

EVALUACIÓN DE UN CONSORCIO BACTERIANO PARA LA REMOCIÓN DE
CIANURO PRESENTE EN ARENAS RESIDUALES DE MINAS DE ORO DEL
MUNICIPIO LOS ANDES, NARIÑO.

ROSARIO ELIZABETH ORTEGA ORTEGA

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
SAN JUAN DE PASTO

2019

EVALUACIÓN DE UN CONSORCIO BACTERIANO PARA LA REMOCIÓN DE
CIANURO PRESENTE EN ARENAS RESIDUALES DE MINAS DE ORO DEL
MUNICIPIO LOS ANDES, NARIÑO.

ROSARIO ELIZABETH ORTEGA ORTEGA

Trabajo de grado

Presentado como requisito para optar el título de:

Bióloga

Asesor

PABLO FERNÁNDEZ IZQUIERDO

Ph.D. en Ciencias Biológicas

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
SAN JUAN DE PASTO

2019

NOTA DE RESPONSABILIDAD

“Las ideas y conclusiones aportadas en el trabajo de grado, son responsabilidades exclusivas de su autor”.

Artículo 1 del Acuerdo N°. 32 de octubre 11 de 1966 emanado por el Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

NOTA DE ACEPTACIÓN

PABLO FERNÁNDEZ IZQUIERDO

ASESOR

DOLLY MARGOT REVELO ROMO

JURADO

IVÁN DARÍO OTERO RAMÍREZ

JURADO

San Juan de Pasto, Septiembre 6 del 2019.

AGRADECIMIENTOS

- En primero lugar quiero agradecerle a mi padre Dios por ser mi motor y por darme la vida para perseguir mis sueños.
- A mis padres y hermana por ser mi apoyo incondicional, por siempre estar conmigo, por dar lo mejor de ellos para que yo pueda lograr esto. Por no dejarme sola y por ser quienes me levantan cuando siento que no doy más.
- Al profesor Pablo Fernández Izquierdo por su asesoría, tiempo, colaboración, paciencia y confianza durante todo el proceso.
- A los jurados, la profesora Dolly Revelo y el profesor Iván Otero por el tiempo invertido y las observaciones realizadas para mejorar esta investigación.
- A la profesora Fedra Ortiz por su guía en la formulación del proyecto de investigación.
- Al grupo de investigación de biotecnología microbiana de la universidad de Nariño por el acceso a los laboratorios, reactivos y equipos
- A la profesora Sonia Mahecha por su guía, correcciones y el tiempo dedicado que permitieron mejorar la presentación de este proyecto.
- A mi gran amiga Tatyana Ruano, a mi amado novio Pablo Lombana y a mi hermosa hermanita Viviana Ortega por su tiempo invertido y su apoyo fundamental en el desarrollo de gran parte de la fase de laboratorio.
- A Yenni Tumbaqui, Javier portilla, Fernando Collazos y Orlando Castro por su ayuda en alguna parte del desarrollo de este proyecto.
- A Alexander Apraez por facilitarme los contactos de los directivos de las minas para poder realizar la toma de muestras y por su colaboración en el préstamo de material de vidriera y reactivos.
- A William Morales por permitirme el acceso y toma de muestras de las minas Cooperativa de pequeños mineros, Los Andes, Nariño y Ecominer S.A.S.

- A Natalia Mosquera, por el acceso a equipos y material de vidriera.
- A los docentes del programa de biología por la formación a lo largo de la carrera.
- Y a todas las personas que hicieron parte de mi vida durante el desarrollo de este proyecto y de mi carrera profesional.

DEDICATORIA

A mis padres, por ser mi mayor inspiración. Todo esto es por y gracias a ellos.

A mi hermana por ser mi mejor amiga.

A mi novio por su apoyo incondicional.

A mi abuelito Carlos Eduardo, quien siempre ha dado lo mejor de sí para nuestra familia.

La nomenclatura de los medios de cultivo alternativos (CE1 y CE2) llevan las iniciales de su nombre.

RESUMEN

El cianuro es un compuesto químico utilizado para la extracción de oro, este provoca la contaminación de fuentes de agua y suelo. Para mitigar su efecto tóxico en el ambiente, se emplean técnicas físicas y químicas que son costosas y algunas generan residuos aún más tóxicos. Como alternativa se emplean microorganismos que tienen la capacidad de eliminar cianuro de los ecosistemas. En Nariño la remoción de cianuro se realiza por métodos tradicionales, como alternativa en biorremediación se aislaron bacterias de las minas de oro de Sotomayor (Nariño), se evaluó su capacidad para degradar cianuro asimilándolo como fuente de carbono o de nitrógeno y se conformó un consorcio con bacterias no antagónicas eficiente para remover esa sustancia. Para evaluar el consorcio se diseñaron dos medios de cultivo con suelo y agua de la región, CE1 con concentración inicial de 300 ppm y CE2 a concentración inicial de 200 ppm. La remoción alcanzada en el medio CE1 y CE2 fue de 30,9% y 19 % respectivamente.

Palabras Clave: Bacterias, Eliminación de KCN, Medio de cultivo alternativo.

ABSTRACT

Cyanide is a chemical compound used to extract gold, this causes the contamination of water and soil sources. To mitigate its toxic effect on the environment, physical and chemical techniques are used that are expensive and some generate more toxic waste. Alternatively, microorganisms that have the ability to remove cyanide from ecosystems are used. In Nariño the removal of cyanide is carried out by traditional methods, as an alternative in bioremediation bacteria were isolated from the gold mines of Sotomayor (Nariño), their ability to degrade cyanide assimilating it as a source of carbon or nitrogen was evaluated and a consortium was formed with non-antagonistic bacteria efficient to remove that substance. To evaluate the consortium, two culture media were designed with soil and water from the region, CE1 with an initial concentration of 300 ppm and CE2 at an initial concentration of 200 ppm. The removal achieved in the CE1 and CE2 medium was 30.9% and 19% respectively.

Keywords: Bacteria, KCN Elimination, Alternative culture medium

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	15
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
3. JUSTIFICACIÓN	21
4. OBJETIVOS	23
4.1. Objetivo general	23
4.2. Objetivos específicos	23
5. MARCO TEÓRICO	24
5.1. Cianuro	24
5.1.1. Aplicaciones del cianuro en la industria	24
5.1.2. Toxicidad y contaminación del cianuro	26
5.2. Métodos para eliminar contaminación por cianuro en plantas de extracción de oro.	27
5.2.1. Métodos físicos.	28
5.2.2. Métodos químicos.	28
5.3. Biorremediación de cianuro.	29
5.3.1. Microorganismos degradadores de cianuro.	30
5.5. Medios de cultivo para crecimiento de microorganismos degradadores de cianuro.....	37
5.5.1 Disponibilidad de nutrientes.	38
5.5.2 Temperatura.	38
5.5.3 El efecto del pH.....	38
5.6. Antecedentes	38
6. METODOLOGÍA	42
6.1. Diseño de muestreo	42
6.1.1. Aislamiento, purificación y conservación de bacterias resistentes a cianuro de potasio	45
6.2. Selección de bacterias aisladas de arenas residuales y piscinas de cianuración del municipio de Sotomayor, para conformar un consorcio bacteriano con actividad para la degradación cianuro de potasio.....	46
6.3. Caracterización bioquímica de las bacterias seleccionadas para conformar el consorcio bacteriano.	48
6.4. Diseño de medios de cultivo alternativos para el crecimiento de un consorcio de bacterias degradadoras de cianuro.	48
6.5. Determinación de la eficiencia del consorcio bacteriano para degradar cianuro en los nuevos medios de cultivo diseñados.	48

6.6. Análisis estadístico.....	49
7. RESULTADOS.....	51
7.1. Aislamiento, purificación y conservación de bacterias resistentes a cianuro de potasio. 51	
7.1.1 Selección de bacterias aisladas de arenas residuales y piscinas de cianuración del municipio de Sotomayor.	51
7.1.2 Evaluación de la actividad antagónica.....	52
7.2 Caracterización bioquímica de las bacterias seleccionadas para conformar el consorcio bacteriano.	54
7.3 Diseño de medios de cultivo alternativos para el crecimiento de un consorcio de bacterias degradadoras de cianuro.....	55
7.4 Determinación de la eficiencia de consorcios bacterianos para degradar cianuro en los nuevos medios de cultivo alternativo.....	56
8. DISCUSIÓN.....	59
9. CONCLUSIONES	66
11. BIBLIOGRAFÍA.....	68
12. ANEXOS	72

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Dosis letal cianuro libre en algunas aves y otros animales.....	26
Tabla 2. Microorganismos con capacidad degradadora de cianuro	31
Tabla 3. Tipos de reacciones, con la enzima correspondiente y la reacción	35
Tabla 4. Composición de los medios de cultivo M9-A y M9-B.....	46
Tabla 5. Crecimiento de aislados bacterianos en los medios de cultivo M9-A, M9-B y a pH 9,5.....	51
Tabla 6. Fórmula de los medios de cultivo CE1 y CE2.	55
Tabla 7. Parámetros cinéticos de crecimiento y biodegradación del consorcio bacteriano (DA1-1 y DA2-4) en los medios M9, CE1 CE2.....	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de minas de oro del municipio de Sotomayor donde se colectaron las muestras. Fuente: En este estudio.	42
Figura 2. Piscina uno de cianuración ubicada en la mina cooperativa de pequeños mineros los Andes, localizada en el municipio de los Andes Sotomayor, Nariño.....	43
Figura 3. Piscina dos de cianuración ubicada en la mina cooperativa de pequeños mineros los Andes, Nariño. La piscina fue dividida en tres parcelas para la toma de muestras. Fuente: Este estudio.	43
Figura 4. Depósito de arena uno ubicada en la mina Ecominer SAS, en Sotomayor, Nariño.. ..	44
Figura 5. Depósito de arena dos ubicada en la mina Ecominer SAS, en Sotomayor, Nariño	45
Figura 6. Fotografías de cajas Petri con bacterias sembradas por estría cruzada sobre cultivo M9 incubado a 30°C por 72 horas	53
Figura 7. Crecimiento de DA1-1, DA2-4 y el grupo conformado por estas dos bacterias, cultivado en caldo M9 por 120 h a 30°C.....	54
Figura 8. Crecimiento de DA1-1, DA1-8 y el grupo conformado por estas dos bacterias, cultivado en caldo M9 por 120 h a 30°C.....	54
Figura 9. Crecimiento del consorcio microbiano compuesto por las bacterias DA1-1 y DA2-4, evaluado en los medios CE1, CE2 y M9.	57
Figura 10. Degradación de KCN por el consorcio microbiano compuesto por las bacterias DA1-1 y DA2-4, evaluado en los medios CE1, CE2 y M9.....	57
Figura 11. ‘’ Ruta de asimilación de cianuro en <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344.. ..	61

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Fotografías en agar M9 de los microorganismos aislados de las dos minas.	72
Anexo 2. Fotografías de la tinción de Gram de los microorganismos aislados.	74
Anexo 3. Aislados bacterianos obtenidos de diferentes puntos de muestreo en las plantas de beneficio de oro en los Andes Sotomayor. Se empleó como medio de cultivo M9 suplementado con cianuro a 100 ppm. La planta 1 es: Cooperativa de pequeños mineros Los Andes, Nariño y la planta 2 es Ecominer S.A.S.	77
Anexo 4. Análisis fisicoquímico del suelo, realizado en la Universidad de Nariño.	78

1. INTRODUCCIÓN

Los compuestos químicos que contienen el ion CN^- (cianuro) se utilizan en diferentes sectores industriales para el procesamiento de fotografías, así como para producir plástico, maquillajes, purificación de metales pesados como el oro y la plata, entre otras (Garcés Molina, Agudelo Betancourt, Macias Mazo, & Salinas Alzate, 2006; Razanamahandry, Karoui, Andrianisa, & Yacouba, 2017). En las actividades mineras de limpieza del oro los residuos cianurados luego de tratamientos físicos y químicos, son dispuestos en el ambiente, en la mayoría de los casos estos residuos presentan concentraciones de cianuro el cual puede contaminar el suelo y las fuentes de agua, constituyendo en un factor de riesgo para la salud y la biodiversidad porque es altamente toxico para la vida (Cabello, et al., 2018). Es por eso que el uso de microorganismos es una estrategia valiosa para el tratamiento de residuos con presencia de sustancias cianuradas, ya que estos organismos pueden asimilar el cianuro como fuente de carbono y nitrógeno (Luque-Alamargo, Moreno, & Roldán, 2016).

En el departamento de Nariño existen varios municipios que derivan su economía de la extracción y procesamiento del oro como el municipio de los Andes Sotomayor, en este municipio las plantas de beneficio utilizan tratamientos físicos y químicos para el procesamiento de arenas cianuradas que son depositadas a cielo abierto en zonas de pendiente y que aún contienen concentraciones de cianuro.

Con el fin de contribuir a la solución de este problema ambiental se planteó un estudio para conformar un consorcio de bacterias cultivables silvestres aisladas de las plantas de tratamiento de oro del Municipio de los Andes Sotomayor las cuales se caracterizan porque pueden asimilar cianuro como fuente de carbono o nitrógeno.

Igualmente es de señalar que los estudios de degradación de cianuro se realizan con medios de cultivo químicamente definidos, los cuales pueden resultar costosos si se desea implementar una estrategia de remoción de cianuro bajo condiciones de campo. En

consecuencia, se diseñaron dos medios de cultivo CE1 y CE2 con sustratos de la región de fácil acceso para los mineros, con una concentración inicial de cianuro de 300 ppm y 200 ppm, respectivamente, el consorcio bacteriano conformado por *Bacillus megaterium* y *Pseudomonas aeruginosa* presentó una remoción de cianuro de 30.9% y 19% respectivamente. Este dato es importante como referente para futuras investigaciones bajo condiciones de campo.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cianuro es un compuesto químico empleado en la industria por su composición y facilidad de reaccionar con otras sustancias (Guerrero, 2005; Mirizadeh, Yaghmaei, & Nejad, 2014). Por ejemplo, se utiliza en: la producción de químicos orgánicos como nailon, nitrilo y plástico acrílico, y en minería para purificar el oro a través de la lixiviación (Garces Molina, et al., 2006; Razanamahandry et al., 2017).

Un proceso que más desechos con cianuro produce es la extracción de oro, lo cual causa graves daños ambientales, porque hay contaminación de las cuencas hídricas, del suelo, además, se presenta pérdida de biodiversidad, destrucción de hábitats, entre otros (Cabello, et al, 2018; Javaheri Safa, Aminzadeh, Zamani, & Motallbi, 2017). Para los animales y el ser humano esa sustancia resulta tóxica, ya que forman complejos con metales (Fe, Au, Cd, Mn y Cu) los cuales actúan como cofactor de enzimas (Kumar, et al, 2016; Kao, Liu, Lou, Lin, & Chen, 2003) interviniendo principalmente en la respiración e inhibiendo la producción de ATP (Cardona Giraldo, 2015; Morillo Mendoza & Guevara Gonzales, 2015).

Para disminuir la contaminación con cianuro se emplean técnicas tanto químicas como físicas. Entre los métodos físicos se encuentra el uso de luz UV, pero no es tan conveniente porque no cubre todas las áreas contaminadas y es un proceso demasiado lento (Morillo Mendoza & Guevara Gonzales, 2015). Mientras que el método químico más utilizado es la cloración alcalina, en donde se obtiene cianato que es considerado menos tóxico; aun así usan químicos que causan otro tipo de contaminación, por ejemplo, en la oxidación de cianuro con hipoclorito de calcio se libera cloro residual y cloruros al medio; la exposición de estos compuestos a largo plazo es peligrosa porque son considerados como carcinogénicos, mutagénicos, teratogénicos, productores de enfermedades respiratorias y encefalopatías crónicas (Fajardo, Burbano, Burbano, Apraez, & Rosero, 2010; Morillo Mendoza & Guevara

Gonzales, 2015). Además, los tratamientos químicos y físicos son costosos, necesitan infraestructura compleja y son inespecíficos metal-cianuro (Cabello, et al., 2018).

Es así que, para degradar cianuro, derivados de cianuro y complejos con metal una buena opción son los microorganismos que lo pueden asimilar al tomarlo como fuente de carbono o de nitrógeno y obtener productos finales menos peligrosos y no tóxicos, tales como formamida, ácido fórmico y amoníaco (Mirizadeh et al., 2014; Kumar et al., 2016). Entre las bacterias con potencial degradador se encuentran las pertenecientes a los géneros:

Pseudomonas, *Acinetobacter*, *Burkholderia*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Serratia*, *Streptomyces*; y hongos de los géneros: *Fusarium*, *Gliocladium* y *Trichoderma* (Mirizadeh et al., 2014; Kumar et al., 2016; Morillo y Guevara, 2015; Luque, et al. 2005; Manso, et al., 2015).

Se han realizado varios estudios que demuestran la eficiencia de algunos microorganismos para degradar cianuro con condiciones de laboratorio, por ejemplo: Coley y Zapata (2006) aislaron, purificaron e identificaron a: *Pichia ohmeri*, *Exophiala* sp., *Candida* sp., *Staphylococcus* sp., los cuales tuvieron un porcentaje de remoción de cianuro del 97% a una concentración de 150 mg/L. Así mismo Javaheri, et al., (2017) aislaron a *Bacillus* sp. M01 y estudiaron la capacidad de degradar cianuro a una concentración de 562 mg /L con una eficiencia del 86% en 48 h.

