

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS CAPACES DE
DEGRADAR CIANURO PRESENTES EN TANQUES DE ALMACENAMIENTO
DE CIANURO EN UNA MINA DE ORO DEL MUNICIPIO DE BUENOS AIRES
CAUCA**

Sara Eugenia Rodallega Nazarit

**Universidad Icesi
Facultad de Ciencias Naturales
Química Farmacéutica
Santiago de Cali
2015**

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS CAPACES DE
DEGRADAR CIANURO PRESENTES EN TANQUES DE ALMACENAMIENTO
DE CIANURO EN UNA MINA DE ORO DEL MUNICIPIO DE BUENOS AIRES
CAUCA**

Sara Eugenia Rodallega Nazarit

**Trabajo de grado para optar al título de pregrado en QUÍMICA
FARMACÉUTICA**

**Tutor del proyecto de investigación:
Dr. Aram Joel Panay Escobar**

**Universidad Icesi
Facultad de Ciencias Naturales
Química Farmacéutica
Santiago de Cali
2015**



APROBADO

(Nombre correspondiente)
Evaluador

(Nombre correspondiente)
Evaluador

(Nombre correspondiente)
Director del Proyecto

(Nombre correspondiente)
Co- Director del Proyecto

AGRADECIMIENTOS

Al finalizar este trabajo de investigación, quiero agradecer a Dios por haberme permitido tener un año más de vida y darme la capacidad física e intelectual para desarrollar este proyecto académico.

A mi familia por apoyarme en cada meta que me propongo y brindarme la oportunidad de recibir una formación académica.

A mi director de proyecto Aram Joel Panay, por haberme brindado su conocimiento y apoyo, y en especial a la investigadora Catalina Mosquera porque su apoyo y colaboración fue una gran ayuda para culminar con éxito este trabajo.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN DEL PROYECTO.....	10
1. INTRODUCCION.....	11
2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO.....	12
2.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	12
2.2 MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE.....	15
2.3 OBJETIVOS.....	23
Generales.....	23
Específicos.....	23
2.4 METODOLOGÍA.....	24
Recolección de muestras.....	24
Aislamiento y selección.....	25
Determinación del crecimiento microbiano.....	25
Preservación de las muestras	25
Verificación de la capacidad degradadora de cianuro.....	26
Cuantificación de degradación de cianuro.....	26
Identificación bacteriano.....	27
2.5 RESULTADOS.....	29
Crecimiento bacteriano.....	29
Evaluación de la tolerancia a cianuro.....	29
Cuantificación de degradación de cianuro.....	30
Identificación de bacterias.....	35
2.6 DISCUSION.....	37
2.7 CONCLUSIONES.....	41
2.8 RECOMENDACIONES.....	42
3.11 BIBLIOGRAFIA.....	43
ANEXOS.....	46

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Rutas de degradación de cianuro por parte de bacterias y hongos.....	18
Tabla 2. Resultados de la Cuantificación de la degradación de cianuro.....	34
Tabla 3. Identificación fenotípica de la bacteria aislada en medio selectivo.....	35
Tabla 4. Resultado de la caracterización bioquímica de la bacteria #1 con la prueba API 20 E.....	36

LISTA DE GRAFICAS

	Página
Grafica 1. Comparación del número de UFC/mL en cada protocolo de crecimiento. ME: medio enriquecido, MS: medio.....	29
Grafica 2. Evaluación del crecimiento bacteriano a cuatro concentraciones de KCN	30
Grafica 3. Variación de la concentración de cianuro de potasio (48.2 ppm) en la muestra y en el control, durante 7 días de estudio.....	31
Grafica 4. Evaluación del crecimiento bacteriano durante 7 días en agar selectivo con una concentración de 50 ppm de KCN	31
Grafica 5. Variación de la concentración de cianuro de potasio (122ppm) en la muestra y en el control, durante 11 días de estudio.....	32
Grafica 6. Evaluación del crecimiento bacteriano durante 11 días en agar selectivo con una concentración de 50 ppm de KCN.....	32

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1. Efectos de la minería ilegal en el cauce y en zonas aledañas al río Teta. Fuente: revista semana.....	13
Figura 2. Minas de oro al norte del Cuaca. Fuente: Periódico El Espectador.....	16
Figura 3. Estructura de valencia del ion cianuro.....	16
Figura 4. a) Canal donde ocurre el reemplazo electroquímico del oro por el zinc; b) tanque de almacenamiento de cianuro de potasio; c) mina de oro en el municipio de Buenos Aires Cauca	24
Figura 5. Resultado de la tinción de Gram de la bacteria #1.....	35
Figura 6. Morfología externa de la bacteria #1.....	35

LISTA DE ANEXOS

	Página
Anexo 1. Resultado de la caracterización bioquímica de la bacteria #1 con la prueba API 20E.....	46
Anexo 2. Curva de calibración con 5 concentraciones de KCN, para determinar la degradación biológica de 48.2 ppm de cianuro de potasio	46
Anexo 3. Curva de calibración con 5 concentraciones de KCN, para determinar la degradación biológica de 122ppm de cianuro de potasio	47

RESUMEN

El conocimiento científico acerca del papel que desempeñan los microorganismos en el tratamiento de agentes contaminantes del medio ambiente como el cianuro, es esencial para controlar los daños que puede ocasionar el uso inadecuado de esta sustancia. En este trabajo, se aisló una cepa bacteriana de un tanque de almacenamiento de cianuro, en una mina de oro en el municipio de Buenos Aires Cauca y posteriormente se estudió su capacidad degradadora de cianuro. Para el aislamiento se empleó un medio selectivo con cianuro de potasio como única fuente de carbono y energía; se logró aislar una cepa bacteriana Gram negativa, que se identificó fenotípicamente como del género *Streptococo*. Su capacidad degradadora se evaluó a escala de laboratorio durante 8 días, empleando un electrodo ion selectivo al cianuro; la cepa presentó un porcentaje de remoción aproximadamente del 30% del cianuro presente en el medio.

Palabras claves: bacterias degradadoras de cianuro, cianuro, minería de oro y biorremediación.

ABSTRACT

The scientific understanding about the role microorganisms play in the treatment of pollution agents such as cyanide is essential to come out with possible ways to control the damages that can be caused by the inappropriate use of this substance. In this work a bacterial strain from a cyanide storage tank was isolated at a gold mine in the city of Buenos Aires Cauca. The bacteria was isolated using, a selective medium with potassium cyanide with only carbon and energy source. The isolated bacteria was a Gram negative bacterial strain, which was identified phenotypically as the genus *Streptococcus*. Its degrading capacity was evaluated on a laboratory scale for 8 days using a cyanide ion selective electrode; the strain showed a percentage removal of about 30% of the initial cyanide present in the media.

Keywords: cyanide degrading bacteria, cyanide, gold mining and bioremediation.

1. INTRODUCCION

La minería de oro es una actividad que tiene una alta incidencia en la contaminación ambiental, puesto que hace uso de sustancias químicas como el cianuro. Cuando la práctica minera se contextualiza en el panorama de la clandestinidad, el efecto negativo que se genera en el medio ambiente puede ser mucho más alto, puesto que no se hace un tratamiento adecuado para desactivar el cianuro, es decir transformarlo en compuestos menos tóxicos.

El cianuro, es una sustancia ampliamente utilizada a nivel industrial; este compuesto se caracteriza por ser muy tóxico para los seres vivos, ya que actúa rápidamente sobre el sistema respiratorio impidiendo el uso de oxígeno mediante la inhibición de la enzima citocromo oxidasa (Guerrero, 2010). Comercialmente el cianuro se presenta como cianuro de hidrógeno (HCN), cianuro de sodio (NaCN) o cianuro de potasio (KCN). El cianuro de sodio es un reactivo químico que disuelve el oro en agua, con lo cual se ve favorecida su posterior separación de otros metales (Garcés et al., 2006)

La biorremediación es una técnica empleada para eliminar contaminantes ambientales, ya que hace uso de microorganismos y plantas que tienen la capacidad de degradar compuestos químicos y transformarlos en otros menos tóxicos para el medio ambiente. Teniendo en cuenta que los microorganismos como bacterias, hongos entre otros, se encuentran en todos los ecosistemas, el mismo foco de contaminación como en el caso de la minera, constituye posiblemente una fuente rica en microorganismos, que presenten la capacidad de degradar las sustancias químicas que se emplean; por ello, se recurre a obtener muestras de agua en tanques de almacenamiento de cianuro en una mina de oro.

Algunos investigadores han realizado estudios con microorganismos y han encontrado diferentes rutas para la degradación de cianuro por parte de bacterias y hongos, conduciendo en la mayoría de los casos a la conversión del cianuro a amonio como producto final (Castillo, 2005); esto permite tener herramientas de base, orientadas a que el panorama de investigación sea menos complejo.

El presente estudio permitió la caracterización de una cepa bacteriana, utilizando medios de cultivos enriquecidos y selectivos que proporcionó al microorganismo una fuente de carbono y de nitrógeno; y finalmente para poder evaluar la capacidad degradadora de cianuro se hace necesario el empleo de un electrodo selectivo al compuesto y un correcto tratamiento de los datos obtenidos. Los resultados obtenidos permitirán tener una base, para futuros estudios de biorremediación donde se empleen bacterias con capacidad de degradar cianuro.

2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

2.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La extracción de oro juega un papel importante en Colombia, puesto que representa una de las mayores fuentes de ingreso económico para el país. En un artículo de la contraloría se menciona que la minería pasó a convertirse en una actividad de gran importancia en la economía nacional en la medida en que los mercados internacionales, en particular de oro y carbón, se tornaron muy atractivos por demanda y precio (Procuraduría General de la Nación, 2014). La importancia dada a la minería es tan significativa, que el Plan Nacional de Desarrollo 2010 – 2014 - “Prosperidad para todos” – la identifica como una de las Locomotoras de crecimiento, proyectando para el año 2014 una producción 72 toneladas/año de oro y 124 Millones de toneladas/año de carbón (Torres et al., 2013). Según la Unidad de Planeación Minero Energética (Unidad de Planeación Minero Energética, UPME, 2005), la industria minera es uno de los sectores más dinámicos en la economía colombiana y representa la segunda actividad con mayor crecimiento, con un 7.12% en 2005 del PIB, sus exportaciones crecieron a un ritmo de 23.01% y representaron 19.84% de las exportaciones totales del país (Lachaud & Maldonado, 2011) .

