

Evaluación de la capacidad degradadora de especies cianuradas con consorcio microbiano

Fernando Antonio Chaves Vallejos

Universidad de Caldas
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Química
Manizales, Colombia
2023

Evaluación de la capacidad degradadora de especies cianuradas con consorcio microbiano

Fernando Antonio Chaves Vallejos

Trabajo Final presentado como requisito parcial para optar al título de:
Magíster en Química – Modalidad en Investigación

Director:

Magíster en Química, Julio Andrés Cardona Castaño

Co-Director:

Doctora en Ciencias-Química, Luz Adriana Betancur Jaramillo

Grupo de investigación:

Grupo de Estudios Ambientales en Agua y Suelo

Universidad de Caldas
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química
Manizales, Colombia
2023

A mis queridos padres y hermana:

Este logro es la manifestación de nuestra fuerza como familia.

Gracias por ayudar a forjar mi destino.

A Dahiana:

Mi compañera en este viaje, cada párrafo escrito lleva la huella de tu amor

AGRADECIMIENTOS

A mi creador, por darme la oportunidad de alcanzar mis objetivos.

A mis padres, quienes, con su amor y esfuerzo incansable, me han guiado y educado hasta convertirme en la persona que soy hoy. Aunque ya no están, su apoyo y enseñanzas han sido fundamentales para mi desarrollo personal y profesional.

A Dahiana, por su amor, apoyo incondicional y ayuda en los momentos más difíciles. Su presencia ha sido un eje fundamental en mi vida.

A mi hermana, por su apoyo constante y por siempre estar presente para mí.

A mis directores de trabajo de grado, la doctora Luz Adriana y el magister Julio Cardona. Sus enseñanzas, recomendaciones y consejos han sido invaluable para mi formación académica y profesional. Su dedicación y compromiso han sido fundamentales para el desarrollo de esta investigación.

Al profesor Daniel Ricardo Toro, por brindarme la oportunidad de realizar esta investigación en su laboratorio. Sus valiosas recomendaciones han contribuido a mejorar significativamente mi trabajo.

A la magister Sonia Echeverry, Cristian Camilo Arboleda y Angela Patricia Alzate. Su colaboración y contribuciones han sido cruciales para el desarrollo de esta investigación. A Angela, en particular, le agradezco por su ayuda de último momento.

A David Rivera por todo su apoyo, consejos y enseñanzas, mucho de lo logrado aquí fue gracias a su ayuda

A la Universidad de Caldas, por la formación que he recibido y por su apoyo financiero en la realización de esta investigación. Su compromiso con la educación y la investigación ha sido fundamental para mi desarrollo académico.

Tabla de contenido

Resumen	12
Abstract	14
Introducción	16
Objetivos	19
Objetivo general	19
Objetivos específicos	19
1. Capítulo I - Marco teórico	20
1.1 El oro en Colombia.	20
1.2 Cianuración.	22
1.3 Cianuro.	23
1.4 Tiocianato	25
1.5 Toxicidad de los compuestos cianurados.	27
1.6 Métodos de tratamiento de compuestos cianuro	30
1.7 Biorremediación microbiana para el tratamiento de compuestos cianurados	33
1.8 Consorcios microbianos en los procesos de biodegradación de compuestos cianurados.....	37
1.9 Bacterias empleadas en esta investigación.....	38
1.9 Biorreactores en el tratamiento de especies cianuradas.....	40
1.10 Análisis de especies cianuradas por fotometría	45
1.11 Análisis de especies cianuradas por cromatografía iónica.	46
2. Capítulo II – Metodología	49
2.1 Estandarizar las condiciones cromatográficas para la cuantificación de especies cianuradas por cromatografía de intercambio iónico con detector de conductividad.....	49
2.1.1 Reactivos.....	50
2.1.2 Análisis mediante cromatografía iónica	50
2.1.3 Determinación de las mejores condiciones de análisis por cromatografía iónica.....	50
2.1.4 Determinación de parámetros analíticos del método usado.	51
2.1.5 Determinación de cianuro.....	52

