

**EVALUACIÓN DE CONDICIONES DE pH Y NUTRIENTES BAJO LAS CUALES
SE DA UNA MAYOR BIODEGRADACIÓN DE CIANURO POR PARTE DE
CEPAS BACTERIANAS**

MARISOL PEÑA REPISO

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS
PROGRAMA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA
SANTIAGO DE CALI
2015**

**EVALUACIÓN DE CONDICIONES DE pH Y NUTRIENTES BAJO LAS CUALES
SE DA UNA MAYOR BIODEGRADACIÓN DE CIANURO POR PARTE DE
CEPAS BACTERIANAS**

MARISOL PEÑA REPISO

Trabajo de grado para optar al título de pregrado en:

QUÍMICA FARMACÉUTICA

**Tutor del proyecto de investigación:
Dr. ARAM JOEL PANAY**

**UNIVERSIDAD ICESI
2015**



APROBADO

Leonardo Herrera Orozco

Evaluador

Andrés Felipe Dávalos Vélez

Evaluador

Aram Joel Panay Escobar

Director del Proyecto

SANTIAGO DE CALI

2015

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por brindarme fortaleza y salud para salir adelante en este proyecto.

A mis padres, quienes me han brindado su apoyo, su amor incondicional en esta hermosa etapa de mi vida y me han brindado la gran oportunidad de recibir una formación académica. Son y serán siempre mi motor en cada una de las etapas que he vivido y que me faltan por vivir.

A mi tutor de tesis, el doctor Aram Joel Panay por la orientación, paciencia y apoyo que me brindó a lo largo del proyecto.

A la estudiante de maestría Catalina Mosquera porque su apoyo y colaboración fueron claves para culminar con éxito este proyecto.

Finalmente a la universidad Icesi por brindarme la oportunidad de aprender y de crecer tanto personal como profesionalmente.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN DEL PROYECTO.....	9
INTRODUCCIÓN.....	11
1. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO.....	13
2.1 Planteamiento del problema.....	13
2.2 Marco teórico y estado del arte.....	15
2.2.1 El cianuro y sus usos.....	16
2.2.2 El cianuro y sus características.....	16
2.2.3 Toxicidad del cianuro.....	17
2.2.4 Alternativas de degradación del cianuro.....	18
2.2.5 Viabilidad de cepas bacterianas.....	21
2.2.6 Cuantificación de cianuro.....	22
2.3 Objetivos.....	23
2.3.1 Objetivo general.....	23
2.3.2 Objetivos específicos.....	23
2.4 Metodología utilizada.....	24
2.4.1 Determinación de la Viabilidad de cepas bacterianas.....	24
2.4.2 Evaluación de la tolerancia de las bacterias a diferentes pH.....	24
2.4.3 Evaluación del crecimiento bacteriano en medios con diferentes concentraciones de KCN.....	25
2.5 Resultados.....	28
2.5.1 Determinación de la viabilidad de las cepas bacterianas.....	28
2.5.2 Evaluación de las bacterias a diferentes pH.....	28
2.5.3 Evaluación de la tolerancia a diferentes concentraciones de cianuro.....	30
2.5.4 Cuantificación de la degradación de cianuro.....	32
2.6 Discusión.....	37
2.7 Conclusiones.....	41
2.8 Recomendaciones.....	42
Bibliografía.....	43

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Efectos de cianuro libre en algunas aves y otras especies. (Donato, Nichols, Possingham, & Moore, 2007).....	18
Tabla 2. Tratamientos fisicoquímicos del cianuro y sus desventajas (Castillo, 2005)	19
Tabla 3. Resultados de la cuantificación de la degradación de cianuro por parte de la bacteria #3: <i>Acinetobacter iwofii</i>	35
Tabla 4. Resultados de la cuantificación de la degradación de cianuro por parte de la bacteria #5: <i>Acinetobacter</i>	35
Tabla 5. Resultados de la cuantificación de la degradación de cianuro por parte de la bacteria #6: <i>Methylobacterium spp</i>	36

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfico 1. Promedio de unidades formadoras de colonia (UFC/ml) en medio enriquecido (medio E) en un mes	28
Gráfico 2. Crecimiento de las diferentes bacterias a pH 7	29
Gráfico 3. Crecimiento de las diferentes bacterias a pH 8	29
Gráfico 4. Crecimiento de las diferentes bacterias a pH 9	30
Gráfico 5. Evaluación del crecimiento bacteriano a 100 ppm de KCN.....	30
Gráfico 6. Evaluación del crecimiento bacteriano a 200 ppm de KCN.....	31
Gráfico 7. Control de crecimiento de bacterias sin KCN	31
Gráfico 8. Variación de la concentración (124 ppm) de KCN en controles y en bacterias	32
Gráfico 9. Variación de la concentración (216,3 ppm) de KCN en controles y en bacterias	33
Gráfico 10. Variación de la concentración (502 ppm) de KCN en controles y en bacterias	33
Gráfico 11. Curva de calibración empleada para cuantificar cianuro en un buffer pH 9	34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diferentes formas del cianuro en la naturaleza (Castillo, 2005).....	17
Figura 2. Ejemplo de estructuras de glucósidos cianogénicos. (López, Gil, & Bello, 2012).....	17
Figura 3. Reacciones hidrolíticas que presentan microorganismos para biodegradar cianuro (Ebbs, 2004).....	20
Figura 4. Organismos cianogénicos (Castillo, 2005).....	21

RESUMEN DEL PROYECTO

El manejo inadecuado del cianuro como un residuo peligroso de la explotación del oro, ha generado a escala mundial, un problema de contaminación de suelos, aire y agua. Esta situación ha despertado un gran interés en la implementación de nuevas alternativas para lograr la eliminación de este contaminante del medio ambiente, por lo cual se ha estudiado la capacidad que tienen microorganismos de incorporar en sus rutas metabólicas al cianuro, como fuente de energía, y así convertirlo en residuos menos tóxicos.

En el presente trabajo, se implementó un modelo experimental, en el cual se evaluó la capacidad de biodegradación de cianuro por parte de cuatro cepas bacterianas en medios de cultivo con diferentes pH (7, 8, 9 y 10) y con diferentes concentraciones de cianuro de potasio (100, 200 y 500 ppm) a escala de laboratorio. Como resultado se obtuvo un crecimiento destacado de la cepa bacteriana #3 que corresponde a la especie *Acinetobacter iwoffii* en un medio con pH de 9 y a una concentración de KCN de 100ppm. Y se confirmó que también posee la mayor capacidad de remoción de cianuro en un periodo de 5 días, en comparación con las otras cepas en estudio.

Se propone que esta cepa se estudie con mayor profundidad, ya que se puede utilizar como una alternativa de biorremediación para contrarrestar la contaminación ocasionada por el cianuro producto de la minería del oro.

Palabras clave: bacterias biodegradadoras de cianuro, minería de oro, cianuro de potasio.

ABSTRACT

Inadequate handling of cyanide as hazardous waste from gold mining has generated worldwide, a problem of contamination of soil, air and water . This situation has aroused great interest in implementing new alternatives to achieve the elimination of this contaminant from the environment, therefore we studied the ability of microorganisms to incorporate into their metabolic routes cyanide as a source of energy, and thus making it less toxic.

In this paper, an experimental model was implemented in which the cyanide biodegradability was evaluated by four bacterial strains in culture mediums with different pH (7, 8, 9 y 10) and different concentrations of potassium cyanide (100, 200 and 500 ppm) in a laboratory scale. The results show a remarkable growth of the bacterial strain # 3 corresponding to the specie *Acinetobacter iwoffii* in a medium having pH 9 and at a concentration of 100 ppm KCN. And also confirmed that this kind of strain has the largest capacity for removal of cyanide over a period of 5 days, compared with the other strains under study.

It is proposed for this strain to be studied in greater depth, since it can be used as an alternative to bioremediation to counteract the pollution caused by cyanide in gold mining

Key words: cyanide biodegrading bacterias, gold mining, potassium cyanide

INTRODUCCIÓN

Colombia es un país privilegiado que se caracteriza por su diversidad de ecosistemas, su variada geografía, sus tierras fértiles y su gran riqueza mineral. Sin embargo, también es un país que no es suficientemente rígido para hacer cumplir todo aquello que la legislación ambiental obliga (Ministerio de Ambiente y Desarrollo , 2012)

A través de los años y en diferentes zonas geográficas de Colombia como en Remedios y Segovia (Antioquia), en Buenos Aires (Cauca), en Santa Rosa del Sur (Bolívar) y en Istmina y Tadó (Chocó), por nombrar algunos, se ha evidenciado un gran crecimiento de la minería tanto legal como ilegal (Ministerio de Ambiente y Desarrollo , 2012).

Este auge del sector minero, ha traído consigo diversos beneficios económicos al país, no obstante también ha causado importantes efectos negativos al medio ambiente y a la salud de las personas. Lo anterior, debido al uso de altas concentraciones de sustancias contaminantes como el cianuro y el mercurio, para la extracción de minerales, específicamente el oro.

El cianuro es un compuesto altamente tóxico que es desechado al suelo o al agua después de extraer el oro, ocasionando daños irreversibles tanto en la diversidad biológica como en las fuentes de agua de nuestro país. Esto debido a que no se degrada por si solo por ende tiende a persistir en la naturaleza, y finalmente puede llegar a presentarse en forma de ácido cianhídrico, compuesto muy volátil y letal, que puede llegar a desencadenar graves problemas de salud en las personas e incluso la muerte.

Frente a esta problemática, se han buscado mitigar los daños que ocasiona este en el medio ambiente con diversas técnicas fisicoquímicas como: la cloración alcalina, la ozonización en presencia de luz ultravioleta, el tratamiento con peróxido de hidrógeno, la adsorción en gránulos de carbono activado y procesos de aire/dióxido de sulfuro para removerlo del ambiente. No obstante, estos procedimientos resultan muy costosos y generalmente no logran la eliminación total del cianuro (Shabnam, Yaghmaei, & Ghobadi, 2014). Para ello, a través de los años se ha utilizado la capacidad que tienen algunos organismos vivos como bacterias, hongos y plantas para degradar los compuestos químicos en productos menos tóxicos con el fin de mejorar las condiciones del ambiente. Este proceso conocido como biorremediación, es aprovechado en la presente investigación como estrategia para analizar in vitro el proceso de degradación de una sal de cianuro (KCN) bajo diferentes condiciones de pH por parte de cuatro cepas bacterianas. Esto con el fin de demostrar que el tratamiento biológico es una alternativa viable, para que en un futuro puedan llegar a ser utilizado como

estrategia de descontaminación eficiente y más limpia de áreas afectadas por los residuos de cianuro producto de la minería.

1. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

2.1 Planteamiento del problema

Las explotaciones auríferas en el país, legales e ilegales, se han convertido en un grave problema ambiental porque además de la destrucción y degradación que ocasionan en amplios ecosistemas, contaminan las fuentes de agua con compuestos químicos peligrosos tales como el mercurio y el cianuro, deteriorando de este modo las condiciones de las cadenas alimenticias, afectando de manera grave la salud de las personas, la fauna y la flora. En un país tan biodiverso como Colombia esto es una auténtica tragedia, por lo cual cualquier método que sea capaz de ayudar a mitigar los devastadores efectos de esta actividad constituye un importante aporte a favor del desarrollo nacional ambientalmente sostenible.