La práctica minera se contextualiza desde dos panoramas: el primero en donde la actividad minera es formal y a gran escala; y el segundo en donde la minería parece ser a menor escala pero surge desde la informalidad (Suárez, 2011). Debido a la finalidad de este proyecto, este último panorama es el que compete analizar, puesto que esta práctica desde la clandestinidad puede tener un grande impacto negativo en el medio ambiente. Debido a que se desaprovechan abiertamente los recursos naturales no renovables, se afecta de manera sensible fauna, flora, aire, agua y suelo, genera sobre costos en el uso de recursos imprescindibles para la vida y genera pasivos ambientales (Torres et al., 2013)

A menudo las minas de oro ilegal o artesanal emplean grandes cantidades de cianuro para separar el oro de otros metales presentes, pero el subproducto de este proceso - el ion cianuro- es arrojado a las fuentes acuíferas donde se constituye en un potente problema de contaminación ambiental. Es debido a esta situación que se hace necesario buscar estrategias de biorremediación que ayuden a minimizar el impacto negativo que esta práctica causa en el medio ambiente; en la medida en que se producen grandes cantidades de cianuro cada año, se hace necesario el uso de varios métodos fisicoquímicos para degradar este compuesto. Sin embargo, la mayoría de estos procedimientos son costosos, pueden producir alteraciones en los suelos y Los fluidos de extracción pueden aumentar la movilidad de los contaminantes (Luque & cols., 2007).

De este modo, los métodos biológicos alternativos para eliminar el exceso de cianuro en el ambiente están siendo diseñados bajo la base de la diversidad metabólica de las bacterias y hongos, los cuales se adaptan a condiciones

extremas de crecimiento (Luque & cols., 2007). Por lo tanto, el aislamiento y la identificación de bacterias en muestras de aguas procedentes de zonas mineras, es una estrategia que podría ser viable para encontrar organismos eficaces en la biorremediación de cianuro. El cianuro, por ser un compuesto natural, puede ser biodegradable. A pesar de que es un inhibidor metabólico, se han aislado organismos capaces de utilizarlo como fuente de nitrógeno. Por este motivo para la eliminación del cianuro se pueden emplear desde los lodos activados hasta enzimas puras, dependiendo de la complejidad y variabilidad del efluente a tratar (Castillo, 2005).

En los alrededores del río Teta, en el municipio de Buenos Aires Cauca, desde hace varios años existe presencia de actividad minera, y por lo que se puede divisar al recorrer sus alrededores ha causado un impacto negativo y de gran magnitud en la flora y fauna de la zona (ver figura 1). En recorridos realizados por las defensorías delegadas para los indígenas y las minorías étnicas, para los derechos colectivos y del ambiente en el departamento del Cauca, se evidencio la destrucción que sufren los ríos Ovejas, Teta y Quinamayó, cuyo cauce ha sido desviado y sus aguas profundamente contaminadas por la remoción de tierras, la formación de montañas con material estéril y el vertimiento de sustancias químicas para el proceso de separación y recolección del oro (Periódico Proclama, 09 mayo de 2015). Se espera que las posibles bacterias encontradas en las muestras, presenten la capacidad de incorporar el nitrógeno y el carbono provenientes del cianuro a sus rutas metabólicas, lo cual sería un indicativo de que pueden degradar el compuesto.



Figura 1. Efectos de la minería ilegal en el cauce y en zonas aledañas al río Teta. Fuente: revista semana, 29/01/2015.

En este trabajo se pretende dar respuesta a la siguiente pregunta de investigación:
¿Existen bacterias con capacidad de degradar cianuro en una mina de oro en el municipio de Buenos Aires Cauca?

2.2 MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

Colombia es un país que se caracteriza por presentar una alta riqueza de sustancias de explotación minera a lo largo de todo el territorio nacional, entre las que se pueden encontrar un gran porcentaje de minerales: oro, carbón, platino, níquel entre otros. Debido a la riqueza del subsuelo la minería en Colombia durante del siglo XX tuvo un alto crecimiento, pero a partir de esa época la minería tradicional, como fuente de ingresos y de empleo, ha venido creciendo en el país sin control alguno. Hoy por hoy, en Colombia la minería ilegal de oro se encuentra como una actividad altamente demandada, lo cual se logra evidenciar en un gran porcentaje de la población y en el impacto ambiental que causa (Procuraduría general de la nación, 2011). Por tal motivo, como se plantea en un artículo de la Universidad Militar Nueva Granda “No se puede llegar a pensar que la minería ilegal solo impacta en términos legales, puesto que tiene amplísimas consecuencias en sectores ambientales, económicos, de legitimidad Estatal y de seguridad” (Montero, 2012). Todo este fenómeno se puede ilustrar en el caso particular del río Dagua en el departamento del Valle del Cauca, donde la minería ilegal de oro ha dejado erosión y socavación de sus márgenes, por construcción de las fosas, así como la pérdida de cobertura vegetal protectora. La contaminación del río con productos químicos como el mercurio y el cianuro utilizados en la extracción del oro disminuyó la potabilización del agua para el consumo humano, restringiendo el derecho fundamental al agua potable de las personas de la zona y causó un impacto catastrófico e irreversible en el medio ambiente y, por ende, en la diversidad biológica (Torres et al., 2013).

La verdadera problemática con respecto a la actividad minera en Colombia, surge a raíz del poco control gubernamental en la mayoría de los casos para la extracción del oro: se permite que se empleen sustancias altamente tóxicas para el medio ambiente como el cianuro; y además se entregan muchos títulos sin algún criterio formalmente definido. Un periodista del periódico El Espectador dice que Cifras de Catastro y Registro minero señalan que de los títulos otorgados en Colombia, el 43% es para la explotación de oro y el 25% para carbón. Estos dos materiales terminan en países extranjeros: el 99% del oro extraído es para exportación y lo mismo sucede con el 95% del carbón. Para la Contraloría, además de representar fuertes daños ambientales, se trata de un modelo que no genera encadenamientos productivos y no dinamiza directamente la economía (Calle, 2013). También se puede asociar a esta problemática la falta de oportunidades laborales y el hecho de que la minería ilegal ha venido nutriendo de dinero las arcas de organizaciones criminales, incluyendo grupos guerrilleros y bandas de delincuentes a lo largo y ancho del país (Revista Semana, 01 de abril de 2015).

Uno de los departamentos con una alta incidencia de actividad minera en estos momentos es el Cauca, en donde la explotación de oro de forma ilegal alcanza un porcentaje mucho mayor respecto a la forma legal, dejando un alto impacto

negativo en el medio ambiente. En el caso particular del municipio de Buenos Aires, ubicado al norte del departamento, esta actividad se lleva a cabo constantemente y en una gran parte del territorio, y a raíz de eso se evidencia como algunos ríos, especialmente el río Teta, se han deteriorado porque la mayoría de minas de oro están en zonas aledañas a esta fuente hídrica como se observa a continuación.

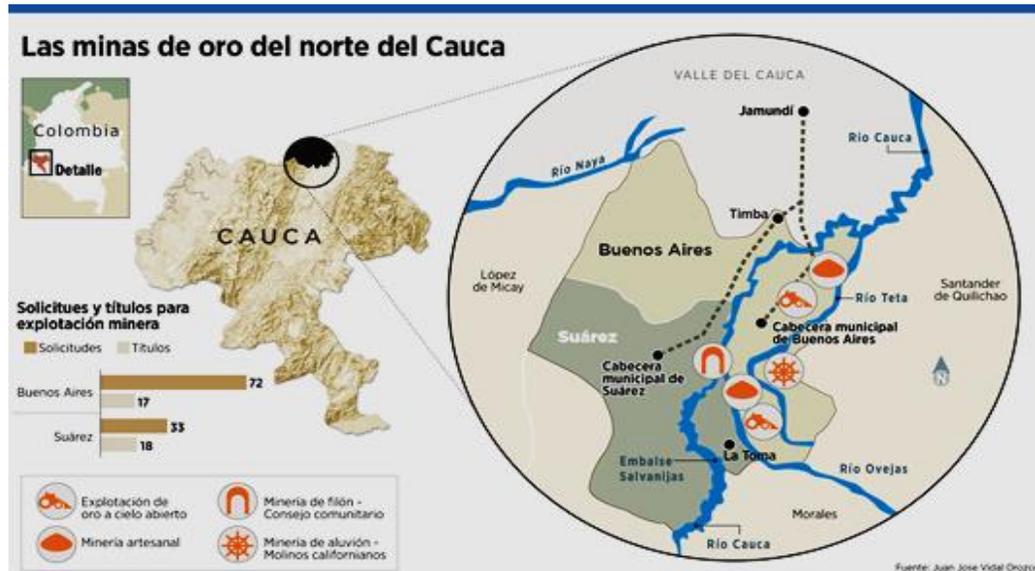


Figura 2. Minas de oro al norte del Cauca. Fuente: Periódico El Espectador (2012).

Cianuro y Biorremediación

La industria minera, en particular la industria minera del oro, ha estado utilizando el cianuro en sus procesos productivos durante muchas décadas. Aunque el cianuro es una sustancia muy tóxica, en realidad es una sustancia química ampliamente utilizada, esencial para el mundo moderno. La clave para su uso seguro es la implementación de sólidas prácticas de manejo, pero esto no es algo que se realice a menudo.



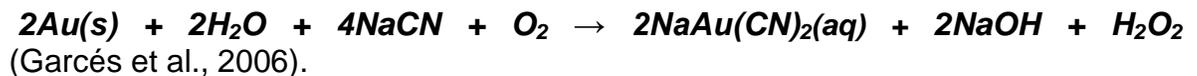
Figura 3. Estructura de valencia del ion cianuro

El ion cianuro como se puede observar en su estructura, se caracteriza por la presencia de la unidad química formada por el enlace carbono nitrógeno, y es potencialmente letal ya que actúa rápidamente sobre el sistema respiratorio, impidiendo el uso del oxígeno mediante la inhibición de la acción de las enzimas respiratorias. Una vez que se encuentra en el torrente sanguíneo, el cianuro forma un complejo estable con la citocromo oxidasa, una enzima que promueve el

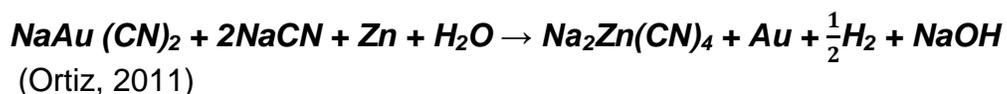
traspaso de electrones a las mitocondrias de las células durante la síntesis de adenosin trifosfato (ATP). Si la citocromo oxidasa no funciona correctamente las células no consiguen aprovechar el oxígeno del torrente sanguíneo, lo que causa hipoxia citotóxica o asfixia celular. La falta de oxígeno provoca que el metabolismo cambie de aerobio a anaerobio, lo que conlleva a la acumulación de lactato en la sangre. El efecto conjunto de la hipoxia y la acidosis láctica provoca una depresión en el sistema nervioso central que causa paro respiratorio y resulta mortal (Guerrero, 2010).