2.2 Aislar e identificar un consorcio de microorganismos con potencial degradador de especies cianuradas.....	52
2.2.1 Ensayos preliminares de la evaluación de la capacidad degradadora de especies cianuradas por <i>Pseudomonas putida</i>	56
2.2.2 Muestreo y aislamiento de un consorcio microbiano con capacidad degradadora de especies cianuradas	57
2.2.2.6 Caracterización microscópica y macroscópica de los aislamientos.....	60
2.3 Evaluación preliminar a escala de laboratorio la capacidad degradadora de especies cianuradas por consorcio microbiano	62
2.3.1 Diseño experimental para la degradación de cianuro a escala de laboratorio	63
2.3.2 Diseño experimental para la degradación de tiocianato a escala de laboratorio	63
2.3.3 Diseño preliminar y puesta en marcha del reactor en continuo para evaluar la degradación preliminar de tiocianato y cianuro	64
3. Capítulo III – Resultados y discusión	65
3.1 Estandarizar las condiciones cromatográficas para la cuantificación de especies cianuradas por cromatografía de intercambio iónico con detector de conductividad.....	65
3.1.1 Análisis mediante cromatografía iónica	65
3.1.2 Determinación de las mejores condiciones de análisis por cromatografía iónica.....	68
3.1.3 Determinación de parámetros analíticos del método usado.	81
3.2 Aislar e identificar un consorcio de microorganismos con potencial degradador de especies cianuradas.....	87
3.2.1 Ensayos preliminares de la evaluación de la capacidad degradadora de especies cianuradas por <i>Pseudomonas putida</i>	88
3.2.2 Muestreo y aislamiento de un consorcio microbiano con capacidad degradadora de especies cianuradas.	94
3.2.2.2 Ensayos de actividad del consorcio microbiano en la degradación de especies cianuradas.....	94
3.2.2.3 Aislamiento de los microorganismos presentes en el consorcio microbiano.....	98
3.2.2.7 Pruebas bioquímicas para los aislamientos M2 y M3.	105
3.2.2.8 Identificación de los microorganismos mediante ADNr 16S	107

3.3 Evaluar preliminarmente a escala de laboratorio la capacidad degradadora de especies cianuradas por consorcio microbiano	109
3.3.1 Diseño experimental para la degradación de cianuro a nivel de laboratorio	110
3.3.2 Diseño experimental para la degradación de tiocianato a escala de laboratorio	117
3.3.3 Diseño preliminar y puesta en marcha del reactor en continuo para evaluar la degradación preliminar de tiocianato y cianuro	124
Conclusiones	130
Recomendaciones	132
Referencias	135
Anexos	156

Índice de figuras

Figura 1. Estructura del complejo cianurado de oro.....	22
Figura 2. Esquema del proceso de lixiviación del oro.....	23
Figura 3. Estructuras resonantes del tiocianato:	25
Figura 4. Inhibición de la respiración celular por cianuro.....	27
Figura 5. Esquema del impacto del cianuro en el cuerpo humano..	29
Figura 6. Esquema general de las rutas metabólicas en la degradación de cianuro	34
Figura 7. Esquema general de un reactor de biomasa sustentada.....	41
Figura 8. Características de un reactor de biomasa fija, aspectos positivos y negativos..	43
Figura 9. Gráfico de calibración de la intensidad del color	46
Figura 10. Esquema de un sistema de separación de cromatografía iónica.....	47
Figura 11. Desarrollo experimental para cumplir el objetivo 1.....	49
Figura 12. Esquema general de la metodología empleada	53
Figura 13. Esquema general de la metodología empleada.....	55
Figura 14. Esquema general para determinar preliminarmente la degradación	62
Figura 15. Cromatograma inicial con condiciones simuladas.....	65
Figura 16. Ensayos preliminares en la separación de picos.....	67
Figura 17. Ensayos preliminares en la separación de picos.....	67
Figura 18. Diagramas de Pareto para todas las variables respuesta.....	73
Figura 19. Graficas de efectos principales para todas las respuestas.	75
Figura 20. Gráficos de superficie de respuesta.	76
Figura 21. Cromatograma con las mejores condiciones.....	78
Figura 22. Gráfico de deseabilidad especificado para el diseño experimental.	78
Figura 23. Cromatograma con las condiciones de optimización.....	80
Figura 24. Recta de calibración del método de cuantificación para siete aniones,	81
Figura 25. a. Cultivo de <i>P. putida</i> ATCC 31483 en agar cetrimide. b. Tinción Gram	89
Figura 26. Prueba de tolerancia en cianuro.	90
Figura 27. Prueba de tolerancia en tiocianato.....	91
Figura 28. Resultados del proceso de adaptación.	93
Figura 29. Cromatograma.....	96
Figura 30. Unidades formadoras de colonia de la solución SM1	97
Figura 31. Medios sólidos usados en el crecimiento de colonias aisladas..	99
Figura 32. Morfotipos aislamientos en diferentes medios,.....	100
Figura 33. Cepas aisladas y almacenadas en criopreservación.....	103
Figura 34. Prueba de oxidasa y catalaza	106
Figura 35. Pruebas de oxidación de azúcares. Prueba TSI	106
Figura 36. Diagrama de Pareto para la remoción de cianuro.	113
Figura 37. Gráfica de efectos principales para el porcentaje de remoción de cianuro.	113
Figura 38. Gráfico de superficie de respuesta para la remoción de cianuro	115
Figura 39. Seguimiento de la reacción de degradación de cianuro,	117
Figura 40. Diagrama de Pareto para la remoción de tiocianato,.....	120
Figura 41. Gráfica de efectos principales para la remoción de tiocianato,.....	121
Figura 42. Gráfico de superficie de respuesta para la degradación de tiocianato.....	122
Figura 43. Seguimiento de la reacción de degradación de tiocianato.....	124
Figura 44. Reactor en continuo diseñado.....	125

