



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Microorganismos Potenciales degradadores de Cianuro en residuos de minería de oro

Edwin Alexis Cardona Giraldo

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Minas, Departamento de Geociencias y Medio Ambiente
Medellín, Colombia

2015

Microorganismos Potenciales degradadores de Cianuro en residuos de minería de oro

Edwin Alexis Cardona Giraldo

Tesis como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Medio Ambiente y Desarrollo

Director:

Ph.D. Juan Carlos Loaiza Usuga

Codirectora:

M.Sc. Laura Osorno Bedoya

Línea de Investigación:

Biorremediación

Grupo de Investigación:

Microbiología del Suelo

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Minas, Departamento de Geociencias y Medio Ambiente

Medellín, Colombia

2015

A mi familia.

Agradecimientos

A Laura Osorno Bedoya mi incondicional codirectora, quien siempre me apoyó en el desarrollo de la tesis. Por su compromiso, acompañamiento y valiosa colaboración.

Al Dr Juan Carlos Loaiza, mi director por sus consejos, su ayuda desinteresada y sobre todo por su paciencia para conmigo.

A los profesores Walter Osorio y Orlando Ruíz por sus asesorías.

Al Laboratorio de Suelos de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín por permitirme realizar los análisis necesarios para esta investigación.

Al Señor Carlos Alberto Valencia, minero de Marmato Caldas por su colaboración para coleccionar muestras para esta investigación.

A Manuela Osorno Bedoya, por su colaboración en el desarrollo de la parte experimental de la tesis.

A mi familia por el apoyo incondicional durante la maestría.

Al grupo de investigación microbiología del suelo.

A la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín.

Resumen

El cianuro es un compuesto químico utilizado para la extracción de oro. Este, provoca la contaminación de fuentes de agua y suelo. En este trabajo se evaluó la capacidad de las bacterias de efluentes de la minería de oro para degradar el cianuro. Para el desarrollo de este trabajo, las bacterias de residuos de la minería de oro fueron aisladas. Se realizaron experimentos *in vitro* y en suelo bajo condiciones de invernadero con plantas para la degradación de cianuro. Como resultado, se encontró seis morfotipos de bacterias tolerantes y capaces de degradar las concentraciones de cianuro de 100 a 400 ppm. Dos bacterias fueron las más eficientes degradantes de cianuro en condiciones *in vitro*. Sin embargo, los resultados de biorremediación no mostraron que la degradación por bacterias y plantas fueron significativas respecto al ensayo *in vitro*.

Palabras clave: Cianuro, Bacterias, Minería de oro, Contaminación, Degradación.

Abstract

Cyanide is a chemical compound used for gold extraction. This, causes pollution in soil and water sources. In this work, the ability of effluent bacteria from gold mining to degrade the cyanide was evaluated. For the development of this work, bacteria from gold mining waste were isolated. The experiments were performed in vitro conditions and in greenhouse soil with plants for tests cyanide degradation. As a result, It was found six morphotypes bacteria tolerant and capable of degrading cyanide concentrations from 100 to 400 ppm. Two bacteria were the most efficient cyanide degrading in vitro. However, the biorremedation results did not show that the degradation by bacteria and plants were significant respect to the tesh in vitro.

Keywords: Cyanide, Bacteria, Gold Mining, contamination, Degradation.

Contenido

Pág.

Resumen IX

Lista de figuras.....XIII

Lista de abreviaturas..... XVI

Introducción 1

Objetivo General..... 2

Objetivos Específicos 2

Hipótesis..... 2

Planteamiento del problema..... 3

Justificación 4

1. Capítulo 1: Revisión de literatura..... 7

1.1 Introducción 7

1.2 El Cianuro..... 8

1.3 Utilización del cianuro 9

1.4 Contaminación por cianuro 10

1.5 Toxicidad del Cianuro 11

1.6 Formas de degradación del cianuro..... 13

1.7 Referencias 19

2. Capítulo 2: Aislamiento y evaluación de microorganismos biodegradadores de cianuro..... 33

2.1 Resumen 33

2.2 Introducción 34

2.3 Materiales y Métodos..... 35

2.4 Resultados..... 37

2.5 Discusión 43

2.6 Conclusiones 44

2.7 Recomendaciones 45

2.8 Referencias 46

3. Capítulo 3: Bioremediación de suelo contaminado con cianuro. 53

3.1 Resumen 53

3.2 Introducción 54

3.3	Materiales y Métodos	55
3.4	Resultados	57
3.5	Discusión.....	63
3.6	Conclusiones.....	64
3.7	Recomendaciones.....	65
3.8	Referencias	65

Lista de figuras

Pág.

Figura 2-1: Ubicación del Municipio de Marmato, Caldas lugar del área de estudio. Fuente: Sociedad de mejoras públicas de Manizales..... 35

Figura 2-2: Crecimiento de bacterias aisladas de los efluentes de minería de oro tratada con CN. a) Bacteria roja (R), b) Bacteria blanca rugosa (BR), c) Bacteria cremosa (C), d) Bacteria amarilla (A), e) Bacteria blanca (B), f) Bacteria rosada (RS) en agar nutritivo (AN).....38

Figura 2-3: Crecimiento de bacterias aisladas de efluentes de minería de oro en medio con CN con diferentes concentraciones. a) Bacteria Cremosa a 200 ppm, b) Bacteria Blanca rugosa a 100 ppm, c) Bacteria Blanca a 300 ppm, d) Bacteria Rosada a 100 ppm, e) Bacteria cremosa a 400 ppm y f) Bacteria blanca rugosa a 400 ppm40

Figura 2-4: Concentración final de CN en ppm para los tratamientos. R: bacteria roja, BR: blanca rugosa, B: bacteria blanca, C: bacteria cremosa, A: bacteria amarilla y RS: bacteria rosada. Letras en minúscula significan diferencias significativas. Las barras de error son un promedio de 3 repeticiones.... 41

Figura 2-5: pH de la solución al finalizar el experimento. R: bacteria roja, BR: blanca rugosa, B: bacteria blanca, C: bacteria cremosa, A: bacteria amarilla y RS: bacteria rosada. Letras en minúscula significan diferencias significativas. Las barras de error son un promedio de 3 repeticiones42

Figura 2-6: Conteo de células. R: bacteria roja, BR: blanca rugosa, B: bacteria blanca, C: bacteria cremosa, A: bacteria amarilla y RS: bacteria rosada. Letras en minúscula significan diferencias significativas. Las barras de error son un promedio de 3 repeticiones 42

Figura 3-1: Ubicación del Municipio de Marmato, Caldas lugar del área de estudio. Fuente: Sociedad de mejoras públicas de Manizales..... 55

Figura 3-2: Análisis de suelo proveniente del Municipio de Marmato... 56

Figura 3-3: Altura de las plantas a) *Leucaena* y b) *Brachiaria*, utilizadas para el ensayo. Control, Bacteria Blanca Rugosa (BR), Bacteria Cremosa (C), combinación Bacteria Cremosa con Bacteria Blanca Rugosa (CxBR). Las barras sin relleno indican una concentración de 100 ppm de CN y las barras con relleno indican una concentración de 200 ppm de CN..... 58

Figura 3-4: Masa seca de las plantas a) *Leucaena* y b) *Brachiaria*, utilizadas para el ensayo. Control, Bacteria Blanca Rugosa (BR), Bacteria Cremosa (C), combinación Bacteria Cremosa con Bacteria Blanca Rugosa (CxBR). Las barras sin relleno indican una concentración de 100 ppm de CN y las barras con relleno indican una concentración de 200 ppm de CN..... 59

Figura 3-5 Concentración inicial (CNi) y final (CNf) de CN en el ensayo en planta: a) Control 100 ppm de CN, Bacteria Blanca Rugosa (BR) a 100 ppm de concentración inicial y 70 ppm de concentración final de CN, Bacteria Cremosa (C) a 100 ppm de concentración inicial y 89 ppm de concentración final de CN, Combinación Bacteria Cremosa con Bacteria Blanca Rugosa (CxBR) a 100 ppm de concentración inicial y 68 ppm de concentración final de CN.
b) Control 200 ppm de CN, Bacteria Blanca Rugosa (BR) a 200 ppm de concentración inicial y 169 ppm de concentración final de CN, Bacteria Cremosa

(C) a 200 ppm de concentración inicial y 170 ppm de concentración final de CN, Combinación Bacteria Cremosa con Bacteria Blanca Rugosa (CxBR) a 200 ppm de concentración inicial y 178 ppm de concentración final de CN..... 60

Figura 3-6 Planta de *Brachiaria* al final del experimento con una concentración de 100 ppm el uso de los dos microorganismos y el control; se observa la posible deficiencia de N..... 61

Figura 3-7 Comprobación del postulado de Kock con los microorganismos inoculados: a). *Leucaena* con bacteria cremosa a 100 ppm de CN, b). *Leucaena* con bacteria blanca rugosa a 200 pmm de CN, c). *Brachiaria* con bacteria cremosa 200 ppm de CN, d). *Brachiaria* con bacteria blanca rugosa a 100 ppm de CN..... 62

Figura 3-8 Raíz de *Leucaena* con presencia de nódulos, bacteria BR 200 ppm CN..... 63

Lista de abreviaturas

Abrebiatura	Término
CN	Cianuro
AN	Agar Nutritivo
FN	Fijadores de Nitrógeno
HCN	Ácido cianhídrico
NaCN	Cianuro de Sodio
KCN	Cianuro de Potasio

Introducción

La extracción de oro genera problemas ambientales y sociales, causa también conflictos medioambientales, contaminación de suelos y fuentes hídricas, hasta la pérdida de ecosistemas. En la minería no existe el grado de perturbación cero, pero se busca que los impactos ambientales sean mínimos (Miranda *et al.*, 2005). La industria minera en general presenta los mismos inconvenientes y descuidos asociados a problemas de contaminación ambiental (Alarcón, 2009; Franco, *et al.*, 2010).

La minería aurífera de oro es una de las principales fuentes de contaminación por cianuro (WHO, 2004; David *et al.*, 2006). Los desechos de estas extracciones son descargados directamente en el suelo y fuentes hídricas donde se verifican los puntos más altos de cianuro. Se han reportado accidentes por contaminación con este compuesto en ecosistemas y poblaciones, alcanzando 2000 km del sitio de origen (Morán, 1998; Gurbuz *et al.*, 2004).

El cianuro es un químico utilizado para la extracción del oro, el cual genera altos niveles de contaminación en suelos, fuentes hídricas, puede destruir hábitats (Hilson y Monhemius, 2006; Sepúlveda *et al.*, 2010; Das y Santra, 2011; Hurtado y Berastain, 2012). Además de ello este compuesto es tóxico para la mayoría de los organismos, ya que forma complejos con metales (Fe^{2+} , Mn^{2+} y Cu^{2+}) que actúan como cofactor de enzimas (Raybuck, 1992; Kao *et al.*, 2003; Gaviria y Meza, 2006).

Con esta problemática ambiental y ecosistémica se hace pertinente encontrar alternativas que ayuden a mitigar y revertir los efectos negativos por la

contaminación con cianuro, mediante la recuperación de suelos y aguas con el uso de biotecnologías (procesos naturales para la remoción de contaminantes) como es el caso de la biorremediación y la fitorremediación. Estas alternativas son tecnologías ambientalmente necesarias (Hoff *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2008; Valverde *et al.*, 2011; Navarro-Noya *et al.*, 2012; Kaksonen *et al.*, 2014; Johnson, 2015; Kebeish, *et al.*, 2015), que se sirven de microorganismos capaces de degradar este químico además metales pesados y plantas que asimilan el compuesto.

Objetivo General

Evaluar el efecto de la biorremediación mediante el uso de residuos contaminados con cianuro subproducto de la minería de oro en el establecimiento de especies vegetales.

Objetivos Específicos

- Aislar microorganismos que puedan degradar cianuro en suelos contaminados por minería de oro.
- Evaluar el efecto de microorganismos en la degradación de cianuro bajo condiciones *in vitro*.
- Evaluar mediante ensayos bajo condiciones de invernadero la efectividad de microorganismos degradadores de cianuro, como posible alternativa en procesos de biorremediación utilizando especies vegetales.

Hipótesis

La biorremediación de suelos contaminados con cianuro subproducto de la minería de oro puede ser efectiva mediante el uso de microorganismos capaces de crecer en ambientes con cianuro transformándolo o metabolizándolo.

Planteamiento del problema

Cuando se plantea un proyecto de extracción minera la recuperación del ecosistema es prioritario, los servicios ecosistémicos prestados no deben disminuir, por el contrario se debe potenciar el restablecimiento de las condiciones ambientales existentes antes del proceso minero. Con tal objetivo existen metodologías de remediación de tipo físico, químico y biológico. Los tratamientos físicos y químicos son los más costosos mientras que la remediación biológica o biorremediación se presenta como una alternativa segura y económica comparada con los anteriores. El uso de microorganismos nativos son una alternativa para la depuración de aguas y suelos contaminados por minería (Gavilán *et al.*, 2008). Siendo los microorganismos los principales aportantes en los procesos de estabilización de contaminantes es importante determinar cuáles de ellos tienen un mayor potencial de sobrevivencia en suelos contaminados por minería de oro.

Los microorganismos por poseer diversas enzimas son capaces de convertir el cianuro en compuestos de origen natural, incluidos los productos de la minería (Ingvorsen *et al.*, 1991 y Kita *et al.*, 2006). Sin embargo, la utilización de bacterias para degradar cianuro y tiocianato en una escala más grande que la escala de laboratorio no se ha logrado previamente a pesar que la literatura disponible indica sobre ciertas cepas de bacterias que poseen la capacidad para degradar cianuros (Akcil *et al.*, 2003, Babu *et al.*, 1996, Patil y Paknikar, 2000). En condiciones aeróbicas, la biodegradación de los cianuros y tiocianato en las aguas residuales, inicialmente produce amoníaco, que se convierte en nitrito y nitrato en presencia de las bacterias nitrificantes, mientras que la biodegradación anaeróbica en condiciones de desnitrificación puede producir nitrógeno. Se ha informado que la biodegradación completa de cianuros complejos y simples, metal y tiocinato de aguas residuales de minería se da por diversas especies de *Pseudomonas*, *Vibrionacas* y *Enterobacterias* (Boucabeille *et al.*, 1994). Iones de sulfato se producen a partir de la degradación de tiocianato. Mientras que las bacterias y los hongos a menudo han sido identificados como los

microorganismos de desintoxicación de cianuro, también se ha demostrado la desintoxicación de cianuro por medio de algas como es el caso de *Scenedesmus obliquus*, *Chlorella sp* (Gurbuz *et. al*, 2004).

Justificación

De acuerdo con David *et al.* (2006). Los animales expuestos a dosis letales de cianuro mueren rápidamente, mientras que en dosis no-letales, metabolizan el cianuro y lo expulsan a través de sus heces, lo cual lleva a pensar que los animales no acumulan el cianuro en su cuerpo (al contrario de los metales pesados). Este mismo autor afirma la existencia de evidencias que algunos complejos metal-cianuro se acumulan en el cuerpos de los peces.

El hecho que el cianuro sea un compuesto muy reactivo explica también su muy alta toxicidad para los seres vivos, de hecho en humanos el cianuro de hidrógeno ingerido oralmente puede ser mortal a partir de una dosis equivalente a un grano de arroz (0,027 g) para el caso de poblaciones y fauna, estas pueden estar expuestas al cianuro a través del aire, agua y alimentos (WHO, 2004).

Al estar en contacto con el cianuro, ya sea en forma líquida, sólida o gaseosa, el cuerpo lo absorbe rápidamente por la piel y las superficies mucosas. Sin embargo, es más peligroso cuando se inhala, ya que se distribuye más rápidamente a través del cuerpo (Moran, 1998).

En aguas naturales no contaminadas, los compuestos de cianuro están raramente presentes en concentraciones medibles. Sin embargo, el cianuro se encuentra masivamente en las aguas residuales de las industrias como el plástico, los fertilizantes, herbicidas, colorantes y farmacéutica. En estas aguas las concentraciones de cianuro pueden ser hasta 10.000.000 veces por litro mayores que en condiciones naturales (Gurbuz *et. al*, 2004).