Además del hombre, los animales se ven afectados por los efectos del cianuro, por ejemplo las aves migratorias y acuáticas que llegan a pozos con altos contenidos de cianuro; pero el componente más vulnerable del ecosistema a los impactos adversos de una exposición al cianuro lo constituye la vida acuática. Los organismos acuáticos son más sensibles a los efectos tóxicos de este reactivo, y físicamente no es posible evitar su ingreso a los cuerpos de agua (Guerrero, 2010).

Básicamente el cianuro se presenta como cianuro de hidrogeno (HCN), cianuro de sodio (NaCN) o cianuro de potasio (KCN). El cianuro de sodio es un reactivo químico que disuelve el oro en agua, con lo cual se ve favorecida su posterior separación de otros metales a través de la siguiente reacción:



Para recuperar el oro del complejo formado con el cianuro de sodio, se hace uso del principio de la precipitación empleando polvo de zinc, lo cual está basado en el hecho de que el oro es electronegativo respecto al zinc, ocurriendo un reemplazo electroquímico del oro por el zinc, seguido por el desplazamiento del hidrógeno del agua por el sodio según la siguiente reacción:



Suarez plantea que: “Sin lugar a dudas, hoy en día, la minería es la actividad de origen antrópico que mayor impacto está causando sobre los recursos naturales del país” (Suárez, 2011). Esto es realmente cierto, pues es una de las principales actividades económicas en Colombia y se puede poner en práctica con mucha facilidad, porque en muchos de los lugares en donde ocurre no existe un control fuerte del gobierno para mitigar el impacto ambiental que se causa en la naturaleza.

Existen en la actualidad estrategias para disminuir los efectos tóxicos de muchas sustancias en la naturaleza, como el empleo de sustancias químicas, la biorremediación entre otras. Esta última es una técnica que puede llegar a ser eficaz, eficiente y segura. Esta tecnología utiliza el potencial metabólico,

fundamentalmente de bacterias, para transformar contaminantes orgánicos en compuestos más simples poco o nada contaminantes porque utilizan la sustancia en particular como fuente de carbono y energía necesarios para sus funciones metabólicas y crecimiento (Garcés et al., 2006).

Garcés plantea, en su artículo sobre “Aislamiento de consorcio de microorganismos degradadores de cianuro”, que el ion cianuro puede ser metabolizado por organismos tales como hongos y bacterias, que lo emplean como fuente de carbono y nitrógeno. Por ejemplo, *Bacillus ipeeaterium* transforma cianuro de potasio en ácido aspártico, asparagina y el dióxido de carbono libre o unido al cianuro en carbonato y amoníaco, *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT534, bajo condiciones alcalinas, consumen el cianuro y lo transforman en amoníaco y *Fusarium solani* IHEM 8026 degrada el cianuro de potasio a ácido fórmico (Garcés et al., 2006).

En un trabajo de investigación titulado “Aislamiento e identificación de bacterias capaces de degradar cianuro presentes en muestras obtenidas del proceso de extracción de almidón de yuca”, se plantea que los microorganismos que tienen la capacidad de degradar cianuro no presentan envenenamiento sujeto a la sustancia, puesto que algunos de ellos cuentan con rutas alternativas para la producción de ATP y otros poseen una oxidasa diferente a la citocromo C oxidasa (enzima inhibida directamente por el cianuro). Sin embargo, en mamíferos, el cianuro es un inhibidor enzimático que bloquea la producción de ATP (Adenosín Trifosfato) induciendo a la hipoxia celular (J.N Siedow, 1995).

Todos los organismos cianógenos y algunos no cianógenos, han desarrollado mecanismos de resistencia frente a este tóxico, esto se debe a la síntesis de una oxidasa alternativa insensible a cianuro y la inducción de un potente sistema de adquisición de metales. Aunque se han descrito varias rutas de degradación de cianuro, la mayoría tienen en común la conversión de éste a amonio como producto final. Las diferentes rutas para la degradación de cianuro por parte de bacterias y hongos se resumen en la siguiente tabla (Castillo, 2005).

Tabla 1. Rutas de degradación de cianuro

Enzimas	Origen microbiano
Cianuro monooxigenasa $\text{HCN} + \text{O}_2 + \text{H}^+ + \text{NADPH} \rightarrow \text{HO CN} + \text{NADP}^+ + \text{H}_2\text{O}$	<i>Pseudomonas sp.</i>
Cianasa $\text{HO CN} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CO}_2 + \text{NH}_3$	<i>Escherichia coli</i> , <i>Rhodococcus rhodochrous</i>

Cianuro dioxigenasa	<i>Pseudomonas fluorescens,</i> <i>Pseudomonas cereus,</i> <i>Bacillus pumillus</i>
$\text{HCN} + \text{O}_2 + \text{H}^+ + \text{NADPH} \rightarrow \text{CO}_2 + \text{NH}_3 + \text{NADP}^+$	
Cianuro hidratasa	
$\text{HCN} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HCONH}_2$	Hongos patógenos
Nitrilo hidratasa	<i>Pseudomonas,</i> <i>Brevibacterium</i>
$\text{R-CN} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{RCONH}_2$	
Cianidasa	<i>Alcaligenes xylosooxidans</i>
$\text{HCN} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HCO}_2\text{H} + \text{NH}_3$	
Nitrilasa	<i>Klebsiella,</i> <i>Pseudomonas, Nocardia</i>
$\text{R-CN} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{RCO}_2\text{H} + \text{NH}_3$	
Rodanasa	<i>Thiobacillus denitrificans,</i> <i>Bacillus subtilis, Bacillus stearothermophilus</i>
$\text{HCN} + \text{S}^{2-} \rightarrow \text{SO}_3^{2-} + \text{HSCN}$	
Cianoalanina sintetasa	
$\text{CyS} + \text{HCN} \rightarrow \beta\text{-cianoalanina} + \text{HS}^-$	<i>Bacillus magaterium</i>

A partir de esta tabla, se puede evidenciar que son diversos los mecanismos empleados para utilizar o romper la molécula de cianuro. Uno de los mecanismos involucra a la enzima cianuro hidratasa, que resulta en la conversión irreversible del cianuro en formamida, que finalmente es transformada en CO_2 y NH_3 . El cianuro también puede ser convertido en -cianoalanina o en un - aminonitrilo por la -cianoalanina sintetasa, seguida de la hidrólisis de los productos para liberar un ácido y NH_3 . Una tercera ruta, involucra la utilización de la cianuro monoxigenasa para catalizar la conversión de HCN en cianato (HOCN), lo que lleva a una descomposición catalítica mediada por otra enzima, cianasa para producir CO_2 y NH_3 . La cianasa es inducible con el cianato, mientras que la enzima cianuro monoxigenasa no lo es. Algunas cepas bacterianas transforman directamente cianuro en CO_2 y NH_3 por medio de la cianuro dioxigenasa, pero sin la formación de cianato como intermediario (Guerrero, 2010). Se puede observar en la tabla 1, que la cianidasa resulta especialmente interesante, ya que no necesita cofactores y produce directamente amoníaco y ácido fórmico, utilizando cianuro y agua como únicos sustratos (Castillo, 2005).

Como todo proceso tecnológico la biorremediación tiene ventajas y desventajas, lo cual dependerá de que tan factible puede ser aplicarla en condiciones de campo y que tan respetuosa es con el entorno natural en el que tiene que desarrollarse. Por ello cuando se logra aislar y caracterizar organismos con capacidad de degradar

contaminantes ambientales el paso a seguir es evaluar cómo se va implementar la técnica, ya que teniendo en cuenta el movimiento o no de la matriz contaminada, las técnicas de biorremediación pueden dividirse en dos: in situ y ex situ. En la primera, los suelos y las aguas contaminadas son tratados en el propio lugar de la contaminación sin transformación. En la segunda, implica la excavación o traslado de los suelos contaminados; y en el caso de las aguas, significa el bombeo-tratamiento-recarga o traslado a reactores. La selección de la técnica depende de tres principios básicos: la bioquímica, que es la posibilidad de que el contaminante sea transformado biológicamente; la biodisponibilidad, que es la accesibilidad del microorganismo al contaminante; y la bioactividad, que es la oportunidad de optimizar la actividad biológica (Barrios, 2011).

La biorremediación de aguas se efectúa en algunos casos mediante el bombeo-tratamiento-recarga que consiste en extraer el agua, promover la biodegradación de los contaminantes en reactores y posteriormente devolverla al acuífero, o bien, inyectar nutrientes y bacterias. De manera que se establece una recirculación y el sitio mismo se convierte en un biorreactor (Barrios, 2011). En el caso particular del uso de bacterias para eliminar las sustancias químicas dañinas, el suelo y el agua debe tener la temperatura, los nutrientes y la cantidad de oxígeno apropiados. Esas condiciones permiten que las bacterias crezcan y se multipliquen, y asimilen más sustancias químicas. Cuando las condiciones no son las adecuadas, las bacterias crecen muy despacio o mueren, o incluso pueden crear sustancias químicas más dañinas. Una vez que se han eliminado las sustancias químicas dañinas, las bacterias ya no tienen sustrato disponible y mueren. (Higuera & Oyarzun, 2011)

Las metodologías tradicionalmente utilizadas para el estudio de los procesos de biorremediación consistían en la utilización de métodos microbiológicos convencionales para la obtención de consorcios con capacidad de degradar contaminantes. Sin embargo, desde hace tiempo se ha puesto de manifiesto la necesidad de utilizar métodos que no requieran un paso previo de cultivo, dado que una gran parte de los microorganismos presentes en los ambientes naturales no pueden crecer en medios de cultivo sintéticos (Martínez & Gaju, 2005). Actualmente existe una tecnología muy eficiente para la biorremediación de efluentes que consiste en el uso de tapetes microbianos, teniendo como ventaja primero que resulta de bajo costo comparada con otras técnicas de biorremediación y segundo es ambientalmente compatible. Con esta herramienta la biorremediación de agua la realizan de manera natural comunidades autótrofas y heterótrofas que forman una biopelícula o tapete microbiano (Jiménez et al., 2015).

