

UCH-FC  
Q. Ambiental  
A398  
C.3

**PRESENCIA DE CIANURO EN SEDIMENTOS  
ENRIQUECIDOS POR LA MINERÍA  
Y SU DEGRADACIÓN MEDIANTE MICROORGANISMOS.**



Seminario de Título

entregado a la

Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al Título de

**QUÍMICO AMBIENTAL**



**Álvaro Esteban Aliaga Cerón.**

Director de Seminario de Título : Dr. Manuel Contreras L.

Co-Director de Seminario de Título : Dr. Rubén León B.

Enero, 2005

FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACIÓN  
SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la escuela de Pre-grado de la Facultad de Ciencias, Universidad de Chile que el Seminario de Título presentado por el alumno:

**ÁLVARO ESTEBAN ALIAGA CERÓN.**

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación de la Memoria de Título como requisito para optar al Título de Químico Ambiental.

**Director de Seminario de Título:**

Dr. Manuel Contreras L. ....

**Co-Director de Seminario de Título:**

Dr. Rubén León B. ....

**Comisión de Evaluación de Seminario de Título:**

Dra. Cecilia Rojas G. ....

Dr. Víctor Cifuentes G. ....



The image shows three handwritten signatures in blue ink. The first signature is crossed out with a diagonal line. The second signature is 'M. Cecilia Rojas' and is positioned above a circular stamp. The stamp contains the text 'FACULTAD DE CIENCIAS', 'BIBLIOTECA CENTRAL', and 'U. DE CHILE'. The third signature is in green ink and is also crossed out with a diagonal line.

*“Al culminar una tesis miras hacia atrás y analizas las acciones y momentos vividos,  
una prueba de humanidad donde no requieres un sustento científico  
para demostrar la amistad y el cariño que has recibido”.*





## AGRADECIMIENTOS.

Esta es la oportunidad donde puedo expresar el reconocimiento a las personas que contribuyeron en la gestión y desarrollo de este trabajo. Por lo cual haré uso de este derecho.

A mis tutores, Dr. Manuel Contreras y Dr. Rubén León, por la ayuda, apoyo y enseñanzas otorgadas en el transcurso de este trabajo. Cada uno, con visiones complementarias, me otorgó valiosas experiencias para el futuro profesional. Además de la confianza y responsabilidad entregada durante el tiempo de permanencia en el Centro de Ecología Aplicada.

A la comisión de Evaluación de Seminario de Título, Dra. Cecilia Rojas y Dr. Víctor Cifuentes, por los comentarios y observaciones que enriquecieron el trabajo. Gracias por la preocupación y tiempo otorgado a la elaboración del informe final.

A minera La Florida, por la buena disposición en el presente trabajo, otorgando la autorización de ingreso a sus dependencias y la toma de muestras desde el proceso de cianuración.

A cada una de las personas que conforman el Centro de Ecología Aplicada, por la asistencia técnica y profesional, además de la grata convivencia con todos ellos. En especial a Olga por la ayuda proporcionada.

Al laboratorio de Luminiscencia y Estructura Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, por la convivencia generada durante el desarrollo de trabajos en el pregrado. Al Profe Raúl, Profe Víctor, Pato, Igor, Carmen Gloria, Manuel y Claudio.



A los Profesores de la carrera, por la formación profesional rigurosa en todo el período universitario. En particular a la profesora Sylvia Copaja, en su cargo de jefa de carrera, siempre nos incentivo a favor de un espíritu crítico y profesional.

A todas las personas que tuve la dicha de conocer en alguna etapa de mi vida, gracias a todos. En general a todos los amigos del período escolar y universitario, por nombrar algunos tenemos al Pepelota, Pablo G., Tata, Samet, Pancho, Romi, Irma, Pato I., Pauly, Carola G., Pardo, Ale R., Ely, Cathy, Roberto y JJ. En particular a los que me recibieron como parte de sus familias, mis hermanos: Negro (Pato G.), Nanoperro (Hernán A.) y Fantasma (Rodrigo C.).

A la familia Gallardo-Santis, por todo el apoyo otorgado en el transcurso de la carrera, acogiéndome como un miembro más de la familia.

A mis padres y hermanos, que siempre estuvieron cerca cuando los necesité. Las circunstancias de la vida que nos tocó vivir, cimentaron en mi persona una gran capacidad reflexiva. Los quiero mucho.

A la mujer que me hizo conocer el amor, María, por su apoyo y cariño incondicional. Para las personas que les cambio la cara de alguna forma, me estoy refiriendo a mi Andrea, María Andrea.





## ÍNDICE GENERAL.

<b>AGRADECIMIENTOS.</b> .....	<b>iv</b>
<b>ÍNDICE DE MATERIAS.</b> .....	<b>vi</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.</b> .....	<b>viii</b>
<b>LISTA DE TABLAS.</b> .....	<b>x</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.</b> .....	<b>xi</b>
<b>RESUMEN.</b> .....	<b>xiii</b>
<b>ABSTRACT.</b> .....	<b>xv</b>
<b>INTRODUCCIÓN.</b> .....	<b>1</b>
<b>HIPÓTESIS.</b> .....	<b>11</b>
<b>OBJETIVOS.</b> .....	<b>12</b>
Objetivo general. ....	12
Objetivos específicos.....	12
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.</b> .....	<b>13</b>
Muestreo en el proceso de cianuración. ....	13
Caracterización de las muestras enriquecidas con cianuro.....	15
Aislamiento y selección de microorganismos desde las muestras enriquecidas con cianuro. ....	16
Caracterización de los microorganismos seleccionados.....	17
Abatimiento de cianuro por microorganismos seleccionados. ....	19
<b>RESULTADOS.</b> .....	<b>23</b>
Caracterización de las muestras enriquecidas con cianuro.....	23
Microorganismos aislados desde las muestras enriquecidas con cianuro. ....	25
Microorganismos seleccionados por tolerancia a cianuro.....	28
Caracterización de las bacterias seleccionadas.....	29
Crecimiento de <i>Bacillus cereus</i> en medio mínimo.....	31

Determinación de la degradación de cianuro realizada por <i>Bacillus cereus</i> .....	34
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>38</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>47</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>48</b>
<b>APÉNDICE</b> .....	<b>54</b>
Apéndice 1: Medios de cultivo.....	54
Apéndice 2: Tipo, metodología, especie, constante de estabilidad e índices de toxicidad referentes al cianuro.....	57
Apéndice 3: Preparación de buffer TAE, gel de agarosa y siembra.....	58
Apéndice 4: Determinación de cianuro y reproducibilidad con la metodología del ácido pícrico.....	61



## LISTA DE FIGURAS.

Figura 1: Porcentaje de $\text{CN}^-$ presente en solución acuosa y en equilibrio con HCN, en función del pH.....	5
Figura 2: Principales reacciones asociadas a la transformación del cianuro. ....	8
Figura 3: Diagrama de flujo simplificado correspondiente al proceso de cianuración de minera La Florida.....	14
Figura 4: Sistema implementado para la cuantificación de cianuro mediante el método del ácido pícrico.....	22
Figura 5: Producto formado a partir de la reacción de ácido pícrico al 0,7 % (amarillo) con distintas concentraciones de $\text{CN}^-$ (incoloro). El rango de concentración va desde $0,0 \text{ mgL}^{-1}$ hasta $5,2 \text{ mgL}^{-1}$ . ....	22
Figura 6: Colonias de microorganismos crecidos en medio MSG con $26 \text{ mgL}^{-1}$ de $\text{CN}^-$ . ....	27
Figura 7: Microorganismo B3S ( <i>B. cereus</i> ) crecido en placa petri con medio MSG. ....	30
Figura 8: Microorganismo B3S ( <i>B. cereus</i> ) por microscopía óptica con aumento 1000 X (A: sin tinción y B: tinción con fucsina).....	30
Figura 9: Electroforesis en gel de agarosa 0,8 % donde se muestra DNA amplificado de <i>B. cereus</i> mediante PCR.....	31
Figura 10: Curvas de crecimiento de <i>B. cereus</i> en medio mínimo M9 (0,4 % glucosa) a distintas concentraciones de extracto de levadura (0,0 %; 0,05 % y 0,20 % YE). ....	32
Figura 11: Curvas de crecimiento de <i>B. cereus</i> en medio mínimo M9 sin glucosa suplementado con distintas concentraciones de extracto de levadura (0,0 %; 0,05 % y 0,20 % YE). ....	33
Figura 12: Degradación de $\text{CN}^-$ en medio YEM9 (0,05 % y 0,20 % YE). Concentración inicial de $2,6 \text{ mgL}^{-1}$ de $\text{CN}^-$ .....	35

Figura 13: Degradación de $\text{CN}^-$ en medio YEM9 (0,05 % y 0,20 % YE).	
Concentración inicial de $13 \text{ mgL}^{-1}$ de $\text{CN}^-$ .....	36
Figura 14: Degradación de $\text{CN}^-$ en medio YEM9 (0,05 % y 0,20 % YE).	
Concentración inicial de $52 \text{ mgL}^{-1}$ de $\text{CN}^-$ .....	36
Figura 15: Degradación de $\text{CN}^-$ en medio YEM9 (0,05 % y 0,20 % YE).	
Concentración inicial de $260 \text{ mgL}^{-1}$ de $\text{CN}^-$ .....	37
Figura 16: Degradación de $\text{CN}^-$ en medio YEM9 (0,05 % y 0,20 % YE).	
Concentración inicial de $520 \text{ mgL}^{-1}$ de $\text{CN}^-$ .....	37



## LISTA DE TABLAS.

Tabla 1: Lugar seleccionado en el proceso de cianuración para la toma de muestra. ....	15
Tabla 2: Mezcla de aminoácidos utilizados para suplementar el medio de cultivo mínimo en busca de requerimientos específicos nutricionales. ....	20
Tabla 3: Concentración de cianuro total ( $CN_T$ ), cianuro disociable en ácido débil ( $CN_{WAD}$ ) y pH en las muestras colectadas desde el proceso de cianuración.....	24
Tabla 4: Concentración de metales totales (en sedimento) y metales solubles (en solución) en las muestras colectadas desde el proceso de cianuración.....	25
Tabla 5: Microorganismos aislados en las muestras del proceso de cianuración, crecidos en medio MCG y luego en medio MSG con $26 \text{ mgL}^{-1}$ de $CN^-$ . ....	26
Tabla 6: Crecimiento de los microorganismos aislados, en el proceso de cianuración, a distintas concentraciones de $CN^-$ en medio MSG.....	28



## LISTA DE ABREVIATURAS.

A	Absorbancia.
AGE	Electroforesis en gel de agarosa.
AP	Solución al 0,7 % de ácido pícrico.
Ag	Plata.
Au	Oro.
BLAST	Algoritmo utilizado para hacer búsquedas y comparación de secuencias en una base de datos (Basic Local Alignment Search Tool).
CEA	Centro de Ecología Aplicada Ltda.
CN	Término utilizado para hacer mención a las especies que componen el cianuro en función de la contribución de ión cianuro (CN <sup>-</sup> ).
CN <sub>T</sub>	Cianuro total.
CN <sub>WAD</sub>	Cianuro disociable en ácido débil.
EQG	Línea base de calidad ambiental de aguas superficiales y suelos de Canadá (Environmental Canadian Quality Guidelines).
GenBank	Base de datos de secuencias de nucleótidos y proteínas más importante de EE.UU.
ICP	Espectroscopia de plasma inductivamente acoplado.
INCO	Proceso de atenuación del cianuro presente en solución.
kb	Kilo pares de bases moleculares.
M9	Medio mínimo de cultivo M9.
MCG	Medio de cultivo con glucosa.

MSG	Medio de cultivo sin glucosa.
NaCN	Cianuro de sodio.
NCBI	Centro Nacional de Información Biotecnológica de EE.UU., el cuál provee la base de datos del GenBank (National Center for Biotechnology Information).
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa.
RBC	Contactador biológico rotatorio o biodisco.
rRNA 16S	Pequeña unidad constituyente del RNA ribosomal con secuencias de DNA altamente conservadas.
SDS	Dodecil-sulfato de sodio.
Solución I	Solución acuosa que contiene Tris 25 mM, EDTA 10 mM y glucosa 50 mM.
TAE	Solución tampón que contiene Tris, acetato y EDTA.
Tris	Solución tampón que contiene Tris-hidroximetil-aminometano.
tsp	Unidad de medida equivalente a 4,92 mL (teaspoon).
YE	Extracto de levadura.
YEM9	Medio mínimo M9 libre de glucosa y suplementado con extracto de levadura.

## RESUMEN.

El objetivo del trabajo se centró en una caracterización de los sedimentos, y soluciones, enriquecidos con cianuro, provenientes del proceso de cianuración de minera La Florida, y en el estudio de su degradación utilizando microorganismos aislados de dichas muestras.

Se realizó un muestreo al proceso de cianuración y se eligieron las etapas correspondientes a los tanques de lixiviación, el filtro de lavado, la electroobtención y el proceso INCO, determinándose elevadas concentraciones de  $CN_T$  en sedimentos (entre 220 y 4520  $mgKg^{-1}$ ) y en solución (entre 6,72 y 5850  $mgL^{-1}$ ).

A partir de las muestras provenientes desde la minera, se obtuvo crecimiento de microorganismos en medio rico no selectivo. Cada uno de ellos fue aislado como cultivo puro en medio MCG y se realizó selección a través de siembras sucesivas en medio MSG en ausencia y presencia de cianuro.

Mediante secuenciación parcial del gen que codifica el rRNA de 16S se identificó la especie de tres aislados bacterianos seleccionados por su crecimiento y tolerancia a  $CN^-$ . El análisis comparativo de sus secuencias con las que se encuentran en la base de datos del GenBank, mediante el programa Blast-n, permitió determinar que uno de estas bacterias aisladas correspondía a *Staphylococcus xylosus*, mientras que las otras dos, presentaban un 100 % de similitud con la secuencia del gen del 16S rRNA de *Bacillus cereus*.

Los aislados correspondientes a *B. cereus* fueron caracterizados mediante microscopía óptica, tinción de Gram, así como la determinación de degradación de algunos metabolitos. La selección de esta cepa bacteriana evidenció la propiedad de tolerar altas concentraciones de cianuro, presentando creciendo hasta en una concentración de  $520 \text{ mgL}^{-1}$  de  $\text{CN}^-$ .

Se implementó un medio mínimo de crecimiento (YEM9) en el cual se realizaron curvas de crecimiento bacteriano y las pruebas de degradación de cianuro. La cepa aislada de *B. cereus* presentó degradación del 75 % de  $\text{CN}^-$  cuando esta bacteria fue crecida en presencia de una concentración inicial de  $2,6 \text{ mgL}^{-1}$ . A elevadas concentraciones, no fue posible estimar disminución de  $\text{CN}^-$  debido a limitaciones con la metodología utilizada, sin embargo esta bacteria toleró todo el rango de concentraciones utilizado ( $2,6$  a  $520 \text{ mgL}^{-1}$ ).

Los resultados obtenidos en este trabajo nos hacen suponer que este organismo estaría utilizando el cianuro como fuente de carbono o nitrógeno, esperando mayor degradación en un sistema donde se optimicen las condiciones de crecimiento.

## ABSTRACT.

This work focuses on cyanide enriched sediments and solution characterization, originating from the cyanidation process of La Florida mine, and its degradation using isolated microorganisms of these samples.

We carried out a sampling to the cyanidation process, where we chose the corresponding stages to the leaching tanks, washing filter, electrowining cells and INCO process as sampling points, determining elevated concentrations of  $CN_T$  in sediments (220 to 4,520  $mgKg^{-1}$ ) and in solution (6.72 to 5,850  $mgL^{-1}$ ).

From the samples collected in the mine, we obtained a growth of the microorganism in a nonselective rich medium. Each of them was isolated as a pure culture in a MCG medium and selection was carried out by means of successive seeding in a MSG medium with and without cyanide.