La industria minera aurífera esta citada como una de las mayores fuentes de contaminación de aguas por cianuro (David *et al.*, 2006, WHO, 2004), es en los

alrededores de las instalaciones de estas industrias donde se pueden encontrar niveles de cianuro más altos, ya que los desechos cianurados son descargados directamente al medio. La minería de oro ha tenido ya una larga serie de accidentes catastróficos para los ecosistemas y las poblaciones, contaminando regiones remotas, hasta a 2000 km del sitio del accidente (Morán, 1998 y Gurbuz *et. al*, 2004).

Dada esta situación se hace necesario identificar alternativas que permitan revertir los efectos adversos de la contaminación en los ecosistemas y en los individuos que los habitan, mediante la evaluación de alternativas de extracción de metales del suelo y su recuperación, usando tecnologías que promuevan los procesos naturales de remoción de contaminantes. La biorremediación y la fitorremediación son dos de estas tecnologías emergentes y ambientalmente pertinentes (Hoff *et al.*, 2002).

En Colombia, la mayor zona de explotación aurífera se encuentra ubicada entre el norte de Antioquia y el Sur de Bolívar, con más de 12.400 minas en explotación que involucran más de 50.000 personas, las cuales reciben influencia directa o indirecta de esta actividad (UPME, 2001).

En Colombia el cianuro es altamente regulado en las descargas al ambiente, según el decreto 1594 en la resolución número 1074 del 28 de Octubre de 1997 por el cual se establecen estándares ambientales en materia de vertimientos, en donde se resuelve que todo vertimiento de residuos líquidos de la red de alcantarillado público y/o a un cuerpo de agua deberá cumplir con los estándares establecidos (DTAMA, 1997). El parámetro de cianuro, expresado como CN en mg/l, tiene un valor máximo de 1.0 mg/l (1ppm) (Giraldo *et al.*, 2006).

La degradación biológica de cianuro se aprovecha de la capacidad de ciertos grupos de microorganismos, en su mayoría bacterias, para utilizar compuestos cianurados como fuente de carbono y nitrógeno, lo cual convierte el compuesto tóxico en sustancias inocuas. La biodegradación de cianuro, como también se le conoce, resulta en la formación de amonio. Los microorganismos involucrados

poseen varios sistemas enzimáticos específicos que les permite desarrollarse en ambientes con alta concentración de cianuro. Entre los microorganismos más conocidos estan; hongos (*Fusarium*, *Hasenula*), bacterias (*E.coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Citrobacter*, *Bacillus subtilis*, quienes asimilan el cianuro usandolo como fuente de nitrógeno y/o carbono, cuyo intermediario es el NH (Akcil y Mudder, 2003).

1. Capítulo 1: Revisión de literatura

1.1 Introducción

La minería de oro genera tanto cambios ambientales como sociales. Las perturbaciones ocasionadas pueden causar problemas medioambientales, la contaminación de fuentes hídricas y suelos, impactar o generar cambios en el ambiente físico, a través de la pérdida de hábitats y de la calidad de los recursos naturales, y afectar comunidades locales a través de alteraciones culturales asociadas a la actividad minera. Aunque en la minería no existe el grado de perturbación cero, se busca que los impactos ambientales y sociales negativos que esta ocasiona sean mínimos (Miranda *et al.*, 2005). La responsabilidad de la industria minera presenta los mismos inconvenientes y descuidos asociados a problemas de contaminación ambiental (Alarcón, 2009; Franco, *et al.*, 2010).

La industria minera aurífera es una de las principales fuentes de contaminación por cianuro (WHO, 2004; David *et al.*, 2006). Se encuentra altos niveles de esta sustancia en los alrededores de las explotaciones donde los desechos cianurados son descargados directamente al suelo y fuentes hídricas. Se han reportado accidentes por contaminación con cianuro en ecosistemas y poblaciones, alcanzando 2000 km del sitio de depositación (Morán, 1998; Gurbuz *et. al*, 2004). En Montana (USA) los contribuyentes continúan sufragando los multimillonarios costes de limpieza de las minas (no existe ningún modo sencillo y barato de limpiar viejas minas) dedicadas a la minería de filtrado de cianuro para la extracción de oro, los sobrantes son soluciones de cianuro ricas en metales tóxicos (Diamond, 2012).

Se hace necesario buscar alternativas que permitan revertir los efectos adversos de la contaminación con cianuro, mediante la evaluación de alternativas para la

extracción de metales del suelo y su recuperación, usando tecnologías que promuevan los procesos naturales de remoción de contaminantes. La biorremediación y la fitorremediación son dos de estas tecnologías emergentes y ambientalmente pertinentes (Hoff *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2008; Valverde *et al.*, 2011; Navarro-Noya *et al.*, 2012; Kaksonen *et al.*, 2014), las cuales usan microorganismos capaces de degradar cianuro y metales pesados y plantas que asimilan esta sustancia.

1.2 El Cianuro

El cianuro es un importante producto químico industrial que se produce a gran escala, el cual es usado en procesos mineros (extracción del oro), galvanoplastia, producción de plásticos, bronceado, síntesis química y otras industrias. Tales industrias descargan grandes cantidades de residuos ricos en cianuro, siendo un efluente altamente tóxico y peligroso (White *et al.*, 2000; Gupta, *et al.*, 2012; Kebeish *et al.*, 2015).

El cianuro puede ser producido por algunas bacterias, hongos y algas, puede ser encontrado en algunas plantas (cianogénicas) que liberan cierta cantidad de cianuro en períodos de post cosecha (Ingvorsen *et al.*, 1991, Piotrowski y Volmer 2006).

Los compuestos de cianuro están presentes en el medio ambiente en diversas formas, incluyendo HCN (Ácido cianídrico), sales inorgánicas simples como el NaCN (Cianuro de sodio) y KCN (Cianuro de potasio), complejos metal-cianuro, tiocianatos y cianuros orgánicos o nitrilos (Kjeldsen, 1999). Las sales de cianuro consisten en la combinación de un catión simple con el ión cianuro. Los metales complejos de cianuro son producidos durante la etapa de cianidación del oro por la reacción del cianuro con una variedad de minerales. Son formados dada sus estabilidades químicas como débiles, moderadas o fuertes. Compuestos con el

hierro como: $[\text{Fe}(\text{CN})_6]_4$ y $[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$ son los más fuertes complejos de cianuro, estos son susceptibles a la disociación por luz ultravioleta (Patil y Paknikar, 1999; Ebbs *et al.*, 2008).

Aunque el cianuro no es persistente, se puede transformar en otras sustancias químicas menos tóxicas mediante procesos físicos, químicos y biológicos naturales (Johnson, 2014). Dado que el cianuro se oxida cuando es expuesto al aire o a otros oxidantes, se descompone y no persiste. Es un veneno mortal cuando es ingerido en una dosis de 200 mg L^{-1} (Hernández, 2010), puede causar problemas crónicos en la salud o en el ambiente cuando está presente en concentraciones bajas (Logsdon *et al.*, 2003).

1.3 Utilización del cianuro

La mayor parte del cianuro producido se utiliza como compuesto básico para la industria química, este se produce en grandes cantidades (alrededor de 1.4 millón de toneladas por año) para sintetizar una amplia gama de químicos orgánicos industriales, como el nylon y los acrílicos (Villemur *et al.*, 2015). Por razones técnicas y económicas es la sustancia química elegida para la recuperación del oro del mineral, en este proceso se utiliza aproximadamente el 18% de la producción mundial de cianuro (Logsdon *et al.*, 2001).

Muchas de las actividades industriales, como procesamiento de carbón, síntesis orgánica, placas de metal, y lixiviación de minerales, usan cantidades significativas de cianuro. Por ejemplo, la cianuración del mineral oxidado es una tecnología utilizada a escala industrial para la recuperación de plata y oro a partir de minerales oxidados y sulfurados concentrados. De 875 operaciones de oro y plata en el mundo, 460 utilizan cianuro, el 90% del oro que se produce en el mundo utiliza cianuro (Mudder *et al.*, 2001). Este compuesto se utiliza en la

extracción de metales desde 1887 y actualmente se utiliza en las minas industrializadas de todo el mundo, con poco uso en minería artesanal, estas operaciones mineras utilizan soluciones muy diluidas de cianuro de sodio entre 100 a 500 partes por millón (Villemur *et al.*, 2015).

1.4 Contaminación por cianuro

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

En aguas naturales no contaminadas, los compuestos de cianuro están raramente presentes en concentraciones medibles. Sin embargo, el cianuro se encuentra masivamente en las aguas residuales de las industrias como el plástico, los fertilizantes, herbicidas, colorantes y farmacéutica. En estas aguas las concentraciones de cianuro pueden ser hasta 10.000.000 veces mayores que en condiciones naturales (Gurbuz *et al.*, 2004).

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

mezcla de compuestos de metal - cianuro con unas concentraciones en gramos hasta de 5.000.000 más altas de las naturales (Ghosh *et al.*, 2006).

1.5 Toxicidad del Cianuro

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

Por lo menos en 1000 especies de plantas y microorganismos de 90 familias se ha verificado que poseen uno a más de 20 compuestos con la capacidad de producir cianuro (Seigler, 1975; Kuyucak y Akcil, 2013). Alrededor de 800 especies de plantas superiores de 70 a 80 familias, incluyendo importantes especies como lino, sorgo, alfalfa, bambú, durazno, pera, cereza, ciruela, maíz, papa, algodón, almendra, y frijoles son cianogénicos (Seigler, 1975; Kuyucak y Akcil, 2013). Especies de ciempiés, escarabajos, polillas y mariposas sintetizan y excretan cianuro como mecanismo de defensa (Seigler, 1975)

El cianuro es un elemento tóxico cuya química y toxicología han sido bien estudiadas (Akcil, 2002), evaluación de toxicidad del cianuro en aves acuáticas y estudios epidemiológicos sobre los efectos a la salud humana han sido realizados por Gupta *et al.* (2012), Khamar *et al.* (2015). El cianuro es altamente tóxico y su toxicidad está relacionada con su especificación fisicoquímica. El cianuro de hidrógeno (HCN) forma cianuro libre, (CN⁻), este se clasifica como el más tóxico debido a su alto potencial de inhibición metabólica (Solomonson, 1981 y Knowles, 1988)

De acuerdo con Solomonson (1981), el Cianuro ejerce sus efectos tóxicos a través de mecanismos que implican la formación de:

- (a) Complejos con metales di ó tri-valentes en el sitio activo de metalo-enzimas tales como la citocromo oxidasa.
- (b) Los intermedios de base de Schiff que conducen a derivados de nitrilo estables durante la catálisis de la enzima.
- (c) Cianhidrinas con grupos ceto metabólicos

El cianuro en solución a través del consumo de aguas superficiales es la vía de exposición principal para la mayoría de los animales víctimas de envenenamiento por cianuro, la exposición simultánea a través de la inhalación y la absorción por la piel también puede ocurrir. Los ríos, lagos y mares pueden contaminarse por cianuro causando daños permanentes en algunas especies; los estudios toxicológicos han indicado que la exposición a corto plazo a altos niveles de cianuro puede dañar el sistema nervioso, respiratorio y cardiovascular de los animales, además degrada la formación de productos de menor toxicidad ocasionando problemas ambientales (Gurbuz *et al.*, 2009; Ramirez, 2010).

Los animales expuestos a dosis letales de cianuro mueren rápidamente, mientras que en dosis no letales, metabolizan el cianuro y lo expulsan a través de sus heces, aunque existen evidencias de acumulación de algunos complejos metal-cianuro en el cuerpos de los peces (David *et al.*, 2006). Existen evidencias de daño al ganado asociado a su alimentación con algunas especies de sorgo y otras plantas cianogénicas (Mudder, 2001).

El hecho que el cianuro sea un compuesto muy reactivo explica también su alta toxicidad para los seres vivos, en humanos el cianuro de hidrógeno (HCN) ingerido oralmente puede ser mortal a partir de una dosis equivalente a un grano de arroz (0,027 g), en poblaciones en contacto con este compuesto y fauna, pueden estar expuestas al cianuro a través del aire, agua y alimentos (WHO, 2004). La concentración letal de cianuro de hidrógeno gaseoso (LC50) es de 100-300 partes por millón

La exposición al cianuro en forma líquida, sólida o gaseosa, puede causar absorción rápida por la piel y superficies mucosas, siendo más peligroso cuando se inhala, ya que se distribuye rápidamente a través del cuerpo (Moran, 1998).

Cuando existe contacto con la piel, el valor LD50 es de 100 mg/kg de peso, el valor LD50 por ingestión del cianuro de hidrógeno es de 50-200 miligramos, o de 1-3 mg/kg de peso (Hernández, 2010).

1.6 Formas de degradación del cianuro

Se han evaluado estrategias para minimizar los impactos generados por el cianuro, el método más usado es mediante procesos físicos de exclusión, adsorción con carbón activado, tratamiento químico y recuperación de cianuro, o por el mantenimiento de los niveles disociables de ácido débil (WAD) de cianuro por debajo de 50 mg L⁻¹ (Gurbuz *et al.*, 2004, Novak *et al.*, 2013). Existen sitios en todo el mundo como es el caso de Dakota del sur en Estados Unidos, Columbia Británica en Canadá que están contaminados con cianuro como resultado de la actividad industrial del pasado y derrames accidentales (Akcil y Mudder, 2003; Huertas *et al.*, 2010; Novak *et al.*, 2013).

La degradación del cianuro se puede dar por medio de los rayos ultravioleta (factor físico), también por tratamientos químicos y biológicos siendo este último el más sano para el ambiente (Kyucak y Ackil, 2013). La eliminación de cianuro por tratamiento químico es generalmente más costosa que los procesos biológicos, pero permite una desintoxicación rápida, el tratamiento de cianuro con microorganismos para relaves y aguas residuales es una alternativa comprobada y viable a los procesos químicos (Gurbuz *et al.*, 2009). El tratamiento bacteriano de cianuro ha sido muy investigado durante las últimas décadas por diversos autores (Atkinson, 1975; Knowles, 1976; Mudder y Whitlock, 1984; Barclay *et al.*, 1998; Whitlock y Mudder, 1998; Adams *et al.*, 2001; Gurbuz *et al.*, 2002; Kuyucak y Akcil, 2013; Novak *et al.*, 2013; Kebeish *et al.*, 2015).

El tratamiento biológico, la adsorción con carbón activado, extracción con solvente, oxidación química con ozono y radiación ultravioleta son ampliamente utilizados en la remoción de complejos iónicos metálicos del cianuro, incluyendo complejos aniónicos estables como los del hierro, (Aksu *et al.*, 1999; Kuyucak y Akcil, 2013).

Los tratamientos biológicos son alternativas factibles puesto que un amplio rango de microorganismos puede metabolizar el cianuro. La bioadsorción es generalmente usada para el tratamiento de metales pesados en desechos, y podría ser empleada para el tratamiento de efluentes que contienen iones metálicos complejos (Aksu *et al.*, 1999). Un ejemplo de adsorción es la pared celular del hongo *Rhizopus arrhizus*, posee esencialmente varios compuestos orgánicos que incluyen quitina, polisacáridos ácidos, lípidos, aminoácidos y otros compuestos celulares que podrían generar una superficie para la adsorción complejos iónicos de cianuro y hierro (Aksu *et al.*, 1999).

La degradación microbiana de cianuro en las aguas residuales de minas, el tratamiento *in situ*, la desintoxicación completa y productos no tóxicos naturales tiene una ventaja sobre los métodos químicos convencionales debido a su bajo costo, (Thompson *et al.*, 1994; Adams *et al.*, 2001).

1.6.1 Métodos Físicos, químicos y Biológicos

La eliminación del cianuro en ambientes contaminados se ha dado por medio de procesos tanto físicos, químicos y biológicos cada uno con una capacidad diferente para degradarlo, costos económicos distintos debido a los equipos y mecanismos.

- **Físicos**

Uno de los métodos es el uso de la luz UV, esta tiene un efecto de degradación en el cianuro, pero es tanta la cantidad de contaminante que se derrama en el suelo y fuentes acuíferas que no alcanza a descomponer en otros elementos o

compuestos menos fuertes (Akcil, 2003, Baxter y Cummings, 2006). Esta forma de degradación es lenta en las aguas profundas, turbias o a la sombra. En residuos sólidos se requiere de grandes extensiones para que estos sean extendidos y la luz los traspase

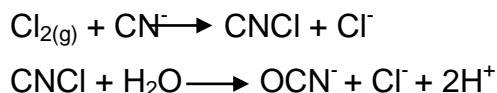
El mecanismo de oxidación fotocatalítica no ha sido determinado con precisión, pero se ha evidenciado la conversión completa de CN^- a OCN^- y la posterior formación de NO^-3 , CO_2 y H_2O_2 . (Bartosz *et al.*, 2002; González y Pulido, 2004; Kuhn y Thomas, 2005).