Los tapetes microbianos son ecosistemas naturales donde microorganismos pertenecientes a diferentes grupos fisiológicos se agrupan en unos pocos milímetros de espesor. En ellos pueden establecerse complejas comunidades microbianas que se estratifican en profundidad, dependiendo de los abruptos

gradientes de luz, oxígeno, potencial redox que se generan, y de su propia fisiología (Martínez & Gaju, 2005).

La comunidad de microorganismos que constituyen el tapete microbiano es inmovilizada sobre una matriz inerte (no tóxica) de polyester de baja densidad. Esta matriz está conformada por una estructura fibrosa de composición ligera y alta porosidad (con una relación superficie- volumen alta), que facilita la fijación estratificada de los microorganismos (principalmente bacterias, cianobacterias y microalgas) y el paso del agua residual a través del tapete microbiano; esta tecnología, evita el lavado de células del sistema (Jiménez et al., 2015).

Identificación de bacterias y cuantificación de cianuro

Existen diversas técnicas para realizar caracterización de microorganismos como por ejemplo, las pruebas moleculares como la secuenciación del gen 16S rRNA, métodos proteómicos como la espectrometría de masas y métodos fenotípicos de identificación como las pruebas bioquímicas.

En el caso de la identificación de bacterias empleando ARNr 16S, el cual es un polirribonucleotido, codificado por el gen *rrs*, también denominado ADN ribosomal 16S, se puede obtener información filogenética y taxonómica de bacterias a partir de su secuencia. Esta molécula presenta una serie de características, las cuales fundamentan su empleo como herramienta filogenética y taxonómica: primero, porque se trata de una molécula antigua, presente en todas las bacterias actuales; segundo, porque su estructura y función han permanecido constantes durante un tiempo muy prolongado; tercero, porque los cambios ocurren de manera suficientemente lenta, como para aportar información acerca de todos los procariontes y además, porque los ARNr contienen suficiente variabilidad para diferenciar no solo los organismos más lejanos, sino también los más próximos ; cuarto, porque presenta un tamaño (1500nt) lo suficientemente largo para minimizar las fluctuaciones estadísticas (Rodicio & Mendoza, 2004).

Por otra parte, la identificación también se puede realizar empleando pruebas bioquímicas utilizando un equipo VITEK® y mediante espectrometría de masas. Las pruebas bioquímicas permiten determinar las características metabólicas de las bacterias. Algunas de estas pruebas son técnicas rápidas, ya que evalúan la presencia de una enzima preformada y su lectura varía entre unos segundos hasta unas horas. Otras pruebas requieren para su lectura el crecimiento del microorganismo con una incubación previa de 18 a 48h. A este grupo pertenecen la mayoría de las pruebas que detectan componentes metabólicos o aquellas que determinan la sensibilidad de un microorganismo a una sustancia dada tras cultivo en medios de identificación, que contienen el sustrato a metabolizar (Fernández et al., 2010).

En el caso de la espectrometría de masas es una técnica analítica que permite analizar con gran precisión la composición de diferentes elementos químicos, al permitir la medición de iones derivados de moléculas, separándolos en función de su relación masa/carga (m/z). En el espectrómetro de masas se produce la separación de las especies iónicas de la muestra en función de su masa. Una variante de la técnica, es la espectrometría de masas MALDI-TOF, la cual es de gran interés en microbiología en la identificación bacteriana basada en la detección de proteínas ribosómicas S y L. La ventaja de este método es que es capaz de realizar la identificación de bacterias enteras, sin necesidad de largos procedimientos previos como la extracción de proteínas, digestión, purificación, etc (Fernández et al., 2010).

Para medir la concentración del ion cianuro en el medio y poder estimar si las posibles bacterias son capaces de degradar la sustancia, se empleará un electrodo selectivo al ion cianuro, este utiliza una membrana de ion selectivo que permite que únicamente los iones cianuro lo penetren. Además, es un electrodo indicador que necesita trabajar siempre junto a uno de referencia. La ventajas que presenta es que realiza las mediciones de forma simple, rápida y precisa (Crison, 2012).

2.3 OBJETIVOS

Objetivo general

Aislar bacterias capaces de degradar cianuro, presentes en muestras de agua de un tanque de almacenamiento de cianuro, en una mina de oro.

Objetivos específicos

1. Aislar las bacterias capaces de sobrevivir en un medio con cianuro, encontradas en muestras de agua provenientes de tanques de almacenamiento de cianuro en una mina de oro.

Indicador: Bacterias aisladas capaces de crecer en un medio selectivo.

2. Cuantificar la remoción del cianuro por parte de las bacterias aisladas mediante el empleo de un electrodo selectivo al ion cianuro.

Indicador: Concentración de cianuro removido

3. Identificar las bacterias capaces de degradar el cianuro mediante pruebas bioquímicas y espectrometría de masas.

Indicador: Identificación del género de las bacterias aisladas

2.4 METODOLOGÍA

2.4.1 RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

Las muestras fueron tomadas de un canal (punto donde se daba la separación del cianuro unido al oro) que conducía a un tanque de almacenamiento de cianuro en una mina de oro en el municipio de Buenos Aires Cauca (ver figura 4). 50 mL de muestra fueron envasados y conservados en tubos falcón estériles, a temperatura ambiente y posteriormente se trasladaron al laboratorio para su procesamiento antes de que transcurrieran 24 h.



Figura 4. a) Canal donde ocurre el reemplazo electroquímico del oro por el zinc; b) tanque de almacenamiento de cianuro; c) mina de oro en el municipio de Buenos Aires Cuca.

2.4.2 AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE MICROORGANISMOS

En el proceso de aislamiento y selección primaria se emplearon dos protocolos de discriminación, denominados A (crecimiento en medio sólido) y B (pre-crecimiento en medio líquido). En el protocolo A se disolvió 1 mL de muestra en 9 mL de agua destilada y luego se realizaron diluciones en serie hasta 10^{-7} , las cuales se hicieron por triplicado. Posterior a ese proceso se realizó la siembra en placas de 0.1 mL de cada dilución en un medio selectivo que contenía : KH_2PO_4 2,7 g, K_2HPO_4 3,5 g y 10 mL de una solución de sales ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 300 mg, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 180 mg, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 130 mg, CaCl_2 40 mg, ZnSO_4 40 mg y MoO_3 20 mg, en un litro de agua desionizada), agar 18 g y KCN 25 mg/L, en 1 litro de agua desionizada como única fuente de carbono y nitrógeno. Las muestras se incubaron durante 7 días a 30°C .

En el protocolo B se tomó por duplicado 10 mL de muestra y se disolvieron en 90 mL de medio selectivo líquido y en 90 mL de medio enriquecido líquido; las muestras se incubaron a 30°C por 7 días en un shaker con agitación a 180 rpm. El medio enriquecido contenía lo siguiente: KH_2PO_4 , 1,36 g/L; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,5 g/L; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g/L; $\text{CaCl} \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0,01g/L; así como elementos traza: $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ mg/L, 5,0; $\text{MnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 2,5 mg/L; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 2,5 mg/L; Na_2HPO_4 , 2,13mg/L y como fuente de carbono se utilizó Glucosa 10 g/L a un pH de 7,2. Transcurrido los días de incubación se realizaron diluciones en serio hasta 10^{-7} de cada uno de los medios por triplicado, tomando 1 mL de muestra y depositándola en 9 mL de agua destilada; posteriormente se realizó la siembra de 1 mL de cada dilución de medio rico líquido en medio rico sólido y de medio selectivo líquido en medio selectivo sólido. Las muestras se incubaron a 30°C por 7 días.

Determinación del crecimiento bacteriano

Para la determinación de la población microbiana, se realizó un recuento directo en placa, pero sin el uso de un microscopio óptico, puesto que las colonias tenían un tamaño considerable, lo que permitía contarlas a simple vista. El conteo de unidades formadora de colonias (UFC) se llevó a cabo en la dilución 10^{-3} para las muestras del protocolo B y en la dilución 10^{-1} para las muestras del protocolo A.

Preservación de las muestras

Las muestras que correspondían a las diluciones 10^{-1} y 10^{-2} fueron criopreservadas. Para este proceso se adicionó 500 μL de medio enriquecido a las placas y se frotaron con una aza de vidrio en forma de L. Posteriormente se tomaron los 500 μL que ya contenían los microorganismos y se mezclaron en un tubo eppendorf de 1.5 mL con 500 μL de glicerol al 50%; finalmente las muestras se llevaron a la nevera a una temperatura de -80°C .

2.4.3 VERIFICACIÓN DE LA CAPACIDAD DEGRADADORA DE CIANURO

Para verificar la capacidad degradadora de cianuro de las colonias bacterianas, se realizó la evaluación de su crecimiento en placas que contenían KCN como única fuente de carbono y nitrógeno, como se indicó en la etapa de aislamiento y selección.

2.4.4 CUANTIFICACIÓN DE LA DEGRADACIÓN DE CIANURO

Nota : De esta etapa en adelante se trabajó únicamente con la bacteria aislada en el protocolo A- medio selectivo (identificada como bacteria #1), puesto que el consorcio bacteriano del protocolo B se contaminó con hongos.

El medio selectivo empleado en las siguientes etapas es diferente al de la etapa de selección y aislamiento, y presenta los siguientes componentes: 1 L buffer fosfato de sodio 25 Mm pH 8, K_2SO_4 0.17 g/L, $Mg SO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g/L, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,01 g/L, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 5.0 mg/L, $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ 2,5 mg/L, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 2,5 mg /L, $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ 1.3 mg/L, 10 mL de una solución de sulfato de zinc 40 ppm y 50 mL de solución de KCN de 1000 ppm.