Figura 45. Formación de biopelícula en los soportes de arenisca	126
Figura 46. Gráfica de la reacción de degradación de cianuro	127
Figura 47. Resultados de la determinación de cianuro en el reactor por colorimetría.....	127
Figura 48. Gráfica de la reacción de degradación de tiocianato.....	129

Índice de tablas

Tabla 1. Proyectos de minería de oro en Colombia.	21
Tabla 2. Especies de cianuradas.	24
Tabla 3. Ecotoxicidad en peces, invertebrados y microalgas.	28
Tabla 4. Características destacadas de varias tecnologías de eliminación de cianuro.....	32
Tabla 5. Ejemplos de microorganismos y sus vías de degradación de cianuros.	35
Tabla 6. Porcentaje de biodegradación de cianuro por diferentes microorganismos.	36
Tabla 7. Biodegradación de cianuro con sistemas de biomasa suspendida.....	42
Tabla 8. Biodegradación de cianuro con sistemas de biomasa inmovilizada.	44
Tabla 9. Condiciones de análisis de las variables respuestas.....	50
Tabla 10. Factores experimentales empleados en el diseño de degradación de cianuro .	63
Tabla 11. Factores experimentales empleados en el diseño de degradación de tiocia	63
Tabla 12. Resoluciones preliminares de los picos estudiando por cromatografía iónica ..	68
Tabla 13. Diseño experimental empleado	69
Tabla 14. Resumen del análisis estadístico de los resultados del experimento.....	70
Tabla 15. Análisis de varianza individual.....	72
Tabla 16. Resultados obtenidos bajos las mejores condiciones de análisis	79
Tabla 17. Repetibilidad de los tiempos de retención	80
Tabla 18. Análisis de regresión para los aniones	81
Tabla 19. Parámetros de validación para cada anión estudiado	84
Tabla 20. Resultados de las precisiones intradiarias e interdiarias	85
Tabla 21. Porcentajes de recuperación en los niveles de dopaje empleados.....	87
Tabla 22. Ensayos de degradación de cianuro y tiocianato	95
Tabla 23. Degradación de especies cianuradas.....	101
Tabla 24. Características microscópicas y macroscópicas de cada aislado.....	104
Tabla 25. Resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas.....	107
Tabla 26. Similitud de las secuencias de ADN con las bases de datos	108
Tabla 27. Diseño experimental para la degradación de cianuro	110
Tabla 28. Resumen del análisis anova de los resultados del experimento.....	111
Tabla 29. Análisis de varianza para el porcentaje de remoción de cianuro	112
Tabla 30. Optimización del método y validación del modelo	115
Tabla 31. Degradación de cianuro en diferentes días	116
Tabla 32. Diseño experimental para la degradación de tiocianato	118
Tabla 33. Resumen del análisis anova de los resultados	118
Tabla 35. Análisis de varianza para la remoción de tiocianato	119
Tabla 36. Optimización del método y resultados experimentales obtenidos.....	122
Tabla 37. Degradación de tiocianato en diferentes días.....	123
Tabla 38. Seguimiento de la reacción en el reactor para cianuro.....	126
Tabla 39. Seguimiento de la reacción en el reactor para tiocianato	128

