0	Dursun et al. (1999)
<i>Trametes versicolor</i>	Batch	Citrato	KCN	NH ₄ , CO ₂	30	10,5	Cabuk et al. (2006)
<i>Trichoderma</i> ssp.	Batch	Glucosa	CN ⁻	NH ₄ , CO ₂	25	6,5	Ezzi and Lynch (2005)
<i>Aspergillus awamori</i>	Continuo	Residuo de <i>Citrus sinensis</i>	KCN	NH ₄ , HCOOH	40	8,84	Santos et al. (2013)
<i>Thiobacillus</i> sp.	Batch	CO ₂	SCN	NH ₄ , CO ₂ , SO ₄	20–40	6–9,3	Stott et al. (2001)
<i>Klebsiella</i> sp.	Batch	SCN	SCN	NH ₄ , SO ₄	38	7,0	Ahn et al. (2005)
<i>Halomonas</i> sp.	Batch	Glucosa, fructosa, CO ₂ , acetato	SCN	NH ₄ , CO ₂ , SO ₄	20–40	6–9,3	Stott et al. (2001)
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	Batch	Acetato	NaCN	NH ₄ , CO ₂	30	9,5–10,0	Huertas et al. (2010)
<i>Rhodococcus</i> sp.	Batch	KCN	KCN	NH ₄ , HCOOH	30		Maniyam et al. (2013)
<i>Pseudomonas stutzeri</i> , <i>Pseudomonas putida</i>	Batch	Lactato, sacarosa	KCN, KSCN	NH ₄ , SO ₄ ²⁻ , CO ₂	28–30	9,0–9,2	Karavaiko et al. (2000)
<i>Fusarium oxysporum</i> CCM1 876	Continuo	Caldo Czampek	CN-	NH ₄ , HCOOH	30	8,0	Campos et al. (2006)
<i>Halothiobacillus</i> , <i>Halophilus/hydrothermalis</i>	Batch	SCN	SCN	–	35	7,0–8,0	Sorokin et al. (2014)

Microorganismo	Operación	Fuente-C	Fuente-N	Productos	Temp. (°C)	pH	Referencias
<i>Pseudomonas</i> sp.	Continuo	Glucosa	[Cu(CN) ₄] ²⁻	–	35	7,5	Patil and Paknikar (1999)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> STK O3	Batch	Mollas	SCN, KCN	NH ₄ , SO ₄ ²⁻	30	8,5-10,0	Mekuto et al. (2016)
<i>Pseudomonas putida</i>	Batch	Glucosa	K ₂ [Ni(CN) ₄]	NH ₄ , CO ₂	30	7,0	Silva-Avalos et al. (1990)
<i>Acetomonas strictum</i>	Batch	SCN	SCN	NH ₄ , SO ₄ ²⁻	25	–	Kwon et al. (2002a)
<i>Cryptococcus humicolus</i>	Batch	Glucosa	K ₂ [Ni(CN) ₄]	NH ₄ , HCOOH	25	–	Kwon et al. (2002b)
<i>Methylobacterium thiocyanatum</i>	Batch	Glucosa	SCN	NH ₃ , CO ₂ , KOH	30	–	Wood et al. (1998)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Batch	Glucosa	SCN	NH ₄ , SO ₄ ²⁻	37	6,0	Chaudhari and Kodam (2010)
<i>Thiobacillus thioeparus</i>	Batch	CO ₂	SCN	NH ₃ , COS ^a	30–40	7,0	Katayama et al. (1992)
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	Batch		SCN	NH ₄ , SO ₄ ²⁻	28	7,6	Boucabeille et al. (1994)
<i>Paracoccus thiocyanatus</i>	–	SCN	SCN	–	30–37	7,5–8,0	Katayama et al. (1995)
<i>Burkholderia phytofirmans</i>	Batch	Acetato	SCN	NH ₄ , SO ₄ ²⁻	25	6,5	Vu et al. (2013)
<i>Micractinium</i> sp.	Batch	NaHCO ₃	SCN	NH ₄ , SO ₄ ²⁻	–	8,2	Ryu et al. (2015)
<i>Thiohalobacter thiocyanaticus</i>	Batch	NaHCO ₃	SCN	COS, NH ₃	30	7,3–7,5	Sorokin et al. (2010)
<i>Thi alkalivibrio, Thiocyanodenitrificans</i>	Batch	NaHCO ₃	SCN	COS, NH ₃	30	9,9	Sorokin et al. (2004)
<i>Thiohalophilus thiocyanoxidans</i>	Batch	NaHCO ₃	SCN	COS, NH ₃	37	7,5	Bezudnova et al. (2007)

Nota. ^a COS - sulfuro de carbonilo. Adaptado de *An integrated biological approach for treatment of cyanidation wastewater* (p. 7), por Mekuto, L., Ntwampe, S. K. O., & Akcil, A., 2016, Science of the Total Environment.

Algunos microorganismos pueden degradar el cianuro en condiciones neutras o ácidas, pueden sobrevivir en presencia de cianuro alcalino, otros son capaces de degradarlo hasta cierto punto. Muchos microorganismos tienen sistemas

y vías enzimáticas únicas que utilizan para degradar el cianuro, mientras que otros microbios lo utilizan como fuente de carbono o nitrógeno. La enzima hidratasa fúngica convierte irreversiblemente el cianuro en formamida, que a su vez se degrada para formar dióxido de carbono y amoníaco *Trametes versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium* y *Pleurotus* (Mahendran et al., 2019).

Según Kunz et al., (1992) las bacterias como *Pseudomonas fluorescens* utilizan esta vía. En las investigaciones de Cobos et al., (2015) se descubrió que *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 desintoxica aguas residuales industriales, no solo las que contienen cianuro libre (CN⁻), sino también cianoderivados, como cianato, nitrilos y complejos metal-cianuro.

Las bacterias que contienen cianuro son *Chromobacterium violaceum* y especies de *Pseudomonas*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. aeruginosa*, *Bacillus*, *B. pumilus*, *Acinetobacter* y *Burkholderia* (Luque-Almagro et al., 2005; Restrepo et al., 2006; Fairbrother et al., 2009; Khamar et al., 2015;). En general, las bacterias producen cianuro de hidrógeno durante la etapa de transición del crecimiento y en los hongos cuando los cuerpos fructíferos se forman bajo las condiciones de daño y estrés. Este es un mecanismo para proporcionar una fuente de carbono y nitrógeno en condiciones de estrés (Ezzi & Lynch, 2005).

Dorr & Knowles (1989), aislaron cepas bacterianas que pueden degradar el cianuro y generar amoníaco, por ejemplo, *P. fluorescens* NCIMB 11746 convierte el cianuro en amoníaco y dióxido de carbono a través del sistema de cianuro oxigenasa ligado a NADH. Chapatwala et al., (1998), demostraron que las células inmovilizadas de *P. putida* utilizaron el cianuro, el cianato y el tiocianato y los convirtieron en amoníaco y dióxido de carbono. Se detectaron agar, alginato y carragenano como matrices encapsulantes para *P. putida*.

Chaudhari & Kodam (2010), informaron que *Klebsiella pneumoniae* pudo degradar el decahidrato de ferrocianuro de sodio, el cianuro de potasio y el trihidrato de hexa cianoferrato de potasio (II) con eficiencias entre 85,0 y 87,5%. En diferentes concentraciones, esta cepa desintoxica el cianuro de potasio en presencia de magnesio, níquel, cobalto, hierro, cromo, arsénico y zinc. El cultivo bacteriano de *K. pneumoniae* y *Ralstonia* sp se aislaron del sitio de eliminación de desechos industriales de galvanoplastia y se observó que degradaban el tiocianato.

Kao et al., (2003), informaron que *K. oxytoca* contenida en los desechos industriales biodegradan el cianuro a productos finales no tóxicos. Uno de los productos finales de la biodegradación del cianuro por las células concentradas en reposo fue el amoníaco. La cepa C-3 de *Burkholderia cepacia* aislada del suelo utiliza cianuro como fuente de nitrógeno para su crecimiento (Adjei et al., 2000).

Un método de enriquecimiento aisló la bacteria formadora de endosporas *Bacillus pumilus* e informó que poseía la capacidad de degradar el cianuro (Ezzi et al., 2005).

Azotobacter chroococcum NCIMB8003 es una bacteria fijadora de N₂ que puede reducir el cianuro a amoníaco por la nitrogenasa (Meghan, 1968).

La bacteria *Chromobacterium violaceum* puede convertir el cianuro en β-cianoalanina por la β-alanina sintasa (Macadam & Knowles, 1984).

Fry & Millar (1972), mostraron que las bacterias no cianogénicas como *Stemphylium loti* y otros patógenos fúngicos de las plantas cianogénicas también pueden convertir el cianuro en formamida en presencia de cianurohidratasa, ver Tabla 5.

Tabla 5

Especies microbianas degradadoras de cianuro (parte 2)

Microorganismos	Cianuro	Referencia
<i>Pseudomonas</i> sp.	Cianuro	Luque-Almagro et al.
<i>Pseudomonas putida</i>	El cianuro de sodio	Chapatwala et al.
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Cianuro de potasio	Nermin Hande y Bilkay
<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Ralstonia</i> spp.	Tiocianato	Chaudhari y Kodam
<i>Fusarium solani</i>	Cianuro de hidrógeno	Alain Dumestre et al.
<i>Thiobacillus thioparus</i>	Tiocianato	Yoko Katayama et al.
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Cianuro	Potivichayanon y Kitleart- Kitleartpornpaioat
<i>Trichoderma</i>	Cianuro	Ezzi, James
<i>Chromobacterium violaceum</i>	Cianuro	Macadam et al.
<i>Stemphylium loti</i>	Cianuro de hidrógeno	Fry, Millar

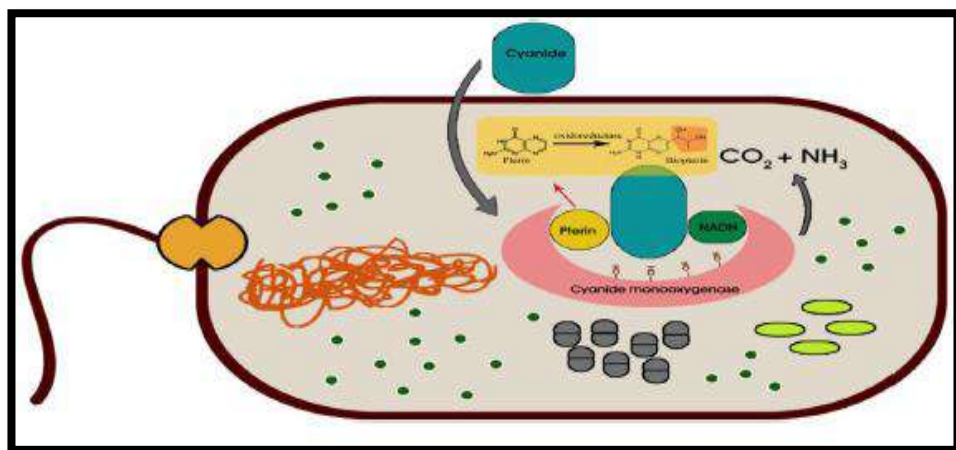
Microorganismos	Cianuro	Referencia
<i>Alcaligenes xylosoxidans</i>	Cianuro	Ingvorsen et al.
<i>Trametes versicolor</i>	Cianuro	Cabuk et al.
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Cianuro	Rubí et al.
<i>Scenedesmus oblicuo</i>	Cianuro	Gurbuz et al.
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Cianuro de potasio	Watanabe et al.
<i>Escherichia coli</i>	Cianuro de potasio	Figueira et al.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cianuro	Cipollone et al.
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Cianuro de potasio	Kao et al.
<i>Gloeocercospora sorghi</i>	Cianuro de hidrógeno	Wang et al.
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	Cianuro	Huertas et al.
<i>Bacillus megaterium</i>	Cianuro de potasio	Castric y Strobel
<i>Bacillus pumilus</i>	El cianuro de sodio	Mahendran et al.
<i>Bacillus stearothermophilus</i> NCA 1503	NACN ₂ y NaHSO ₃	Atkinson
<i>Pseudomonas putida</i>	El cianuro de sodio	Babu et al.
<i>Pseudomonas acidovorans</i>	Cianuro de potasio	Shivaraman y parhad
<i>Bacteria Mixed Cultures</i>	Cianuro	Blanco y Schnabel
<i>Azotobacter vinelandii</i> TISTR 1094	Cianuro	Kaewkannetra et al.
<i>Citrobacter</i> spp. y <i>Pseudomonas</i> spp	El cobre y cianuro de cinc	Patil y paknikar
<i>Fermentative bacill and methogenic bacteria</i>	Cianuro	Paixao et al.
<i>Proteobacteria</i>	Tiocianato	Sorokin et al.
<i>Acremonium strictum</i>	Tiocianato	Kwon et al.
<i>Fusarium oxysporum</i>	Cianuro y formamida	Campos et al.
<i>Rhodococcus</i>	Cianuro de potasio	Maegala et al.
<i>Serratia marcescens</i>	Cianuro de potasio	Karamba et al.
<i>Schizophyllum comuna,</i> <i>Polyporus arcularius,</i> <i>Ganoderma lucidum</i>	Cianuro	Ozel et al.

Nota. Adaptado de *Microbial (Enzymatic) Degradation of Cyanide to Produce Pterins as Cofactors*. (p. 580), por Mahendran, R., Bs, S., Thandeeswaran, M., KG, K., Vijayasathy, M., Angayarkanni, J., & Muthusamy, G., 2019, *Current Microbiology*, 77(4).

Gupta et al., (2010) muestra como *P. fluorescens* utiliza el cianuro como fuente de nitrógeno y lo convierte en dióxido de carbono y amoníaco, el compuesto de amoníaco a satisfecho el requerimiento de nitrógeno de la bacteria (ver Figura 6).

Figura 6

Degradación de cianuro en Pseudomonas fluorescens



Nota. Degradación de cianuro en presencia de cofactores, pterina, y NADH. Las bacterias que utilizan cianuro producen amoníaco y dióxido de carbono. Adaptado de “Microbial (Enzymatic) Degradation of Cyanide to Produce Pterins as Cofactors.” (p. 13), por Gupta, Mahendran, R., Bs, S., Thandeeswaran, M., KG, K., Vijayarathy, M., Angayarkanni, J., & Muthusamy, G., 2019, *Current Microbiology*, 77(4).

2.11.1 Hongos

Hongos como *Trichoderma* sp. y *Actinobacteria* sp. se utilizan para producir y metabolizar cianuro (Barclay, Hart et al., 1998; Barclay, Tett et al., 1998)

Özel et al., (2010) reportaron a hongos como *Schizophyllum commune*, *Polyporus arcularius*, *Ganoderma applanatum*, *Pleurotus eryngii*, *Clavariadelphus truncatus*, *Cerrena unicolor*, *Trametes versicolor*, *Ganoderma lucidum* y *Schizophyllum commune*, degradadores de cianuro.

En varias especies de hongos, el micelio (tejido) seco puede degradar el cianuro y se vende comercialmente para desintoxicar el cianuro en los desechos industriales (Özel et al., 2010).

2.12 Rutas Metabólicas

Las vías a utilizar dependen de varios factores, como la disponibilidad de oxígeno, el nivel de pH, las concentraciones de cianuro, la biodisponibilidad de cianuro, la temperatura, fuente de carbono, y su solubilidad en el sistema de agua del suelo (Aroinsein et al., 1994; Mekuto et al., 2016).

- Ruta hidrolítica.
- Ruta oxidativa.
- Ruta reductiva.
- Ruta de sustitución / transferencia.
- Ruta sintasa.

Las primeras tres vías son vías de degradación, en las que las enzimas catalizan la conversión de cianuros en moléculas orgánicas o inorgánicas simples y

se convierten posteriormente en amoníaco, metano, CO₂, ácido fórmico y ácido carboxílico. Las dos últimas vías son para la asimilación de cianuro en el microbio como fuente de nitrógeno y carbono (Baxter et al., 2006).

Todas estas vías dependen del mecanismo de tolerancia del cianuro en los microbios y del proceso que utiliza para disociar los complejos de cianuro metálico o para metales quelantes (Barclay et al., 1998).

2.12.1 Ruta Hidrolítica

La vía hidrolítica de degradación de cianuro es catalizada por cinco enzimas presentes en el sistema microbiano: (i) cianuro hidratasa, (ii) nitrilo hidratasa, (iii) vías de carbonilo (tiocianato hidrolasa), (iv) nitrilasa y (v) cianidasa.

Las primeras tres enzimas tienen un sustrato específico, directamente hidrolizan y adhieren el triple enlace carbono-nitrógeno para formar formamida, y las dos últimas lo convierten en amoníaco y ácido carboxílico las cuales se utilizan en su actividad metabólica (Ver Tabla 6, 7, 8 y 9) (Gupta et al., 2010).

Tabla 6*Características de cianuro hidratasa de diferentes microorganismos*

Microorganismos	Propiedades de nitrilo hidratasa					Especificidad del sustrato
	Óptimo			Utiliza CN como fuente de nitrógeno	K _m	
	pH	Concentración	T (°C)			
<i>Stemphylium loti</i>	7,0–9,0	2 mM	25	Nitrógeno	15–20 mM	NaCN
<i>Stemphylium loti</i> (en fase inmovilizada)	6,5–7,5	100 mM	22–24	Nitrógeno	43 mM	NaCN
<i>Fusarium solani</i> IHEM 8026	9–10,7	0.8 mM	30	Nitrógeno	–	–
<i>Fusarium oxysporum</i>	4–7	20 mM	25	Nitrógeno	50 mM	KCN
<i>Gloeocercospora sorghi</i>	5,3–5,7		35	Nitrógeno	40–70 mM	KCN

Nota. Adaptado de *Enzymatic mechanism and biochemistry for cyanide degradation: A review.* (p. 4), por Gupta, N., Balomajumder, C., & Agarwal, V. K., 2019, Journal of Hazardous Materials, 176.

Tabla 7*Características de nitrilo hidratadas de diferentes microorganismos*

Microorganismos	pH óptima	Temperatura óptima	Especificidad del sustrato
<i>Myrothecium</i>	7,7	55 °C	Cianamida
<i>Bacillus</i> sp.	7,0	50 °C	Alquil nitrilo
<i>Corynebacterium</i> sp. C5	8,5	55 °C	Dinitrilo alifático
<i>Brevibacterium imperialis</i> CBS489-74	7,5	–	Acrlonitrilo
<i>Pseudomonas putida</i> NRRL-18668	9,2– 11,4	30 °C	Nitrilo alifático
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> B 23	7,5	20 °C	Nitrilo alifático
<i>Arthrobacter</i> sp. J1	7,2	35 °C	Nitrilo alifático
<i>Pseudonocardia thermophila</i> JCM3095	9,0	55 °C	Acrlonitrilo acetonitrilo, Benzonitrilo
<i>Rhodococcus</i> sp. N 774	8,5	35 °C	Nitrilo alifático

Nota. Adaptado de *Enzymatic mechanism and biochemistry for cyanide degradation : A review.* (p. 5), por Gupta, N., Balomajumder, C., & Agarwal, V. K., 2019, *Journal of Hazardous Materials*, 176.

Tabla 8*Características de cianidasa en diferentes microorganismos.*

Microorganismos	Propiedades de la cianidasa				Sustrato
	Óptimo		Km	Utiliza CN como fuente	
	pH	T (° C)			
<i>Bacillus pumilus</i> C1	7,8–8,0	37	Nitrógeno	2,56 mm	NaCN
<i>P. stutzeri</i> AK61	6–10	30	Nitrógeno	40–70 mm	KCN

Nota. Adaptado de *Enzymatic mechanism and biochemistry for cyanide degradation : A review.* (p. 5), por Gupta, N., Balomajumder, C., & Agarwal, V. K., 2019, *Journal of Hazardous Materials*, 176.

Tabla 9*Características de la nitrilasa en diferentes microorganismos*

Microorganismos	Óptimo		Sustrato
	pH	T (° C)	
<i>Nocardia</i> sp.	8	30 ° C	Nitrilo aromático
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> J1	7,5	45 ° C	Benzonitrilo, 2-furanocarbonitrilo
<i>R. rhodochrous</i> K22	5,5	50 ° C	Crotononitrilo, acilonitrilo
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> PA-34	7,5	35 ° C	Benzonitrilo 100%, acilonitrilo 22AE4, crotononitrilo 20AE9%
<i>Arthrobacter</i> sp. J1	8,5	40 ° C	Nitrilos aromáticos
<i>Alcaligenes faecalis</i> JM3	7,5	45 ° C	Mandelonitrilo, p-aminobencil cianuro
<i>Acinetobacter</i> sp. AK226	8,0	50 ° C	Nitrilos alifáticos y aromáticos
<i>Pseudomonas thermophila</i> JCM3095	9,0	55 ° C	Acilonitrilo, acetonitrilo, benzonitrilo

Microorganismos	Óptimo		Sustrato
	pH	T (°C)	
<i>Klebsiella ozaenae</i>	9,2	35 °C	Bromoxinilo
<i>Fusarium solani</i>	7,8–9,1		Nitrilos aromáticos
<i>Fusarium oxysporum</i>	6,0–11,0	0 °C	Alifático y aromático

Nota. Adaptado de *Enzymatic mechanism and biochemistry for cyanide degradation : A review.* (p. 6), por Gupta, N., Balomajumder, C., & Agarwal, V. K., 2019, *Journal of Hazardous Materials*, 176.

2.12.2 Ruta Oxidativa

La segunda ruta de conversión de cianuro implica la conversión oxigenolítica en dióxido de carbono y amoníaco. Esta vía requiere NADPH para catalizar esta vía de degradación. Los microorganismos que exhiben esta vía también requieren una fuente de carbono adicional con cianuro (Gupta et al., 2010). Hay dos tipos de vías oxidativas que involucran tres enzimas diferentes:

A. Cianuro dioxigenasa

El crecimiento en cianuro requiere que este se convierta enzimáticamente en amoníaco, y luego sea asimilado por vías bien establecidas.

Para Cabuk et al., (2006 citado por Gupta et al., 2010) el cianuro oxigenasa es una hidroxilasa dependiente de pterina, lo que significa que esta enzima requiere pterina como cofactor. *P. fluorescens* NCIMB11764 es uno de esos organismos que crece a concentraciones de CN equivalentes a 300 ppm, lo que resulta en una

conversión oxidativa de cianuro en dióxido de carbono y amoníaco, donde el amoníaco satisface los requisitos de nitrógeno (Kunz et al., 200; citado por Gupta et al.,2010).