▪ Químicos

Entre los métodos químicos más usados están la cloración alcalina, el dióxido de sulfuro/aire, peróxido de hidrógeno donde el producto final esperado es el ión cianato (OCN^-) porque este posee una toxicidad menor y puede seguir oxidándose con cloro a un pH casi neutro y finalmente producir CO_2 y N_2 (APHA, 1998).

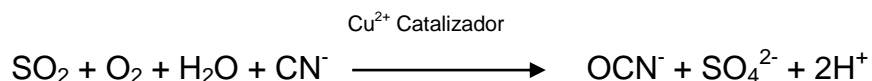
Cloración Alcalina

La reacción de destrucción del cianuro ocurre en dos etapas, que involucran la conversión de cloruro de cianuro (CNCl) seguido de su hidrólisis a cianato (Akcil, 2003; Kuyucak y Akcil, 2013).



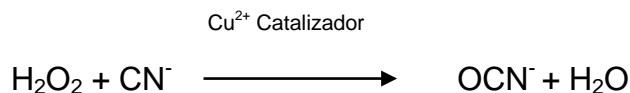
Dióxido de Sulfuro /Aire

Este utiliza SO_2 o un derivado y aire en presencia de cobre soluble como catalizador para oxidar el cianuro a cianato (OCN) que es menos toxico, (Akcil, 2003; Kuyucak y Akcil, 2013).



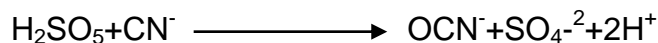
Peróxido de Hidrógeno

Es similar al proceso INCO (SO_2 /aire) pero se emplea peróxido de hidrógeno en lugar de dióxido de sulfuro y aire, también se emplea cobre soluble como catalizador y el producto de la reacción es el cianato, puede trabajarse en amplios rangos de pH, produce efluentes aceptables ambientalmente pero incrementa el total de sólido disueltos (Akcil, 2003; Kuyucak y Akcil, 2013).



Oxidación con ácido de Caro.

También conocida como oxidación con ácido peroximonosulfurico (H_2SO_5), es muy utilizada en minería, este degrada el cianuro de los efluentes de cianuración provocando que el cianuro se oxide a cianato, compuesto menos toxico que el cianuro. Se hace necesario disponer de un reactor estático para mezclar el ácido sulfúrico con el peróxido y un control apropiado de los gases que se formen, esto incrementa los costos del proceso, también se debe considerar que el ácido de Caro no es un compuesto estable y se debe tener cuidado en la cantidad a aplicar respecto al volumen a tratar (Luis, 2006).



Debido a que la reacción produce ácido sulfúrico es necesario controlar el pH adicionando cal o soda caustica.

- **Biológicos**

Estas metodologías se han empleado con éxito en el tratamiento de diferentes residuos líquidos industriales (Kuyucak y Akcil, 2013), las bacterias son las principales responsables de la degradación biológica (Akcil *et al.*, 2003), exhiben una amplia gama de funciones metabólicas y son capaces de degradar estructuras químicas como el cianuro (Botz, 2001). La degradación biológica o biodegradación de cianuro se da por la capacidad de ciertos grupos de microorganismos (en su mayoría bacterias) para utilizar compuestos cianurados como fuente de carbono y nitrógeno (Oudjehani *et al.*, 2002; Trapp *et al.*, 2003), este tipo de estrategia biológica se puede aplicar *in situ*, en medios aeróbicos y anaeróbicos, crecimientos en suspensión de forma activa y pasiva. Las especies microbianas pueden crecer en múltiples entornos que permitan la captación, el tratamiento, la adsorción y precipitación de cianuro, sus compuestos y metales (Akcil, 2002; Akcil *et al.*, 2003; Oudjehani *et al.*, 2002; Trapp *et al.*, 2003; Kuyucak y Akcil, 2013).

Se sabe que la toxicidad del cianuro en altas concentraciones puede limitar la capacidad de los microorganismos para utilizarlo como sustrato para su crecimiento (Patil y Paknikar, 1999). Compuestos de cianuro (NaCN, KCN, entre otros), se transforman a otras formas químicas (NH₃, NH₄, NO₂, CO₂), por la acción microorganismos en el suelo (Dinama, 2009).

Los microorganismos involucrados en la degradación de efluentes de minería, poseen varios sistemas enzimáticos específicos que les permite adaptarse en ambientes con alta concentración de cianuro. Entre los microorganismos más conocidos están los hongos del género *Fusarium*, *Hasenula*, y las bacterias de los géneros *E.coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Citrobacter*, *Bacillus subtilis*, quienes asimilan el cianuro usándolo como fuente de nitrógeno y/o carbono, con un

intermediario como es el NH (Akcil y Mudder, 2003; Botz *et al.*, 2005; Novak *et al.*, 2013; Kebeish *et al.*, 2015).

Algunos microorganismos tienen la capacidad de asimilar el mineral y eliminar el cianuro o llevarlo a amoníaco, fumarato y otros compuestos menos peligrosos ambientalmente, como es el caso de *Ferrobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans* y *Acidithiobacillus thiooxidans* (Asmah *et al.*, 1999); *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas fluorescens* (Castric *et al.*, 1972; Babu *et al.*, 1996; Barclay *et al.*, 1998; Watanabe *et al.*, 1998, Akcil *et al.*, 2003; Zagury *et al.*, 2004; Anderson y Cook, 2004). *Pseudomonas aeruginosa* también lo elimina con niveles adecuados de aireación entre 100 y 120 rpm (Castric *et al.*, 1972). *Pseudomonas paucimobilis* emplea moderadamente fuertes complejos metálicos de cianuro como el [K, Ni (CN)] para transformar este químico en sustancias menos contaminantes (Barclay *et al.*, 1998).

Son varios los microorganismos que se han evaluado y aislado en suelos procedentes de minería, siendo los géneros más representativos *Exiguobacterium*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, y *Acinetobacter*, los cuales mostraron reducción del arseniato bajo condiciones anaeróbicas (Zagury *et al.*, 2004; Anderson y Cook, 2004).

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

Dentro de los géneros que producen enzimas de conversión de cianuro (Ingvorsen *et al.*, 1991), que pueden eliminar o degradar este compuesto están *Chromobacterium violaceum* (Ebbs *et al.*, 2004), *Klebsiella oxytoca* (Ebbs, 2004); *Burkholderia cepacia* (Adjei y Ohta, 2000). Otras especies identificadas

previamente y que se destacan por su capacidad para degradar cianuro son *Irobacter freundii*, *Bacillus subtilis*, *Cifrobacfer freundii* y *Enterobacter*. Existen reportes de cepas de *Cifrobacfer fiemdii* y *Enferobacfer aerogenes*, las cuales juegan un papel muy importante en la desintoxicación del cianuro de efluentes de minería (Porter y Knowles, 1979).

Algunos hongos reportados en la literatura como degradadores de cianuro son; *Gloeocerospora sorghi* (Fry y Munch, 1975; Wang *et al.*, 1992), *Fusarium lateritium* y *Stemphylium loti* (Fry y Millar, 1972). En el caso de *Fusarium solani* ha sido demostrada su habilidad de utilizar el cianuro como nutriente para su crecimiento. Para *Fusarium oxysporum* se ha reportado tolerancia al KCN transformándolo en formamida (Barclay *et al.*, 1998). En el caso de *Fusarium lateritium* este presenta tolerancia al cianuro por la inducción de la enzima cianuro hidratasa (Barclay *et al.*, 1998). Otras especies de hongos como es *Trichoderma* spp, también ha sido reportada, encontrando que una variedad de cepas de *Trichoderma harzianum* actúan en la descomposición del cianuro (Ezzi y Lynch, 2005).

Existen estudios relacionados a la desintoxicación de cianuro por algas como es el caso de *Arthrospira maxima*, *Chlorella* sp. y *Scenedesmus obliquus* en aguas contaminadas obteniendo un porcentaje entre el 86 al 90% de remoción del cianuro (Gurbuz, 2004).

1.7 Referencias

Adams, D.J., Komen, J.V., Pickett, T.M. (2001). Biological cyanide degradation. In: Young, C. (Ed.). Cyanide: Social, Industrial and Economic Aspects. The Metals Society, Warrendale, PA. 203– 213.

Adjei, M. D., & Ohta, Y. (2000). Factors affecting the biodegradation of cyanide by *Burkholderia cepacia* strain C-3. *Journal of bioscience and bioengineering*, 89 (3), 274-277.

Akcil, A. (2002). Cyanide usage in gold mining and environmental standards. *Economical and Technical Journal (Standard)* 41, 65–68.

Akcil, A., Karahan, A.G., Ciftci, H., Sagdic, O. (2003). Biological treatment of cyanide by natural isolated bacteria (*Pseudomonas* species). *Minerals Engineering*. 16: 560– 567.

Akcil A. (2003). Destruction of cyanide in gold mill effluents: biological versus chemical treatments. *Biotechnology Advances*. 21 501-511

Akcil, A., & Mudder, T. (2003). Microbial destruction of cyanide wastes in gold mining: process review. *Biotechnology Letters*, 25 (6), 445-450.

Aksu, Z., Calik, A., Dursun, A. Y. & Demircan, Z. (1999). Biosorption of iron (III)–cyanide complex anions to *Rhizopus arrhizus*: application of adsorption isotherms. *Process Biochemistry*, 34 (5), 483-491.

Alarcón, L. (2009). La minería y los cambios climáticos. *Geonoticias*, Sociedad Geológica del Perú.

Anderson, C. R., & Cook, G. M. (2004). Isolation and characterization of arsenate-reducing bacteria from arsenic-contaminated sites in New Zealand. *Current microbiology*, 48 (5), 341-347.

APHA. (1998). American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, Standard Methods SM-4500-CN-D, Cyanide, Titrimetric Method, Washington, DC.

Atkinson, A. (1975). Bacterial cyanide detoxification. *Biotechnology and Bioengineering*, 17 (3), 457-460.

Asmah, R. H., Bosompem, K. M., Osei, Y. D., Rodrigues, F. K., Addy, M. E., Clement, C., & Wilson, M. D. (1999). Isolation and characterization of mineral oxidizing bacteria from the Obuasi gold mining site, Ghana. *Process Metallurgy*, 9, 657-662.

Babu, G. R. V., Vijaya, O. K., Ross, V. L., Wolfram, J. H., & Chapatwala, K. D. (1996). Cell-free extract (s) of *Pseudomonas putida* catalyzes the conversion of cyanides, cyanates, thiocyanates, formamide, and cyanide-containing mine waters into ammonia. *Applied microbiology and biotechnology*, 45 (1-2), 273-277.

Barclay, M., Hart, A., Knowles, C.J., Meeussen, J.C.L., Tett, V.A. (1998). Biodegradation of metal cyanides by mixed and pure cultures of fungi. *Enzyme and Microbial Technology* 22, 223–231.

Bartosz, D. Browski, A., Janczarek, H.J. Miller, J. (2002). Photo-oxidation of dissolved cyanide using TiO₂ catalyst. En: *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, Vol. 151, Issues 1-3, 23 201-205.

Baxter, J., & Cummings, S. P. (2006). The impact of bioaugmentation on metal cyanide degradation and soil bacteria community structure. *Biodegradation*, 17 (3), 207-217.

Botz, M. M. (2001). Overview of cyanide treatment methods. *Mining Environmental Management, Mining Journal Ltd., London, UK*, 28-30.

Boucabeille, C., Bories, A., Ollivier, P. (1994). Degradation of thiocyanate by a bacterial coculture, *Biotechnol. Lett.* 16: 425–430.

Castric, P. A., Farnden, K. J., & Conn, E. E. (1972). Cyanide metabolism in higher plants: V. The formation of asparagine from β -cyanoalanine. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 152 (1), 62-69.

Chen, C. Y., Kao, C. M., & Chen, S. C. (2008). Application of *Klebsiella oxytoca* immobilized cells on the treatment of cyanide wastewater. *Chemosphere*, 71 (1), 133-139.

David A. Dzombak Rajat S. Ghosh George M. Wong-Chong, Taylor and Francis. (2006) Cyanide in water and soil, p.6.

Diamond, J. M. (2012). *Collapse: How societies choose to fail or succeed*. p. 464.

DTAMA. 1997. Departamento Técnico y Administrativo del Medio Ambiente. p. 1-3.

Ebbs, S. (2004). Biological degradation of cyanide compounds. *Current opinion in Biotechnology*, 15 (3), 231-236.

Ebbs, S. D., Piccinin, R. C., Goodger, J. Q., Kolev, S. D., Woodrow, I. E., & Baker, A. J. (2008). Transport of ferrocyanide by two eucalypt species and sorghum. *International journal of phytoremediation*, 10 (4), 343-357.

Ezzi, M. I., & Lynch, J. M. (2005). Biodegradation of cyanide by *Trichoderma* spp. and *Fusarium* spp. *Enzyme and microbial technology*, 36 (7), 849-854.

Franco, A., Muñoz, D., Y Vélez, H. (2010). Conflictos Socio ambientales para la extracción minera en Colombia. Caso de la inversión Británica. Amigos de la tierra Colombia. p 12.

Fry, W. E., and Millar, R. L. (1972). Cyanide degradation by an enzyme from *Stemphylium loti*. Arch. Biochem. Biophys. 151: 468–474.

Fry, W.E., and Munch, D.C. (1975). Hydrogen cyanide detoxification low resolution program (CoLoRes) in the SITUS package Chacon by *Gloeocercospora sorghi*. Physiol. Plant Path. 7, 23–33.

Gavilán, I., Santos, E., Tovar, L.R., Gavilán, A., Suárez, S., Olmos, J. (2008). Mercury Speciation in Contaminated Soils from Old Mining Activities in Mexico Using a Chemical Selective Extraction. Unidad de Gestión Ambiental, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria 04510 Coyoacán, México D.F. 8, 52-55.

Ghosh RS, Johannes CL, Meeussen David, Dzombak A, David VN. (206). Fate and transport of anthropogenic cyanide in soil and groundwater In: Cyanide in water and soil: chemistry, risk, and management. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, p 191–198.

Giraldo, C., Gil, E., Camargo, P., Ossa, P. (2006). Tratamiento de aguas residuales contaminadas con cianuro. IV Congreso internacional XV Congreso nacional de Ingeniería Bioquímica. 4 al 7 de abril del 2006 en la ciudad de Morelia Mich. México. GIPAB: Grupo de Investigación en Procesos Ambientales y Biotecnológicos. Universidad EAFIT.

González, L. Pulido J.H. (2004). Análisis de alternativas para la degradación del cianuro en la planta de beneficio de la empresa Mineros Nacionales. Medellín, p 77.

Gupta, N., Balomajumder, C., & Agarwal, V. K. (2012). Adsorption of cyanide ion on pressmud surface: A modeling approach. *Chemical Engineering Journal*, 191, 548-556.

Gurbuz, F., Karahan, A., Akcil, A., & Ciftci, H. (2002). Degradation of cyanide by natural algae species. In *Extended Abstracts of the Third International Congress 'Environmental, Micropaleontology, Microbiology and Metobentholog' (EMMM'2002)* pp. 1-6.

Gurbuz, F., Ciftci, H., Akcil, A., & Karahan, A. G. (2004). Microbial detoxification of cyanide solutions: a new biotechnological approach using algae. *Hydrometallurgy*, 72(1), 167-176.

Gurbuz, F., Ciftci, H., & Akcil, A. (2009). Biodegradation of cyanide containing effluents by *Scenedesmus obliquus*. *Journal of hazardous materials*, 162(1), 74-79.

Hernández, S., L. M. (2010). Evaluación de la capacidad de un aislado bacteriano nativo de *pseudomonas* sp. como potencial degradador de compuestos cianurados, p 32-35.

Hoff, R., Hensel P., Proffitt E., Delgado P., Shigenaka G., Yender R.Y., Mearns, A.J. (2002). Oil Spills in mangroves. Planning & Response Considerations. National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA). EUA. Technical Report. 69 p.