Es de señalar que en el año 2004 se realizó un trabajo de investigación por Benavides (2004), donde se reportaron 16 microorganismos de los géneros *Pseudomonas*, *Klebsiella* y *Chromobacterium*, aislados de la mina Nueva Esparta en el Municipio de los Andes Sotomayor en Nariño. Sin embargo, hasta la fecha no se ha implementado ninguna estrategia con microorganismos nativos para mitigar la contaminación derivada de las arenas cianuradas en Nariño. En la mina nueva Esparta en el municipio de Sotomayor las arenas residuales se depositan a cielo abierto y se encontró la mayor concentración de cianuro libre es de 433.33 ppm, lo cual representa un alto riesgo para el ambiente si se presentan las descargas sin

previo tratamiento (Fajardo et al., 2010). Además, en Colombia la ley contempla que los residuos contaminantes deben ser tratados al momento de ser vertidos, y que la concentración de CN debe ser encontrado con un valor máximo de 1 ppm (Giraldo, Gil, Camargo y Ossa, 2006; Cardona, 2015).

Al respecto, una de las tendencias para remover sustancias contaminantes del ambiente es el uso de consorcios bacterianos, porque se genera una mayor eficiencia para degradar cianuro (Kandasamy, Dananjeyan , & Krishnamurthy, 2014; Nwokoro & Uju Dibua, 2014; Cornejo, 2016), es necesario usar estos microorganismos a escala de laboratorio para realizar tratamientos y tecnologías, como el desarrollo de biorreactores aeróbicos y anaeróbicos que permitan aumentar la remoción de cianuro (Kumar, et al., 2016; Cabello, et al., 2018).

No obstante, también es necesario establecer las mejores relaciones entre las variables biológicas y operacionales para asegurar la eficiencia del sistema de descontaminación (Restrepo , Montoya, & Muñoz, 2006; Cabello, et al., 2018; Guerrero, 2005). Entre los anteriores factores, las variables biológicas son la base para realizar los estudios de las variables operacionales. Al respecto entre las variables biológicas se encuentran, características metabólicas del modelo biológico, la composición del consorcio microbiano, edad y concentración del inóculo y la composición del medio de cultivo adaptado a las condiciones de campo.

Por último, es de señalar que las condiciones de laboratorio son diferentes a las condiciones de campo en donde existen variables que inciden directamente en la actividad de los microorganismos y enzimas como el caso del suelo que presenta varias cantidades de minerales algunos de los cuales podrían actuar como inhibidores (Chakraborty, Wu, & Hazen, 2012), por lo que es necesario diseñar un medio de cultivo alternativo para que se pueda realmente aplicar en las zonas contaminadas con cianuro, utilizando fuentes de

carbono y nitrógeno como cianuro, sacarosa y nitrato, suelo y agua de la región como fuentes de micronutrientes.

En atención a los anteriores argumentos se plantea la siguiente pregunta de investigación:

¿En qué medida un consorcio con bacterias silvestres y medio de cultivo son más eficientes para la remoción de cianuro, procedentes de las minas de oro del municipio de los Andes Sotomayor del departamento de Nariño, a escala de laboratorio?

3. JUSTIFICACIÓN

Para procesos de biorremediación como la eliminación de cianuro de suelo y agua contaminados, lo ideal es el uso de microorganismos nativos para que no se altere el ecosistema natural, ya que al ingresar microorganismos ajenos se podría afectar las interacciones que se estén presentando o generar patogenicidad en las siembras aledañas o para el ser humano. El uso de bacterias resulta ser más económico, son procesos más eficientes y los productos que se generan no son tóxicos. Además, las bacterias deberían usarse conformando consorcios con base en el análisis de las interacciones ecológicas para evitar los antagonismos microbianos. Estos consorcios se realizan para aumentar la eficiencia de remoción de cianuro.

Por otro lado, la relevancia de esta investigación radica en el aislamiento y conformación de un consorcio bacteriano con capacidad para degradar cianuro. De esta manera se sientan bases para futuras investigaciones, porque estos microorganismos pueden ser utilizados para realizar procesos de biorremediación en las minas de oro del municipio de Sotomayor en el Departamento de Nariño. Así mismo con la conformación de dos medios de cultivo alternativos permitieron sentar bases para el desarrollo de una tecnología para la solución de un problema ambiental porque se sentaron las bases para establecer las variables operacionales.

No obstante, el mayor aporte de la presente propuesta recae en la población minera de Nariño y Colombia. La extracción de oro en Colombia se realiza en Antioquia, Chocó, Córdoba, Bolívar, Caldas y Nariño abarcando aproximadamente 5 millones de hectáreas. La mayor zona de explotación se encuentra en el norte de Antioquia y el Sur de Bolívar, con aproximadamente 12.400 minas (Cardona Giraldo, 2015).

Para Nariño, esta actividad se distribuye en distritos tales como: el Distrito Minero Mallama - Cumbitara (Los Andes-Sotomayor), el Distrito Minero de Pasto - San Pablo, el

Distrito Minero de Barbacoas, el Distrito Minero de los Alisales - Monopamba - Patascoy y el Distrito Minero del Mira - Guiza. Existen 204 explotaciones de las cuales el 49.75% corresponden a extracción de oro de filón o aluvial, con esta actividad se genera empleo a 16.000 personas en la Región Andina y Pacífica y además la economía de Nariño depende en un 8% a la extracción de oro (Copenariño, 2007).

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Evaluar un consorcio de bacterias silvestres procedentes de las minas de oro del municipio de los Andes Sotomayor del departamento de Nariño y un medio de cultivo alternativo para la remoción de cianuro, a escala de laboratorio.

4.2. Objetivos específicos

1. Seleccionar bacterias aisladas de arenas residuales y piscinas de cianuración de las minas de oro cooperativa de pequeños mineros los Andes y Ecominer SAS del municipio de Sotomayor, para conformar un consorcio bacteriano con actividad para degradar cianuro de potasio.
2. Diseñar medios de cultivo alternativos para el crecimiento de un consorcio de bacterias degradadoras de cianuro de potasio.
3. Determinar la eficiencia del consorcio bacteriano para degradar cianuro de potasio en el medio de cultivo diseñado para tal fin.

5. MARCO TEÓRICO

5.1. Cianuro

El cianuro es un compuesto químico que tiene en su estructura carbono y nitrógeno unidos mediante tres enlaces (Guerrero, 2005; Mirizadeh, et al., 2014). A todos los compuestos que tienen esa característica se denominan cianuro (Tuya-Salas, 2014) y se puede encontrar en el ambiente de tres maneras: formando sales, complejos con metales y en forma libre. Las principales sales inorgánicas encontradas son cianuro de sodio (NaCN), cianuro de potasio (KCN) y cianuro de hidrógeno (HCN); por otro lado, el cianuro forma complejos cianuro-metal, con los siguientes metales: Cd, Co, Cu, Ni, Au y Fe, este último es con el que presenta mayor afinidad (Guerrero, 2005; Kumar, et al., 2016; Razanamahandry, et al., 2017). Por último, se encuentra la forma libre como ion cianuro ($-\text{CN}$) (Kumar, et al., 2016; Razanamahandry, et al., 2017).

En la naturaleza más de 2000 plantas son consideradas cianogénicas, entre las cuales se incluye: almendras, albaricoques, bambúes, frijoles germinados, cerezas, aceitunas, papas, sorgo, y nueces, producen cianuro como método de defensa o en poscosecha (Guerrero, 2005; Razanamahandry, et al., 2017), Por otro lado, ciempiés, escarabajos, polillas, mariposas, algas, hongos y bacterias producen cianuro para competir o defenderse. Cabe señalar que la cantidad de cianuro producido por los seres vivos se encuentra en niveles mínimos por lo cual no se considera contaminante (Guerrero, 2005; Kumar, et al., 2016; Razanamahandry, et al., 2017).

5.1.1. Aplicaciones del cianuro en la industria.

Por las propiedades físico-químicas que tiene el cianuro es ampliamente utilizado en la industria, por ejemplo: se usa en la fabricación de papel, de textiles y plásticos, en fotografía para revelar fotos, como plaguicida para controlar plagas de roedores e insectos, en la realización de maquillaje, para producción de químicos orgánicos como nailon, nitrilo y

plástico acrílico, en la elaboración de medicamentos como laetril (combatir el cáncer) y nitroprusiato (tratar la presión arterial), y en minería para purificar metales preciosos como el oro mediante procesos de lixiviación. Se estima que de la producción mundial de CN, el 20% es para generar NaCN, del cual el 90% es destinado para procesos mineros (Guerrero, 2005; Garcés Molina, et al., 2006; Coley & Zapata, 2016; Razanamahandry, et al., 2017; Ibañez, et al., 2017). Estas industrias descargan gran cantidad de cianuro en las fuentes hídricas y en los suelos (Mirizadeh, et al., 2014).

5.1.1.1. Cianuro en minería

Este químico ha sido utilizado desde 1887 en la limpieza de metales pesados como la plata y el oro, a través de lixiviación, usando concentraciones entre 100 y 500 ppm a pH básico (Garcés et al., 2006). Para extraer oro, se tritura la piedra, se coloca sobre arcilla, se cubre totalmente con solución de cianuro para que este forme un complejo estable con el Au, luego se filtra para retener el complejo (CN-Au) y la solución restante contaminada con cianuro es descartada (Guerrero, 2005; Garcés et al., 2006). En procesos industriales asociados con la extracción de oro y plata se conocen varias formas de cianuros: total, libre, y disociable en ácido débil (WAD, por sus siglas en inglés) (Guerrero, 2005).

Para Nariño, esta actividad se distribuye en distritos tales como: el Distrito Minero Mallama - Cumbitara (Los Andes-Sotomayor), el Distrito Minero de Pasto-San Pablo, el Distrito Minero de Barbacoas, el Distrito Minero de los Alisales - Monopamba - Patascoy y el Distrito Minero del Mira - Guiza. Existen 204 explotaciones de las cuales el 49.75% corresponden a extracción de oro de filón o aluvial. En estos distritos se realiza lixiviación utilizando cianuro a concentraciones máximas de 500 ppm. En algunos casos como en la mina nueva Esparta de los Andes-Sotomayor la concentración de cianuro libre es de 433.33 ppm, lo cual representa un alto riesgo para el ambiente si se presentan las descargas sin previo tratamiento (Fajardo et al., 2010).

5.1.2. Toxicidad y contaminación del cianuro

Las formas más peligrosas reportadas son: HCN y -CN, ya que tiene afinidad con la enzima citocromo oxidasa, por eso se considera altamente tóxico para todos los organismos aerobios. Cuando se forma ese complejo, la enzima deja de funcionar, por lo tanto, no habrá traspaso de electrones, se inhibe la respiración aeróbica y se da una anaerobiosis, habrá ácido láctico en la sangre, se afecta el sistema nervioso, se produce paro cardiorrespiratorio y finalmente la muerte (Kao, et al., 2003; Cardona, 2015; Morillo & Guevara, 2015; Kumar, et al, 2016).

Al tener una exposición prolongada con compuestos cianurados, aunque en concentraciones bajas hay efectos nocivos para la salud, tanto de humanos como de animales, afectando principalmente al sistema nervioso central, la tiroides y el riñón (Ramírez, 2010; Cardona, 2015). Entre las dosis letales para animales, generalmente, se encuentra concentraciones de 200 mg HCN/L (Montenegro, 2003), aunque puede variar, como se describe en la Tabla 1. En tanto, para humanos es letal cuando se ingiere (1 a 3 mg CN /Kg), se absorbe (100 a 300 mg CN/Kg) y se inhala (100 a 300 mg CN/L) (Ruiz & UN. ECLAC, 2004). Por otro lado, en los microorganismos el principal efecto es que inhabilita el crecimiento, aunque puede alterar la morfología (en *Bacillus pumillus*) y modificar la motilidad (en *Spirillum volutans*), también en hongos causa mutaciones como en el caso de *Neurospora crassa* (Dubey & Holmes, 1995). Mientras que en plantas se inhibe la fotosíntesis (Whishinick & Lane, 1969; Vasil'ev, et al., 2007).

Tabla 1

Dosis letal cianuro libre en algunas aves y otros animales.

Especies	Dosis
Ánade real	1.43 mg CN Kg ⁻¹
Urubú de cabeza roja	36 mg NaCN Kg ⁻¹

Buitre negro americano	2.54 mg CN Kg ⁻¹
Paloma bravía	3.7 mg CN Kg ⁻¹
Codorniz japonesa	4.5 mg CN Kg ⁻¹
Cernícalo americano	2.12 mg CN kg ⁻¹
Gallina	11.1 mg CN kg ⁻¹
Estornino pinto	9.0 mg CN kg ⁻¹
Ganado	200 mg HCN kg ⁻¹
Perro	24 mg NaCN kg ⁻¹
Ratón	8.5 mg CN kg ⁻¹
Rata	5.1-5.7 mg NaCN kg ⁻¹

En esta tabla se muestra la dosis letal de cianuro para algunos animales. Extraído de *Razanamahandry et al, 2017*

El cianuro presente en el suelo y agua es un grave problema de contaminación hoy en día, ya que, se estima que se libera 14 millones de kg de cianuro anualmente en el agua (Mirzadeh et al.,2014), afectando los ambientes acuáticos, especialmente en peces, al reducir la capacidad natatoria e inhibir su reproducción (5,0 y 7,2 g CN/L) (Hernández L. , 2010), también aqueja a las aves migratorias ya que son sensibles aun en muy bajas concentraciones (0.1 mg/L) y a los animales que toman de esa agua (Cardona, 2015; Cabello, et al., 2018). Por lo tanto, los compuestos con cianuro y derivados pueden afectar a la biodiversidad y la biomasa de los ecosistemas, provocando así, graves problemas en el ambiente (Cabello, et al., 2018).

5.2. Métodos para eliminar contaminación por cianuro en plantas de extracción de oro.

Es de gran interés descontaminar el suelo y agua que tienen altas concentraciones de cianuro, como es el caso de las aguas cianuradas y arenas residuales procedentes de procesos mineros. Es importante señalar que en Colombia la ley contempla que los residuos contaminantes deben ser tratados al momento de ser vertidos, y la concentración de CN debe ser encontrado con un valor máximo de 1 ppm (Giraldo, Gil, Camargo y Ossa, 2006;

Cardona, 2015). Para tener control, disminuir las concentraciones contaminantes de cianuro y llegar a las permitidas por la ley en cada país se han desarrollado métodos físicos como la fotodescomposición del cianuro y químicos como la cloración alcalina (Fajardo, et al., 2010; Morillo Mendoza & Guevara Gonzales, 2015).

5.2.1. Métodos físicos.

El método físico más utilizado es la fotodescomposición de cianuro, la cual consiste en la utilización de luz ultravioleta (UV), un oxidante como el aire y un semiconductor como el dióxido de titanio. Con ese procedimiento se logra la conversión de cianuro libre hasta nitratos, dióxido de carbono y agua. A pesar de eso, es considerado un proceso lento en aguas turbias y profundas. Además, cuando los residuos son sólidos se necesita un área amplia en donde estos se extiendan y sean alcanzados por los rayos UV (Gil, Camargo, Castro, & Pineda, 2005; Hernández, 2010).

5.2.2. Métodos químicos.

Hay varios métodos para disminuir la toxicidad del cianuro como los siguientes: tratamiento con hipoclorito de calcio, precipitación de sulfato ferroso y oxidación de peróxido de hidrógeno.

5.2.2.1. *Tratamiento con hipoclorito de calcio.*

En este proceso el cianuro es oxidado a cianato, luego en amoníaco y bicarbonato en pH ácido. Aunque se logra degradar cianuro a compuestos menos tóxicos, es peligroso porque se generan productos finales como cloruro de cianógeno y organoclorados; la exposición de estos compuestos a largo plazo es peligrosa porque son considerados como carcinogénicos, mutagénicos, teratogénicos, productores de enfermedades respiratorias y encefalopatías crónicas (Fajardo, et al., 2010; Morillo Mendoza & Guevara Gonzales, 2015).

5.2.2.2. *Precipitación con sulfato ferroso*

Este proceso se realiza a pH entre 7,5 a 10,5 utilizando sulfato ferroso, consiste en la transformación de cianuro a compuestos más estables y considerados menos tóxicos como ferrocianuro y/o ferricianuro, luego son vertidos al ambiente (Fajardo, et al., 2010; Morillo Mendoza & Guevara Gonzales, 2015). A pesar de que los compuestos finales son menos tóxicos, no es una solución a fondo, ya que la especie química sigue sin cambiar en su estructura y se puede liberarse de nuevo bajo nuevas condiciones de temperatura y pH.

5.2.2.3. Oxidación de peróxido de hidrógeno

Este método es simple y con mínimos requisitos; el uso de peróxido de hidrógeno resulta no ser tóxico y oxidante con la capacidad de romper el triple enlace del cianuro. Se da una oxidación por medio de Cu^{+2} a través del sulfato de cobre con un pH alcalino, se forma un complejo con el ion cianuro denominado tetracianocuprato (es potencialmente activo), el cual tiene mayor afinidad con el peróxido. Posteriormente estos residuos son eliminados (Gil, Camargo, Castro, & Pineda, 2005; Hernández, 2010). El problema de esta técnica es que el cianuro se transforma en cianuro de hidrogeno, siendo esta la forma más toxica de cianuro.