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Término
β_1	Pendiente de la curva de calibración
°C	Grado centígrado
Å	Angstrom
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANLA	Autoridad Nacional de Licencias Ambientales
ATCC	American Type Culture Collection
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CcO	Citocromo c oxidasa
CV	Coeficiente de variación
DQO	Demanda química de oxígeno
F	Forward
IC	Cromatografía iónica
kPa	Kilopascales
LOD	El límite de detección
LOQ	El límite de cuantificación
mA	Miliamperios
mM	Milimolar
Moz	Mega onza
nm	Nanómetro
ppm	Partes por millón
PVC	Polyvinyl Chloride
R	Reverse
rpm	Revoluciones por minuto
S	Spike
Sa	Desviación estándar del intercepto
SAD	Cianuro disociable en ácido fuerte
Sb	Desviación estándar de la pendiente
S _c	Sensibilidad de calibrado
t _r	Tiempo de retención
TSI	Triple Sugar Iron agar
TSB	Caldo Soja Trypticaseína
USEPA	Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos
UV-Vis	Ultra violeta visible
v/v	Volumen a volumen
VIF	Variance Inflation Factor
WAD	Cianuro disociable en ácido débil
Y	Sensibilidad analítica
µL	Microlitros

Resumen

El proceso de lixiviación en la minería del oro produce efluentes con alta carga de compuestos cianurados que son perjudiciales para el medio ambiente. Si bien existen varios tratamientos para las aguas residuales de origen minero, muchos de ellos generan subproductos dañinos y requieren de tecnología costosa y especializada para su aplicación.

Como alternativa, existen los tratamientos biológicos que pueden ser una opción para la eliminación de contaminantes de aguas cianuradas debido a su bajo costo, simplicidad, selectividad y ausencia de subproductos contaminantes. Dentro de los tratamientos biológicos, los biorreactores con microorganismos son una tecnología que asimila sustratos contaminantes como los compuestos cianurados, para metabolizarlos y excretar sustancias inocuas.

En este estudio se evaluó la capacidad degradadora de especies cianuradas, mediante cromatografía de intercambio iónico, a partir de un consorcio microbiano. Para cumplir este objetivo se desarrollaron 3 etapas.

Primero, se desarrolló y estandarizó un método de identificación y cuantificación de especies cianuradas, por cromatografía iónica con detector de conductividad. Segundo, se evaluó la degradación preliminar de cianuro y tiocianato, utilizando *Pseudomonas putida* ATCC 31483 y un consorcio microbiano aislado de la zona minera de Manizales. En tercer lugar, se evaluó preliminarmente la degradación de cianuro y tiocianato a escala de laboratorio y en un reactor en continuo, utilizando el consorcio microbiano.

Experimentalmente se logró obtener un método de cromatografía iónica preciso, selectivo, sensible y adecuado para el análisis de tiocianato, sulfato, nitrato, nitrito, fosfato y cloruro.

No se logró degradar cianuro ni tiocianato utilizando *Pseudomonas putida*. Sin embargo, se logró aislar un consorcio microbiano que degrado estos sustratos. Se identificaron 5 microorganismos degradadores los cuales fueron: *Raoultella terrigena*, *Rahnella aquatilis*, y tres cepas de *Pseudomonas veronii*. Al hacer un comparativo entre cada aislado y el consorcio microbiano frente a la degradación de cianuro y tiocianato se encontró que el este último tiene mejor porcentaje de remoción.

Utilizando el consorcio microbiano y optimizando el método a escala de laboratorio, se alcanzó una degradación del 85.71 % para cianuro y del 71.98 % para tiocianato. En el biorreactor continuo con lecho fijo, se obtuvo una degradación del 85.71 % para cianuro y del 45.36 % para tiocianato. Estos resultados sugieren que se encontraron microorganismos nativos de la zona minera de Manizales, con potencial degradador de especies cianuradas.

Palabras claves: Biorreactores, microorganismos degradadores, Cromatografía iónica, Compuestos cianurados

Abstract

The leaching process in gold mining generates effluents with a high concentration of cyanide compounds that are harmful to the environment. While various treatments exist for mining wastewater, many of them produce harmful byproducts and require expensive, specialized technology for implementation.