Huertas, M. J., Sáez, L. P., Roldán, M. D., Luque-Almagro, V. M., Martínez-Luque, M., Blasco, R., García-García, I. (2010). Alkaline cyanide degradation by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 in a batch reactor. Influence of pH. *Journal of hazardous materials*, 179 (1), 72-78.

Ingvorsen, K., Højer-Pedersen, B., & Godtfredsen, S. E. (1991). Novel cyanide-hydrolyzing enzyme from *Alcaligenes xylooxidans* subsp. *denitrificans*. *Applied and environmental microbiology*, 57 (6), 1783-1789.

Johnson, C. A. (2014). The fate of cyanide in leach wastes at gold mines: An environmental perspective. *Applied Geochemistry*.

Kaksonen, A. H., Mudunuru, B. M., & Hackl, R. (2014). The role of microorganisms in gold processing and recovery—A review. *Hydrometallurgy*, 142, 70-83.

Kebeish, R., Aboelmy, M., El-Naggar, A., El-Ayouty, Y., & Peterhansel, C. (2015). Simultaneous overexpression of cyanidase and formate dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana* chloroplasts enhanced cyanide metabolism and cyanide tolerance. *Environmental and Experimental Botany*, 110, 19-26.

Khamar, Z., Makhdoumi-Kakhki, A., & Gharaie, M. M. (2015). Remediation of cyanide from the gold mine tailing pond by a novel bacterial co-culture. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 99, 123-128.

Kita, Y., Nishikawa, H., Takemoto, T. (2006). Effects of cyanide and dissolved oxygen concentration on biological Au recovery. *J. Biotechnol.* 124: 545–551.

Kjeldsen, P. (1999). Behaviour of cyanide in soil and groundwater: a review. *Water Air Soil Poll.* 115, 279–307.

Knowles, C.J. (1976). Microorganisms and cyanide. *Bacteriological Reviews* 40, 652 – 680.

Knowles, C. J., & Bunch, A. W. (1986). Microbial cyanide metabolism. *Advances in microbial physiology*, 27, 73-111.

Knowles, C.J. (1988). Cyanide utilization and degradation by microorganisms. *Ciba Foundation Symposium*, vol. 140, pp. 3 – 15.

Kuhn, D.D., Thomas, C. (2005). Photolytic degradation of hexacyanoferrate (II) in aqueous media: The determination of the degradation kinetics. En: *Chemosphere*, Vol. 60, p. 1222-1230.

Kuyucak, N., y Akcil, A. (2013). Cyanide and removal options from effluents in gold mining and metallurgical processes. *Minerals Engineering*, 50, 13-29.

Logsdon, M. J., Hagelstein, K., & Mudder, T. (2001). *El manejo del cianuro en la extracción de oro*. International Council on Metals and the Environment. p 3.

Luis, A. (2006). Análisis de alternativas para la degradación del cianuro en efluentes líquidos y sólidos del municipio de Segovia, Antioquia y en la planta de beneficio de la empresa mineros nacionales, municipio de Marmato, Caldas. *Dyna*, 73(149), 31-34.

Meyers, P. R., Gokool, P., Rawlings, D. E., & Woods, D. R. (1991). An efficient cyanide-degrading *Bacillus pumilus* strain. *Journal of general microbiology*, 137(6), 1397-1400.

Miranda, M., Chambers, D., y Coumans, C. (2005). Marco Básico para una Minería Responsable: Una Guía para la Mejora de Estándares, 4 (2), 21-48.

Moran, R. (1998). Cyanide uncertainties-Observations on the chemistry, toxicity, and analysis of cyanide and mining-related waters: Washington. DC, *Mineral Policy Centre*, 1-13.

Mudder, T., Whitlock, J. (1984). Biological treatment of cyanidation wastewaters. In: *Minerals and Metallurgical Processing*, p. 161– 165.

Mudder, T. I., Botz, M. M., & Smith, A. (2001). Chemistry and treatment of cyanidation wastes. *Mining Journal Books, London, UK*. p. 345.

Navarro-Noya, Y. E., Hernández-Mendoza, E., Morales-Jiménez, J., Jan-Roblero, J., Martínez-Romero, E., & Hernández-Rodríguez, C. (2012). Isolation and characterization of nitrogen fixing heterotrophic bacteria from the rhizosphere of pioneer plants growing on mine tailings. *Applied Soil Ecology*, 62, 52-60.

Novak, D., Franke-Whittle, I. H., Pirc, E. T., Jerman, V., Insam, H., Logar, R. M., & Stres, B. (2013). Biotic and abiotic processes contribute to successful

anaerobic degradation of cyanide by UASB reactor biomass treating brewery waste water. *water research*, 47 (11), 3644-3653.

Oudjehani, K., Zagury, G., & Deschenes, L. (2002). Natural attenuation potential of cyanide via microbial activity in mine tailings. *Applied microbiology and biotechnology*, 58 (3), 409-415.

Patil, Y.B., Panikar, K.M., (1999). Removal and recovery of metal cyanides using a combination of biosorption and biodegradation processes. *Biotechnology Letters* 21 (10), 913-919.

Patil, Y.B., Paknikar, K.M. 2000. Development of process for biot detoxification of metal cyanides from wastewaters. *Process Biochem.* 35: 1139–1151.

Piotrowski, M., & Volmer, J. J. (2006). Cyanide metabolism in higher plants: cyanoalanine hydratase is a NIT4 homolog. *Plant molecular biology*, 61 (1-2), 111-122.

Porter, N., & Knowles, C. J. (1979). Cyanide-resistant growth in *Citrobacter Freundii* and other Enterobacteriaceae. *FEMS Microbiology Letters*, 5(5), 323-326.

Ramírez, A. V. (2010, March). Toxicidad del cianuro: Investigación bibliográfica de sus efectos en animales y en el hombre. In *Anales de la Facultad de Medicina* (Vol. 71, No. 1, p. 54-61).

Seigler, D. S. (1975). Isolation and characterization of naturally occurring cyanogenic compounds. *Phytochemistry*, 14(1), 9-29.

Solomonson, L. P. (1981). Cyanide as a metabolic inhibitor. In: Vennesland B et al (eds) Cyanide in biology. Academic press. London and New York, p 11-28.

Thompson, L. J., Jones, E., & Atiyah, R. (1994). Biotreatment processes for cyanide detox in heaps and process solutions-case studies of field treatments. In *The Proceedings of the 1994 AIME/SME Annual Meeting and Exhibit* p. 14-17.

Trapp, S., Larsen, M., Pirandello, A., & Danquah-Boakye, J. (2003). Feasibility of cyanide elimination using plants. *ejmp & ep (European Journal of Mineral Processing and Environmental Protection)*, 3(1), 128-137.

UPME. (2001). Estadísticas minero energéticas. Unidad de Planeación Energética (UPME). 13p.

Valverde, A., González-Tirante, M., Medina-Sierra, M., Santa-Regina, I., García-Sánchez, A., & Igual, J. M. (2011). Diversity and community structure of culturable arsenic-resistant bacteria across a soil arsenic gradient at an abandoned tungsten–tin mining area. *Chemosphere*, 85(1), 129-134.

Villemur, R., Juteau, P., Bougie, V., Ménard, J., & Déziel, E. (2015). Development of four-stage moving bed biofilm reactor train with a pre-denitrification configuration for the removal of thiocyanate and cyanate. *Bioresource technology*, 181, 254-262.

Wang, P., Matthews, D.E., and Van Etten, H.D. (1992). Purification and characterization of cyanide hydratase from the phytopathogenic fungus *Gloeocercospora sorghi*. *Arch. Biochem. Biophys.* 298, 569–575.

Watanabe, A., Yano, K., Ikebukuro, K., & Karube, I. (1998). Cloning and expression of a gene encoding cyanidase from *Pseudomonas stutzeri* AK61. *Applied microbiology and biotechnology*, 50 (1), 93-97.

White, D. M., Pilon, T. A., & Woolard, C. (2000). Biological treatment of cyanide containing wastewater. *Water Research*, 34(7), 2105-2109.

Whitlock, J., Mudder, T. (1998). The Homestake wastewater treatment process Part I: design and startup of a full scale facility. In: Mudder, T.I., Botz, M. (Eds.), *The Cyanide Monograph*, second ed. Mining Journal Books Limited, London, England, UK, ISBN 0-9537-33602.

WHO, World Health Organization. (2004). Hydrogen cyanide and cyanides: Human health aspects. *Concise international chemical assessment document*, 61.

Zagury, G. J., Oudjehani, K., & Deschênes, L. (2004). Characterization and availability of cyanide in solid mine tailings from gold extraction plants. *Science of the Total Environment*, 320(2), 211-224.

2. Capítulo 2: Aislamiento y evaluación de microorganismos biodegradadores de cianuro

2.1 Resumen

Uno de los principales problemas de la minería de oro en Colombia y el mundo es el uso de productos químicos para el procesamiento de los minerales, estos contaminan suelos, aguas y aire. Un ejemplo es el cianuro es cual es usado para separar el oro a su forma más pura, a menudo es vertido en acuíferos y suelos. Aunque, el cianuro se puede degradar con la luz, las cantidades en las que se usa en la minería no permiten su degradación. Una alternativa para la descontaminación por cianuro es el uso de microorganismos que lo degraden. Este trabajo plantea aislar microorganismos de efluentes de minería de oro contaminados con cianuro, con el objetivo de encontrar cepas resistentes a ambiente ricos en cianuro y evaluar el efecto de estos en la biodegradación de este compuesto. Para lo cual se aislaron 6 morfotipos de bacterias. Estas, crecieron en medio enriquecidos con cianuro como única fuente de N. Presentando mejor crecimiento la colonia blanca rugosa, colonia cremosa, en todas las concentraciones de cianuro. Existen microorganismos que están en los efluentes y suelos aledaños a la minería de oro contaminados con cianuro que pueden degradarlos y usarlos como fuente de N.

Palabras clave: Minería de oro, cianuro, contaminación, degradación, bacterias.

2.2 Introducción

El cianuro (CN) es utilizado para la extracción del oro, este genera problemas de contaminación a nivel mundial (Gaviria y Meza, 2006), teniendo mayor importancia en acuíferos y suelos (Luque-Almagro *et al.*, 2005; Hilson y Monhemius, 2006; Hurtado y Berastain, 2012), afectando sus propiedades químicas y biológicas (Das y Santra, 2011), amenazando la sostenibilidad de estos ecosistemas (Sepúlveda *et al.*, 2010).

El cianuro es tóxico para la mayoría de los organismos, ya que forma complejos con metales (Fe^{2+} , Mn^{2+} y Cu^{2+}) que actúan como cofactor de muchas enzimas (Raybuck, 1992; Kao *et al.*, 2003; Gaviria y Meza, 2006). Varios autores han buscado estrategias para disminuir la concentración de CN en los suelos mediante procesos de remediación químicos y físicos, cuyas aplicaciones son limitadas debido a variaciones ambientales, altos costos y riesgos operacionales (Knowles, 1976; Kjeldsen, 1999; Karavaiko *et al.*, 2000; Gaviria y Meza, 2006; Kitis *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2007; Pirc *et al.*, 2010). Una alternativa viable es el método biológico o biorremediación (Watanabe *et al.*, 1998; Akcil *et al.*, 2003; Das y Santra, 2011), mediante el uso de microorganismos y plantas los cuales pueden metabolizar el CN (Luque-Almagro *et al.*, 2005; Huertas *et al.*, 2010), utilizándolo como fuente de N (Kim *et al.*, 2011; Johnson, 2015; Kebeish, *et al.*, 2015). Esta última estrategia es rentable, amigable con el medio ambiente, y fácilmente operable (Baxter y Cummings, 2006; Dash *et al.*, 2009; Potivichayanon y Kitleartpornpairat, 2010).

Haciendo el uso de estos microorganismos atractivo para la biorremediación de suelos contaminados por CN. (Kao *et al.*, 2003; Gupta *et al.*, 2010; Johnson, 2015). El propósito de este estudio fue aislar microorganismos que pueden degradar cianuro de residuos de minería de oro y evaluarlos bajo condiciones *in vitro* a diferentes concentraciones de CN, como posibles alternativas en programas de biorremediación.

2.3 Materiales y Métodos

Muestras

Se tomaron 5 muestras de aguas y sedimentos de efluentes de minería de oro tratada con CN, en cinco puntos en el Municipio de Marmato, Caldas, Colombia (latitud norte 5° 28' 31", longitud oeste 75° 35' 57") (figura 2-1). Cada muestra fue depositada en un recipiente ámbar de 250 ml esterilizados en autoclave a 121 °C 15 psi por 15 min, los cuales fueron almacenados en un refrigerador a 4 °C para su posterior procesamiento en el Laboratorio de Microbiología Ambiental de la Universidad Nacional de Colombia - Sede Medellín.



Figura 2-1: Ubicación del Municipio de Marmato, Caldas lugar del área de estudio.

Fuente: Sociedad de mejoras públicas de Manizales.

Aislamiento y purificación

Con el objetivo de obtener una mayor diversidad bacteriana, para el crecimiento de microorganismos provenientes de los residuos de la minería de oro se utilizaron 4 medios de cultivos: Agar Nutritivo (AN), medio King A, medio King B (Koneman, 1997) y medio para microorganismos Fijadores de Nitrógeno (FN)

(Döbereiner y Day, 1976). Cada medio fue preparado por separado, esterilizado en la autoclave a 121 °C 15 psi por 15 min y servido en cajas Petri de acuerdo a la metodología de Ackil *et al.*, (2003). Se realizó tinción de gram para la identificación de las bacterias.

El tratamiento previo del suelo consistió en tomar 1 g muestra en 50 mL de agua destilada estéril, el cual se agitó a 100 rpm durante 30 min. Posteriormente, se tomó 1 mL del sobrenadante realizando diluciones hasta 10^{-3} ; de esta solución y las muestras de efluentes se tomó 100 μ L los cuales fueron inoculados en cada uno de los medios, haciendo todos los aislamientos por duplicado. Estos medios fueron incubados a 25 °C por 4 días. Luego de observar el crecimiento de las bacterias y diferenciarlas por morfologías, se sembraron por separado en AN para tener cada cultivo axénico, finalmente estas cepas se conservaron en nevera a 4°C en AN.

Para el ensayo de crecimiento en medio sólido con CN se siguieron las metodologías de Baxter y Cummings, (2006) con modificaciones. La composición del medio fue de glucosa 1 g L⁻¹ y agar 15 g L⁻¹ en agua destilada, el cual fue esterilizado en una autoclave a 121°C de temperatura a 15 psi por 15 min. El cianuro de sodio (NaCN) como única fuente de nitrógeno (N), el cual se preparó a cuatro concentraciones a razón de 100 ppm (0,188 g L⁻¹); 200 ppm (0,376 g L⁻¹); 300 ppm (0,564 g L⁻¹) y 400 ppm (0,752 g L⁻¹), se utilizó azul de bromotimol como indicador de pH. El NaCN se esterilizó por filtración y se mezcló con el medio de cultivo a temperatura de 34°C antes de servirse en cajas Petri. Cada uno de los morfotipos aislados en el paso anterior fueron inoculados por separado en este medio y encubados a 28°C por 5 días.

Ensayo experimental *in vitro*

Se preparó un medio líquido compuesto por glucosa (1g L⁻¹), y cianuro (NaCN) como única fuente de nitrógeno (N), en dos concentraciones a razón de 100 ppm (0,188 g L⁻¹) y 200 ppm (0,376 g L⁻¹), el medio se ajustó a un pH de 11 para evitar la formación de HCN (Ácido Cianhídrico) el cual es volátil y puede afectar el

desarrollo de los microorganismos, finalmente el medio se esterilizó en la autoclave a 121 °C, 15 psi por 15 min.

Degradación de CN bajo condiciones *in vitro*

En Erlenmeyer de 250 mL, se sirvió el medio con un volumen final de 100 mL, se adicionó 10% de inóculo v/v de cada bacteria que creció y presentó tolerancia al CN en el medio sólido, con una concentración de 10^7 cel mL⁻¹. Los tratamientos se agitaron a 100 rpm durante 9 días a 28°C con sus respectivos controles; todos se hicieron con 3 repeticiones. Al final se determinó el CN por medio de un electrodo específico (Orion Dual Star pH/ISE Benchtop Thermo Scientific), pH con un potenciómetro (WTW series InoLab) y células por mL por conteo en cámara de Neubaüer.