5.3. Biorremediación de cianuro.

La biorremediación es importante porque utiliza microorganismos, hongos, plantas o enzimas derivadas para recuperar ambientes contaminados a su condición natural, es por eso que se ha considerado una alternativa factible para degradar cianuro, derivados de cianuro y complejos con metal. Por otro lado, se ha reportado que existen microorganismos y plantas con capacidad de tolerar y degradar tanto cianuro libre como cuando está formando complejos con metales (Cornejo, 2016). Una buena estrategia es utilizar microorganismos que pueden asimilarlo como fuente de carbono o de nitrógeno, lo cual resulta más beneficioso que continuar utilizando los métodos tradicionales (químicos y físicos), ya que, se obtienen productos finales como: formamida, ácido fórmico y amonio que son menos peligrosos y no

tóxicos para el medio ambiente y el ser humano al ser vertidos (Manso, et al., 2015; Akinpelu, et al., 2018; Deloya, 2012).

5.3.1. Microorganismos degradadores de cianuro.

A pesar de lo tóxico que resulta el cianuro para los organismos aerobios, se ha encontrado que hay bacterias y hongos que son capaces de tolerarlo y hasta de usarlo como fuente para la construcción de aminoácidos y proteínas. Estos microorganismos son eficientes para la degradación de $-CN$ porque tienen capacidad oxidativa, logran adaptarse, utilizar diversas sustancias químicas como fuente tanto de nitrógeno como de carbono, son capaces de sobrevivir aun cuando hay pocos nutrientes y en ambientes alcalinos. Entre los géneros con potencial degradador de cianuro se encuentran, para hongos: *Fusarium*, *Gliocladium* y *Trichoderma*; mientras que para bacterias son: *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Burkholderia*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Serratia* y *Streptomyces* (Mirizadeh et al., 2014; Kumar et al., 2016 (Luque-Alamargo, y otros, 2005; Morillo Mendoza y Guevara Gonzales, 2015; Manso, et al., 2015). En la Tabla 2 se mencionan diferentes microorganismos y su eficiencia para degradar cianuro (Razanamahandry et al., 2017).

La biorremediación con microorganismos es beneficiosa porque: tiene menores costos operacionales, se logra eliminar una amplia gama de compuestos cianurados, existe la capacidad de producir efluentes de alta calidad, los procesos son ecológicos ya que se trabaja con microorganismos autóctonos y resulta ser más sano para el medio ambiente. El éxito de este proceso se da cuando se trabaja con microorganismos nativos que tienen capacidades fisiológicas y metabólicas para degradar contaminantes del medio (Deloya, 2012; Cardona, 2015; Tuya, 2014).

Tabla 2.

Microorganismos con capacidad degradadora de cianuro

Organismo	Recurso de cianuro	Eficiencia degradadora	Referencia
<i>Thiobacillus intermedius</i>	CN- / 50 mM	0.021 $\mu\text{mol min}^{-1}$ 0.042 $\mu\text{mol min}^{-1}$ 0.015 $\mu\text{mol min}^{-1}$	Singleton y Smith (1988)
<i>Klebsiella</i> sp., <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Pseudomonas putida</i>	Tetracyanonickelate		Silva-avalos et al., 1990)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> NCIMB 11764	KCN/50 mM 20 - 50 mM	85%/6 h (condiciones aerobicas) 89%/12 h (condiciones anaerobicas)	Kunz et al., (1992)
<i>P. fluorescens</i> NCIMB 11764	HCN	760 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ ml}^{-1}$ (después 72 h)	Kunz et al., (1998)
<i>P. fluorescens</i> NCIMB 11764	KCN	90 - 100%	Fernandez et al., (2004)
a. <i>Neurospora crassa</i> , b. <i>Gibberella zeae</i> , c. <i>Aspergillus nidulans</i>	KCN Complejos metal-cianuro	< 80% (a), (b), (c) (después de 48 h)	(Basile 2008)
<i>Thiobacillus thioparus</i> THI115	SCN-	93% (en 38 h)	Yamasaki et al., (2002)
<i>Bacillus</i> sp. (<i>Bacillus safensis</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> , y <i>Bacillus Tequilensis</i>)	Compuestos de cianuro	65.5% (200 mg CN L ⁻¹) 44.3% (400 mg CN L ⁻¹)	Mekuto et al., (2013)

<i>Micromonospora braunna</i>	KCN (recurso de nitrógeno)	98.79% (100 ppm en 18 h)	Shete y Kapdnis (2012)
<i>B. safensis</i> + <i>B. lichenformis</i> + <i>Bacillus tequilensis</i> Wastewater	KCN	65.5% (por 8 días) para 200 mg CN L-1 44.3% (por 8 días) para 400 mg CN L-1	Mekuto et al., (2013)
<i>Burkholderia cepacia</i> C-3	Cianuro libre	80%	Adjei y Ohta (2000)
<i>Pseudomonas</i> sp.	Cianuro libre	60%	Kao et al., (2003)
<i>Pseudomonas</i> sp.	Cianuro libre	89%	Akcil et al., (2003)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Cianuro libre	99.9%	Kao et al., (2003)
<i>Trametes versicolor</i>	Cianuro libre	100 % (después de 42 h)	Akinpelu et al., (2015)
<i>Trametes versicolor</i>	Cianuro libre	30%	Cabu et al., (2006)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Cianuro libre	26%	Chen et al., (2008)
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> CECT5344	Cianuro libre	99.9%	Huertas et al., (2010)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> + <i>Ralstonia</i>	KSCN (Tiocianato)	500 - 2500 mg L-1 día-1	Chaudhari y Kodam, (2010)

sp.			
<i>Bacillus sp. CN-22</i>	HCN	200 - 6.62 mg L ⁻¹ 72 h ⁻¹	Wu et al., (2014)
<i>Bacteria + cassava peels</i>	KCN	400 mg L ⁻¹ día ⁻¹	Siller y Winter, (1998)
<i>Enterobacter sakazakii</i> (a)	KCN	99% (después de 96 h)	Ninan et al., (2013)
<i>Azotobacter sp.</i> (b)			
<i>Rhizobium sp.</i> (c)			
<i>Pseudomonas fluorescens + Chlorella vulgaris.</i>	<i>Cyanide 0.5 mg + glucosa</i>	60% (a)	Kiruthika, (2008)
	<i>1 g (a)</i>	58% (b)	
	<i>Cyanide 0.5 mg + glucosa</i>	54% (c)	
	<i>1 g + NaCl 1 g (b)</i>	51% (d)	
	<i>Cyanide 1 mg + glucosa</i>		
	<i>g + NaCl 1 g (c)</i>		
	<i>Cyanide 1 mg + glucosa</i>		
	<i>g + NaCl 1g (d)</i>		
<i>Fusarium solani</i>	KCN 80 mM	Km: 4.7 mM Vmax : 1.7 microM min ⁻¹ mg ⁻¹ ,	Barclay et al., (1998)
<i>Gloeocercospora sorghi</i>	KCN 30 mM	Km: 90 mM Vmax: 4.4 mmol min ⁻¹	Jandhyala, (2002)

<i>Gloeocercospora sorghi</i>	KCN 20 mM Complejos metal- cianuro	mg-1 < 80% (después de 48 h)	Basile (2008)
<i>Aspergillus awamori</i>	KCN 0-475 ppm		Santos et al., (2013)
<i>Fusarium oxysporum + Beta vulgaris</i>	Cianuro de metal + KCN 500 mg CN L-1	83 - 263 mg CN L-1	Akinpelu et al., (2015)

Extraído de Razanamahandry et al., 2017.

5.3.1.1. Vías metabólicas para degradar cianuro.

Para asimilar y degradar cianuro los microorganismos pueden tener vías alternativas en donde se producen reacciones bioquímicas como: reacción hidrolítica, oxidativa, reductiva y sustitución/ transferencia. Las reacciones con sus respectivas ecuaciones se encuentran en la Tabla 3 (Luque-Alamargo, Moreno, & Roldán, 2016; Kumar, et al., 2016; Razanamahandry et al., 2017).

5.3.1.1.1. Reacción hidrolítica.

Reducción del cianuro en presencia de agua con enzimas para producir formiato o formamida y amoniaco. Las enzimas involucradas son: Cianuro hidratasa (CH) nitrilo hidratasa (NH), tiocianato hidratasa (TCN), nitrilasa y cianidina. Las CH, NH y TCH son las que hidrolizan y escinden directamente el enlace triple del cianuro para formar formamida. Por otro lado, nitrilasa y cianidina forman amonio y ácido carboxílico (Kumar, et al., 2016; Luque et al., 2016; Razanamahandry et al., 2017).

Tabla 3

Tipos de reacciones, con la enzima correspondiente y la reacción.

Tipo de reacción	Enzima	Reacción
Oxidación	Cianuro dioxigenasa	$\text{HCN} + \text{O}_2 + 2\text{e}^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{NH}_3 + \text{CO}_2$
	Cianuro monooxigenasa	$\text{HCN} + \text{O}_2 + 2\text{e}^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{OCN}^- + \text{H}_2\text{O}$
Reducción	Cianasa	$\text{OCN}^- + \text{HCO}_3^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{NH}_3 + 2\text{CO}_2$
	Nitrogenasa	$\text{HCN} + 6\text{e}^- + 6\text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_4 + \text{NH}_3$
Hidrolisis	Cianidasa	$\text{HCN} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HCOOH} + \text{NH}_3$
	Cianuro hidratasa	$\text{HCN} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HCONH}_2$
	Formamidasa	$\text{HCONH}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HCOOH} + \text{NH}_3$
	Nitrilasa	$\text{R-CN} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{R-COOH} + \text{NH}_3$
	Nitrilo hidratasa	$\text{R-CN} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{R-CONH}_2$
	Amidasa	$\text{R-CONH}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{R-COOH} + \text{NH}_3$
Substitución/ transferencia	3-Cianoanolanina sintasa	$\text{HCN} + \text{Cys} \rightarrow 3\text{-Cianoanolanina} + \text{H}_2\text{S}$
	Rodanasa	$\text{HCN} + \text{S}_2\text{O}_3^{2-} \rightarrow \text{SCN}^- + \text{SO}_3^{2-}$

Extraído de Kumar et al, 2016.

5.3.1.1.2. Reacción oxidativa.

Estas reacciones se dan en presencia de NADPH, en donde el cianuro reacciona con oxígeno y produce amonio y dióxido de carbono. Las enzimas involucradas son: cianuro monooxigenasa, cianida (presente en animales, hongos, bacterias y plantas) y cianuro dioxigenasa (Kumar, et al., 2016; Luque et al., 2016; Razanamahandry et al., 2017).

5.3.1.1.3. Reacción reductiva.

Se basan en la transferencia de electrones a través de la enzima nitrogenasa en ambientes principalmente anaerobios. Los productos finales de HCN son metano y amonio. En *Klebsiella* se puede reducir tiocianato (Kumar, et al., 2016; Luque et al., 2016; Razanamahandry et al., 2017).

5.3.1.1.4 Reacción sustitución/ transferencia.

La sustitución/transferencia es una reacción catalizada por cianoalanina sintasa la cual usa O-acetilserina (OAS) como sustrato. Estas reacciones evitan la toxicidad del cianuro a las células y proporcionan una fuente de nitrógeno (Kumar, et al., 2016; Luque et al., 2016; Razanamahandry et al., 2017).

5.4. Consorcios microbianos degradadores de cianuro.

Se define como una comunidad formada por el conjunto dos o de más especies de microorganismos que interactúan para su mutuo beneficio (Salazar & Sánchez, 2011).

Hay dos características que cumplen los consorcios microbianos que son importantes para soportar los cambios del medio ambiente y realizar funciones que los microorganismos por sí solos no pueden realizar. Primero la comunicación entre las poblaciones mediante metabolitos o señales moleculares. Dado lo anterior se desprende la segunda característica que consiste en una división del trabajo, ya que la producción general se obtiene de una combinación de las funciones desempeñadas por los individuos constitutivos o sub-poblaciones (Salazar & Sánchez, 2011). Las poblaciones mixtas pueden realizar funciones que son difíciles o incluso imposibles para las cepas de manera individual.

Los microorganismos usados para la conformación de consorcios deberán convertir el cianuro en materiales no peligrosos y menos tóxicos. Varias especies bacterianas, especialmente miembros del género *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, y *Burkholderia* han sido reportados por su potencia para degradar cianuro. El cianuro libre en medio ácido, incluso a pH ligeramente alcalino (pH 9.2 a 25°C) cambia a HCN, para los resultados en biorremediación se deben, por lo tanto, utilizar condiciones alcalinas (Kumar, et al., 2016). Estas comunidades tienen un periodo de aclimatación y posterior degradación de CN (Kandasamy, et al., 2015; Kumar, et al., 2016).

En procesos de degradación de cianuro Kandasamy, et al (2014), Nwokoro & Uju (2014), Mekuto, et al., (2015) y Cornejo (2016) proponen según sus respectivas investigaciones que para remover contaminación con cianuro es mejor el uso de consorcios microbianos, ya que así se obtiene un mayor porcentaje de remoción, por lo que resulta más efectivo al momento de realizar biorremediación. También es necesario usar estos microorganismos para realizar tratamientos y desarrollar tecnologías que tengan más eficiencia en la degradación de cianuro (Kumar et al. 2016; Cabello, et al., 2018).

5.5. Medios de cultivo para crecimiento de microorganismos degradadores de cianuro.

Un medio de cultivo es considerado una fuente que permite el crecimiento y desarrollo de microorganismos. Este debe tener ciertos componentes como: nutrientes adecuados, consistencia adecuada del medio, presencia o ausencia de oxígeno, humedad suficiente, pH ajustado y esterilidad. Según el estado físico los medios de cultivo pueden ser: líquidos, semisólidos o sólidos. Debido a la diversidad metabólica de hongos y bacterias, hay varios medios de cultivos y no existe uno que sea considerado adecuado para todos en general (Restrepo, Montoya, & Muñoz, 2006).

Hay diferentes condiciones que se deben tener en cuenta al momento de realizar los medios de cultivo para bacterias que degradan cianuro como:

5.5.1 Disponibilidad de nutrientes.

Se ha reportado que cuando hay presencia de una fuente de C o N aumenta el crecimiento microbiano, por lo tanto, se incrementa la captación y degradación de compuestos de cianuro. Por otro lado, los grupos carbonilo (aldehídos y cetonas) reaccionan con el cianuro en condiciones naturales (40°C y pH neutro) para formar sal carboxílica (una especie estable de cianuro) en presencia de ion de metal; por lo que no estarían al alcance de los microorganismos (Kumar, et al., 2016).

5.5.2 Temperatura.

Las enzimas generalmente son producidas por microorganismos mesófilos. La tasa de biodegradación del cianuro es dependiente de la temperatura ya que estos microorganismos generalmente son aislados del suelo y trabajan de manera eficiente con una temperatura que generalmente oscila entre 20 y 40°C (Kumar, et al., 2016).

5.5.3 El efecto del pH

En la biorremediación del suelo contaminado con cianuro es significativo. El pH óptimo para el crecimiento de bacterias (6-8), hongos (4-5) y enzimas degradadoras de cianuro (6-9) es típico durante la degradación de cianuro. Para evitar la formación de HCN volátil, el pH alcalino es preferencial (pH = 9.2). Así, desde un punto de vista químico, los tratamientos biológicos de los efluentes industriales contaminados con cianuro requieren un pH alcalino (Kumar, et al., 2016).

5.6. Antecedentes

Se han realizado varios estudios de eficiencia degradadora de cianuro por microorganismos, por ejemplo:

Benavides (2004) realizó un trabajo de investigación, donde reportó bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Klebsiella* y *Chromobacterium*, aislados de la mina Nueva Esparta en

el Municipio de los Andes Sotomayor en Nariño. Utilizó los medios de cultivo BS1 y BS2 y encontró que *Pseudomonas* Xp5d toleró cianuro hasta 400 mg CN-/L.

Luque y colaboradores (2005) encontraron a *Pseudomonas pseudoalcaligenes* con la capacidad de degradar cianuro una concentración de 30mM y a un pH óptimo de 9.5. Esta bacteria usa el cianuro como única fuente de nitrógeno y tiene la capacidad de utilizarlo en la mayoría de sus estados, como cuando el CN está formando complejos con metales.

Coley y Zapata (2006) aislaron microorganismos, los purificaron e identificaron como: *Pichia ohmeri*, *Exophiala* sp., *Candida* sp., *Staphylococcus* sp., los cuales tuvieron un porcentaje de remoción de cianuro del 97% a una concentración de 150 mg CN-/L.

Garcés, et al (2006) aislaron y evaluaron tres consorcios microbianos autóctonos de minas de oro del municipio de Amalfi en Antioquia, a una concentración de 2000 ppm de KCN con un porcentaje de remoción de 53.15% en condiciones aerobias. Por lo cual los autores sugieren que los consorcios pueden ser utilizados de manera efectiva en tratamientos para descontaminación de cianuro.

Mirizadeh et al. (2014) encontraron que la cepa a la cual denominaron C2 presentó la mayor capacidad para degradar CN con un porcentaje de remoción del 86%. Además, afirman que a medida que se aumenta la concentración de cianuro, los microorganismos necesitan mayor tiempo de aclimatación y generalmente los microorganismos utilizan el CN como fuente de nitrógeno.

Nwokoro y Uju (2014) aislaron y evaluaron dos especies de bacterias (*Pseudomonas stutzeri* y *Bacillus subtilis*) individualmente y juntas. Encontraron que la mayor eficiencia de degradar cianuro se presentó cuando las bacterias estaban juntas con un porcentaje de remoción del 88.5% a los 10 días de tratamiento.

Kandasamy, Dananjeyan, Krishnamurthy, & Benckiser (2015) aislaron 10 bacterias, de las cuales *Bacillus pumilus* y *Pseudomonas putida* degradaron cianuro con porcentajes de

remoción de 63% y 61% respectivamente. Encontraron que a medida que aumenta el tamaño poblacional, disminuían las concentraciones de NaCN y glucosa.