Optimización de la concentración de cianuro para el crecimiento bacteriano

Para determinar la máxima concentración de cianuro en la cual la bacteria #1 presenta crecimiento, se tomaron 200 μ L de muestra (crecimiento previo en medio selectivo líquido durante 5 días) y se sembraron en placas con medio sólido selectivo a 4 concentraciones de cianuro, 50 ppm, 100ppm, 250ppm y finalmente 500 ppm.

Preparación de muestras para cuantificación de KCN

Se tomó aproximadamente 50 μ L de la bacteria #1 criopreservada y se depositó en un erlenmeyer estériles de 50 ml, con 50 ml de medio enriquecido, se incubó a 30 °C por 5 días en un shaker con agitación a 180 rpm; transcurrido los 5 días, se observó un alto crecimiento.

Posterior al periodo de incubación, se tomó por triplicado 5 mL de la muestra y se inocularon en erlenmeyers estériles de 50 mL, con 50 mL de medio selectivo; las muestras se taparon con papel parafilm y papel aluminio, para ser llevadas a 30 °C en un shaker con agitación a 180 rpm .Se tomaron 4 controles, de los cuales 3 se ubicaron en el shaker y el otro en una nevera a 2 °C.

Curva de calibración

Se preparó 100 mL de una solución patrón de 1000 ppm de KCN no hidratado en agua destilada y se construyó una curva de calibración con cinco concentraciones (5, 25, 50, 70 y 150 ppm); se empleó como solución matriz los componentes del medio selectivo sin la adición del cianuro.

Cuantificación de CN⁻ usando el electrodo ion selectivo

La biodegradación de cianuro por las cepas bacteriana se estudió en un periodo de 8 días y se dio seguimiento cada dos días empleando un medio cultivo selectivo. Para ello, se realizaron medidas de pH y de ion cianuro, empleando un pH- metro y un electrodo ion selectivo respectivamente. En esta etapa se realizó la lectura de las concentraciones de la curva de calibración partiendo de la más diluida a la más concentrada y seguido la lectura de las muestras, sumergiendo el electrodo en la solución; los datos se obtuvieron en milivoltios y se reportaron cuando se tornaron constantes.

Determinación de la eficiencia de remoción

El porcentaje de eficiencia de remoción se determina así:

$$\%RE = \frac{C_i - C_f}{C_i} * 100$$

Dónde:

C_i: concentración inicial de ion cianuro en ppm (mg/L)

C_f: concentración final de ion cianuro en ppm (mg/L)

2.4.5 IDENTIFICACIÓN MICROBIANA

La cepa de estudio se caracterizó fenotípicamente mediante pruebas morfológicas y bioquímicas.

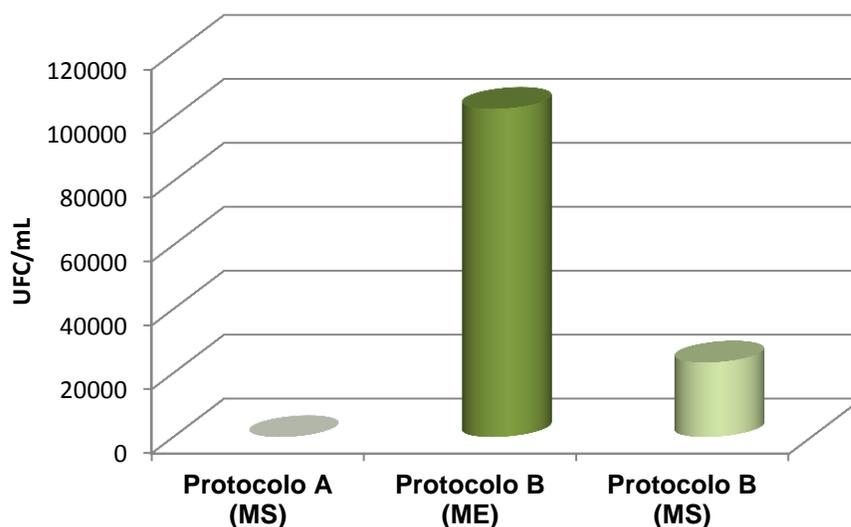
Para la caracterización bioquímica se hizo uso del método API 20E, que consiste en 23 pruebas enfocadas a la identificación de enterobacterias y otros bacilos Gram negativos; para este proceso la muestra se sembró en agar enriquecido y se incubó durante 3 días a 30 °C; posteriormente se llevó a cabo la inoculación de las celdas, que luego fueron llevadas a una incubadora por un periodo de 48 horas a 35 °C. Se determinó la presencia de las siguientes enzimas: *oxidasa*, evaluando la aparición de un color violeta o púrpura al exponer la colonia al reactivo de oxidasa y *catalasa*, evaluando la aparición de burbujas al adicionar al microorganismo peróxido de hidrogeno. Simultáneamente se realizó una tinción de Gram para evaluar si la bacteria objeto de estudio era Gram (-) o Gram (+).

El análisis macroscópico se llevó a cabo mediante el uso de un estereoscopio, donde se definió la forma de la colonia.

2.5 RESULTADOS

Determinación del Crecimiento bacteriano

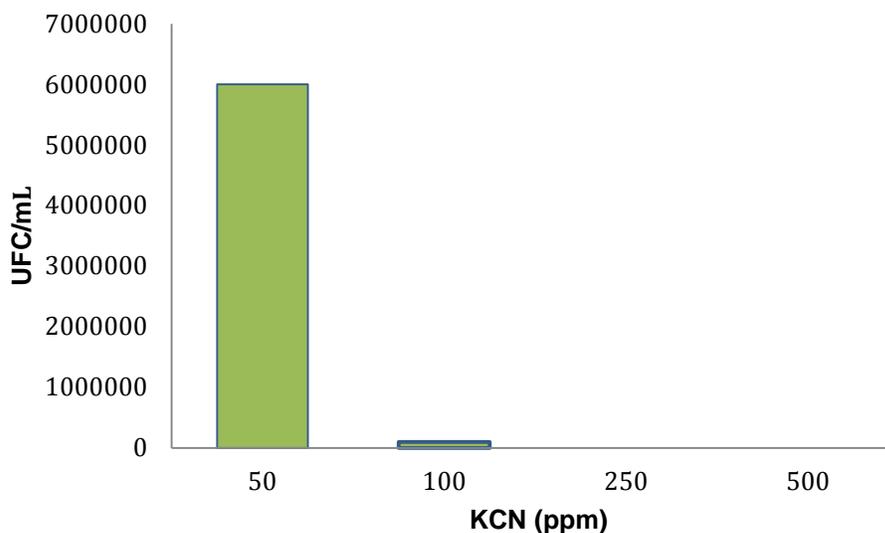
Dilución inicial de la muestras en los protocolos de crecimiento : Los resultados del gráfico 1 muestran una diferencia muy marcada entre los diferentes protocolos de crecimiento; se observa un mayor número de UFC/mL en el protocolo B- medio enriquecido, seguido del protocolo B-medio selectivo y finalmente protocolo C-medio selectivo.



Gráfica 1. Comparación del número de UFC/mL en cada protocolo de crecimiento. ME: medio enriquecido , MS: medio selectivo

Evaluación de la tolerancia a cianuro

Con el objetivo de determinar la concentración óptima de cianuro en la cual se evidenciara un mayor crecimiento bacteriano, se sometió la bacteria #1 a 4 concentraciones de cianuro. En la gráfica 2 se observa que la máxima concentración en la cual la bacteria presenta el menor crecimiento corresponde a 100 ppm de KCN, mientras que a una concentración de 50 ppm se exhibe el mayor crecimiento; en las concentraciones correspondientes a 250 ppm y 500 ppm no se evidenció crecimiento bacteriano.



Gráfica2. Evaluación del crecimiento bacteriano a 4 concentraciones de KCN

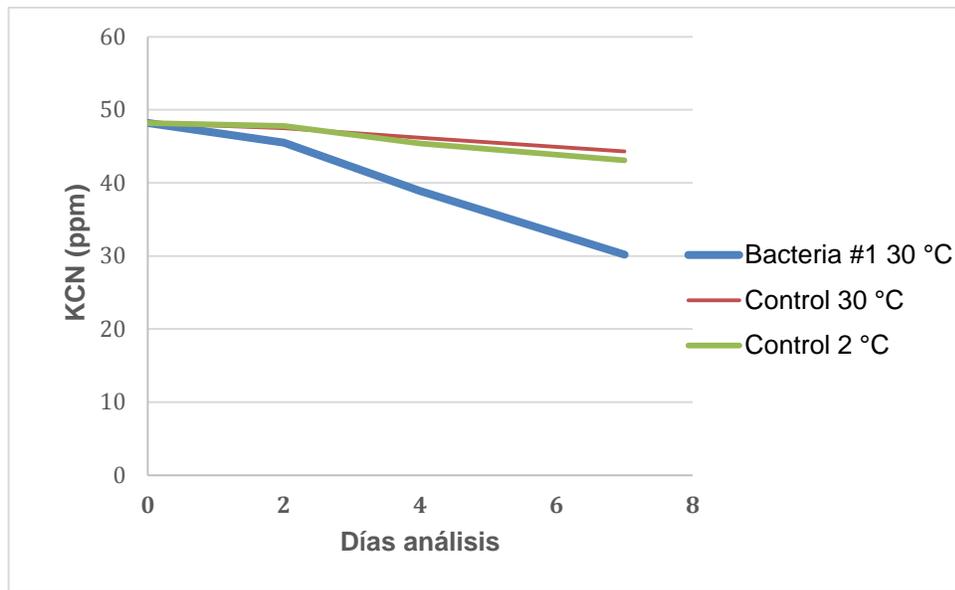
Cuantificación de la degradación de cianuro

Se realizó una curva de calibración con 5 concentraciones conocidas de KCN, empleando como matriz la solución de sales y el buffer fosfato; La curva de calibración presentó un coeficiente de correlación de 0.999, lo que indica que existe una buena linealidad entre los datos.