B. Vía del cianato (cianasa)

La cianasa es una enzima inducible presente en varios microorganismos. Cataliza la conversión de cianuro en cianato, que a su vez se convierte en amoníaco y bicarbonato. La cepa bacteriana *P. pseudoalcaligenes* contiene esta enzima y utiliza cianuro como única fuente de nitrógeno en condiciones alcalinas.

Para Chatpatwalal et al. (1998) citado por Gupta et al. (2010), la biodegradación del cianuro implica tres procesos: una vía de asimilación del cianuro, un mecanismo para la tolerancia al cianuro y la producción de sideróforos, que son necesarios para descomponer los complejos de cianuro y quelante el hierro de los medios.

P. putida utiliza cianuro como única fuente de carbono y nitrógeno. Los productos finales de la biodegradación del cianuro se identificaron como amoníaco (NH₃) y dióxido de carbono (CO₂). *P. putida* degradó cianuros, cianatos y tiocianatos a NH₃ y CO₂ (Luque-Almagro et al., 2005)

2.12.3 Ruta Reductiva

Generalmente se considera que las vías reductoras de degradación del cianuro ocurren en condiciones anaeróbicas. Esta vía está mediada por una enzima nitrogenasa. La enzima utiliza HCN y produce metano y amoníaco como producto final (Gupta et al., 2010).

A. Nitrogenasa

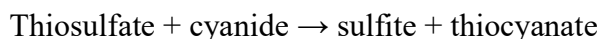
Para Seefeldt et al. (2004) citado por Gupta et al. (2010) la nitrogenasa une cada átomo de nitrógeno a tres átomos de hidrógeno para formar amoníaco, y luego el amoníaco se une al glutamato y se convierte en glutamina.

Sicking et al., (2005) mencionaron que, debido a las propiedades oxidativas del oxígeno, la mayoría de las nitrogenasas son inhibidas irreversiblemente por el dióxígeno, las cuales oxidan degradativamente a los cofactores de Fe-S. Esto requiere mecanismos para que los fijadores de nitrógeno eviten el oxígeno in vivo. A pesar de este problema, muchos usan oxígeno como aceptor de electrones terminales para la respiración. Una nitrogenasa recientemente descubierta de *Streptomyces thermoautotrophicus*, no se ve afectada por la presencia de oxígeno. Las Azotobacteraceae son únicas en su capacidad para emplear una nitrogenasa sensible al oxígeno en condiciones aeróbicas.

2.12.4 Ruta de Sustitución / Transferencia

La actividad de esta vía implica la asimilación de cianuro y, de manera útil, esto tiende a aumentar el crecimiento del microorganismo al proporcionar una fuente de nitrógeno adicional y evitar la toxicidad del cianuro. Hay dos tipos de enzimas que catalizan la asimilación del cianuro a través de esta vía (Gupta et al., 2010).

A. Rhodanasa



Bordo et al.,(2001) mencionaron que las rhodanasas son enzimas muy conservadas y extendidas, consideradas como uno de los mecanismos más desarrollados para la desintoxicación del cianuro. Las rhodanasas in vitro catalizan la transferencia irreversible de un átomo de azufre de un donante adecuado (es decir, tiosulfato) al cianuro, lo que resultará a la formación de sulfito y tiocianato menos tóxicos.

Bowen et al. (1965), citado por Gupta et al. (2010) mencionaron que la enzima rhodanasa en todas las cepas de *Trichoderma* demostraron un pH óptimo amplio generalmente en el rango de 8,5 a 11,5, junto con un óptimo de temperatura amplio de 35 - 55 °C. La rhodanasa cataliza la conversión de cianuro en un producto menos tóxico, tiocianato, que se asimila en el citoplasma del microbio en presencia

de tiosulfato. Alternativamente, el cianuro en presencia de la otra enzima, cianuro hidratasa, se hidroliza para formar formamida que eventualmente se convierte en dióxido de carbono y amoníaco. Se encontró que la enzima rhodanasa se presenta predominantemente en la pared extracelular de todas las cepas de hongos.

2.12.5 Ruta Sintasa

Esta vía también es una vía de asimilación de cianuro. Implica la síntesis de aminoácidos, β -cianoalanina y ácido Ω -ciano- α -aminobutírico mediante el uso de residuos de aminoácidos como precursores que reaccionan con compuestos de cianuro.

Las altas concentraciones de amoníaco pueden resultar tóxicas e inhibir a algunos microorganismos. Algunas cepas evitan este problema de toxicidad convirtiendo el tiocianato en cianato en lugar de amoníaco. Es poco probable que el cianato vuelva a convertirse en cianuro libre (Johnson, 2014).

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODO

3.1 Material biológico

Se obtuvieron 5 muestras entre suelo y fango del pasivo ambiental ubicado en el distrito de Palca, Tacna-Perú. La ex unidad minera tiene por nombre Chulluncane, ubicada al Este 0408223 UTM con el Norte 8033116 UTM, conformada con alrededor de 19 pasivos ambientales, según el inventario de pasivos mineros aprobado por la R.M. N° 200-2021-MINEM/DM (Minem, 2021).

3.2 Materiales y Equipos

- Cámara de Petroff Hausser
- Incubadora manual
- Autoclave
- Espectrofotómetro EPOCH 2
- Incubadora con agitación
- Centrifugadora
- Sistema de filtración
- Ultra congeladora
- Horno esterilizador
- Spinner de microtubos
- Microscopio Trinocular

3.3 Diseño de la investigación

Los bioensayos consistieron en determinar la actividad degradadora de las bacterias previamente seleccionadas en base a los criterios desarrollados correspondientes a la actividad de aislamiento, tolerancia y degradación.

Para la actividad de degradación se utilizó el medio Mineral 9M modificado, ver Anexo 1, que es una solución formada de sales minerales suplementado con NaCN a un pH 10,5. Las 37 bacterias aisladas fueron bacilos Gram negativos y Gram positivos. El periodo de evaluación fue durante 36 horas a una temperatura óptima de 33°C, cada día se ajustaba el pH con NaOH 2N y para el análisis de cianuro se usó el método titulométrico (APHA, 1992).

3.4 Metodología

3.4.1 Lugar de Muestreo

El pasivo ambiental ubicado en el distrito de Palca tiene por nombre CHULLUNCANE y la posible extracción principal de este lugar fue el cobre, por tal motivo las muestras de suelo fueron expuestas a contaminantes tóxicos contenidos en sus residuos, desde bocaminas, tajos abiertos, socavones entre otros.

Para los documentos de consulta se utilizó el informe N° 401-2019-MINEM-DGM-DTM/PAM, ver Tabla 10. El Software utilizado para la elaboración del mapa cartográfico fue Google Earth Pro (Figura 7).

Tabla 10

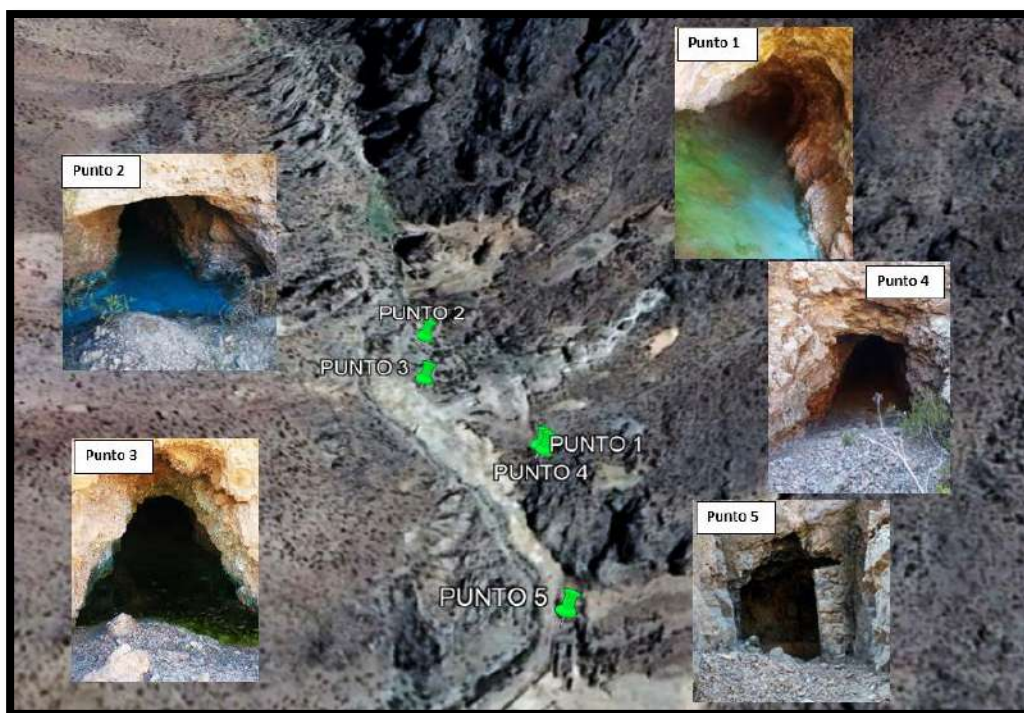
Puntos de muestreo

Sitio	Muestra	Concesión Minera	Tipo de residuo	UTM		Altitud	Zona
				E	N		
PUNTO 1	Efluente	Chulluncane	Cobre	0408223	8033187	3961,00	19K
PUNTO 2	Efluente	Chulluncane	Cobre	0408223	8033268	3961,00	19K
PUNTO 3	Efluente	Chulluncane	Cobre	0408209	8033245	3961,00	19K
PUNTO 4	Suelo	Chulluncane	Cobre	0408223	8033184	3961,00	19K
PUNTO 5	Suelo	Chulluncane	Cobre	0408186	8033116	3961,00	19K

Nota. Elaboración propia.




Figura 7



Pasivo ambiental Chulluncane ubicado en el distrito de Palca



Nota. Elaboración propia.

Tabla 11*Descripción de los puntos de muestreo*

Sitio	Descripción	Río	Flora	pH	Figura
Punto 1	La bocamina tiene presencia de agua y puede producir infiltraciones en el subsuelo a través de sus paredes o deslizamiento de las mismas en época de lluvia. (Primera capa: arena fina verde azulado de 1 cm de espesor y una segunda capa: color ocre de arena fina de 3 cm de espesor), se evidencia presencia de microalgas.	Río Caplina, a 24 m del PAM	Si, Microalgas	7,4	
Punto 2	La bocamina tiene presencia de agua y puede producir infiltraciones en el subsuelo a través de sus paredes. (Primera capa: arena fina verde azulado de 1 cm de espesor y una segunda capa: color ocre de arena fina de 3 cm de espesor), se evidencia presencia de microalgas.	Río Caplina, a 36 m del PAM	Si, Microalgas	7,23	
Punto 3	La bocamina tiene presencia de agua y puede producir infiltraciones en el subsuelo a través de sus paredes o deslizamiento de las mismas en época de lluvia.	Río Caplina, a 18 m del PAM	Si, Microalgas	8,04	

Sitio	Descripción	Río	Flora	pH	Figura
Punto 4	Compuesto de tierra fina y rocas pequeñas de color ocre amarillento, sin vegetación circundante, de extensión plana dentro de una bocamina (> 100 m de distancia aproximadamente).	Río Caplina, a 25 m del PAM	No	5,89	
Punto 5	Mezcla de tierra y rocas compactadas de color gris amarillento, sin vegetación circundante, obtenida de un desmonte y una bocamina con tierra seca. Indicios de infiltraciones de agua en temporadas de lluvia en el interior del socavón.	Río Caplina, a 6 m del PAM	No	4,7	

Nota. Elaboración propia.

3.4.2 Recolección de las Muestras

Las muestras fueron tomadas siguiendo las buenas prácticas de muestreo de suelo, a una profundidad de 0 - 10 cm (Minam, 2014), se recolectaron en bolsas de polietileno densa y frascos de vidrio estériles, se transportaron al laboratorio almacenándolos a 4 °C (Araujo et al., 2006).

3.4.3 Aislamiento de los Microorganismos

Las muestras fueron puestas en agua destilada estéril en una proporción de 100 g en 200 ml. Cada muestra se agitó por 1 hora a 150 rpm, se dejó reposar durante 10 min, seguidamente se tomaron 10 ml de la suspensión adicionándola a 90 ml de Infusión Cerebro Corazón (BHI) esterilizado previamente durante 24 horas a 35 °C, (Mirizadeh et al., 2014). Se tomó 0,1 ml de la muestra inoculada con BHI y se sembró por extensión en placas de agar nutritivo con 25 mg/L de cianuro de sodio (NaCN) esterilizado por filtración, incubándolas a 35 °C. Las placas se observaron después de 48 horas y todas las colonias se seleccionaron y purificaron mediante la técnica de siembra en 4 cuadrantes, para estudios posteriores (V. M. Luque-Almagro et al., 2005) y diferenciadas por su pared celular con la técnica de tinción Gram para luego clasificarlas como Gram positivas y Gram negativas (Karamba et al., 2015; Sankaranarayanan et al., 2015).

3.4.4 Identificación

Descripción macroscópica

Se describió la morfología de la colonia por superficie, forma, borde, elevación y color.

Descripción microscópica

Se aplicó la técnica de coloración Gram y verde de malaquita para la coloración de endosporas (Black, 2012), se determinó el tipo de pared y la morfología de las células mediante observación microscópica a 100 X.

Caracterización Bioquímica

Mediante pruebas bioquímicas: catalasa, oxidasa, hidrólisis de almidón, tinción de endosporas, utilización del citrato, RM-VP, reducción de nitratos, SIM para evaluar motilidad y degradación de triptófano a indol, Mc Conkey para fermentación de lactosa, agar hierro tres azúcares (TSI), agar lisina hierro (LIA), óxido fermentación (OF) para la arabinosa y el manitol, y crecimiento al 6,5% NaCl (Garrity, 2005; Mac Faddin et al., 2003).

3.4.5 Preservación de Cultivos de Cepas Bacterianas

Se criopreservaron las 37 cepas bacterianas en el laboratorio de Biorremediación a 1 mL del cultivo bacteriológico en fase exponencial, se centrifugó el criovial a 8000 rpm por 10 minutos, seguidamente se quedó con el pellet y se le agregó 1ml de caldo TSA con 30% de glicerol. Se pre congelaron a -4 °C, luego se pasaron a la ultracongeladora de -80 °C para su almacenamiento a largo plazo. Ver Anexo 9 (Perry, 1998; Bonavia et al., 2012; Khamar et al., 2015).

3.4.6 Medio Mineral 9M

El medio utilizado para los siguientes ensayos fue propuesto por Huertas y colaboradores (Huertas et al., 2010) descrito como medio mineral 9M. En este trabajo se modificaron las proporciones de algunos componentes, quedando con la siguiente composición en 1L de agua destilada:

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (6,4 g), KH_2PO_4 (3 g), NaCl (0,5 g), acetato de sodio 0,4% (w/v) como fuente de carbono, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,1 g), CaCl_2 (0,01 g). El medio se esterilizó a 121 °C por 15 minutos, seguidamente se agregó las trazas en 1% (v/v) (g/L): $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,05 g), $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ (0,05 g), $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,005 g), $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,005 g), $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (0,002 g), $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,0003 g) esterilizado por filtración. Por último, se añadió el NaCN (200 ppm) esterilizado por filtración. Para evitar la volatilización del cianuro, el medio se mantuvo a pH 9,5 con NaOH 2N (Donato et al., 2008; Karamba et al., 2015).

3.4.7 Curva de Calibración

Se tomará un cultivo de *Bacillus* antes de las 24 horas y se obtendrá una concentración por medio de pellets bacterianos de una centrifuga para hallar la curva de calibración entre la lectura obtenida del espectrofotómetro con el recuento de las células en una cámara de Petrohausser, ver tabla 12. El pellet fue agregado a 50 ml de medio 9M con 200ppm NaCN, sin extracto de levadura, la OD inicial fue

de 0,001 nm llegando a un máximo de 1.576 nm aproximadamente (Luque-Almagro et al., 2005; Bouari et al., 2013).

Se tomó con una micropipeta 10 µl de muestra y se colocó en la cámara de Petroff Hausser; se observó al microscopio por 100 X y se anotaron los resultados conjuntamente con las del espectrofotómetro, hallando de esa manera la curva de calibración (ver Anexo 2).

Tabla 12

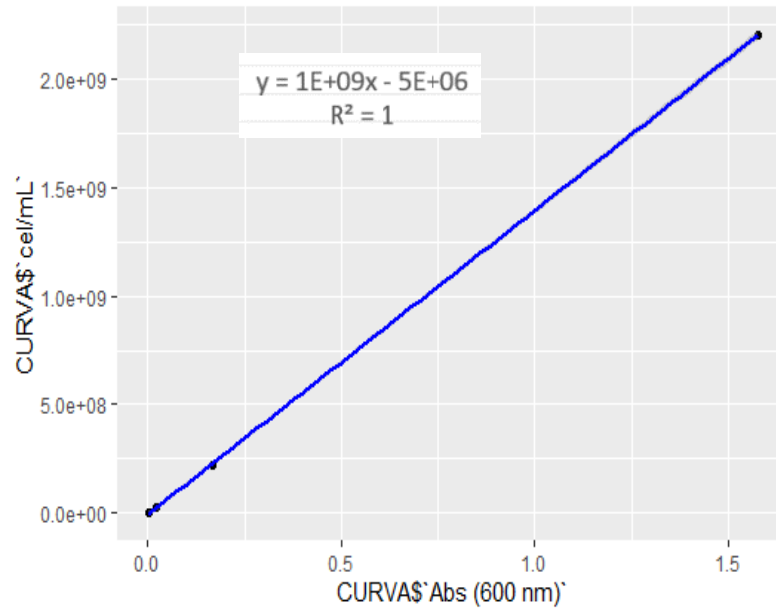
Conteo de células en la cámara de Petroff Hausser vs OD de 600 nm.

<i>X= OD de 600 nm</i>	<i>Y= Petroff Hausser</i>
Abs. (600 nm)	cél/mL
0,001	250000
0,003	1500000
0,020	25000000
0,168	220000000
1,576	2200000000

Nota. Elaboración propia.

Figura 8

Curva de calibración cámara de Petroff Hausser vs OD de 600nm.



Nota. Elaboración propia.

Curva de calibración para determinar la concentración microbiana, siguiendo la fórmula de la recta:

Dónde: X= absorbancia

$$Y = 10^9(X) - 5 \times 10^6$$

Y= Concentración de bacterias

3.4.8 Tolerancia y Selección de los Microorganismos frente al NaCN

Placas de agar nutritivo con NaCN

La biodegradación de cianuro en los medios simulados se puede lograr cuando los microbios son capaces de utilizar el NaCN como fuente de carbono y nitrógeno. Las 37 cepas bacterianas fueron sembradas por estría en agar TSB con 50 y 200 ppm de NaCN, se dejó incubando a 33°C por 24-48 horas (Luque-Almagro et al., 2005).

Tolerancia al NaCN usando medio mineral 9M

Para el siguiente ensayo cada cepa fue sometida a 3 concentraciones de cianuro. Si fuese necesario la reactivación de la cepa, se deberá sembrar una asada en 2 ml de caldo Soya Trypticasa, luego de las 24 horas se tomará 10 µl del sedimento y se sembrará en 1 placa con agar nutritivo hasta observar crecimiento.

Para el ensayo de tolerancia, primeramente, se obtuvo la masa microbiana inicial tomando 2 asadas de cultivo joven en 10 ml de Caldo Soya Trypticasa (TSB) incubado por 24 h y seguidamente centrifugado a 8000 rpm/20 minutos. Se tomó el pellet y se agregó 5 ml de medio 9M con aproximadamente 200 ppm NaCN, se mezcló bien y se tomó 1 ml para cada concentración de cianuro preparado en 300, 400 y 500 ppm, en tubos con 9 ml de medio mineral 9M modificado. Finalmente, las diferentes concentraciones se incubaron a 33°C con agitación (150 rpm) durante

96 horas. Las lecturas (a 48, 72 y 96 horas) se realizaron mediante densidad óptica (OD) con un espectrofotómetro a 600 nm (Guamán & Nieto, 2018).

3.4.9 Parámetros para la Biodegradación del NaCN

La degradación puede ser predicha con la disminución de la concentración de cianuro y la producción de amoníaco o aumento de la biomasa microbiana, en condiciones de aireación (Parmar et al., 2012).

Los parámetros para la degradación fueron, según Valentina et al. (2018):

- pH : 10,5 (Constante en todo el proceso)
- Temperatura : 33 °C (Constante en todo el proceso)
- Agitación : 150 rpm (Constante en todo el proceso)
- Aireación : 1,5 L/min (Constante en todo el proceso)
- NaCN (ppm) : 200 ppm - 240 ppm (Al inicio del proceso)

3.4.10 Instalación de los Biorreactores

Se construyó un mini biorreactor a base de matraces de vidrio con tapa de jebes de 6 cm de diámetro, con dos agujeros en la tapa de 0,5 y 0,6 mm por donde se instalaron dos tubos. Uno de los tubos se conectó mediante una manguera a un motor de aireación de 1,5 litros/minuto y el otro tubo funcionó como salida de aire. Los tubos de vidrio fueron de 15 y 5 cm de altura aproximadamente. Para este trabajo se instalaron 5 biorreactores aireados, tres de ellos para repeticiones y dos para control, de capacidad de volumen de 250 ml cada uno (Figura 9).

Figura 9

Biorreactores manuales



Nota. Elaboración propia.

Se tomó una muestra de 10 ml cada 3, 6 y 12 horas para la titulación de cianuro y 200 μm para el recuento de células por densidad óptica en el espectrofotómetro. Fue importante regular el pH en cada medición con NaOH 2N para evitar la volatilización del cianuro.

3.4.11 Titulación del NaCN

Se evaluó la concentración de NaCN inicial y final, a través del método titulométrico con Nitrato de plata (APHA, 1992). Se tomó 10 ml de muestra con una jeringa estéril y se añadió 3 gotas de yoduro de potasio al 10%, se homogenizó

y tituló la muestra con nitrato de plata hasta llegar a que la mezcla cambie a un color verde con transparencia lechosa (Figura 10), la cantidad usada se multiplicó por el factor de 20, dando como resultado la cantidad de cianuro restante.