Kumar, Kumar, & Chand (2015) formaron un consorcio con tres bacterias *Enterobacter* sp. RL2a, *Serratia marcescens* RL2b y sp. RL2c para la degradación efectiva de las aguas residuales de cianuro. La degradación de cianuro *in vitro* fue óptima a pH 6,0, temperatura de 30°C a 20 mM de concentración de cianuro (eliminado en 36 h), con 2% volumen de inóculo de las células.

Mekuto, Obed Ntwampe, & Jackson (2015) estudiaron un consorcio bacteriano mesófilo tolerante a los álcalis del género *Bacillus*, al cual se le evaluó la capacidad para degradar altas concentraciones de cianuro libre (hasta 500 mg CN-/L), complementado únicamente con residuos de suero de leche. Las condiciones óptimas fueron: pH 9.88, temperatura 33.60 ° C y concentración de residuos de suero 14.27 g / L, bajo el cual 206.53 mg CN- / L en 96 h fue biodegradado con una concentración de cianuro inicial de 500 mg CN- / L.

Morillo Mendoza y Guevara Gonzales (2015) evaluaron la degradación de cianuro de sodio por *Pseudomonas* sp. aislada de lodos de una planta de tratamiento en Perú, a dos temperaturas (32°C y 36°C) y tres pH (9.5, 10 y 10.5). Encontraron que la mayor concentración de cianuro (655 ppm) degradado fue a 36°C y pH 9.5.

Sankaranarayanan & Gowthami (2015) estudiaron consorcios microbianos con la capacidad de degradar cianuro en condiciones aerobias. El consorcio fue compuesto de bacterias de los géneros *Bacillus*, *Klebsiella* y *Pseudomonas*. Más del 98% de cianuro se eliminó como amoníaco en 96 horas a un rango de pH de 7.0-8.0 por los consorcios microbianos elegidos. Sin embargo, las especies individuales mostraron solo un 50-75% de degradación de cianuro. El mayor porcentaje de eliminación de cianuro observado en el consorcio que en el organismo individual sugirió la existencia de sinergismo en el consorcio.

Cornejo (2016), quien aisló 89 cepas microbianas, de las cuales las pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Alcaligenes* presentaron mayor capacidad de degradar cianuro, tanto individualmente, así como en consorcios, reduciendo cianuro en un 97 y 99 % tras 15 días de tratamiento en laboratorio.

Mekuto, et al., (2016) determinaron que *Exiguobacterium acetylicum* tiene la capacidad de degradar tiocianato (SCN-) y no logró degradar CN; mientras que *Bacillus marisflavi* es capaz de degradar CN- pero no SCN. Luego evaluaron a *Exiguobacterium acetylicum* y *Bacillus marisflavi* juntas y encontraron que logran degradar CN- y SNC- con una eficiencia degradativa de 99.9%, a 34°C y pH: 9,0.

Javaheri Safa, Aminzadeh, Zamani, & Motallbi (2017) aislaron a *Bacillus* sp. M01 y estudiaron la capacidad de degradar cianuro a una concentración de 562 mg /L con una eficiencia del 86% en 48h con temperatura óptima de 44°C y velocidad de rotación de 130 rpm.

A pesar de que se han estudiado ampliamente los diferentes microorganismos con capacidad para degradar cianuro es necesario establecer las mejores relaciones entre las variables biológicas y operacionales para asegurar la eficiencia del sistema de descontaminación *in situ* (Restrepo et al., 2006; Cabello, et al., 2018; Guerrero, 2005; Mekuto, et al., 2016). Entre los anteriores factores, las variables biológicas son la base para realizar los estudios de las variables operacionales. Al respecto entre las variables biológicas se encuentran, características metabólicas del modelo biológico, la composición del consorcio microbiano, edad y concentración del inóculo y la composición del medio de cultivo adaptado a las condiciones de campo.

6. METODOLOGÍA

La presente propuesta de investigación es de tipo experimental, en donde se aislaron bacterias de piscinas de cianuración y relaves de arena, las cuales fueron sometidas a diferentes tratamientos bajo condiciones controladas a escala de laboratorio, para conformar un consorcio bacteriano eficiente para degradar cianuro y un medio de cultivo alternativo en donde crece el consorcio.

6.1. Diseño de muestreo

Para realizar este trabajo se colectaron muestras de las minas Ecominer S.A.S y Corporación de pequeños mineros los Andes, ubicadas en el municipio de Los Andes - Sotomayor, departamento de Nariño, Colombia; con coordenadas $1^{\circ}29'36''$ N $77^{\circ}31'17''$ O, a 1588 metros sobre el nivel del mar (Figura 1).

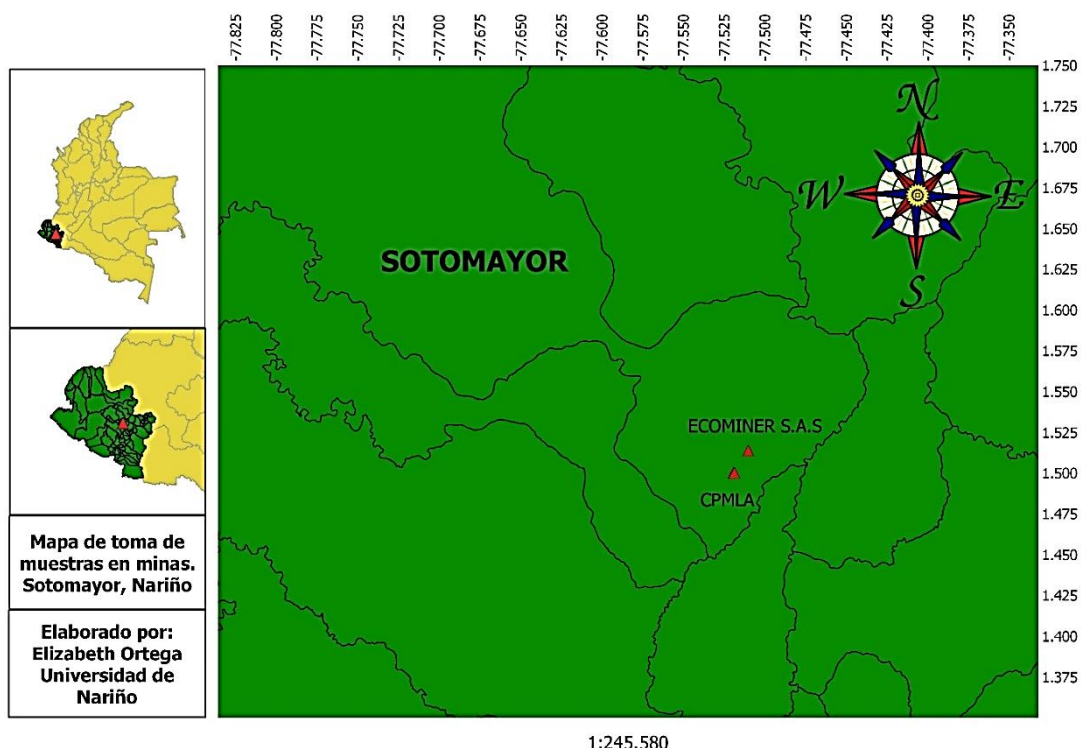


Figura 1. Mapa de minas de oro del municipio de Sotomayor donde se colectaron las muestras. Fuente: En este estudio.

Para el muestreo, se colectó agua en dos piscinas de cianuración ubicadas en la mina Corporación de pequeños mineros los Andes, para tal efecto se dividió la piscina en tres

parcelas de aproximadamente 3 m de ancho para la piscina uno y 2 m para la piscina 2, como se observa en las figuras 2 y 3. De cada parcela se colectó una muestra compuesta, para tal efecto submuestras de 100 ml de diferentes puntos y profundidades fueron colectadas con jarra nisky hasta completar un litro (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, 2011; Ciatiac, 2011). Para un total de 6 muestras entre las dos piscinas.



Figura 2. Piscina uno de cianuración ubicada en la mina cooperativa de pequeños mineros los Andes, localizada en el municipio de los Andes Sotomayor, Nariño. La piscina fue dividida en tres parcelas para la toma de muestras. Fuente: Este estudio.



Figura 3. Piscina dos de cianuración ubicada en la mina cooperativa de pequeños mineros los Andes, Nariño. La piscina fue dividida en tres parcelas para la toma de muestras. Fuente: Este estudio.

Por otra parte, las muestras de arena fueron colectadas en la mina Ecominer S.A.S del cementerio de arena. Para tal efecto se dividió la piscina de arena en tres parcelas de aproximadamente 4 m de ancho para la piscina uno y 2 m para la piscina dos, como se observa en las figuras 4 y 5. En cada una de ellas se hicieron recorridos en patrón de zig-zag, se colectaron de forma estéril muestras de suelo a 10 cm de profundidad hasta completar 1 kg. En total se colectaron nueve muestras de arena (Vargas & Vargas, 2015).

Posteriormente, todas las muestras se transportaron bajo refrigeración hasta los laboratorios de la Universidad de Nariño donde se procesaron para los diferentes análisis.



Figura 4. Depósito de arena uno ubicada en la mina Ecominer SAS, en Sotomayor, Nariño. La piscina fue dividida en tres parcelas para la toma de muestras. Fuente: Este estudio.



Figura 5. Depósito de arena dos ubicada en la mina Ecominer SAS, en Sotomayor, Nariño. La piscina fue dividida en tres parcelas para la toma de muestras. Fuente: Este estudio.

6.1.1. Aislamiento, purificación y conservación de bacterias resistentes a cianuro de potasio.

Para el aislamiento se usó el medio mínimo (M9), con las modificaciones propuestas por Mekuto y colaboradores (2016), el pH se ajustó a 8,5, se adicionó KCN a 100 ppm y se utilizó agar-agar a concentración de 12 g/L. El medio se esterilizó mediante autoclave a 121°C durante 15 minutos. Por otra parte, la solución de cianuro (10 g de KCN en 1 L de agua destilada) se esterilizó por filtración a través de membrana, utilizando filtro millipore 0.45 μm y luego se adiciono al medio estéril M9. Para el aislamiento de las muestras de arena y agua se utilizó el método de dilución seriada, para ello se prepararon diluciones seriadas hasta 10^{-6} , se hicieron 3 réplicas de cada dilución y se sembró en tres cajas petri con el medio de cultivo M9.

Las características de las colonias bacterianas se describieron con base en el manual Bergy (color, forma, borde, elevación), la morfología microscópica se describió con base en

la respuesta a la tinción de Gram. Para conservar las bacterias se prepararon tubos con agar M9 inclinado y fueron puestos a refrigeración a 4°C. Las muestras de estos tubos fueron usadas para los siguientes experimentos.

6.2. Selección de bacterias aisladas de arenas residuales y piscinas de cianuración del municipio de Sotomayor, para conformar un consorcio bacteriano con actividad para la degradación cianuro de potasio.

Para cumplimiento de este objetivo se realizaron tres fases: evaluación de la capacidad para utilizar KCN como única fuente de carbono o nitrógeno, crecimiento a pH 9,5 y ausencia de antagonismo en cultivo mixto.

Para la primera fase se prepararon dos medios de cultivo con agar (M9-A y M9-B) como base en el medio mínimo M9 (Millar, 1972), los cuales tienen los mismos nutrientes salvo que uno tiene KCN como única fuente de carbono y el otro tiene KCN como única fuente de nitrógeno. Las composiciones de los medios de cultivo se presentan en la tabla 4.

Se reactivaron las bacterias en caldo M9. Después se sembraron por estría y por triplicado en el medio de cultivo M9-A y M9-B, suplementado con agar y se incubaron durante 72 horas a 30°C.

Tabla 4

Composición de los medios de cultivo M9-A y M9-B

Nutriente	M9-A	M9-B
	KCN como fuente de nitrógeno	KCN como fuente de carbono
Na ₂ HPO ₄	3.0 g	3.0 g
KH ₂ PO ₄	1.5 g	1.5 g
NaCl	0.25 g	0.25 g
MgSO ₄	120.4 mg	120.4 mg

CaCl ₂	111.0 mg	111.0 mg
ZnSO ₄	287.5 mg	287.5 mg
FeSO ₄	278.0 mg	278.0 mg
MoO ₃	200.0 mg	200.0 mg
C ₆ H ₁₂ O ₆	10 g	0
NH ₄ NO ₃	0	1 g
KCN	200 ppm	200 ppm
Agua destilada	1000 ml	1000 ml

En la segunda fase se evaluó la capacidad de crecimiento de las bacterias en el caldo de cultivo M9 a pH, 9,5. Las bacterias que crecen a pH 9.5 se usaron para los posteriores experimentos.

6.2.1. Evaluación de la actividad antagónica

De acuerdo con el epígrafe 6.2 se seleccionaron bacterias que asimilan KCN como fuente de carbono y como fuente de nitrógeno, se hicieron combinaciones entre bacterias de los dos grupos. Estas combinaciones se utilizaron para evaluar si existe un efecto antagónico, según la metodología propuesta por Aquiahuat & Pérez, (2004), en medio sólido M9 se sembraron las dos bacterias por medio de estría cruzada. Se realizó por triplicado.

Para evaluar el antagonismo en medio líquido se utilizó 135 ml de caldo M9, con las bacterias seleccionadas se prepararon inóculos de 0.1 unidades de absorbancia y se adicionó 7,5 ml de cada bacteria al medio (Pérez, Gonzales, & Muñoz, 2014). Las muestras se incubaron a 30°C durante 120 horas, cada 24 horas se tomó 1 mL de muestra para evaluar el crecimiento y se evaluó por espectrofotometría a 600 nm. Las bacterias que no presentaron antagonismo se seleccionaron para conformar el consorcio.

6.3. Caracterización bioquímica de las bacterias seleccionadas para conformar el consorcio bacteriano.

Se caracterizaron las bacterias que conformaron el consorcio bacteriano usando pruebas Api CH 50 y Api 20 E (Bou, Fernandez, Garcia, Saez, & Valdezate, 2011; Coley & Zapata, 2006).

Para la identificación de los microorganismos con paneles API, se debe tomar una colonia pura del microorganismo de interés y se suspende homogéneamente en 5mL de agua destilada estéril. Luego se llena cada pozo, se coloca la tira en una cámara húmeda de incubación y se incuba a 30 °C durante 48 h.

6.4. Diseño de medios de cultivo alternativos para el crecimiento de un consorcio de bacterias degradadoras de cianuro.

Para esta fase como materia prima se utilizó suelo proveniente de la finca Portillo Gómez, ubicada en Sotomayor, Nariño; con coordenadas 1°29'36" N 77°31'17" O, a 1588 metros sobre el nivel del mar. Y se tomaron muestras de agua del municipio de Sotomayor. Estos sustratos fueron tomados en Sotomayor, Nariño, porque se planteó realizar un medio de cultivo con condiciones de campo y con materiales de fácil acceso para los mineros de la región. De acuerdo con la composición del análisis fisicoquímico del suelo, se realizaron los cálculos para alcanzar las concentraciones de nutrientes del medio M9, y se suplementó con las sales necesarias. El medio se esterilizó mediante autoclave a 121°C durante 15 minutos.

6.5. Determinación de la eficiencia del consorcio bacteriano para degradar cianuro en los nuevos medios de cultivo diseñados.

El consorcio bacteriano se conformó con los aislados DA2-4 y DA1-1, Para tal efecto se preparó un inóculo a 0.1 (DO₆₀₀), entre las 2 bacterias y 30 mL de inóculo fueron agregados en 270 mililitros de medio de cultivo CE1 y CE2, por triplicado. Como control se inoculó

medio de cultivo M9 con un inóculo preparado bajo las mismas condiciones de los medios CE1 y CE2. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado, se colectaron muestras de 10 ml cada 48 horas durante 240 horas para evaluar el crecimiento a 600 nm en espectrofotometría.

Los parámetros cinéticos de crecimiento y biodegradación se evaluaron mediante el cálculo de la velocidad específica de crecimiento μ (h^{-1}), Ecuación 1; el tiempo de duplicación celular T_d (h), Ecuación 2; y el porcentaje de eficiencia de remoción RE, Ecuación 3: (Tuya, 2014)

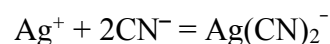
$$\mu = \frac{\ln X_f - \ln X_0}{t} \quad [\text{Ecuación 1}]$$

$$T_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad [\text{Ecuación 2}]$$

$$RE = \left(\frac{S_0 - S_f}{S_0} \right) * 100 \quad [\text{Ecuación 3}]$$

Donde X_0 y X_f es el número de células inicial y final de la fase exponencial de crecimiento, tomadas en los tiempos t_0 y t_f . S_0 y S_f es la concentración de cianuro (mg/L) inicial y final del ensayo.

Por otra parte, la concentración de cianuro se evaluó por el método de análisis volumétrico (Tuya, 2014). Esta técnica consiste en la reacción de ión cianuro con nitrato de plata (AgNO_3) en pH alcalino mayor o igual a 11 para formar $\text{Ag}(\text{CN})_2^-$ como se muestra en la reacción:



6.6. Análisis estadístico.

A todos los datos se les realizó prueba de homogeneidad de varianzas con el test-F de Fisher y además se analizó la normalidad con el test de normalidad Shapiro-wilk, con un

$\alpha=0.05$ en el programa PAST3 versión 3.15. Para determinar el antagonismo microbiano se realizó una prueba de varianza, con un $\alpha=0.05$ en el programa PAST3 versión 3.15. Mientras que para evaluar la eficiencia de los consorcios en el medio de cultivo diseñado se realizó una prueba Anova de 1 vía, se evaluó la normalidad, con un $\alpha=0.05$ en el programa PAST3 versión 3.15.