Según cifras de la Agencia Nacional de Minería (ANM) en Colombia se empezó a incrementar la extracción de oro desde el 2007, al pasar de 15,48 toneladas a 66,1 en el 2012. Y se prevé que la expectativa para el año 2016 sea de 80 toneladas al año y seguir subiendo hasta alcanzar las 93 toneladas al año en el 2020 (Portafolio, 2014). Considerando estas cifras, se observa que la minería es una actividad de gran importancia en la economía nacional, por lo cual llama mucho la atención no solo a las grandes empresas mineras o también llamadas de gran escala, sino también a organizaciones al margen de la ley que claramente realizan esta actividad sin atender a las exigencias que se establecen en las normas nacionales. Esto implica que los residuos no son manejados adecuadamente, por lo cual son depositados en ríos y suelos causando graves daños tanto ambientales como sociales.

Uno de estos residuos es el cianuro. Este compuesto es usado para acomplejar el oro y así lograr su extracción. Cuando ya se ha logrado este propósito, el cianuro libre (ion cianuro) es desechado en las fuentes de agua, lo que constituye un grave problema ambiental, ya que este no se degrada por sí solo y tiende a persistir en la naturaleza, contaminando de este modo fuentes de agua, de las cuales se abastecen gran cantidad de animales y personas para su consumo. El cianuro afecta la respiración celular, causando la morbilidad o la mortalidad dentro de un corto período de tiempo. Es predominantemente una neurotoxina, y su toxicidad está mediada a través de la inhibición de la citocromo oxidasa, una enzima que participa en la respiración mitocondrial. Pero según recientes estudios, el cianuro inhibe múltiples enzimas y altera varios procesos intracelulares vitales que conducen a una cascada de eventos tóxicos. (Gupta R. , 2015)

Según un artículo publicado en la revista semana en Colombia; “más de 90 ríos, han resultado contaminados producto de la explotación aurífera con materiales

como el mercurio y el cianuro, impidiendo que el agua sea potable o que se puedan realizar actividades de pesca” (Semana, 2015). Adicionalmente, en el caso particular del Valle del Cauca, se ha incrementado en gran medida la minería ilegal, pues de acuerdo con los datos de la CVC, hoy existen 350 títulos mineros otorgados en el departamento, de ellos, 170 cuentan con licencia ambiental y el resto están inactivos o se explotan sin dicho permiso. Esto ha ocasionado daños significativos en zonas como el Parque Farallones de Cali, el Cerro de la Bandera, San Pedro, Río frío, Ginebra y Jamundí en la parte alta (Redacción del País , 2014).

Frente a esta problemática, se hace necesaria la remoción de cianuro del ambiente para lo cual se han implementado diversos métodos fisicoquímicos que presentan diversas limitaciones y grandes desventajas, dado que representan altos costos y pueden generar compuestos intermedios aún más tóxicos que el cianuro, y a veces no es posible la eliminación completa del mismo, lo que conduce a un incremento en la contaminación del ambiente.

Como solución a estas desventajas se ha estudiado el uso de la biodegradación o biorremediación mediante el uso de microorganismos, que presenta grandes ventajas sobre los otros métodos actualmente existentes, debido a que en este caso se aprovecha la capacidad que tienen los microorganismos para incorporar en su ruta metabólica al cianuro como fuente de carbono y nitrógeno para remover estos tóxicos del medio ambiente. Esta técnica resulta favorable ya que su diseño es simple, las sustancias químicas utilizadas son de bajo costo y se cuenta con la capacidad para tratar todas las formas del cianuro y de sus subproductos (Castillo, 2005).

En un estudio realizado en la Universidad Icesi, se encontró que cepas bacterianas demostraron actividad biodegradadora de cianuro (Mosquera, 2013), razón por la cual el presente proyecto pretende evaluar bajo qué condiciones estas cepas bacterianas presentan una mayor remoción de cianuro, para así tener un referente y en el futuro llevar este proceso a mayor escala y reducir significativamente el impacto ambiental que tiene el uso del cianuro en las explotaciones auríferas.

2.2 Marco teórico y estado del arte

Colombia es un país con una biodiversidad extraordinaria, que, sin embargo, se está viendo afectada por el uso de compuestos peligrosos como el cianuro y el mercurio, producto del incremento de la minería tanto legal como ilegal. La minería ilegal, la falta de control del gobierno y el desconocimiento por parte de las grandes empresas mineras de las implicaciones medioambientales, debidas al tratamiento no adecuado de estos compuestos, son agravantes de esta situación.

Como consecuencia del mal manejo de residuos de las grandes empresas mineras y de la minería artesanal, el cianuro entra a contaminar el agua y el suelo del ecosistema, cuando es desechado en su forma de cianuro libre (ion cianuro), después de que se ha extraído completamente el oro. Esta práctica tiene nefastas consecuencias para animales y humanos que se abastecen de estos recursos naturales. Según un artículo publicado por Javier Silva Herrera en el periódico El Tiempo, en el Chocó se están acabando ríos, ya que cuando terminan de extraer el oro, las empresas mineras arrojan lo que sobra al mismo río o a sus orillas. Se ha observado que “en muchos sectores, y a raíz de la presencia de estas máquinas (retroexcavadoras), el río es sedimentado (poco profundo y propenso a desbordamientos), erosionado en sus orillas, donde no hay casi pesca y con un curso transformado que amenaza con acabar con los caseríos” (El Tiempo, 2014). Sin embargo, el Gobierno ha tratado de controlar la situación con presencia del ejército en algunos sectores mineros del país, para destruir maquinas que se empleen con el fin de explotación ilegal de oro. Además, implementó el decreto – 2261 de 2012- mediante el cual se “restringió el uso de mercurio, arsénico y cianuro en el país y se reglamentó la importación de maquinaria pesada” (Herrera, 2012).

Pero a pesar de estos esfuerzos, debido a que la exportación de minerales genera ingresos significativos al país, en comparación con otros ramos de actividad económica, genera fuertes intereses económicos asociados, los cuales representan un gran obstáculo para controlar los riesgos que este tipo de prácticas crean sobre los ecosistemas y sobre la vida misma de muchas personas (Silva, 2014). Según un artículo de la revista semana “cerca del 20 % de los beneficios de la minería ilegal en Colombia van a los grupos guerrilleros y paramilitares. Además, el 86 % de la producción del país se estima que es ilegal” (Revista semana , 2015).

Y es que el negocio de la minería es aún más rentable en comparación al negocio de la coca, “mientras un kilo de cocaína cuesta alrededor de 4 millones de pesos, un kilo de oro está cerca de los 90 millones de pesos. Una mina pequeña en promedio puede producir a la semana una libra de oro cuyo valor comercial está en 32 millones de pesos” (Semana, 2015). Además de estas grandes ganancias, en aquellos territorios de difícil acceso, inhóspitos y con poca intervención del

Estado, se aplican las llamadas vacunas a todos aquellos que participan en la cadena de explotación, incrementando la miseria y la violencia en nuestro país.

2.2.1 El cianuro y sus usos

La lixiviación del oro en la cual se usa cianuro se ha empleado desde el siglo XIX. En este proceso, el oro es oxidado ($\text{Au} \rightarrow \text{Au}^+$) y se enlaza con el cianuro formando iones aurocianuro $\text{Au}(\text{CN})_2^-$. Posteriormente, este complejo es precipitado usando carbón activado o zinc para obtener el oro en su forma metálica (Logsdon, Hagelstein, & Mudder, 1999). Uno de los parámetros más importantes durante dicho proceso es controlar el cianuro libre, ya que si se usa en exceso es perjudicial para el medio ambiente, pero si se usa muy poco no se realizará con éxito la extracción del oro (Jímenez, 2006).

La cantidad de cianuro utilizada en los procesos de lixiviación de oro es preocupante, ya que del 20% de cianuro que se produce industrialmente en el mundo el 18% es usado para este fin (Shabnam, Yaghmaei, & Ghobadi, 2014). Esto debido muy posiblemente a que la extracción del oro con el uso de cianuro es muy rentable, ya que este permite recuperar más del 97% del oro, frente al 60% que se logra con la extracción utilizando mercurio.

Dadas estas cantidades, se puede decir que el uso del cianuro en la minería constituye un riesgo latente. Existen ejemplos de accidentes ambientales muy graves ocurridos por no tener el estricto cuidado que se requiere en el procedimiento de lixiviación del oro. Uno de estos ejemplos, es el que aconteció en Rumania, en donde se presentó el rompimiento de una barrera de contención de solución de cianuro, produciendo la liberación de esta solución al ambiente, incorporando cianuro y metales pesados a múltiples fuentes de agua en Rumania, Hungría, Yugoslavia y Bulgaria, con la consecuente muerte de peces y cierre de acueductos (Olivero, 2014).

A pesar del riesgo que representa el uso del cianuro, este es un compuesto ampliamente utilizado en diversos procesos de la industria química debido a la facilidad con la cual reacciona con otras sustancias. Dentro de estos procesos, se destacan la producción de nailon, el endurecimiento del acero, las aplicaciones fotográficas, la producción de goma sintética y además se utiliza en diversos productos farmacéuticos como el laetril, una sustancia para combatir el cáncer, y el nitroprusiato, un fármaco para reducir la presión arterial (Shabnam, Yaghmaei, & Ghobadi, 2014).

2.2.2 El cianuro y sus características

El cianuro es un compuesto de origen natural formado por la asociación de dos elementos químicos, nitrógeno y carbono, unidos mediante un enlace triple ($\text{C}\equiv\text{N}$). Se pueden encontrar en la naturaleza diversas especies de cianuro tales

como, cianuro de hidrógeno (HCN) si es un gas o como cristales si es cianuro de sodio (NaCN) o cianuro de potasio (KCN) (Ministerio de minas, 2007). También en formas menos estables como cianuro de níquel o muy estables como el ferrocianuro (Castillo, 2005).

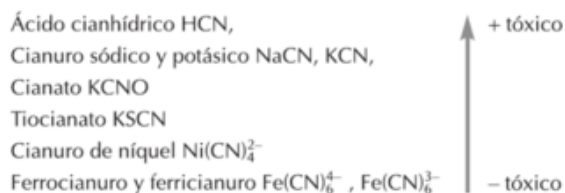


Figura 1. Diferentes formas del cianuro en la naturaleza (Castillo, 2005).

Las plantas son fuentes potenciales de cianuro, ya que cuentan con metabolitos secundarios conocidos como glucósidos cianogénicos, los cuales lo producen a través de un proceso conocido como cianogénesis. En situaciones de peligro, dichos metabolitos son hidrolizados por una enzima y liberan ácido cianhídrico (HCN), el cual es un compuesto altamente venenoso y mortal con el que se deshacen de su enemigo.

Dentro del grupo de glucósidos cianogénicos se pueden encontrar la amigdalina, la linamarina, la durrina, entre otros (López, Gil, & Bello, 2012).

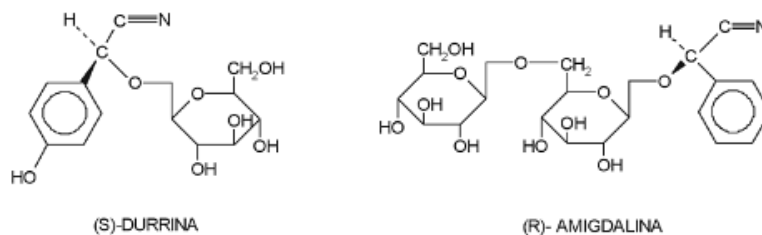


Figura 2. Ejemplo de estructuras de glucósidos cianogénicos. (López, Gil, & Bello, 2012)

Por otra parte bacterias, hongos y algas igualmente pueden utilizar al cianuro como un mecanismo de protección que los convierte en una fuente alimenticia poco atractiva (Castillo, 2005).