Con la ecuación de la recta obtenida se determina la concentración de KCN en el transcurso del tiempo. En el caso de la cuantificación de la degradación de 48.2 ppm de KCN se tiene:

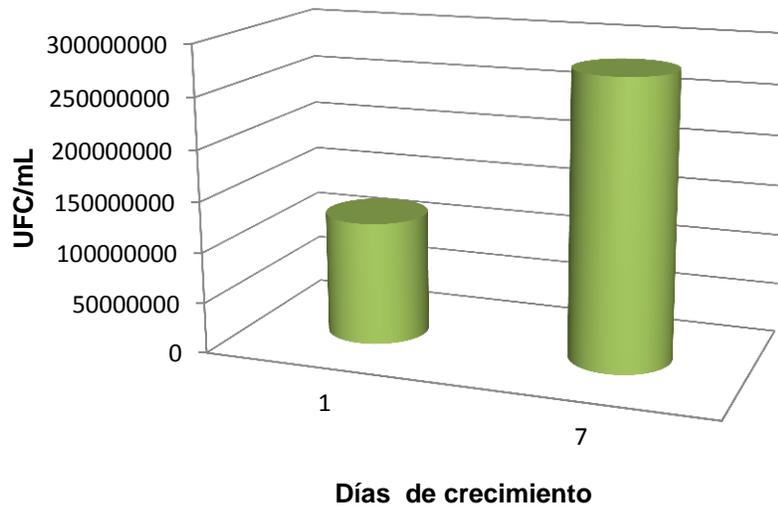
$$\text{Ecuación 1. } mv = (-58.056 * \text{Log}(ppm)) - 126.81$$

Teniendo en cuenta que la concentración donde se tiene un mayor crecimiento bacteriano corresponde a 50 ppm de KCN, se emplea esta para realizar la etapa de cuantificación. En la gráfica 3 se observa la variación de la concentración de cianuro de potasio durante un periodo de 7 días, tanto en la muestra como en los controles



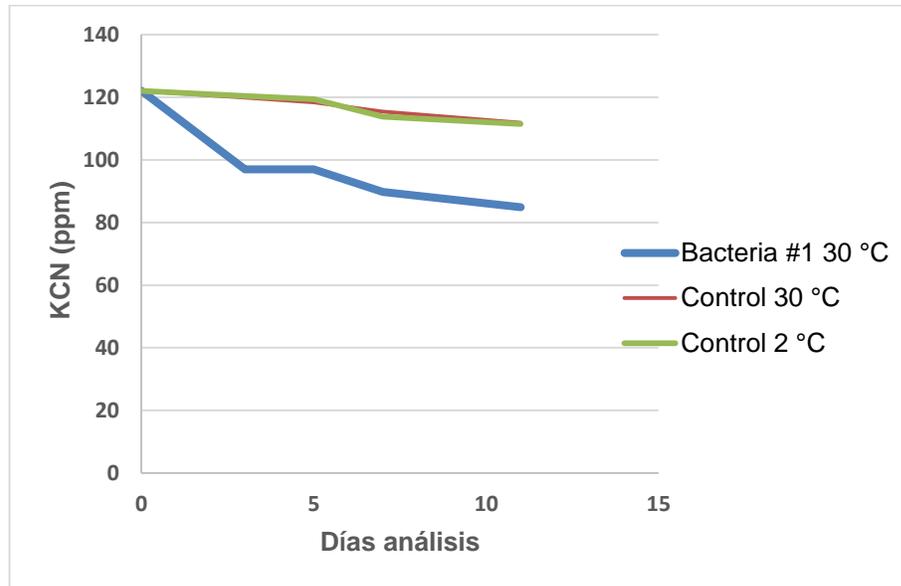
Gráfica 3. Variación de la concentración (48.2 ppm) de cianuro en la muestra y en los controles, durante 8 días de estudio.

Con el objetivo de determinar el número de UFC/mL al inicio del estudio y en la culminación del mismo, se determina en medio selectivo la variación de la población microbiana en la gráfica 4.

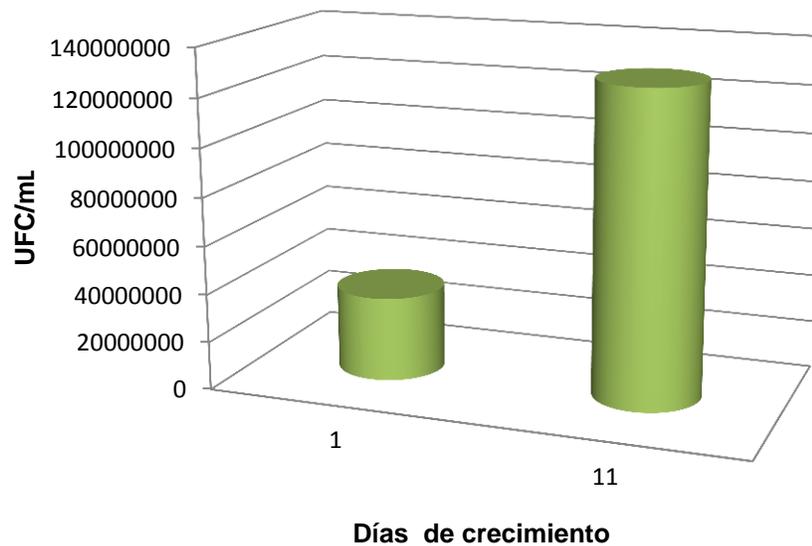


Gráfica 4. Evaluación del crecimiento bacteriano en un periodo de 7 días en agar selectivo, con una concentración de 50 ppm de KCN.

Como en la gráfica 2, se observa que a una concentración de 100 ppm la bacteria crece, se realiza nuevamente la cuantificación para estimar el porcentaje de degradación a una concentración de 122 ppm de KCN.



Gráfica 5. Variación de la concentración (122 ppm) de cianuro en la muestra y los controles, en un periodo de 11 días.



Grafica 6. Evaluación del crecimiento bacteriano en un periodo de 11 días en agar selectivo, con una concentración de 50 ppm de KCN.

Determinación del porcentaje de remoción

Ecuación 2.
$$\%RE = \frac{C_i - C_f}{C_i} * 100$$

Dónde:

C_i: concentración inicial de ion cianuro en ppm (mg/L)

C_f: concentración final de ion cianuro en ppm (mg/L)

✓ **Para una concentración inicial de 48.2 ppm de KCN**

Degradación biológica sin corrección con el control

$$\%RE = \frac{48.2 \text{ ppm KCN} - 30.2 \text{ ppm KCN}}{48.2 \text{ ppm KCN}} * 100$$

$$\%RE = 37.3 \%$$

Control: Evaporación por factores ambientales

$$\%RE = \frac{48.2 \text{ ppm KCN} - 44.3 \text{ ppm KCN}}{48.2 \text{ ppm KCN}} * 100$$

$$\%RE = 8.1 \%$$

Degradación biológica corregida con el control

$$\%RE = 37.3 \% - 8.1 \%$$

$$\%RE = 29.2 \%$$

✓ **Para una concentración inicial de 122 ppm de KCN**

Degradación biológica sin corrección con el control

$$\%RE = \frac{122 \text{ ppm KCN} - 84.88 \text{ ppm KCN}}{122 \text{ ppm KCN}} * 100$$

$$\%RE = 30.43 \%$$

Control: Evaporación por factores ambientales

$$\%RE = \frac{122 \text{ ppm KCN} - 111.8 \text{ ppm KCN}}{122 \text{ ppm KCN}} * 100$$

$$\%RE = 8.36\%$$

Degradación biológica corregida con el control

$$\%RE = 30.43 \% - 8.36 \%$$

$$\%RE = 22.07 \%$$

Tabla 2. Resultados de la Cuantificación de la degradación de cianuro

	Estudio 1 48.2 ppm KCN	Estudio 2 122.0 ppm KCN
Disminución de cianuro total por degradación biológica y factores externos (T, pH etc.)	37.3%	30.4%
Disminución de cianuro total por factores externos (T, pH etc.)	8.1%	8.4%
Disminución de cianuro total por degradación biológica	29.2%	22.1%

Identificación bacteriana

Con el objetivo de poder estimar la posible identidad de la bacteria #1, se muestra a continuación los resultados obtenidos del análisis bioquímico y morfológico que se realizó.

Tabla 3. Identificación fenotípica de la bacteria #1 aislada en medio selectivo

Prueba	Resultado
Tinción de Gram	Estreptococo Gram (-)
Catalasa	Positivo
Oxidasa	Negativo
API20E	<i>Escherichia Coli 1</i>
Morfología externa (forma , borde)	Irregular, ondulado

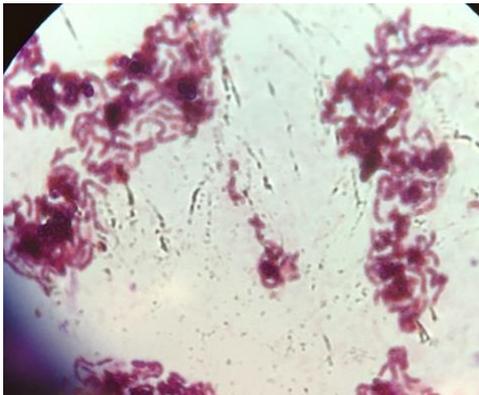


Figura 5. Resultado de la tinción de Gram de la bacteria #1.



Figura 6. Morfología externa de la bacteria #1.

Tabla 4. Resultado de la caracterización bioquímica de la bacteria #1 con la prueba API 20 E.

Prueba	Reacción /enzima	Resultado/coloración
ONPG	Beta-galactosidasa	+ (amarillo)
ADH	Arginina deshidrolasa	+ (rojo)
LDC	Lisina descarboxilasa	+ (rojo)
ODC	Ornitina descarboxilasa	+ (rojo- naranja)
CIT	Utilización del citrato	+ (azul oscuro)
H2S	Producción de H2S	- (no precipitado negro)
URE	Ureasa	+ (rojo-naranja)
TDA	Triptófano desaminasa	- (amarillo)
IND	Producción de indol	- (amarillo)
VP	Producción de acetoína (Voges-Proskauer)	+ (rojo)
GEL	Gelatinasa	- (no difusión de pigmento)
GLU	Fermentación /oxidación de glucosa	- (Azul)
MAN	Fermentación/oxidación de manitol	- (Azul)
INO	Fermentación/oxidación de inositol	- (Azul)
SOR	Fermentación/oxidación de sorbitol	+ (amarillo)
RHA	Fermentación/oxidación de ramnosa	+ (amarillo)
SAC	Fermentación/oxidación de sacarosa	- (Azul)
MEL	Fermentación/oxidación de melobiosa	+ (amarillo)
AMY	Fermentación/oxidación de amigdalina	- (Azul)
ARA	Fermentación/oxidación de arabinosa	+ (amarillo)
OX	Citocromo oxidasa	- (amarillo)

Positivo (+); Negativo (-)

2.6 DISCUSIÓN

La selección del sitio de muestreo en la mina de oro, garantizó que los microorganismos aislados estuvieran en presencia del contaminante (cianuro) en su ambiente natural. Se asume que la presencia de cianuro en el sitio de recolección de las muestras permitió el crecimiento de colonias bacterianas capaces de degradarlo. Estas se cultivaron inicialmente en medio enriquecido y finalmente en presencia de cianuro, lo que favoreció la expresión de las enzimas involucradas en el metabolismo y el aislamiento de las nuevas colonias degradadoras de este compuesto.