By means of partial sequence of the gene that codes the rRNA of 16S the specie of three bacterial isolated was identified, they were selected by their growth and tolerance to  $CN^-$ . The comparative analysis of their sequences with those that are in the database of the GenBank, by means of the program Blast-n, allowed to determine that one of these bacterial isolated corresponded *Staphylococcus xylosus*, while the other two, presented 100% of similarity with the sequence of the 16S rRNA gene of the *Bacillus cereus*.

The isolated *B. cereus* was characterized through optical microscopy, Gram stain, as well as the tests of some metabolite degradation. The selection of this organism



established the property to tolerate cyanide concentrations, presenting growing until a concentration of  $520 \text{ mgL}^{-1}$  of  $\text{CN}^-$ .

We prepared a growth minimal medium (YEM9) for carrying out both bacterial growth curves and tests cyanide degradation. The isolated *B. cereus* exhibited degradation of 75 % when an amount of  $2.6 \text{ mgL}^{-1}$   $\text{CN}^-$  was added. At high concentrations, was not possible to consider decrease of this compound due to limitations with the selected methodology, nevertheless this bacterium tolerated all the range of concentrations used ( $2.6$  to  $520 \text{ mgL}^{-1}$ ).

The results obtained in this work make us suppose that this organism would be using the cyanide like source of carbon or nitrogen, expecting greater degradation in a system where the conditions of growth be optimized.



## INTRODUCCIÓN.

Las últimas décadas han estado marcadas por un aumento en los volúmenes de producción industrial generados por la demanda creciente de insumos, este fenómeno ha sido potenciado por el desarrollo de nuevas tecnologías las cuales facilitan los procesos de producción en serie. Asociado a ellos se encuentran numerosos compuestos químicos, algunos de ellos tóxicos, y que potencialmente pueden tener contacto con la naturaleza (Davis y col, 1994).

En Chile, la apertura económica a mercados internacionales, como consecuencia de las políticas de comercio exterior adoptadas por el gobierno, hacen necesario crear condiciones que permitan solventar un desarrollo económico y social en armonía con su entorno natural. De este modo, se persigue dar cumplimiento a la legislación ambiental existente, así como a las normas que serán implementadas en forma gradual en los años venideros. Desde esa perspectiva, es fundamental que las empresas contemplen el abatimiento de los compuestos nocivos presentes en los residuos industriales líquidos y sólidos.

El cianuro es uno de los compuestos nocivos que tiene importantes implicaciones en el medio ambiente al ser liberado como desecho de actividades industriales (Eisler, 1991). El término cianuro hace referencia a una gran variedad de compuestos, orgánicos e inorgánicos, que tienen como constituyente el grupo CN (Harper y Goldhaber, 1997) donde se incluyen el cianuro libre, el ión cianuro, los cianuros simples, los cianuros complejos, nitrilos, cianógenos y cianuro total (Eisler, 1991).

En la naturaleza, el cianuro es producido por diferentes especies de bacterias, plantas, hongos y algas (Eisler, 1991; Harper y Goldhaber, 1997). Es común encontrarlo en vegetales consumidos por el hombre, entre ellos tenemos retoños de bambú, porotos de soya, cerezas, aceitunas, papas y lentejas (Cyanide Management, 2003). Estos vegetales generan glucósidos cianogénicos que en contacto con  $\beta$ -gluconidasa liberan el cianuro en el aparato digestivo de organismos superiores (Parada, 2002). Se ha podido determinar que algunos vegetales presentan concentraciones entre 100 y 8000 mgKg<sup>-1</sup> de glucósidos cianogénicos (Way, 1984). Un ejemplo de esto, lo constituye la mandioca o yuca, un tubérculo que provee sobre el 70 % de las calorías consumidas en la dieta de países tropicales (Way, 1984), convirtiéndose en un agente causante de altas incidencias de neuropatía atáxica generadas en dichas regiones. (Baskin y Brewer, 1997).

En el ámbito industrial, el cianuro es requerido y usado en curtiembres, extracción de oro y plata, galvanoplastia, elaboración de adhesivos, cosméticos, nylon, pinturas y plásticos (Cyanide Management, 2003). Este compuesto se obtiene a partir del ácido cianhídrico, o como derivado de este, donde la producción comercial en el mundo asciende a 1,4 millones de toneladas anuales (Logsdon y col, 2001). El 20 % de esa producción se emplea en la elaboración de cianuro de sodio (NaCN), de la cual la minería utiliza un 90 % en los procesos de extracción de metales.

En relación a lo anteriormente descrito, la minería extractiva de oro (Au) utiliza diversas técnicas, las que están comprendidas en tres etapas: extracción, beneficio y proceso (US. EPA, 1994a). En ellas, la etapa de beneficio consiste en la concentración del metal en una fase determinada y es realizada a través de cuatro técnicas: amalgamación, cianuración, concentración por gravedad y flotación. Debido a los

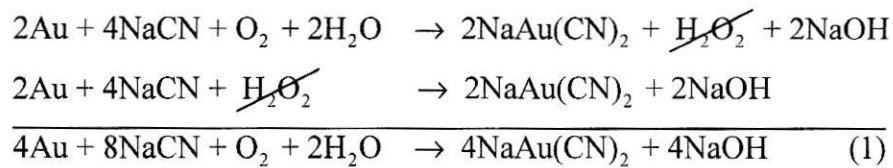
compuestos utilizados, son las dos primeras las que presentan mayor riesgo ambiental, de manera que ambas serán brevemente descritas a continuación.

La amalgamación consiste en mezclar el mineral con mercurio (Hg) después o durante la molienda, formando una amalgama que se calienta a temperaturas de 350-600 °C para solubilizar el Au. Este proceso posee rendimientos, en oro, del 75-80 % y pérdidas de Hg en el rango de 50 % y 25 %. Esto último debido a los flujos de agua y evaporación de mercurio, respectivamente (Guerrero y Torres, 2000). Por otra parte, la cianuración es un proceso donde se utiliza NaCN como agente lixivante de Au y Ag en condiciones alcalinas, que tiene la ventaja de obtener dichos metales a partir de minerales de baja ley, con elevados rendimientos (Cyanide Management, 2003).

El primer proceso de extracción de oro mediante cianuración data de fines del siglo XIX y fue implementado en Nueva Zelanda (Cyanide Management, 2003). Este proceso consiguió obtener rendimientos de hasta un 90 % de extracción de oro, a partir de cantidades tan pequeñas como 80 mg de Au por tonelada de mineral (Smith y Mudder, 1996). Por su alta eficiencia, se estima que en la actualidad el 90 % de la minería extractiva del oro utiliza cianuro en la etapa de beneficio (Cyanide Management, 2003).

Existen evidencias que indican que la cianuración ocurre con la formación de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) como intermediario (Yannopoulos, 1995), la ecuación que representa este proceso es conocida como ecuación de Elsner (Ecuación 1).





Ecuación 1: Disolución de Au en solución con NaCN, conocida como ecuación de Elsner.

En el proceso de cianuración se requieren concentraciones relativamente bajas de  $\text{CN}^-$  debido a su afinidad por el oro y a la estabilidad del complejo formado ( $\text{Au}(\text{CN})_2^-$ ). En condiciones normales se disuelven  $8,2 \text{ mgL}^{-1}$  de  $\text{O}_2$  en  $\text{H}_2\text{O}$  (Yannopoulos, 1995), determinando según la ecuación 1, una concentración de  $100,5 \text{ mgL}^{-1}$  de NaCN ( $53,4 \text{ mgL}^{-1}$  de  $\text{CN}^-$ ) para disolver la totalidad del oro. La disolución de Ag es análoga pero requiere 10 veces la cantidad de cianuro que la requerida para Au (Smith y Mudder, 1996), por ende la aleación de Au-Ag (metal doré) se disuelve a una concentración intermedia. Al incrementar esta concentración se generan condiciones que favorecen la disolución de otros metales, incrementando su consumo y provocando disminución de la selectividad por Au y Ag (Smith y Mudder, 1996). La estabilidad de los complejos cianurados metálicos se explicaría parcialmente por la interacción entre los orbitales “d” del metal con los orbitales antienlazantes desocupados del ión cianuro, dando formación al enlace, con una contribución de electrones del  $\text{CN}^-$  al metal, o viceversa (Smith y Mudder, 1996).

Los métodos estándares de cuantificación de cianuro hacen referencia a tres tipos de especies cianuradas capaces de proporcionar el grupo CN como ión cianuro ( $\text{CN}^-$ ) (APHA, 1995): cianuro libre ( $\text{CN}_{\text{LIBRE}}$ ), cianuro disociable en ácido débil ( $\text{CN}_{\text{WAD}}$ ) y cianuro total ( $\text{CN}_{\text{T}}$ ). El  $\text{CN}_{\text{LIBRE}}$  corresponde al  $\text{CN}^-$  en solución acuosa, el cual está en

equilibrio con HCN en función del pH (Figura 1). El  $CN_{WAD}$  hace referencia al  $CN_{LIBRE}$  y al  $CN^-$  que se encuentra unido a metales formando complejos inestables en medio ácido, donde el Cd, Ni y Zn corresponden a los metales más representativos. El  $CN_T$  agrupa al  $CN_{WAD}$  y al  $CN^-$  que se encuentra constituyendo complejos difícilmente dissociables en medio ácido ( $CN_{SAD}$ ), en ellos los metales más característicos son Au, Co y Fe. Un método alternativo para determinar  $CN_{WAD}$ , no considerado como metodología estándar, corresponde a la utilización del ácido pícrico (Fisher y Brown, 1952; INCO, 2002).

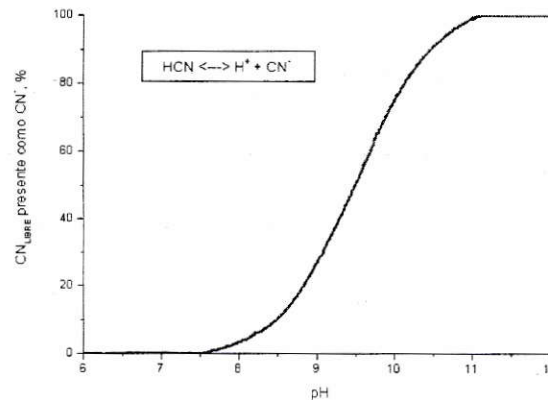


Figura 1: Porcentaje de  $CN^-$  presente en solución acuosa y en equilibrio con HCN, en función del pH

Los Estándares del Reglamento Nacional Primario de Agua Potable dictaminados por la U.S. EPA establecen que no se debe sobrepasar un nivel de  $0,2 \text{ mgL}^{-1}$  de  $CN_{LIBRE}$ . Además existen criterios de calidad del agua, con respecto a cianuro, para proteger la vida acuática en cuerpos de aguas dulces ( $5,2 \text{ } \mu\text{gL}^{-1}$ ) y de organismos marinos ( $1,0 \text{ } \mu\text{gL}^{-1}$ ). En Chile, el Decreto Supremo N° 90 (D.S., 2000), como Norma de Emisión,

proporciona la regulación para contaminantes asociados a las descargas de residuos líquidos a aguas marinas y continentales superficiales. En el se encuentran valores, dependiendo del cuerpo receptor afectado, en el rango de 0,2 a 1 mgL<sup>-1</sup> de CN<sub>T</sub>. No existe normativa relacionada a calidad de suelos en Chile pero en el extranjero hacen la salvedad en el uso de éste. En Canadá la normativa establecida estipula diferencias para suelos de uso agrícola y residencial (0,9 mgKg<sup>-1</sup> de CN<sub>LIBRE</sub>) de aquellos de uso comercial e industrial (8,0 mgKg<sup>-1</sup> CN<sub>LIBRE</sub>) (EQG, 2002).

Existen estudios que evidencian los efectos nocivos en peces, fauna y ganado a causa de cianuro (US. EPA, 1984; Irwin 1997). Pruebas experimentales exponen a los peces como los organismos acuáticos más sensibles a cianuro, en ellas las dosis letales se presentan entre los 20 y 76 µgL<sup>-1</sup>. Sin embargo, dosis no letales (5,0 a 7,2 µgL<sup>-1</sup>) pueden llevar a la pérdida de la capacidad de nado e inhibición de la reproducción (Irwin, 1997). El efecto tóxico es atribuido a la inhibición de la citocromo *c oxidasa*, al formar un complejo con el Fe<sup>+3</sup> del grupo hemo, generando el bloqueo de la transferencia electrónica de la cadena respiratoria mitocondrial (Way, 1984). Esto provoca la inhibición de la utilización de oxígeno por la célula y muerte de los organismos en pocos minutos. La dosis letal más baja reportada por ingesta en el hombre (LDLo) corresponde a 2,8 mg de NaCN por Kg de peso corporal (Merck, 2002).

Es posible encontrar diversos aportes antropogénicos de cianuro al ambiente, entre ellos los residuos industriales líquidos que involucran elaboración de aluminio, pinturas y plásticos, galvanización de metales, operaciones metalúrgicas, procesos mineros de oro y plata y refinación del petróleo (Eisler, 1991). Esta situación genera la



necesidad de tratamiento de los efluentes para lograr abatirlos y dar cumplimiento a la normativa vigente.

Se utilizan diferentes tratamientos de tipo fisicoquímicos para abatir el cianuro, entre los que podemos mencionar la cloración alcalina, adsorción mediante carbón activado, oxidación con peróxido de hidrógeno con catalizador de cobre, intercambio iónico (Smith y Mudder, 1996). Estos métodos son costosos y requieren grandes cantidades de compuestos peligrosos, como por ejemplo hipoclorito de sodio (Watanabe y col, 1998). Uno de estos métodos que es ampliamente utilizado en la minería por el menor costo asociado corresponde al proceso INCO (INCO, 2002).

Considerando el ingreso al ambiente, la persistencia del cianuro depende del sistema en estudio, diferenciando el medio acuático del sustrato suelo. Los ecosistemas acuáticos se desarrollan en un rango de pH de 5,5 a 8,0 (Smith y Mudder, 1996), valores entre los cuales se favorece la disociación del  $CN_{WAD}$  y el equilibrio se encuentra desplazado hacia el HCN que se volatiliza fácilmente. Si consideramos el sustrato suelo, tenemos la presencia de arcillas, carbonatos, materia orgánica, óxidos, silicatos y sulfuros, además de agua y oxígeno, lo que determina las condiciones específicas de alcalinidad, estabilización de especies orgánicas y potencial redox, lo que favorece la adsorción o formación de precipitados (Smith y Mudder, 1996). En general, las reacciones de transformación están determinadas por la presencia de  $CN_{LIBRE}$  (equilibrio en fase acuosa de  $CN^-$  con HCN) que además de sufrir hidrólisis, biodegradación y fotólisis reacciona con metales y sulfuros (Figura 2).

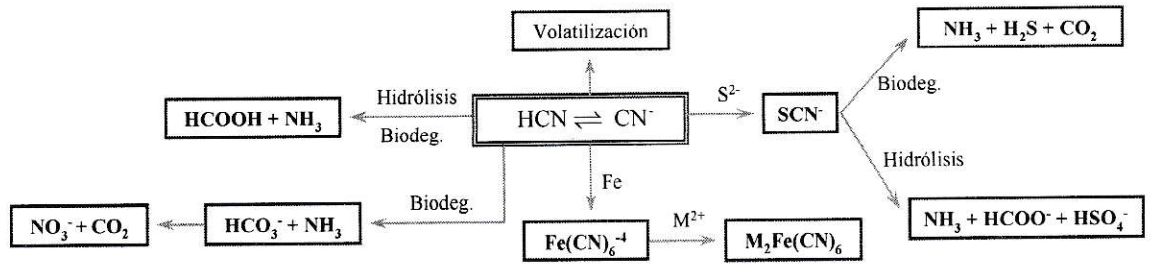


Figura 2: Principales reacciones asociadas a la transformación del cianuro.