Figura 10

Titulación del cianuro con $AgNO_3$



Nota. Elaboración propia.

3.4.12 Eficiencia de Degradación

La eficiencia de degradación (DE) del cianuro se calculó mediante la siguiente fórmula (Kandasamy et al., 2015):

$$DE (\%) = \left(\frac{I_c - R_c}{I_c} \right) \times 100$$

Donde:

I_c = Concentración inicial de cianuro (mg/L)

R_c = Concentración residual de cianuro (mg/L)

3.4.13 Proceso de Biodegradación de NaCN

Se tomaron dos asadas de la cepa joven seleccionada y se sembró en 4 placas con agar nutritivo a 33 °C. Luego de las 24 horas y de manera aséptica se liberó y lavó la masa bacteriana crecida en la placa con el medio líquido 9M (más extracto de levadura al 2%) se la regresó al mismo medio ajustando el pH a 9 con NaOH 2N (Huertas et al., 2010). Se dejó masificar la bacteria en agitación (130 rpm) a 33° C por 24 horas, hasta obtener la masa microbiana deseada.

Para la biodegradación, la cepa debió alcanzar una concentración entre 10^7 a 10^8 cél/mL en 150 ml de medio 9M modificado con NaCN a un pH de 10,5 evitando la volatilización (Khamar et al., 2015). Para lograr dicha concentración se utilizó la fórmula obtenida con la curva de calibración. Pasadas las 24 horas de incubación, se centrifugó la muestra a 8000 rpm por 20 minutos quedando sólo el pellet bacteriano (Karamba et al., 2015; Sankaranarayanan & Gowthami, 2015). Para obtener la masa madre, se agregó 30 ml de medio 9M sin extracto de levadura al pellet resultante, la masa madre fue dividida para tres repeticiones, para cada biorreactor manual de 150 ml (Bouari et al., 2013; Víctor M. Luque-Almagro et al., 2005). El medio fue incubado y evaluado a 33 °C durante 36 horas sobre una incubadora manual. Cada 3, 6 y 12 horas se tomó una muestra de 10 ml para la titulación y 200 µl para la medición de la concentración celular por densidad óptica. Se reguló el pH con NaOH 2N para evitar la volatilización del cianuro.

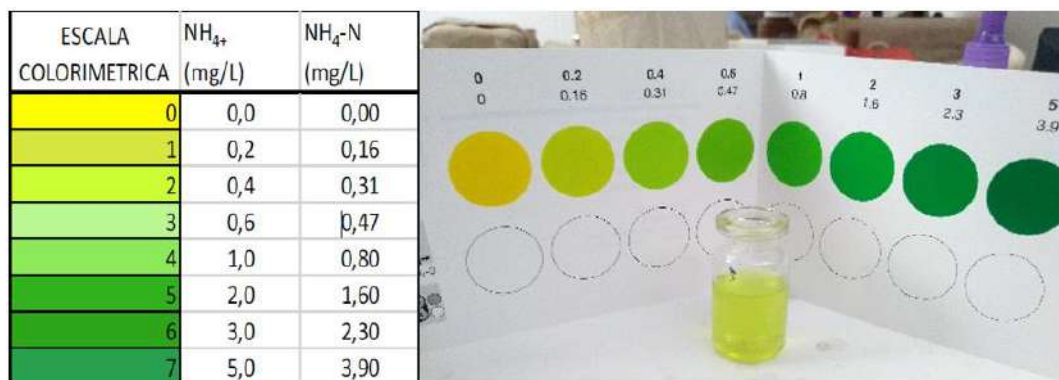
3.4.14 Método Colorimétrico para Detectar Amonio

Se realizó usando una tarjeta colorimétrica que midió la cantidad de nitrógeno amónico. El nitrógeno amónico (NH_4^+) se presentó en forma de iones amonio y amoniaco.

La concentración de amonio se determinó cualitativamente por comparación visual del color de la solución de medición con las zonas de color amarillo-verde con la escala colorimétrica de amoniaco, según se observa en la Figura 11. Se cogió 5 ml del ensayo evaluado y se precedió a seguir la guía descrita por Merck (2003).

Figura 11

Escala colorimétrica de amoniaco



Nota. Kit del Tes de amonio por Merck, 2003.

3.4.15 Análisis Estadístico

Todos los resultados se muestran como promedio \pm (DS) Desviación estándar de n=3 ó n=2 muestras. Los gráficos se realizaron utilizando el programa OriginPro 18 y el software estadístico Rstudio versión 4.2.1. Para realizar la comparación entre tratamientos se utilizó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilks y un test de igualdad de varianza de Levene. Para las muestras con distribución normal se aplicó una prueba de Anova de una vía, con test a posteriori de Tukey ($p < 0,05$). Para las muestras que no presentaron distribución normal se aplicó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

CAPÍTULO IV

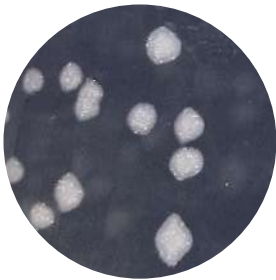
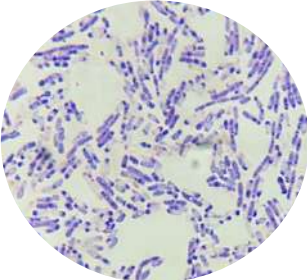

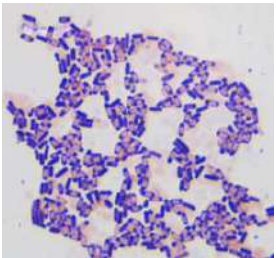
RESULTADOS


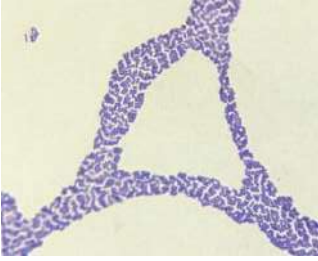





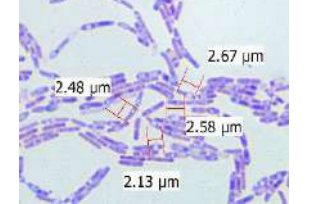

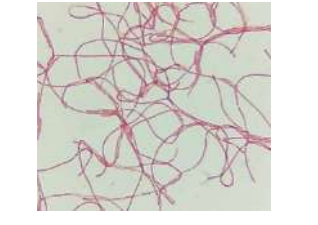
4.1 Características microbiológicas de bacterias aisladas


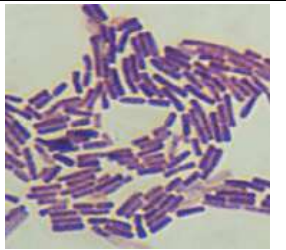
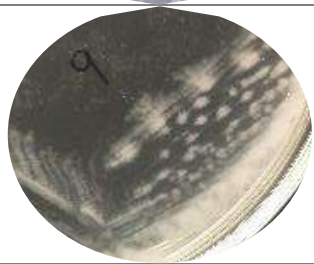

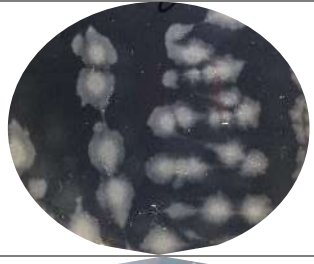


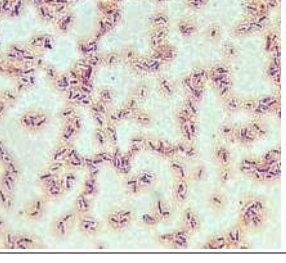



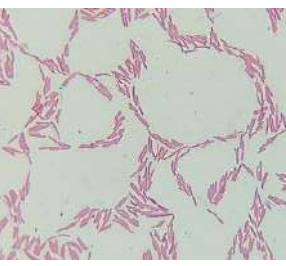
Las características macroscópicas se evaluaron en medio TSA tras 24 horas de incubación a 35 °C. Para las características microscópicas se utilizó la técnica de coloración Gram, diferenciando a las 37 cepas aisladas como Gram negativos y Gram positivos a través del objetivo 100X, se observaron bacilos, estreptobacilos y cocobacilos (Tabla 13).






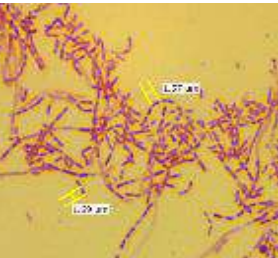

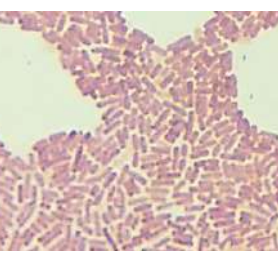
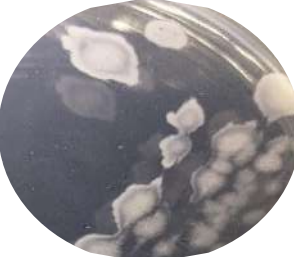
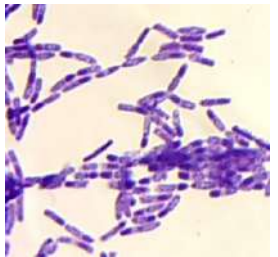

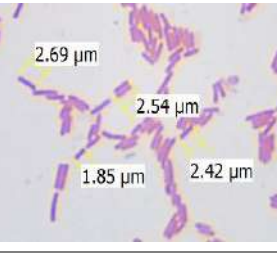
Tabla 13


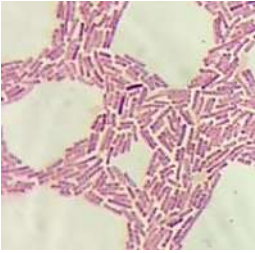
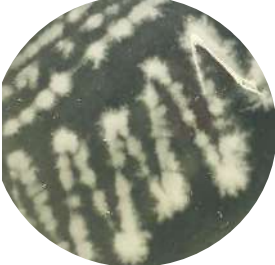
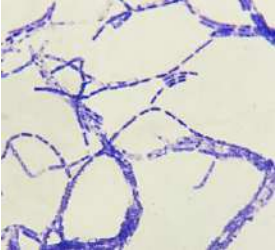
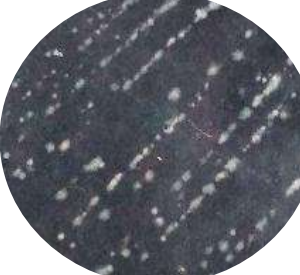


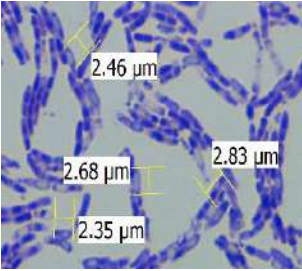


Identificación macroscópica y microscópica de las cepas


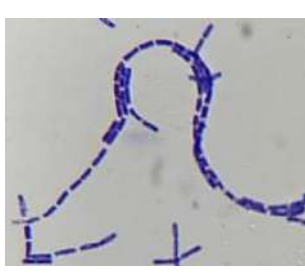

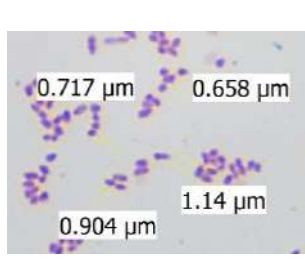
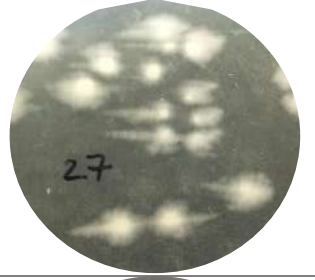
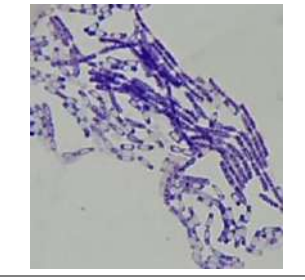
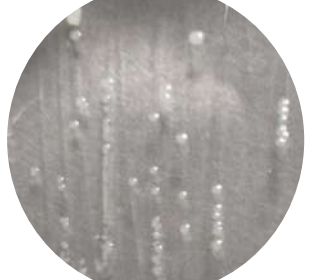
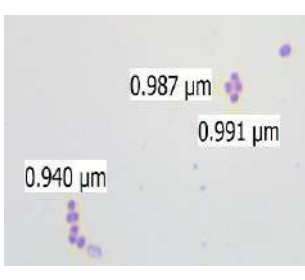

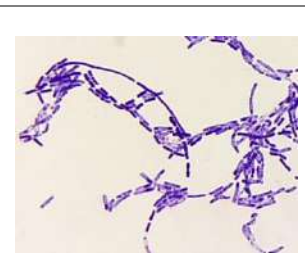
Código	Morfología colonial	Tinción gram
PP-01	 <p>Superficie: brillante, esmerilada, cremosa, lisa y superficial Elevación: elevada Forma: irregular Borde: Ondulado Color: Crema</p>	 <p>Gram positivo. Diplobacilos rectangulares con esporas terminales y centrales</p>
PP-02	 <p>Superficie: rugosa, mate, cremosa y superficial Elevación: elevada Forma: irregular Borde: Ondulado Color: Crema</p>	 <p>Gram positivo. Estreptobacilos con esporas terminales y centrales.</p>

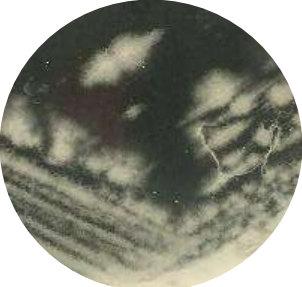
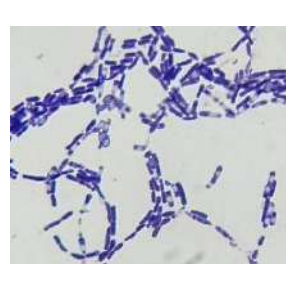
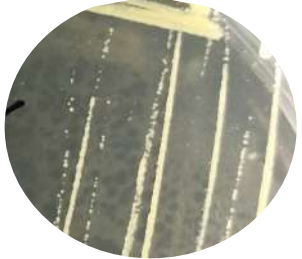
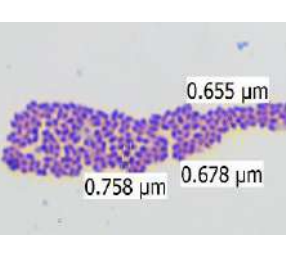

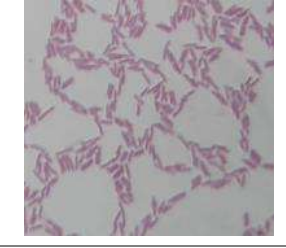

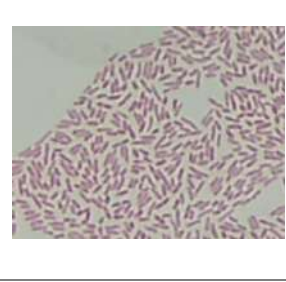

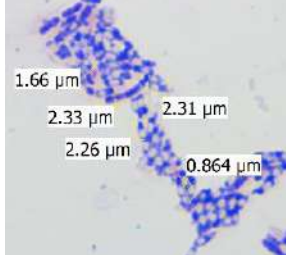
PP-03		<p>Forma: irregular, puntiforme Borde: ondulado Elevación: plana Superficie: rugosa, mate, cremosa y superficial Color: Crema</p>		Gram positivo. Empalizada
PP-04		<p>Forma: circular Borde: entero Elevación: acuminada Superficie: lisa, brillante, cremosa y superficial Color: blanco</p>		Gram positiva. Estreptobacilos
PP-05		<p>Forma: circular Borde: entero Elevación: convexa Superficie: lisa, brillante, cremosa y superficial Color: blanco</p>		Gram positiva. Estreptobacilos
PP-06		<p>Superficie: rugosa, mate, cremosa y superficial Elevación: elevada Forma: irregular Borde: Ondulado Color: Crema</p>		Gram positivo. Estreptobacilos rectangulares con esporas centrales y terminales.
PP-07		<p>Forma: irregular Borde: ondulado Elevación: elevada Superficie: rugosa, mate, cremosa y superficial Color: Crema</p>		Gram positiva. Filamentosa

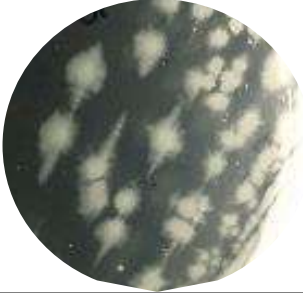
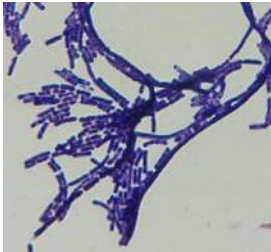

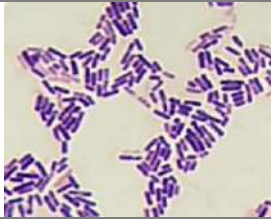

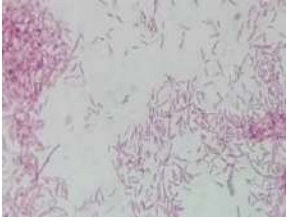
PP-08		<p>Forma: puntiforme Borde: entero Elevación: elevada Superficie: lisa, mate, cremosa y superficial Color: Crema</p>		Gram positivo. Empalizada
PP-09		<p>Forma: rizoide Borde: lobulado Elevación: plana Superficie: rugosa, mate, cremosa e invasiva Color: Crema</p>		Gram positivo. Estreptobacilos rectangulares.
PP-10		<p>Superficie: rugosa, mate, cremosa y superficial Elevación: elevada Forma: irregular Borde: Ondulado Color: Crema</p>		Gram positivo. Estreptobacilos rectangulares con esporas centrales.
PP-11		<p>Forma: rizoide Borde: lobulado Elevación: convexo Superficie: rugosa, brillante, chiclosa e invasiva Color: blanco</p>		Gram positivo. Bacilos con membrana
PP-12		<p>Forma: irregular Borde: ondulado Elevación: elevada Superficie: rugosa, mate, cremosa y superficial Color: Crema</p>		Gram positivo Filamentosa
PP-13		<p>Forma: puntiforme Borde: entero Elevación: elevada Superficie: lisa, mate, cremosa e invasiva Color: crema</p>		Gram negativo. Empalizadas

PP-14		<p>Forma: puntiforme Borde: entero Elevación: elevada Superficie: lisa, brillante, cremosa y superficial Color: crema</p>		Gram positivo. Empalizadas
PP-15		<p>Superficie: brillante, esmerilada, cremosa, lisa y superficial Elevación: convexa Forma: circular Borde: entero Color: Crema</p>		Gram positivo. Estreptobacilos
PP-16		<p>Superficie: brillante, esmerilada, cremosa, lisa y superficial Elevación: convexa Forma: circular Borde: entero Color: crema</p>		Bacteria negativo Bacilos muy delgados pequeños
PP-17		<p>Forma: puntiforme Borde: entero Elevación: elevada Superficie: lisa, mate, cremosa y superficial Color: crema</p>		Gram negativo. Empalizadas
PP-18		<p>Superficie: rugosa, mate, cremosa y superficial Elevación: elevada Forma: irregular Borde: ondulado Color: crema</p>		Gram positivo. Estreptobacilos rectangulares con esporas centrales y terminales
PP-19		<p>Forma: circular Borde: entero Elevación: convexa Superficie: lisa, brillante, cremosa y superficial Color: crema</p>		Gram Negativa. Empalizadas

PP-20		<p>Forma: puntiforme Borde: entero Elevación: elevada Superficie: lisa, mate, cremosa y superficial Color: crema</p>		Gram negativo. Empalizadas
PP-21		<p>Superficie: rugosa, mate, cremosa y superficial Elevación: elevada Forma: irregular Borde: Ondulado Color: Crema</p>		Gram positivo. Estreptobacilos rectangulares con esporas terminales y centrales.
PP-22		<p>Forma: puntiforme Borde: entero Elevación: elevada Superficie: lisa, mate, cremosa y superficial Color: crema</p>		Gram negativo. Empalizadas
PP-23		<p>Superficie: rugosa, mate, cremosa e invasiva Elevación: elevada Forma: irregular Borde: lobulado Color: Crema</p>		Gram positivo. Estreptobacilos con esporas terminales y centrales.
PP-24		<p>Superficie: rugosa, mate, cremosa y superficial Elevación: elevada Forma: irregular Borde: lobulado Color: Crema</p>		Gram positivo. Estreptobacilos rectangulares con esporas centrales y terminales.

PP-25		<p>Superficie: rugosa, mate, cremosa y superficial Elevación: elevada Forma: irregular Borde: Ondulado Color: Crema</p>		Gram positivo. Estreptobacilos rectangulares
PP-26		<p>Superficie: lisa, mate, cremosa y superficial Elevación: plana Forma: circular Borde: entero Color: crema</p>		Gram negativo. Empalizadas
PP-27		<p>Superficie: rugosa, mate, cremosa y superficial Elevación: elevada Forma: irregular Borde: ondulado Color: crema</p>		Gram positivo. Estreptobacilos con esporas terminales y centrales
PP-28		<p>Forma: puntiforme Borde: entero Elevación: elevada Superficie: lisa, brillante, chiclosa y superficial Color: crema</p>		Gram negativo. Sarcina
PP-29		<p>Superficie: rugosa, mate, cremosa y superficial Elevación: elevada Forma: irregular Borde: lobulado Color: Crema</p>		Gram positivo. Estreptobacilos rectangulares con esporas centrales.

PP-30		<p>Superficie: rugosa, mate, cremosa y superficial Elevación: elevada Forma: irregular Borde: lobulado Color: Crema</p>		<p>Gram positivo. Estreptobacilos rectangulares con esporas centrales.</p>
PP-31		<p>Forma: puntiforme Borde: entero Elevación: elevada Superficie: lisa, brillante, chiclosa y superficial Color: amarillo</p>		<p>Gram positivo. Estreptococo</p>
PP-32		<p>Forma: puntiforme Borde: entero Elevación: elevada Superficie: lisa, brillante, chiclosa y superficial Color: amarillo</p>		<p>Gram negativo. Empalizadas</p>
PP_33		<p>Forma: puntiforme Borde: entero Elevación: elevada Superficie: lisa, brillante, chiclosa y superficial Color: amarillo</p>		<p>Gram negativo. Empalizadas</p>
PP_34		<p>Forma: puntiforme Borde: entero Elevación: elevada Superficie: lisa, mate, cremosa y superficial Color: amarillo</p>		<p>Gram positivo. Estreptobacilos con esporas terminales y centrales.</p>

PP_35		<p>Superficie: rugosa, mate, cremosa y superficial Elevación: plana Forma: irregular Borde: ondulado Color: Crema</p>		<p>Gram positivo. Estreptobacilos rectangulares con esporas centrales.</p>
PP_36		<p>Forma: puntiforme Borde: entero Elevación: elevada Superficie: lisa, mate, cremosa y superficial Color: crema</p>		<p>Gram negativo. Empalizadas</p>
PP_37		<p>Forma: puntiforme Borde: entero Elevación: elevada Superficie: lisa, brillante, chiclosa y superficial Color: verde</p>		<p>Gram negativo. empalizado</p>

Nota. Elaboración propia.