Los dos protocolos de crecimiento descritos en la metodología, se realizaron con el objetivo de estimar cómo era el crecimiento bacteriano, al exponer la muestra del ambiente natural directamente en un medio selectivo sólido y por otra parte, someterla a una fase de pre-crecimiento en medio líquido enriquecido y selectivo. La gráfica 1 muestra el resultado del número de UFC/ mL en cada protocolo de crecimiento; se evidencia un alto crecimiento en el protocolo B-medio enriquecido, ya que se cuenta con una fuente de sustancias nutritivas normales para el crecimiento de cualquier tipo de bacteria, y por ende se espera tener colonias que sean capaces de sobrevivir en un medio con cianuro, aunque no lo degraden; en el protocolo B- medio selectivo el número de UFC/mL es menor, puesto que se espera que únicamente las bacterias que tienen la capacidad de degradar el cianuro puedan crecer en el medio, y finalmente en el protocolo A- medio selectivo sólido se obtuvo el menor número de UFC/mL. Con esto concluimos que, es necesario exponer las bacterias a un pre- crecimiento en medio líquido para obtener un mayor número de microorganismos, esta metodología la recomendamos para estudios de este tipo, donde se desee tener un rango más amplio de bacterias.

Para continuar con las siguientes fases propuestas (cuantificación e identificación) se trabajó únicamente con la colonia obtenida en el protocolo A (bacteria #1), por dos razones : primero, porque el hecho de que la bacteria creciera directamente en medio selectivo sin una fase de pre-crecimiento en medio rico, fue un buen indicativo de su capacidad degradadora; segundo, porque los consorcios de bacterias obtenidos en el protocolo B, se contaminaron con hongos lo cual dificultaba su uso para posteriores análisis. También en esta etapa, se realizó una modificación al medio selectivo utilizado en la fase de aislamiento y selección; dicha modificación consistió en incorporar todos los componentes del medio enriquecido, con el objetivo de brindar todos los nutrientes para obtener un mayor crecimiento bacteriano.

La determinación de la concentración óptima de cianuro de potasio, arrojó como se observa en la gráfica 2, que a una concentración de 50 ppm la bacteria tiene mayor capacidad de vivir y degradar el cianuro, puesto que se tiene un crecimiento bacteriano más alto; por otro lado, se observó que la concentración máxima de cianuro en la cual todavía se evidencia crecimiento bacteriano,

corresponde a 100 ppm, mientras que en 250 y 500 ppm no hubo crecimiento. Este análisis es de gran importancia, puesto que permite establecer las condiciones en las cuales se debe realizar la etapa de la cuantificación y de esa manera poder estimar con mayor certeza el poder de degradación de la bacteria.

En este estudio se logró verificar la capacidad degradadora de la bacteria #1, al evaluar la variación de la concentración de cianuro en un periodo de 7 días (ver gráfica 3.), partiendo de una concentración inicial de 48.2 ppm de KCN; la cepa #1 removió aproximadamente el 30% del cianuro total en la muestra. Por otra parte, se quiso analizar el porcentaje de biodegradación a una concentración aproximada de 100 ppm de KCN, puesto que en la gráfica 2 se observa que allí todavía hay crecimiento bacteriano; se partió de una concentración inicial de 122.0 ppm y se llegó a una concentración final de 84.9 ppm de KCN (ver gráfica 5). Con el resultado anterior se obtuvo una biodegradación equivalente al 22.1% (ver tabla 2.). Al comparar los resultados de ambas cuantificaciones se corrobora que realmente la concentración óptima en la cual la bacteria tiene un mayor crecimiento, corresponde a 48.2 ppm de KCN; lo anterior se concluye, puesto que en los 7 días que duró la cuantificación con la concentración de 48.2 ppm la degradación fue mucho mayor respecto al otro análisis que se realizó en periodo de 11 días.

Una aspecto importante para evitar tener datos erróneos de la biodegradación del cianuro es la evaporación, ya que las sales simples de cianuro (cianuro de sodio y cianuro de potasio) en agua, suelen evaporarse al formar cianuro de hidrogeno (HCN); a un valor de pH de 9.3 la mitad del cianuro total existe como HCN y la otra mitad como ion CN^- , por otro lado a pH menores que 8.4 más del 90% existe como HCN (Domínguez & Cobos, 2008). Se debe tener en cuenta que el cianuro de hidrogeno (HCN) tiene una presión de vapor relativamente alta, 100 KPa a 26 °C, por lo cual se volatiliza con rapidez en superficies líquidas a condiciones ambientales, causando una disminución de la concentración del ion cianuro en la solución. La velocidad de volatilización depende entonces de la concentración de HCN, en función de la concentración de cianuro total, del pH, del área superficial, de la profundidad de la solución, y la temperatura (Domínguez & Cobos, 2008). Por lo anterior, en este estudio se empleó un buffer fosfato a pH 8 para evitar en gran medida la conversión del cianuro total en cianuro de hidrógeno.

Teniendo en cuenta que el fenómeno de la evaporación depende en cierta medida de la temperatura, se realizaron dos controles que fueron sometidos a 30 °C y 2 °C, para evaluar la influencia de esta variable en la tasa de evaporación; en las gráficas 3 y 5 se observa que en los dos estudios a 122 ppm y 48.2 ppm de KCN, no existen diferencias significativas entre los controles y la muestra. Esto indica que en este caso la evaporación no juega un papel en la eliminación de cianuro, por el contrario la disminución de la concentración de cianuro se debe únicamente a la capacidad degradadora de la bacteria. Por otro lado, también se puede atribuir a la disminución del cianuro de potasio en los controles, errores

sistemáticos de tipo instrumental y personal; tales como mal calibración del electrodo y una mala lectura de los datos arrojados por el equipo.

Aunque la cepa logró degradar un buen porcentaje del cianuro total en la muestra, este valor no logra ser mayor al 50%; lo anterior se puede deber a que como se desconocía la identidad de la bacteria, posiblemente no se suministró los requerimientos nutricionales correctos para garantizar un mayor crecimiento bacteriano y obtener un alto porcentaje de degradación. Por otra parte, también se puede considerar el hecho de que la bacteria solo pueda degradar ese porcentaje de cianuro, pero aun así puede tolerar el resto sin afectar su supervivencia.

Teniendo en cuenta que la bacteria #1 presenta la capacidad de degradar el cianuro, es decir que posiblemente lo puede emplear como fuente de carbono, nitrógeno y energía, o únicamente utilizar una de ellas, puesto que se desconoce a ciencias ciertas este panorama, se espera que a mayor tiempo de exposición en el medio selectivo aumente el número de unidades formadoras de colonia (UFC) y que a la vez aumente la degradación del cianuro. En las gráficas 4 y 6 se logra corroborar esta hipótesis y se observa que finalizado el proceso de análisis el número de UFC a aumento más del 50% en las dos cuantificaciones.

Uno de los objetivos del proyecto estaba orientado a realizar la identificación de las posibles bacterias encontradas en la mina de oro y que a su vez evidenciaran su capacidad degradadora de cianuro; cabe mencionar que debido a que durante la fase experimental hubo retrasos en cuanto al cumplimiento del segundo objetivo del proyecto, no se tubo a tiempo los resultados de la degradación, los cuales eran decisivos para determinar qué tan conveniente era realizar la inversión para enviar al extranjero la muestra, y de ese modo tener una identificación a nivel molecular. Por otra parte la regulación colombiana (Decisión N° 391 de la comunidad Andina) que establece el Régimen Común sobre Acceso a los Recursos Genéticos, plantea que para sacar muestras biológicas del país, se debe realizar una solicitud donde se incluya toda la información relevante del proyecto de investigación y otras disposiciones; el proceso de análisis de la solicitud tiene un periodo total de 45 días hábiles, por lo tanto el tiempo estimado para terminar el proyecto no era suficiente para esperar la respuesta de la solicitud y en el caso de que fuera positiva enviar la muestra a identificar.

El poder tener certeza de la identidad de la cepa bacteriana con la que se está realizando un estudio determinado, es de gran importancia, puesto que permite tener una base de conocimiento, para optimizar las condiciones de crecimiento a nivel de laboratorio a través de la caracterización bioquímica que se expone en la literatura. La identificación de la bacteriana #1 se llevó a cabo fenotípicamente mediante pruebas morfológicas y bioquímicas. Se aisló una cepa bacteriana Gram negativa, que se identificó fenotípicamente como del género *Streptococo*, mediante la prueba de tinción de Gram (ver tabla 3 y figura 5); por otra parte la prueba API20E utilizada para identificar entero bacterias- oxidasas negativas,

arrojo que la bacteria aislada correspondía a la especie *Escherichia Coli*, lo cual se contradice con el resultado de la tinción de Gram, puesto que esta última corresponde fenotípicamente a un bacilo. Este resultado no tiene mucha relevancia ni ofrece una buena probabilidad de la identidad de la cepa bacteriana, por el contrario lo que indica es el perfil bioquímico de la bacteria (ver tabla 4). La caracterización de la morfología externa de la bacteria indica que presenta una forma irregular y un borde ondulado (ver figura 6).

Teniendo en cuenta que hoy en día, ya se han descrito varias rutas de degradación de cianuro, sería un aspecto muy importante en futuros estudios poder determinar cuál es la ruta bioquímica que la bacteria #1 emplea para degradar el cianuro; a pesar de que el porcentaje de degradación no fue muy alto, los resultados indican que realmente se encontró una cepa bacteriana con capacidad biodegradadora de cianuro. Dada la importancia del cianuro en la extracción de metales preciosos como lo es oro y el impacto que genera en el medio ambiente, es necesario que se sigan estableciendo estrategias de biorremediación a través de estudios en laboratorios con microorganismos tales como las bacterias y que se evalúe que tan factible puede ser aplicar dicha técnica en condiciones de campo, garantizando que esta sea respetuosa con el entorno natural en el que tiene que desarrollarse.