Existen 8 procesos importantes que afectan la presencia del cianuro en el suelo y en aguas subterráneas: formación de complejos, precipitación, adsorción, oxidación, volatilización, formación de tiocianato, degradación fotolítica y biodegradación (Smith y Mudder, 1996). Respecto a dichos procesos, la biodegradación es una vía generada naturalmente en ambientes sometidos a su presencia, razón por la cual es posible encontrar algas, bacterias, hongos y plantas que lo degradan (Young y Jordan, 1995).

Existen pocos microorganismos conocidos que poseen las enzimas capaces de convertir el cianuro en compuestos que sirvan como fuente de carbono y nitrógeno (Chapatwala y col, 1998). Entre ellas se distinguen tres tipos: cianuro dihidratasa, cianuro hidratasa y cianuro oxidasa. Las dihidratasas, aisladas de especies como *Bacillus pumilus* C1 (Meyers y col, 1993) y *Pseudomona stutzeri* AK1 (Watanabe y col, 1998), lo degradan a especies como HCOOH y NH<sub>3</sub>. Las hidratasas, hasta ahora todas originarias de hongos, lo transforman a HCONH<sub>2</sub> (Janhyala y col, 2003). Las oxigenasas, como la obtenida de *Pseudomona fluorescens* NCIMB 11726 (Wang y col, 1996), lo transforman a NH<sub>3</sub> y CO<sub>2</sub>.

Microorganismos capaces de transformar compuestos químicos nocivos en especies de menor toxicidad son ampliamente utilizados para sanear ambientes contaminados (US. EPA, 1995). Ellos representan una alternativa limpia y económica de abatimiento de diversos compuestos peligrosos presentes en el ambiente. La elección del tratamiento de tipo biológico, que incluye microorganismos y plantas, se diferencia por el lugar en que se realiza (in situ o ex situ) y por la matriz de trabajo (sólida o líquida). Los sedimentos y lodos se tratan in situ por bioventilación, bioremediación y fitoremediación y ex situ por biopilas, compostaje y tratamiento superficial en tierra (landfarming), en cambio las aguas subterráneas, aguas superficiales y lixiviados se tratan in situ por bioremediación, incremento de la atenuación natural y fitoremediación y ex situ por bioreactores y humedales (Deuren y col, 2002).

Existen experiencias que involucran biotratamiento de cianuro en la minería. La mina de oro Homestake, Dakota del Sur, implementó una instalación de depuración biológica compuesta por un set de biodiscos (discos giratorios donde se adhieren microorganismos generando una biopelícula) con la presencia de bacterias *Pseudomonas paucimobilis* capaces de transformarlo a  $\text{NH}_3$  (Smith y Mudder, 1996), requiriendo  $\text{H}_3\text{PO}_4$  y  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  como nutrientes. La mina Homestake redujo los niveles de  $10 \text{ mgL}^{-1}$  en la entrada al tratamiento a un valor de  $0,3 \text{ mgL}^{-1}$  en los efluentes (U.S.EPA, 1994b). Otra experiencia corresponde a la realizada por Hecla Mining Company's, Idaho, con un sistema de biotratamiento para pilas de lixiviación utilizando bacterias nativas capaces de degradarlo a  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{N}_2$  (U.S.EPA, 1994b). Las pilas de lixiviación tenían un contenido promedio de  $46,6 \text{ mgL}^{-1} \text{ CN}_{\text{WAD}}$  que fueron reducidos a concentraciones



menores que  $0,2 \text{ mgL}^{-1}$  durante dos meses de riego por goteo con un medio de cultivo con microorganismos.

En Chile, la localidad de Alhué se caracteriza por la actividad minera debido a la existencia de cuerpos silicios vetiformes con la presencia de valores económicos de oro y plata, además de la presencia subordinada de zinc, plomo y cobre (Minera Florida, 2002). Estos yacimientos han sido clasificados como epitermales de baja sulfuración, término que se refiere al estado de oxidación del azufre como sulfuro (Maksaev, 2003). En el año 1886 la empresa Albion Mining Company construyó en Alhué la primera planta de cianuración en Chile, la cual perduró hasta el año 1929 (Millán, 2001). En el año 1987, luego de cuatro décadas sin explotación, se reanudó la extracción de minerales ejecutada por la Sociedad Minera Maipo que en el año 2000 traspasa sus activos a manos de minera La Florida S.A. donde, un año después, se incorpora al proceso una planta de cianuración, consiguiendo como producto del proceso un metal doré con 20 % de oro y 78 % de plata (Minera Florida, 2002) y empleando el proceso INCO para atenuar el cianuro presente en solución.

A la luz de los antecedentes anteriores, el presente trabajo se sustenta en la obtención de microorganismos desde muestras provenientes del proceso de cianuración de minera La Florida, donde es posible encontrar elevadas concentraciones de cianuro. Además de la capacidad de degradación que presentarían algunas de las cepas aisladas, siendo ésta evaluada en forma experimental.

## **HIPÓTESIS.**

En virtud a resultados preliminares donde fueron obtenidos microorganismos a partir de sedimentos provenientes del proceso de cianuración, nos planteamos la siguiente hipótesis:

“Si existen microorganismos en los sedimentos provenientes de minera Florida capaces de sobrevivir y crecer en ambientes con altas concentraciones de cianuro, entonces ellos tendrían la capacidad de abatir este compuesto.”

## **OBJETIVOS.**

### **Objetivo general.**

- Estudiar la capacidad de degradar cianuro de microorganismos provenientes de ambientes mineros enriquecidos con cianuro.

### **Objetivos específicos.**

- Realizar un muestreo en diferentes puntos del proceso de cianuración de minera La Florida.
- Determinar cianuro total y disociable en ácido débil en muestras provenientes de minera La Florida.
- Obtener y aislar microorganismos tolerantes a cianuro en muestras provenientes de minera La Florida.
- Caracterizar los microorganismos seleccionados utilizando métodos microbiológicos y moleculares.
- Estimar la cantidad de cianuro degradado experimentalmente debido a la acción microbiana.



## **MATERIALES Y MÉTODOS.**

### **Muestreo en el proceso de cianuración.**

Se utilizaron muestras provenientes de minera La Florida, específicamente, de la planta de cianuración de la faena Alhué. Estas correspondieron a sedimentos y soluciones enriquecidos con cianuro producto del proceso minero.

El proceso de cianuración utiliza un concentrado de mineral que es obtenido por extracción, chancado, molienda y concentrado por flotación. El material es conducido a seis tanques de lixiviación, conectados en serie, desprovistos de tapas y con agitación permanente. Luego es enviado a un espesador que separa la mezcla en dos fases: el espesado y la solución clarificada. El espesado es trasladado a un sistema a presión de filtración y lavado donde el filtrado retorna al espesador. La solución clarificada es conducida al sistema de electroobtención para extraer Au y Ag, luego sus efluentes son enviados al sistema de atenuación del cianuro presente en solución para ser reutilizados como agua de proceso.

La Figura 3 presenta un diagrama de flujo simplificado del proceso de cianuración. En el se observa la ubicación y tipo de muestra (sedimento o solución), con un código asignado para su identificación (Tabla 1). Se seleccionaron siete puntos que incluyen las etapas del proceso, o los efluentes y afluentes, correspondientes a los tanques de lixiviación, el filtro de lavado, la electroobtención y el proceso INCO.

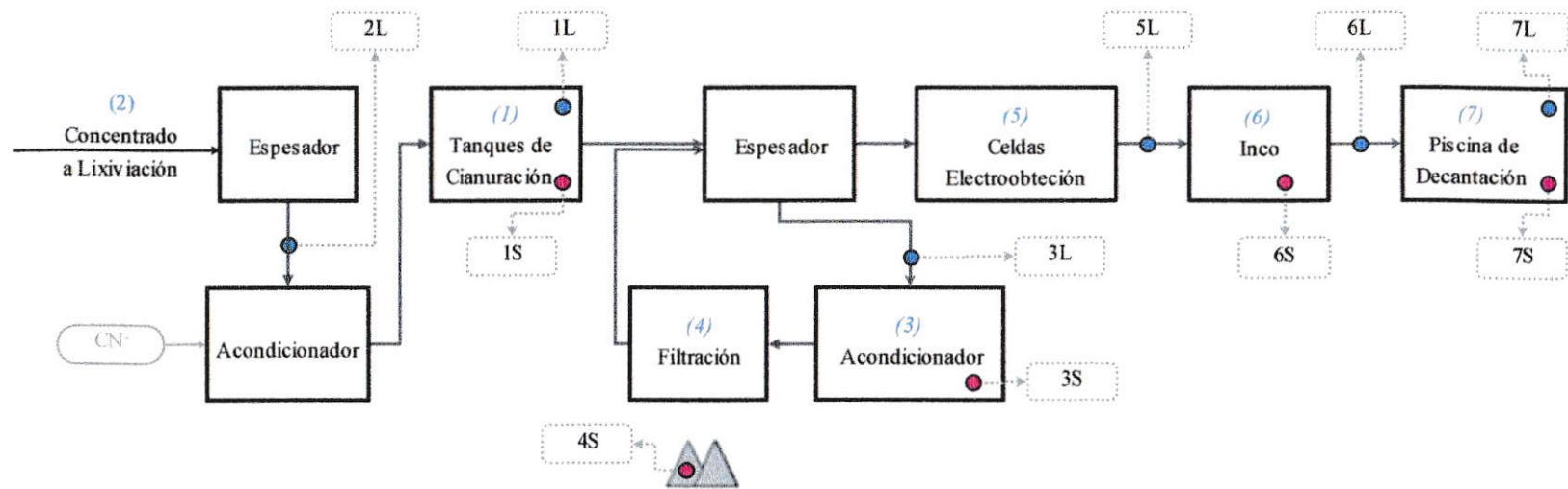


Figura 3: Diagrama de flujo simplificado correspondiente al proceso de cianuración de minera La Florida. Los puntos de muestreo son descritos en función del tipo de muestra colectada. (● = Sólida; ● = Líquida; □ = Código de Muestra).

El procedimiento utilizado para coleccionar las muestras líquidas correspondió a la metodología estándar (APHA, 1995). Las muestras sólidas fueron coleccionadas con una pala y almacenadas en recipientes de polietileno herméticos, aisladas de la luz y mantenidos a una temperatura de 4 °C. Cada una de ellas fue rotulada con un código asignado de acuerdo al lugar de origen y a la fase que esta presentó (Tabla 1).

Tabla 1: Lugar seleccionado en el proceso de cianuración para la toma de muestra. Cada muestra fue nombrada con un código asignado en función del punto de muestreo y del tipo de muestra.

PUNTO DE MUESTREO	DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA	CÓDIGO DE MUESTRA
Alimentación (2)*	Solución (L)	2L
Tanques de lixiviación (1)*	Solución (L)	1L
	Sedimento (S)	1S
Acondicionador filtro Larox (3)*	Solución (L)	3L
	Sedimento (S)	3S
Filtro Larox (4)*	Sedimentos lavados (S)	4S
Electroobtención (5)*	Efluente líquido (L)	5L
Proceso INCO (6)*	Efluente líquido (L)	6L
	Precipitado (S)	6S
Piscinas de decantación (7)*	Solución (L)	7L
	Sedimento (S)	7S

()\*: Número asignado para identificar la etapa del proceso que fue muestreada.  
L = muestra líquida; S = muestra sólida.

### **Caracterización de las muestras enriquecidas con cianuro.**

Para la caracterización de las muestras se consideró la determinación del cianuro total ( $CN_T$ ), cianuro disociable en ácido débil ( $CN_{WAD}$ ) y pH. Además de la concentración de cadmio (Cd), cobre (Cu), hierro (Fe), níquel (Ni) y zinc (Zn), con la medición de los metales disueltos (en solución) y metales totales (en sedimentos).

Para la cuantificación de  $CN_T$  y  $CN_{WAD}$  en las muestras mineras, correspondientes a sedimentos y soluciones, se utilizó metodología estándar por destilación y espectrofotometría (APHA, 1995).

Para la medición de pH en las soluciones, se utilizó un medidor de pH Fisher Scientific modelo Accumet 25 con un electrodo combinado de pH Hanna Instrument modelo HI1332. Las soluciones fueron agitadas constantemente con un agitador magnético Heidolph Instrument modelo 3002 S.

Para la medición de metales, correspondientes a Cd, Cu, Fe, Ni y Zn, se utilizó espectroscopia de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente (ICP-AES) con un equipo ICP Thermo Jarrel Ash modelo IRIS Advantage, y utilizando un estándar de calibración multielementos High-Purity QCS-26.

### **Aislamiento y selección de microorganismos desde las muestras enriquecidas con cianuro.**

Para la obtención de microorganismos, se sembraron dos tubos con una cantidad de  $\frac{1}{4}$  tsp de sedimento ( $\sim 1,23$  mL) ó 1 mL de solución, los tubos de 15,5 mL Pyrex® Brand 99447 contenían 10 mL de medio de cultivo líquido MCG (apéndice 1) estéril. Estos tubos fueron incubados a 25 °C en una incubadora Felisa modelo FE-132D durante 96 hrs con agitación manual esporádica.

A partir de cada uno de los tubos, se extrajo 100  $\mu$ L y fueron diseminados con técnicas de siembra, esparciéndola en forma homogénea sobre placas con medio MCG. Estas placas fueron incubadas a 25 °C durante 48 hrs con la finalidad de obtener colonias de microorganismos.



A partir de los aislados anteriores, se realizó la selección de aquellos microorganismos que pudieran crecer en medio MSG (Apéndice 1) en presencia de 13 y 26 mgL<sup>-1</sup> de CN<sup>-</sup> (35,2 y 65 mgL<sup>-1</sup> de KCN respectivamente). Una segunda etapa de selección fue realizada utilizando placas con medio MSG más CN<sup>-</sup> en un rango desde 26 mgL<sup>-1</sup> hasta 650 mgL<sup>-1</sup>. Las placas con cada uno de los microorganismos fueron incubados a 25 °C hasta 96 hrs.

Las especies seleccionadas fueron nombradas de acuerdo a la etapa del proceso de donde proviene cada muestra. Estas fueron denominadas anteponiendo una letra al código de muestra. Por ejemplo, dos microorganismos aislados desde una muestra de sedimento que proviene del filtro de lavado (código de muestra 4S) serían nombradas como A4S y B4S respectivamente.

Se utilizó cianuro de potasio (KCN, Merck p.a.). Éste compuesto presenta un bajo peso molecular (65,12 gmol<sup>-1</sup>), y una elevada solubilidad en agua (7160 mgL<sup>-1</sup>), además está descrito como de alta toxicidad con valores de LD<sub>50</sub> (oral, ratas) equivalente a 5 mgKg<sup>-1</sup> de KCN, y LDL<sub>O</sub> (oral, hombre) de 2,6 mgKg<sup>-1</sup> de KCN.

### **Caracterización de los microorganismos seleccionados.**

En la caracterización primaria de los organismos tolerantes, se determinó la morfología de la colonia, la morfología celular y la tinción de Gram de acuerdo a lo descrito en Seeley y col, 1991. Se realizó la determinación de la degradación de metabolitos como almidón, caseína, esculina, gelatina y lecitina, además del consumo de glucosa, lactosa, maltosa y manitol.



La identificación de las bacterias tolerantes, fue realizada con un conjunto de técnicas de biología molecular, entre las cuales están: extracción de DNA, electroforesis en gel de agarosa, amplificación de DNA por PCR, purificación de DNA desde gel de agarosa y secuenciación de DNA.

La extracción del DNA genómico de cada organismo fue realizada empleando la metodología descrita en Sambrook y Russell, 2001. Este fue posteriormente analizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8 % en Buffer TAE 1 X. Luego se amplificó el gen que codifica el rRNA de 16S mediante la técnica de PCR, utilizando los partidores universales pA (5'- AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG) y pH (5'- AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA) (Edwards y col, 1989).