2.2.3 Toxicidad del cianuro

La letalidad del cianuro en el ser humano, ya sea por ingesta, absorción o inhalación radica en que al ingresar al cuerpo, llega al torrente sanguíneo y forma un complejo con la enzima citocromo oxidasa, inhibiendo su acción. Esta enzima es la encargada del adecuado flujo del transporte de electrones en las mitocondrias durante la síntesis de adenosin trifosfato (ATP) de las células. De

esta manera, al no funcionar la enzima correctamente, cesan tanto la respiración mitocondrial, como la generación de energía, lo que finalmente lleva a la muerte de la célula y a la imposibilidad de que los tejidos usen el oxígeno, aun si éste se encuentra en abundancia en el cuerpo (Garrido & Teijón, 2006). La falta de oxígeno provoca que el metabolismo cambie de aerobio a anaerobio, lo que conlleva a la acumulación de lactato en la sangre. Este conjunto de efectos, conduce a una depresión en el sistema nervioso central que puede causar paro respiratorio y la muerte (Guerrero, 2010).

La dosis letal de las sales de cianuro en humanos, se ha estimado que está en el intervalo de 200-300 mg para un adulto, y en cuanto a la inhalación de ácido cianhídrico, entre concentraciones de 401-601 mg/m³ (200-300 ppm) (Dirección general de salud pública , 2008).

La dosis letal varía entre especies, como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 1. Efectos de cianuro libre en algunas aves y otras especies. (Donato, Nichols, Possingham, & Moore, 2007)

Especies	Dosis
Pato silvestre	0.53 mg CN/kg
Paloma	1.6 mg CN/kg
Cernícalo Americano	2.12 mg NaCN/kg
Pollo doméstico	11.1 mg CN/kg
Ganado	200 mg HCN/kg
Perro	24 mg NaCN/kg
Ratones	8.5 mg CN/kg

Las diferencias entre especies en la sensibilidad al cianuro no se relacionan con el tamaño del cuerpo, sino más bien con la dieta. Las especies predominantemente carnívoras tienen menos DL50 que los que se alimentan principalmente de material vegetal (Donato, Nichols, Possingham, & Moore, 2007).

2.2.4 Alternativas de degradación del cianuro

Dado que el cianuro no se descompone fácilmente por sí solo y que es un contaminante para las fuentes de agua, y el ecosistema en general, es indispensable que después de que se usa la solución de cianuro para solubilizar el oro, se remueva el cianuro residual que queda de esta solución desprovista del oro, se remueva para evitar perjudicar al ambiente y a la salud humana, razón por

la cual se han usado diversos procedimientos fisicoquímicos para este fin. Entre dichos métodos están la cloración alcalina, la ozonización en presencia de luz ultravioleta, el peróxido de hidrogeno, la adsorción en gránulos de carbono activado, electrólisis, manejo con hipoclorito de calcio y los procesos de aire/dióxido de sulfuro, entre otros (Shabnam, Yaghmaei, & Ghobadi, 2014).

Estos métodos presentan diversas limitaciones y grandes desventajas, ya que representan altos costos, pueden llegar a formar compuestos intermedios aún más tóxicos que el cianuro y a veces no es posible la eliminación completa del mismo, lo que conduce a un incremento en la contaminación del ambiente y un incremento del riesgo para la salud de las personas (Castillo, 2005). En la siguiente tabla se muestran los inconvenientes que se presentan con algunas de estas técnicas:

Tabla 2. Tratamientos fisicoquímicos del cianuro y sus desventajas (Castillo, 2005)

Tratamiento	Inconveniente
Cloración	No elimina ferrocianuros
Electrólisis	No es útil en concentraciones bajas
Precipitación	Genera residuos como ferrocianuro férrico
Ozonización	No es válido para cianuro de cobalto

La biodegradación es una técnica que está fundamentada en el uso de organismos vivos, como bacterias, hongos y plantas para descomponer o degradar componentes químicos en compuestos menos tóxicos para el ambiente y que para ellos es un mecanismo por el cual pueden suplir sus necesidades de nutrientes y energía para su crecimiento (Thieman & Palladino, 2010). Dicha técnica ha tomado fuerza a través de los años para mitigar las nefastas consecuencias que trae consigo la actividad minera tanto legal como ilegal trayendo grandes ventajas en comparación con el uso de las técnicas fisicoquímicas que generalmente son utilizadas, dichas ventajas son: que requiere un menor costo y es muy efectiva, dado que elimina en gran medida los contaminantes del medio ambiente. Como el cianuro es un compuesto biodegradable, ciertos microorganismos pueden incorporarlo en su ruta metabólica como fuente de carbono y nitrógeno.

A través de cuatro diferentes vías se ha evidenciado la biodegradación del cianuro, aunque pueden existir otras vías de microorganismos que se encuentran en estudio. Dentro de las cuatro vías se encuentran: la hidrolítica, la oxidativa, la

reductora y la sustitución/transferencia. Cada una de ellas es dependiente de factores tales como el pH, temperatura, cantidad de oxígeno y la concentración de cianuro (Ebbs, 2004)

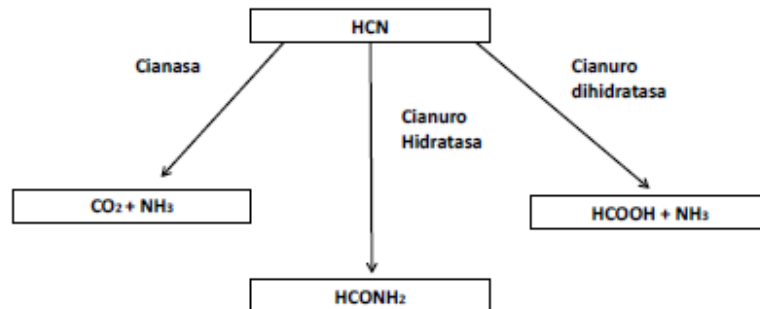


Figura 3. Reacciones hidrolíticas que presentan microorganismos para biodegradar cianuro (Ebbs, 2004).

En las reacciones hidrolíticas, la enzima cianuro hidratasa o cianidasa que se encuentra mayoritariamente en los hongos, es la encargada de convertir el cianuro en productos como la formamida y posteriormente amonio y dióxido de carbono. A su vez, las bacterias cuentan con la enzima cianuro dihidratasa para formar estos mismos productos. Las enzimas anteriormente mencionadas presentan una gran similitud estructural y de aminoácidos con otra enzima conocida como la nitrilasa o nitrilo oxidasa. La nitrilasa y la nitrilo oxidasa, pueden convertir nitrilos alifáticos y nitrilos aromáticos en su respectivo ácido o amida, respectivamente, pero a diferencia de la cianuro hidratasa o cianidasa presentan una menor especificidad por su sustrato (Ebbs, 2004). En este tipo de vía se logra una remoción de cianuro de hasta 200 ppm, pero se requiere de una fuente adicional de carbono, además de la que ofrece el cianuro.

Por otro lado se encuentran las reacciones de oxidación, en las cuales una enzima conocida como cianuro monooxigenasa realiza una conversión de cianuro a dióxido de carbono y amoníaco, pero para ello requiere de NADPH para catalizar esta reacción. Los microorganismos que usan esta vía son capaces de degradar concentraciones altas de cianuro a pH alcalino, pero requieren de un cofactor conocido como pterina para poder lograrlo y una fuente de carbono adicional a la del cianuro (Gupta N. , 2009).

Por su parte, la vía reductora está mediada por una enzima nitrogenasa la cual utiliza HCN para producir metano y amoníaco generalmente bajo condiciones anaerobias (Gupta N. , 2009).

En el siguiente cuadro se destacan algunos organismos que tienen la capacidad de participar en procesos de degradación de cianuro:

Bacterias	Chromobacterium violaceum
	Pseudomonas aeruginosa
	Pseudomonas chloraphilis
	Pseudomonas fluorescens
Algas	Chlorella vulgaris
	Nostoc muscorum
	Plectonema boryarum
	Anacystis nidulans
Hongos	Marasmius oreades
	Stemphyllium loti
	Gloeocercospora sorghii

Figura 4. Organismos cianogénicos (Castillo, 2005)

2.2.5 Viabilidad de cepas bacterianas

Para lograr la preservación de cepas bacterianas en un tiempo determinado, es necesario recurrir a técnicas que cumplan con tres objetivos principales, que son: que el cultivo a conservar sea puro, evitando que se produzcan contaminaciones durante el proceso de conservación; que durante el tiempo de conservación sobrevivan al menos el 70-80% de las células, y por último, que estas células permanezcan genéticamente estables (García & Uruburu, 2011). Dado que los dos primeros objetivos se logran fácilmente, se centra la atención en cumplir el último objetivo, para lo cual se utilizan varios métodos de conservación para los microorganismos. Dentro de estos se encuentran los métodos de conservación a largo plazo, métodos alternativos y métodos restringidos.

Los métodos de largo plazo son los habitualmente utilizados, ya que en estos se paraliza el crecimiento de las células microbianas, pero éstas no han muerto. Logrando de esta manera la máxima estabilidad genética, porque se evita la aparición de generaciones sucesivas (García & Uruburu, 2011). Dentro de estos métodos se destacan la Congelación y la liofilización.

En el método de conservación por congelación, se congelan las bacterias en suspensión con un líquido conocido como agente crioprotector y se guardan a temperaturas inferiores a cero grados centígrados, con lo que el agua se congela. De esta manera, al no disponer las células de agua en forma líquida, no hay crecimiento (García & Uruburu, 2011).

Los agentes crioprotectores son de vital importancia, ya que son aquellos que evitan el daño que se pueda producir en las células microbianas en el momento de la congelación. Existen muchos compuestos que se pueden utilizar como crioprotectores, pero los que se utilizan con más frecuencia son el glicerol y el dimetilsulfóxido (DMSO).

En cuanto al método de liofilización, se realiza un proceso en el que se les elimina el agua a las bacterias por medio de equipos liofilizadores, por lo cual no se presenta el crecimiento de las mismas. También se utilizan crioprotectores, pero en este caso es más recomendable usar el inositol para la mayoría de las bacterias y la leche descremada para hongos y actinomicetos (García & Uruburu, 2011).

Por otro lado, dentro de los métodos alternativos, se encuentran la conservación por transferencia periódica y la conservación por suspensión en agua destilada. Se utilizan cuando no es posible realizar la conservación por congelación o por liofilización, ya sea porque no se cuenta con los equipos requeridos o porque la cepa microbiana no resiste estos tratamientos de conservación.

Finalmente, se tienen los métodos no empleados habitualmente, que se usan cuando las cepas bacterianas no resisten los métodos alternativos o de elección. Su baja demanda, es debida a que no se consigue la estabilidad genética deseada que se logra con los anteriores métodos expuestos. Dentro de estos se encuentran la desecación en papel de filtro, la desecación en suelo, arena, silicagel y la desecación en bolitas de alginato (García & Uruburu, 2011).

2.2.6 Cuantificación de cianuro

Mediante la técnica ionométrica, utilizando el electrodo selectivo al ion cianuro se evaluó la remoción de cianuro. El elemento sensor del electrodo es una membrana sólida que contiene una mezcla de sales de plata moderadamente solubles, cuando esta membrana entra en contacto con el cianuro se desarrolla un potencial que puede medirse con ayuda del electrodo de referencia. La técnica permite medir de manera muy precisa cantidades mínimas de cianuro (entre 0,05 a 10 mg/L) y es un método que presenta grandes ventajas como la rapidez, precisión y sencillez (Marín, 2003) (Nava, 2007).