4.2 Identificación de las cepas aisladas por pruebas bioquímicas

Se identificaron 37 cepas bacterianas según las pruebas bioquímicas descritas en Mac Faddin (2003) y el manual bacteriológico de Brenner et al., (2007).

Ver Tabla 14.

Tabla 14

Identificación de cepas seleccionadas por pruebas bioquímicas

Código de la cepa	PRUEBAS BIOQUÍMICAS															Posible género y/o especie	
	Catalasa	Oxidasa	Hidrólisis del Almidón	Citrato	RM	VP	Nitrato	6,5% NaCl	LIA	TSI	Cél >1 µm	Agar MacConkey	Motilidad	Indol	Tinción endosporas		Agar Pseudomona
PP_01	+	+	+	-	+	-	+	+	K/A	K/A	+	-	+	-	+	NR	<i>Género Bacillus</i>
PP_06 PP_10	+	+	+	-	+	+	+	-	K/A	K/A	+	-	+	-	+	NR	<i>Género Bacillus</i>
PP_23	+	-	+	-	+	-	+	NR	K/A	K/A	+	-	+	-	+	NR	<i>Género Bacillus</i>
PP_30	+	-	+	-	+	+	+	NR	K/A	K/A	+	-	+	-	+	NR	<i>Género Bacillus</i>
PP_02 PP_27 PP_35	+	+	+	-	+	-	+	+	K/A	K/A	+	-	+	-	+	NR	<i>Género Bacillus</i>
PP_18 PP_34	+	+	+	-	+	+	+	+	K/A	K/A	+	-	-	-	+	NR	<i>Género Bacillus</i>
PP_03	+	-	-	+	-	+	-	+	K/A	K/A		-	+	-		NR	<i>Bacillus pumillus</i>
PP_04 PP_05 PP_07	+	-	+v	-	-	+	-	+	NR	NR	+	-	-	-	-	NR	<i>Bacillus frigoritolerans</i>
PP_12	+	-	+v	-	-	+	-	+	NR	NR	+	-	-	-	-	NR	<i>Bacillus frigoritolerans</i>

Código de la cepa	PRUEBAS BIOQUÍMICAS																Posible género y/o especie
	Catalasa	Oxidasa	Hidrólisis del Almidón	Citrato	RM	VP	Nitrato	6,5% NaCl	LIA	TSI	Cél >1 µm	Agar MacConkey	Motilidad	Indol	Tinción endosporas	Agar Pseudomona	
PP_08	+	-	+	-	-	-	+	-	K/K	K/A	+	-	+	-	-	NR	<i>Género Bacillus</i>
PP_09 PP_25	+	+	+	+	+	-	NR	NR	K/A	K/A	+	-	+	-	-	NR	<i>Género Bacillus</i>
PP_11	+	-	+	-	-	+	+	+	K/A	K/A	+	-	-	+	+ con cápsula	NR	<i>Género Bacillus</i>
PP_13	+	+	-	-	-	+	+	+	NR	NR	+	Crec. amarillo	+	-	-	-	<i>Género Bacillus</i>
PP_14	+	-	+	-	+	-	+	-	A/A	A/A	+	-	+	-	-	NR	<i>Género Bacillus</i>
PP_15	+	-	-	-	-	-	+	+	K/K	K/K	+	-	-	-	-	NR	<i>Género Bacillus</i>
PP_21 PP_24 PP_29	+	+	+	-	+	+	+	NR	K/A	K/A	+	-	+	-	+	NR	<i>Género Bacillus</i>
PP_19	+	-	+	-	+	-	+	NR	K/K	A/A	+	-	-	-	-	NR	<i>Género Bacillus</i>
PP_17 PP_20 PP_22	+	-	+	-	+	-	NR	NR	A/K	A/A	+	-	+	-	-	NR	<i>Género Corynebacterium</i>
PP_26	+	+	+	+	-	-	-	+	K/A	K/A	-v	Crec. amarillo	+	-	-	Pi	<i>Pseudomona stutzeri</i>

Código de la cepa	PRUEBAS BIOQUÍMICAS															Posible género y/o especie	
	Catalasa	Oxidasa	Hidrólisis del Almidón	Citrato	RM	VP	Nitrato	6,5% NaCl	LIA	TSI	Cél >1 µm	Agar MacConkey	Motilidad	Indol	Tinción endosporas		Agar Pseudomona
PP_28	+	-	-	-	+	-	NR	NR	NR	NR	-	Crec. amarillo	-	-	-	-	<i>Género Acinetobacter</i>
PP_31	+	-	-	-	NR	NR	NR	NR	NR	NR	-	-	-	-	-	NR	<i>Género Microbacterium</i>
PP_32	+	-v	-	+	NR	-	+	-	K/K	K/A	+	Crec. amarillo	+	-	-	-	<i>Género Chromobacterium</i>
PP_33	+	+	+	+	-	-	+	+	NR	NR	-v	Crec. amarillo	+v	-	-	Fl	<i>Género Pseudomonas</i>
PP_36	+	-	+	-	+	-	-	NR	K/K	A/K	+	-	+	-	NR	-	<i>Género Bacillus</i>
PP_16 PP_37	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+v	Crec. amarillo	+	-	-	Fl	<i>Género Pseudomona</i>

Nota. + = resultado positivo, - = resultado negativo, K/A=ácido/alcalino, K/K=sin reacción, K=Alcalino (sin reacción), v= variable, Pi=presencia de piocianina, Fl=presencia de fluoresceína NR=No realizada. Cada experimento fue realizado por duplicado.

4.3 Tolerancia y selección de las bacterias frente al NaCN

En la tabla 15, las 37 cepas aisladas y sembradas en medio sólido mostraron crecimiento rápido a 50 ppm de NaCN tras 24 horas de incubación. Las cepas sembradas en medio sólido con 200 ppm de NaCN mostraron crecimiento lento a moderado entre las 24 a 48 horas de incubación. En medio líquido mineral 9M modificado las 37 cepas mostraron crecimiento a 300ppm, 30 cepas a 400ppm y 13 cepas a 500ppm de NaCN; todo el ensayo fue determinado a un total de 96 horas de incubación. Fueron seleccionadas 10 cepas de acuerdo al siguiente criterio:

- a) Mayor tolerancia frente a 500 ppm NaCN.
- b) Cepas con diferentes características microscópicas y macroscópicas.

Tabla 15

Cepas bacterianas preseleccionadas en Medio Mineral 9M con NaCN

Código	Criterios de selección						Selección
	Placa con Agar nutritivo		Tubos con 9M + NaCN (ppm)				
	48 horas		Concentración inicial		Concentración final (96 horas)		
	50ppm	200ppm	300, 400 y 500 ppm		300 ppm	400 ppm	
PP_01	++++	+++	2,1E+7	2,95E+7	2,9E+7	2,5E+7	
PP_02	++++	++++	2,1E+7	2,25E+7	2,65E+7	3,05E+7	*
PP_03	++	++	1,5E+7	2,1E+7	2,35E+7	2,2E+7	
PP_04	++++	++++	1,35E+7	1,6E+7	2,35E+7	3,05E+7	*
PP_05	++++	++++	2,5E+7	3,4E+7	2,75E+7	2,1E+7	
PP_06	++	+	1.1E+7	1,75E+7	2,3E+7	5E+6	

Código	Criterios de selección						Selección
	Placa con Agar nutritivo		Tubos con 9M + NaCN (ppm)				
	48 horas		Concentración inicial	Concentración final (96 horas)			
	50ppm	200ppm	300, 400 y 500 ppm	300 ppm	400 ppm	500 ppm	
PP_07	++	++++	4.7E+7	8,25E+7	6,3E+7	3,1E+7	
PP_08	++	+	2E+7	2,45E+7	2,5E+7	2,1E+7	
PP_09	++	+	2.6E+7	4,25E+7	3,65E+7	1,35E+7	
PP_10	+++	+++	3.1E+7	3,25E+7	3,6E+7	3,68E+7	
PP_11	+++	++	3.4E+7	3,51E+7	3,2E+7	3,53E+7	*
PP_12	++	+	2,5E+7	2,56E+7	2,58E+7	9,5E+6	
PP_13	++	+	1,55E+7	2,75E+7	2,7E+7	2,4E+7	*
PP_14	++	+	2,55E+7	3,7E+7	3E+7	2,33E+7	
PP_15	++	+	1.75E+7	3,15E+7	1,43E+7	1,32E+7	
PP_16	++	+	8E+7	8,2E+7	7,5E+7	1E+7	
PP_17	++	++	3E+7	3,2E+7	2,65E+7	2E+7	
PP_18	++	+	4,75E+7	6,5E+7	6,65E+7	4,55E+7	
PP_19	++	+	5,9E+7	9,8E+7	9,45E+7	5,5E+7	
PP_20	++	+	2,3E+7	4,9E+7	4,05E+7	3,3E+7	*
PP_21	++	++	3,95E+7	4,7E+7	4,15E+7	2,75E+7	
PP_22	+	++	1,5E+6	1,85E+7	2,7E+7	1,48E+6	
PP_23	+++	+++	2,05E+7	3E+7	3,95E+7	4,7E+7	
PP_24	++	+++	3,25E+7	4,45E+7	3,9E+7	2,8E+7	
PP_25	+++	++	4,65E+7	4,68E+7	4,7E+7	4,9E+7	
PP_26	+++	++	1,55E+7	3,85E+7	2,2E+7	1,6E+7	*
PP_27	+	+	5,5E+7	5,4E+7	5,15E+7	2,95E+7	

Código	Criterios de selección						Selección
	Placa con Agar nutritivo		Tubos con 9M + NaCN (ppm)				
	48 horas		Concentración inicial	Concentración final (96 horas)			
	50ppm	200ppm	300, 400 y 500 ppm	300 ppm	400 ppm	500 ppm	
PP_28	+++	++	9E+7	9,2E+7	9E+7	7,5E+7	
PP_29	++	+++	2,05E+7	2,8E+7	2,5E+7	2,32E+7	
PP_30	++	++	4,05E+7	4,45E+7	4,25E+7	4,2E+7	
PP_31	++	+	3,5E+7	3,55E+7	2,55E+7	2,1E+7	
PP_32	++	+	2,55E+7	2,85E+7	3,6E+7	2,6E+7	
PP_33	+++	+++	2,1E+7	2,2E+7	3,1E+7	3,15E+7	*
PP_34	+++	+++	2,1E+7	2,2E+7	2,45E+7	2,5E+7	*
PP_35	++	+	4,1E+7	4,9E+7	4,85E+7	3,7E+7	
PP_36	+++	+++	9,2E+6	4,55E+7	4,7E+7	4,9E+7	*
PP_37	+++	+++	3,45E+7	5E+7	4,45E+7	4,51E+7	*
TOTAL	37	37	37	36	30	13	

Nota. +++=mayor crecimiento, ++= moderado crecimiento, + poco crecimiento, *=cepa seleccionada.

4.4 Evaluación de la degradación de las cepas seleccionadas

En las siguientes figuras se visualizará el comportamiento de la bacteria frente al cianuro de sodio partiendo de una concentración inicial de 200 y/o 240 ppm con una temperatura de 33°C y a un pH de 10,5 para evitar la volatilización del HCN. Todo el proceso se hizo en un biorreactor armado manualmente a base de mangueras y con aireación. La concentración microbiana fue convertida a escala

logarítmica, los resultados se muestran como medias \pm error estándar. PP_26 (n=3), PP_33 (n=2), PP_20 (n=2), PP_04 (n=2), PP_37 (n=2), PP_36 (n=2), PP_02 (n=2), PP_34 (n=3), PP_11(n=2), PP_13 (n=13).

Tabla 16

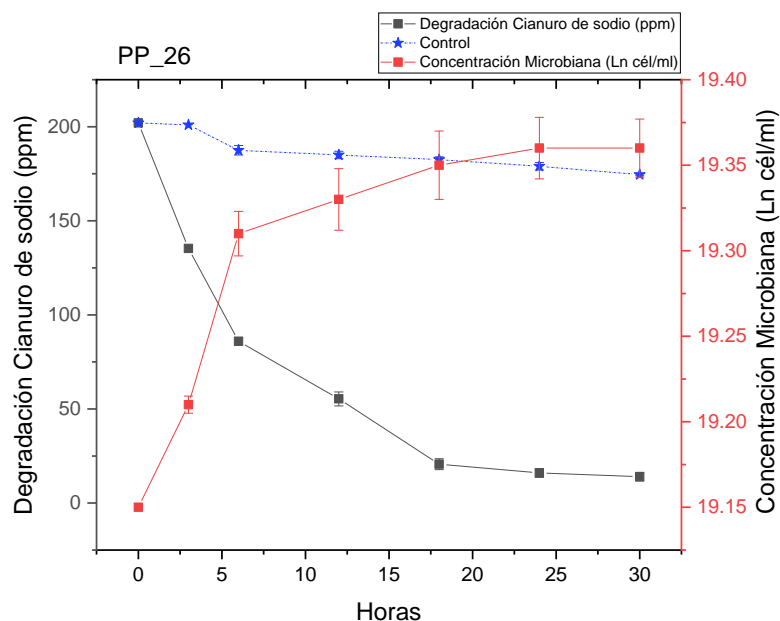
Concentración microbiana, cianuro y eficiencia de la cepa PP_26

Código	Horas	Concentración NaCN	Control	Concentración Microbiana (ln cél/ml)	% Eficiencia de degradación
PP_26	0	200	202	19,15	0
PP_26	3	135,33	200	19,1	33
PP_26	6	86	187	19,31	57
PP_26	12	55,33	185	19,33	73
PP_26	18	20,67	182	19,35	90
PP_26	24	16	179	19,36	92
PP_26	30	14	174	19,36	93

Nota. Elaboración propia.

Figura 12

Remoción de cianuro frente a la cepa PP_26



Nota. Elaboración propia.

Interpretación

En la Figura 12, la cepa PP_26 identificada bioquímicamente como *Pseudomona stutzeri*, mostró desde la hora inicial una fase exponencial por un total de 30 horas, quedando en estacionaria, culminó el ensayo con 14 ppm de cianuro residual logrando un 93 % de eficiencia de degradación convirtiendo a la bacteria en la más idónea de todas. Al final del proceso se evaluó su posible ruta metabólica con la producción del amoníaco mediante un test colorimétrico, el resultado fue un color verde limón ($\text{NH}_4^+ = 0,4 \text{ mg/L}$), mediante información bibliográfica, la posible enzima presente en esta bacteria es la cianidasa por medio de la ruta hidrolítica.

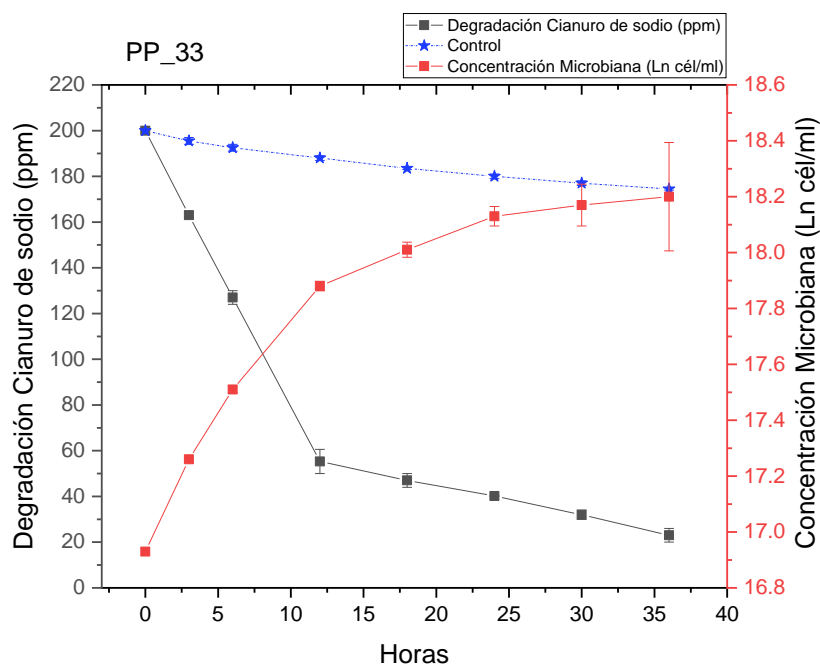
Tabla 17*Concentración microbiana, cianuro y eficiencia de la cepa PP_33*

Código	Horas	Concentración NaCN	Control	Concentración Microbiana (ln cél/ml)	% Eficiencia de degradación
PP_33	0	200	200	16,93	0
PP_33	3	163	195,5	17,26	19
PP_33	6	127	192,5	17,51	37
PP_33	12	55,3	188	17,88	73
PP_33	18	47	183,5	18,01	77
PP_33	24	40,2	180	18,13	80
PP_33	30	32	177	18,17	84
PP_33	36	23	174,5	18,20	89

Nota. Elaboración propia.

Figura 13

Remoción de cianuro frente a la cepa PP_33



Nota. Elaboración propia.

Interpretación

La cepa PP_33 identificada bioquímicamente dentro del *Género Pseudomonas* estuvo en fase de crecimiento por un total de 36 horas, quedando finalmente con 23 ppm de cianuro residual, logrando un 89 % de eficiencia de degradación. Al final del proceso se evaluó la posible ruta metabólica de la bacteria con la producción del amoníaco mediante un test colorimétrico, resultando un color verde limón ($\text{NH}_4^+ = 0,4 \text{ mg/L}$), la posible enzima presente en esta bacteria es el nitrilo hidratasa por medio de la ruta hidrolítica.

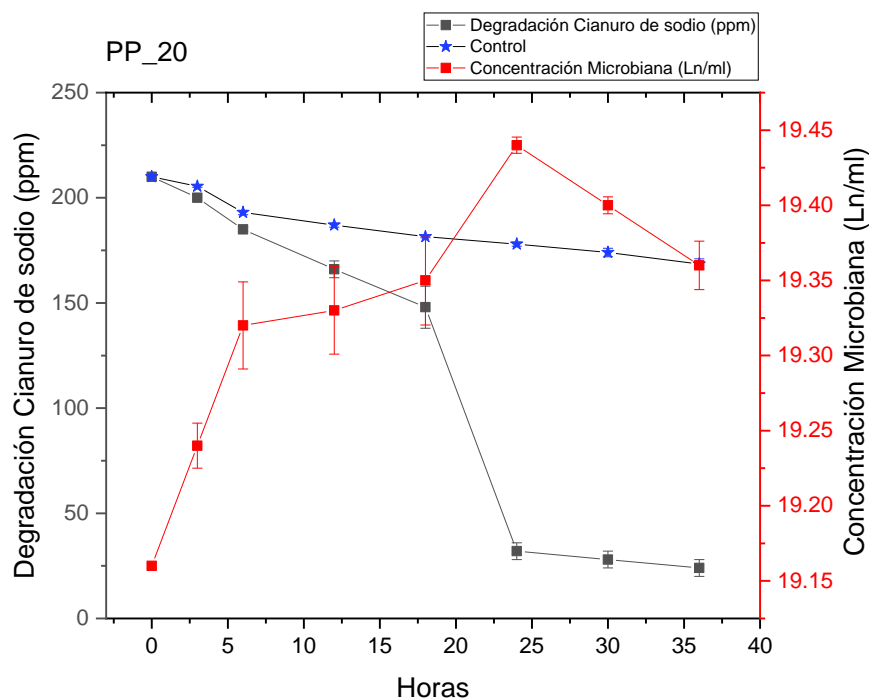
Tabla 18*Concentración microbiana, cianuro y eficiencia de la cepa PP_20*

Código	Horas	Concentración NaCN	Concentración Microbiana (ln cél/ml)	% Eficiencia de degradación	Control
PP_20	0	210	19,16	0	210
PP_20	3	200	19,24	5	205,5
PP_20	6	185	19,32	12	193
PP_20	12	166	19,33	21	187
PP_20	18	148	19,35	30	181,5
PP_20	24	32	19,44	85	178
PP_20	30	28	19,4	87	174
PP_20	36	24	19,36	89	168,5

Nota. Elaboración propia.

Figura 14

Remoción de cianuro frente a la cepa PP_20



Nota. Elaboración propia.

Interpretación

En la Figura 14 la cepa PP_20, identificada bioquímicamente dentro del *Género Corynebacterium*, inició el proceso con 210 ppm de cianuro, su fase de crecimiento fue de 24 horas terminando el ensayo con 24 ppm de cianuro, se logró un 89 % de eficiencia de degradación. La posible ruta metabólica de la bacteria con la producción del amoníaco mediante un test colorimétrico, resultó a un color verde limón ($\text{NH}_4^+ = 0,4 \text{ mg/L}$), la posible enzima presente en esta bacteria es el nitrilo hidratasa por medio de la ruta hidrolítica.