La mezcla de reacción de PCR consta de un volumen final de 25  $\mu$ L que contiene: 2,5  $\mu$ L de buffer de reacción 10 X; 0,5  $\mu$ L de dNTP's 10 mM, 1  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 1  $\mu$ L de cada partidor 25  $\mu$ M; 0,5 Unidades de enzima Taq DNA polimerasa recombinante y agua bidestilada. El termociclador Bio-Rad modelo i-Cycler fue programado de acuerdo al siguiente protocolo: 1 ciclo a 95 °C por 3 min, 35 ciclos consecutivos de 95 °C por 30 s, 55 °C por 30 s y 72 °C por 3 min, 1 ciclo a 72 °C por 10 min, para luego mantener la reacción a 4 °C.

La purificación de los amplificados de DNA fue realizada utilizando el Kit Bio 101 GENE CLEAN II & III. Estos fueron enviados al servicio de secuenciación del laboratorio de Genética de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. Los resultados proporcionados fueron analizados utilizando el programa BLAST que correlaciona la secuencia obtenida con la base de datos del GenBank (BLASTN, 2004).

Para identificar los microorganismos, se utilizaron las secuencias que codifican para el rRNA 16S debido a su universalidad, que es altamente conservada y es utilizada como marcador taxonómico (Fry y col, 1991).

### **Abatimiento de cianuro por microorganismos seleccionados.**

Para la determinación del abatimiento del cianuro, se determinó un conjunto de parámetros, entre los cuales están: elección del medio mínimo de cultivo, curvas de crecimiento y degradación de CN<sup>-</sup>.

Para elegir el medio mínimo, las bacterias tolerantes, previamente seleccionados, se sometieron a crecimiento en placas con medio Vogel, Vogel-Bonner y M9 (Apéndice 1), preparados según la metodología descrita en Sambrook y Russell, 2001.

Para probar el crecimiento, se resuspendió una colonia de cada uno de ellos en agua desionizada estéril y luego se hicieron diluciones seriadas (10, 100, 1000 veces), se sembraron 100 µL de cada una de ellas y fueron incubadas a 26 °C.

Además se sembraron placas con medio Vogel, se colocaron cinco filtros Whatman estériles de 3 mm de diámetro, cada uno con una mezcla de aminoácidos. Las placas fueron incubadas a 26 °C. Se utilizaron cinco mezclas de aminoácidos que son presentadas en la Tabla 2.

Una vez seleccionado el medio de cultivo, se procedió a realizar curvas de crecimiento en medio líquido con agitación permanente. Estos análisis se realizaron utilizando matraces de 100 mL con vástago que contenían 20 mL de medio YEM9 (Apéndice 1). Las experiencias fueron realizadas variando la cantidad de extracto de levadura (0,05 % ó 0,2 % YE), a temperatura de 26 °C y agitación promedio de 110 rpm

empleando un agitador orbital KLINE modelo 255. La determinación del crecimiento bacteriano se realizó con la medición de la absorbancia del cultivo a 540 nm, en un espectrofotómetro Bausch & Lomb modelo Spectronic 20.

Tabla 2: Mezcla de aminoácidos utilizados para suplementar el medio de cultivo mínimo en busca de requerimientos específicos nutricionales.

Mezcla de aminoácidos				
1	2	3	4	5
Adenina	Guanina	Cisteina	Metionina	Uracilo
Histidina	Leucina	Isoleucina	Valina	Lisina
Fenilalanina	Tirosina	Triptofano	Treonina	Prolina
Glutamato	Serina	Alanina	Aspartato	Arginina

La degradación del cianuro se probó en tubos Twist-Top a los cuales se les adicionó una alícuota de 900  $\mu\text{L}$  de medio YEM9, con bacterias en fase de crecimiento exponencial ( $\sim 10^7$  células/mL), obtenidas a partir de la curva de crecimiento (7-8 hrs de agitación). Además se adicionó 100  $\mu\text{L}$  de dilución de  $\text{CN}^-$ , a partir de una solución patrón que contenía 5200  $\text{mgL}^{-1}$ , y así obtener cinco concentraciones para realizar las experiencias, las cuales fueron: 2,6  $\text{mgL}^{-1}$ ; 13  $\text{mgL}^{-1}$ ; 52  $\text{mgL}^{-1}$ ; 260  $\text{mgL}^{-1}$  y 520  $\text{mgL}^{-1}$ . El volumen final de los tubos correspondió a 1000  $\mu\text{L}$ .

Una batería de los tubos anteriormente descritos, fue incubada a igual concentración de  $\text{CN}^-$  y cantidad de microorganismos. Cada uno de ellos, recubiertos con papel metálico para evitar el contacto con la luz, fue incubado a 26 °C por un tiempo no inferior a 24 hrs.

Una vez cumplido el tiempo de incubación, las bacterias fueron eliminadas mediante centrifugación a 17380 g durante 5 min en una microcentrífuga refrigerada



Hettich modelo 16S. Luego se extrajo una alícuota del sobrenadante para cuantificar  $CN_{WAD}$  mediante el método del ácido pícrico (Fisher y Brown, 1952; INCO, 2002). La cantidad degradada fue estimada con el porcentaje de este compuesto presente en solución y que fue calculado utilizando la Ecuación 2.

$$\text{Porcentaje de CN, \%} = \left( \frac{CN_f}{CN_i} \right) * 100 \quad (2)$$

Ecuación 2: Cálculo del porcentaje de CN presente en solución, luego de transcurrido el tiempo de incubación. ( $C_i$  = concentración inicial y  $C_f$  = concentración transcurrido el tiempo de incubación).

La determinación de cianuro se realizó empleando tubos Eppendorf que contenían 250  $\mu\text{L}$  de solución AP (1,6 % NaOH p.a.; 4 %  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$  p.a.; 0,7 %  $\text{C}_6\text{H}_3\text{N}_3\text{O}_7$  p.a. con 50 % humedad; 2,7 %  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  p.a.; 0,8 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  p.a.), luego se adicionó una alícuota del sobrenadante de la muestra centrifugada en un rango de 10  $\mu\text{L}$  a 300  $\mu\text{L}$  para que la concentración final del tubo estuviera dentro la curva de calibración (0 a 5,2  $\text{mgL}^{-1} \text{CN}^-$ ), además se adicionó agua desionizada hasta completar un volumen final de 750  $\mu\text{L}$ . Los tubos fueron introducidos en un baño de glicerol (glicerina anhidra, Merck) durante 25 min a una temperatura de 89 °C otorgada por agitador magnético Heidolph Instrument modelo 3002 S (Figura 4). Transcurrido el tiempo de reacción, los tubos fueron retirados del baño y se les adicionó 250  $\mu\text{L}$  de agua desionizada. La concentración de  $\text{CN}^-$  se obtuvo a partir del registro de la absorbancia a 520 nm, del complejo coloreado (Figura 5), medido en un espectrofotómetro Unicam modelo UV2.

Para determinar degradación de cianuro, empleándolo como fuente de nitrógeno, se utilizó medio M9. Para ello, se empleó bacterias crecidas en medio YEM9, siendo lavadas e incubadas posteriormente en medio M9 a 26 °C. La concentración de  $\text{CN}^-$  correspondió a  $13 \text{ mgL}^{-1}$  y  $26 \text{ mgL}^{-1}$  con un aporte de 0,05 % de glucosa.

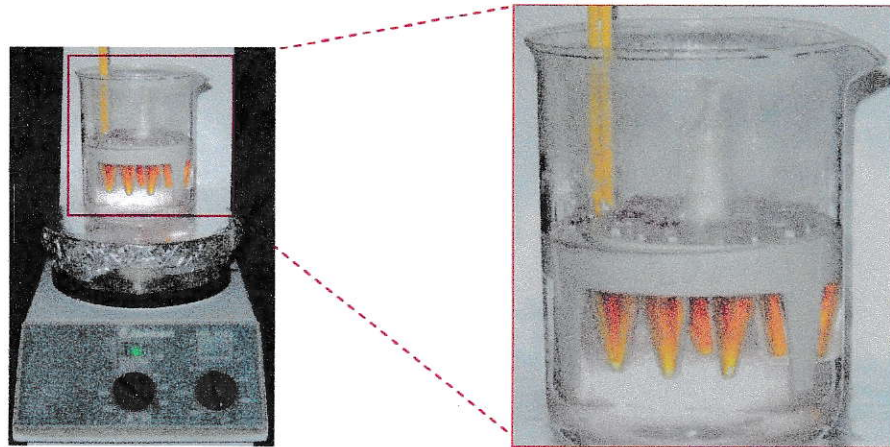


Figura 4: Sistema implementado para la cuantificación de cianuro mediante el método del ácido pícrico.

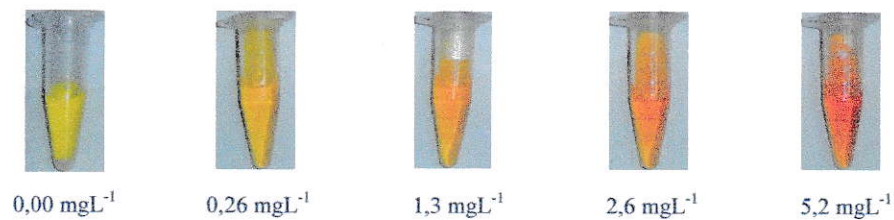


Figura 5: Producto formado a partir de la reacción de ácido pícrico al 0,7 % (amarillo) con distintas concentraciones de  $\text{CN}^-$  (incoloro). El rango de concentración va desde  $0,0 \text{ mgL}^{-1}$  hasta  $5,2 \text{ mgL}^{-1}$ .



## **RESULTADOS.**

### **Caracterización de las muestras enriquecidas con cianuro.**

En las muestras obtenidas desde el proceso de cianuración, descrito anteriormente en la Figura 3, se determinaron los parámetros que permitieron caracterizarlas. Los resultados evidencian que ellas tienen pH alcalino y cantidades elevadas de  $CN_T$  y  $CN_{WAD}$ . Es importante recordar que cada muestra fue rotulada con un código asignado de acuerdo a la elección del punto de muestreo y del tipo de muestra colectada (Tabla 1).

La Tabla 3 indica los resultados de la determinación de pH,  $CN_T$  y  $CN_{WAD}$  en las muestras. En los sedimentos se obtuvieron concentraciones entre 170,0 y 4520,0  $mgKg^{-1}$  de  $CN_T$  y  $CN_{WAD}$ , los que corresponden a aquellos colectados desde los tanques de lixiviación (1S), el acondicionador filtro Larox (3S) y el proceso INCO (6S). En cambio en solución, el valor medido se encontró entre 6,7 y 5850,2  $mgL^{-1}$  en las muestras correspondientes a la alimentación de la lixiviación (2L), los tanques de lixiviación (1L), el acondicionador filtro Larox (3L), la electroobtención (5L) y el proceso INCO (6L). Las muestras con mayor concentración de cianuro total se encontraron en el proceso INCO y en los tanques de lixiviación en el caso de sedimentos y soluciones respectivamente.

Tabla 3: Concentración de cianuro total ( $CN_T$ ), cianuro disociable en ácido débil ( $CN_{WAD}$ ) y pH en las muestras colectadas desde el proceso de cianuración.

PUNTO DE MUESTREO	CÓDIGO DE MUESTRA	pH	$CN_T^*$	$CN_{WAD}^*$
Alimentación a lixiviación	2L	7,09	6,7	nd**
Tanque de lixiviación N°6	1L	12,12	5850,2	5150,0
	1S	nd**	1610,0	800,2
Acondicionador filtro Larox	3L	11,74	1790,1	1630,0
	3S	nd**	220,3	170,0
Electroobtención	5L	10,88	1220,3	970,1
Proceso INCO	6L	9,75	20,3	nd**
	6S	nd**	4520,0	2030,0

\* Las concentraciones se expresan en unidades de  $mgL^{-1}$  ó  $mgKg^{-1}$ , solución ó sedimento respectivamente. La fase es apreciable en el código de muestra (L = solución o S = sedimento). \*\*nd = no determinado.

La Tabla 4 presenta las concentraciones de Cd, Cu, Fe, Ni y Zn. en las muestras. En los sedimentos se consiguieron concentraciones entre 34,6800 y 304950,3600  $mgKg^{-1}$  de los metales totales, los que correspondieron a aquellos colectados desde los tanques de lixiviación (1S), acondicionador filtro Larox (3S) y proceso INCO (6S). En cambio en solución, el valor medido se encontró entre un valor menor a 0,0030  $mgL^{-1}$  y 856,8000  $mgL^{-1}$  en las muestras correspondientes a la alimentación de la lixiviación (2L), los tanques de lixiviación (1L), el acondicionador filtro Larox (3L), la electroobtención (5L) y el proceso INCO (6L). Las muestras con mayor concentración de metales se encontraron en los tanques de lixiviación, en ellas el Cu, Fe y Zn fueron las especies predominantes.

Tabla 4: Concentración de metales totales (en sedimento) y metales solubles (en solución) en las muestras colectadas desde el proceso de cianuración.

PUNTO DE MUESTREO	CÓDIGO DE MUESTRA	Cd*	Cu*	Fe*	Ni*	Zn*
Alimentación a lixiviación	2L	<0,0015	0,0100	<0,0027**	<0,0030**	0,0300
Tanque de lixiviación N°6	1L	0,0447	856,8000	489,4000	0,0175	410,4000
	1S	843,9900	9161,6300	110563,9200	2,9800	304950,3600
Acondicionador filtro Larox	3L	0,2040	371,8000	115,1000	0,0174	331,9000
	3S	780,7900	8278,1900	137557,9000	<0,2780**	216221,2500
Electroobtención	5L	2,3840	182,9000	51,2200	0,5173	191,2000
Proceso INCO	6L	0,0278	10,9000	<0,0027**	0,0610	6,7940
	6S	34,6800	74591,8000	11154,7600	103,5200	143266,0800

\*Las concentraciones se expresan en unidades de  $\text{mgL}^{-1}$  ó  $\text{mgKg}^{-1}$ , solución ó sedimento respectivamente. La fase es apreciable en el código de muestra (L = solución o S = sedimento). \*\*LD = límite de detección.

### Microorganismos aislados desde las muestras enriquecidas con cianuro.

En un análisis previo, se detectó la presencia de microorganismos en muestras tomadas desde los tanques de lixiviación, lográndose dos aislados bacterianos, denominados A1 y A2, respectivamente.

Su caracterización indicó que corresponden a bacterias Gram positivas con capacidad para crecer en medio MSG suplementado con diferentes concentraciones de cianuro. Una de ellas, la cepa A1, se caracterizó por tener un crecimiento más rápido y tolerar hasta  $156 \text{ mgL}^{-1}$  de  $\text{CN}^-$ . La secuenciación del rRNA 16S permitió identificarla como *Staphylococcus xylosus* (N° de acceso Z26900).

En atención a lo anteriormente descrito, se elaboró un sistema para el aislamiento de microorganismos presentes en el proceso de cianuración. Para ello se procedió a



colectar muestras en los lugares señalados en Figura 3 y Tabla 1. Como resultados se logró aislar 24 colonias en MCG, los cuales fueron diferenciados por su forma y color.

La tabla 5 muestra los resultados del proceso de aislamiento de microorganismos en MCG y la capacidad de estos aislados para desarrollarse en MSG suplementado con  $26 \text{ mgL}^{-1}$  de  $\text{CN}^-$ . El 58 % (14 de 24) de las colonias aisladas presentó tolerancia a dichas concentraciones de cianuro, mostrándose algunas de ellas en la Figura 6.

Tabla 5: Microorganismos aislados en las muestras del proceso de cianuración, crecidos en medio MCG y luego en medio MSG con  $26 \text{ mgL}^{-1}$  de  $\text{CN}^-$ .