Diseño experimental

Se empleó un diseño completamente al azar con arreglo factorial 3 x 2 para cada una de las colonias de bacterias, a razón de 3 concentraciones de CN (0, 100 y 200 ppm) 2 niveles de inoculación (con o sin la bacteria), cada uno de los tratamientos tiene tres réplicas, incluyendo el control. Los diferentes tratamientos se evaluaron mediante un análisis de varianza, para lo cual se realizaron pruebas con un nivel de significancia $P \leq 0.05$, el análisis estadístico se ejecutó mediante el software STATGRAPHICS versión centurión XVI.

2.4 Resultados

Asilamiento y purificación

En esta etapa se vio el crecimiento de bacterias y hongos en todas las muestras (los hongos no se evaluaron en esta investigación). Se observó el crecimiento de 6 morfotipos diferentes de bacterias, aislados y purificados de las muestras, Gram positiva: Blanca (B). Gram negativa las siguientes: Amarilla (A), Rosada (RS), Cremosa (C), Blanca rugosa (BR), Roja (R) ver figura 2-2.

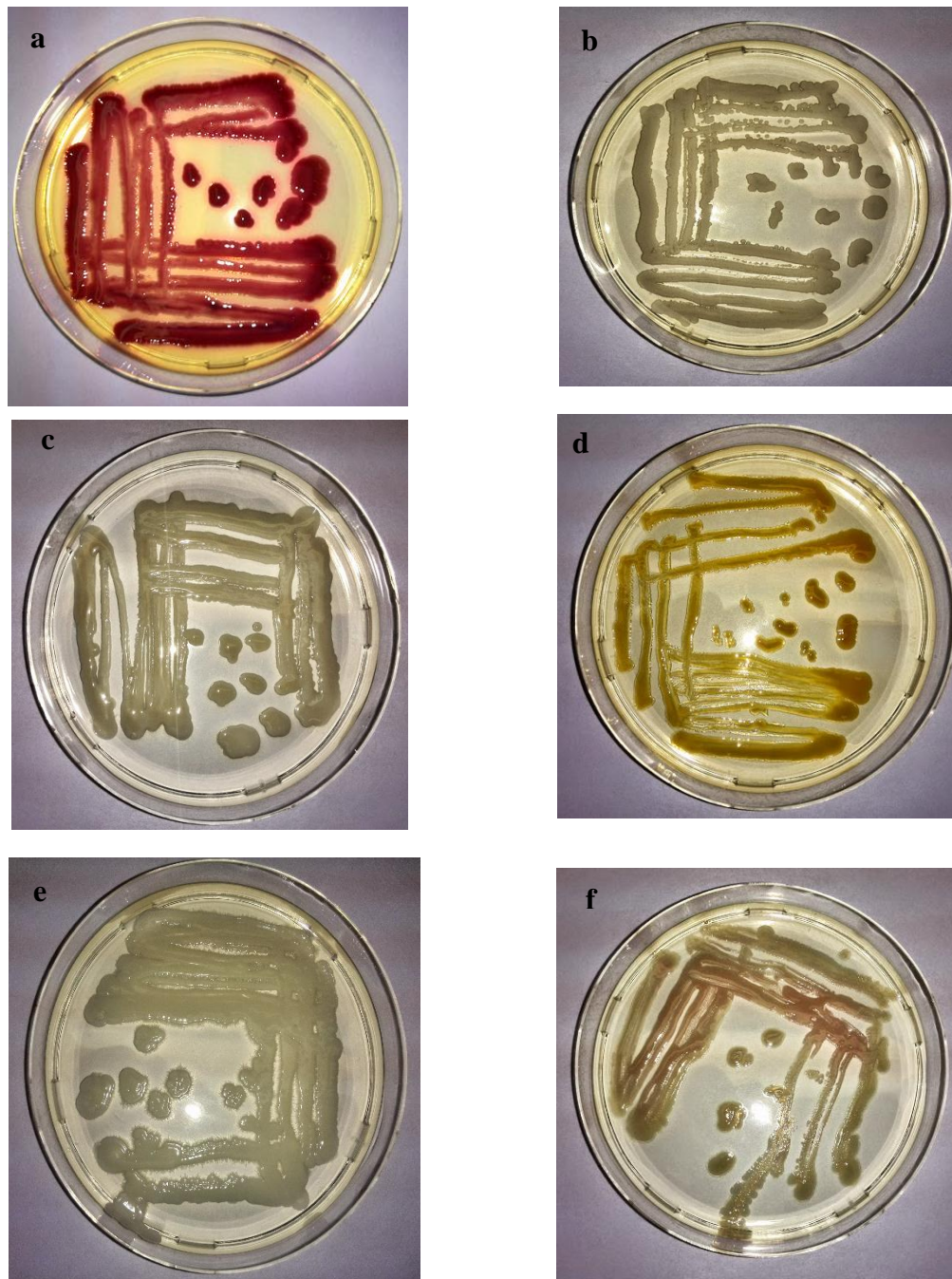


Figura 2-2: Crecimiento de bacterias aisladas de los efluentes de minería de oro tratada con CN. a) Bacteria roja (R), b) Bacteria blanca rugosa (BR), c) Bacteria cremosa (C), d) Bacteria amarilla (A), e) Bacteria blanca (B), f) Bacteria rosada (RS) en agar nutritivo (AN).

Para el crecimiento de bacterias en medio sólido con CN, se presentó crecimiento de los seis morfotipos de bacterias mostrados en la figura (2-2) para todas las concentraciones (100 ppm, 200 ppm, 300 ppm y 400 ppm), sin embargo, se observó mayor crecimiento para la bacteria blanca rugosa y la bacteria cremosa, ver figura (2-3).

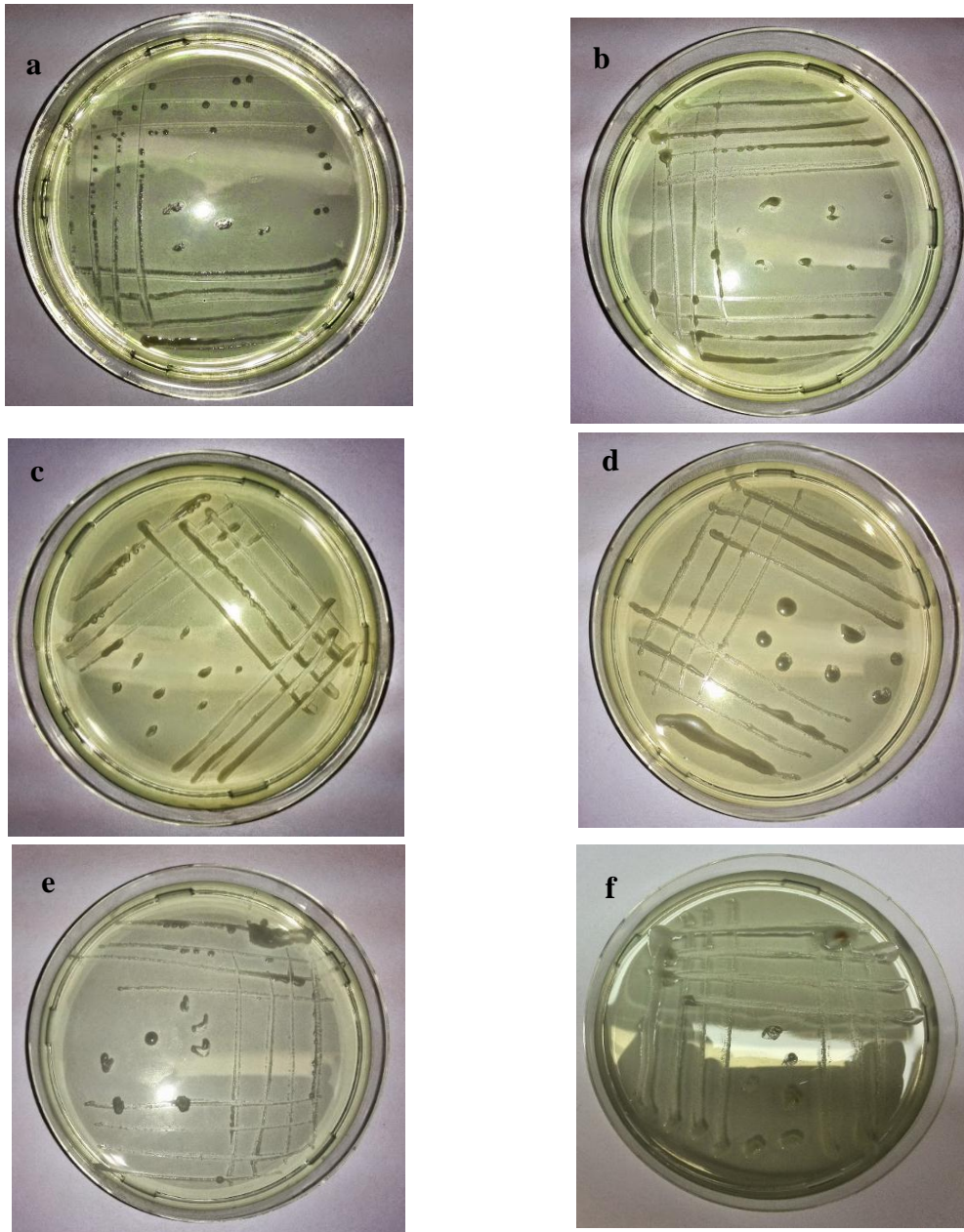


Figura 2-3: Crecimiento de bacterias aisladas de efluentes de minería de oro en medio con CN con diferentes concentraciones. a) Bacteria Cremosa a 200 ppm, b) Bacteria Blanca rugosa a 100 ppm, c) Bacteria Blanca a 300 ppm, d) Bacteria Rosada a 100 ppm, e) Bacteria cremosa a 400 ppm y f) Bacteria blanca rugosa a 400 ppm.

Degradación de CN bajo condiciones *in vitro*

Los resultados encontrados muestran que todas las bacterias presentan una disminución en la cantidad de CN significativa con respecto al control (200 ppm) (figura 2-4). Las bacterias que mostraron mayor disminución de CN fueron la cremosa, con una reducción de 85 ppm. Seguido de la blanca rugosa con 79 ppm, la rosada 33 ppm, la bacteria blanca 30 ppm, la amarilla 11 ppm y la roja 10 ppm de degradación. De acuerdo a los resultados de pH, 4 bacterias presentaron diferencia significativa con respecto al control (pH: 11), las bacterias BR y A no modificaron el pH medio, la bacteria C fue la que logró bajar más el pH alcanzando un valor de pH: 10,5 (figura 2-5). Al finalizar el ensayo, el conteo bacteriano fue de 10^7 células mL^{-1} mostrando una buena concentración bacteriana, donde se puede ver que el CN no inhibió el crecimiento de estas (figura 2-6). El control no presentó bacterias.

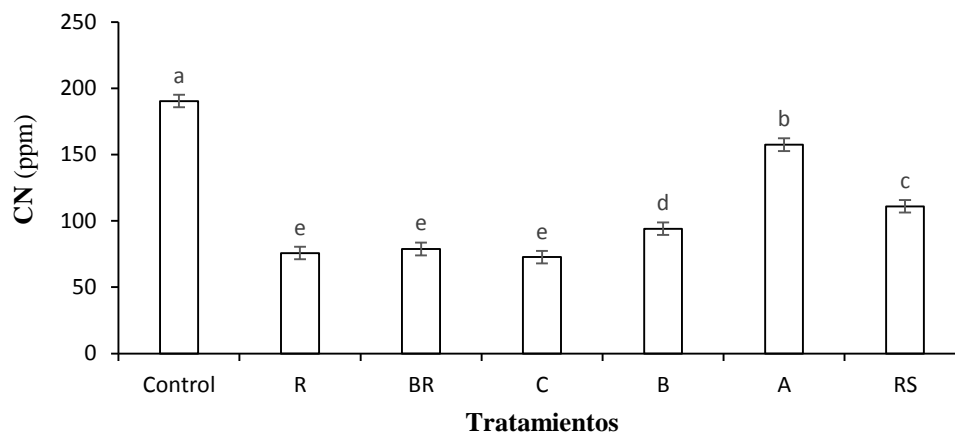


Figura 2-4: Concentración final de CN en ppm para los tratamientos. R: bacteria roja, BR: blanca rugosa, B: bacteria blanca, C: bacteria cremosa, A: bacteria amarilla y RS: bacteria rosada. Letras en minúscula significan diferencias significativas. Las barras de error son un promedio de 3 repeticiones.

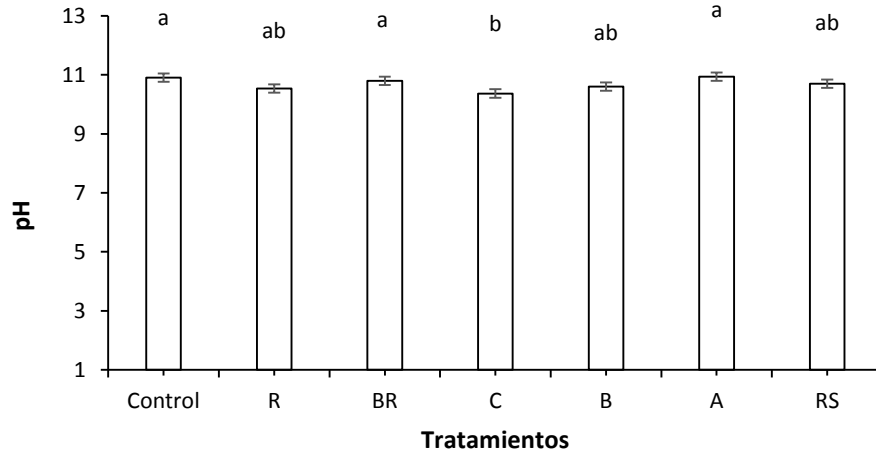


Figura 2-5: pH de la solución al finalizar el experimento. R: bacteria roja, BR: blanca rugosa, B: bacteria blanca, C: bacteria cremosa, A: bacteria amarilla y RS: bacteria rosada. Letras en minúscula significan diferencias significativas. Las barras de error son un promedio de 3 repeticiones.

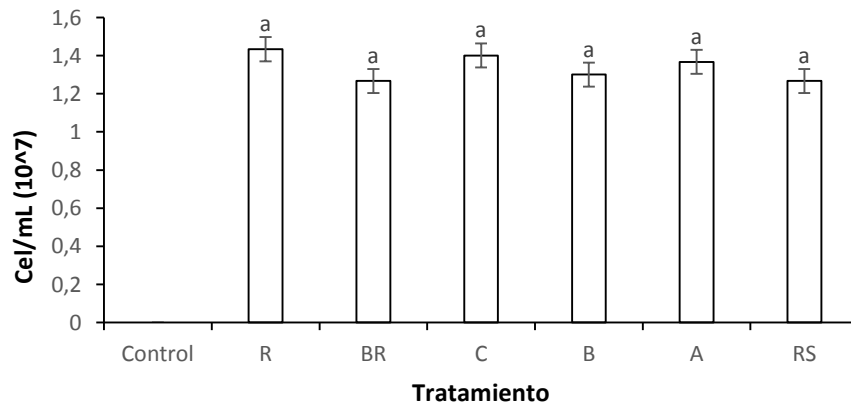


Figura 2-6: Conteo de células. R: bacteria roja, BR: blanca rugosa, B: bacteria blanca, C: bacteria cremosa, A: bacteria amarilla y RS: bacteria rosada. Letras en minúscula significan diferencias significativas. Las barras de error son un promedio de 3 repeticiones.

2.5 Discusión

Las bacterias aisladas y purificadas de efluentes de minería de oro, en este trabajo pueden crecer y tolerar concentraciones de CN, además lo degradan como se mostró en el ensayo *in vitro*.

La biodegradación de CN se ha estudiado con microorganismos que degradan este compuesto a productos finales no tóxicos y estos lo usan como fuente de nitrógeno, (Babu *et al.*, 1996; Dumestre *et al.*, 1997; Barclay *et al.*, 1998; Kao *et al.*, 2003; Gurbuz *et al.*, 2009; Huertas *et al.*, 2010; Naveen *et al.*, 2011; Bhalla *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2013; Maniyam *et al.*, 2013; Mirizadeh *et al.*, 2014). Estos autores, confirman lo encontrado en esta investigación el nitrógeno de este compuesto (CN) es tomado para el desarrollo de los microorganismos.