2.3 Objetivos

2.3.1 Objetivo general

Identificar las condiciones bajo las cuales cepas bacterianas capaces de degradar cianuro presentan un mayor porcentaje de remoción del mismo para su uso potencial en biorremediación.

2.3.2 Objetivos específicos

1. Determinar la viabilidad del uso de cepas bacterianas aisladas previamente en la universidad Icesi
2. Determinar entre los diferentes valores de pH en estudio (7,8,9 y 10), aquel que permita conseguir la mayor tasa de remoción de cianuro
3. Evaluar cuál es la concentración máxima de cianuro que son capaces de tolerar las cepas bacterianas en estudio

2.4 Metodología utilizada

2.4.1 Determinación de la Viabilidad de cepas bacterianas

Los microorganismos en estudio se encontraban criopreservados desde el año 2013 en la universidad Icesi, aplicando el método de congelación, en el cual las bacterias se encontraban en una nevera a $- 80^{\circ}\text{C}$ en tubos eppendorf debidamente rotulados.

Para determinar la viabilidad de estas cepas bacterianas se utilizaron dos procedimientos. En el primero, se realizó un pre-crecimiento de las bacterias en medio enriquecido líquido y en el otro, se evaluó el crecimiento de las bacterias en un medio enriquecido sólido.

Para cada uno de los protocolos, el medio enriquecido (medio E) estaba compuesto de la siguiente manera: KH_2PO_4 1,36 g/L; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g/L; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,01 g/L; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5,0 mg/L; $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2,5 mg/L; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2,5 mg/L; Na_2HPO_4 2,13 mg/L. Como fuente de carbono se adicionaron 20 ml de una solución de glucosa al 20%. A un $\text{pH} \pm 7,2$.

Para realizar el pre-crecimiento, se hizo un inóculo de las cuatro bacterias en estudio, cada una en un erlenmeyer estéril con 50 ml de medio E y se dejaron crecer por 3 días.

Al cuarto día de crecimiento se preparó medio E pero con adición de 18 g/L de agar para preparar un medio sólido, y posteriormente se inocularon las bacterias en dicho medio. Para ello fue necesario previamente el uso de diluciones en serie. Se utilizaron diluciones desde 10^{-1} hasta 10^{-7} , pero únicamente se sembraron las diluciones 10^{-3} , 10^{-5} y 10^{-7} . Este procedimiento se hizo por duplicado.

Así mismo, un mes después las bacterias criopreservadas se someten al procedimiento anteriormente descrito, para evaluar si se presenta algún cambio en el crecimiento de las bacterias después de transcurrido este tiempo.

Determinación del crecimiento bacteriano

Para la determinación del crecimiento de las bacterias, se realizó un conteo directo en la placa, ya que debido al gran tamaño de las colonias se facilitaba su conteo. El conteo de unidades formadora de colonias (UFC) se llevó a cabo en las diluciones 10^{-3} , 10^{-5} y 10^{-7} .

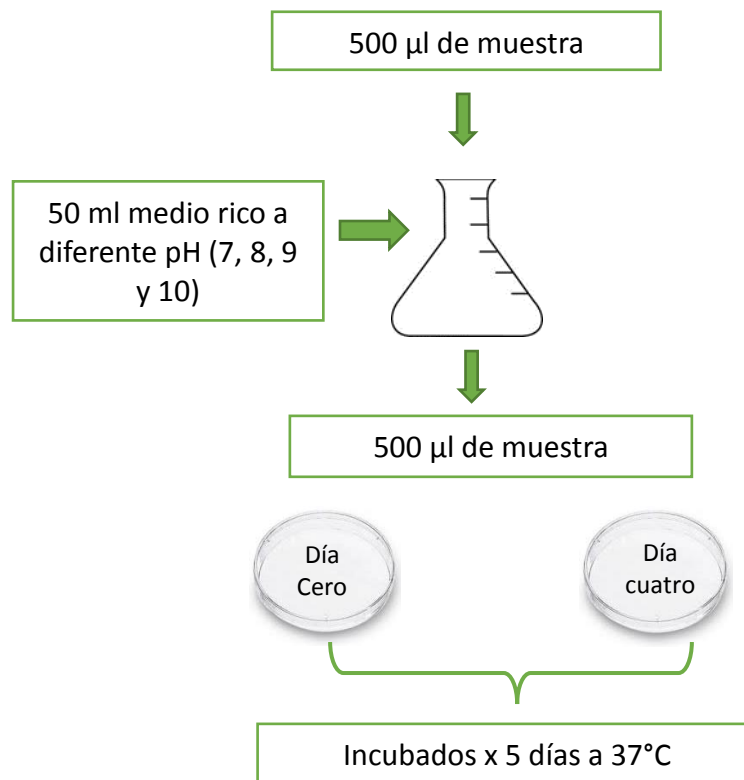
2.4.2 Evaluación de la tolerancia de las bacterias a diferentes pH

Para determinar las condiciones óptimas de degradación de cianuro, fue necesario inicialmente verificar si las bacterias efectivamente crecían a los diferentes pH en estudio (7,8, 9 y 10). Para ello, se prepararon 500 mL de un buffer de fosfatos hasta alcanzar un pH de 7 y 500 mL del mismo buffer hasta alcanzar un pH de 8.

Para la preparación de los buffers de pH 9 y 10, se requirió utilizar un buffer distinto al de fosfatos, ya que este únicamente tiene capacidad buffer hasta pH 8. El buffer que se eligió para alcanzar los pH 9 y 10 fue el de glicina – NaOH.

A cada uno de los buffer se le adicionaron las sales y la solución de glucosa que se adicionaba al medio E. y se procedió a inocular las cuatro bacterias cada una en un erlenmeyer estéril con 50 mL de medio buffer.

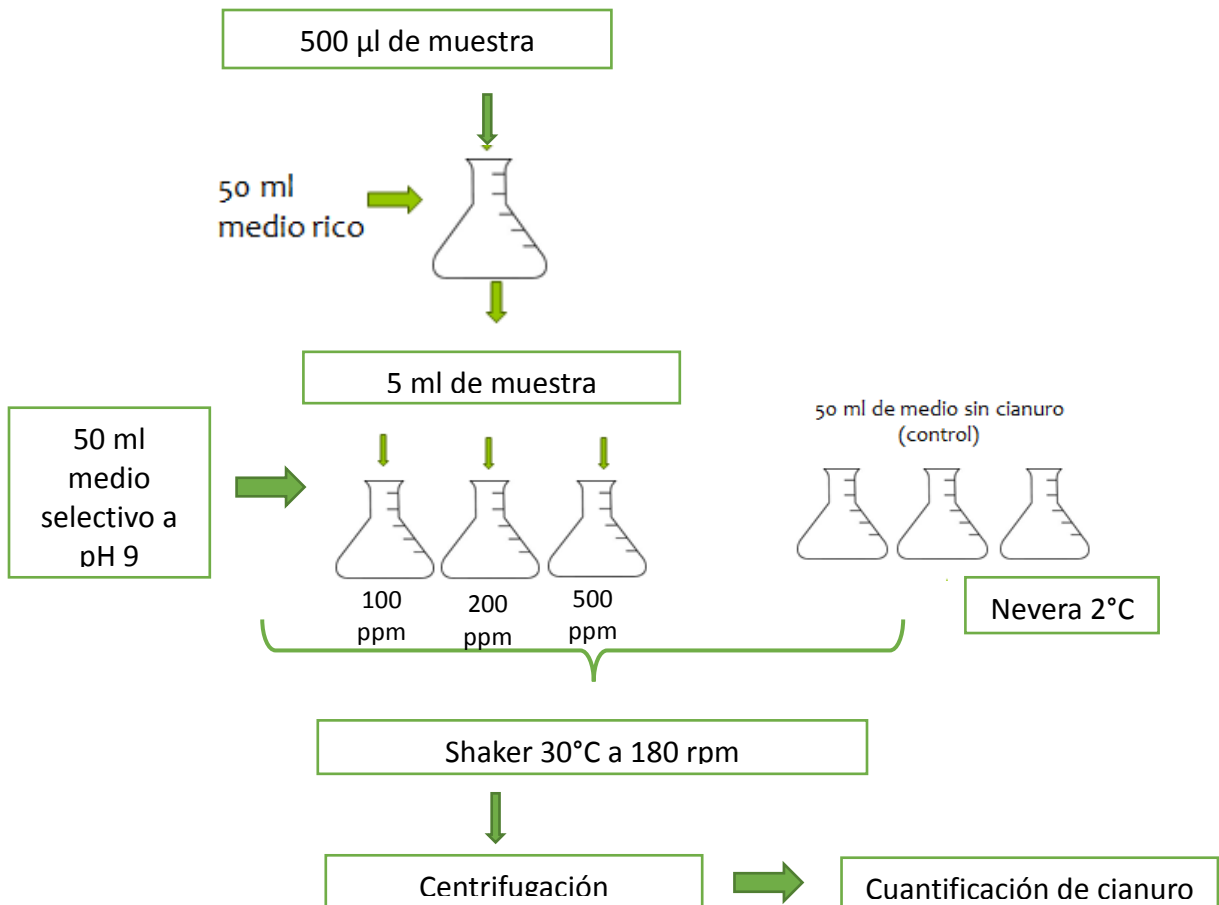
Finalmente, para cada pH, se realizó un control del crecimiento, inoculando las bacterias en medio enriquecido sólido el día cero y el día cuatro. Para esto fue necesario también el uso de diluciones en serie. Para el caso del buffer pH 7 y 8 se sembraron las diluciones 10⁻³, 10⁻⁶ y 10⁻⁷, y para los buffer pH 9 y 10 se usaron las diluciones 10⁻¹, 10⁻² y 10⁻³.



2.4.3 Evaluación del crecimiento bacteriano en medios con diferentes concentraciones de KCN

Después de 3 días de crecimiento de las bacterias en medio enriquecido, estas se colocaron a crecer en 50 mL de medio S con un buffer de glicina-NaOH pH 9 y con diferentes concentraciones de KCN (100, 200 y 500 ppm) en el shaker con agitación 180 rpm y 30°C de temperatura. Adicionalmente, se colocaron dos controles de medio con cianuro, uno en el shaker y otro en la nevera. Además, por aparte se sembraron bacterias en 50 mL de medio enriquecido.

Finalmente, se sembraron en medio sólido enriquecido las bacterias que crecían en medio E líquido y las que crecían en medio S líquido. Esto con el fin de realizar una comparación de la cantidad de bacterias que hubiesen sobrevivido si no se encontraran en un medio expuesto al cianuro.



Cuantificación de la degradación de cianuro

Curva de calibración

Se prepararon 100 ml de una solución patrón de 1000 ppm de KCN en agua destilada, y se realizó una curva de calibración ($R^2 = 0,9949$, anexo gráfico 11), utilizando diferentes soluciones de KCN de concentraciones: 2, 5, 100, 250, 500 y 750 ppm (Mosquera, 2013).

Cuantificación de CN⁻ usando el electrodo ion selectivo

Para realizar la cuantificación de CN⁻ se utilizó el electrodo ion selectivo al CN⁻. El electrodo marca Thomas fue sumergido en las soluciones que contenían

diferentes concentraciones de KCN, siempre desde la solución más diluida hasta la más concentrada

Antes de sumergir el electrodo en cada solución, este se lavaba con agua desionizada y se secaba con suaves movimientos con papel kimwipe. Cada lectura se hacía después de 5 minutos para permitir que el electrodo se estabilizara.

La biodegradación de cianuro se evaluó en un periodo de 5 días y los datos de cada lectura fueron obtenidos en milivoltios (mV).