CÓDIGO DE MUESTRA	MUESTRA ó RÉPLICA (A ó B)	MICROORGANISMOS AISLADOS EN MCG	MICROORGANISMOS SELECCIONADOS EN MSG CON $26 \text{ mgL}^{-1}$ DE $\text{CN}^-$	
		Número*	Número*	Nombre**
1L	A	2	0	-
	B	1	0	-
2L	A	1	1	A2L
	B	2	1	B2L
3L	A	2	1	A3L
	B	1	1	B3L
3S	A	2	1	A3S
	B	1	1	B3S
4S	A	1	1	A4S
	B	2	1	B4S
5L	A	1	1	A5L
	B	2	0	-
6L	A	1	1	A6L
	B	1	1	B6L
6S	A	1	1	A6S
	B	0	-	-
7L	A	1	1	A7L
	B	1	1	B7L
7S	A	1	0	-
	B	0	-	-
		$\Sigma$ Aislados = 24	$\Sigma$ Seleccionados = 14	

\*Las colonias de microorganismos son diferenciadas entre sí por color y forma

\*\*El nombre de cada uno de los microorganismos seleccionados fue asignado en función de la muestra donde fueron aislados. Al código de muestra se antepuso una letra en orden alfabético para identificar cada especie obtenida por cada etapa muestreada.



A2L



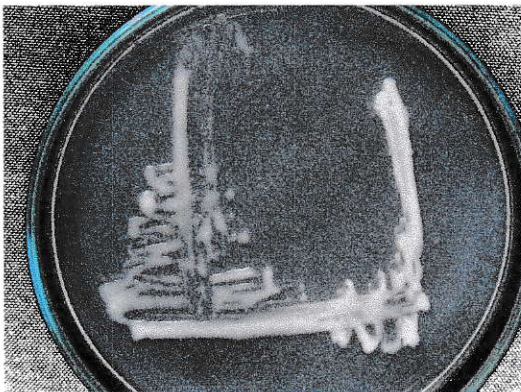
B2L



B3S



A6L



A7L



A2

Figura 6: Colonias de microorganismos crecidas en medio MSG con  $26 \text{ mgL}^{-1}$  de  $\text{CN}^-$   
(Los nombres asignados a cada especie fueron descritos en la Tabla 5).



### Microorganismos seleccionados por tolerancia a cianuro.

La Tabla 6 muestra la tolerancia de los microorganismos aislados en un rango comprendido entre 26 mgL<sup>-1</sup> y 650 mgL<sup>-1</sup> de CN<sup>-</sup>. Se observó que el 36 % (5 de 14) fue capaz de crecer a concentraciones de 52 mgL<sup>-1</sup>. Dos de estos organismos, A3S y B3S, fueron seleccionados por tolerar concentraciones de 520 mgL<sup>-1</sup>, las que corresponden a aquellas aisladas desde sedimentos del acondicionador filtro Larox.

Tabla 6: Crecimiento de los microorganismos aislados, en el proceso de cianuración, a distintas concentraciones de CN<sup>-</sup> en medio MSG.

ESPECIE AISLADA	CONCENTRACIÓN DE CN <sup>-</sup> , mgL <sup>-1</sup>																	
	8	13	26	52	65	78	104	130	156	182	208	260	312	364	416	468	520	650
A1	x	x	x	x	x	x	x	x	x	-	-							
A2	x	x	x	x	-	-												
A1L		-	-															
B1L		-	-															
A2L		x	x															
B2L		x	x															
A3L		x	x	-	-	-	-	-	-									
B3L		x	x	x	x	x	x	x	-									
A3S		x	x	nd	nd	nd	nd	nd	x	x	x	x	x	x	x	x	x	-
B3S		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
A4S		x	x															
B4S		x	x															
A5L		x	x															
B5L		x	-															
A6L		x	x	x	x	x	x	x	x	-								
B6L		x	x															
A6S		x	x															
B6S		-	-															
A7L		x	x															
B7L		x	x															
A7S		-	-															
B7S		-	-															

**Simbología:**  
x = Crece.  
- = No Crece.  
nd = No determinado.

### **Caracterización de las bacterias seleccionadas.**

Se realizó una caracterización general de los aislados bacterianos A3S y B3S, en ella se observó que la temperatura de crecimiento óptimo fue de 35 °C y la morfología de la colonia presentaba bordes irregulares y coloración blanquecina (Figura 7). Mediante microscopía, se observó que la forma celular era la de un bacilo alargado y la tinción de Gram indicó que correspondían a bacterias del tipo Gram positivas (Figura 8).

Utilizando el DNA genómico de ambos aislados, se realizó la amplificación del gen que codifica el rRNA de 16S, mediante PCR, esto nos permitió obtener un fragmento de aproximadamente 1,4 kilobases (Figura 9). La secuencia de 786 pares de bases de este fragmento fue comparada con la base de datos del GenBank. Como resultado de ella se determinó que ambos presentan un 100 % de similitud con la secuencia de *Bacillus cereus* (Nº de acceso AY647292). Adicionalmente, una caracterización bioquímica parcial nos mostró que esta es capaz de utilizar o degradar distintos compuestos: almidón (+), caseína (+), esculina (+), gelatina (+) y lecitina (+), además del consumo de glucosa (+), lactosa (-), maltosa (+) y manitol (-) ((+) significa que degrada o utiliza, (-) no degrada o no utiliza). Estos resultados son coincidentes con las mayoría de los aislados de la especie *B. cereus* descritos en la literatura (Holt, 1994).



Figura 7: Microorganismo B3S (*B. cereus*) crecido en placa petri con medio MSG.



Figura 8: Microorganismo B3S (*B. cereus*) por microscopía óptica con aumento 1000 X  
(A: sin tinción y B: tinción con fucsina).



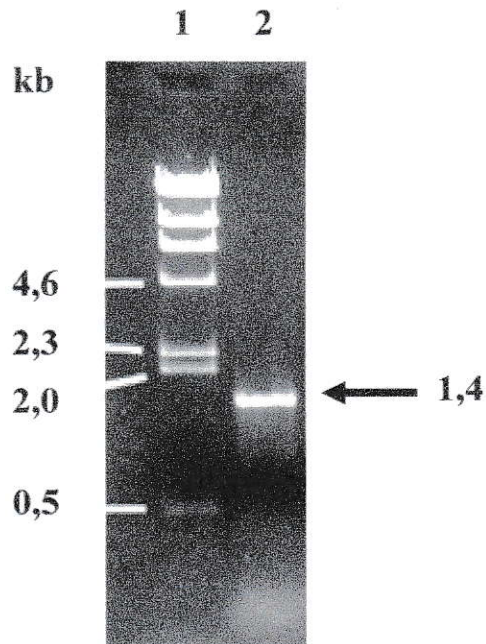


Figura 9: Electroforesis en gel de agarosa 0,8 % donde se muestra DNA amplificado de *B. cereus* mediante PCR. Carril 1: DNA del fago  $\lambda$ /HindIII; Carril 2: producto de amplificación obtenido a partir de *B. cereus* y utilizando la mezcla de partidores pA-pH. La flecha indica el fragmento de 1,4 kilobases (kb) correspondiente a parte del rRNA 16S.

### **Crecimiento de *Bacillus cereus* en medio mínimo.**

Para elegir las condiciones de crecimiento en medio mínimo, se utilizaron los medios M9, Vogel y Vogel-Bonner. Se obtuvo crecimiento cuando el medio mínimo fue suplementado con aportes nutricionales. En medio Vogel fue observado luego de 120 hrs de incubación a 26 °C, sólo cuando se le adicionó una mezcla de 4 aminoácidos que contenía Cys, Ile, Trp y Ala ó Met, Val, Trh y Asp (Tabla 2). Además, se observó crecimiento en medio M9 cuando se agregó extracto de levadura (0,2 % YE). El

crecimiento fue rápido y en mayor cantidad respecto al observado en medio Vogel suplementado con aminoácidos, por lo que se optó por utilizar este medio de cultivo.

Una vez seleccionado el medio M9 suplementado con YE, fueron realizadas las curvas de crecimiento a 26 °C y agitación promedio de 110 rpm. El crecimiento fue estudiado en función de la cantidad de YE (0,05 % ó 0,2 %) y glucosa presente en el medio (0,0 % ó 0,4%).

En la Figura 10 se muestra que *B. cereus* presentó crecimiento en medio M9 cuando fue suplementado con YE. Se observó aumento en el número de bacterias luego de 4 hrs de agitación, alcanzando la fase estacionaria de crecimiento transcurridas 12-13 hrs. Durante este período de tiempo, la curva de crecimiento fue mayor que cuando se utilizó YE, llegando a la fase estacionaria de crecimiento con un valor de absorbancia (D.O.) mayor a 1,2.

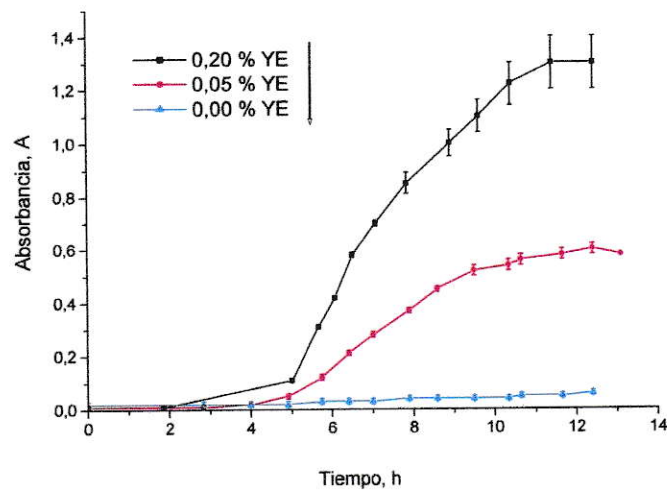


Figura 10: Curvas de crecimiento de *B. cereus* en medio mínimo M9 (0,4 % glucosa) a distintas concentraciones de extracto de levadura (0,0 %; 0,05 % y 0,20 % YE).



Debido a que *B. cereus* presentó crecimiento en medio M9 suplementado con YE, se realizaron curvas de crecimiento sin aporte de glucosa (medio YEM9) con el crecimiento de este organismo solo con el aporte de extracto de levadura.

En la Figura 11 se muestra el crecimiento de *B. cereus* en medio YEM9. Este fue observable pero de menor intensidad que en la condición con glucosa anteriormente mostrada en la Figura 10. La especie *B. cereus* presentó una menor tasa de crecimiento específico cuando fue crecido con 0,05 % YE respecto al aporte de 0,2 %. Los valores obtenidos en fase de crecimiento exponencial corresponden a  $0,07 \pm 0,01 \text{ hrs}^{-1}$  y  $0,18 \pm 0,01 \text{ hrs}^{-1}$ , respectivamente.

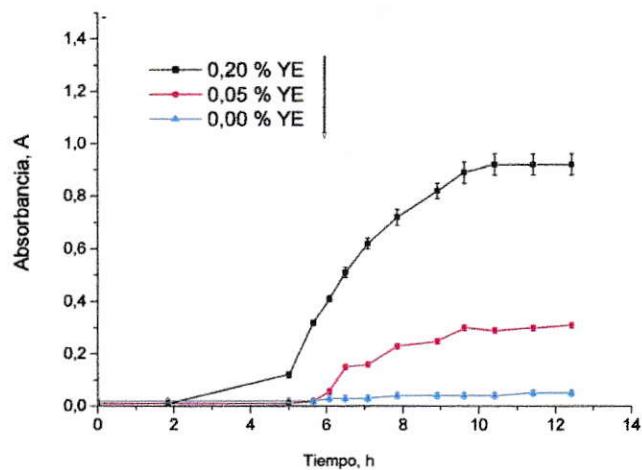


Figura 11: Curvas de crecimiento de *B. cereus* en medio mínimo M9 sin glucosa suplementado con distintas concentraciones de extracto de levadura (0,0 %; 0,05 % y 0,20 % YE).

### **Determinación de la degradación de cianuro realizada por *Bacillus cereus*.**

Los experimentos indican que *B. cereus*, en tubos Twist-Top, tolera concentraciones de  $520 \text{ mgL}^{-1}$  en un período de incubación correspondiente a 120 hrs. Transcurrido ese tiempo se extrajo desde los tubos una cantidad de  $100 \mu\text{L}$  y fue sembrado en placas con medio MSG, presentando crecimiento luego de 15 hrs de incubación a  $26 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Las pruebas de degradación para fueron realizadas en un intervalo de tiempo menor a 120 hrs. Los resultados consideran la condición con bacterias (*B. cereus*) y sin ellas (control), además del aporte de extracto de levadura (0,05 % ó 0,20 %). La cantidad de bacterias en cada tubo correspondió a aproximadamente a  $10^7$  células/mL.

En la Figura 12 se muestra la degradación observada a una concentración de  $2,6 \text{ mgL}^{-1}$  de  $\text{CN}^-$  y con un aporte de 0,05 % YE, lo que no ocurre cuando se adicionó 0,20 % YE. Esta disminución se muestra en la condición con bacterias, estimada hasta un 75 % de la concentración inicial en un período de incubación equivalente a 72 hrs. En estas pruebas los controles estériles mantuvieron la concentración inicial de cianuro.

La degradación no fue detectable a concentraciones de  $13 \text{ mgL}^{-1}$ ;  $52 \text{ mgL}^{-1}$ ;  $260 \text{ mgL}^{-1}$  y  $520 \text{ mgL}^{-1}$ . Las experiencias se muestran en las Figuras 13, 14, 15 y 16, respectivamente.

Cuando se empleó el  $\text{CN}^-$  como fuente de nitrógeno y glucosa como fuente de carbono (0,05 %), no se detectó degradación realizada por *B. cereus* a concentraciones de  $13 \text{ mgL}^{-1}$  y  $26 \text{ mgL}^{-1}$  de  $\text{CN}^-$ . Se observó disminución en la concentración de cianuro

cuando se adicionó un aporte de 0,4 % glucosa y sin la presencia de bacterias (Apéndice 4).

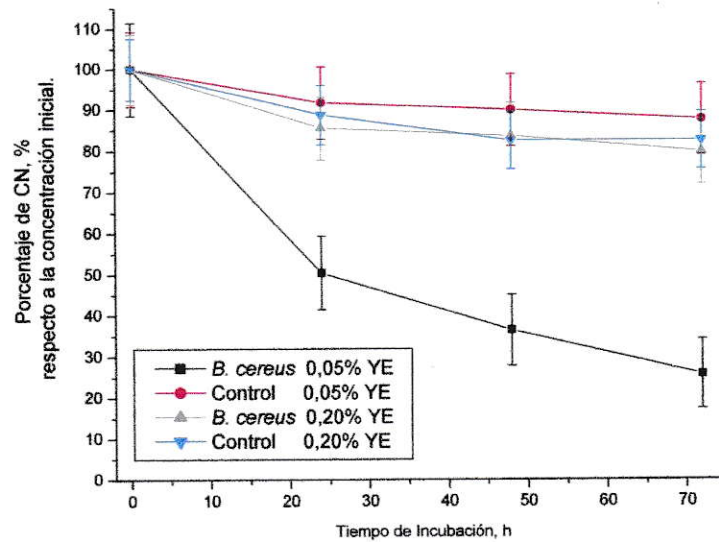


Figura 12: Degradación de  $\text{CN}^-$  en medio YEM9 (0,05 % y 0,20 % YE). Concentración inicial de  $2,6 \text{ mgL}^{-1}$  de  $\text{CN}^-$  (*B. cereus*: tubo con bacterias; Control: tubo sin presencia de bacterias; YE: extracto de levadura).