7. RESULTADOS

7.1. Aislamiento, purificación y conservación de bacterias resistentes a cianuro de potasio.

Con la metodología aplicada para el aislamiento de bacterias degradadoras de cianuro se obtuvo que el 62%, correspondiente a 8 aislados bacterianos diferentes provienen de muestras de agua de la planta Cooperativa de Pequeños Mineros, los Andes, Nariño y el 38% corresponde a 5 aislados bacterianos de muestras de arena de la planta de tratamiento Ecominer S.A.S. En la planta de tratamiento Cooperativa de Pequeños Mineros, los Andes, Nariño el 75 % de los aislados corresponden a bacilos Gram positivos, de estos, dos aislados bacterianos fueron bacilos Gram negativos y se obtuvo un coco Gram negativo. En cambio, en la planta de tratamiento Ecominer S.A.S se aislaron 4 bacilos Gram negativos y se obtuvo un bacilo Gram positivo. En el Anexo 2 se presentan la relación de los diferentes morfotipos obtenidos de las plantas de cianuración, y en los anexos 1 y 2 se muestra las figuras de la tinción de Gram y las morfologías de las colonias.

7.1.1 Selección de bacterias aisladas de arenas residuales y piscinas de cianuración del municipio de Sotomayor.

De acuerdo con los datos obtenidos, en el medio M9-A el cual contenía KCN como única fuente de nitrógeno crecieron 6 aislados, y en el segundo medio (M9-B) con KCN como única fuente de carbono crecieron 3 aislados; y en los dos medios 4 aislados (tabla 5).

Tabla 5

Crecimiento de aislados bacterianos en los medios de cultivo M9-A, M9-B y a pH 9,5.

Aislado bacteriano	M9-A	M9-B	Crecimiento a pH 9,5
DA6-2	+	-	-
DA1-1	+	-	+

DA4-1	+	-	-
DA5-3	+	-	-
DA5-6	+	-	-
DS2-1	+	-	-
CS9-3	-	+	-
DA2-4	-	+	+
DA1-8	-	+	+
DS7-3	+	+	-
CS7-1	+	+	-
DA5-7	+	+	-
CS7-2	+	+	-

En esta tabla se muestra el crecimiento de los aislados bacterianos en los medios M9-A y M9-B. El primero tiene KCN como única fuente de nitrógeno y el segundo tiene KCN como única fuente de carbono. Se cultivaron a 30°C durante 72 horas.

De las bacterias que solo utilizan KCN como única fuente de nitrógeno solo DA1-1 creció en caldo M9 a pH 9,5 (tabla 5) y de las bacterias, que utilizan cianuro como única fuente de carbono DA2-4 y DA1-8 crecieron a pH 9,5 lo cual se evidenció por la turbidez del caldo de cultivo. Estos microorganismos fueron usados en los posteriores experimentos.

7.1.2 Evaluación de la actividad antagónica

Para la formación de consorcios bacterianos para degradar cianuro se evaluaron las relaciones antagónicas entre las bacterias seleccionadas para lo cual se formaron dos grupos, el primero formado por DA1-1 y DA2-4 y el segundo por DA1-1 y DA1-8. El efecto

antagónico se determinó por el método de estría cruzada en agar, en la figura 6b) se observa una posible inhibición de crecimiento de la bacteria DA1-1 sobre la bacteria DA1-8.

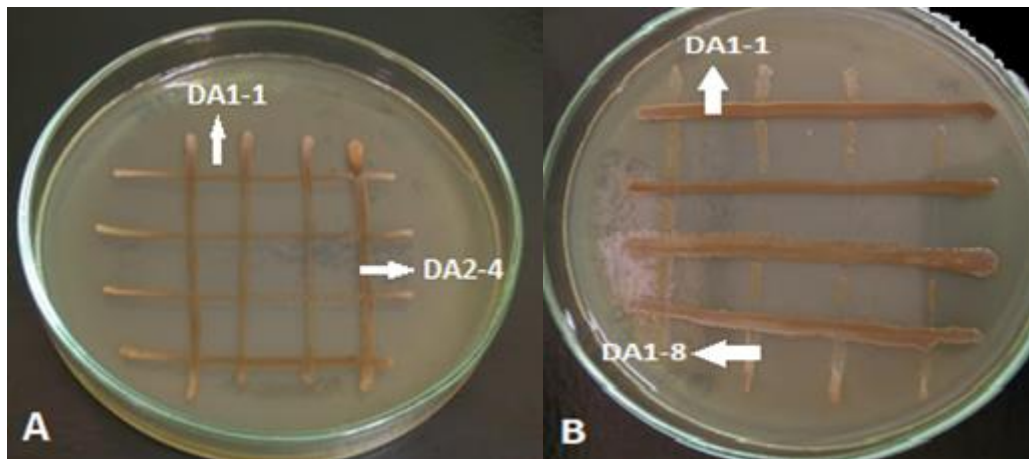


Figura 6. Fotografías de cajas Petri con bacterias sembradas por estría cruzada sobre cultivo M9 incubado a 30°C por 72 horas. En la fotografía A se observa una caja de cultivo con los aislados bacterianos DA1-1 y DA2-4 y en figura B un cultivo con los aislados DA1-1 y DA1-8, en donde se evidencia una posible inhibición.

Con el fin de corroborar la inhibición del crecimiento las bacterias se sembraron en caldo M9 sin cianuro, bien sea en cultivo puro y cultivo mixto. Los resultados se aprecian en la Figura 7, en donde se observa el crecimiento de DA1-1, DA2-4 y el grupo conformado por estas dos bacterias, mientras que en la Figura 8 se aprecia el crecimiento de las bacterias DA1-1, DA1-8 y en cultivo mixto, en esta última figura se observa en un descenso de la turbidez del medio de cultivo

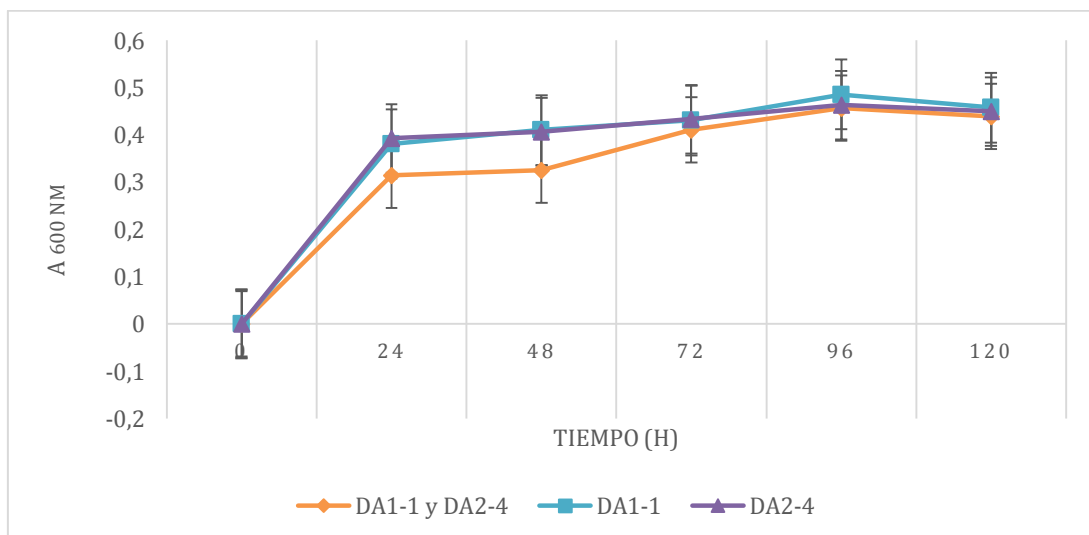


Figura 7. Crecimiento de DA1-1, DA2-4 y el grupo conformado por estas dos bacterias, cultivado en caldo M9 por 120 h a 30°C. Anova de una vía, estableciendo que no existen diferencias estadísticas significativas ($p= 5,37$).

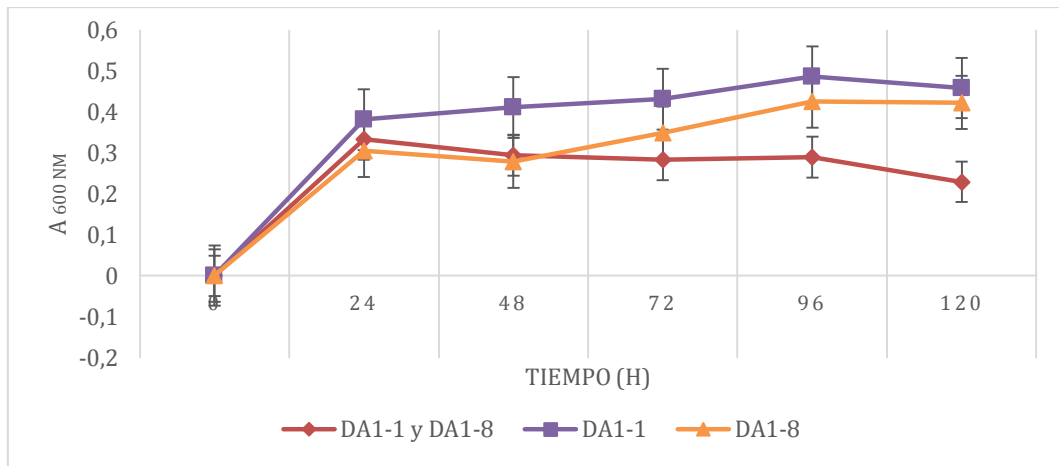


Figura 8. Crecimiento de DA1-1, DA1-8 y el grupo conformado por estas dos bacterias, cultivado en caldo M9 por 120 h a 30°C. Test de Tukey $p = 0,00016$, por lo tanto, en esta combinación se presenta una inhibición bacteriana.

A partir de las 24 horas en la curva conformada por el cultivo mixto, se realizó un análisis de Anova de una vía, estableciendo que existen diferencias estadísticas significativas ($p= 2,75E-10$) en los valores de absorbancia obtenidos para DA1-1, DA1-8 y el cultivo mixto. Según el test de Tukey se estableció que la diferencia estadística en los valores de absorbancia es producida por el cultivo mixto ($p = 0,00016$). Por lo tanto, en esta combinación se presenta una inhibición bacteriana.

En consecuencia, se seleccionaron las bacterias DA2-4 y DA1-1 para la conformación del consorcio bacteriano porque primero no se evidencia antagonismo y pueden crecer a pH 9.5.

7.2 Caracterización bioquímica de las bacterias seleccionadas para conformar el consorcio bacteriano.

Los perfiles bioquímicos de los aislados DA1-1 y DA2-4 se obtuvieron a través del panel API 20 E y API 50 CH, respectivamente. Los resultados fueron comparados en la base de datos para perfiles bioquímicos Biomerieux-APIWEB.

Con base en la batería bioquímica API 50 CH, se encontró que DA2-4 corresponde a *Bacillus megaterium* con un porcentaje de similitud del 93%; mientras que con base en API 20 E, se encontró que DA1-1 es *Pseudomonas aeruginosa* con un porcentaje de similitud del 96,8%.

7.3 Diseño de medios de cultivo alternativos para el crecimiento de un consorcio de bacterias degradadoras de cianuro.

Para el diseño del medio de cultivo se utilizó suelo y agua de Sotomayor-Nariño. Se realizó un análisis fisicoquímico del suelo, los resultados en el Anexo 4. Con base en el análisis se realizó un extracto de suelo con los sustratos anteriormente mencionados y se suplementaron con nutrientes hasta alcanzar las concentraciones del medio M9. Por otro lado, para determinar las concentraciones de cianuro se basó en la propuesta por Mirizadeh, et al., (2014) en donde se utiliza una concentración de cianuro 200 ppm diseñado para uso en laboratorio. Por otra parte, los análisis fisicoquímicos de las aguas cianuradas de la planta de beneficio se indican concentraciones de cianuro a 300 ppm. Por lo cual se diseñaron dos medios de cultivo alternativo (CE1 y CE2) con igual concentración de nutrientes, pero difieren en la concentración de KCN (300 y 200 ppm respectivamente). En la tabla 6 se observan las concentraciones de los diferentes componentes de los medios de cultivo.

Tabla 6

Fórmula de los medios de cultivo CE1 y CE2.

SUSTRATO	CE1	CE2
Extracto de suelo	1000 mL	1000 mL
FeSO4	0.28 g	0.28 g
NaCl	0.26 g	0.26 g
Na2HPO4	3.1 g	3.1 g
ZnSO4	0.29 g	0.29 g

MoO ₃	0.21 g	0.21 g
Sacarosa	12 g	12 g
NH ₄ NO ₃	1.05 g	1.05 g
[KCN] ppm	300	200

7.4 Determinación de la eficiencia de consorcios bacterianos para degradar cianuro en los nuevos medios de cultivo alternativo.

En la Figura 9 se observa el crecimiento del consorcio bacteriano conformado por las bacterias DA1-1 y DA2-4, en los medios M9, CE1 y CE2. Con los datos obtenidos a las 240 horas de experimento, se realizó un análisis de Anova para determinar las variaciones en las medias de crecimiento del consorcio en los medios cultivo M9, CE1 y CE2, determinó que existen diferencias estadísticamente significativas ($p=0.00$). Por lo cual se realizó la prueba Tukey y se detectó que el medio de cultivo que presenta variación es M9 con respecto a los medios CE1 y CE2 ($p= 0.00$ y 0.00 respectivamente), con promedio de crecimiento superior al obtenido en los medios CE1 y CE2.

En la Figura 10 se representa la concentración de cianuro a diferentes tiempos en los medios CE1, CE2 y M9. En el análisis de Anova se estableció que existen diferencias estadísticas significativas ($p=7,47E-11$) entre las concentraciones de cianuro residual obtenido a las 240 horas. Con la prueba Tukey el medio de cultivo que presenta diferencias estadísticamente significativas fue el M9 ($p= 0,00$ y $5,11E-11$, respecto a los medios CE1 y CE2 respectivamente). También se presentó diferencias entre CE1 y CE2 con un $p=0,00$.

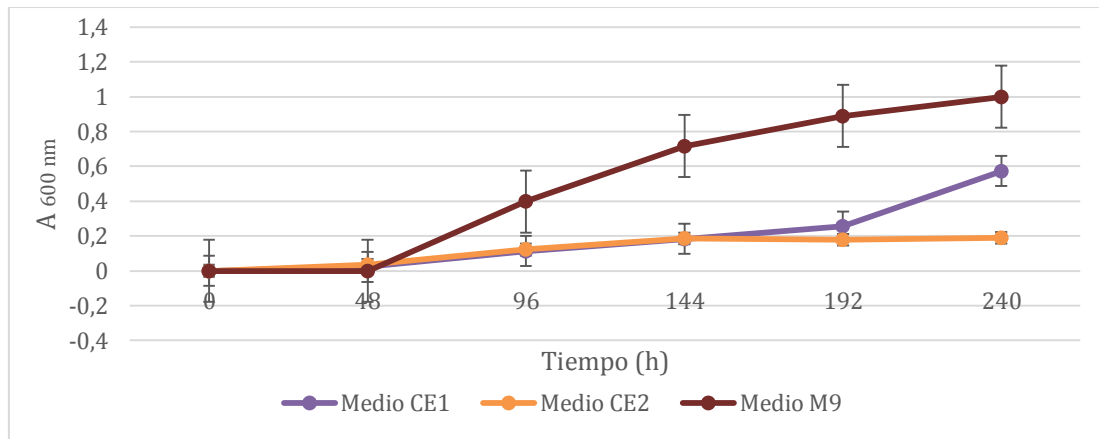


Figura 9. Crecimiento del consorcio microbiano compuesto por las bacterias DA1-1 y DA2-4, evaluado en los medios CE1, CE2 y M9.

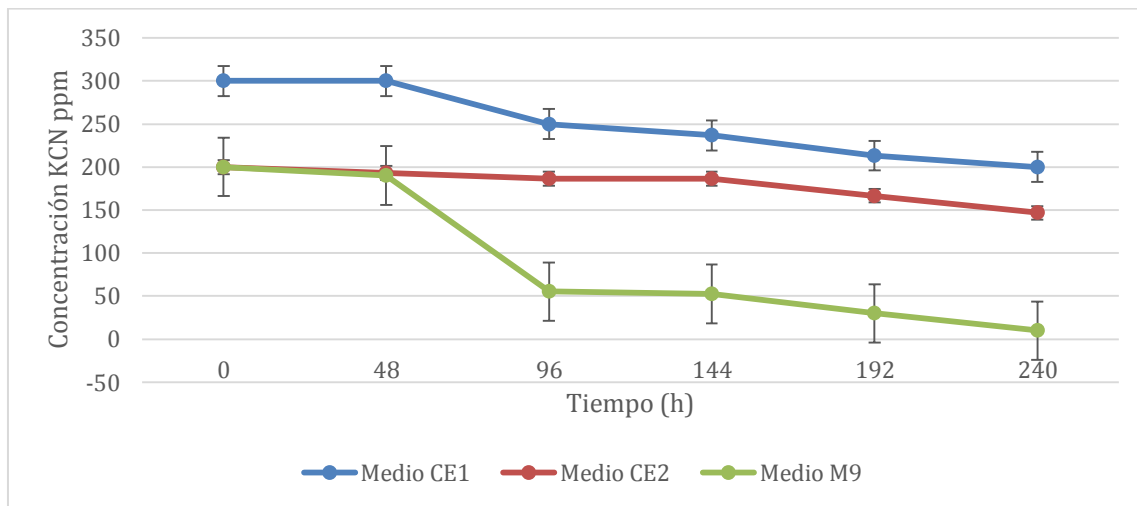


Figura 10. Degradación de KCN por el consorcio microbiano compuesto por las bacterias DA1-1 y DA2-4, evaluado en los medios CE1, CE2 y M9.