Preparación de las muestras para cuantificación de CN⁻

El medio de cultivo fue preparado con un inóculo de 500µL de bacterias con 3 días de crecimiento en 50 mL de medio S pH 9. Se tomaron 15 mL de este medio de cultivo y los microorganismos se separaron usando centrifugación. La centrifuga marca eppendorf 2448, se programó a 10700g por 5 minutos. Se obtuvo el sobrenadante y se adicionó a un beaker, para posteriormente realizar la cuantificación con el electrodo. La concentración de KCN se midió a los 5 días de cultivo.

Determinación de la eficiencia de remoción

Para cada caso se realizó la cuantificación de cianuro por medio del electrodo ion selectivo CN⁻

El porcentaje de eficiencia de remoción se determina de la siguiente manera:

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

Dónde:

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

C_r: concentración residual de cianuro en ppm (mg/L)

2.5 Resultados

2.5.1 Determinación de la viabilidad de las cepas bacterianas

Los resultados del gráfico 1 muestran el promedio de crecimiento de las bacterias en un mes.

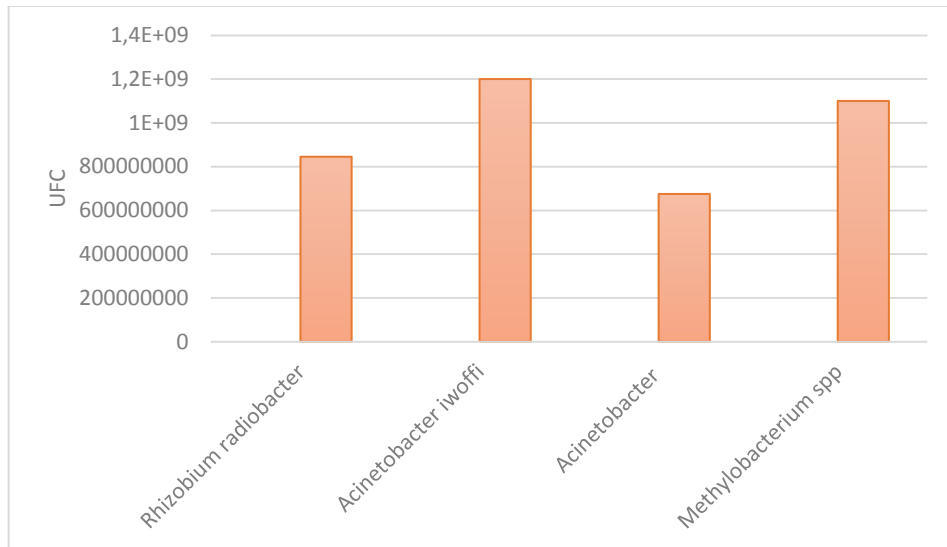


Gráfico 1. Promedio de unidades formadoras de colonia (UFC/ml) en medio enriquecido (medio E) en un mes

Los microorganismos en estudio son: #2: *Rhizobium radiobacter*, #3: *Acinetobacter iwoffi*, #5: *Acinetobacter* y #6: *Methylobacterium spp*

2.5.2 Evaluación de las bacterias a diferentes pH

Con el objetivo de determinar el pH óptimo del medio en el cual se llevarían a cabo los ensayos de biodegradación, se sometieron las bacterias a diferentes pH 7,8, 9 y 10 y se evaluó el crecimiento bacteriano en cada uno de ellos.

En el gráfico 2, que corresponde al crecimiento de las bacterias que han sido sometidas a un medio líquido pH 7, se observa que las bacterias *Rhizobium radiobacter*, y *Acinetobacter* se adaptan fácilmente a este pH y presentan un crecimiento significativo respecto a las bacterias #3 y #6 que empiezan a decrecer.

Por su parte, en el gráfico 3 que corresponde al crecimiento bacteriano en medio a pH 8, se puede observar que las bacterias *Rhizobium radiobacter*, *Acinetobacter iwoffi*, y *Methylobacterium spp* se adaptaron a estas condiciones, ya que el crecimiento en 4 días fue significativo, en comparación a la bacteria #5: *Acinetobacter*.

Por otro lado, en el gráfico 4, que corresponde al crecimiento de las bacterias que han sido sometidas a un medio líquido pH 9, se observa que en general las bacterias se adaptan a estas condiciones, a excepción de la bacteria #5, y presentan un crecimiento moderado en 4 días.

Finalmente, las bacterias se someten a un medio líquido con un pH de 10, sin embargo, no se evidenció crecimiento bacteriano bajo estas condiciones.

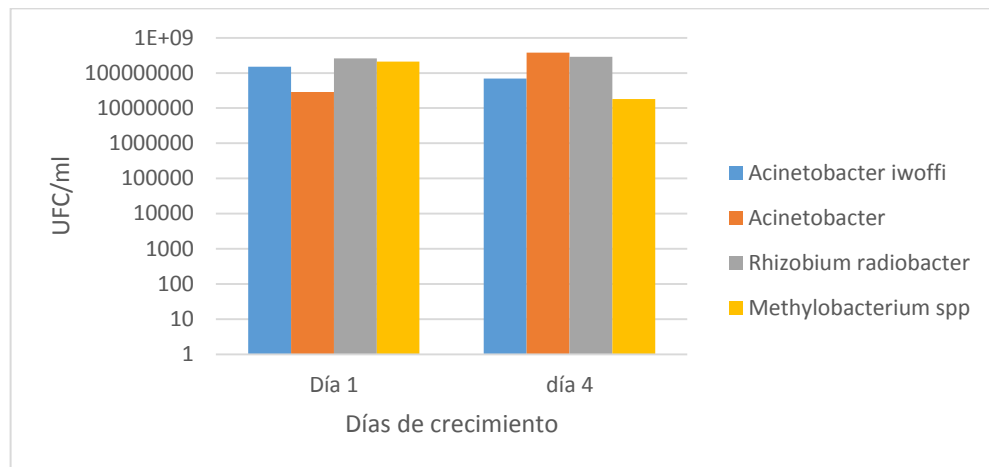


Gráfico 2. Crecimiento de las diferentes bacterias a pH 7

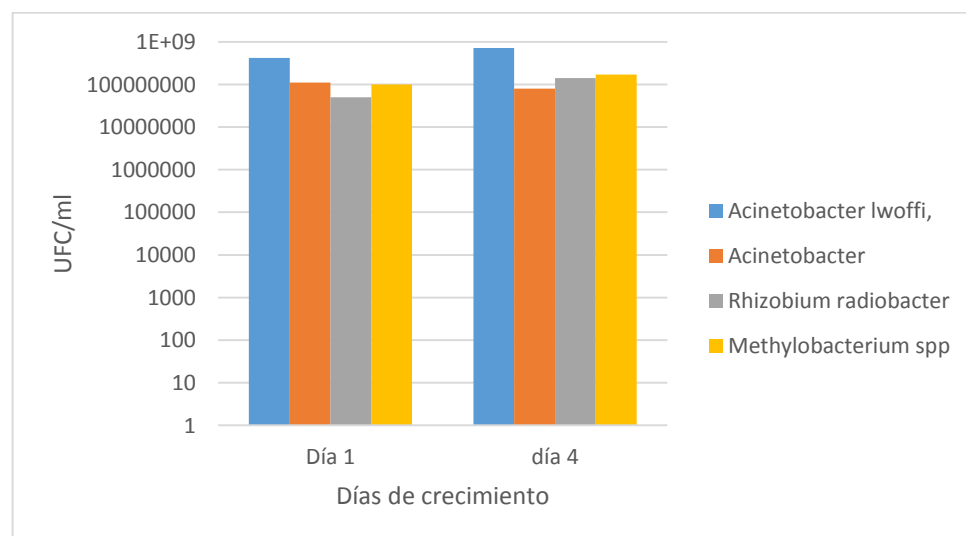


Gráfico 3. Crecimiento de las diferentes bacterias a pH 8

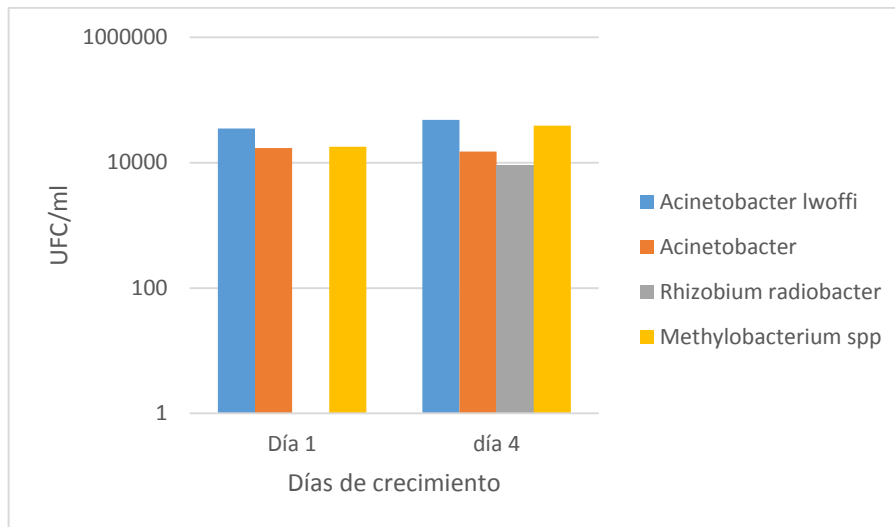


Gráfico 4. Crecimiento de las diferentes bacterias a pH 9

2.5.3 Evaluación de la tolerancia a diferentes concentraciones de cianuro

Con el objetivo de determinar la concentración óptima de cianuro en la cual se evidencia un mayor crecimiento bacteriano, se sometieron a las bacterias en estudio a 3 concentraciones diferentes de cianuro.

En la gráfica 5, se observa que la bacteria #3: *Acinetobacter iwoffi*, presenta el mayor crecimiento a 100 ppm de KCN, y las bacterias #5: *Acinetobacter* y #6: *Methylobacterium spp* también crecen pero en menor cantidad. Por su parte, las bacteria #2: *Rhizobium radiobacter*, no evidenció crecimiento.

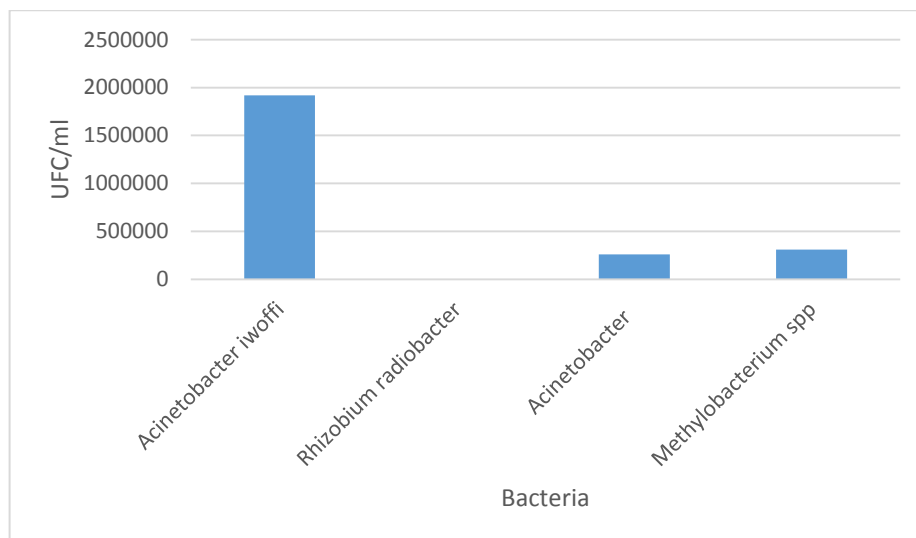


Gráfico 5. Evaluación del crecimiento bacteriano a 100 ppm de KCN

En la gráfica 6, se observa que únicamente la bacteria #3 presenta crecimiento a 200 ppm de KCN.