As an alternative, biological treatments may be an option for eliminating contaminants from cyanide-laden waters due to their low cost, simplicity, selectivity, and absence of contaminating byproducts. Among biological treatments, microbial bioreactors are a technology that assimilates contaminant substrates like cyanide compounds, metabolizing them and excreting harmless substances.

This study evaluated the degrading capacity of cyanide species through ion exchange chromatography using a microbial consortium. To achieve this objective, three stages were developed.

First, a method for the identification and quantification of cyanide species was developed and standardized using ion chromatography with conductivity detection. Second, the preliminary degradation of cyanide and thiocyanate was evaluated using *Pseudomonas putida* ATCC 31483 and a microbial consortium isolated from Manizales's mining area. Third, the degradation of cyanide and thiocyanate was preliminarily assessed on a laboratory scale in a continuous reactor using the microbial consortium.

Experimentally, a precise, selective, sensitive, and suitable ion chromatography method was developed for the analysis of thiocyanate, sulfate, nitrate, nitrite, phosphate, and chloride.

Cyanide and thiocyanate degradation using *Pseudomonas putida* was not achieved. However, a microbial consortium capable of degrading these substrates was isolated. Five degrading microorganisms were identified: *Raoultella terrigena*, *Rahnella aquatilis*, and three strains of *Pseudomonas veronii*. When comparing each isolate and the microbial consortium for cyanide and thiocyanate degradation, the latter showed a higher removal percentage.

Using the microbial consortium and optimizing the method on a laboratory scale, degradation reached 85.71% for cyanide and 71.98% for thiocyanate. In the continuous fixed-bed bioreactor, degradation was 85.71% for cyanide and 45.36% for thiocyanate. These results suggest that microbial consortium has potential to degrade cyanide species.

Keywords: Bioreactors, degrading microorganisms, Ion chromatography, Cyanide compounds

Introducción

La extracción minera es una actividad importante a nivel mundial debido a su aporte en el desarrollo económico de muchos países [1]. Son varios los minerales que se pueden extraer de la corteza terrestre [2], pero la minería del oro es una de las más importantes y aplicadas por su alto valor comercial [3].

En Colombia la actividad minera puede ser clasificada en tres bloques principales [4]. El primero, como una actividad minera formal, tecnificada y de gran escala; el segundo, como una actividad minera a pequeña escala sometidas a las regulaciones nacionales y un tercer bloque que se desarrolla de manera tradicional y artesanal [5], con carencia de tecnología adecuada para realizar el proceso de extracción de minerales que en muchos casos se realiza en la informalidad, lo que la convierte en una actividad no rentable e insegura [6]. Las tres modalidades mencionadas tienen algo en común y es el uso de sustancias químicas contaminantes como el cianuro que causan daños medioambientales [7].

Existen varios procesos para la extracción de oro siendo la lixiviación con cianuro una de las más usadas por ser económica y fácil de realizar [8]. El cianuro (CN^-) es el compuesto lixivante más utilizado en la industria metalúrgica de metales preciosos [9]. Se utiliza con frecuencia en la extracción de oro debido a su gran afinidad con este elemento [10], no obstante, el cianuro puede afectar a los seres vivos por medio de la ingesta, inhalación o contacto, desarrollando efectos neurotóxicos graves y mortales [11].

La toxicidad del cianuro se debe a que este se adhiere al citocromo *c* en las células animales y vegetales, inhibiendo la cadena de transporte de electrones y por ende la respiración celular [12]. Por otra parte, el tiocianato que es un subproducto de la cianuración del oro tiene una dosis letal mínima de 500 mg de NaSCN (tiocianato de sodio) por cada kg de peso corporal para todas las especies animales [13]. Este compuesto inhibe varios sistemas enzimáticos particularmente a las ATPasas al unirse a su ion Mg^{2+} [13].

Debido a los efectos negativos de los compuestos cianurados, se han desarrollado tratamientos para los efluentes mineros, en donde son usados compuestos o sustancias

con alto poder oxidante, que implican costos de inversión y de operación altos [14]. Sumado a esto, se generan subproductos con impacto negativo sobre los ecosistemas [15,16].

Es por estas razones que se plantea la búsqueda de procesos amigables con el medio ambiente y a bajo costo, alternativa que ofrecen los sistemas de tratamiento biológicos [17].

Los sistemas de tratamiento biológico han tomado importancia por sus aplicaciones, costos, selectividad y por causar menos impacto al medio ambiente [18]. Uno de estos sistemas es el uso del metabolismo de microorganismos, para eliminar sustratos contaminantes como los son las especies cianuradas resultantes de la lixiviación de cianuro [19].