Los parámetros de crecimiento y degradación del consorcio bacteriano en tres medios de cultivo se observan en la Tabla 7.

Tabla 7

Parámetros cinéticos de crecimiento y biodegradación del consorcio bacteriano (DA1-1 y DA2-4) en los medios M9, CE1 CE2.

Parámetros	Medios					
	CE1		CE2		M9	
	\bar{x}	σ	\bar{x}	σ	\bar{x}	Σ
μ	0,12	0,01	0,04	0	0,21	0,02

Td	5,81	0,4	17,315	0,3	3,334	0,3
RE	30,99	6	19,05	4	95	0

Donde, μ = velocidad específica (h⁻¹), Td=el tiempo de duplicación celular (h); y RE= porcentaje de eficiencia de remoción (Tuya-Salas, 2014).

8. DISCUSIÓN

Entre las dos plantas de tratamiento de oro del municipio de Sotomayor fueron aisladas 13 colonias, este número de aislados es igual a los datos publicados por Benavides (2004) quien encontró 16 bacterias resistentes a cianuro; aunque se considera mayor que lo encontrado por Kandasamy et al (2015), quienes aislaron 10 bacterias en procesos industriales en la India. Al respecto en los ambientes contaminados con sustancias tóxicas prevalecen bacterias que presentan mecanismo de defensa, como la activación de enzimas alternativas que les permiten continuar con los procesos metabólicos (Dwuivedi, Balomajumder, & Mondal, 2016; Mekuto et al, 2016). No obstante, es de señalar que estos morfotipos son los más abundantes en las muestras colectadas en las piscinas de cianuración, con el 62% de los aislados bacterianos, esto concuerda con la investigación de Razanamahandry, Andrianisa, Karoui, Kouakou, & Yacouba (2016), en donde se reporta una mayor diversidad de microorganismos resistentes a cianuro en las zonas líquidas con mayor concentración de este.

Probablemente si se aplica una metodología para cuantificar bacterias totales presentes en el agua y arena se podría identificar una gran diversidad de especies gracias al elevado aporte que realizan las bacterias no cultivables (Cornejo, 2016), sin embargo, es de señalar que el interés de este trabajo se enfoca en el desarrollo de un consorcio bacteriano para aplicarlo en un futuro como parte de una estrategia de descontaminación de aguas y arenas cianuradas, por tal razón es necesario que las bacterias a seleccionar sean poco exigentes en sus requerimientos nutricionales y condiciones físicas del cultivo y que puedan crecer en medios económicos de fácil acceso para el personal que labora en las plantas de cianuración de las minas de oro.

El medio de cultivo M9 fue modificado con el propósito de que el KCN participe como un nutriente bien sea como única fuente de carbono en el medio M9-B o como fuente exclusiva

de nitrógeno en medio M9-A. Por lo cual solo las bacterias con mecanismo de asimilación para cianuro de potasio pueden crecer en estos medios de cultivo, en tal sentido, las bacterias CS9-3, DA2-4 y DA1-8 asimilan esta sustancia como fuente de carbono y las DA6-2, DA1-1, DA4-1, DA5-3, DA5-6 y DS2-1 lo utilizan como fuente de nitrógeno, en cambio las bacterias que crecieron en los dos medios DS7-3, CS7-1, DA5-7 y CS7-2 presentan dos vías de asimilación.

Al respecto la modificación del medio de cultivo M9 se constituye en un aporte al conocimiento científico-tecnológico porque se constituye en una estrategia novedosa para el aislamiento de bacterias que utilizan el KCN bien sea como fuente de carbono o de nitrógeno. Otros medios de cultivo se han empleado para el aislamiento de bacterias que degradan cianuro (Benavides, 2004; Luque et al, 2005; Coley & Zapata, 2006; Kandasamy et al, 2015), pero solo logran discriminar la vía de asimilación de esta sustancia tomada como fuente de nitrógeno.

Con respecto al medio M9-A se reporta que los microorganismos toman cianuro como fuente de nitrógeno porque en esta molécula el estado de oxidación del nitrógeno es -3, así como en NH_4^+ por lo que es una buena fuente de N para el crecimiento bacteriano (Dursun & Aksu, 2000). Debido a que *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 utiliza el cianuro como fuente de nitrógeno, es posible que las bacterias DA6-2, DA1-1, DA4-1, DA5-3, DA5-6 y DS2-1 que crecieron en el medio M9-A presenten un mecanismo similar de detoxificación. Se ha estudiado en *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 que al ingresar el CN a la célula se afecta la respiración aerobia generando estrés oxidativo, para disminuir la toxicidad y continuar con la espiración se activan los mecanismos de defensa frente a las especies reactivas de oxígeno (ROS), se induce oxidación alternativa (AOX) y malato:quinona oxidoreductasa (MQO). El oxalacetato producido por MQO se une al cianuro y se forma cianhidrina de oxalacetato, la cual es asimilada por la enzima nitrilasa

NitC generándose amonio, este último es asimilado por la bacteria a través de la ruta de la glutamina sintetasa y la glutamato sintasa (GS/GOGAT), como se observa en la figura 11 (Estepa, 2016; Cabello, et al., 2018).

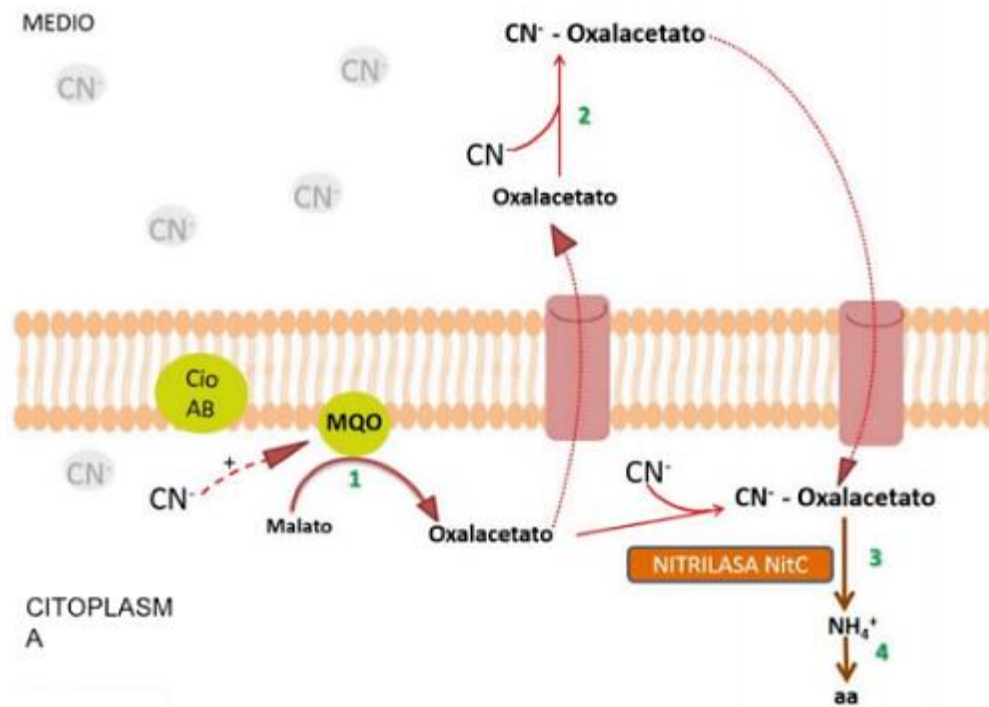


Figura 11. “ Ruta de asimilación de cianuro en *P. pseudoalcaligenes* CECT5344. 1. En presencia de cianuro, una malato:quinona oxidorreductasa (MQO) asociada a la oxidasa terminal alternativa cataliza la formación de oxalacetato. 2. El oxalacetato reacciona químicamente con el cianuro dando lugar a la cianhidrina del oxalacetato. 3. A través de la nitrilasa NitC el nitrilo formado da lugar a amonio. 4. El amonio es asimilado por la ruta GS/GOGAT” (Estepa, 2016).

Por otro lado, para determinar la vía metabólica que activan las bacterias DA2-4, CS9-3, y DA1-8 que crecieron en el medio de cultivo M9-B es necesario realizar estudios adicionales. El crecimiento de estas bacterias en el medio M9-B contradice lo planteado por varios investigadores quienes afirman que los microorganismos no son capaces de tolerar CN como única fuente de carbono ya que este elemento tiene un nivel de oxidación +2 por lo que se convierte en CO, siendo así una mala fuente de C. (Dursun y Aksu , 2000; Luque, et al., 2005; Kandasamy, et al., 2015). Es de señalar que bacterias como el aislado DA2-4 previamente identificado como *Bacillus megaterium*, degradan cianuro como fuente de

nitrógeno en donde la serina reacciona con el cianuro para formar β -cianoalanina el cual es hidrolizado a asparagina y luego a ácido aspártico (Castric & Strobel, 1969). Sin embargo, el crecimiento de *Bacillus megaterium* DA2-4 sugiere que existe otra vía de degradación, para lo cual es necesario pruebas de biología molecular y de estudios de degradación de cianuro para confirmar la especie del aislado DA2-4 y la ruta metabólica de transformación del cianuro como fuente de carbono.

Por otra parte, para el desarrollo del consorcio se utilizaron las bacterias que tienen vías de asimilación diferentes con el objeto de ampliar las opciones de asimilación del cianuro. No obstante, las bacterias que tienen las dos vías de asimilación pueden teóricamente ser más eficientes para remover cianuro, sin embargo es de señalar que en el presente estudio sólo las bacterias DA1-1, DA2-4 y DA1-8 crecieron a pH 9,5. Esta característica es muy importante al momento de desarrollar un consorcio bacteriano, porque es bien conocido que el cianuro en medio líquido se volatiliza a un pH menor a 8,0 (Tuya-Salas, 2014; Razanamahandry, et al., 2017), por lo cual solo las bacterias que soportan altos niveles de pH pueden utilizarse como inóculos para remover cianuro bajo condiciones de campo en plantas de cianuración.

Si bien los aislados bacterianos DA1-1, DA2-4 y DA1-8 tienen elevadas posibilidades para degradar cianuro debido a su crecimiento en medios de cultivo con pH de 9,5, cabe indicar que para la conformación de un consorcio se deben evaluar las interacciones ecológicas que se presentan entre ellas porque pueden inhibir o incrementar su capacidad para degradar cianuro (Faust & Raes, 2012; Lindemann, et al., 2016). Al respecto en cultivo mixto conformado por DA1-1 y DA1-8 fue evidente una relación antagónica cuando se cultivaron en medio líquido (Figura 8). Cabe mencionar que muchos microorganismos tienen la capacidad de ejercer un efecto de control biológico sobre diferentes poblaciones de otros microorganismos, estas relaciones antagónicas son estudiadas ampliamente en el sector agrícola (Hernández, Bautista, & Velázquez, 2007; Valenzuela, 2014; Hernández, et al.,

2018), sin embargo en los estudios sobre degradación de cianuro si bien se evalúan las relaciones antagónicas no se mencionan las especies que presentan este tipo de interacciones (Mirizadeh, et al, 2014).

Entre los mecanismos de antagonismo en microorganismos se encuentran las relaciones de competencia, la producción de antibióticos, enzimas y de otras sustancias como sideróforos, que permiten a estos microorganismos ejercer su capacidad biocontroladora (Bais, Weir, Gilroy, & Vivanco, 2006). Al respecto, el mecanismo de antagonismo presentado entre DA1-1 y DA1-8 no es claro, por lo cual se requiere realizar estudios adicionales enfocados en este tema. No obstante, el antagonismo entre bacilos Gram – como DA1-1 y bacilos Gram + como DA1-8 se constituye en un aporte al conocimiento de las relaciones ecológicas que presentan las bacterias de las piscinas de cianuración del municipio de los Andes Sotomayor, este aspecto es importante considerarlo si se pretende aplicar estrategias de remoción de cianuro con bacterias en la zona de estudio.

Además, es claro que para la remoción de cianuro *in situ* se deben emplear inóculos de cultivos mixtos de bacterias que no presenten antagonismo entre sí como el caso de DA2-4 y DA1-1 (*Bacillus megaterium* y *Pseudomonas aeruginosa*, respectivamente). También, se deberían adicionar a altas concentraciones a fin de mitigar el efecto antagónico con bacterias presentes en las piscinas de cianuración.

Si bien especies como *Bacillus megaterium* de DA2-4 y *Pseudomonas aeruginosa* de DA1-1 ya han sido informados como degradadoras de cianuro (Elangovan, Venkatesh, & Nagarajan, 2005; Mekuto, Obed, Kena, Tolbert, & Solomon, 2016), no existe abundante información sobre su empleo en consorcios. En esta investigación se encontró que la combinación de estas dos bacterias bajo condiciones de laboratorio, se pueden alcanzar porcentajes de remoción de cianuro bastante altos (95% de remoción de KCN en medio M9).

Sin embargo, bajo condiciones de campo en donde no hay control de las variables climáticas y fisicoquímicas los porcentajes de remoción de sustancias contaminantes son inferiores (Razanamahandy, et al., 2017; Cabello, et al., 2018). Por tal razón se diseñaron los medios de cultivo CE1 y CE2 con materiales de la región de los Andes Sotomayor a fin de simular en parte el efecto del suelo y agua disponibles en esta zona.

Es evidente que los mayores niveles de crecimiento y degradación de cianuro (Figuras 9 y 10, respectivamente) se obtuvieron con el medio de cultivo M9 utilizado como control. Cabe anotar que este medio se utiliza para evaluaciones bajo condiciones de laboratorio porque es químicamente definido y del cual no se ha informado que presente efecto de inhibición sobre el crecimiento de bacterias o degradación de cianuro.

Los medios de cultivo CE1 y CE2 presentaron menores porcentajes de remoción en comparación con el medio control probablemente por la presencia de sustancias inhibidoras que pueden afectar la expresión de genes, la actividad enzimática o el transporte de nutrientes. En esta investigación la actividad enzimática pudo verse afectada porque el suelo con el que se prepararon los medios alternativos contenían Fe (21.2 mg/Kg – Anexo 4). Cuando hay elevadas cantidades de este compuesto, las bacterias disminuyen su eficiencia para degradar cianuro. Además, es posible la formación de complejos cianuro-metal, los cuales complican y evitan el crecimiento bacteriano (Morillo Mendoza & Guevara Gonzales, 2015; Luque et al, 2016). Sin embargo, es necesario realizar estudios de optimización para verificar si es posible incrementar el porcentaje de remoción de cianuro con los medios de cultivo CE1 y CE2.

De cualquier forma, los porcentajes de remoción de los medios CE1 y CE2 de 30% y 19% respectivamente son valores de referencia para futuros estudios a escala de laboratorio y campo, desde esta perspectiva, los medios de cultivo CE1 y CE2 se consideran como una

novedad científica que aporta al estudio de remoción de cianuro con microorganismos; estos medios podrían utilizarse como base para estudios de simulación de cianuro.

En el medio de cultivo CE1 el consorcio bacteriano presenta mayor velocidad de crecimiento y tasa de duplicación con respecto al medio CE2. Este resultado concuerda con lo encontrado por Kandasamy et al, (2015) en donde *B. pumilus*, presentó mayor crecimiento que se evidencia con el aumento de la densidad óptica (0,42 a 660 nm) a 5mM de NaCN, mientras que en 1mM de NaCN tiene menor crecimiento (0,2 a 600nm) a 120 horas.

Por otro lado, la mayor tasa de remoción de KCN se obtiene con el medio de cultivo CE1 (Tabla 7). Este resultado es coherente con otras investigaciones en donde se demuestra que, a mayor concentración inicial de cianuro, habrá mayor degradación, como lo reportado por Kaewkannetraa, et al., (2009) quienes evaluaron la degradación de KCN utilizando *Azobacter vineladii* como modelo biológico, evaluó 3 concentraciones (50, 100 y 150 ppm CN⁻), y los porcentajes de remoción fueron: 56%, 58% y 65,3% respectivamente.

9. CONCLUSIONES

- Con la metodología aplicada se lograron aislar 13 bacterias resistentes a cianuro, el 62% de los aislados bacterianos se presentó en las piscinas de cianuración de la mina Cooperativa de Pequeños mineros Los Andes, Nariño, y el 38% en las arenas residuales de la mina Ecominer S.A.S.
- Se logró diferenciar las vías de asimilación de KCN de los 13 aislados bacterianos obtenidos en este estudio a partir de las modificaciones planteadas al medio de cultivo M9, en donde se utilizó el cianuro como única fuente de carbono o única fuente de nitrógeno. Los aislados bacterianos DA1-1, DA6-2, DA4-1, DA5-3, DA5-6 y DS2- asimilan KCN como única fuente de nitrógeno, los aislados DA2-4, CS9-3, y DA1-8 utilizan el KCN como única fuente de carbono y 4 aislados DS7-3, CS7-1, DA5-7, CS7-2 utilizan las dos vías.
- El consorcio bacteriano se conformó con dos bacterias que no presentan antagonismo microbiano DA1-1 y DA2-4. A su vez el aislado bacteriano DA1-1 asimila KCN como fuente de nitrógeno y DA2-4 asimila KCN como fuente de carbono.
- Los medios de cultivo CE1 y CE2 diseñados con suelo y agua de la región de los Andes Sotomayor se consideran como una novedad científica que aporta al estudio de remoción de cianuro con microorganismos; estos medios podrían utilizarse como base para estudios de simulación de remoción de cianuro.
- En el presente estudio se reporta por primera vez el uso del consorcio bacteriano conformado por las bacterias silvestres *Bacillus megaterium* (DA1-1) y *Pseudomonas aeruginosa* DA2-4, las cuales cultivadas en medios de cultivo alternativos CE1 y CE2 presentan una remoción de cianuro del 30% y 19% respectivamente.