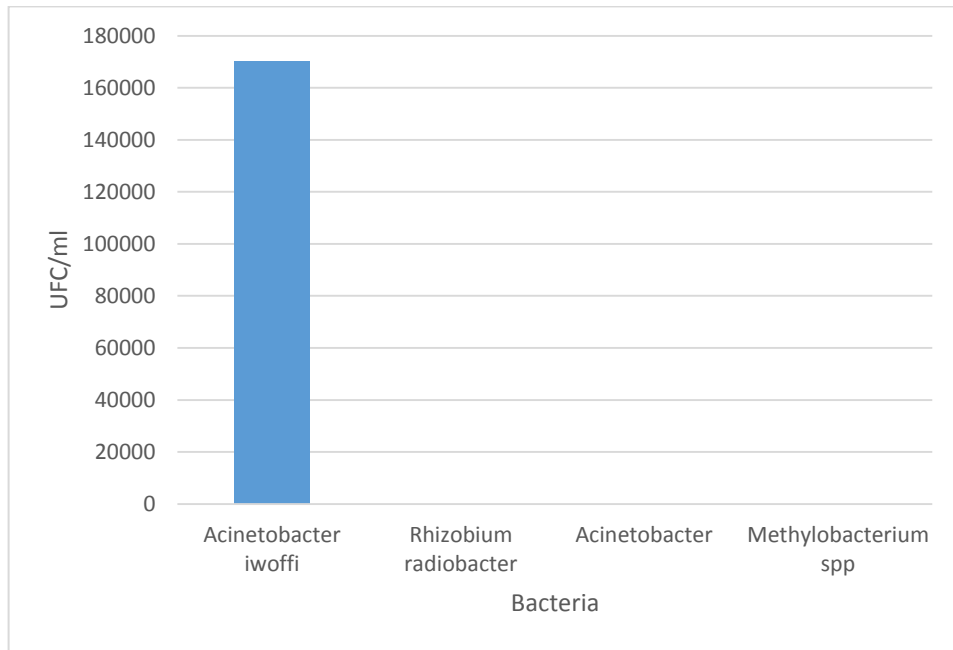


Gráfico 6. Evaluación del crecimiento bacteriano a 200 ppm de KCN

A 500 ppm no se evidenció el crecimiento de ninguna UFC de ninguna bacteria.

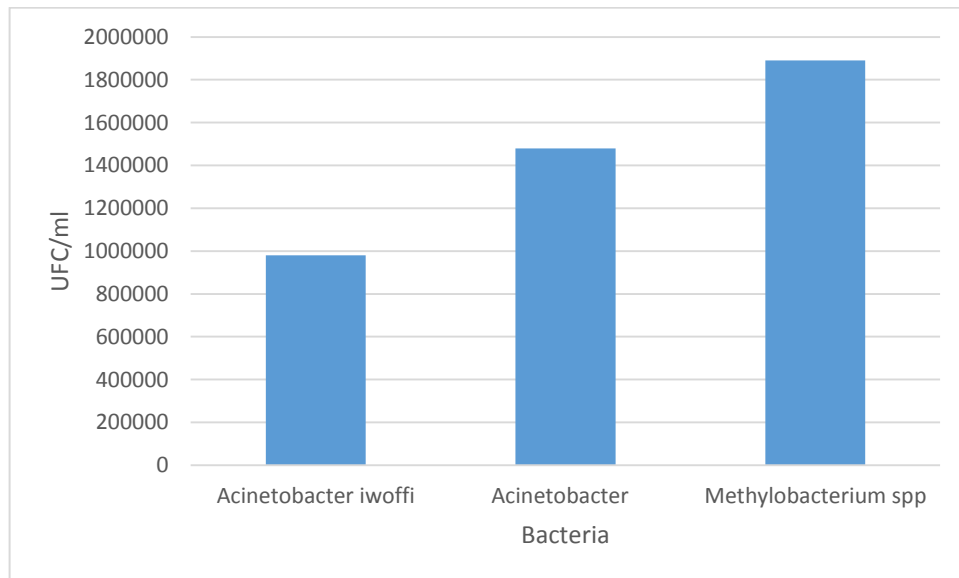


Gráfico 7. Control de crecimiento de bacterias sin KCN

2.5.4 Cuantificación de la degradación de cianuro

Se realizó una curva de calibración con 6 concentraciones conocidas de KCN, empleando como matriz la solución de sales y el buffer de glicina – NaOH pH 9. De esta curva, se obtuvo la ecuación para evaluar la concentración de KCN en el tiempo. Además, se consiguió el coeficiente de correlación que dio un valor de 0,9949, que indica que existe una buena linealidad entre los datos. Cabe mencionar que se utilizó un pH de nueve, debido a que el cianuro es más soluble en este pH.

Ecuación 1. $mv = (-66,326 \times \log(ppm)) - 125,63$

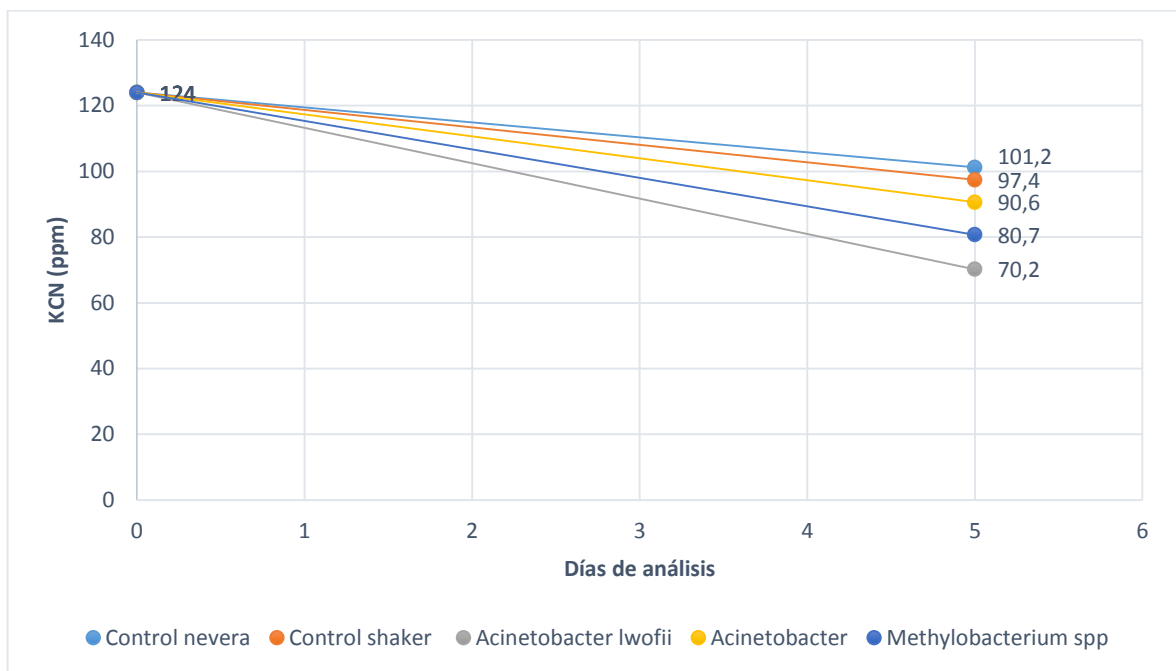


Gráfico 8. Variación de la concentración (124 ppm) de KCN en controles y en bacterias

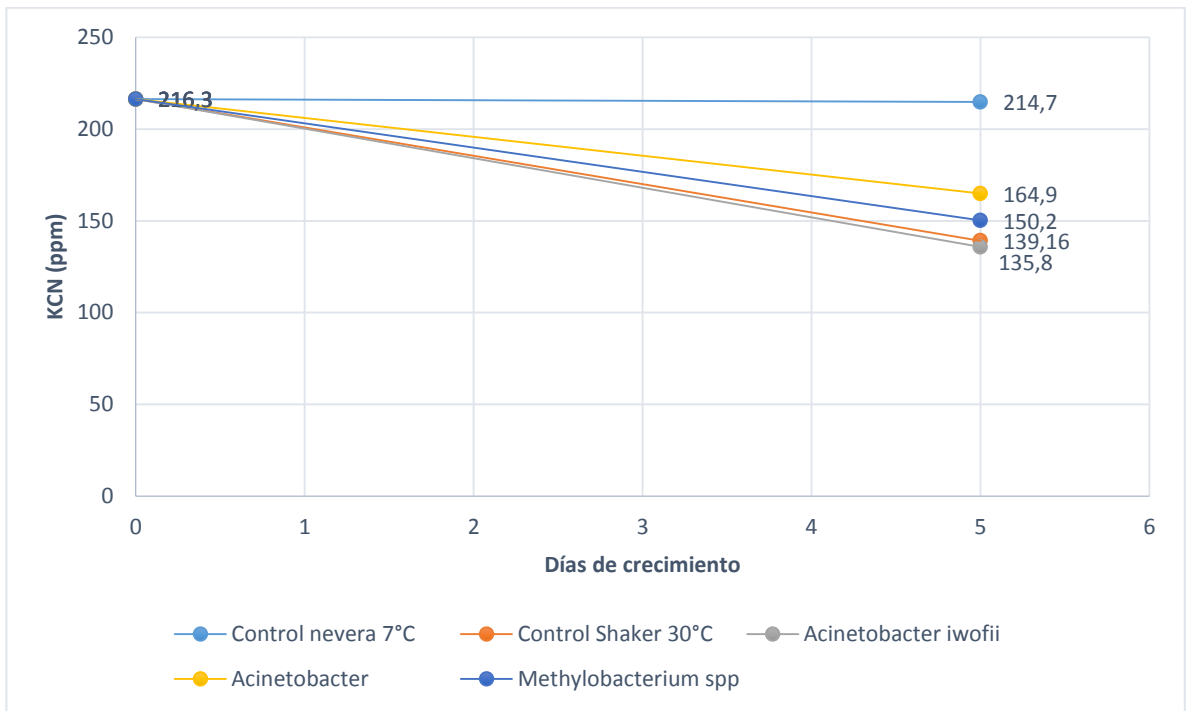


Gráfico 9. Variación de la concentración (216,3 ppm) de KCN en controles y en bacterias