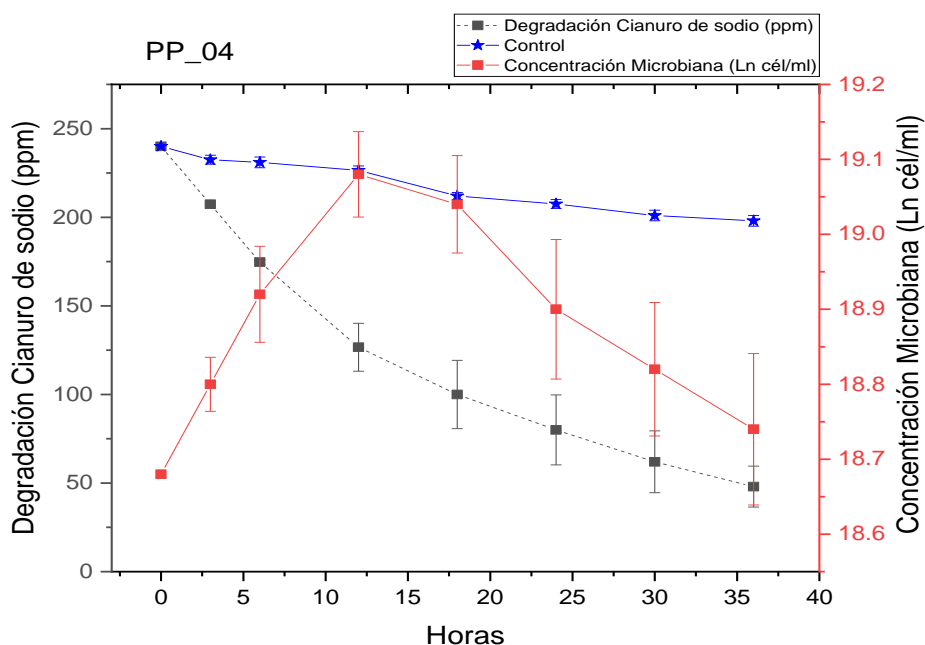
Tabla 19*Concentración microbiana, cianuro y eficiencia de la cepa PP_04*

Código	Horas	Concentración NaCN	Control	Concentración Microbiana (ln cél/ml)	% Eficiencia de degradación
PP_04	0	240	240	18,683	0
PP_04	3	207,33	232,5	18,809	14
PP_04	6	174,67	231	18,920	27
PP_04	12	126,67	226,5	19,087	47
PP_04	18	100	212	19,049	58
PP_04	24	80	207,5	18,907	67
PP_04	30	62	201	18,826	74
PP_04	36	48	198	18,744	80

Nota. Elaboración propia.

Figura 15

Remoción de cianuro frente a la cepa PP_04



Nota. Elaboración propia.

Interpretación

La cepa PP_04, identificada bioquímicamente como *Bacillus frigiditolerans*, inició el proceso con 240 ppm de cianuro, su fase de crecimiento fue relativamente corto, un total de 12 horas, terminando el ensayo con 48 ppm de cianuro residual logrando un 80 % de eficiencia de degradación. Al final del proceso se evaluó la posible ruta metabólica de la bacteria con la producción del amoníaco mediante un test colorimétrico, resultando un color rosado el cual no hubo evidencia de ese color, se puede deber a que presenta otra ruta metabólica. La bacteria es muy eficiente durante las primeras 12 horas de evaluación.

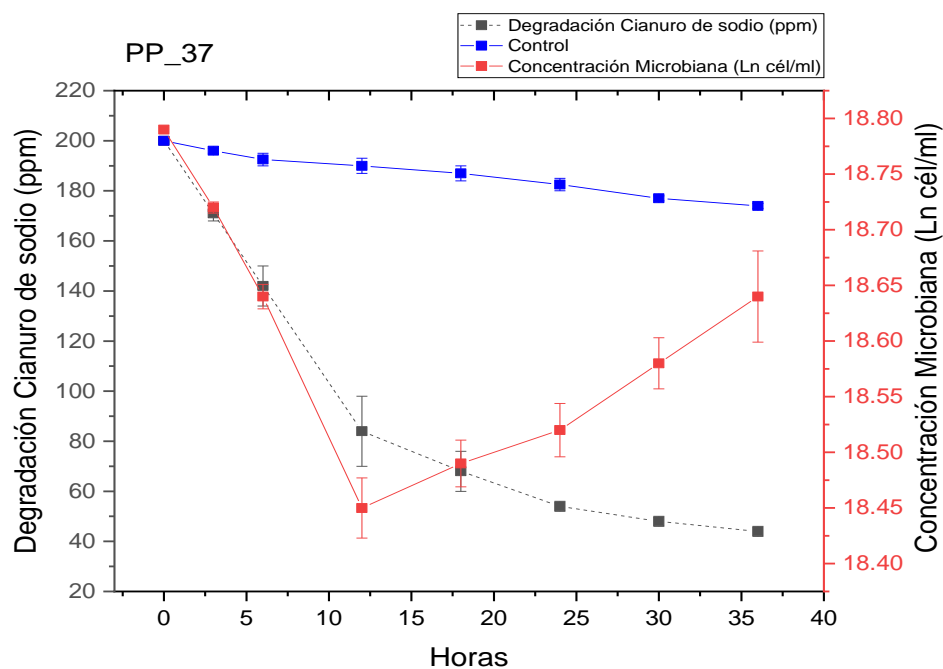
Tabla 20*Concentración microbiana, cianuro y eficiencia de la cepa PP_37*

Código	Horas	Concentración NaCN	Control	Concentración Microbiana (ln cél/ml)	% Eficiencia de degradación
PP_37	0	200	200	18,79	0
PP_37	3	171	196	18,72	15
PP_37	6	142	192,5	18,64	29
PP_37	12	84	190	18,45	58
PP_37	18	68	187	18,49	66
PP_37	24	54	182,5	18,52	73
PP_37	30	48	177	18,53	76
PP_37	36	44	174	18,54	78

Nota. Elaboración propia.

Figura 16

Remoción de cianuro frente a la cepa PP_37



Nota. Elaboración propia.

Interpretación

La cepa PP_37, identificada bioquímicamente dentro del género *Pseudomonas*, tuvo 12 horas como tiempo de adaptación, su fase de crecimiento duró un total de 24 horas y terminó el ensayo con 44 ppm logrando un 78 % de eficiencia de degradación. Al final del proceso se evaluó la posible ruta metabólica de la bacteria con la producción del amoníaco mediante un test colorimétrico, resultando un color verde limón ($\text{NH}_4^+ = 0,4 \text{ mg/L}$), la posible enzima presente en esta bacteria es el nitrilo hidratasa por medio de la ruta hidrolítica.

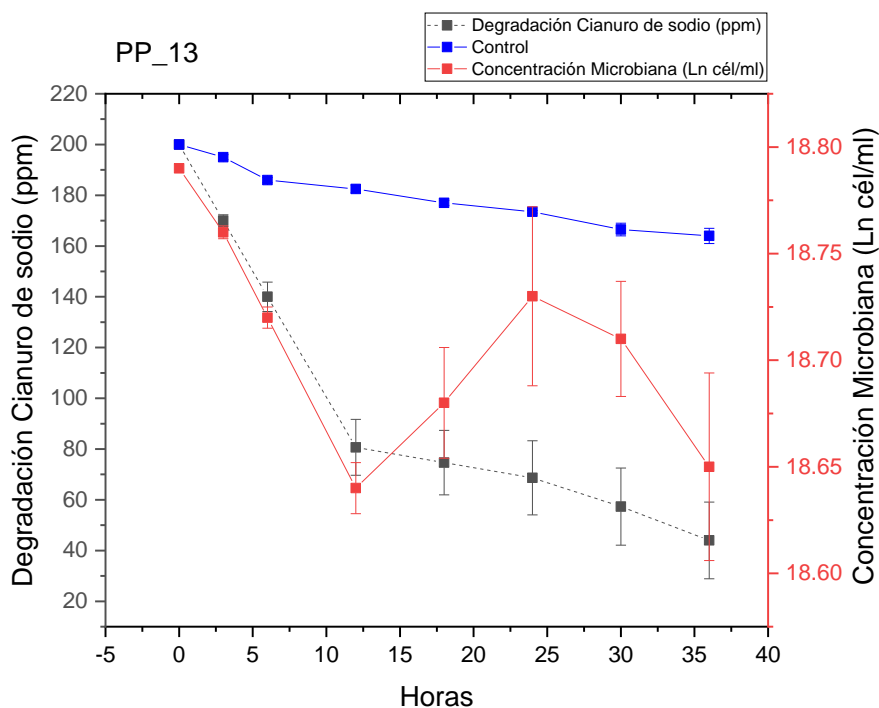
Tabla 21*Concentración microbiana, cianuro y eficiencia de la cepa PP_13*

Código	Horas	Concentración NaCN	Control NaCN	Concentración Microbiana (ln cél/ml)	% Eficiencia de degradación
PP_13	0	200	200	18,79	0
PP_13	3	170	195	18,76	15
PP_13	6	140	186	18,72	30
PP_13	12	80,67	182,5	18,64	60
PP_13	18	74,67	177	18,68	63
PP_13	24	68,67	173,5	18,73	66
PP_13	30	57,33	166,5	18,71	71
PP_13	36	44	164	18,65	78

Nota. Elaboración propia.

Figura 17

Remoción de cianuro frente a la cepa PP_13



Nota. Elaboración propia.

Interpretación

La cepa PP_13, identificada bioquímicamente dentro del género *Bacillus*, tuvo una fase de adaptación de 12 horas seguida por una fase exponencial de 12 horas comenzando el ensayo con 200 ppm y finalizando con 44 ppm de cianuro residual logrando un 78 % de eficiencia de degradación. Al final del proceso la posible ruta metabólica de la bacteria, con la producción del amoníaco mediante un test colorimétrico ($\text{NH}_4^+ = 0,4 \text{ mg/L}$), es la cianidasa o nitrilo hidratasa por medio de la ruta hidrolítica.

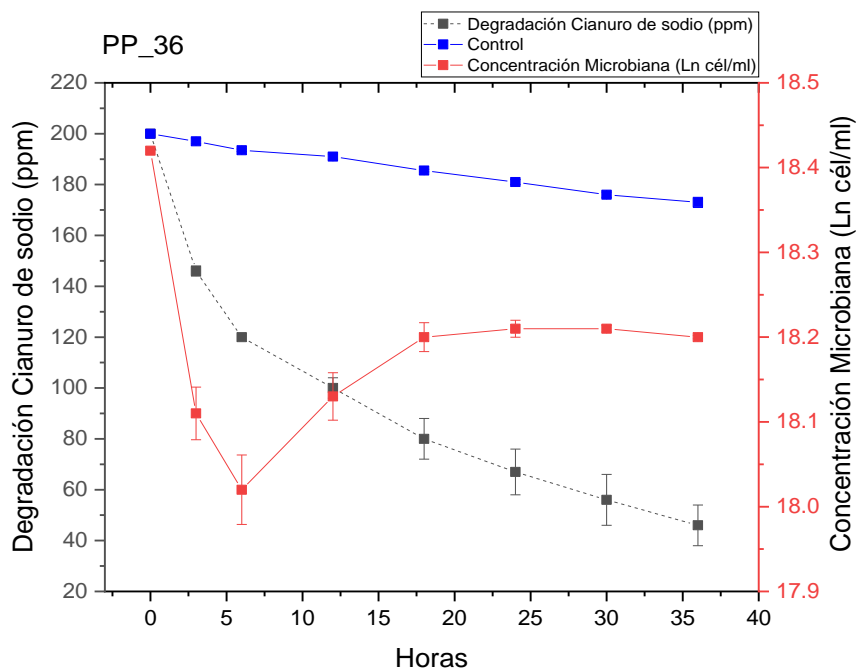
Tabla 22*Concentración microbiana, cianuro y eficiencia de la cepa PP_36*

Código	Horas	Concentración NaCN	Control	Concentración Microbiana (ln cél/ml)	% Eficiencia de degradación
PP_36	0	200	200	18,42	0
PP_36	3	146	197	18,11	26
PP_36	6	120	193,5	18,02	40
PP_36	12	100	191	18,13	50
PP_36	18	80	185,5	18,2	60
PP_36	24	67	181	18,21	67
PP_36	30	56	176	18,21	72
PP_36	36	46	173	18,2	77

Nota. Elaboración propia.

Figura 18

Remoción de cianuro frente a la cepa PP_36



Nota. Elaboración propia.

Interpretación

La cepa PP_36, identificada bioquímicamente dentro del género *Bacillus*, tuvo una fase de adaptación de 6 horas, su fase exponencial fue un total de 30 horas, terminando el proceso con 46 ppm de cianuro residual logrando un 77 % de eficiencia de degradación. Al final del proceso se evaluó la posible ruta metabólica de la bacteria con la producción del amoníaco mediante un test colorimétrico, resultando un color verde limón ($\text{NH}_4^+ = 0,4 \text{ mg/L}$), la posible enzima presente en esta bacteria es la cianidasa o nitrilo hidratasa por medio de la ruta hidrolítica.

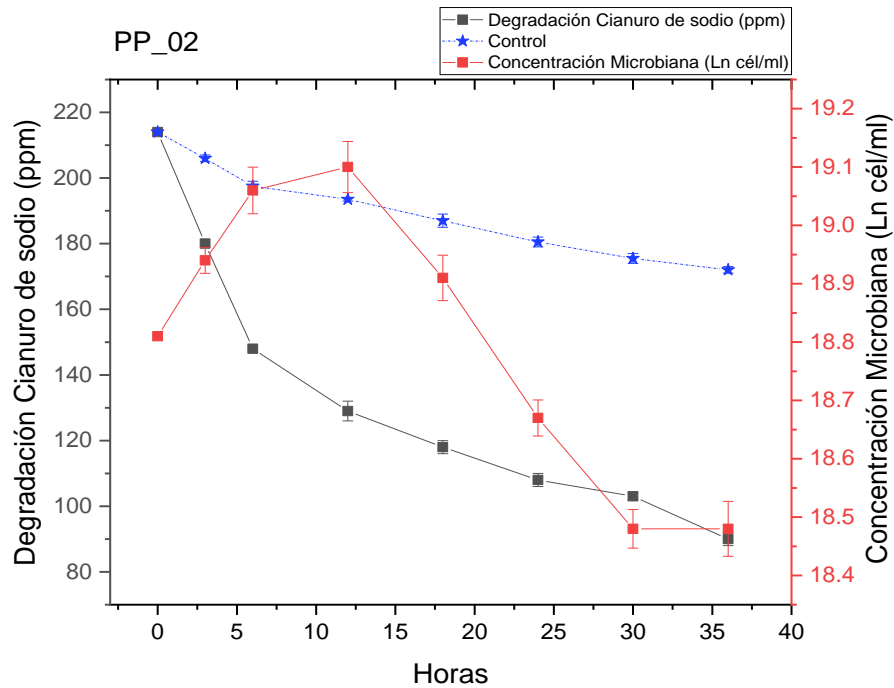
Tabla 23*Concentración microbiana, cianuro y eficiencia de la cepa PP_02*

Código	Horas	Concentración NaCN	Control	Concentración Microbiana (ln cél/ml)	% Eficiencia de degradación
PP_02	0	200	214	18,81	0
PP_02	3	180	206	18,94	16
PP_02	6	148	197,5	19,06	31
PP_02	12	129	193,5	19,1	41
PP_02	18	118	187	18,91	46
PP_02	24	108	180,5	18,67	50
PP_02	30	103	175,5	18,48	52
PP_02	36	90	172	18,48	59

Nota. Elaboración propia.

Figura 19

Remoción de cianuro frente a la cepa PP_02



Nota. Elaboración propia.

Interpretación

La cepa PP_02, identificada bioquímicamente dentro del género *Bacillus*, tuvo una fase exponencial de 12 horas comenzando el ensayo con 200 ppm y finalizando con 90 ppm de cianuro residual, quedando gran parte de ella, la eficiencia de degradación fue del 59%. Al final del proceso se evaluó la posible ruta metabólica de la bacteria con la producción del amoníaco mediante un test colorimétrico, resultando un color verde limón ($\text{NH}_4^+ = 0,4 \text{ mg/L}$), la posible enzima presente en esta bacteria es la cianidasa o nitrilo hidratasa por medio de la ruta hidrolítica.

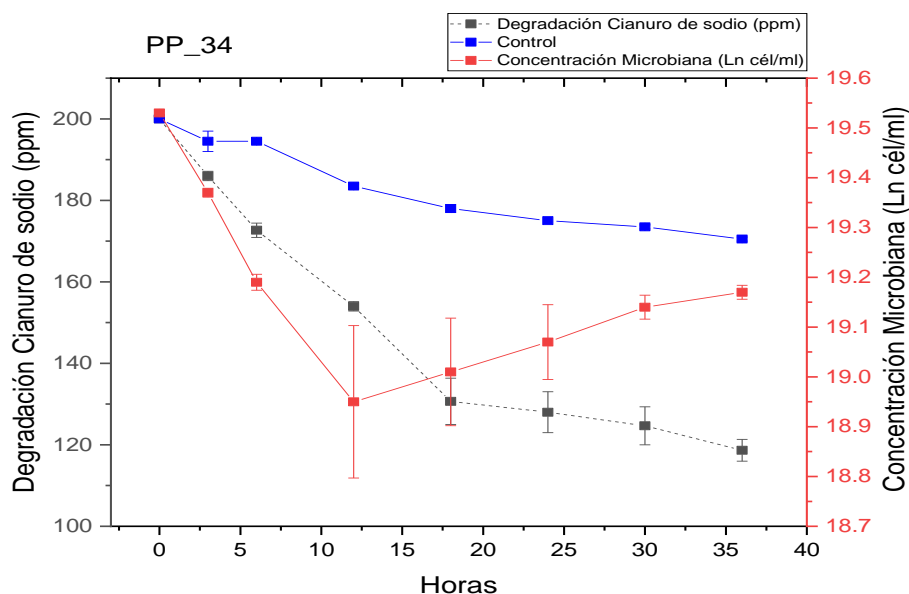
Tabla 24*Concentración microbiana, cianuro y eficiencia de la cepa PP_34*

Código	Horas	Concentración NaCN	Control NaCN	Concentración Microbiana (ln cél/ml)	% Eficiencia de degradación
PP_34	0	200	200	19,53	0
PP_34	3	186	194,5	19,37	7
PP_34	6	173	194,5	19,19	14
PP_34	12	154	183,5	18,95	23
PP_34	18	131	178	19,01	35
PP_34	24	128	175	19,07	36
PP_34	30	125	173,5	19,14	38
PP_34	36	119	170,5	19,17	41

Nota. Elaboración propia.

Figura 20

Remoción de cianuro frente a la cepa PP_34



Nota. Elaboración propia.

Interpretación

En la Figura 20, la cepa PP_34 identificada bioquímicamente dentro del género *Bacillus*, tuvo una fase de adaptación por 12 horas, su fase exponencial fue de 24 horas; inició con 200 ppm de cianuro y terminó el proceso con 119 ppm de cianuro residual, quedando como la cepa menos degradativa, el porcentaje de degradación fue de 41%. Al final del proceso se evaluó la posible ruta metabólica de la bacteria con la producción del amoníaco mediante un test colorimétrico, resultando un color verde limón ($\text{NH}_4^+ = 0,4 \text{ mg/L}$), la posible enzima presente en esta bacteria es la cianidasa o nitrilo hidratasa por medio de la ruta hidrolítica.

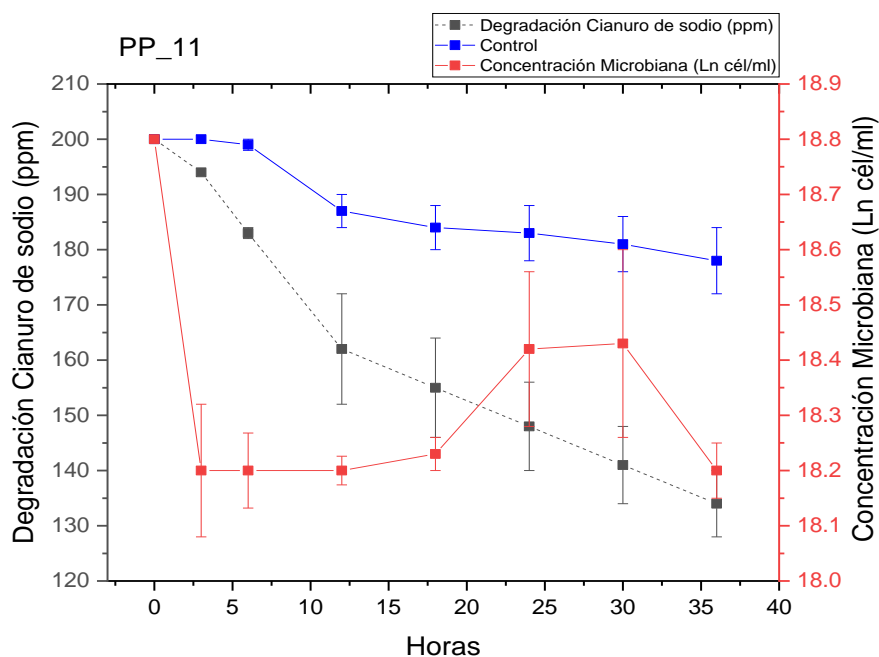
Tabla 25*Concentración microbiana, cianuro y eficiencia de la cepa PP_11*

Código	Horas	Concentración NaCN	Control NaCN	Concentración Microbiana (ln cél/ml)	% Eficiencia de degradación
PP_11	0	200	200	18.8	0
PP_11	3	194	200	18.2	4
PP_11	6	183	199	18.2	10
PP_11	12	162	187	18.2	20
PP_11	18	155	184	18.23	23
PP_11	24	148	183	18.42	27
PP_11	30	141	181	18.43	30
PP_11	36	134	178	18.2	34

Nota. Elaboración propia.

Figura 21

Remoción de cianuro frente a la cepa PP_11



Nota. Elaboración propia.