De acuerdo a los resultados en esta investigación se presenta diversidad de bacterias (6 morfotipos) que crecieron en los efluentes de minería de oro, (Boucabeille *et al.*, 1994; Akcil, 2002; Oudjehani *et al.*, 2002; Akcil *et al.*, 2003; Trapp *et al.*, 2003; Zagury *et al.*, 2004; Huertas *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2013, Kuyucak y Akcil, 2013), estos autores reportan diversidad bacteriana en residuos, efluentes y sustratos contaminados con CN.

Las bacterias aisladas de estas muestras, toleran concentraciones de CN hasta 400 ppm, con este compuesto como única fuente N, como lo encontrado por Akcil, 2002; Oudjehani *et al.*, 2002; Akcil *et al.* 2003; Khamar, 2015. Todos los autores trabajaron con medios de cultivo enriquecidos con CN como fuente de N igual que lo realizado en esta investigación, condiciones asépticas y temperaturas de incubación similares para el desarrollo de los microorganismos.

La tolerancia al CN varía de acuerdo al microorganismo. Khamar y colaboradores 2015 encontraron dos cepas bacterianas que pueden tolerar una concentración de 350 ppm de CN. Luque-Almagro *et al.*, (2005) hallaron una amplia gama de tolerancias de CN con *Pseudomonas pseudoalcaligenes* hasta en 780 ppm de CN con un pH inicial de 11.5. Boucabeille *et al.*, (1994) investigaron en un medio

enriquecido con glucosa *Pseudomonas* sp. tolerando 228 ppm de cianuro. Para este trabajo se tuvo en cuenta dos concentraciones de CN 100 y 200 ppm, que fueron las concentraciones más óptimas para ver la actividad y eficiencia de las bacterias en la tolerancia y degradación del CN.

Estos autores trabajaron con concentraciones crecientes hasta 1000 ppm de CN. Akcil, (2002) trabajó con 200 ppm de NaCN; Oudjehani *et al.*, (2002) tomó KCN en cantidades de 230 ppm y 790 ppm; Akcil *et al.* (2003) reportó una tolerancia de 1000 ppm de NaCN, encontrando al género de las *Pseudomonas* sp con capacidad de tolerancia y degradación del compuesto; Khamar, (2015) desde 25 ppm hasta 200 ppm de CN, donde identificaron el crecimiento de *Azotobacter vinelandii* y degradación del CN por parte de *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, *Pseudomonas* sp.

El pH del medio se controló y mantuvo en valores cercanos a 11 como lo reportado por (Boucabeille *et al.*, 1994; Khamar, 2015 Se usan estos valores básicos para evitar la volatilización del CN (Boucabeille *et al.*, 1994; Huertas *et al.*, 2010). Khamar (2015) mostró que a un pH de 10 estos microorganismos pueden crecer y así efectuar funciones de degradadores, como ocurrió con los ensayos *in vitro* en este proyecto, donde el medio estaba con un pH inicial de 11 favoreciendo el crecimiento apropiado de las bacterias y así facilitando o generando su actividad degradadora.

2.6 Conclusiones

La concentración de células por mL⁻¹ refleja que el medio con CN no inhibió el crecimiento bacteriano, estas bacterias en presencia del CN degradaron este contaminante.

Todas las bacterias degradaron el CN en el ensayo *in vitro* pero no presentaron la misma eficiencia o el mismo poder de degradación de este compuesto

posiblemente porque la adaptación y resistencia de estas no es completo con sustancias tan contaminantes.

Los resultados in vitro muestran que en solo 9 días, 3 morfotipos de bacterias lograron reducir a casi una tercera parte el CN inicial del medio. Lo anterior demuestra que estas bacterias no solo toleran el CN sino que además lo están metabolizando o transformando. Lo anterior genera la posibilidad de generar ensayos con sustratos contaminados con CN y así evaluar su funcionamiento bajo condiciones de invernadero

2.7 Recomendaciones

Se recomienda identificar las bacterias aisladas que presentan una mayor tolerancia al CN, para futuras investigaciones sería importante realizar aislamientos y ensayos de ADN más detallados que permitan identificación y caracterización de estas cepas.

Dada la alta actividad microbiana hallada en este primer acercamiento al comportamiento de estas bacterias en condiciones experimentales, es necesario profundizar en el estudio de su comportamiento bajo condiciones controladas en invernadero y su factibilidad de uso en la recuperación de suelos degradados.

La actividad microbiana de las bacterias halladas en esta investigación dejan una puerta abierta para trabajar en la recuperación de suelos o ecosistemas afectados por las actividades mineras.

2.8 Referencias

Akcil, A., (2002). First application of cyanidation process in Turkish gold mining and its environmental impacts. *Minerals Engineering*, 15: 695– 699.

Akcil, A. (2003). Destruction of cyanide in gold mill effluents: biological versus chemical treatments. *Biotechnology Advances*, 21 (6), 501-511.

Akcil, A., Karahan, A. G., Ciftci, H., & Sagdic, O. (2003). Biological treatment of cyanide by natural isolated bacteria (*Pseudomonas sp.*). *Minerals engineering*, 16(7), 643-649.

Babu, G. R. V., Vijaya, O. K., Ross, V. L., Wolfram, J. H., & Chapatwala, K. D. (1996). Cell-free extract (s) of *Pseudomonas putida* catalyzes the conversion of cyanides, cyanates, thiocyanates, formamide, and cyanide-containing mine waters into ammonia. *Applied microbiology and biotechnology*, 45 (1-2), 273-277.

Barclay, M., Tett, V. A., & Knowles, C. J. (1998). Metabolism and enzymology of cyanide/metalocyanide biodegradation by *Fusarium solani* under neutral and acidic conditions. *Enzyme and Microbial Technology*, 23 (5), 321-330.

Bhalla, T. C., Sharma, N., & Bhatia, R. K. (2012). Microbial degradation of cyanides and nitriles. In *Microorganisms in Environmental Management* (25), 569-587.

Baxter, J., & Cummings, S. P. (2006). The impact of bioaugmentation on metal cyanide degradation and soil bacteria community structure. *Biodegradation*, 17 (3), 207-217.

Boucabeille, C., Bories, A., Ollivier, P., Michel, G., (1994). Microbial degradation of metal complexed cyanides and thiocyanate from mining wastewaters. *Environ. Pollut.* 84, 59-67.

Dash, R. R., Gaur, A., & Balomajumder, C. (2009). Cyanide in industrial wastewaters and its removal: A review on biotreatment. *Journal of Hazardous Materials*, 163 (1), 1-11.

Das, S., & Santra, S. C. (2011). Cyanide degradation by *Aspergillus niger* strain isolated from steel-plant wastewater. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 10 (7), 2516-2522.

Döbereiner, J., & Day, J. M. (1976). Associative symbioses in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. In *Proceedings of the 1st international symposium on nitrogen fixation*. Vol. 2, p. 518-538.

Dumestre, A., Chone, T., Portal, J., Gerard, M., & Berthelin, J. (1997). Cyanide Degradation under Alkaline Conditions by a Strain of *Fusarium solani* Isolated from Contaminated Soils. *Applied and environmental microbiology*, 63 (7), 2729-2734.

Gaviria C, A. C., & Meza S, L. A. (2006). Análisis de alternativas para la degradación del cianuro en efluentes líquidos y sólidos del municipio de Segovia, Antioquia y en la planta de beneficio de la empresa mineros nacionales, municipio de Marmato, Caldas. *Dyna*, 73 (149), 31-44.

Gupta, N., Balomajumder, C., & Agarwal, V. K. (2010). Enzymatic mechanism and biochemistry for cyanide degradation: a review. *Journal of hazardous materials*, 176 (1), 1-13.

Gurbuz, F., Ciftci, H., & Akcil, A. (2009). Biodegradation of cyanide containing effluents by *Scenedesmus obliquus*. *Journal of hazardous materials*, 162 (1), 74-79.

Hilson, G., & Monhemius, A. J. (2006). Alternatives to cyanide in the gold mining industry: what prospects for the future? *Journal of Cleaner production*, 14 (12), 1158-1167.

Huertas, M. J., Sáez, L. P., Roldán, M. D., Luque-Almagro, V. M., Martínez-Luque, M., Blasco, R., & García-García, I. (2010). Alkaline cyanide degradation by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 in a batch reactor. Influence of pH. *Journal of hazardous materials*, 179 (1), 72-78.

Hurtado, J., & Berastain, A. (2012). Optimización de la biorremediación en relaves de cianuración adicionando nutrientes y microorganismos. *Revista Peruana de Biología*, 19 (2), 187-192.

Johnson, C. A. (2015). The fate of cyanide in leach wastes at gold mines: An environmental perspective. *Applied Geochemistry*, 57, 194-205.

Khamar, Z., Makhdoumi-Kakhki, A., & Gharaie, M. M. (2015). Remediation of cyanide from the gold mine tailing pond by a novel bacterial co-culture. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 99, 123-128.

Kao, C.M., Liu, J.K., Lou, H.R., Lin, C.S., Chen, S.C., (2003). Biotransformation of cyanide to methane and ammonia by *Klebsiella oxytoca*. *Chemosphere* 50, 1055-1061.

Karavaiko, G. I., Kondrat'eva, T. F., Savari, E. E., Grigor'eva, N. V., & Avakyan, Z. A. (2000). Microbial degradation of cyanide and thiocyanate. *Microbiology*, 69 (2), 167-173.

Kebeish, R., Aboelmy, M., El-Naggar, A., El-Ayouty, Y., & Peterhansel, C. (2015). Simultaneous overexpression of cyanidase and formate dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana* chloroplasts enhanced cyanide metabolism and cyanide tolerance. *Environmental and Experimental Botany*, 110, 19-26.

Kim, Y. M., Lee, D. S., Park, C., Park, D., & Park, J. M. (2011). Effects of free cyanide on microbial communities and biological carbon and nitrogen removal performance in the industrial activated sludge process. *water research*, 45 (3), 1267-1279.

Kitis, M., Karakaya, E., Yigit, N. O., Civelekoglu, G., & Akcil, A. (2005). Heterogeneous catalytic degradation of cyanide using copper-impregnated pumice and hydrogen peroxide. *Water Research*, 39 (8), 1652-1662.

Knowles, C.J., (1976). Microorganisms and cyanide. *Bacteriol. Rev.* 40, 652-680.

Kjeldsen, P., (1999). Behaviour of cyanide in soil and groundwater: a review. *Water Air Soil Poll.* 115, 279–307.

Koneman, E. W. (1997). *Color atlas and textbook of diagnostic microbiology*. Lippincott-Raven Publishers.

Kumar, V., Kumar, V., & Bhalla, T. C. (2013). In vitro cyanide degradation by *Serratia marcescens* RL2b. *Int J Environ Sci*, 3, 1985-1995.

Kuyucak, N., & Akcil, A. (2013). Cyanide and removal options from effluents in gold mining and metallurgical processes. *Minerals Engineering*, 50, 13-29.

Luque-Almagro, V.M., Huertas, M.J., Martínez-Luque, M., Moreno-Vivián, C., Roldán, M.D., García -Gil, L.J., Castillo, F., Blasco, R., (2005). Bacterial degradation of cyanide and its metal complexes under alkaline conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 940-947.

Maniyam, M. N., Sjahrir, F., Ibrahim, A. L., & Cass, A. E. (2013). Biodegradation of cyanide by *Rhodococcus* UKMP-5M. *Biologia*, 68 (2), 177-185.

Mirzadeh, S., Yaghmaei, S., & Nejad, Z. G. (2014). Biodegradation of cyanide by a new isolated strain under alkaline conditions and optimization by response surface methodology (RSM). *J Environ Health Sci Eng*, 12, 85.

Naveen, D., Majumder, C.B., Mondal, P., Shubha, D., (2011). Biological treatment of cyanide containing wastewater. *Res. J. Chem. Sci.* 1, 15-21.

Oudjehani, K., Zagury, G., & Deschenes, L. (2002). Natural attenuation potential of cyanide via microbial activity in mine tailings. *Applied microbiology and biotechnology*, 58(3), 409-415.

Pirc, E., Levstek, M., & Bukovec, P. (2010). Influence of cyanide on the anaerobic degradation of glucose. p 4.

Potivichayanon, S., & Kitleartpornpaioat, R. (2010). Biodegradation of cyanide by novel cyanide degrading bacterium. *World Acad Sci Eng Technol*, 42, 362-1365.

Raybuck, S. A. (1992). Microbes and microbial enzymes for cyanide degradation. *Biodegradation*, 3 (1), 3-18.

Sepúlveda, A., Schluep, M., Renaud, F. G., Streicher, M., Kuehr, R., Hagelüken, C., & Gerecke, A. C. (2010). A review of the environmental fate and effects of hazardous substances released from electrical and electronic equipments during recycling: Examples from China and India. *Environmental Impact Assessment Review*, 30 (1), 28-41.

Trapp, S., Larsen, M., Pirandello, A., & Danquah-Boakye, J. (2003). Feasibility of cyanide elimination using plants. *ejmp & ep (European Journal of Mineral Processing and Environmental Protection)*, 3(1), 128-137.

Watanabe, A., Yano, K., Ikebukuro, K., & Karube, I. (1998). Cloning and expression of a gene encoding cyanidase from *Pseudomonas stutzeri* AK61. *Applied microbiology and biotechnology*, 50 (1), 93-97.

Zagury, G. J., Oudjehani, K., & Deschênes, L. (2004). Characterization and availability of cyanide in solid mine tailings from gold extraction plants. *Science of the Total Environment*, 320 (2), 211-224.

Zhou, X., Xu, S., Liu, L., & Chen, J. (2007). Degradation of cyanide by *Trichoderma mutants* constructed by restriction enzyme mediated integration (REMI). *Bioresource technology*, 98 (15), 2958-2962.

3. Capítulo 3: Bioremediación de suelo contaminado con cianuro.

3.1 Resumen

El cianuro es un químico que sirve para la extracción del oro. Este compuesto genera gran contaminación ambiental. Afecta los suelos cambiando sus propiedades químicas – biológicas. Provocan la destrucción en estos ecosistemas. El cianuro se puede degradar con la luz pero las cantidades en la minería no permiten su degradación. Una alternativa para la contaminación por cianuro es el uso de microorganismos que lo degrade. El objetivo de este trabajo fue obtener microorganismos de efluente de minería de oro contaminados con cianuro, con el fin de evaluar el efecto de estos en la biodegradación del cianuro en suelo y su interacción con plantas. Se trabajó con 2 morfotipos de bacterias (Blanca Rugosa y Cremosa), capaces de crecer en efluentes de minería de oro contaminados con cianuro y dos especies de plantas *Leucaena leucocephala* y *Brachiaria becumbens* para evaluar su desarrollo en el suelo contaminado con cianuro y la interacción con los microorganismos como potenciales degradadores del contaminante. No se observaron diferencias significativas en el ensayo para la degradación del cianuro. Las plantas presentaron un crecimiento similar al del control. Se midió la altura y masa seca de las plantas. Es posible que a pesar de estimar todas las condiciones adecuadas para el experimento en campo la actividad de degradación de las bacterias no fue lo suficientemente representativa como lo fue en ensayo *in vitro*.

Palabras clave: Cianuro, degradación, bacterias, minería de oro, microorganismos.

3.2 Introducción

En la extracción del oro se utiliza el cianuro (CN), el cual genera contaminación ambiental (Gaviria y Meza 2006), este tiene un efecto de gran importancia en los suelos (Luque-Almagro *et al.*, 2005; Hilson y Monhemius, 2006; Hurtado y Berastain, 2012), cambiando sus propiedades químicas y biológicas (Das y Santra, 2011) provocando destrucción en estos ecosistemas (Sepúlveda *et al.*, 2010).

El cianuro forma compuestos complejos que pueden ser tóxicos para los organismos (Kao *et al.*, 2003; Gaviria y Meza, 2006). Investigadores han buscado estrategias para mitigar la concentración que existe de CN en el suelo (Gaviria y Meza, 2006). Una solución es la remediación física y química pero son métodos limitados dada las variaciones ambientales, riesgos de operación y el alto costo que estos poseen (Karavaiko *et al.*, 2000; Kitis *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2007; Pirc *et al.*, 2010).