Muchos autores han documentado la capacidad de algunos microorganismos para tolerar medios con concentraciones elevadas de especies cianuradas y usar estos compuestos como fuente de carbono y nitrógeno en sus metabolismos [20–22]. Los microorganismos usados en estos procesos son generalmente aislados de efluentes de la industria minera, arenas residuales de esta misma industria, tubérculos, entre otros [23–25].

Entre los microorganismos que degradan especies cianuradas están: *Streptococcus* sp. [26], *Pseudomonas fluorescens* [27,28], *Pseudomonas alcalofilas* [14], *Pseudomonas pseudoalcaligenes* [29], *Pseudomonas putida*, *Klebsiella* sp [30,31].

En este trabajo se empleó agua sintética enriquecida con cianuro y tiocianato para evaluar la degradación de estos sustratos mediante una cepa de *Pseudomonas putida* ATCC 31483. Debido a que no se logró degradar estas especies cianuradas, se optó por aislar un consorcio de microorganismos en las aguas residuales de la industria minera de Maltería en Manizales, y evaluar la degradación preliminar de cianuro y tiocianato.

Se evaluó la degradación de estos compuestos usando el sedimento obtenido en la zona de muestreo, este se adicionó en medios líquidos que contenían nutrientes esenciales para el crecimiento microbiano, cada medio se enriqueció con 100 ppm de cianuro y 200 ppm de tiocianato, se obtuvieron porcentajes de remoción del 69 % y del 58 % respectivamente.

Se encontró un consorcio de microorganismos degradador de especies cianuradas, a partir de este se procedió a realizar el aislamiento, purificación e identificación de los microorganismos involucrados en la degradación de estos compuestos, se aislaron 5 cepas bacterianas, pertenecientes a 3 géneros diferentes de *Pseudomonas veronii*, una de *Raoultella terrigena* y una de *Rahnella aquatilis*.

Estas cepas fueron identificadas molecularmente por el método Sanger [32] y clasificados de acuerdo con su secuencia de ADNr 16S por análisis BLAST [33,34]. Al realizar ensayos en la degradación de especies cianuradas individualmente por cada morfotipo, se encontró que su capacidad degradadora disminuye sustancialmente, llegando en el mejor de los casos a 42.85 % de degradación de cianuro y de 44.90 % de tiocianato.

Se optimizó el proceso de degradación de cianuro y tiocianato a escala de laboratorio mediante diseños experimentales factoriales con modelo cuadrático, se encontró la máxima degradación para cianuro correspondiente a 85.71 % y 71.98 % para tiocianato.

Teniendo en cuenta los resultados y que el método desarrollado presenta bajos costos de implementación, se puede diseñar un sistema a gran escala, que permita minimizar la carga de especies cianuradas en los efluentes de minería del oro, tanto para grandes empresas como para pequeños mineros.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar la capacidad degradadora de especies cianuradas, mediante cromatografía de intercambio iónico, a partir de un consorcio microbiano aislado de la zona minera de Maltería en Manizales, Caldas.

Objetivos específicos

- Estandarizar las condiciones cromatográficas para la cuantificación de especies cianuradas por cromatografía de intercambio iónico con detector de conductividad.
- Aislar e identificar un consorcio de microorganismos con potencial degradador de especies cianuradas.
- Evaluar preliminarmente a escala de laboratorio la capacidad degradadora de especies cianuradas por un consorcio microbiano.

1. Capítulo I - Marco teórico

1.1 El oro en Colombia.

El oro ha formado parte de la vida humana desde los orígenes de la civilización, y en la mayoría de las culturas se ha considerado un símbolo de riqueza y poder. La purificación del oro y la elaboración de aleaciones han sido técnicas conocidas desde la antigüedad (2100-1200 a.C.). En el siglo I d.C, gracias a los avances técnicos del imperio Romano se produjo la primera fiebre del oro del mundo en Las Médulas, región española. La explotación minera fue tan intensa que el paisaje de la zona quedó transformado de forma irreversible [35].