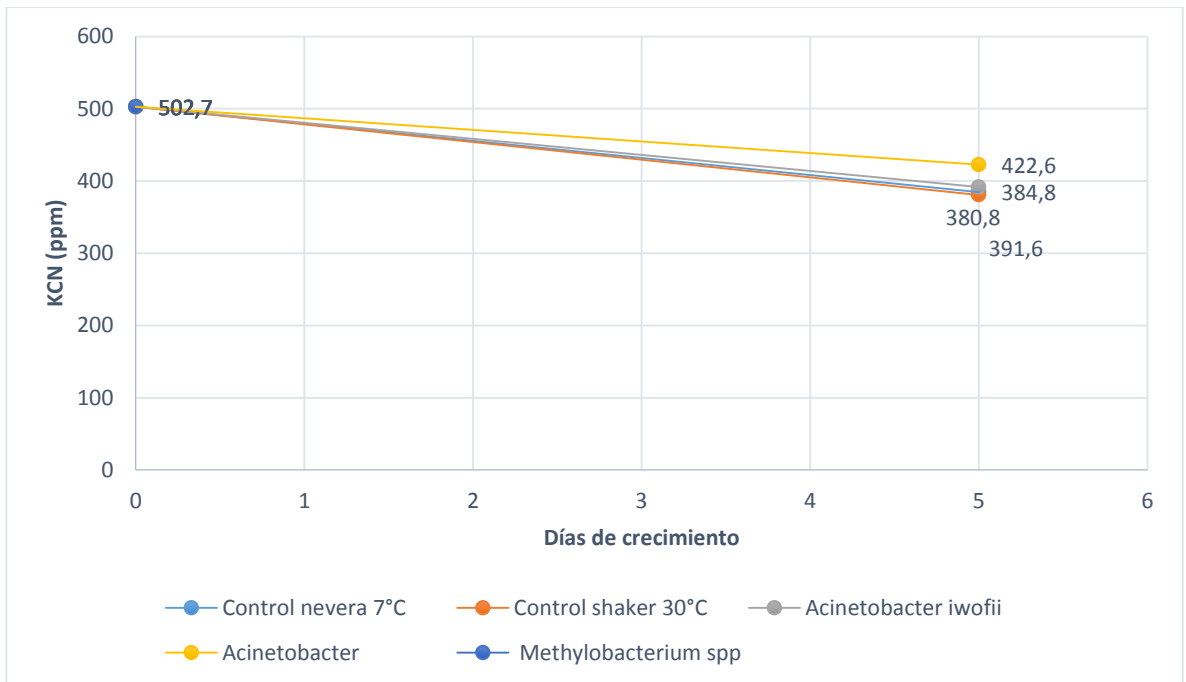


Gráfico 10. Variación de la concentración (502 ppm) de KCN en controles y en bacterias

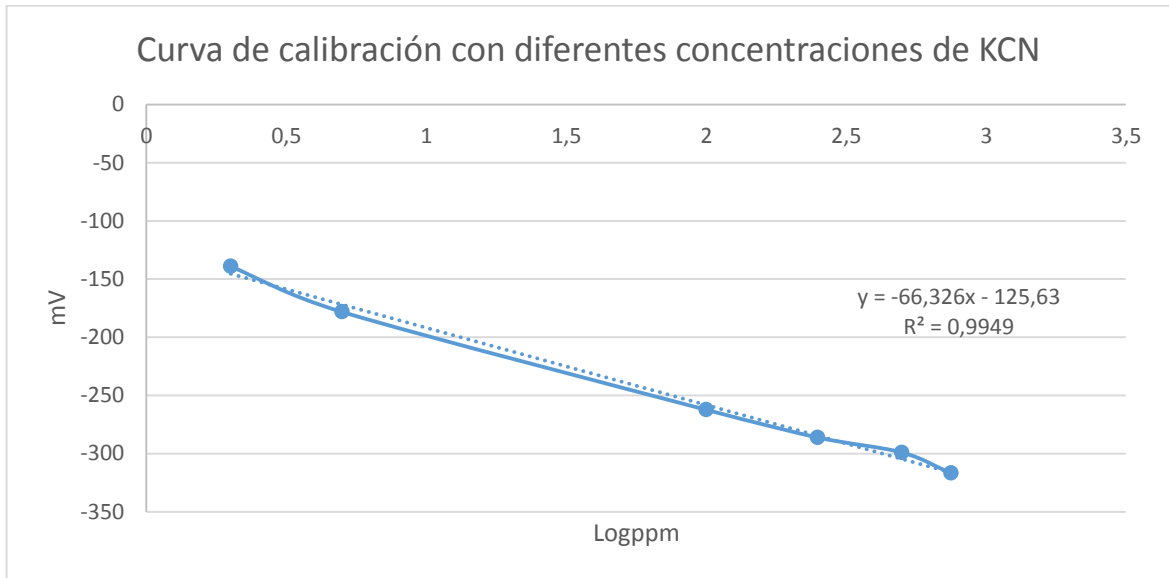


Gráfico 11. Curva de calibración empleada para cuantificar cianuro en un buffer pH 9

Determinación del porcentaje de remoción de cianuro

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

Dónde:

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

C_r : concentración residual de cianuro en ppm (mg/L)

Muestra de cálculo para una concentración inicial de 124 ppm

- Bacteria #3:** $\%RE = \frac{124 \text{ ppm KCN} - 70,2 \text{ ppm KCN}}{124 \text{ ppm KCN}} * 100$

$$\%RE = 43,4\%$$

- Bacteria #5:** $\%RE = \frac{124 \text{ ppm KCN} - 90,6 \text{ ppm KCN}}{124 \text{ ppm KCN}} * 100$

$$\%RE= 26,9 \%$$

- **Bacteria #6:** $\%RE = \frac{124 \text{ ppm KCN} - 80,7 \text{ ppm KCN}}{124 \text{ ppm KCN}} * 100$

$$\%RE= 34,9 \%$$

- **Control shaker:** $\%RE = \frac{124 \text{ ppm KCN} - 97,4 \text{ ppm KCN}}{124 \text{ ppm KCN}} * 100$

$$\%RE= 21,4\%$$

Tabla 3. Resultados de la cuantificación de la degradación de cianuro por parte de la bacteria #3: *Acinetobacter iwofii*

Bacteria N° 3	124 ppm	216 ppm	502 ppm
Disminución de cianuro total por degradación biológica y factores externos (T, pH etc.)	43,4%	37,1 %	21,9%
Disminución de cianuro total por factores externos (T, pH etc.)	21,4%	33,2 %	24,1%
Disminución de cianuro total por degradación biológica	22%	3,9%	

Tabla 4. Resultados de la cuantificación de la degradación de cianuro por parte de la bacteria #5: *Acinetobacter*

Bacteria N° 5	124 ppm	216 ppm	502 ppm
Disminución de cianuro total por	26,9 %	23,6%	15,8%

degradación biológica y factores externos (T, pH etc.)			
Disminución de cianuro total por factores externos (T, pH etc.)	21,4%	33,2 %	24,1%
Disminución de cianuro total por degradación biológica	5,5%		

Tabla 5. Resultados de la cuantificación de la degradación de cianuro por parte de la bacteria #6: *Methylobacterium spp*

Bacteria N° 6	124 ppm	216 ppm	502 ppm
Disminución de cianuro por factores biológicos y factores externos (T, pH etc.)	34,9%	30,4%	16,9
Disminución de cianuro total por factores externos (T, pH etc.)	21,4%	33,2 %	24,1 %
Disminución de cianuro total por degradación biológica	13,5%		

2.6 Discusión

Viabilidad bacteriana

La viabilidad de un microorganismo es la capacidad que tiene de crecer en un medio dado. Si ha sido criopreservado, su capacidad de crecimiento se asocia a una adecuada elección del método de criopreservación.

El método elegido para criopreservar los microorganismos en estudio, fue el de congelación. Para desarrollar este método, fue necesario congelar a las bacterias en una nevera con una temperatura de -80°C en suspensión con glicerol al 50%, quien actuaba como agente crioprotector, y estuvieron en dicho ambiente desde el 2013.

Lamentablemente, no se ha llevado un registro con el cual se pueda comparar el crecimiento bacteriano con el del 2013. Sin embargo, de acuerdo a los resultados obtenidos, se puede afirmar que el método elegido garantiza la conservación de las muestras, ya que se logró demostrar que las bacterias pueden crecer y sobrevivir en un medio enriquecido, aun cuando han estado por un largo tiempo inactivas.

Los datos obtenidos de viabilidad servirán entonces, para que en 6 meses cuando se vuelva a realizar monitoreo del crecimiento bacteriano, se pueda comparar con lo obtenido en este proyecto.

Evaluación del crecimiento bacteriano a diferentes pH

El pH es un parámetro crítico en el cultivo de microorganismos ya que estos sólo pueden crecer en un rango estrecho de pH fuera del cual mueren rápidamente. El pH intracelular es ligeramente superior al del medio que rodea las células ya que, en muchos casos, la obtención de energía metabólica depende de la existencia de una diferencia en la concentración de protones a ambos lados de la membrana citoplásmica (Universidad Navarra, 2008).

Dado esto, el primer paso para realizar el proceso de tratamiento biológico del cianuro, es seleccionar bacterias capaces de tolerar un pH alcalino. Por lo tanto, en la segunda parte del proyecto, se buscó evaluar la tolerancia de los microorganismos en estudio a diferentes pH. Para ello, se sometieron las bacterias a un pre-crecimiento en un medio líquido con sales y distintos buffers (7, 8, 9 y 10) y posteriormente se transfirieron a un medio E sólido anteriormente descrito en la metodología, con el fin de estimar cómo era el crecimiento bacteriano.

Para el caso del crecimiento bacteriano en medio a pH 9, como se observa en el gráfico 2, se muestra el resultado del número de UFC/ml a los días 1 y 4 de

crecimiento. Se evidencia un alto crecimiento por parte de las bacterias #2: *Rhizobium radiobacter*, #6: *Methylobacterium spp* y #3: *Acinetobacter iwoffii*, mientras que la bacteria #5: *Acinetobacter* decrece.

Por su parte, en el gráfico 3 que corresponde al crecimiento bacteriano en medio a pH 8, también se puede observar que las bacterias en general se adaptaron a estas condiciones, ya que el crecimiento en 4 días fue significativo.

Por otro lado, en el gráfico 4 se observa que las bacterias #2 y #5 se adaptan fácilmente a un pH de 7 y presentan un crecimiento significativo, mientras que las bacterias #3 y #6 empiezan a disminuir.

Finalmente, las bacterias se someten a un medio líquido con un pH de 10, sin embargo, no se evidenció crecimiento bacteriano bajo estas condiciones.

Los resultados descritos anteriormente, evidencian que los pH óptimos para realizar el estudio son el de 8 y 9. Y además, teniendo en cuenta, que el cianuro es más soluble entre más alto sea el pH, se escogió el pH 9 para hacer las pruebas de biodegradación de cianuro.

Evaluación del crecimiento bacteriano a diferentes concentraciones de KCN

El cianuro se puede presentar en dos formas dependiendo del pH del medio en el que se encuentre. Con pH alcalino predomina la forma soluble del cianuro, mientras que con un pH ácido en el medio, predomina la forma gaseosa, el ácido cianhídrico (HCN pKa=9,2). Por lo tanto, para mantener el cianuro en disolución y evitar su volatilización y posterior liberación al ambiente, es necesario mantener el medio a un pH alcalino (mínimo pH 9) (Shabnam, Yaghmaei, & Ghobadi, 2014).

Dada esta condición y con el fin de determinar la concentración de cianuro de potasio a la cual se presentó el mayor crecimiento bacteriano, se sometieron cada una de las bacterias a un medio buffer pH 9 con diferentes concentraciones de KCN (100 ppm, 200 ppm y 500 ppm) y sales. De acuerdo al gráfico 5, se observa que las bacterias # 3, #5 y #6 son las únicas que sobreviven al medio con cianuro de 100 ppm. Este resultado es de esperarse, debido a que en diversos estudios se ha evidenciado que los géneros que han sido identificados con un alto potencial de resistencia y degradación de cianuro son: *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, y *Alcaligenes*, y las bacterias #3 y #5 corresponden a una especie del genero *Acinetobacter* (Coley, 2006). Por su parte, la bacteria #6 pertenece al género *Methylobacterium spp*, y se ha encontrado que posee una enzima conocida como la cianasa capaz de romper el enlace C≡N, lo cual puede ser un indicio de que gracias a esta enzima se logra la resistencia y biodegradación de cianuro (Rangel, 2008).