2.7 CONCLUSIONES

1. Dada la importancia del cianuro en la extracción de metales preciosos como lo es oro, se deben establecer en lo posible estrategias de biorremediación para minimizar el efecto que hoy en día su uso ha generado en el medio ambiente.
2. Mediante estudios en el laboratorio se aisló una cepa bacteriana Gram negativa, que se identificó fenotípicamente como del género *Streptococo*; se determinó que la cepa bacteriana removió aproximadamente el 30% del cianuro total presente en la muestra; lo anterior da buenos indicios de su capacidad biodegradadora y de su posible utilización en técnicas de biorremediación.
3. El trabajo en un laboratorio de investigación se torna tedioso, en la medida que se trabaja con microorganismos de identidad desconocida, pues esto hace difícil optimizar las condiciones de crecimiento en los medios de cultivos selectivos que se emplean; por ende es necesario partir de un conocimiento previo.

2.8 RECOMENDACIONES

Se recomienda para futuros estudios con la cepa bacteriana aislada, realizar como objetivo principal la identificación, para poder optimizar las condiciones de crecimiento y lograr tener mejores resultados. Por otro lado, es importante que durante el estudio se pueda brindar a la bacteria las condiciones del ambiente natural (temperatura, pH, humedad, luz, etc.) de donde se ha extraído, para garantizar la supervivencia del microorganismo y de eso modo que los resultados obtenidos estén más orientados hacia condiciones reales áreas contaminadas.

También se recomienda aprovechar la biodiversidad encontrada en la mina de oro para futuras investigaciones.

3.11 BIBLIOGRAFIA

1. Barrios, M. Y. (2011). Biorremediación: una herramienta para el saneamiento de ecosistemas marinos contaminados con petróleo. Recuperado de: <http://search.ebscohost.com/login>.
2. Bolaños, E. A. (6 de Marzo de 2012). *La ruta del oro en el Cauca. El Espectador*.
3. Calle, V. L. (6 de Mayo de 2013). Colombia no está preparada para la locomotora minera. *El Espectador*.
4. Castillo, F. (2005). "Biología Ambiental", Madrid- España: Tébar, S.L. Pág. 410-411.
5. Crison. (2012). Electrodo selectivo de cianuro. Recuperado el 6 de noviembre de: file:///D:/Downloads/96_53.pdf.
6. Domínguez, P.C.J, Cobos, H.F.O. (2008). Comportamiento electroquímico del cianuro. Tomado de : <http://nebulosa.icesi.edu.co:2516/ehost/pdfviewer/pdfviewer?vid=3&sid=ce5c92c1-4d42-463d-a6c7-468979ff80f5%40sessionmgr4002&hid=4107>
7. Fernández, O.A, García. C, Sáez. N.J, Valdezate. R.S. (2010). Procedimientos en microbiología clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Recuperado de: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf>.
8. Garcés Molina. M, A., Betancur, L. M. A., Mazo, K. I. M. og Natalia Andrea Salinas, A. (2006). Aislamiento de consorcio de microorganismos degradadores de cianuro. (Spanish). *Revista Lasallista de Investigación*, 3(1), 7-12. Recuperado de: <http://search.ebscohost.com/login>.

9. Guerrero, J.J. (2010). Cianuro: Toxicidad y Destrucción Biológica. Recuperado de: <http://www.ilustrados.com/documentos/cianurotoxdestrucbiologica.pdf>.
10. Higuera, P., & Oyarzun, R. 2011. Curso de Minería y Medio Ambiente. Recuperado de Google: <http://www.uclm.es/users/higueras/MAM/index.htm>
11. Jiménez, M.R., Zamora, C.J., Zúñiga, C.G. (2015). Determinación del flujo de agua para la biorremediación en sistemas recirculados acuaculturales utilizando tapetes microbianos construidos
12. J.N. Siedow, A. U. (1995). Plant mitochondrial electron transfer and molecular. *The plant cell*, 821.
13. Lachaud, M. A., & Maldonado, J. H. (2011). Aproximación al cálculo del crecimiento real de Colombia: aportes metodológicos para la inclusión en las cuentas nacionales de los impactos del agotamiento del carbón y del gas natural. (Spanish). *Revista de Economía del Rosario*, 14(1), 1-29. Recuperado de: <http://search.ebscohost.com/login>
14. Luque-Almagro, V. M., Huertas, M. J., Roldán, M. D., Moreno-Vivián, C., Martínez-Luque, M., Blasco, R. og Castillo, F. (2007). The cyanotrophic bacterium *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 responds to cyanide by defence mechanisms against iron deprivation, oxidative damage and nitrogen stress. *Environmental Microbiology*, 9(6), 1541-1549. doi:10.1111/j.1462-2920.2007.01274.x
15. Martínez. A, Gaju, N. (2005). El papel de los tapetes microbianos en la biorrecuperación de zonas litorales sometidas a la contaminación por vertidos de petróleo
16. Montero, M.L. (2012). Minería ilegal en Colombia un frente de guerra que se abre. Universidad militar Nueva Granada Recuperado de: <http://www.iegap-unimilitar.edu.co/images/docs/analpolitmineriailegal.pdf>
17. Ortiz, A. a. (Enero de 2001). Recuperación de oro y plata de minerales por heap leaching. Recuperado el 13 de Noviembre de 2014, de Google: www.sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtual/publicaciones/geologia/v04_n7/recup_oro_plata.htm.

18. Procuraduría General de la Nación. (1 de septiembre de 2011). "Minería legal en Colombia; informe preventivo. Google. Recuperado el 6 de noviembre de 2014, de Google: <http://www.procuraduria.gov.co/portal/media/file/MINERIA%20ILEGAL%20EN%20COLOMBIA%20%20DOCUMENTO.pdf>
19. Revista Proclama. (09 mayo de 2015). Persisten amenazas contra líderes que se oponen a la minería ilegal en el Norte del Cauca. Tomado de: <http://www.proclamadelcauca.com/2015/01/persisten-amenazas-contra-lideres-que-se-oponen-a-la-mineria-ilegal-en-el-norte-del-cauca.html>
20. Revista Semana. (01 de abril de 2015). El nuevo flagelo que devora a Colombia Tomado de: <http://beta.semana.com/nacion/multimedia/la-guerra-contra-la-mineria-ilegal-criminal-en-colombia/422834-3>
21. Rodicio, M., Mendoza, M. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. Recuperado de: <http://www.icb.uncu.edu.ar/upload/Rodiciocap112.pdf>
22. Suárez, L. G. (2011). Perspectiva jurídica de los impactos ambientales sobre los recursos hídricos provocados por la minería en Colombia. (Spanish). Juridical Perspective of Environmental Impact on Water Resources Caused by Mining in Colombia. (English), 10, 123-139.
23. Torres.G.J, Pinzón.S.M, Esquivia.Z.M, Parra. P.A, Espitia.J.E. (2013). La explotación ilícita de recursos minerales en Colombia. Casos Valle del Cauca (Rio Dagua)- Chocó (Rio San Juan). Efectos sociales y ambientales. Recuperado de: <http://www.contraloriagen.gov.co/...Minerales...Colombia.../49219b35-39ed-4>

ANEXOS

Anexo 1. Resultado de la caracterización bioquímica de la bacteria #1 con la prueba API 20 E.

!

API 20 E V4.1 [Impresora](#) [Exportar](#) [Nuevo test](#) [Modificar](#)

REFERENCIA: FECHA:

COMENTARIO:

PERFIL INACEPTABLE

Galeria	API 20 E V4.1
Perfil	7 5 4 0 6 2 2
Nota	

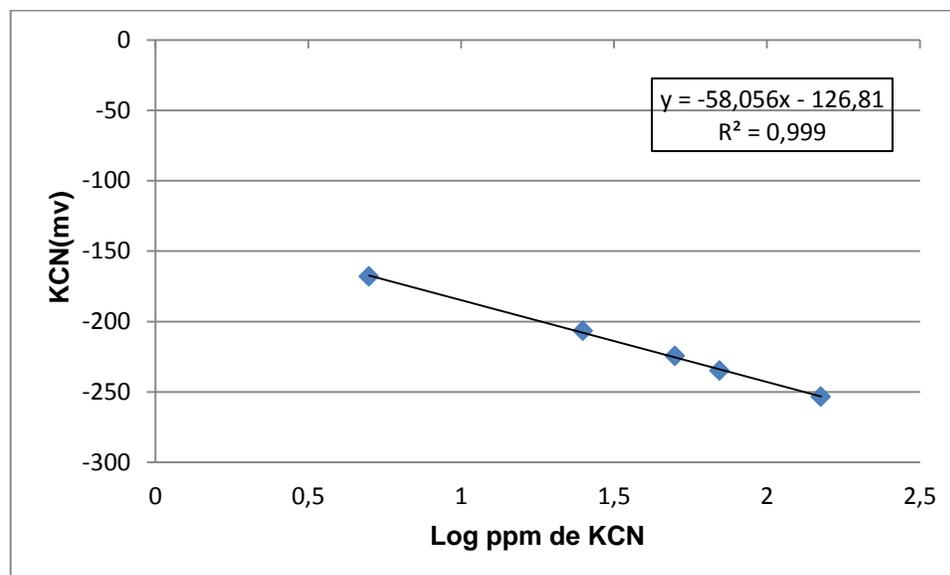
Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra							
Escherichia coli 1			ADH	1%	H2S	1%	GLU	99%	MAN	98%
			INO	1%	RHA	82%	MEL	75%		

API

- API 10S
- API 20 A
- API 20 C AUX
- API 20 E
- API 20 NE
- API 20 STREP
- API 50 CHB
- API 50 CHE
- API 50 CHL
- API CAMPY
- API CANDIDA
- API CORYNE
- API LISTERIA
- API NH
- API STAPH
- RAPID 20 E

ID32

Anexo 2 .Curva de calibración con 5 concentraciones de KCN, para determinar la degradación biológica de 48.2 ppm de cianuro de potasio.



Anexo 2. Curva de calibración con 5 concentraciones de KCN, para determinar la degradación biológica de 122 ppm de cianuro de potasio.