La fitorremediación es un mecanismo también útil para la degradación del CN donde actúan las plantas y raíces de las mismas en la asimilación y posible conversión del CN a compuestos menos contaminantes (Dushenkov *et al.*, 1995; McCutcheo y Rock, 2001; Bushey *et al.*, 2006). El otro mecanismo existente es el biológico o biorremediación (Akcil *et al.*, 2003; Das y Santra, 2011), donde algunos microorganismos y plantas son capaces de metabolizar el CN (Huertas *et al.*, 2010; Luque- Almagro *et al.*, 2005), utilizándolo como fuente de N (Kim *et al.*, 2011; Johnson, 2015; Kebeish, *et al.*, 2015).

Esta última estrategia es rentable, amigable con el medio ambiente, y fácilmente operable (Baxter y Cummings, 2006; Dash *et al.*, 2009; Potivichayanon y Kitleartpornpaioat, 2010).

Por lo tanto, el uso de estos microorganismos es atractivo para la biorremediación de suelos contaminados por CN. (Dhillon y Shivaraman, 1999; Kao *et al.*, 2003).

El propósito de este estudio fue trabajar con microorganismos que pueden degradar CN de residuos de minería de oro y evaluarlos en dos especies de plantas (*Leucaena leucocephala* y *Brachiaria becumbens*) a diferentes concentraciones de CN.

3.3 Materiales y Métodos

Suelo

Se colectó suelo para realizar los ensayos en planta del Municipio de Marmato, Caldas, Colombia (latitud norte 5° 28' 31", longitud oeste 75° 35' 57") figura (3-1) este se le realizó un análisis físico químico con resultados que se muestran en la figura (3-2), este fue analizado en el laboratorio de suelos de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín.



Figura 3-1: Ubicación del Municipio de Marmato, Caldas lugar del área de estudio.

Fuente: Sociedad de mejoras públicas de Manizales

Textura				pH	C.E.	M.O.	Al	Ca	Mg	K	Na	CICE	P	S	Fe	Mn	Cu	Zn	B	N-N
A%	L%	Ar%	Clase																	
56	30	14	FA	5.3		5.1	0.3	5.9	5.2	0.24	0.13	11.8	19	16	96	13	3	29	0.2	

Figura 3-2: Análisis de suelo proveniente del Municipio de Marmato.

Al suelo se le midió el porcentaje de humedad con un valor de 17% y la máxima capacidad de retención de agua 20% para determinar el riego a capacidad de campo, este se realizó con solución Hoagland libre de N. El suelo fue esterilizado con dazomet (3,5-dimetil-1,3,5-tiadiazina-2-tiona) a una concentración de 13.8 g en 40 kg de suelo por 8 días, luego este fue tamizado por una malla de 4 mm. El suelo fue servido en materas que contenían 500 g de suelo base seca.

Ensayo en invernadero

Plantas

El ensayo se realizó con dos especies de planta: *Brachiaria becumbens* y *Leucaena leucocephala* por su rápido crecimiento. Las semillas fueron germinadas en cámara húmeda por 3 días, para *Leucaena* adicionalmente se escarificó con ácido sulfúrico puro por 20 min. Se sembraron 3 semillas por maceta y después de 15 días de crecimiento se realizó un raleo.

Bacterias

Se escogió dos bacterias (C y BR) aisladas y purificadas de la extracción de oro con CN que presentaron en un ensayo *in vitro* la degradación de este compuesto (capítulo 2). Las bacterias después de purificación fueron sembradas en agar nutritivo (AN) y se suspendieron en agua destilada estéril (121°C, 15 psi, 20 min) y se realizaron conteos en cámara de Neubauer hasta obtener concentraciones superiores a 10^7 bacterias mL⁻¹, El inóculo fue almacenado en nevera a 4°C. Este se aplicó 5 ml por planta al momento de la siembra. Al finalizar el experimento se reaislaron las bacterias en AN para confirmar su presencia.

Cianuro

El cianuro fue aplicado en concentraciones de 0, 100 y 200 ppm este fue preparado con NaCN en agua destilada estéril y se aplicó en los días 15 y 30 del experimento.

Diseño experimental

Se empleó un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial 3x2x2 para cada una de las plantas, 3 concentraciones de CN (0, 100 y 200 ppm), 2 con y sin inoculación de la bacteria C y 2 con y sin inoculación de la bacteria BR, cada tratamiento tuvo 4 réplicas, incluyendo el control.

Se evaluaron al final del experimento altura de la planta (cm), masa área seca (g), concentración de CN en el suelo y la presencia de las bacterias.

Los tratamientos se evaluaron mediante análisis de varianza. Las pruebas se hicieron con un nivel de significancia $P \leq 0.05$, mediante el uso del software STATGRAPHICS versión centurión XVI.

3.4 Resultados

Biorremediación

El experimento con las plantas, bacterias y concentraciones de CN duró 2 meses. Todas las plantas presentaron desarrollo en las concentraciones con CN (0, 100, 200 ppm) y con la inoculación de las bacterias (C y BR). El crecimiento de las plantas fue normal, presentaron una altura promedio de 22 cm para *Leucaena* 39 cm para *Brachiaria* (figura 3-3), masa aérea seca (figura 3-4). El ensayo en planta no mostró diferencias significativas para los tratamientos y las concentraciones de CN; la degradación de este compuesto fue mínima (figura 3-5).

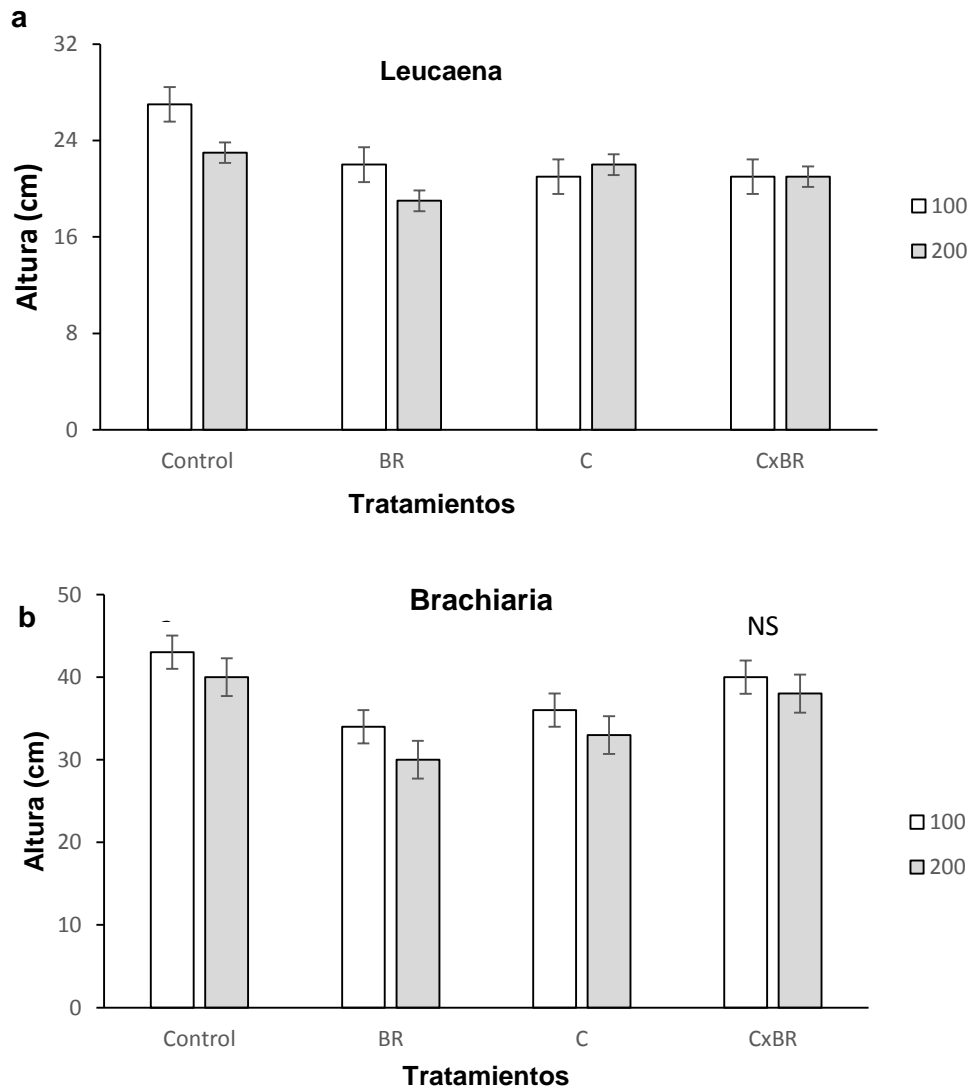


Figura 3-3 Altura de las plantas a) *Leucaena* y b) *Brachiaria*, utilizadas para el ensayo. Control, Bacteria Blanca Rugosa (BR), Bacteria Cremosa (C), combinación Bacteria Cremosa con Bacteria Blanca Rugosa (CxBR). Las barras sin relleno indican una concentración de 100 ppm de CN y las barras con relleno indican una concentración de 200 ppm de CN.

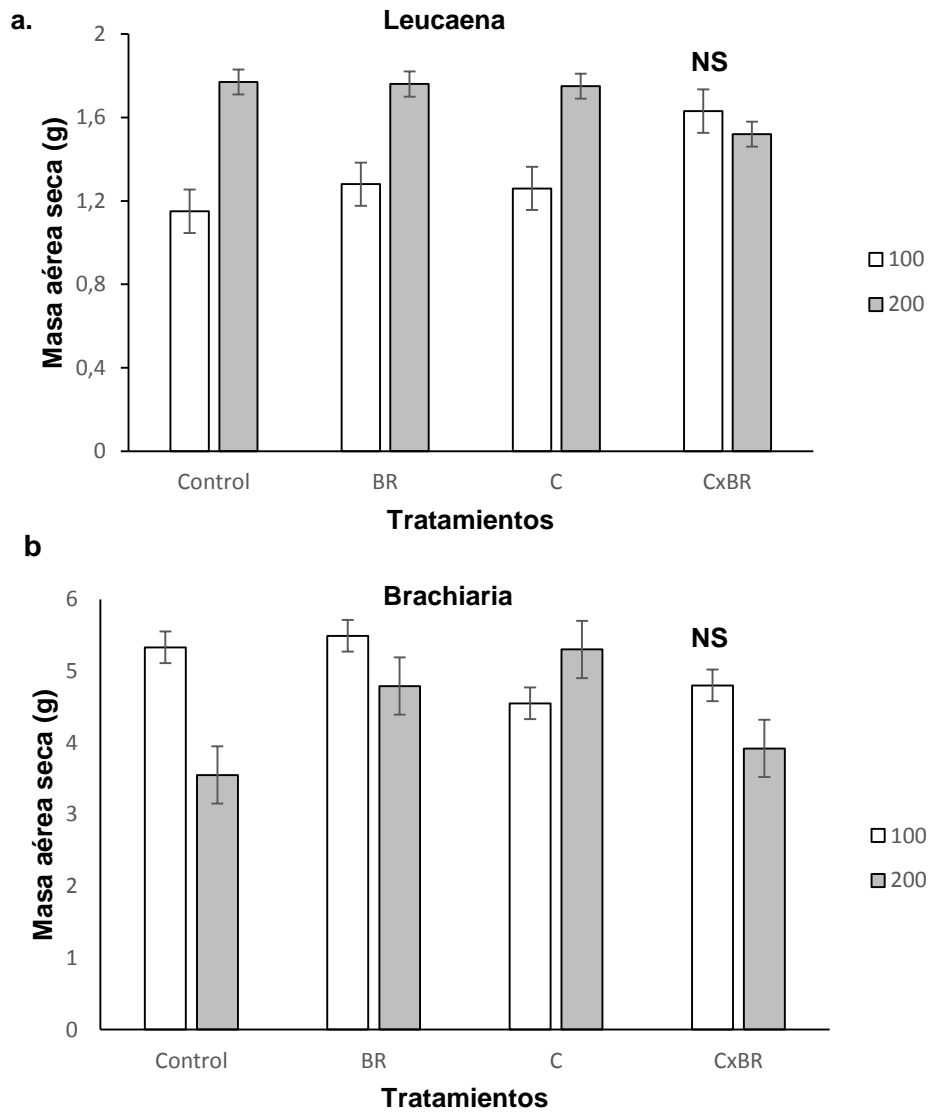


Figura 3-4 Masa aérea seca de las plantas a) *Leucaena* y b) *Brachiaria*, utilizadas para el ensayo. Control, Bacteria Blanca Rugosa (BR), Bacteria Cremosa (C), combinación Bacteria Cremosa con Bacteria Blanca Rugosa (CxBR). Las barras sin relleno indican una concentración de 100 ppm de CN y las barras con relleno indican una concentración de 200 ppm de CN.

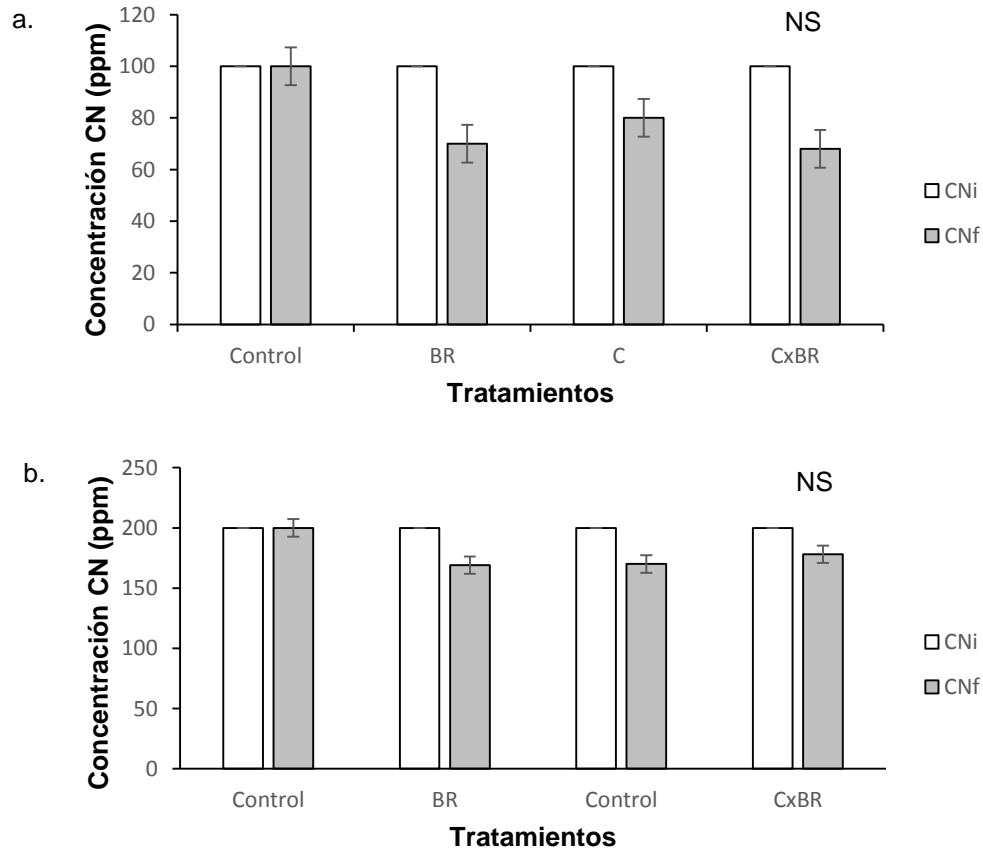


Figura 3-5 Concentración inicial (CNI) y final (CNf) de CN en el ensayo en planta:
a). Control 100 ppm de CN, Bacteria Blanca Rugosa (BR) a 100 ppm de concentración inicial y 70 ppm de concentración final de CN, Bacteria Cremosa (C) a 100 ppm de concentración inicial y 89 ppm de concentración final de CN, Combinación Bacteria Cremosa con Bacteria Blanca Rugosa (CxBR) a 100 ppm de concentración inicial y 68 ppm de concentración final de CN.
b). Control 200 ppm de CN, Bacteria Blanca Rugosa (BR) a 200 ppm de concentración inicial y 169 ppm de concentración final de CN, Bacteria Cremosa (C) a 200 ppm de concentración inicial y 170 ppm de concentración final de CN, Combinación Bacteria Cremosa con Bacteria Blanca Rugosa (CxBR) a 200 ppm de concentración inicial y 178 ppm de concentración final de CN.

Las plantas presentaron un desarrollo normal sin muestras de perturbaciones o deficiencia de nutrientes exceptuando la *Brachiaria* que en el momento final del ensayo mostró una posible falta de N este tomado del CN adicionado (figura3-6).