Interpretación

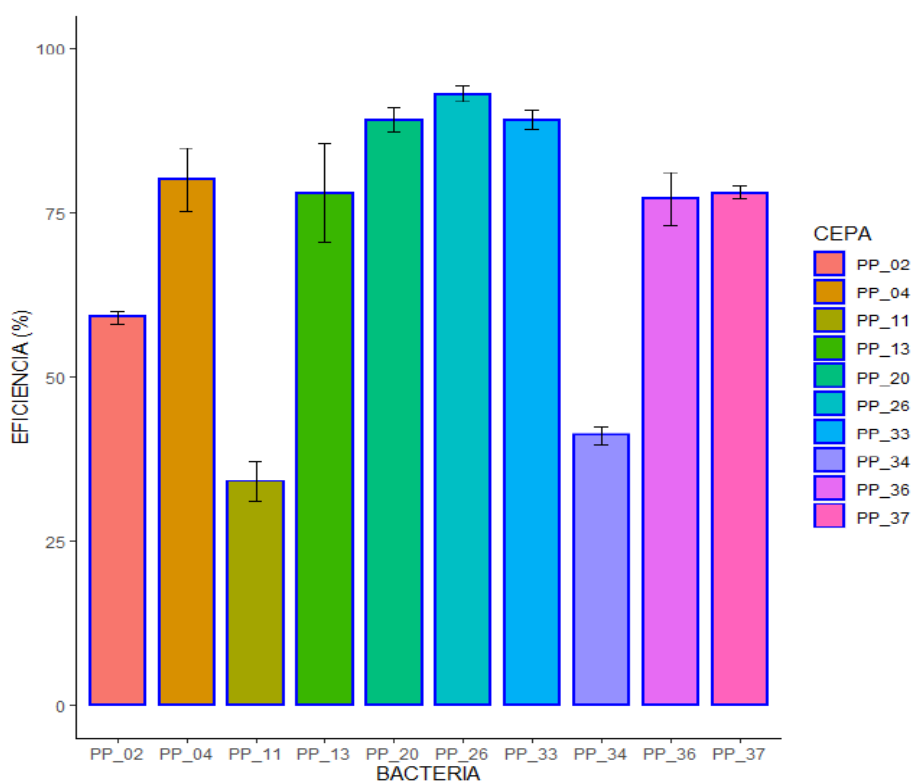
La cepa PP_11, identificada bioquímicamente dentro del género *Bacillus*, tuvo una fase de adaptación de 12 horas y una fase exponencial de 18 horas comenzando el ensayo con 200 ppm y finalizando con 134 ppm de cianuro residual, quedando una gran parte de ella. Al final del proceso se evaluó la posible ruta metabólica de la bacteria con la producción del amoníaco mediante un test colorimétrico, resultando un color verde limón ($\text{NH}_4^+ = 0,4 \text{ mg/L}$), mediante información bibliográfica, la posible enzima presente en esta bacteria es la cianidasa o nitrilo hidratasa por medio de la ruta hidrolítica.

4.5 Eficiencia de degradación

La Figura 22 muestra el porcentaje de eficiencia de degradación de las cepas en estudio durante un periodo de 36 horas de evaluación. Las cepas, PP_04, PP_33, PP_26, PP_20, PP_37, PP_13 y PP_36 mostraron el mayor porcentaje de degradación: 80, 89, 93, 89, 78, 78 y 77% respectivamente. Mientras tanto las cepas, PP_02, PP_34 y PP_11, presentaron los menores porcentajes de remoción, con 59, 41 y 34%, respectivamente.

Figura 22

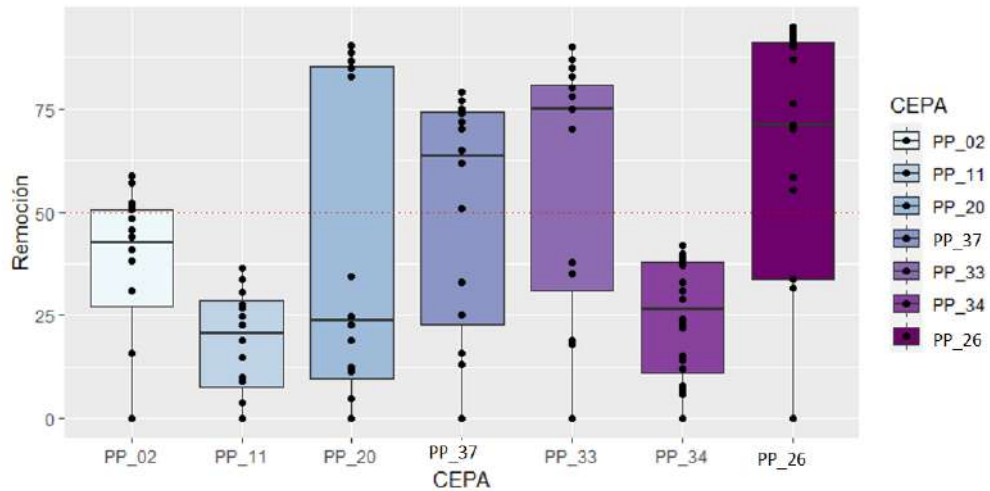
Eficiencia de biodegradación de cianuro por cada cepa



Nota. Elaboración propia.

Figura 23

Eficiencia de degradación - valores no paramétricos

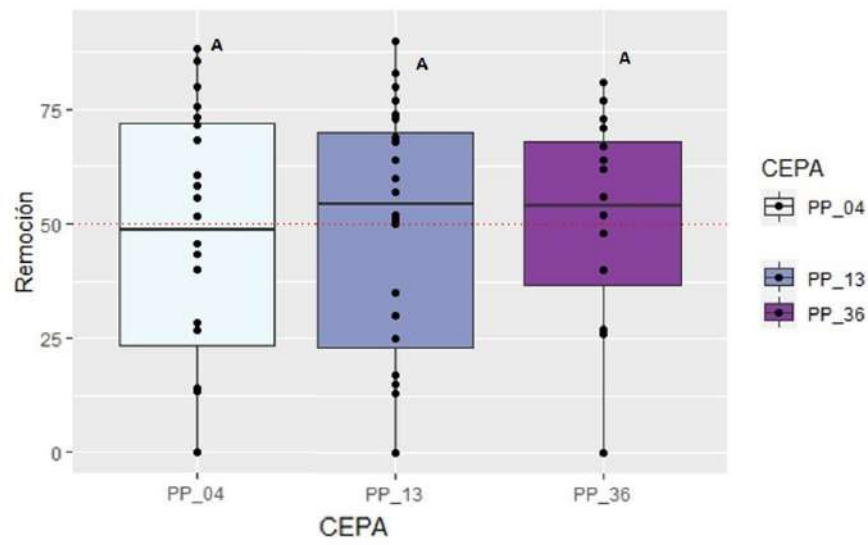


Nota. Los resultados se muestran como medias \pm desviación estándar. Existen diferencias significativas en % de remoción según Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

El porcentaje de eficiencia de degradación de la cepa PP_26 fue del 93%, la mejor de todas las cepas, seguida por la cepa PP_20 y PP_33, ambas sobre el 80% de eficiencia. También apreciamos las cepas con menor tasa de remoción la cepa PP_11, PP_34 y la cepa PP_02. En la figura se visualiza la diferencia de medias que hay entre cada tratamiento, concluyendo por medio de la prueba Kruskal-Wallis concluyendo que las 7 cepas degradan el cianuro de manera diferente, posiblemente se deba al metabolismo de la bacteria, su ruta metabólica o a la intoxicación de la misma por el cianuro, siendo necesario agregar un azúcar para potenciar su capacidad degradadora.

Figura 24

Eficiencia de degradación - valores paramétricos



Nota. Efecto del bioensayo con diferentes cepas bacterianas sobre la remoción del NaCN. Los resultados se muestran como medias \pm desviación estándar. A= No existen diferencias significativas en % de remoción según Anova de una vía y test a posteriori de Tukey, $p=0.878$ ($p<0,05$).

La figura 24 nos muestra que no hubo diferencias significativas en cuanto al % de eficiencia de degradación por las cepas, las medias reflejan similitud en sus tratamientos. Las 3 cepas bacterianas muestran buenos índices de degradación sobrepasando el 75% de eficiencia.

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN

Los pasivos ambientales mineros son lugares que han sido abandonados durante muchos años; contribuyendo a la existencia de compuestos tóxicos en el suelo, creando un ambiente hostil donde los microorganismos nativos deben biotransformarse por diferentes mecanismos de adaptación y persistencia a tales compuestos tóxicos (A Akcil et al., 2003). Mediante este trabajo se han aislado microorganismos provenientes de muestras de suelo y fuentes lodosas del pasivo ambiental Chulluncane, donde se lograron aislar un total de 37 bacterias. Diversos autores mencionan la importancia de trabajar con bacterias provenientes de suelos mineros, por su alta capacidad de adaptación a los contaminantes existentes en esos sitios (A Akcil et al., 2003; Araujo et al., 2006; Bartha & Atlas, 1977; Igeño et al., 2007; Khamar et al., 2015; Kumar et al., 2016).

La exposición al cianuro es perjudicial para los seres humanos, pero algunos microorganismos son tolerantes a sus efectos tóxicos, convirtiéndolos a materiales menos tóxicos (Khamar et al., 2015). En este estudio, 13 cepas, de un total de 37 evaluadas, mostraron mayor tolerancia al cianuro de sodio a una concentración de 500 ppm, sin embargo, algunas demoraron 48 horas en crecer en este medio.

El medio mineral 9M modificado fue la clave para todos los ensayos realizados. V. M. Luque - Almagro et al. (2005); Oudjehani et al. (2002) señalaron que este medio es necesario para que la bacteria solo use el cianuro como única fuente de carbono y nitrógeno. Se seleccionaron 10 bacterias por sus características

macromorfológicas, micromorfológicas, y por la tolerancia frente al cianuro en condiciones altamente alcalinas ($\text{pH} > 9$).

Los resultados de degradación mostraron el diferente comportamiento de cada cepa bacteriana frente al cianuro; algunas cepas tuvieron una etapa de adaptación de alrededor de 12 horas, posiblemente debido a la toxicidad del cianuro, tal como lo menciona Bouari et al. (2013), mientras que otras cepas mostraron una fase rápida de crecimiento exponencial.

Respecto a este punto, Gupta et al. (2010) mencionan que la degradación microbiana involucra rutas enzimáticas y condiciones específicas como el pH, temperatura y concentración de cianuro, que dependen del mecanismo de tolerancia del cianuro en los microbios.

Mediante la identificación por pruebas bioquímicas se pudo mostrar la presencia de 6 géneros de bacterias, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Acinetobacter*, *Microbacterium* y *Chromobacterium*, las cuales solo el género *Pseudomonas* alcanzó un 93% de eficiencia de degradación.

Mekuto et al. (2013) reportaron mediante un consorcio de *Bacillus safensis*, *B. licheniformis* y *B. tequilensis*, capaces de degradar cianuro con una eficiencia de 65.5% para una concentración inicial de 200 ppm de $[\text{CN}^-]$ y de 44.3 % para 400 ppm de $[\text{CN}^-]$. Wu et al. (2014) también informaron que una cepa de *Bacillus sp.* llamada CN-22, logró disminuir de 200 a 6,62 mg la concentración de cianuro en aguas residuales tratadas bajo pH inicial 10.3 y a 31 °C con inóculos al 2,38 % durante 72 h, mostrando una degradabilidad del 96,7%.

Recientemente Moradkhani et al. (2018) describió una cepa de *Pseudomonas parafulva* como la más eficiente en la remoción de cianuro, con un registro de 93,5% de degradación a una concentración de 200 ppm después de 13 días; esta cepa toleró hasta 500 ppm NaCN, lo que la convirtió en la opción más razonable para la biodegradación de desechos contaminados con cianuro.

Del mismo modo Akcil et al. (2003), reportaron que *Pseudomonas* sp. redujo la concentración de cianuro de 200 mg/L a 1 mg/L en 70 horas con una eficiencia del 86%.

Tiong et al. (2015), identificaron a *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, el cual toleró una concentración de cianuro inicial de 260 mg/L a 30°C por 200 rpm, quedando como cianuro residual 52 mg/L, logrando una degradación de hasta el 60 %.

Víctor M. Luque-Almagro et al. (2005), también reportaron la degradación de *Pseudomonas* CECT5344 bajo condiciones alcalinas en 50 Mm NaCN a 30°C por un periodo de 2 semanas, haciendo hincapié que *Pseudomonas* es capaz de tolerar a los metales pesados, pudiendo utilizar cianuro libre como sus complejos metálicos, bajo condiciones alcalinas; haciéndola superior a otros microorganismos que son sensibles a la presencia de estos metales.

En este trabajo hemos obtenido las cepas PP_26 y la PP_33 pertenecientes al género *Pseudomonas* los cuales tuvieron una alta eficiencia degradativa, 93 y 89 % similar a los reportados por los autores mencionados anteriormente. Las especies pertenecientes al género *Pseudomonas* son las más estudiadas, esto se debe a que

la bacteria soporta niveles de pH elevados (alcalófilos) para evitar la volatilización del cianuro y a su vez biodegradar el tiocianato y cianuro (Dumestre et al., 1997; Víctor M. Luque-Almagro et al., 2005; Tuya, 2014).

Usar microorganismos alcalófilos en procesos de biodegradación de cianuro bajo condiciones alcalinas ($\text{pH} > 10.5$) son de vital importancia para evitar la emisión de HCN al ambiente (A Akcil et al., 2003; Dumestre et al., 1997; Jandhyala et al., 2003; Víctor M. Luque-Almagro et al., 2005). Valentina et al. (2018) sostuvo que cuando el pH es inferior a 9.3, la mayor parte del cianuro total existirá como moléculas de HCN. Por el contrario, cuando el pH es superior a 10.2, el cianuro total existirá como anión cianuro, siendo un factor importante a considerar para la disociación del cianuro en un medio acuoso. En el presente trabajo se mantuvieron las cepas seleccionadas a un pH constante de 10.5 evitando así la volatilización, como también lo señaló la investigación reportada por Khamar et al. (2015), donde la eliminación de cianuro biológico fue de 38%, 48% 30% y 2% a pH 8.5, 9.5, 10.5 y 11.5, respectivamente, concluyendo que la eliminación de (HCN) se puede evitar mediante el uso de un medio alcalino (Huertas et al., 2010; Igeño et al., 2007).

La concentración inicial de cianuro usada en este experimento fue de 200 a 240 ppm NaCN, con la intención de no sobresaturar a la cepa, tal como lo mencionan Akcil et al. (2003) y Dumestre et al. (1997) quienes reportaron que la concentración de 300 ppm y 400 ppm de cianuro libre inhiben y son tóxicas para los microorganismos y/o bacterias de ensayo.

Bouari et al. (2013); Víctor M. Luque-Almagro et al. (2005) mencionaron que agregar una fuente externa de carbono permiten un apropiado crecimiento a las células bacterianas porque pueden utilizar al cianuro como fuente de nitrógeno, pero no como única fuente de carbono. Por lo tanto, las altas concentraciones de cianuro pueden interferir con las tasas de crecimiento bacteriano y provocar su inhibición. En la presente investigación no se hizo uso de fuente externa de carbono para los ensayos descritos, y los resultados obtenidos evidencian la eficiente degradación de cianuro bajo condiciones alcalinas a las que fueron estimuladas las cepas aisladas en este estudio.

CONCLUSIONES

1. En el presente estudio de investigación, se aisló e identificó bacterias provenientes de un pasivo ambiental, y evaluamos su eficiencia de biodegradación de cianuro.
2. Diez cepas bacterianas provenientes de los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Corynebacterium*, fueron las más eficientes en la degradación del cianuro, con una remoción en el rango de 78 a 93% en 36 horas, mostrando un crecimiento exponencial. Esto sugiere que estas bacterias utilizan el cianuro como fuente de energía.
3. Las cepas aisladas, al provenir de ambientes contaminados, desarrollaron un mecanismo de adaptación, las cuales las hacen ideales para ser usadas como una alternativa de saneamiento en un tipo de tratamiento tecnológico como la biorremediación, siendo alternativas más limpias y económicas para la descontaminación de los suelos.

RECOMENDACIONES

1. Estudios posteriores deben considerar las enzimas de degradación, los aspectos bioquímicos y genéticos para una mejor aplicación en la biorremediación a escala de campo. Los microorganismos deben seleccionarse no solo por su capacidad para degradar los compuestos de cianuro, sino también por tolerar las tensiones al competir con las poblaciones microbianas dentro del entorno en el que se encuentran.
2. Debido a que solo se conoce el 10% de todos los microorganismos, se sugiere recurrir a técnicas sólidas y confiables como la secuenciación y la metanogenómica para la identificación precisa de poblaciones microbianas y sus funciones metabólicas dentro del proceso.
3. Cada microorganismo puede tener requerimientos fastidiosos para su crecimiento, como lo son el requerir nutrientes específicos, condiciones específicas de pH, temperaturas de incubación, ciertos niveles de oxígeno en la atmósfera o necesitar de las interacciones con otros microbios, se sugiere encontrar las condiciones óptimas y evaluar la degradación de cianuro bajo las mismas.

REFERENCIAS

- Adjei, M. D., & Ohta, Y. (2000). Factors Affecting the Biodegradation of Cyanide by Burkholderia cepacia Strain C-3. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 89(3), 274–277. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(00\)88833-7](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(00)88833-7)
- Akcil, A, Karahan, A. G., Ciftci, H., & Sagdic, O. (2003). Biological treatment of cyanide by natural isolated bacteria (Pseudomonas sp.). *Minerals Engineering*, 16(7), 643–649. [https://doi.org/10.1016/S0892-6875\(03\)00101-8](https://doi.org/10.1016/S0892-6875(03)00101-8)
- Akcil, Ata. (2003). Destruction of cyanide in gold mill effluents : biological versus chemical treatments. *Biotechnology Advances*, 21, 501–511. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(03\)00099-5](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(03)00099-5)
- Akcil, Ata. (2010). A new global approach of cyanide management: International cyanide management code for the manufacture, transport, and use of cyanide in the production of gold. *Mineral Processing and Extractive Metallurgy Review*, 31(3), 135–149. <https://doi.org/10.1080/08827501003727022>
- Alvillo-Rivera, A., Garrido-Hoyos, S., & Buitrón, G. (2021). Biological treatment for the degradation of cyanide : A review. *Journal of Materials Research and Technology*, 12, 1418–1433. <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2021.03.030>
- ANA. (2019, October 3). *Ancash: Autoridad Nacional del Agua verifica derrame*

de relave minero en Pira . Autoridad Nacional Del Agua.
<http://www.ana.gob.pe/noticia/ancash-autoridad-nacional-del-agua-verifica-derrame-de-relave-minero-en-pira>

ANDINA. (2022, January 24). *Puno: OEFA supervisa derrame de relave minero en el distrito de Paratía* . Agencia Peruana de Noticias Andina.
<https://andina.pe/agencia/noticia-puno-oefta-supervisa-derrame-relave-minero-el-distrito-paratia-878277.aspx>

Anning, C., Wang, J., Chen, P., Batmunkh, I., & Lyu, X. (2019). Determination and detoxification of cyanide in gold mine tailings: A review. *Waste Management and Research*, 37(11), 1117–1126.
<https://doi.org/10.1177/0734242X19876691>

APHA, A. P. H. A. (1992). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (M. A. Franson (ed.); 18th ed.). Board.

Araujo, I., Montilla, M., Cárdenas, C., Herrera, L., Angulo, N., & Morillo, G. (2006). Lodos estabilizados y cepas bacterianas en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. *Interciencia*, 31(4), 268–275.
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33911506>

Aroinstein, B. N., Maka, A., & Srivastava, V. J. (1994). Chemical and biological removal of cyanides from aqueous and soil-containing systems. *Appl Microbiol Biotechnol*, 41, 700–707. <https://doi.org/10.1007/BF00167288>

- ASGMI. (2010). *Manual para el inventario de minas abandonadas o paralizadas*.
Asociacion de Servicios de Geología y Minería Iberoamericanas; ASGMI.
[https://asgmi.org/wp-
content/uploads/2018/05/Manual_Inventario_PAM_Completo.pdf](https://asgmi.org/wp-content/uploads/2018/05/Manual_Inventario_PAM_Completo.pdf)
- Barclay, M., Hart, A., Knowles, C. J., Meeussen, J. C. L., & Tett, V. A. (1998).
Biodegradation of metal cyanides by mixed and pure cultures of fungi.
Enzyme and Microbial Technology, 22, 223–231.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(97\)00171-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0141-0229(97)00171-3)
- Barclay, M., Tett, V. A., & Knowles, C. J. (1998). Metabolism and enzymology
of cyanide / metallocyanide biodegradation by *Fusarium solani* under neutral
and acidic conditions. *Enzyme and Microbial Technology*, 23, 321–330.
[https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(98\)00055-6](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(98)00055-6)
- Bartha, R., & Atlas, R. M. (1977). The Microbiology of Aquatic Oil Spills.
Advances in Applied Microbiology, 22, 225–266.
[https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(08\)70164-3](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(08)70164-3)
- Baxter, J., & Cummings, S. P. (2006). The current and future applications of
microorganism in the bioremediation of cyanide contamination. *Antonie van
Leeuwenhoek*, 90, 1–17. <https://doi.org/10.1007/s10482-006-9057-y>
- Black, J. G. (2012). *Microbiology: Principles and Explorations* (Octava). John
Wiley & Sons.