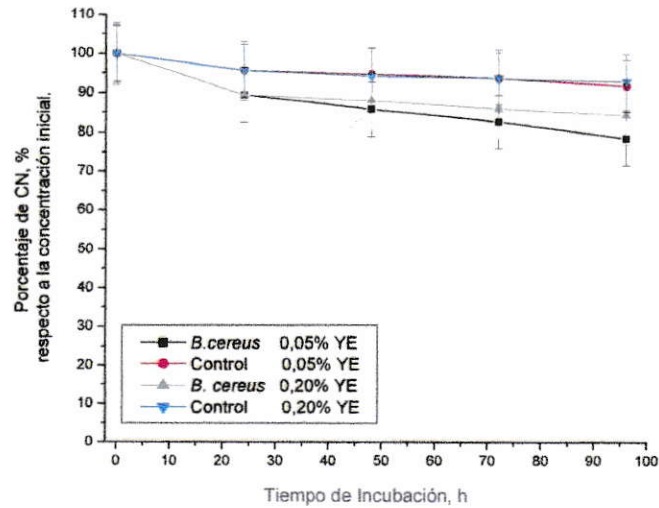


Figura 13: Degradación de  $\text{CN}^-$  en medio YEM9 (0,05 % y 0,20 % YE). Concentración inicial de  $13 \text{ mgL}^{-1}$  de  $\text{CN}^-$  (*B. cereus*: tubo con bacterias; Control: tubo sin presencia de bacterias; YE: extracto de levadura).

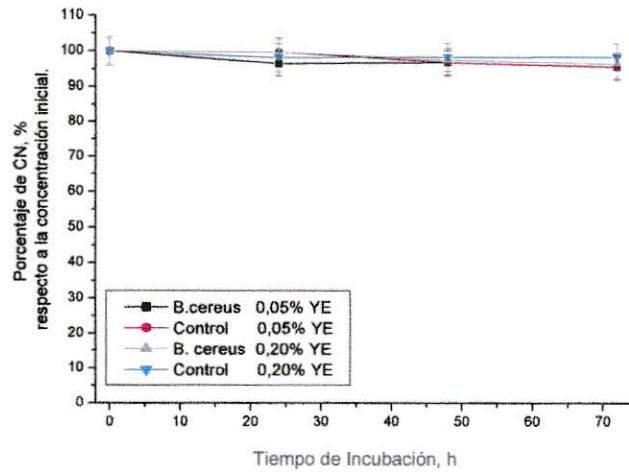


Figura 14: Degradación de  $\text{CN}^-$  en medio YEM9 (0,05 % y 0,20 % YE). Concentración inicial de  $52 \text{ mgL}^{-1}$  de  $\text{CN}^-$  (*B. cereus*: tubo con bacterias; Control: tubo sin presencia de bacterias; YE: extracto de levadura).



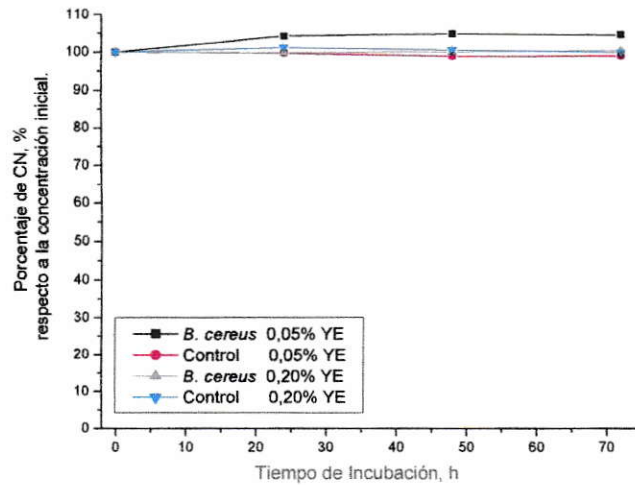


Figura 15: Degradación de  $\text{CN}^-$  en medio YEM9 (0,05 % y 0,20 % YE). Concentración inicial de  $260 \text{ mgL}^{-1}$  de  $\text{CN}^-$  (*B. cereus*: tubo con bacterias; Control: tubo sin presencia de bacterias; YE: extracto de levadura).

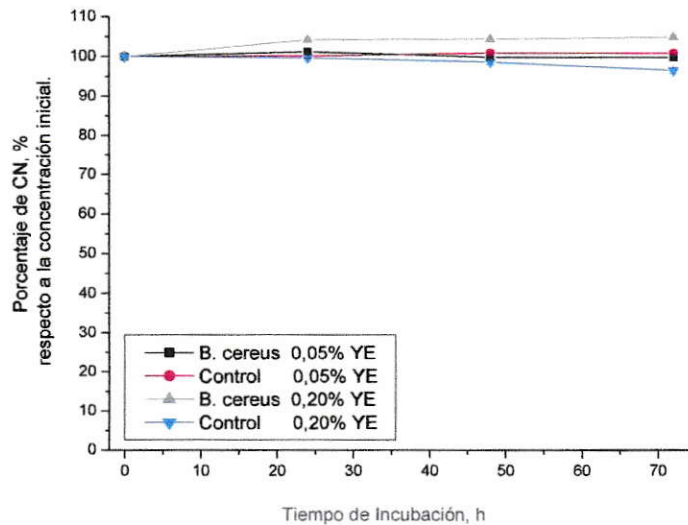


Figura 16: Degradación de  $\text{CN}^-$  en medio YEM9 (0,05 % y 0,20 % YE). Concentración inicial de  $520 \text{ mgL}^{-1}$  de  $\text{CN}^-$  (*B. cereus*: tubo con bacterias; Control: tubo sin presencia de bacterias; YE: extracto de levadura).

## DISCUSIÓN.

A partir del muestreo realizado en el proceso de cianuración fue posible obtener un sustrato enriquecido con cianuro en condiciones alcalinas. La determinación del pH en las muestras líquidas arrojó un valor mayor o igual a 10,88. Este resultado permitiría pensar que este compuesto se mantiene en su estado iónico (Figura 1), evitando así las pérdidas por volatilización de HCN.

La determinación del cianuro permitió evidenciar que estas concentraciones varían de una etapa a otra del proceso. Estas diferencias pueden estar relacionadas con las condiciones específicas a las que está sometido el mineral en cada una de ellas, no obstante, lo importante fue la obtención de muestras con altas concentraciones de  $\text{CN}^-$  independiente de la razón del cambio.

A partir de la ecuación de Elsner (Ecuación 1), se estima que la máxima disolución de Au ocurriría cuando se adiciona una cantidad de aproximadamente  $50 \text{ mgL}^{-1}$  de  $\text{CN}^-$ . A concentraciones superiores, el incremento de este compuesto favorece la disolución de otros metales, provocando disminución de la selectividad por Au y Ag (Smith y Mudder, 1996). Si consideramos esto último, en conjunto con las concentraciones superiores a  $5000 \text{ mgL}^{-1}$   $\text{CN}_T$  y  $\text{CN}_{\text{WAD}}$  encontradas en los tanques de lixiviación, tenemos que el  $\text{CN}^-$  estaría acomplejando a los metales presentes en el mineral.

En base a lo descrito anteriormente, podemos pensar que el  $\text{CN}^-$  no estaría disponible por encontrarse acomplejado. Para dilucidar esto último, es importante contrastar las concentraciones de cianuro con las de los metales. En este análisis, las

especies que dan origen a los complejos difícilmente dissociables ( $CN_{SAD}$ ), como Fe y Cu, no representan una cantidad importante de la concentración de cianuro total. Esto se observa en la pequeña diferencia porcentual encontrada entre  $CN_T$  y  $CN_{WAD}$ , que en los tanques de lixiviación asciende al 12 % (Tabla 3) ( $CN_T = CN_{SAD} + CN_{WAD}$ ). Los metales como Cd, Ni y Zn dan origen a los complejos débilmente enlazados, que en conjunto con el  $CN_{LIBRE}$  constituyen el  $CN_{WAD}$ . Las altas concentraciones de  $CN_{WAD}$  evidencian que la formación de estos complejos se encuentra favorecida, sin embargo estos no influirían mayoritariamente en la concentración de cianuro total porque solamente el Zn se encontró en concentraciones elevadas (Tabla 4) ( $CN_{WAD} = CN_{LIBRE} + CN_{acomplejado\ débilmente}$ ). Los antecedentes antes descritos, permiten respaldar que una parte considerable del  $CN_T$  se encontraría en su forma libre.

La formación de los complejos con metales diferentes al Au o Ag, quedó de manifiesto con la determinación de aquellos disueltos en solución. Se obtuvo altas concentraciones de Cu, Fe y Zn en los tanques de lixiviación (mayor o igual a  $410,4000\text{ mgL}^{-1}$ ) respecto de aquellas provenientes de la alimentación (menor o igual a  $0,0300\text{ mgL}^{-1}$ ). Los sedimentos colectados desde los tanques de lixiviación presentaron cantidades importantes de estos metales con una concentración mayor o igual a  $9161,6300\text{ mgKg}^{-1}$ .

A partir de las muestras del proceso de cianuración, se aislaron 24 microorganismos en un medio rico en nutrientes. Posteriormente, fueron seleccionados 14 aislados que presentaron crecimiento en un medio sin glucosa y presencia de cianuro ( $26\text{ mgL}^{-1}$ ). Entre sí, ellos, presentaron diferencias sustanciales en cuanto a la morfología de la colonia, obteniéndose principalmente bacterias y un aislado que mediante

microscopía óptica presentaba un aspecto levaduriforme (A6L). Estos resultados dan cuenta de la presencia de una diversidad de microorganismos en un sitio donde se cuantificaron elevadas concentraciones de cianuro y metales (Tabla 3 y Tabla 4, respectivamente).

La fase posterior de selección permitió obtener 2 cepas bacterianas que crecen a concentraciones de  $520 \text{ mgL}^{-1}$ , estas correspondieron a los aislados A3S y B3S, ambos posteriormente identificados como *B. cereus*. Estas especies representaron el 8 % (2 de 24) de las especies aisladas, con características de Gram positivo y forma celular de bacilo alargado, además con una temperatura óptima de crecimiento de  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ .

El abatimiento de cianuro fue probado con esta cepa de *B. cereus* en medio de cultivo mínimo. La elección del medio fue compleja debido a que la bacteria requirió de nutrientes adicionales. Se observó crecimiento en medio Vogel suplementado con aminoácidos o en medio M9 con aporte de extracto de levadura, seleccionándose este último por el crecimiento observado. Una ventaja adicional que presentaría M9 es la presencia de fósforo, nutriente utilizado en la biodegradación de cianuro con microorganismos como *Pseudomona paucimobilis* (Mudder y Whitlock, 1984) y *Fusarium solani* (Dumestre y col, 1997), y por otra parte se observa que existe una proporcionalidad entre la cantidad de fósforo adicionada por nosotros a *B. cereus* y la degradación realizada por *Burkholderia cepacia* (Blumenroth y col, 2003). La presencia de este compuesto sería importante para el crecimiento de *B. cereus* pero éste se encuentra condicionado al aporte de YE.

Las curvas de crecimiento realizadas en medio M9 evidencian crecimiento bacteriano dependiente del aporte YE (Figuras 10 y 11). En ellas se determinó que



probablemente YE otorgó aporte de carbono, razón por la que se limitó este producto a la menor concentración probada (0,05 % YE). El aporte de carbono es concordante con lo descrito en la literatura donde el YE proporciona nutrientes como fuente de carbono, de sulfuro y de nitrógeno (Fluka, 2004).

La cepa de *B. cereus* que fue aislada desde el acondicionador filtro Larox, presentó  $CN_{WAD}$  en una cantidad de  $1,070 \text{ mgKg}^{-1}$  en fase sólida y  $1630,0 \text{ mgL}^{-1}$  en fase líquida (Tabla 3). Estas concentraciones permitirían la adaptación de la bacteria para tolerarlo, creciendo en condiciones de laboratorio hasta una concentración de  $520 \text{ mgL}^{-1}$  de  $CN^-$ .

En las experiencias de abatimiento de cianuro realizado por *B. cereus* ( $\sim 10^7$  células/mL), en el rango de concentraciones probadas (2,6; 13; 52; 260 y  $520 \text{ mgL}^{-1}$ ), se observó degradación a una concentración de  $2,6 \text{ mgL}^{-1}$  (Figura 12). Ésta se muestra en la condición con un menor aporte de YE (0,05 % YE), observándose una reducción del 75 % en un período de incubación de 72 hrs. Los controles sin bacterias no presentan disminución de la concentración de cianuro por lo que se podría concluir que esta fue realizada por este microorganismo.

Cuando se adicionó una concentración de  $13 \text{ mgL}^{-1}$  de  $CN^-$ , se observó una tendencia a la disminución entorno al 10 -15 % del valor inicial, situación donde no fue posible diferenciarla de los controles sin bacterias (Figura 13). Pese a ello, esta disminución sería similar a la condición con una concentración inicial de  $2,6 \text{ mgL}^{-1}$  de  $CN^-$ .

No se observó degradación de cianuro cuando se adicionaron concentraciones de  $52 \text{ mgL}^{-1}$  (Figura 14),  $260 \text{ mgL}^{-1}$  (Figura 15) y  $520 \text{ mgL}^{-1}$  (Figura 16). A estas

concentraciones, resulta difícil discriminar si existió la degradación en base a los resultados descritos anteriormente. La metodología no es capaz de determinar concentraciones elevadas, por lo que una disminución equivalente a  $1,3 \text{ mgL}^{-1}$  sería difícil de estimar. Para aclarar este punto se requiere un período de incubación más extenso para medir la posible disminución en la concentración de cianuro. *B. cereus* toleró todas las concentraciones de  $\text{CN}^-$  probadas, presentando crecimiento al ser sembradas en medio MSG e incubadas por un tiempo de 15 hrs a  $26^\circ\text{C}$ .

No se evidenció degradación de cianuro al utilizar medio M9 sin aporte de YE. Se observó disminución en la concentración de  $\text{CN}^-$  en los tubos con bacterias y en los controles cuando el aporte de glucosa fue superior a 0,4%, producida por la reacción con glucosa que lleva a la formación de una cianohidrina como producto final (Solomons, 1996).

El análisis de la literatura nos permite recurrir a otros trabajos donde se muestran otros microorganismos que pueden degradar el cianuro. Podemos mencionar la degradación de  $52 \text{ mgL}^{-1}$  en 72 hrs por *Fusarium solani* (Dumestre y col, 1997),  $26 \text{ mgL}^{-1}$  en 17 hrs por *Pseudomona stutzeri* (Watanabe y col, 1998) y  $470 \text{ mgL}^{-1}$  en una noche por *Bacillus pumilus* (Jandhyala y col, 2003). En general, estas experiencias fueron realizadas con agitación y temperatura mayor o igual a  $30^\circ\text{C}$ . Existen trabajos donde se ha utilizado directamente la enzima cianuro dihidratasa, aislada de *Bacillus pumilus*, la que transforma cianuro a ácido fórmico y amoníaco, consiguiendo degradación de  $14 \text{ mM}$  ( $364 \text{ mgL}^{-1}$ ) con una cantidad de  $0,5 \text{ mg/mL}$  ( $50 \text{ mgL}^{-1}$ ) de enzima (Benedict y Jandhyala, 2003).

Los resultados obtenidos en este trabajo nos indican que la cepa aislada de *B. cereus* fue capaz de degradar cianuro cuando se aportó una menor cantidad de YE. Esto nos haría suponer que el cianuro pudiera ser degradado cuando esta bacteria lo utilizaría como fuente de carbono o nitrógeno. Es importante considerar un posible requerimiento de sulfuro para crecer, condición observada en medio Vogel con suplemento de Cys y Met. Este resultado sería concordante con el requerimiento de dichos aminoácidos descrito para un mutante de *B. cereus* (Lundgren y Bott, 1969).