10. RECOMENDACIONES

A partir de este estudio surgen diversas investigaciones que pueden contribuir a la construcción de una línea de investigación de remoción de cianuro con bacterias silvestres.

- Es necesario la identificación molecular de los microorganismos aislados que permita ampliar la caracterización de las bacterias empleadas.
- Se recomienda realizar estudios sobre la vía de asimilación de KCN como fuente de carbono o nitrógeno con el fin de comprender los procesos metabólicos e incrementar la remoción de cianuro con estrategias de ingeniería metabólica.
- Realizar estudios que permitan optimizar los medios de cultivo CE1 y CE2 a fin de encontrar las concentraciones de nutrientes y condiciones operacionales que incidan en el incremento de la remoción de cianuro.
- Realizar estudios de remoción bajo condiciones de campo a fin de desarrollar un paquete tecnológico bajo las condiciones de las instalaciones de las plantas de beneficio del municipio de los Andes Sotomayor. En este sentido, es necesario usar microorganismos que no tengan antagonismo entre sí y también realizar inóculos altos para evitar inhibiciones.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Akinpelu, E., Adetunji, A., Obed Ntwampe, S., Nchu, F., & Makuto, L. (2018). Performance of *Fusarium oxysporum* EKT01/02 isolate in cyanide biodegradation system. *Korean Society of Environmental Engineers*, 154-170.
- Bais, H., Weir, T., Gilroy, S., & Vivanco, J. (2006). The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu Rev Plant Biol*, 233-266.
- Benavides, W. (2004). *Aislamiento de bacterias degradadoras de cianuro residual de las plantas de cianuración del municipio de los Andes-Sotomayor*. San Juan de Pasto: Universidad de Nariño.
- Bou, G., Fernandez, A., Garcia, C., Saez, J., & Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 29:601-8.
- Cabello, P., Moreno Vivián, C., Roldán, D., Sáez, L., Olaya-Abril, A., & Luque Almagro, V. (2018). Assimilation of cyanide and cyano-derivatives by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344: from omic approaches to biotechnological applications. *FEMS Microbiology Letters*, Volume 365, Issue 6.
- Cardona Giraldo, E. A. (2015). *Microorganismos Potenciales degradadores de Cianuro en residuos de minería de oro*. Medellín: Universidad Nacional de Colombia.
- Castric, P., & Strobel, G. A. (1969). Cyanide metabolism by *Bacillus megaterium*. *The journals of biological*, 4089-4094.
- Chakraborty, R., Wu, C., & Hazen, T. (2012). Systems biology approach to bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology*, 483-490.
- Ciatiac. (2011). Instructivo para la toma de muestra de agua para análisis microbiológicos, físico-químicos y contaminantes. *Manual de procedimientos LOG 001.*, 1-100.
- Coley, T., & Zapata, D. (2016). *Aislamiento y purificación de microorganismos degradadores de cianuro*. Medellín: Universidad EAFIT.
- Cornejo, M. D. (2016). *Biorremediación de relaves mineros con el uso de un consorcio nativo caracterizado molecularmente y productor de enzimas degradadoras de cianuro y derivados*. Tumbes: Universidad nacional de Tumbes.
- Daloya, A. (2012). Tratamiento de desechos del cianuro por biorremediación. *Tecnología En Marcha*, 61-72.
- Dubey, K., & Holmes, S. (1995). Biological cyanide destruction mediated by microorganisms. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 257-267.
- Dursun, A. Y., & Aksu, Z. (2000). Biodegradation of ferrous (II) cyanide complex ions by immobilized *Pseudomonas fluorescens* in a packed-bed column reactor. *Process Biochemistry*, 615-622.
- Dwivedi, N., Balomajumder, C., & Mondal, P. (2016). Comparative evaluation of cyanide removal by adsorption, biodegradation, and simultaneous adsorption and biodegradation (SAB) process using and almond shell. *Journal of Environmental Biology*, 551-556.
- Elangovan, A., Venkatesh, K., & Nagarajan, J. (2005). Biodegradation of cyanide using *Bacillus megaterium* V. *Journal of industrial pollution control*, 247-254.

- Estepa, J. (2016). *Degradación bacteriana de cianuro y compuestos nitrogenados tóxicos*. Córdoba: Universidad de Córdoba.
- Fajardo, J., Burbano, D., Burbano, E., Apraez, N., & Rosero, M. (2010). Estudios de metodos quimicos de remoción de cianuro presentes en residuos de cinuración provenientes del proceso de extracción de oro de veta del municipio de Nariño. *Luna azul*, 8-16.
- Faust, K., & Raes, J. (2012). Microbial interactions: from networks to models. *NATURE REVIEWS / MICROBIOLOGY*, 138-150.
- Garces Molina, A. M., Agudelo Betancourt, L. M., Macias Mazo, K. I., & Salinas Alzate, N. A. (2006). Aislamiento de consorcio de microorganismos. *REVISTA LASALLISTA DE INVESTIGACIÓN*, Vol. 3 No. 1.
- Gil, E., Camargo, P., Castro, C., & Pineda, T. (2005). *Oxidación fotocatalítica del cianuro*. Medellín: Universidad EAFIT.
- Guerrero, J. (2005). Cianuro: toxicidad y destrucción biológica. *El Ingeniero de Minas*, N° 35. pp 22-25.
- Hernández, A., Bautista, S., & Velázquez, G. (2007). Uso de microorganismos antagonistas en el control de enfermedades postcosecha de frutos. *Revista mexicana de fitopatología*, 66-74.
- Hernández, L. (2010). *Evaluación de la capacidad de un aislado bacteriano nativo de Pseudomonas sp. como potencial degradador de compuestos cianuro*. Medellín: Universidad Nacional de Colombia.
- Hernández, L., Rivas, T., Romero, M., Chiquito, C., Ruiz, F., & Chiquito, R. (2018). Potencial antagonico de bacterias y levaduras marinas para el control de hongos fitopatogeno. *Revista Mexicana de ciencias agrícolas*, 4311-4321.
- Ibañez, M., Cabello, P., Luque-Alamargo, V., Sáez, L., Oyala, A., Sánchez, V., . . . Dolores, M. (2017). Quantitative proteomic analysis of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 in response to industrial cyanide-containing wastewaters using Liquid Chromatography- Mass Spectrometry/Mass Spectrometry (LC- MS/MS). *Plos one*, 1-20.
- Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. (2011). Protocolo de Muestreo, Transporte y Conservación de Muestras de Agua con Fines Múltiples . (*consumo humano, abrevado animal y riego*), 1-100.
- Javaheri Safa, Z., Aminzadeh, S., Zamani, M., & Motallbi, M. (2017). Significant increase in cyanide degradation by *Bacillus* sp. M01 PTCC 1908 with response surface methodology optimization. *AMB Expr*, 7:200.
- Kaewkannetraa , P., Imai, T., Garcia-Garcia, F., & Chiu, T. (2009). Cyanide removal from cassava mill wastewater using *Azotobacter vinelandii* TISTR 1094 with mixed microorganisms in activated sludge treatment system. *Journal of Hazardous Materials*, 224-228.
- Kandasamy, S., Dananjeyan , B., & Krishnamurthy, K. (2014). Biodegradation of cyanide and starch by individual bacterial strains and mixed bacterial consortium isolated from cassava sago wastewater. *Research Journal of Chemistry and Environment*, Vol.18 (6).

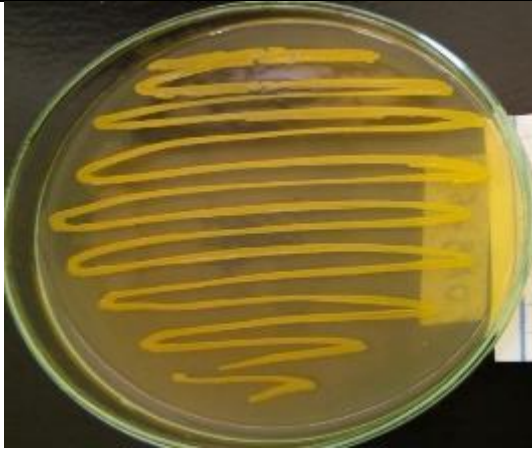
- Kandasamy, S., Dananjeyan, B., Krishnamurthy, K., & Benckiser, G. (2015). Aerobic cyanide degradation by bacterial isolates from cassava factory wastewater. *Brazilian Journal of Microbiology*, 659-666.
- Kao, C., Liu, J., Lou, H., Lin, C., & Chen, S. (2003). Biotransformation of cyanide to methane and ammonia by *Klebsiella oxytoca*. *Chemosphere*, 1055-1061.
- Kumar, R., Saha, S., Dhaka, S., Kurade, M., Kang, C., Han Baek, S., & Jeon, B. (2016). Remediation of cyanide-contaminated environments through microbes and plants: a review of current knowledge and future perspectives. *Geosystem Engineering*, 2166-3394.
- Kumar, V., Kumar, V., & Chand, T. (2015). Statistical Enhancement of Cyanide Degradation Using Microbial consortium. *Journal of microbial y biochemical technology*, 344-350.
- Lindemann, S., Bernstein, H., Song, H., Fredrickson, J., Fierlds, M., Sgou, W., . . . Beliaev, A. (2016). Engineering microbial consortia for controllable outputs. *The ISME Journal*, 1-8.
- Luque-Alamargo, V., Huertas, M., Martinez-Luque, M., Moreno-Vivia, C., Dolores, M., Roldan, D., . . . Blasco, R. (2005). Bacterial Degradation of Cyanide and Its Metal Complexes under Alkaline Conditions. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 40-947.
- Luque-Alamargo, V., Moreno, C., & Roldán, M. (2016). Biodegradation of cyanide wastes from mining and jewellery industries. *Current Opinion in Biotechnology*, 38:9-13.
- Manso, I., Ibanéz, M., Peña, F., Sáez, L., Luque-Alamargo, V., Castillo, F., . . . Moreno, C. (2015). *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344, a cyanide-degrading bacterium with by-product (polyhydroxyalkanoates) formation capacity. *Microb Cell Fact*, 14:77.
- Mekuto, L., Obed Ntwampe, S., & Jackson, V. (2015). Biodegradation of free cyanide and subsequent utilisation of biodegradation by-products by *Bacillus* consortia: optimisation using response surface methodology. *Environ Sci Pollut Res*, 10434-10443.
- Mekuto, L., Obed, S., Kena, M., Tolbert, M., & Solomon, O. (2016). Free cyanide and thiocyanate biodegradation by *Pseudomonas aeruginosa* STK 03 capable of heterotrophic nitrification under alkaline conditions. *Biotech*, 3205-3017.
- Mekuto, L., Oluwaseun Alegbeleye, O., Obed Ntwampe, S., Mewa Ngongan, M., Baptist Mudumbi, J., & Akinpelu, E. (2016). Co-metabolism of thiocyanate and free cyanide by *Exiguobacterium acetylicum* and *Bacillus marisflavi* under alkaline conditions. *Biotech*, 6:173.
- Millar. (1972). *M-9 minimal salts medium*.
- Mirzadeh, S., Yaghmaei, S., & Nejad, G. 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*, 12-85.
- Montenegro, R. (2003). Estudio sobre el impacto ambiental y sanitario de las minas de oro. el caso cordón esquel. . Retrieved from, 1-20.
- Morillo Mendoza, J., & Guevara Gonzales, J. (2015). Degradación de cianuro de sodio por *Pseudomonas* sp. a dos temperaturas y tres pH. *REBIOLEST*, 1(3): e40.

- Nwokoro, O., & Uju Dibua, M. E. (2014). Degradation of soil cyanide by single and mixed cultures of *Pseudomonas stutzeri* and *Bacillus subtilis*. *DEGRADATION OF SOIL CYANIDE BY BACTERIA*, 65:113-119.
- Peréz, R., Gonzales, T., & Muñoz, J. (2014). Antagonismo microbiano asociado a cepas bacterianas provenientes de jitomate (*Lycopersicum esculentum* Mill) y maíz (*Zea Mays*). *Revista Iberoamericana de Ciencias*, ISSN 2334-2501.
- Ramírez, A. (2010). Toxicidad del cianuro. Investigación bibliográfica de sus. *An Fac Med*, 54-61.
- Razanamahandry, L., Andrianisa, H., Karoui, H., Kouakou, K., & Yacouba, H. (2016). Biodegradation of free cyanide by bacterial species isolated from cyanide-contaminated artisanal gold mining catchment area in Burkina Faso. *Chemosphere*, 71-78.
- Razanamahandry, L. C., Karoui, H., Andrianisa, H. A., & Yacouba, H. (2017). Bioremediation of soil and water polluted by cyanide: A review. *African Journal of Environmental Science and Technology*, Vol. 11(6), pp. 272-291.
- Restrepo, O., Montoya, C., & Muñoz, N. (2006). Degradación microbiana de cianuro procedente de plantas de beneficio de oro mediante una cepa nativa de *P.fluorecens*. *Dyna*, Año 73,, 45-51.
- Ruiz, A., & UN. ECLAC. (2004). Situación y tendencias de la minería aurífera y del mercado internacional del oro. *Retrieved form*, 1-100.
- Salazar, Y., & Sánchez, E. (2011). *Evaluación de consorcios a partir de aislamientos bacterianos con capacidad degradadora de pentaeritritol (PENT) y trinitroloeno (TNT)*. Bogotá: Universidad de la Salle.
- Sankaranarayanan, A., & Gowthami, M. (2015). Cyanide Degradation by Consortium of Bacterial Species Isolated from Sago Industry Effluent. *Journal of Environmental Treatment Techniques*, 41-46.
- Tuya-Salas, J. (2014). *Evaluación de la capacidad degradativa de cianuro por bacterias alcalófilas aisladas de los relaves de la planta concentradora de metales Mesapata Cátac - Ancash*. Lima: Universidad Nacional mayor de San Marcos.
- Valenzuela, K. (2014). *Evaluación de la capacidad antagónica de bacterias promotoras de crecimiento vegetal frente a tres aislamientos de Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici (Sacc.) W.C. Snyder & H.N. Hansen*. Manizales: Universidad Católica de Manizales.
- Vargas, C., & Vargas, L. (2015). *Análisis microbiológico de suelos*. San José, Costa Rica: San Jose, Costa Rica: Departamento de Transferencia e Información Tecnológica-INTA.
- Vasil'ev, A., Vorobyov, A., Dzyubinskaya, E., Nesov, A., Shestak, A., & Samuilov, V. (2007). Cyanide-induced death of cells in plant leaves. *Biochemistry*, 572-582.
- Whishinick, M., & Lane, M. (1969). Inhibition of ribulose diphosphate carboxylase by cyanide: inactive ternary complex of enzyme ribulose diphosphate and cyanide. *J. Biol. Chem.*, vol. 244, p. 55-59.

12. ANEXOS

Anexo 1

Fotografías en agar M9 de los microorganismos aislados de las dos minas.