Figura 3-6 Planta de *Brachiaria* al final del experimento con una concentración de 100 y 200 ppm el uso de los dos microorganismos y el control; se observa la posible deficiencia de N.

Se comprobó el postulado de Kock con la siembra de las raíces en agar nutritivo y la presencia de las bacterias que se inocularon en las macetas (figura 3-7).

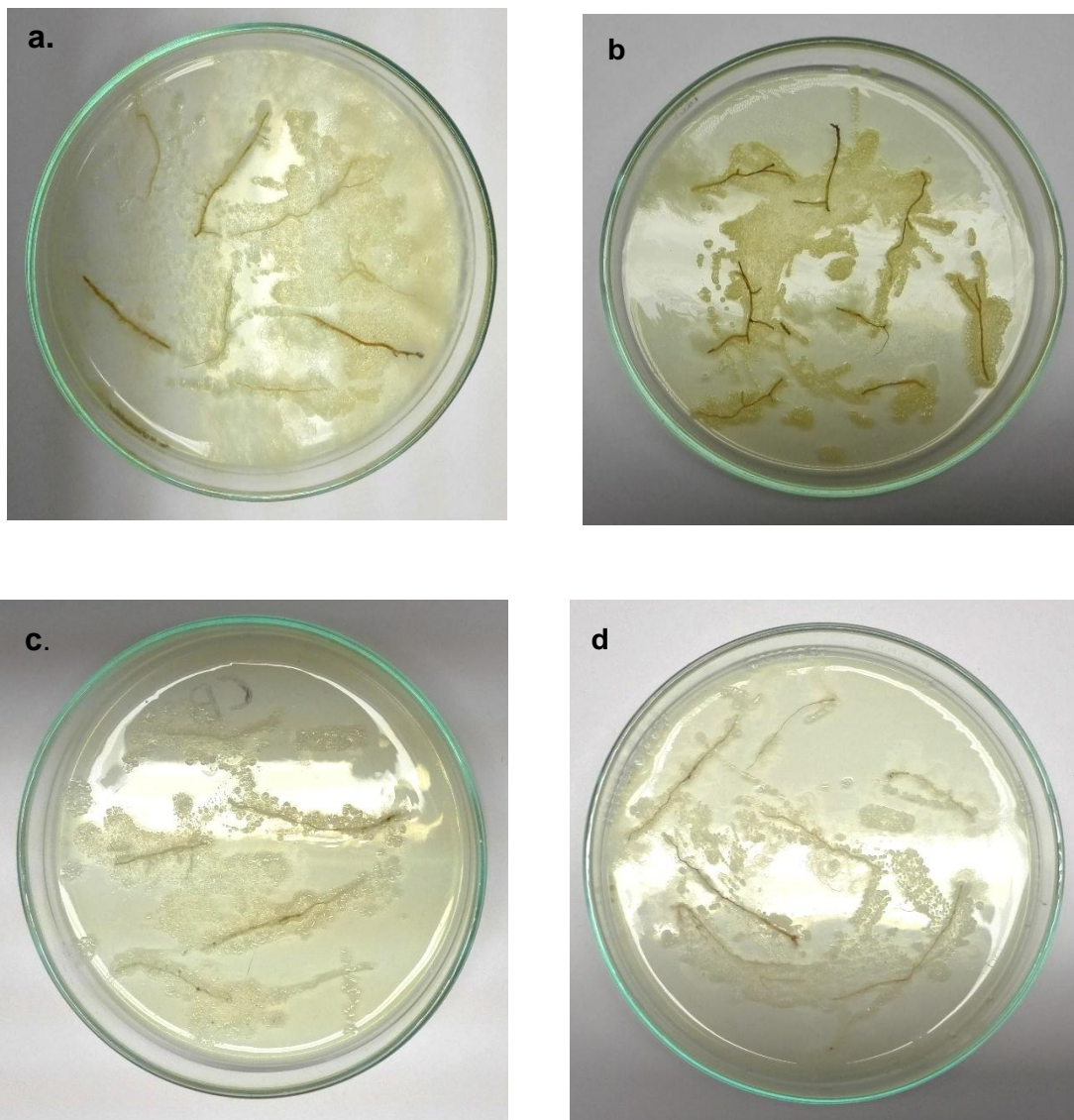


Figura 3-7: Comprobación del postulado de Kock con los microorganismos inoculados: a). *Leucaena* con bacteria cremosa a 100 ppm de CN, b). *Leucaena* con bacteria blanca rugosa a 200 ppm de CN, c). *Brachiaría* con bacteria cremosa 200 ppm de CN, d). *Brachiaría* con bacteria blanca rugosa a 100 ppm de CN.

Se observó desarrollo de nódulos en las raíces de la *leucaena* para los tratamientos con los microorganismos y CN, este resultado es importante porque indica que las bacterias inoculadas en el suelo con CN son del género *Rhizobium* (figura 3-8).



Figura 3-8: Raíz de *Leucaena* con presencia y ausencia de nódulos, bacteria BR 200 ppm CN.

3.5 Discusión

La actividad microbiana que se presentó en el ensayo muestra una interacción entre microorganismo y planta, para este caso género *Rizhobium* – *Leucaena*. Medir las variables de masa aérea seca, altura y la misma concentración del CN al finalizar el experimento ayudan a corroborar la funcionalidad de los microorganismos y si el crecimiento de las especies vegetales se ve afectado o no por el contaminante (NaCN).

Existen plantas que actúan en la fitorremediación del CN como es el caso de *Scirpus validus* L, *Typha* sp, *Ceratophyllum demersum* L. *Potamageton* spp (Dushenkov *et al.*, 1995; McCutcheo y Rock, 2001; Dzombak *et al.*, 2005; Bushey *et al.*, 2006), *Hordeum vulgare* L., *Avena sativa* L., *Sorghum bicolor* L., (Samiotakis y Ebbs, 2004), *Eichhornia crassipes* (Ebel, 2007), *Arabidopsis thaliana* (Kebeish *et al.*, 2015) estos autores reportan dicha funcionalidad y en este estudio se mostró el desarrollo de nódulos en la raíz de la planta (*Leucaena*),

indicando la presencia de microorganismos que pueden degradar el cianuro en el suelo.

Las bacterias aisladas y purificadas de efluentes de minería de oro, para este ensayo en planta pueden crecer y tolerar altas concentraciones de CN, pero no logran degradarlo como se ha mostrado en otras condiciones como es la *in vitro* Khamar y colaboradores (2015) encontraron microorganismos como: *Azotobacter vinelandii*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes* y *Pseudomonas* sp degradadores y tolerantes de CN.

El CN puede ser biodegradado por microorganismos que usan este compuesto como fuente de nitrógeno y además de ello pueden transformarlo en productos menos tóxicos (Babu *et al.*, 1996; Dumestre *et al.*, 1997; Barclay *et al.*, 1998; Kao *et al.*, 2003; Gurbuz *et al.*, 2009; Huertas *et al.*, 2010; Naveen *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 2013; Maniyam *et al.*, 2013; Mirizadeh *et al.*, 2014) lo realizado por estos autores sirve de contraste para esta investigación donde los microorganismos utilizados tomaron el nitrógeno del CN como nutriente.

3.6 Conclusiones

Las condiciones en las que se realizó el ensayo en campo fueron las adecuadas para el desarrollo de las plantas y microorganismos que degradan el CN, pero las bacterias con las que se trabajó no tuvieron un efecto significativo en la degradación de este compuesto.

Las bacterias con las que se trabajó en este experimento cumplen una función de degradación en ensayos *in vitro*.

La presencia de nódulos en la planta (*Leucaena*) demuestra la actividad por parte de microorganismos.

3.7 Recomendaciones

Para futuras investigaciones se debe emplear otras condiciones de campo en el desarrollo del experimento y verificar la función degradadora de CN por parte las bacterias.

Es importante desarrollar trabajos de este alcance para aportar posibles soluciones a los problemas de contaminación que genera la extracción de oro con CN.

Es necesario continuar con la búsqueda y aislamiento de nuevas cepas procedentes de los sitios bajo condiciones de vertimiento ó aplicación de residuos subproducto de la explotación aurífera, lo cual permitirá un porcentaje mayor de acierto en cuanto a la identificación de las cepas más eficientes en la degradación del CN.

3.8 Referencias

Akcil, A. (2003). Destruction of cyanide in gold mill effluents: biological versus chemical treatments. *Biotechnology Advances*, 21 (6), 501-511.

Akcil, A., Karahan, A. G., Ciftci, H., & Sagdic, O. (2003). Biological treatment of cyanide by natural isolated bacteria (*Pseudomonas sp.*). *Minerals engineering*, 16(7), 643-649.

Barclay, M., Tett, V. A., & Knowles, C. J. (1998). Metabolism and enzymology of cyanide/metallo cyanide biodegradation by *Fusarium solani* under neutral and acidic conditions. *Enzyme and Microbial Technology*, 23 (5), 321-330.

Babu, G. R. V., Vijaya, O. K., Ross, V. L., Wolfram, J. H., & Chapatwala, K. D. (1996). Cell-free extract (s) of *Pseudomonas putida* catalyzes the conversion of cyanides, cyanates, thiocyanates, formamide, and cyanide-containing mine waters into ammonia. *Applied microbiology and biotechnology*, 45 (1-2), 273-277.

Baxter, J., & Cummings, S. P. (2006). The impact of bioaugmentation on metal cyanide degradation and soil bacteria community structure. *Biodegradation*, 17 (3), 207-217.

Bushey, J. T., Ebbs, S. D., & Dzombak, D. A. (2006). Development of a plant uptake model for cyanide. *International Journal of Phytoremediation*, 8 (1), 25-43.

Dash, R. R., Gaur, A., & Balomajumder, C. (2009). Cyanide in industrial wastewaters and its removal: A review on biotreatment. *Journal of Hazardous Materials*, 163 (1), 1-11.

Das, S., & Santra, S. C. (2011). Cyanide degradation by *Aspergillus niger* strain isolated from steel-plant wastewater. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 10 (7), 2516-2522.

Dhillon, J. K., & Shivaraman, N. (1999). Biodegradation of cyanide compounds by a *Pseudomonas* species (S1). *Canadian journal of microbiology*, 45 (3), 201-208.

Dumestre, A., Chone, T., Portal, J., Gerard, M., & Berthelin, J. (1997). Cyanide Degradation under Alkaline Conditions by a Strain of *Fusarium solani* Isolated from Contaminated Soils. *Applied and environmental microbiology*, 63 (7), 2729-2734.

Dushenkov, V., Kumar, P. N., Motto, H., & Raskin, I. (1995). Rhizofiltration: the use of plants to remove heavy metals from aqueous streams. *Environmental science & technology*, 29 (5), 1239-1245.

Dzombak, D. A., Ghosh, R. S., & Wong-Chong, G. M. (Eds.). (2005). *Cyanide in water and soil: chemistry, risk, and management*. CRC press. 27 (24) 480-498.

Ebel, M., Evangelou, M. W., & Schaeffer, A. (2007). Cyanide phytoremediation by water hyacinths (*Eichhornia crassipes*). *Chemosphere*, 66 (5), 816-823.

Gaviria C, A. C., & Meza S, L. A. (2006). Análisis de alternativas para la degradación del cianuro en efluentes líquidos y sólidos del municipio de Segovia, Antioquia y en la planta de beneficio de la empresa mineros nacionales, municipio de Marmato, Caldas. *Dyna*, 73 (149), 31-44

Gurbuz, F., Ciftci, H., & Akcil, A. (2009). Biodegradation of cyanide containing effluents by *Scenedesmus obliquus*. *Journal of hazardous materials*, 162 (1), 74-79

Hilson, G., & Monhemius, A. J. (2006). Alternatives to cyanide in the gold mining industry: what prospects for the future? *Journal of Cleaner production*, 14 (12), 1158-1167.

Huertas, M. J., Sáez, L. P., Roldán, M. D., Luque-Almagro, V. M., Martínez-Luque, M., Blasco, R., & García-García, I. (2010). Alkaline cyanide degradation by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 in a batch reactor. Influence of pH. *Journal of hazardous materials*, 179 (1), 72-78.

Hurtado, J., & Berastain, A. (2012). Optimización de la biorremediación en relaves de cianuración adicionando nutrientes y microorganismos. *Revista Peruana de Biología*, 19 (2), 187-192.

Johnson, C. A. (2015). The fate of cyanide in leach wastes at gold mines: An environmental perspective. *Applied Geochemistry*, 57, 194-205.

Kao, C.M., Liu, J.K., Lou, H.R., Lin, C.S., Chen, S.C., (2003). Biotransformation of cyanide to methane and ammonia by *Klebsiella oxytoca*. *Chemosphere* 50, 1055-1061.

Karavaiko, G. I., Kondrat'eva, T. F., Savari, E. E., Grigor'eva, N. V., & Avakyan, Z. A. (2000). Microbial degradation of cyanide and thiocyanate. *Microbiology*, 69 (2), 167-173.

Khamar, Z., Makhdoumi-Kakhki, A., & Gharaie, M. M. (2015). Remediation of cyanide from the gold mine tailing pond by a novel bacterial co-culture. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 99, 123-128.

Kebeish, R., Aboelmy, M., El-Naggar, A., El-Ayouty, Y., & Peterhansel, C. (2015). Simultaneous overexpression of cyanidase and formate dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana* chloroplasts enhanced cyanide metabolism and cyanide tolerance. *Environmental and Experimental Botany*, 110, 19-26.

Kim, Y. M., Lee, D. S., Park, C., Park, D., & Park, J. M. (2011). Effects of free cyanide on microbial communities and biological carbon and nitrogen removal performance in the industrial activated sludge process. *water research*, 45 (3), 1267-1279.

Kitis, M., Karakaya, E., Yigit, N. O., Civelekoglu, G., & Akcil, A. (2005). Heterogeneous catalytic degradation of cyanide using copper-impregnated pumice and hydrogen peroxide. *Water Research*, 39 (8), 1652-1662.

Kumar, V., Kumar, V., & Bhalla, T. C. (2013). In vitro cyanide degradation by *Serratia marcescens* RL2b. *Int J Environ Sci*, 3, 1985-1995.

Luque-Almagro, V.M., Huertas, M.J., Martínez-Luque, M., Moreno-Vivián, C., Roldán, M.D., García -Gil, L.J., Castillo, F., Blasco, R., (2005). Bacterial degradation of cyanide and its metal complexes under alkaline conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 940-947.

Maniyam, M. N., Sjahrir, F., Ibrahim, A. L., & Cass, A. E. (2013). Biodegradation of cyanide by *Rhodococcus* UKMP-5M. *Biologia*, 68 (2), 177-185.

McCutcheon, S. C., & Rock, S. A. (2001). Phytoremediation: state of the science conference and other developments. *International Journal of Phytoremediation*, 3 (1), 1-11.

Mirzadeh, S., Yaghmaei, S., & Nejad, Z. G. (2014). Biodegradation of cyanide by a new isolated strain under alkaline conditions and optimization by response surface methodology (RSM). *J Environ Health Sci Eng*, 12, 85.

Naveen, D., Majumder, C.B., Mondal, P., Shubha, D., (2011). Biological treatment of cyanide containing wastewater. *Res. J. Chem. Sci.* 1, 15-21.

Pirc, E., Levstek, M., & Bukovec, P. (2010). Influence of cyanide on the anaerobic degradation of glucose. p 4.

Potivichayanon, S., & Kitleartpornpaioat, R. (2010). Biodegradation of cyanide by novel cyanide degrading bacterium. *World Acad Sci Eng Technol*, 42, 362-1365.

Samiotakis, M., & Ebbs, S. D. (2004). Possible evidence for transport of an iron cyanide complex by plants. *Environmental pollution*, 127 (2), 169-173.

Sepúlveda, A., Schlupe, M., Renaud, F. G., Streicher, M., Kuehr, R., Hagelüken, C., & Gerecke, A. C. (2010). A review of the environmental fate and effects of hazardous substances released from electrical and electronic equipments during recycling: Examples from China and India. *Environmental Impact Assessment Review*, 30 (1), 28-41.

Zhou, X., Xu, S., Liu, L., & Chen, J. (2007). Degradation of cyanide by *Trichoderma mutants* constructed by restriction enzyme mediated integration (REMI). *Bioresource technology*, 98 (15), 2958-2962.