En base a la utilización como nutriente, la degradación podría ser mejorada en función de las condiciones de crecimiento de *B. cereus*. La temperatura utilizada en los experimentos de degradación (26 °C) fue inferior a la de crecimiento óptimo (35 °C), condición que fue escogida para evitar posibles emanaciones de HCN.

*B. cereus* es un organismo de metabolismo aeróbico donde su crecimiento estaría relacionado directamente con el aporte de oxígeno en el medio de cultivo. En este sentido, la utilización de tubos cerrados herméticamente limitaría la oxigenación del medio y con ello el crecimiento bacteriano.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican una propiedad importante de esta cepa de *B. cereus*, la que corresponde a la capacidad para tolerar el cianuro, además de la degradación de este compuesto. Esta condición nos permite pensar en su utilización de un sistema de biodegradación de cianuro que pueda ser aplicable a la minería del oro.

Existen experiencias de biotratamiento realizadas por otros grupos de trabajo donde la degradación de cianuro, realizada por *P. paucimobilis*, ocurrió sin ser utilizado como nutriente (Mudder y Whitlock, 1984). En otras la degradación de este compuesto,



por la cepa *B. pumillus*, otorgó la fuente de carbono y nitrógeno (Chapatwala y col, 1998).

Podemos inferir que *B. cereus*, tendría mayor aplicabilidad en el tratamiento de sedimentos y lodos debido a que una gran cantidad del cianuro se encontraría acomplejado, permaneciendo en el ambiente y liberándose de acuerdo a la estabilidad del complejo formado. En cambio los residuos líquidos, requieren de un microorganismo que realice la degradación en un intervalo de tiempo menor, considerando como limitante el almacenamiento del residuo. La utilización de bacterias para degradar el cianuro corresponde a una alternativa económica de abatimiento del mismo, que además presenta la ventaja de prescindir de reactivos peligrosos (Chapatwala y col, 1998) o generar precipitados en el tratamiento que induzcan otro problema a futuro (Blumenroth y col, 2003).

Los límites de cianuro establecidos en la normativa son bastante exigentes, lo que determina una necesidad de tratamiento de los desechos líquidos y sólidos que abandonan las dependencias mineras y tienen como destino final el ambiente. La legislación en Chile señala que las descargas líquidas no pueden superar valores entre  $0,2 \text{ mgL}^{-1}$  y  $1 \text{ mgL}^{-1} \text{ CN}_T$  (D.S. 90, 2000). En Canadá, la normativa establece una cantidad de  $8,0 \text{ mgKg}^{-1} \text{ CN}_{\text{LIBRE}}$  en suelos de uso comercial o industrial (EQG, 2002).

Por otra parte, se han descrito cepas de *B. cereus* que poseen la propiedad de detoxificar soluciones que presentan metales pesados como As, Cd y Co (Zaired, 2003). En estos casos se han utilizado residuos de caña de azúcar como fuente de carbono. Esto eventualmente sería un carácter que podría ser utilizado en conjunto con la degradación



de cianuro, considerando que esta bacteria fue aislada desde una muestra que contenía altas concentraciones de Cd, Cu, Fe y Zn (Tabla 4).

La proyección de un tratamiento biológico de residuos con presencia de cianuro debería considerar el análisis de los requerimientos nutricionales del microorganismo y de las condiciones que favorezcan su crecimiento. Este análisis es un tema importante para la obtención de un medio de cultivo que puede ser mejorado en base al suministro de solamente los compuestos necesarios, además de los aspectos del sistema de tratamiento donde se determine efectivamente cuales son las condiciones óptimas de aireación (presión de O<sub>2</sub>) y temperatura.

Un acercamiento al aislamiento de microorganismos que fueran capaces de degradar concentraciones elevadas, podría hacerse con la búsqueda de genes que codificaran enzimas (cianuro dihidratasa, cianuro hidratasa y cianuro oxidasa) que participan en la degradación, a través de la técnica de PCR utilizando DNA extraído directamente desde las muestras. Las pruebas de degradación podrían ser realizadas en conjunto con la determinación de los productos de aquella transformación como amoníaco y ácido fórmico.

Considerando los temas abordados para afrontar la problemática ambiental del cianuro, queda de manifiesto la necesidad de instituir una visión desde las Ciencias Ambientales, es decir una mezcla de la química tradicional integrada a otras disciplinas, empleando distintas estrategias, métodos y técnicas con el fin de brindar soluciones a un problema que es de carácter multidisciplinario. Además, abordar la problemática ambiental desde una disciplina en particular, dificulta la entrega de una solución

integral, generando el aislamiento, y posible competencia de intereses con otras disciplinas.

Cuando los problemas ambientales involucran intereses sociales, la componente económica es fuerte y condiciona la toma de decisiones en favor de una solución en particular, razón por la que debe ser internalizada a los proyectos de carácter técnico. En este contexto, el tratamiento biológico podría ser una alternativa económica y limpia para tratar residuos con presencia de cianuro.

## CONCLUSIONES.

- La caracterización de las muestras colectadas en distintas etapas del proceso de cianuración, nos permitió establecer que éstas contienen elevadas concentraciones de  $CN_T$ ,  $CN_{WAD}$ , Cd, Cu, Fe y Zn.
- Las pruebas de aislamiento de microorganismos realizadas con las distintas muestras nos permiten concluir que existen bacterianas que pueden ser aisladas en las diferentes etapas del proceso.
- A partir de los microorganismos aislados se puede demostrar que cada uno de ellos presenta diferentes niveles de tolerancia a cianuro. Encontrando que al menos uno de ellos, *B. cereus*, tolera concentraciones de  $520 \text{ mgL}^{-1}$  de  $CN^-$ .
- En nuestras condiciones experimentales la cepa aislada de *B. cereus* fue capaz de abatir cianuro.

## BIBLIOGRAFÍA.

- APHA, AWWA, WEF. 1995. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 19th Ed.
- Baskin S. y Brewer T, 1997. Chapter 10: Cyanide Poisoning. In Textbook of Military Medicine: Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare Office of the Surgeon General, Department of the Army. Disponible en:  
<http://www.vnh.org/MedAspChemBioWar/chaptersinpdf/Ch-10electrv699.pdf>
- Benedik M. y Jandhyala D. 2003. Cyanide Remediation Using Microbial Enzymes. Environmental Institute of Houston, University of Houston-Clear Lake. Disponible en: <http://www.eih.uh.edu/publications/01annrep/benedik.pdf>
- BLASTN, Nucleotide-Nucleotide BLAST. 2004. By National Center Biotechnology Investigation, NCBI. Disponible en:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>
- Blumenroth P., Bosecker K., Michnea A., Varna A. y Sasaran N. 2003. Development of Biological Detoxification Process for Mining Wastewaters. Bundesanstalt für Geowissenschaften und Rohstoffe. Hannover. Disponible en:  
<http://www.bgr.de/index.html?/b412/abwass/abwasser.htm>
- Chapatwala K., Babu G., Vijaya O., Kumar K. y Wolfram J., 1998. Biodegradation of Cyanides, Cyanates and Thiocyanates to Ammonia and Carbon Dioxide by Immobilized Cells of *Pseudomonas putida*. Indus. Microb. Biotech. 20: 28-33.
- Cyanide Management. 2003. Australian Government: Department of Environment and Heritage. Disponible en:  
<http://www.deh.gov.au/industry/industry-performance/minerals/booklets/cyanide/>



- D.S. 90. 2000. Decreto Supremo N° 90 del Ministerio Secretaría General de la Presidencia, Chile. Norma de Emisión para la regulación de contaminantes asociados a las descargas de residuos líquidos a aguas marinas y continentales superficiales.
- Davis G.A., Kincaid L., Menke D., Griffith B., Jones S., Brown K. y Goergen M. 1994. The Product Side of Pollution Prevention: Evaluating the Potencial for Safe Substitutes. EPA/600/R-94/178.
- Deuren J.V., Lloyd T., Chhetry S., Liou R. y Peck J., 2002. Remediation Technologies Screening Matrix and Reference Guide, 4<sup>th</sup> Edition. Federal Remediation Technologies Roundtable. Disponible en: [http://www.frtr.gov/matrix2/top\\_page.html](http://www.frtr.gov/matrix2/top_page.html)
- Dumestre A., Chone T., Portal J., Gerard M. y Berthelin J. 1997. Cyanide Degradation under Alkaline Conditions by a Strain of *Fusarium solani* Isolated from Contaminated Soils. Appl. Environ. Microbiol. 63: 2729-2734.
- Edwards, U., T. Rogall, H. Blöcker, M. Emde y Böttger, E. C. 1989. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. Nucleic Acids Res. 17: 7843-7853.
- Eisler R. 1991. Cyanide Hazards to Fish, Wildlife, and Invertebrates: A Synoptic Review: U.S. Fish Wildl. Serv., *Biol. Rep.* 85(1.23). EPA 510-B-95-007. Disponible en: [http://www.pwrc.usgs.gov/infobase/eisler/CHR\\_23\\_Cyanide.pdf](http://www.pwrc.usgs.gov/infobase/eisler/CHR_23_Cyanide.pdf)
- EQG, Canadian Environmental Quality Guidelines. 2002. Developed by the National Guidelines and Standards Office. Canada.
- Fisher F.B. y Brown J.S. 1952. Colorimetric Determination of Cyanide in Stack Gas and Waste Water. Anal. Chem. 24: 1440-1444.

- Fluka. 2004. LB-Top Agar. BioChemika for microbiology medium for molecular biology. 61731 Data Sheet. Disponible en :  
[http://www.sigmaaldrich.com/fluka/product%20information%20sheet/61731\\_data\\_sheet\\_64kb.pdf](http://www.sigmaaldrich.com/fluka/product%20information%20sheet/61731_data_sheet_64kb.pdf)
- Fry N., Warwick S., Saunders N. y Embley T. 1991. The use of 16S ribosomal RNA analyses to investigate the phylogeny of the family Legionellaceae. *J. Gen. Microbiol.* 137: 1215-1222.
- Guerrero B. y Torres J. 2000. Efectos Ambientales por uso de Cianuro y Mercurio en la Recuperación Secundaria de Oro. Disponible en:  
<http://www.contraloriagen.gov.co/cdminas/contenido/Efectos%20ambientales%20por%20uso%20de%20cianuro%20y%20mercurio.pdf>
- Harper C. y Goldhaber S. 1997. Toxicological Profile for Cyanide. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. Division of Toxicology. Atlanta, Georgia. Disponible en: <http://www.cyantists.com/CyanideToxProfile.pdf>
- Holt J.G. 1994. *Bergey's Manual of determinative Bacteriology*. Williams & Wilkins. Baltimore.
- INCO, System Cyanide Destruction. 2002. INCO/SO<sub>2</sub> AIR Operating Manual.
- Irwin R.J. 1997. Environmental Contaminants Encyclopedia entry on Cyanide(s) in General. National Park Service with Assistance from Colorado State University. Disponible en: <http://www.nature.nps.gov/hazardssafety/toxic//cyanide.pdf>
- Jandhyala D., Berman M., Meyers P., Sewell B., Wilson R. y Benedik M. 2003. CynD, the Cyanide Dihydratase from *Bacillus pumilus*: Gene Cloning and Structural Studies. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 4794-4805.

- Logsdon M., Hagelstein K. y Mudder T. 2001. El Manejo del Cianuro en la Extracción de Oro. The International Council on Metals and the Environment. Ottawa, Ontario. Primera impresión en español.
- Lundgren D. y Bott K. 1969. Growth and Sporulation Characteristics of an Organic Sulfur-Requiring Auxotroph of *Bacillus cereus*. J. Bacteriol. 86: 462-472.
- Maksaev V. 2003. Depósitos Epidermales. Apuntes del Curso Electivo de posgrado en Ciencias mención Geología de la Universidad de Chile. Disponible en: <http://cipres.cec.uchile.cl/~vmaksaev/Metalog%E9nesis.html>
- Merck. 2002. Ficha de Datos de Seguridad de Cianuro de Sodio. Artículo Número 106437.
- Meyers P., Rawlings D., Woods D. y Lindsey G. 1993. Isolation and Characterization of a Cyanide Dihydratase from *Bacillus pumilus* C1. J. Bacteriol. 175: 6105-6112.
- Millán A. 2001. Historia de la Minería del Oro en Chile. Editorial Universitaria.
- Minera La Florida, Faena Alhué. Sitio Web del Grupo Cenizas. Visitada el año 2002. Disponible en: <http://www.cenizas.cl/faenaalh.htm>
- Mudder T.I. y Whitlock J.L. 1984. Method for the biological removal of free and complex cyanide and thiocyanates from water. U.S. Patent Document 4440644.
- Parada R. 2002. Plantas tóxicas para el Ganado en Chile. Disponible en: <http://www.robertoparada.cl/Cianuro.htm>
- Sambrook J. y Russell D. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. Third Edition.



- Seeley H.W.Jr., Vandermark P.J. y Lee, J.J. 1991. Microbes in action. A laboratory manual of microbiology. W. H. Freeman and Company, Four Edition, Chapter 5.
- Smith A. y Mudder T. 1996. Tratamiento de Residuos de Cianuración. Editado en Versión Española por Mining Journal Books Ltda.
- Solomons, T.W. 1996. Organic Chemistry. John Wiley & Sons. New York.
- U.S. EPA. 1984. Ambient Aquatic Life Water Quality Criteria for Cyanide. Ambient Water Quality Criteria for Cyanide. Office of Research and Development Environmental Research Laboratories. Duluth, Minnesota. Narragansett, Rhode Island.
- U.S. EPA. 1994a. Technical Resource Document: Extraction and Beneficiation of Ores and Minerals, Volume 2, Gold. Office of Solid Waste Special Waste Branch 401 M Street, SW, Washington, DC 20460. Disponible en: <http://www.epa.gov/epaoswer/other/mining/techdocs/gold.pdf>
- U.S. EPA. 1994b. Technical Resource Document: Treatment of Cyanide Heap Leaches and Tailings. Office of Solid Waste Special Waste Branch 401 M Street, SW, Washington, DC 20460. Disponible en: <http://www.epa.gov/epaoswer/other/mining/techdocs/cyanide.pdf>
- U.S. EPA. 1995. How to Evaluate Alternative Cleanup Technologies for Underground Storage tank Sites: A Guide for Corrective Action Plan Reviewers. EPA 510-B-95-007.
- Wang C-S., Kunz D. y Venables B. 1996. Incorporation of Molecular Oxygen and Water during Enzymatic Oxidation of Cyanide by *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764. Appl. Environ. Microbiol. 62: 2195-2197.