DA5-6



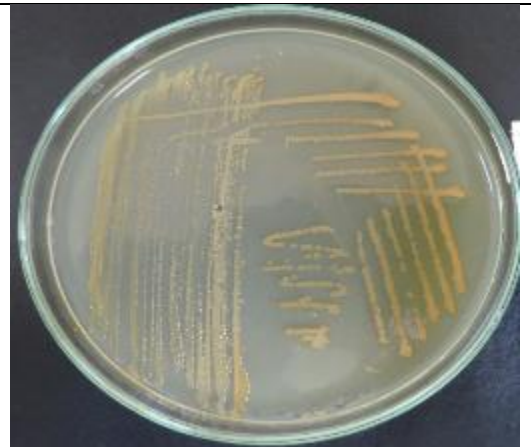
DS7-3

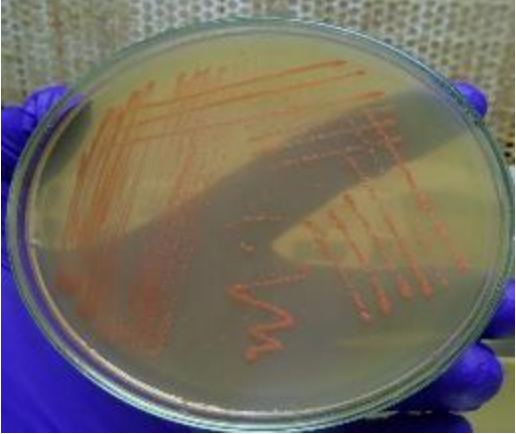
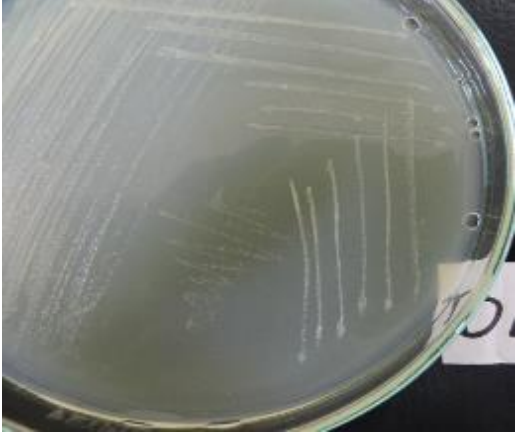
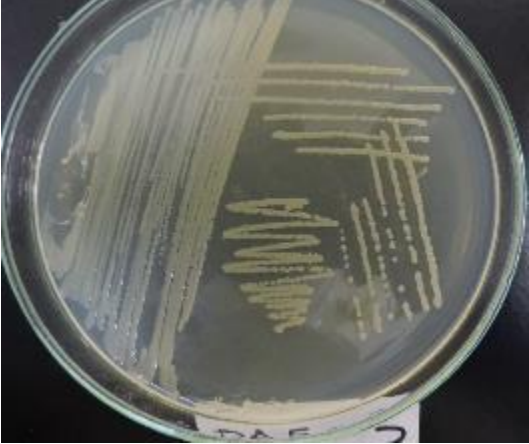







DA2-4



CS7-1



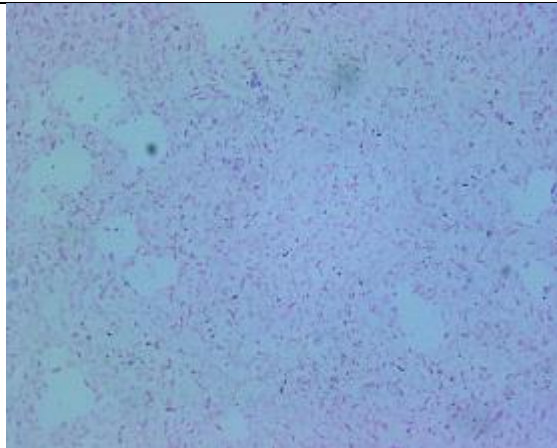
DA6-2	DA1-1
	
DA4-1	DA5-7
	
DA5-3	DS2-1
	
DA1-8	CS7-2
	



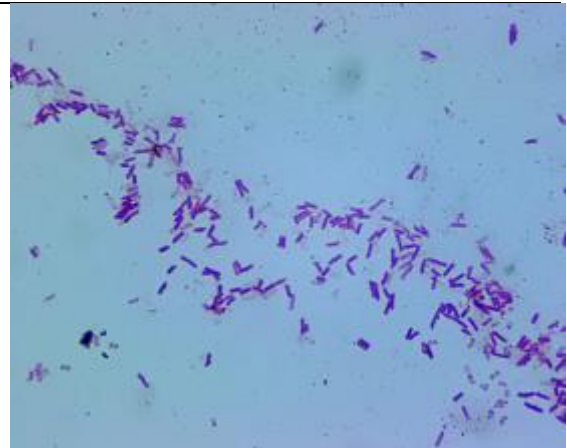
CS9-3

Anexo 2

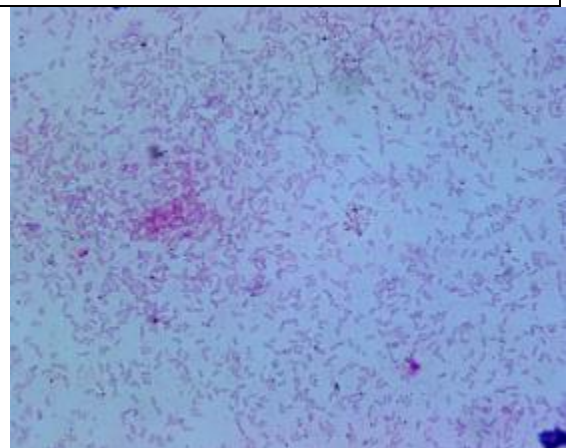
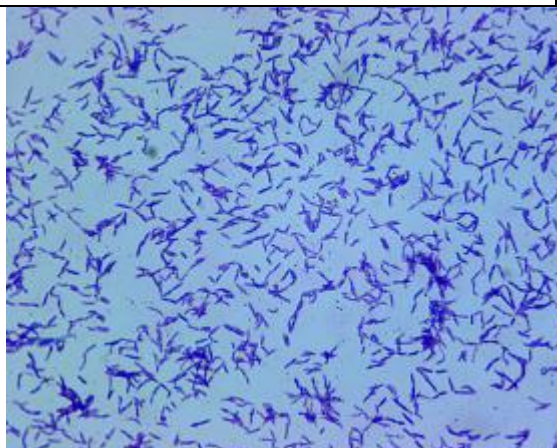
Fotografías de la tinción de Gram de los microorganismos aislados.


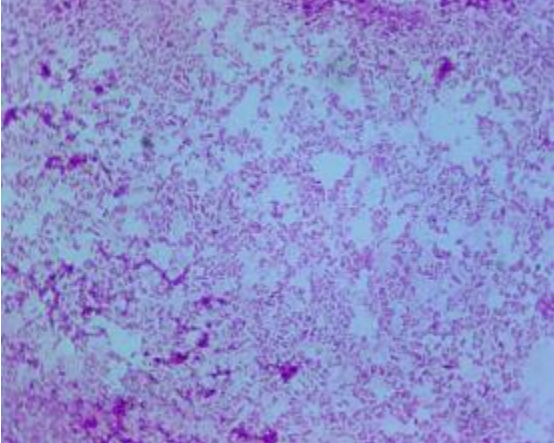
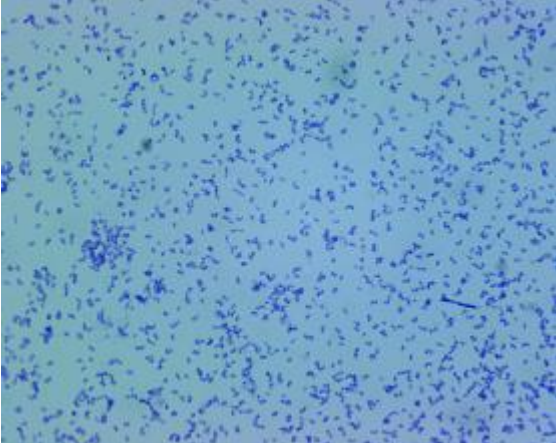
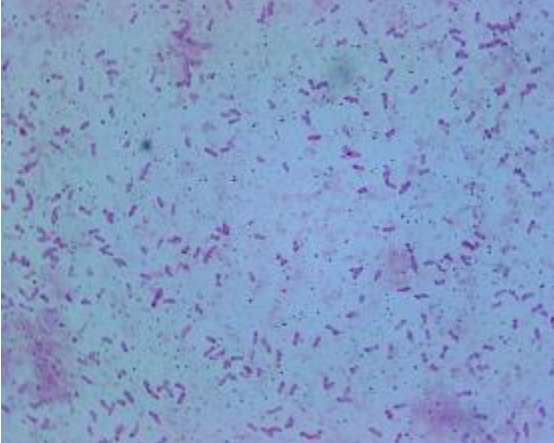
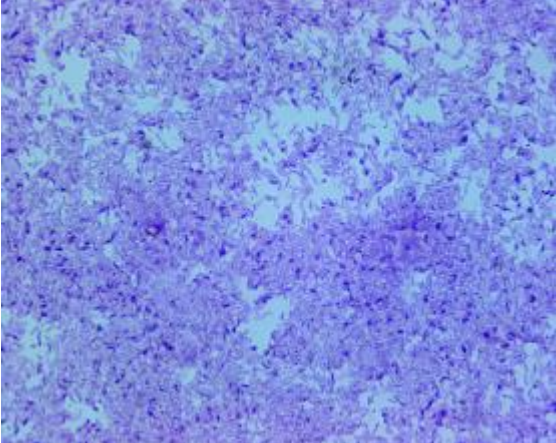



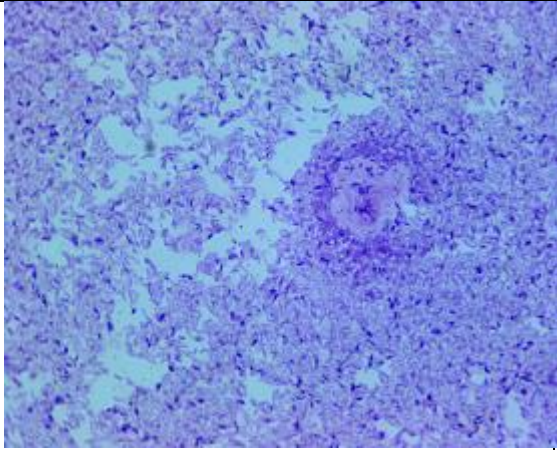
DA5-6



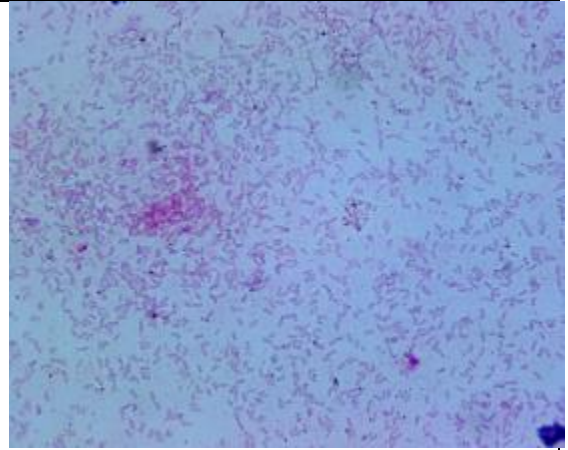
DS7-3



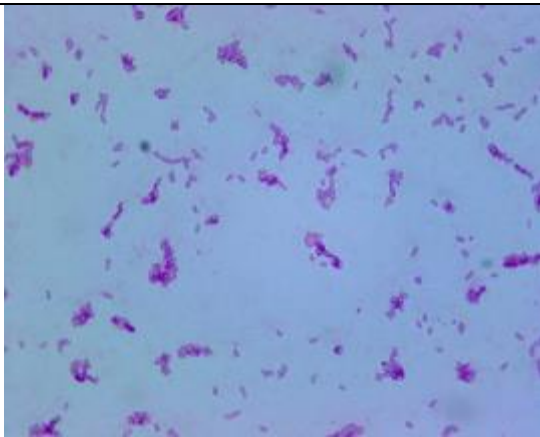
DA2-4	CS7-1
	
DA6-2	DA1-1
	
DA4-1	DA5-7
	
DA5-3	DS2-1



DA1-8



CS7-2



CS9-3


Anexo 3

Aislados bacterianos obtenidos de diferentes puntos de muestreo en las plantas de beneficio de oro en los Andes Sotomayor. Se empleó como medio de cultivo M9 suplementado con cianuro a 100 ppm. La planta 1 es: Cooperativa de pequeños mineros Los Andes, Nariño y la planta 2 es Ecominer S.A.S.


Planta	Sitio de muestreo	Código del aislado	Morfología macroscópica				Morfología microscópica
			Color	Forma	Borde	Elevación	
1	Agua	DA5-6	Amarilla	Puntiforme	Entero	Plana	Bacilos Gram -
2	Arena	DS7-3	Beige	Irregular	Entero	Plana	Bacilos Gram +
1	Agua	DA2-4	Rosado	Puntiforme	Entero	Elevada	Bacilos Gram +
2	Arena	CS7-1	Beige claro	Irregular	Lobulado	Plana	Bacilos Gram -
1	Agua	DA6-2	Beige	Irregular	Entero	Umbonada	Bacilos Gram +
1	Agua	DA1-1	Café	Circular	Entero	Papilada	Bacilos Gram -
1	Agua	DA4-1	Rosado oscuro	Irregular	Ondulado	Plana	Cocos Gram +
1	Agua	DA5-7	Blanco	Puntiforme	Entero	Plana	Bacilos Gram -
1	Agua	DA5-3	Café	Circular	Entero	Convexa	Bacilos Gram +
2	Arena	DS2-1	Café claro	Fusiforme	Ondulado	Plano	Bacilos Gram -
1	Agua	DA1-8	Blanca	Circular	Entero	Convexa	Bacilos Gram +
2	Arena	CS7-2	Café claro	Fusiforme	Entero	Papilada	Bacilos Gram -
2	Arena	CS9-3	Beige	Irregular	Ondulado	Plana	Bacilos Gram -

Anexo 4

Análisis fisicoquímico del suelo, realizado en la Universidad de Nariño.

SECCION DE LABORATORIOS REPORTE ANÁLISIS DE SUELOS AGRICOLAS				Código:LBE-PRS-FR-115					
				Página: 1 de 1					
				Versión: 2					
				Vigente a partir de: 2014-01-15					
DATOS USUARIO		DATOS MUESTRA		REPORTE No. LSIA-R-84-18					
USUARIO DEL SERVICIO:	Rosario Elizabeth Ortega	Tipo de Muestra Suelo Agrícola		Fecha Toma Muestra AA 18 MM 10 DD 20					
CC - Nit:	1085329204	Fecha Recepción Muestra AA 18 MM 11 DD 07	Fecha ejecución del análisis AA 18 MM 11 DD 16 AL AA 18 MM 11 DD 23	Fecha Emisión del Reporte AA 18 MM 11 DD 26					
Dirección:	Manzana J Casa 22 Barrio Ezequiel Moreno								
Teléfono:	3103825761	Departamento:	Nariño	Municipio:	Sotomayor				
e-mail:		Vereda:		Finca:					
Propietario:	Familia Portillo Gómez	Cultivo actual:	Plátano	Cultivo Proyectado	Plátano				
Análisis Solicitado:	Completo	Fertilizantes Aplicados:		Topografía:					
				Altitud (msnm)	Profundidad : cm 20				
PARAMETROS QUIMICOS				Código muestra - Identificación Lote					
ENSAYOS	MÉTODO	TÉCNICA	UNIDAD DE MEDIDA	LSIA-0458-18					
pH, Potenciómetro Relación Suelo: Agua (1:1)	NTC 5264	Potenciometrica		5,78					
Materia Orgánica	Walkley-Black (Colorimétrico)- NTC 5403	Espectrofotometrica uv-vis	%	5,30					
Fósforo disponible	Bray II y Kurtz NTC 5350	Espectrofotometrica uv-vis	mg/Kg	2,53					
Capacidad Intercambio Catiónico (CIC)	CH ₃ COONH ₄ 1NpH7 NTC 5268	Volumétrica		36,1					
Calcio de Cambio	CH ₃ COONH ₄ 1NpH7 NTC 5349	Espectrofotometría de Absorción Atómica	cmol ⁺ /Kg	3,13					
Magnesio de Cambio				0,76					
Potasio de Cambio				1,01					
Aluminio de Cambio	Extracción KCl 1N NTC 5263	Volumétrica		ND					
Hierro disponible				21,2					
Manganeso disponible	DTPA - NTC 5526	Espectrofotometría de Absorción Atómica	mg/Kg	0,18					
Cobre disponible				0,04					
Zinc disponible				ND					
Boro disponible	Agua Caliente NTC 5404	Espectrofotometrica uv-vis		0,09					
Nitrógeno Total	Con base en la materia orgánica	Cálculo	%	0,21					
Carbono Orgánico	Walkley-Black (Colorimétrico) NTC5403	Espectrofotometrica uv-vis	%	3,07					
Azufre disponible	[Ca(H ₂ PO ₄) ₂ ·H ₂ O] 0,008M NTC 5402	Espectrofotometrica uv-vis	mg/Kg	2,21					
PARAMETROS FISICOS									
F=Franco - Ar=Arcilloso A=Arenoso - L=Limoso	Al Tacto		Grado Textural	F-Ar-A					
Densidad Aparente	Probeta graduada	Gravimétrica	g/cc	0,79					
OBSERVACIONES:	LABORATORIO USUARIO Los resultados son válidos unicamente para la muestra analizada. Una vez entregado este informe de resultados el Laboratorio deja de tener control sobre su reproducción total o parcial. ND = No se detectó. LCM=Límite de Cuantificación del Método. NA = No Aplica								
TABLA DE INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS (ICA, Fertilización en diversos Cultivos, Quinta Aproximación)									
Bases Intercambiables	UNIDADES: cmol ⁺ /Kg			Fósforo y Elementos Menores	UNIDADES: mg/Kg			pH	
	BAJO	MEDIO	ALTO		BAJO	MEDIO	ALTO	Valor	Categoría
Ca	< de 3	3 - 6	> de 6	P	< de 20	20 - 40	> de 40	< de 5,5	Extremadamente ácido
Mg	< de 1,5	1,5 - 2,5	> de 2,5	Fe	< de 25	25 - 50	> de 50	5,5 - 5,9	Moderadamente ácido
K	< de 0,2	0,2 - 0,4	> de 0,40	Mn	< de 5	5 - 10	> de 10	6,0 - 6,5	Adecuado
Materia Orgánica Según el Clima (%)				Cu	< de 2	2 - 3	> de 3	6,6 - 7,3	Neutro
FRIO	< de 5	5 - 10	> de 10	Zn	< de 1,5	1,5 - 3	> de 3	7,4 - 8,0	Alcalino
MEDIO	< de 3	3 - 5	> de 5	B	< de 0,2	0,2 - 0,4	> de 0,4	> de 8	Muy alcalino
CALIDO	< de 2	2 - 3	> de 3	S	< de 10	10 - 20	> de 20		
Conductividad eléctrica (Grado de Salinidad) dS/m - Decisimenes/metro									
No Salino	Ligera salinidad			Moderado			Fuerte		Muy Fuerte
0 - 2	2 - 4			4 - 8			8 - 15		Mayor de 15

Elaboró Maria del Rosario Carreño Castellanos
 2018-11-26 Técnico Laboratorio de Suelos
 Revisó: Cca. Angélica Lucía Ordoñez 2018-11-26

Aprobación del Reporte:
 Laboratorio de Análisis de Suelos e Insumos Agrícolas
 FIN REPORTE DE RESULTADOS