- Bolstad, D. M., Burgess, J. L., Crutchfield, C. D., Storment, S., Gerkin, R., & Wilson, J. R. (2010). Characterization of firefighter exposures during fire overhaul. *AIJHAJ-American Industrial Hygiene Association Journal*, *61*(5), 636–641. <https://doi.org/10.1080/15298660008984572>
- Bordo, D., Forlani, F., Spallarossa, A., Colnaghi, R., Carpen, A., Bolognesi, M., & Pagani, S. (2001). A persulfurated cysteine promotes active site reactivity in *Azotobacter vinelandii* rhodanese. *Biological Chemistry*, *382*(8), 1245–1252. <https://doi.org/10.1515/BC.2001.155>
- Botz, M. M., Mudder, T. I., & Akcil, A. U. (2005). Cyanide treatment : Physical , chemical and biological processes. *Developments in Mineral Processing*, *15*, 672–702. [https://doi.org/10.1016/S0167-4528\(05\)15028-5](https://doi.org/10.1016/S0167-4528(05)15028-5)
- Botz, M. M., Mudder, T. I., & Akcil, A. U. (2016). Cyanide Treatment. In *Gold Ore Processing*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-63658-4.00035-9>
- Bouari, A.-R., Begum, S. A., & Egiebor, N. O. (2013). Bioremediation of Complex Cyanide Contaminated Wastewater using *Pseudomonas Fluorescens* Pf-5. *International Journal of Engineering Research & Technology*, *2*(9), 1485–1493.
- Bowen, T. J., Butler, P. J., & Happold, F. C. (1965). Some properties of the rhodanese system of *Thiobacillus denitrificans*. *The Biochemical Journal*,

97(3), 651–657. <https://doi.org/10.1042/bj0970651>

Castillo, L., Satalaya, C., Paredes, U., Encalada, M., Zamora, J., & Cuadros, A. (2021). Pasivos ambientales mineros en el Perú: Resultados de la auditoría de desempeño sobre gobernanza para el manejo integral de los PAM. In *Documento de Política en Control Gubernamental* (Vol. 1, pp. 1–52). [https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/2135978/Pasivos ambientales mineros en el Perú.pdf.pdf?v=1629917547](https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/2135978/Pasivos_ambientales_mineros_en_el_Peru.pdf.pdf?v=1629917547)

Chapatwala, K. D., Babu, G. R. V, Vijaya, O. K., Kumar, K. P., & Wolfram, J. H. (1998). Biodegradation of cyanides , cyanates and thiocyanates to ammonia and carbon dioxide by immobilized cells of *Pseudomonas putida*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 20, 28–33. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900469>

Chaudhari, A. U., & Kodam, K. M. (2010). Biodegradation of thiocyanate using co-culture of *Klebsiella pneumoniae* and *Ralstonia* sp . *Appl Microbiol Biotechnol*, 85, 1167–1174. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2299-7>

Chávez, M. (2015). Los Pasivos Ambientales Mineros: Diagnóstico Y Propuestas. In *Red de propuesta y Acción Minería Ambiente Comunidad* (pp. 1–82). <https://muqui.org/wp-content/uploads/2019/11/pasivosambientales2015.pdf>

Churata, A., & Chambilla, wilberth A. (2019). Historia de la contaminación de la bahía de Ite por la empresa minera Southern Perú. *La Vida & La Historia*,

6(10), 70–79. <https://doi.org/10.33326/26176041.2019.10.874>

Cobos, I. M., Ibáñez García, M. I., Moreno, F. de la P., Sáez Melero, L. P., Luque-Almagro, V. M., Rodríguez, F. C., Ruiz, M. D. R., Jiménez, M. A. P., & Vivián, C. M. (2015). *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344, a cyanide-degrading bacterium with by-product (polyhydroxyalkanoates) formation capacity. *Microbial Cell Factories*, *14*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0267-8>

Donato, D., Ricci, P. F., Noller, B., Moore, M., Possingham, H., & Nichols, O. (2008). The protection of wildlife from mortality: Hypothesis and results for risk assessment. *Environment International*, *34*(6), 727–736. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2007.10.003>

Dorr, P. K., & Knowles, C. J. (1989). Cyanide oxygenase and cyanase activities of *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764. *Federation of European Microbiological Societies*, *60*, 289–294. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1989.tb03488.x>

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*, *63*(7), 2729–2734. <https://doi.org/10.1128/aem.63.7.2729-2734.1997>

Eisler, R., & Wiemeyer, S. N. (2004). Cyanide Hazards to Plants and Animals from

- Gold Mining and Related Water Issues. *Rev. Environ Contam Toxicol*, 183, 21–54. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9100-3_2
- Ezzi, M. I., & Lynch, J. M. (2005). Biodegradation of cyanide by *Trichoderma* spp. and *Fusarium* spp. *Enzyme and Microbial Technology*, 36(7), 849–854. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.03.030>
- Fairbrother, L., Shapter, J., Brugger, J., Southam, G., Pring, A., & Reith, F. (2009). Effect of the cyanide-producing bacterium *Chromobacterium violaceum* on ultraflat Au surfaces. *Chemical Geology*, 265(3–4), 313–320. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2009.04.010>
- Frakes, R. A., Sharma, R. P., & Calvin, C. (1985). Developmental Toxicity of the Cyanogenic Glycoside Linamarin in the Golden Hamster. *Teratology*, 31(2), 241–246. <https://doi.org/10.1002/tera.1420310209>
- Fry, E., & Millar, R. L. (1972). Cyanide Degradation by an Enzyme from *Stemphylium loti*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 151, 468–474. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(72\)90523-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(72)90523-1)
- Garrity, G. M. (2005). Volume 2 : The Proteobacteria. In D. J. Brenner, N. R. Krieg, & J. T. Staley (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Second, Vol. 2, pp. LXXXII, 2816). Springer New York, NY. https://www.academia.edu/39555146/Systematic_Bacteriology_Second_Edition

- Gibbons, T. (2005). International cyanide management code. *Developments in Mineral Processing*, 15, 182–199. [https://doi.org/10.1016/S0167-4528\(05\)15008-X](https://doi.org/10.1016/S0167-4528(05)15008-X)
- Grufides. (2016). Pasivos ambientales mineros en la región cajamarca. *Grupo de Formación e Intervención Para El Desarrollo Sostenible*, 54. https://grufides.org/sites/default/files//documentos/documentos/%5BV4.0%5D Informe - Pasivos ambientales presentes en la Región Cajamarca_2_0.pdf
- Guamán, M. P., & Nieto, D. A. (2018). Evaluation of the rotational speed and carbon source on the biological removal of free cyanide present on gold mine wastewater, using a rotating biological contactor. *Journal of Water Process Engineering*, 23, 84–90. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2018.03.008>
- Gupta, N., Balomajumder, C., & Agarwal, V. K. (2010). Enzymatic mechanism and biochemistry for cyanide degradation: A review. *Journal of Hazardous Materials*, 176, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.11.038>
- Gurbuz, F., Ciftci, H., & Akcil, A. (2009). Biodegradation of cyanide containing effluents by *Scenedesmus obliquus*. *Journal of Hazardous Materials*, 162(1), 74–79. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.05.008>
- Guy, R. D., Berry, J. A., Fogel, M. L., & Hoering, T. C. (1989). Differential fractionation of oxygen isotopes by cyanide-resistant and cyanide-sensitive respiration in plants. *Planta*, 177(4), 483–491.

<https://doi.org/10.1007/BF00392616>

Hall, A. H., Dart, R., & Bogdan, G. (2007). Sodium Thiosulfate or Hydroxocobalamin for the Empiric Treatment of Cyanide Poisoning? *Annals of Emergency Medicine*, 49(6), 806–813.
<https://doi.org/10.1016/j.annemergmed.2006.09.021>

Hamel, J. (2011, February). A Review of Acute Cyanide Poisoning With a Treatment Update. *Critical Care Nurse*, 31(1), 72–82.
<https://doi.org/10.4037/ccn2011799>

Huertas M. J., Luque Almagro, V. M., Martínez Luque, M., Blasco R., Moreno C., Castillo F., R. M. D. (2006). Cyanide metabolism of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 : role of siderophores. *Biochemical Society Transactions*, 34(1), 152–155.

Huertas, M. J., Sáez, L. P., Roldán, M. D., Luque-Almagro, V. M., Martínez-Luque, M., Blasco, R., Castillo, F., Moreno-Vivián, C., & García-García, I. (2010). Alkaline cyanide degradation by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 in a batch reactor. Influence of pH. *Journal of Hazardous Materials*, 179(1–3), 72–78. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.02.059>

Igeño, M. I., Orovengua, E., Guijo, M. I., Merchán, F., Quesada, A., & Blasco, R. (2007). Biodegradation of cyanide-containing wastes by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. *Communicating Current Research and*

Educational Topics and Trends in Applied Microbiology, 1, 100–107.

Jandhyala, D., Berman, M., Meyers, P. R., Sewell, B. T., Willson, R. C., & Benedik, M. J. (2003). CynD, the cyanide dihydratase from *Bacillus pumilus*: Gene cloning and structural studies. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(8), 4794–4805. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.8.4794-4805.2003>

Jaszczak, E., Polkowska, Ż., Narkowicz, S., & Namieśnik, J. (2017). Cyanides in the environment—analysis—problems and challenges. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(19), 1–20. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9081-7>

Johnson, C. A. (2014). Applied Geochemistry The fate of cyanide in leach wastes at gold mines : An environmental perspective. *APPLIED GEOCHEMISTRY*, 1, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2014.05.023>

Kandasamy, S., Dananjeyan, B., Krishnamurthy, K., & Benckiser, G. (2015). Aerobic cyanide degradation by bacterial isolates from cassava factory wastewater. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(3), 659–666. <https://doi.org/10.1590/S1517-838246320130516>

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*. *Chemosphere*, 50, 1055–1061. [https://doi.org/10.1016/s0045-6535\(02\)00624-](https://doi.org/10.1016/s0045-6535(02)00624-0)

0

- Karamba, K. I., Shukor, M. Y., Syed, M. A., Zulkharnain, A., Yasid, N. A., Khalid, A., Khalil, K. A., & Ahmad, S. A. (2015). Isolation, screening and characterisation of cyanide-degrading *Serratia marcescens* strain aq07. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences*, 8(2), 401–406.
- Karlsson, H. L. (2004). Ammonia, nitrous oxide and hydrogen cyanide emissions from five passenger vehicles. *Science of the Total Environment*, 334–335, 125–132. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.04.061>
- Khamar, Z., Makhdoumi-Kakhki, A., & Mahmudy Gharai, M. H. (2015). Remediation of cyanide from the gold mine tailing pond by a novel bacterial co-culture. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 99, 123–128. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.01.009>
- Kumar, R., Saha, S., Dhaka, S., Kurade, M. B., Kang, C. U., Baek, S. H., & Jeon, B. H. (2016). Remediation of cyanide-contaminated environments through microbes and plants: a review of current knowledge and future perspectives. *Geosystem Engineering*, 1–13. <https://doi.org/10.1080/12269328.2016.1218303>
- Logsdon, M. J., Hagelstein, K., & Mudder, T. I. (2001). El Manejo del cianuro en la extracción de oro. In *International Council on Metals and the Environment*. [http://www.ingenieroambiental.com/200/El Manejo del cianuro \(ICMM\).pdf](http://www.ingenieroambiental.com/200/El%20Manejo%20del%20cianuro%20(ICMM).pdf)
- Luo, Y. (2019). Environmental problems in the mining of metal minerals. *IOP*

Conference Series: Earth and Environmental Science, 384(1), 1–4.
<https://doi.org/10.1088/1755-1315/384/1/012195>

Luque-Almagro, V. M., Blasco, R., Huertas, M. J., Martínez-Luque, M., Moreno-Vivián, C., Castillo, F., & Roldán, M. D. (2005). Alkaline cyanide biodegradation by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. *Biochemical Society Transactions*, 33(1), 168–169. <https://doi.org/10.1042/BST0330168>

Luque-almagro, V. M., Blasco, R., Mart, M., Moreno-vivi, C., & Rold, M. D. (2011). Bacterial cyanide degradation is under review : *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 , a case of an alkaliphilic cyanotroph. *Biochemical Society Transactions*, 39, 269–274. <https://doi.org/10.1042/BST0390269>

Luque-Almagro, Víctor M., Cabello, P., Sáez, L. P., Olaya-Abril, A., Moreno-Vivián, C., & Roldán, M. D. (2017). Exploring anaerobic environments for cyanide and cyano-derivatives microbial degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(3), 1067–1074. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8678-6>

Luque-Almagro, Víctor M., Huertas, M. J., Martínez-Luque, M., Moreno-Vivián, C., Roldán, M. D., García-Gil, L. J., Castillo, F., & Blasco, R. (2005). Bacterial degradation of cyanide and its metal complexes under alkaline conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(2), 940–947.

<https://doi.org/10.1128/AEM.71.2.940-947.2005>

Luque, V. M., Moreno, C., & Roldán, M. D. (2016). Biodegradation of cyanide wastes from mining and jewellery industries. *Current Opinion in Biotechnology*, 38, 9–13. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.12.004>

Macadam, A. M., & Knowles, C. J. (1984). Purification and properties of β -cyano-L-alanine synthase from the cyanide-producing bacterium, *Chromobacterium violaceum*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 786, 123–132. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(84\)90081-5](https://doi.org/10.1016/0167-4838(84)90081-5)

MacFaddin, J. F. (2003). *Pruebas Bioquímicas para la identificación de Bacterias de Importancia Clínica* (S. Rondinone & O. Giovanniello (eds.); Tercera). Panamericana.

Mahendran, R., Bs, S., Thandeeswaran, M., KG, K., Vijayasathy, M., Angayarkanni, J., & Muthusamy, G. (2019). Microbial (Enzymatic) Degradation of Cyanide to Produce Pterins as Cofactors. *Current Microbiology*, 77(4), 578–587. <https://doi.org/10.1007/s00284-019-01694-9>

Mahendran, R., Thandeeswaran, M., Kiran, G., & Arulkumar, M. (2018). Evaluation of Pterin , a Promising Drug Candidate from Cyanide Degrading Bacteria. *Current Microbiology*, 0(0), 0. <https://doi.org/10.1007/s00284-018-1433-0>

Meghan, K. (1968). The Kinetics of the Reduction of Isocyanides , Acetylenes and

the Cyanide Ion by Nitrogenase Preparation from *Azotobacter chroococcum* and the Effects of Inhibitors. *Biochem J.*, 107, 1–6.

Mekuto, L., Ntwampe, S. K. O., & Jackson, V. A. (2013). Biodegradation of free cyanide using bacterial species isolated from cyanide wastewater.

Biotechnology, 1.mi

Mekuto, Lukhanyo, Ntwampe, S. K. O., & Akcil, A. (2016). An integrated biological approach for treatment of cyanidation wastewater. *Science of the Total Environment*, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.07.040>

Minam. (2014). Guía para el muestreo de suelos. In *Ministerio del Ambiente* (pp. 1–72). <https://www.minam.gob.pe/calidadambiental/wp-content/uploads/sites/22/2013/10/GUIA-PARA-EL-MUESTREO-DE-SUELOS-final.pdf>

MINAM. (2006, July 5). *RESUMEN EJECUTIVO SOBRE DERRAME DE RELAVES CONSORCIO INGENIEROS EJECUTORES MINEROS (CIEMSA) EN PUNO*. Ministerio de Salud. http://www.digesa.minsa.gob.pe/DEPA/ciemsas_puno.asp

Minem. (2021). *R. M. N° 200-2021-MINEM/DM*. El Peruano. https://www.minem.gob.pe/_legislacionM.php?idSector=1&idLegislacion=13423

Ministerio del Ambiente. (2010). DS N° 010-2010-MINAM: Aprueban límites

máximos permisibles para la descarga de efluentes líquidos de actividades minero - metalúrgicas. *El Peruano*, 424114–424117. http://www.minam.gob.pe/wp-content/uploads/2013/09/ds_010-2010-minam.pdf

Ministerio del Ambiente. (2017). Estándares de Calidad Ambiental para Agua (ECA). *El Peruano*, 10–19. <http://www.minam.gob.pe/wp-content/uploads/2017/06/DS-004-2017-MINAM.pdf>

Mirzadeh, S., Yaghmaei, S., & Nejad, Z. G. (2014). Biodegradation of cyanide by a new isolated strain under alkaline conditions and optimization by response surface methodology (RSM). *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 12(85), 1–9. <https://doi.org/10.1186/2052-336X-12-85>

Moradkhani, M., Yaghmaei, S., & Nejad, Z. G. (2018). Biodegradation of cyanide under alkaline conditions by a strain of *Pseudomonas putida* isolated from gold mine soil and optimization of process variables through response surface methodology (RSM). *Periodica Polytechnica Chemical Engineering*, 62(3), 265–273. <https://doi.org/10.3311/PPch.10860>

Moreno, B. (2015, April 27). *Tía María: 6 razones de por qué la minera Southern ha generado desconfianza en Arequipa*. SPDA Actualidad Ambiental. <https://www.actualidadambiental.pe/tia-maria-6-razones-de-por-que-la-minera-southern-ha-generado-desconfianza/>

- Mudder, T. I., Smith, A. S., & Botz, M. M. (2001). *The Chemistry and Treatment of Cyanidation Wastes* (Second Edi). Mining Journal Books LTD.
http://dana6.free.fr/3_060713_English_Compndium.pdf
- Municipalidad Distrital de Palca. (2008). *Recurso turístico de Palca* (p. 45).
https://www.peru.gob.pe/docs/PLANES/11739/PLAN_11739_RECURSOS_TURISTICOS_DE_PALCA_1_2012.pdf
- Newsletter. (2020, July 17). *Derrame de relaves en Mina Cobriza del Perú afecta a río Mantaro*. Minería Chilena. <https://www.mch.cl/2020/07/17/derrame-de-relaves-en-mina-cobriza-del-peru-afecta-a-rio-mantaro/>
- NICNAS. (2010). Sodium Cyanide. In *Journal of Chemical Education* (Vol. 80, Issue 9). Priority Existing Chemical Assessment Report N° 31.
<https://doi.org/10.1021/ed080p997>
- Oudjehani, K., Zagury, G. J., & Deschenes, L. (2002). Natural attenuation potential of cyanide via microbial activity in mine tailings. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58(3), 409–415. <https://doi.org/10.1007/s00253-001-0887-2>
- Özel, Y. K., Gedikli, S., Aytar, P., Ünal, A., Yamaç, M., Çabuk, A., & Kolankaya, N. (2010). New fungal biomasses for cyanide biodegradation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 110(4), 431–435.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2010.04.011>
- Parmar, P., Soni, A., Vyas, K., & Desai, P. V. (2012). Isolation and characterization

- of cyanide degrading bacterial strains from contaminated soil. *International Journal of Environmental Sciences*, 2(4), 2006–2014.
<https://doi.org/10.6088/ijes.00202030084>
- Pérez, J., & Higuera, Ó. (2008). Comportamiento electroquímico del cianuro. *Revista Científica Ingeniería y Desarrollo*, 24(24), 63–76.
- Perry, S. F. (1998). Freeze-drying and cryopreservation of bacteria. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part B Molecular Biotechnology*, 9(1), 59–64. <https://doi.org/10.1007/bf02752697>
- Razanamahandry, L. C., Onwordi, C. T., Saban, W., Bashir, A. K. H., Mekuto, L., & Malenga, E. (2019). Performance of various cyanide degrading bacteria on the biodegradation of free cyanide in water. *Journal of Hazardous Materials*, 380, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.120900>
- Restrepo, O., Montoya, C., & Muñoz, N. (2006). MICROBIAL DEGRADATION OF CYANIDE FROM GOLD METALLURGICAL PLANTS UTILIZING *P.fluorecens*. *Dyna*, 73(149), 45–51.
<https://www.researchgate.net/publication/262467370>
- Sancho, J. P., Fernández, B., & Bellón, F. (2007). Developments of an alternative technology to remove cyanide from mining wastewater. *9th INTERNATIONAL MINE WATER CONGRESS*, 413–417.
http://www.imwa.de/docs/imwa_2005/IMWA2005_059_Sancho.pdf

- Sankaranarayanan, A., & Gowthami, M. (2015). *Cyanide Degradation by Consortium of Bacterial Species Isolated from Sago Industry Effluent*. 3(1), 41–46.
- Seefeldt, L. C., Dance, I. G., & Dean, D. R. (2004). Current Topics Substrate Interactions with Nitrogenase : Fe versus Mo †. *Current*, 43(6).
- Shao, Y., Yan, T., Wang, K., Huang, S., Yuan, W., & Qin, F. G. F. (2020). Soil heavy metal lead pollution and its stabilization remediation technology. *Energy Reports*, 6, 122–127. <https://doi.org/10.1016/j.egyr.2020.11.074>
- Sicking, C., Bruschi, M., Lindackers, A., Riedel, K. U., Schubert, B., Isakovic, N., Krall, C., Klipp, W., Drepper, T., Schneider, K., & Masepohl, B. (2005). Identification of two new genes involved in diazotrophic growth via the alternative Fe-only nitrogenase in the phototrophic purple bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *Journal of Bacteriology*, 187(1), 92–98. <https://doi.org/10.1128/JB.187.1.92-98.2005>
- Tiempo Minero. (2022, April 1). *Derrame de relave minero afecta tres ríos en Huarochiri* . Tiempo Minero. <https://camiper.com/tiempominero-noticias-en-mineria-para-el-peru-y-el-mundo/derrame-de-relave-minero-afecta-tres-rios-en-huarochiri/>
- Tiong, B., Bahari, Z. M., Irwan Shah Lee, N. S., Jaafar, J., Ibrahim, Z., & Shahir, S. (2015). Cyanide degradation by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* strain W2

isolated from mining effluent. *Sains Malaysiana*, 44(2), 233–238.
<https://doi.org/10.17576/jsm-2015-4402-10>

Tuya, J. D. (2014). *Evaluación de la capacidad degradativa de cianuro por bacterias alcalófilas aisladas de los relaves de la planta concentradora de metales Mesapata Cátac - Ancash*.

Valentina, C., Hadisoebroto, R., & Rinanti, A. (2018). Removing cyanide by mixed culture at liquid media with variation in pH and cyanide concentration. *MATEC Web of Conferences*, 197, 47–49.
<https://doi.org/10.1051/mateconf/201819713016>

van Buuren, C., Makhotla, N., & Olivier, J. W. (2011). The Aster Process: Technology Development through to Piloting, Demonstration and Commercialization. *ALTA 2011 Nickel-Cobalt-Copper, Uranium and Gold Conference, September*, 236–253.

Wu, C. F., Xu, X. M., Zhu, Q., Deng, M. C., Feng, L., Peng, J., Yuan, J. P., & Wang, J. H. (2014). An effective method for the detoxification of cyanide-rich wastewater by *Bacillus* sp. CN-22. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(8), 3801–3807. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5433-5>

ANEXOS

Anexo 1

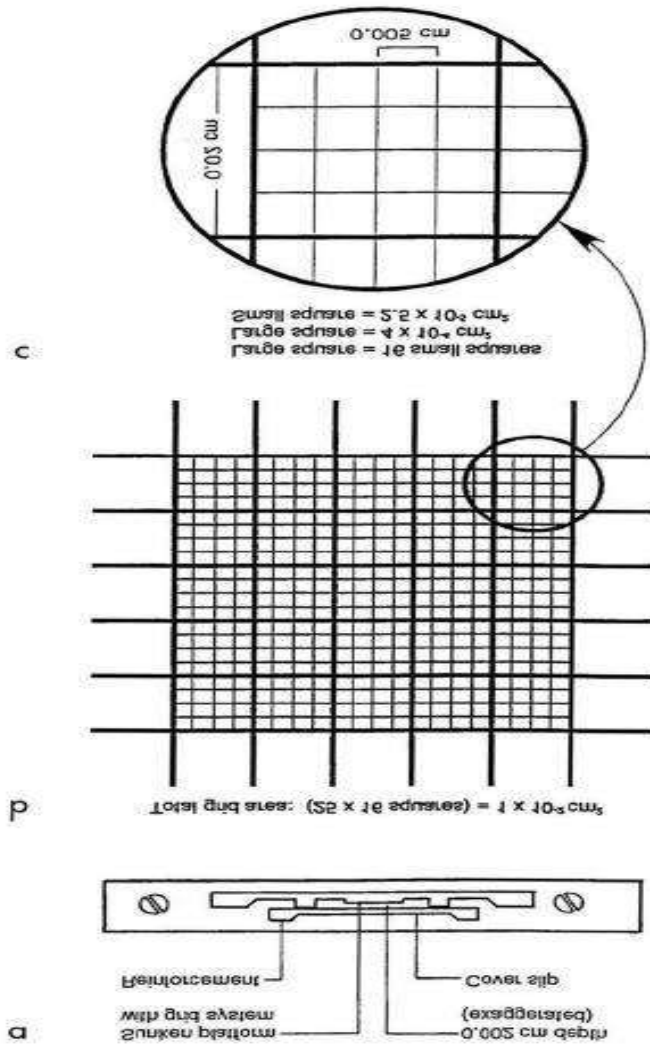
Medio Mineral 9M modificado

Compuestos	Medio 9M (g/L)	Medio 9M modificado (g/L)
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	12,8	6,4
KH ₂ PO ₄	3	3
NaCl	0,5	0,5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5	0,1
CaCl ₂	0,1	0,01
Acetato de sodio	0,2% (p / v)	0,4% (p / v)
TRAZAS 1% (v / v)	g/L	g/L
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,05	0,05
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,05	0,05
CuCl ₂ ·2H ₂ O	0,005	0,005
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,005	0,005
Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O	0,002	0,002
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,0003	0,0003
Cianuro de Sodio (mg/L)	200	200
pH	10,5 ± 0,5	10,5 ± 0,5

Nota. Elaboración propia.