- Watanabe A., Yano K., Ikebukuro K. y Karube I. 1998. Cyanide Hydrolysis in a Cyanide-Degrading Bacterium, *Pseudomonas stutzeri* AK61, by cyanidase. *Microbiol.* 144: 1677-1682.
- Way J.L. 1984. Cyanide Intoxication and its Mechanism of Antagonism. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 24: 451-481.
- Yannopoulos, J.C. 1995. *Metalurgia Extractiva del Oro*. Versión traducida al español, Editorial Imral, Oruro.
- Young C.A. y Jordan T.S. 1995. Cyanide Remediation: Current and Past Technologies Department of Metallurgical Engineering, Montana Tech, Butte, MT 59701. Disponible en:  
<http://www.engg.ksu.edu/HSRC/95Proceed/young.pdf>
- Zaied K. 2003. Domestic Wastewater: Microbial Genetic Control of Heavy Metal Pollution from Wastewater. The Sixth Gulf Water Conference: Water in the GCC (Gulf Cooperation Council) Countries. Riyadh, Kingdom of Saudi Arabia. Disponible en:  
<http://www.wsta-gcc.org/includes/New%20Folder/HTML/ke6.htm>

## APÉNDICE

### Apéndice 1: Medios de cultivo.

#### 1) Medio rico con glucosa (MCG):

Glucosa	0,8 % p/v
Extracto de Levadura	0,5 % p/v
Peptona	0,5 % p/v
Agar	1,5 % p/v

#### 2) Medio sin glucosa (MSG):

Extracto de levadura	0,3 % p/v
Peptona	0,3 % p/v
Agar	1,5 % p/v

#### 3) Medio mínimo Vogel 50X (MV):

Citrato de sodio dihidrato	15,0 % p/v
Fosfato potasio dibásico	25,0 % p/v
Nitrato de amonio	10,0 % p/v
Sulfato de magnesio II heptahidrato	1,0 % p/v
Cloruro de calcio dihidrato	0,5 % p/v
Elementos trazas (*a)	5,0 mL/L
Biotina	0,25 mL/L
Cloroformo	2,0 mL/L
Agar	2,0 %

\*a) Solución de elementos trazas: En 300 mL de agua destilada agregar sucesivamente:

Ácido bórico	9,0 mg
Sulfato de cobre II	58,5 mg
Ioduro de potasio	1,95 mg
Sulfato de manganeso II	9,0 mg
Molibdato de amonio	5,05 mg
Cloruro de hierro III hexahidrato	138,8 mg
Sulfato de zinc hidrato	822,0 mg

4) Medio mínimo Vogel-Bonner (MVB):

Sales VB 25 X (*b)	40 mL/L
Glucosa	2,5 % p/v
Agar	2,0 % p/v

\*b) Sales VB 25 X:

Sulfato de magnesio II	0,5 % p/v
Ácido cítrico	5,0 % p/v
Fosfato de potasio dibásico	25,0 % p/v
Cloruro de amonio	1,4 % p/v
Fosfato de sodio básico	15,6 % p/v

5) Medio mínimo M9:

Agua desionizada	770,0 mL/L
Sales M9 5 X (*c)	20,0 mL/L
Sulfato de magnesio II 1 M	2,0 mL/L
Cloruro de calcio 1 M	0,1 mL/L
Glucosa 20 % p/v	20,0 mL/L
Agar	15,0 g/L

(\*c) Sales M9 5 X.

Fosfato de sodio dibásico heptahidrato	6,4	% p/v
Fosfato de potasio básico	1,5	% p/v
Cloruro de sodio	0,25	% p/v
Cloruro de amonio	0,5	% p/v

- Se autoclava por separado: H<sub>2</sub>O, M9 5X, MgSO<sub>4</sub> 1 M y CaCl<sub>2</sub> 1 M. Se mezclan en orden correlativo y luego se adiciona la glucosa esterilizada por filtración.

6) Medio mínimo YEM9

Corresponde a medio mínimo M9 suplementado con extracto de levadura

- Se disuelve el extracto de levadura (0,05 % ó 0,2 % YE según corresponda) en agua antes de esterilizar y luego se sigue el mismo procedimiento que en M9.



**Apéndice 2: Tipo, metodología, especie, constante de estabilidad e índices de toxicidad referentes al cianuro.**

Tipo de Cianuro	Metodología Cuan-tificación	Especies y/o compuestos	Log Ke o $\beta$	Solubilidad g /100g H <sub>2</sub> O	Toxicidad Peces (LC50 en mg/L)	Toxicidad Ratas (LD50 en mg/Kg)
Cianuro Libre	CN <sub>LIBRE</sub>	CN <sup>-</sup>	-	-	0,1	5 (KCN)
		HCN	9,23	-	0,05 a 0,18	
	CN <sub>LIBRE</sub> ; CN <sub>T</sub>	KCN (s)	-	716g (25°C)	0,02 a 0,08 0,4 a 0,7	
		Ca(CN) <sub>2</sub> (s)	-			
		NaCN*2H <sub>2</sub> O (s)	-	342g (15°C)		
	CN <sub>WAD</sub> ; CN <sub>T</sub>	Cu(CN) (s)	19,5	-	-	
		Zn(CN) <sub>2</sub> (s)	15,9	-	-	
		Ni(CN) <sub>2</sub> (s)	-	9,1x10 <sup>-4</sup> g (25°C)	-	
Complejos Débiles	CN <sub>WAD</sub> ; CN <sub>T</sub>	Cd(CN) <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	17,9	-	-	
		Zn(CN) <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	19,6	-	0,18	
Complejos Moderadamente Fuertes	CN <sub>WAD</sub> ; CN <sub>T</sub>	Ni(CN) <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	30,2	-	0,42	
		Cu(CN) <sub>2</sub> <sup>1-</sup>	16,3	-	-	
		Cu(CN) <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	21,6	-	0,71 (24hrs)	
		Cu(CN) <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	23,1	-	-	
		Ag(CN) <sub>2</sub> <sup>1-</sup>	20,5	-	-	
Complejos Fuertes	CN <sub>T</sub>	Fe(CN) <sub>6</sub> <sup>3-</sup>	35,4	-	35,0(L) ; 860-940(O)	
		Fe(CN) <sub>6</sub> <sup>4-</sup>	43,6	-	35,2(L); 860- 1210 (O)	
		Au(CN) <sub>2</sub> <sup>1-</sup>	38,3	-	-	
Tiocianato		SCN <sup>-</sup>			50-200	854
Cianato		CNO <sup>-</sup>			34-54	567 (KCNO)

### Apéndice 3: Preparación de buffer TAE, gel de agarosa y siembra

#### 1) Buffer TAE 50 X:

Tris base	24,2 % p/v
Ácido acético glacial	57,1 mL/L
EDTA (0,5M) pH 8,0	100,0 mL/L

- Se prepara un stock de 1 Litro de buffer TAE 50 X, diluir una alícuota del stock para conseguir buffer TAE 1X que es utilizado en la electroforesis en gel de agarosa.

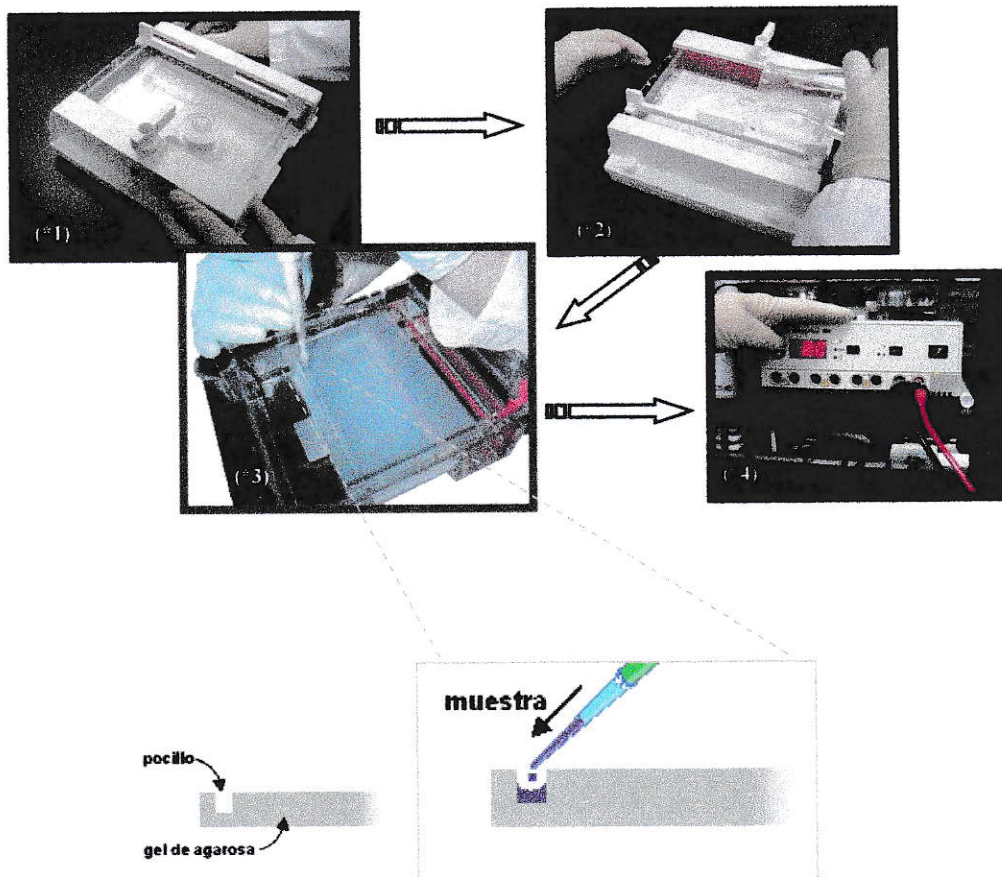
#### 2) Preparación del gel de agarosa:

- Preparar una solución al 0,8 % de agarosa en buffer TAE 1X. Calentar hasta ebullición para disolver la agarosa.
- Enfriar a temperatura ambiente y adicionar bromuro de etidio hasta una concentración final de 0,5 µg/mL de gel. *Precaución: el bromuro de etidio es mutagénico por lo que se debe evitar el contacto con la piel.*
- Nivelar el molde del gel e insertar un peine de tamaño apropiado (\*1) (Ver Figura A3-1 con la descripción de los pasos a seguir).
- Trasvasijar al molde la solución enfriada a temperatura ambiente. Es importante que la solución no presente burbujas (\*2). Esperar hasta que la solución gelifique completamente.
- Retirar cuidadosamente el peine y trasladar el gel a la cubeta de electroforesis.
- Agregar buffer TAE 1X hasta cubrir todo el gel.

#### 3) Siembra en el gel de agarosa:

- Colocar en un tubo eppendorf una alícuota de la solución de DNA genómico.
- Agregar una alícuota de buffer de siembra GLD y otra de agua estéril. Se mezcla, cuidadosamente, cargando y descargando con la micropipeta.

- La cantidad de DNA y de reactivos utilizados son dependientes de la colonia de microorganismos obtenida.
- Cargar lentamente la muestra en uno de los pocillos formados por acción de los dientes del peine en el gel. (\*3)
- Sembrar un marcador de peso molecular conocido en un pocillo contiguo.
- Conectar la fuente e iniciar la corrida a voltaje constante por un período determinado. (\*4)
- Colocar el gel sobre un transiluminador UV y observar manteniendo los ojos protegidos de la radiación UV.



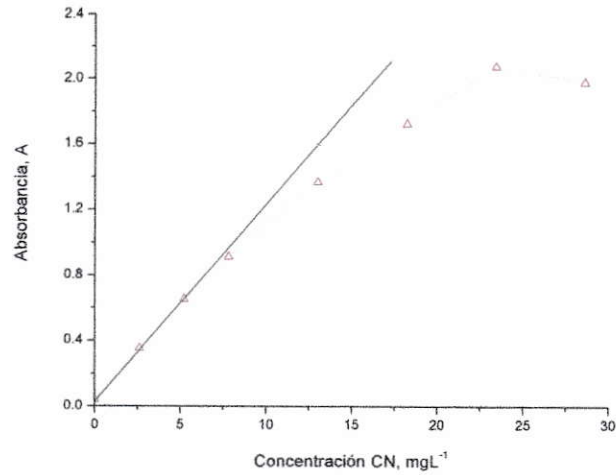
A3-1: Esquema gráfico resumen de la preparación y siembra en gel de agarosa

4) Técnica de GENECLEAN, extracción de DNA desde el gel:

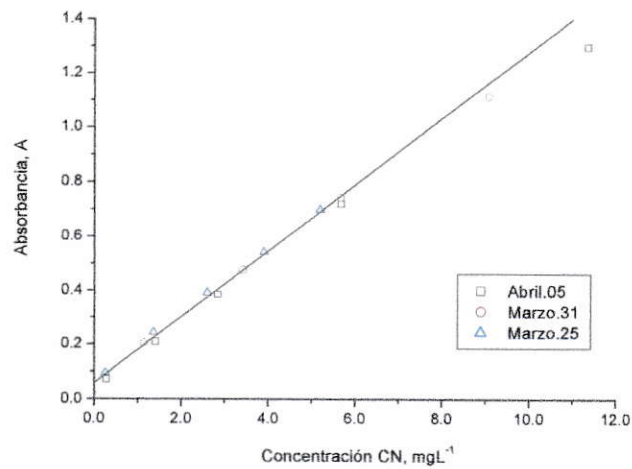
- Realizar la extracción utilizando el Kit Bio 101 GENECLEAN II & III.
- Cortar la banda de DNA desde el gel de agarosa.
- Adicionar 400  $\mu$ L de NaI 6M e incubar entre 55-60 °C hasta disolver completamente la agarosa.
- Agregar 10-15  $\mu$ L de sílica (Glassmilk) e incubar por 5 min.
- Centrifugar a velocidad máxima por 1 min y eliminar el sobrenadante.
- Adicionar entre 300-500  $\mu$ L de solución de New Wash (resuspende la sílica).
- Centrifugar por 3 min y eliminar totalmente el sobrenadante.
- Agregar 5  $\mu$ L de agua estéril para resuspender.
- Incubar por 5 min a 55 °C y centrifugar por 5 min.
- Rescatar el sobrenadante, el cual contiene el DNA.



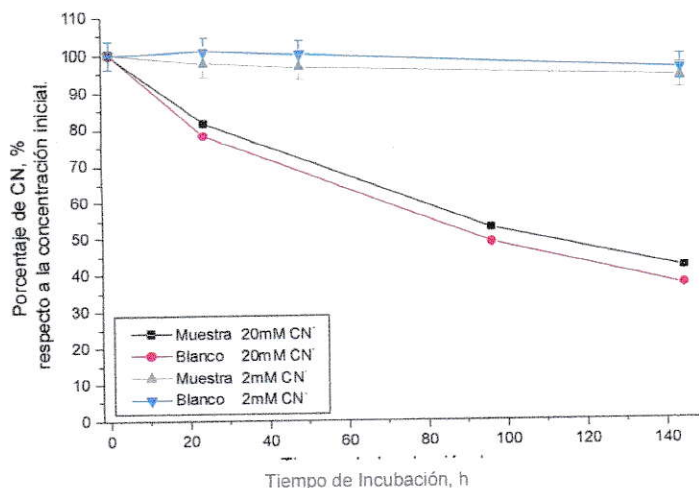
**Apéndice 4: Determinación de cianuro y reproducibilidad con la metodología del ácido pícrico.**



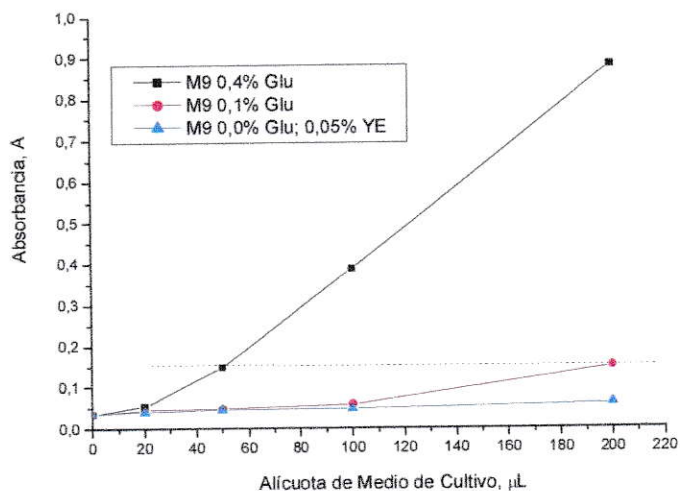
A4-1: Determinación del rango lineal de la determinación de CN con los volúmenes de muestra empleados (volumen total de 1 mL).



A4-2: Reproducibilidad de las curvas de calibración de CN con los volúmenes de muestra empleados (volumen total de 1 mL).



A4-3: Disminución de la concentración de cianuro en presencia de 0,4 % de glucosa (Muestra: tubo con presencia de *B. cereus* y Blanco: tubo sin microorganismos).



A4-4: Determinación del complejo coloreado generado por la presencia de glucosa en medio M9. Se varió la alícuota adicionada de medio de cultivo (Glu: glucosa; YE: extracto de levadura).