Por otro lado, también era de esperarse que la bacteria #2 que corresponde a la especie *Rhizobium radiobacter*, igualmente conocida como *Agrobacterium tumefaciens*, presentara crecimiento, ya que se ha reportado en estudios previos que existe una variación nueva de *Agrobacterium tumefaciens* SUTS 1, la cual tiene la capacidad de degradar cianuro, con un porcentaje de remoción aproximadamente de 87,50% (Mosquera, 2013). Este resultado probablemente no se dio, debido a que en el medio se evidenció la presencia de un hongo que posiblemente perjudicó el crecimiento de las bacterias, al quitarle parte de los nutrientes que requiere para poder vivir y reproducirse. Además, la concentración de KCN usada es relativamente alta, y puede ser que esta bacteria desarrolle su potencial de biodegradación de cianuro en concentraciones más bajas.

En cuanto al crecimiento en concentraciones de KCN de 200 ppm, se observó que la única bacteria que logró sobrevivir fue la #3: *Acinetobacter iwoffii*, lo cual confirma que esta especie tiene un mecanismo por el cual no es sensible a altas concentraciones de cianuro. Posteriores estudios podrían profundizar en este aspecto y explicar la razón por la cual se logra esto.

Algunos microorganismos capaces de asimilar el cianuro pueden utilizarlo sólo como una fuente de nitrógeno, pero no como la única fuente de carbono. En la molécula de cianuro, el estado de oxidación de C (2, al igual que el CO) y N (-3, como en NH₄⁺) hacen que este compuesto sea una mala fuente de carbono (C) pero una excelente fuente de N para el crecimiento bacteriano (Shabnam, Yaghmaei, & Ghobadi, 2014). Esta explicación, puede ser la razón por la cual las bacterias #5: *Acinetobacter* y #6: *Methylobacterium spp* no crecieron de igual manera en que lo hizo la cepa #3: *Acinetobacter iwoffii* en el medio de 216 ppm. Debido a esto, se recomienda el uso de una fuente adicional de carbono para evaluar si el crecimiento de estas cepas mejora o no.

Finalmente, no se logró evidenciar crecimiento bacteriano a una concentración de 500 ppm, lo cual era de esperarse, ya que es una concentración demasiado alta y nociva que inhibe el crecimiento bacteriano.

Al realizar un análisis comparativo entre las bacterias que crecieron con KCN y las que crecieron con ausencia de este, se evidencia una diferencia significativa, ya que en el medio control (sin KCN) se presenta un crecimiento gigante de todas las bacterias. Por lo cual se establece que el cianuro a ciertas concentraciones es dañino para cada bacteria.

Este análisis es de vital importancia realizarlo, puesto que permite establecer las condiciones en las cuales es posible encontrar con seguridad el microorganismo que tiene una capacidad de realizar una mayor biodegradación del cianuro.

Cuantificación de cianuro

Para determinar los efectos de la cantidad inicial de cianuro, se adicionaron al medio de cultivo cantidades conocidas de cianuro las cuales fueron exactamente 124 ppm, 216 ppm y 502 ppm. Se logró evidenciar que la capacidad biodegradadora varía entre las cepas.

Como se mencionó anteriormente, la bacteria #2 no se tuvo en cuenta, ya que el medio de cultivo se contaminó con hongos.

En cuanto a la bacteria # 3: *Acinetobacter iwoffi*, se observó que fue la que alcanzó la mayor biodegradación de cianuro en comparación con las otras, al someterla a un medio con concentración inicial de 124 ppm obteniendo como resultado final al cabo de 5 días, una concentración de 70,2 ppm de KCN. Este resultado equivale a una remoción del 22% del cianuro del medio (ver tabla 2, gráfico 8).

Por otro lado, las cepas #5: *Acinetobacter* y #6: *Methylobacterium spp*, lograron un porcentaje de remoción de cianuro de 5,5 % y 13,5% respectivamente, que indica que pueden adaptarse en un ambiente con cianuro y poseen capacidad de degradación del mismo, pero posiblemente requieran de una fuente adicional de energía o condiciones menos drásticas para lograr una remoción mayor.

En el caso del medio con concentración inicial de 216 ppm, se obtuvo que la bacteria #3 fue capaz de resistir esta concentración de cianuro y se obtuvo un porcentaje de remoción de este contaminante del 3,9%. En contraste, se evidenció que las bacterias #5 y #6 no realizaron remoción de cianuro, y que la disminución que hubo de este, se dio probablemente a una pérdida por evaporación.

Finalmente, en el medio con concentración inicial de 502 ppm, se evidenció pérdida de cianuro pero no debida a la acción de algunas de las cepas bacterianas, ya que ninguna creció en este medio, sino por factores externos como la temperatura, ya que el shaker se encontraba a 30°C.

Con el rápido avance de la tecnología se han podido esclarecer diferentes rutas de biodegradación de cianuro. Razón por la cual sería de gran ayuda aprovechar estos avances para estudiar a profundidad el mecanismo por el cual la bacteria #3 logra degradar el cianuro. Aunque los porcentajes de remoción no son muy altos, se logró evidenciar que esta bacteria resiste altas concentraciones de cianuro y un pH alcalino fuerte.

2.7 Conclusiones

- Según los resultados obtenidos en el laboratorio, se evidenció que los microorganismos *Acinetobacter*, *Methylobacterium spp* y *Rhizobium radiobacter* no resisten concentraciones de KCN mayores de 200 y 500 ppm.
- Según los resultados obtenidos en el laboratorio, se corroboró que el pH afecta significativamente la actividad microbiana.
- Los controles testigo sirvieron para determinar el nivel de degradación de cada bacteria empleada en el estudio, verificando la efectividad de este proceso frente a las posibles pérdidas de cianuro por volatilización.
- La bacteria que presentó mayor remoción de cianuro fue la #3: *Acinetobacter lwoffii* que presentó un porcentaje de remoción de cianuro de 22% a condiciones robustas de pH y de concentración de cianuro.
- Es importante incluir en este tipo de estudios, métodos de densidad microbiana para realizar una comparación más exacta de biodegradación de cianuro por parte de cada cepa bacteriana.
- El cianuro es un compuesto de gran importancia en la industria minera para lograr la extracción de metales preciosos como el oro , pero su capacidad de persistir en la naturaleza lo hace toxico, por lo cual se deben seguir realizando estudios para mejorar las estrategias de biorremediación y así lograr un ambiente más limpio

2.8 Recomendaciones

Se recomienda buscar una fuente energética adicional para los microorganismos que les permita adaptarse más fácilmente a concentraciones altas de cianuro y su capacidad de biodegradación mejore. Adicionalmente, se recomienda realizar estudios bioquímicos para establecer la ruta de degradación de cianuro de la cepa bacteriana #3, quien fue la bacteria que se destacó con una mayor remoción de cianuro en los medios de 124 y 216 ppm.

Por su parte, el método que se elija para criopreservar bacterias por periodos prolongados de tiempo, deber ser adecuadamente escogido para garantizar la conservación de las propiedades de las bacterias.

Bibliografía

- Castillo, F. (2005). *Biotecnología ambiental*. Madrid: Tébar.
- Coley, T. (2006). *AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS DEGRADADORES*. Medellín: Universidad de Medellín .
- Dirección general de salud pública . (2008). *Riesgo químico - accidentes graves*. Murcia .
- Donato, D., Nichols, O., Possingham, H., & Moore, M. (2007). A critical review of the effects of gold cyanide-bearing tailings solutions on wildlife. *Environment International* , 974-984.
- Ebbs, S. (2004). Degradación biológica de el compuesto cianuro. *Current Opinion in Biotechnology - Elsevier*, 231-234.
- El Tiempo. (24 de junio de 2014). Minería ilegal acaba con ríos chocoanos. *El Tiempo*.
- García, M. D., & Uruburu, F. (2011). La conservación de cepas bacterianas. *Colección Española de cultivos tipo (CECT)*.
- Garrido, A., & Teijón, J. M. (2006). *Fundamentos de bioquímica estructural*. Madrid: Tébar.
- Guerrero, J. (2010). Cianuro: Toxicidad y Destrucción. *El ingeniero de minas*, 22 - 25.
- Gupta, N. (2009). Mecanismo enzimático y bioquímico de la degradación del cianuro . *Journal of Hazardous Materials*, 1-13.
- Gupta, R. (2015). *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents (Second Edition)*. Academic Press.
- Herrera, N. (7 de Noviembre de 2012). Tetequieto a minería ilegal. *El Espectador* .
- Jímenez, C. (2006). *MEDICIÓN DE CIANURO LIBRE POR VOLUMETRÍA EN PRESENCIA DE ESPECIES COBRE-CIANURO*. Monterrey: CINVESTAV-IPN.
- Logsdon, M., Hagelstein, K., & Mudder, T. (1999). *El manejo del cianuro en la extracción de oro* . Ontario.

- López, A., Gil, A. G., & Bello, J. (2012). *Alimentos con sustancias tóxicas de origen natural: plantas superiores alimenticias*. Madrid : Díaz de santos .
- Marín, R. (2003). *Fisicoquímica y microbiología de los medios acuáticos; tratamiento y control de calidad de aguas* . Madrid : Diaz de santos .
- Ministerio de Ambiente y Desarrollo . (2012). SINOPSIS NACIONAL DE LA MINERÍA AURÍFERA ARTESANAL Y DE PEQUEÑA ESCALA. 5 - 12.
- Ministerio de minas. (2007). *Producción más limpia en la minería del oro en Colombia; mercurio, cianuro y otras sustancias*. Bogotá.
- Mosquera, C. (2013). *AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS CAPACES DE DEGRADAR CIANURO PRESENTES EN MUESTRAS OBTENIDAS DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE ALMIDÓN DE YUCA*. Cali: Universidad Icesi.
- Nava, A. (2007). Análisis químico de cianuro en el proceso de cianuración: revisión de los principales métodos . *REVISTA DE METALURGIA*, 24.
- Olivero, J. (2014). *EFECTOS DE LA MINERÍA EN COLOMBIA SOBRE LA SALUD HUMANA*. Obtenido de http://www1.upme.gov.co/sites/default/files/forum_topic/3655/files/efectos_mineria_colombia_sobre_salud_humana.pdf
- Portafolio. (Mayo de 2014). Extracción de oro, por buen camino, pero debe mejorar. *El Tiempo*.
- Ramirez, A. (2010). Toxicidad del cianuro. Investigación bibliográfica de sus efectos en animales y en el hombre. *Scielo Perú*.
- Rangel, A. (2008). Caracterización y regulación fisiológica de enzimas implicadas en la asimilación de nitrógeno orgánico en *Prochlorococcus*. *Universidad de Cordoba* .
- Redacción del País . (25 de julio de 2014). Minería ilegal afecta al 20% del Valle del Cauca, según el Instituto Agustín Codazzi. *El País*.
- Revista semana . (2015). La fiebre del oro acelera la deforestación en Suramérica. *Semana*.
- Semana, R. (2015). El nuevo flagelo que devora a Colombia: La minería ilegal está acabando con las selvas y ríos del país. Informe exclusivo de SEMANA de una tragedia silenciosa. *Semana* .

Shabnam, M., Yaghmaei, S., & Ghobadi, Z. (2014). Biodegradation of cyanide by a new isolated strain under alkaline conditions and optimization by response surface methodology (RSM). *JOURNAL OF ENVIRONMENTAL HEALTH SCIENCE & ENGINEERING*.

Silva, S. (16 de Enero de 2014). La minería en Colombia: la maldición de los recursos naturales. *El Tiempo*.

Thieman, W., & Palladino, M. (2010). *Introducción a la biotecnología*. Madrid : Pearson.

Universidad Navarra. (2008). <http://www.unavarra.es/genmic/micind-2-8.htm>.