Anexo 2

Recuento de bacterias en cámara Petroff Hausser



Nota. El recuento se realizó en 5 cuadrados (la de los extremos y la central), y con las fórmulas correspondientes.

$$N = (X_5) (25) (50) (103) \text{ bacterias/ml}$$

Donde: X_5 = promedio del recuento

Anexo 3

Pasivos ambientales en la Ex Unidad Minera Chulluncane



Nota. Elaboración propia.

Anexo 4

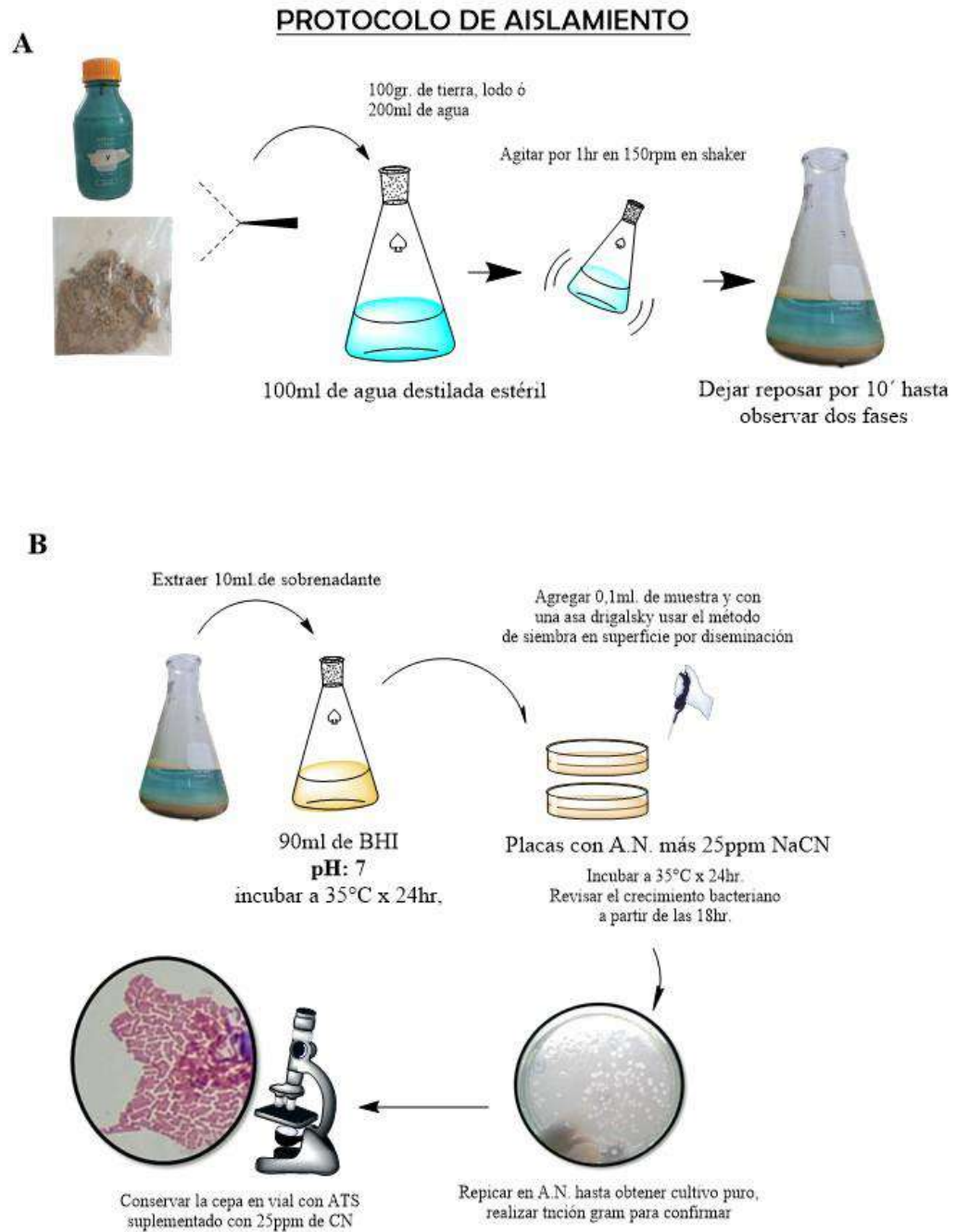
Etapa de pre enriquecimiento de las muestras de suelo



Nota. Elaboración propia.

Anexo 5

Aislamiento microbiano de muestras de suelo y fango

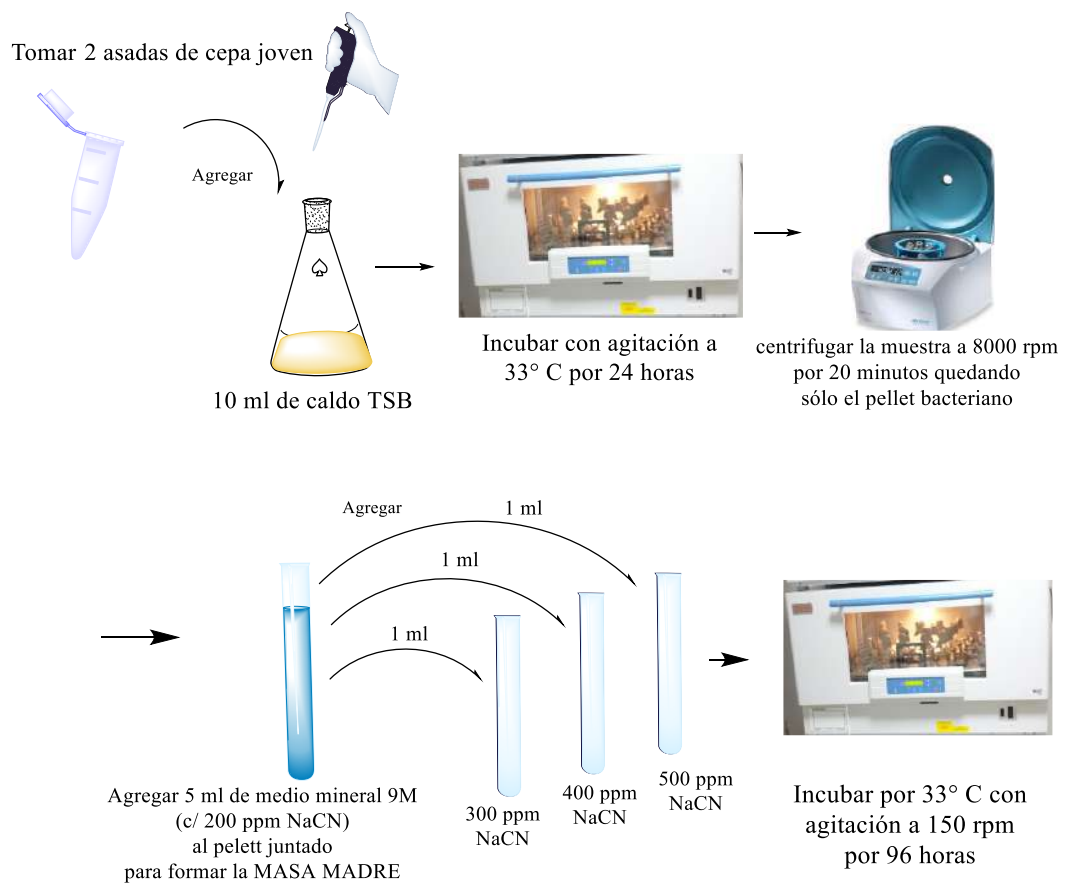


Nota. Elaboración propia.

Anexo 6

Protocolo para tolerancia al cianuro por la bacteria

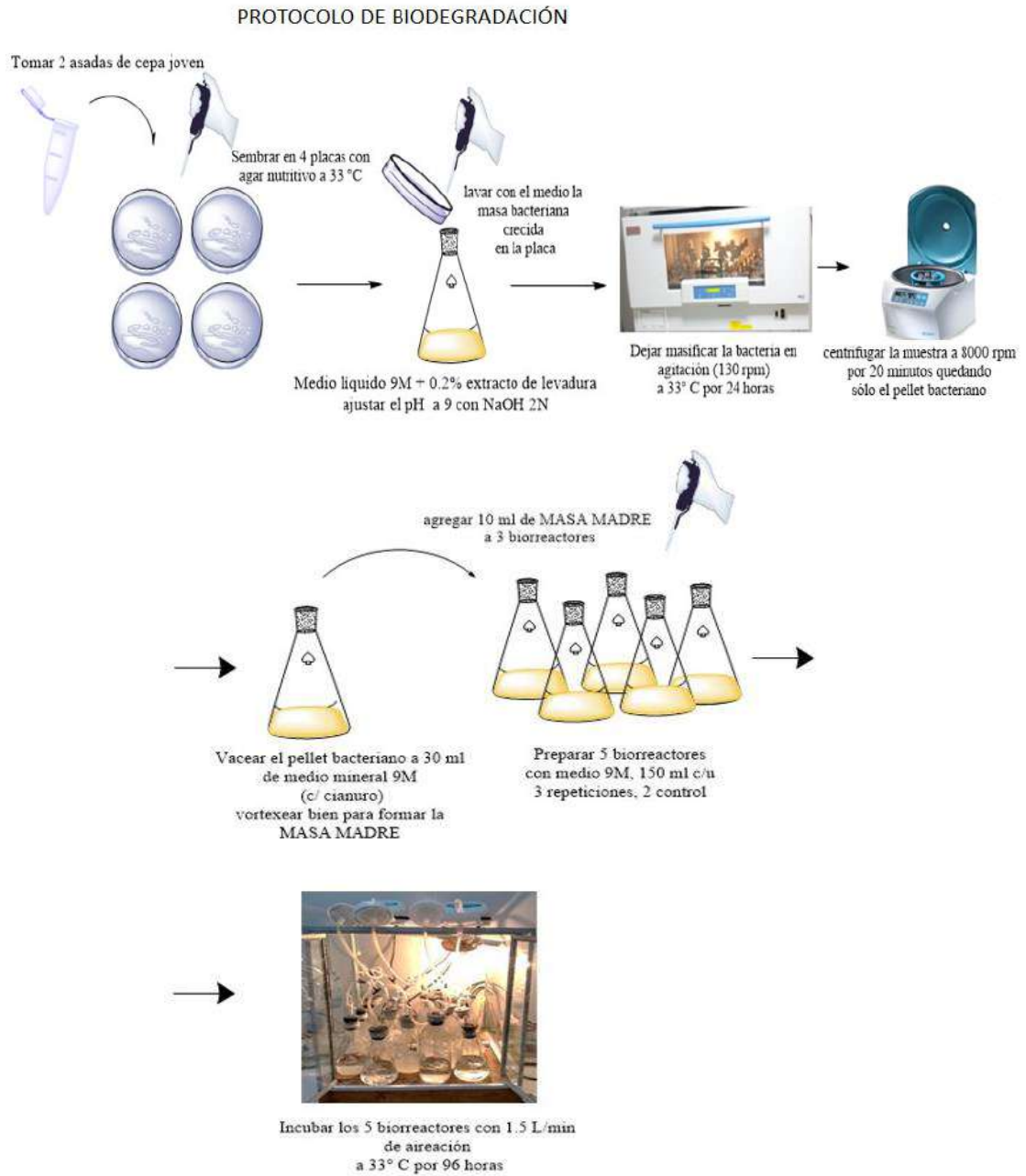
PROTOCOLO PARA TOLERANCIA AL CIANURO



Nota. Elaboración propia.

Anexo 7

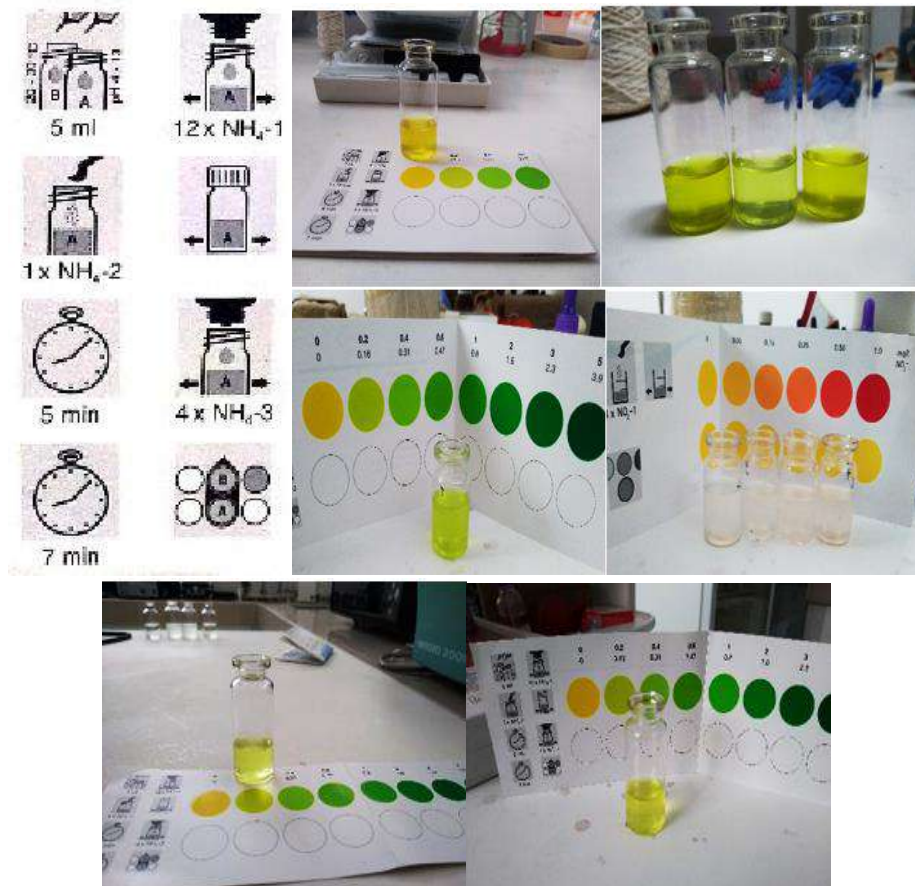
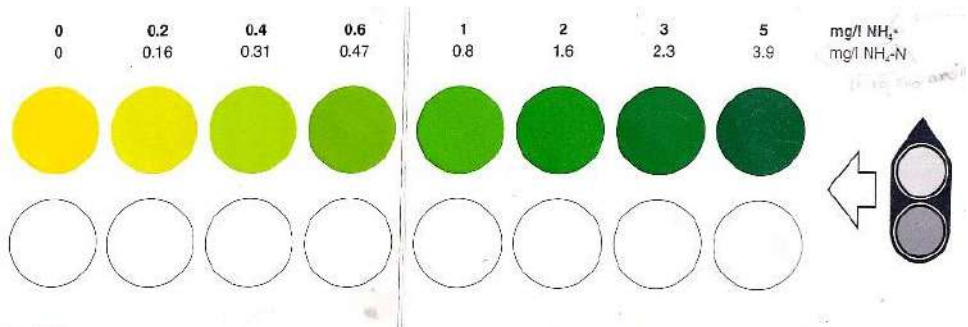
Protocolo de biodegradación



Nota. Elaboración propia.

Anexo 8

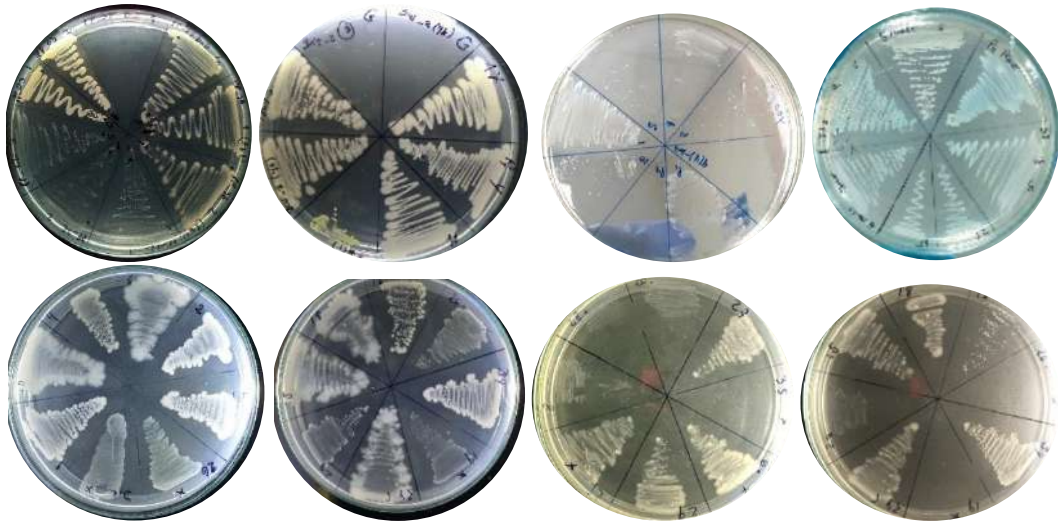
Medición de amonio con reactivo



Nota. Elaboración propia.

Anexo 9

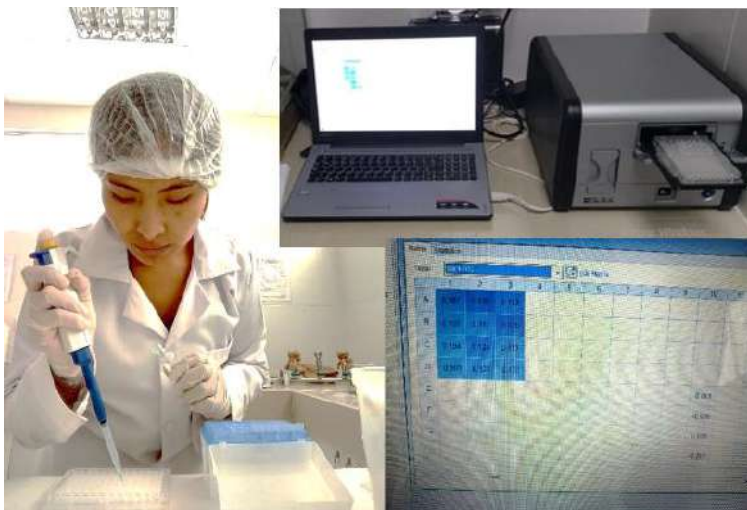
Tolerancia al cianuro 50 y 200ppm en Agar Nutritivo



Nota. Elaboración propia.

Anexo 10

Lectura en el Espectrofotómetro



Nota. Elaboración propia.

Anexo 11

Pruebas bioquímicas



Nota. Elaboración propia.

Anexo 13

Formato para el llenado del proceso de degradación

Tiempo	Temperatura °C	Repeticiones	pH inicial	Gasto de Titulación con AgNO ₃ (ml)	CN		[] microbiana	
					(Titulación / AgNO ₃) Fin (ppm)	Remoción de cianuro DE (%) = [(Ic-Rc)/Ic]*100	Abs. (600 nm)	(y = 1E+09x - 5E+06)
0	30°C	R1	10.5	10.1	202	0	0.2126	207600000
		R2	10.5	10.1	202	0	0.2126	207600000
		R3	10.5	10.1	202	0	0.2126	207600000
		Control 1	10.5	10.1	202	0		
		Control 2	10.5	10.1	202	0		
3	30°C	R1	10.5	6.9	138	31.7	0.2227	217700000
		R2	10.5	6.7	134	33.6	0.2264	221400000
		R3	10.5	6.7	134	33.6	0.2248	219800000
		Control 1	10.5	8.2	200	18.8		
		Control 2	10.5	8.5	200	15.8		
6	30°C	R1	10.5	4.5	90	55.4	0.2433	238300000
		R2	10.5	4.2	84	58.4	0.2541	249100000
		R3	10.5	4.2	84	58.4	0.2505	245500000
		Control 1	10.5	6.8	190	32.7		
		Control 2	10.5	7.2	185	28.7		
12	30°C	R1	10.5	3	60	70.3	0.245	240000000
		R2	10.5	2.9	58	71.3	0.255	250000000
		R3	10.5	2.4	48	76.2	0.26	255000000
		Control 1	10.5	5.6	187	44.5		
		Control 2	10.5	5.9	183	41.6		
18	30°C	R1	10.5	1.3	26	87.1	0.2505	245500000
		R2	10.5	1	20	90.1	0.2572	252200000
		R3	10.5	0.8	16	92.1	0.2682	263200000
		Control 1	10.5	4.7	184	53.4		
		Control 2	10.5	4.9	181	51.5		
24	30°C	R1	10.5	1	20	90.1	0.2539	248900000
		R2	10.5	0.8	16	92.1	0.2585	253500000
		R3	10.5	0.6	12	94.1	0.2695	264500000
		Control 1	10.5	4	181	60.4		

		Control 2	10.5	3.5	177	65.3	
		R1	10.5	0.9	18	91.1	0.255
		R2	10.5	0.7	14	93.1	0.259
		R3	10.5	0.5	10	95	0.27
30	30°C	Control 1	10.5	3.8	175	62.4	
		Control 2	10.5	3	174	70.3	

Nota. Elaboración propia.



Bach. Gisela July Maraza Choque
TESISTA



Dr. César Julio Cáceda Quiroz
ASESOR