La época colonial en América del Sur trajo una expansión de la minería de oro, plata y otros metales. En Colombia la exploración minera comenzó a mediados de la década de 1530, la minería estaba bien establecida en la región del Alto Cauca, y para 1547 los españoles ya tenían conocimiento de yacimientos ricos de oro ubicados 600 km aguas arriba del río Cauca [36]. A medida que se fueron descubriendo los yacimientos, estos fueron intensamente explotados y agotados. Para mejorar el rendimiento de la extracción del metal precioso, se introdujeron varias técnicas incluyendo procesos peligrosos como la amalgamación de mercurio, que se practica en la actualidad [37].

Los yacimientos de oro más importantes se concentran entre las Cordilleras Occidental y Central, en la cuenca hidrográfica del río Cauca, el alto valle del Magdalena, entre el Centro y Cordillera Oriental, y las tierras bajas de la costa del Pacífico [36]. Los departamentos de Antioquia y Chocó, ha arrojado las mayores producciones de oro en los últimos 10 años, con alrededor del 40 % y 25 % de la producción nacional total respectivamente [38].

El hecho de que el 20 % de los municipios colombianos tengan yacimientos de oro ha llamado la atención de empresas nacionales e internacionales. Se prevé que la producción de oro en Colombia aumente de 1.8 Moz en 2018 a 2.3 Moz para 2027, con un crecimiento anual promedio de 2.4 %. Las reservas del país y los bajos costos operativos aseguran la continuación de los proyectos de extracción de oro en los próximos años, asegurando que

el sector aurífero seguirá siendo el segundo sector minero más grande del país [37]. La Tabla 1 muestra los proyectos de minería en Colombia.

Tabla 1. Proyectos de minería de oro en Colombia. Adaptado de Betancur *et al.* 2018 [37].

Compañía	País	Nombre de la mina	Localización de la mina	Recursos
AngloGold Ashanti	Sur África	La Colosa	Cajamarca, Tolima	28.5 Moz
Continental Gold Ltd	Canadá	Burítica	Buriticá, Antioquia	Reservas: 0.5 Moz; Vida de la mina: 14 años; Producción estimada: 253 koz/año
Metminco Ltd.	Australia	Miraflores	Quinchía, Risaralda	Producción estimada: 45 koz/año; Vida de la mina: 9.5 años; Reservas probadas: 0.1 Moz
GoldMining Inc	Canadá	Titiribi	Titiribí, Antioquia	Recursos medidos e indicados: 4.6 Moz
Cordoba Minerals	Canadá	San Matias	Montelíbano, Córdoba	Recursos inferidos: 2.4 Moz
AngloGold Ashanti	Sur África	Gramalote	San Roque, Antioquia	Recursos: 3.5 Moz; Vida de la mina: 13 años; Producción estimada: 350 koz/año
GoldMining Inc	Canada	La Mina	Venecia and Fredonia, Antioquia	Recursos: 0.7 Moz
AngloGold Ashanti (92.72%) B2Gold (7.28 %)	South Africa/Canada	Quebradona	Jericó, Antioquia	Recursos: 5.6 Moz

Actualmente, el sector de la minería aurífera en Colombia está conformado por tres subsectores principales: la minería formal a gran escala, la minería a pequeña escala, y la minería artesanal [39].

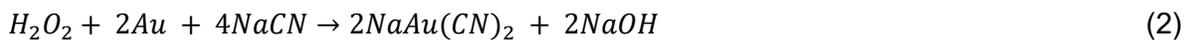
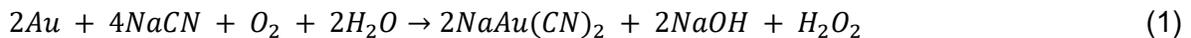
La minería artesanal se refiere al lavado en los ríos para separar los granos de oro de la arena, o al uso de picos para extraer la tierra con oro. La minería a pequeña escala involucra más maquinaria y afecta áreas más grandes. La minería a gran escala emplea métodos de explotación más diseñados [37].

Para la extracción del oro, comúnmente se usan sustancias contaminantes como el mercurio y cianuro. La percepción común de las comunidades afectadas es que la expansión de la minería aurífera genera competencia por la tierra y el agua, contaminación con cianuro y metales pesados, desplazamiento de las comunidades y pérdida de oportunidades de subsistencia para los agricultores [39].

1.2 Cianuración.

Los minerales de oro y plata no se encuentran puros en la corteza terrestre, en la mayoría de los casos se encuentran asociados a diferentes minerales sulfurosos tales como pirita, galena, blenda, entre otros [40]. La extracción de oro requiere procesos como la cianuración que es ampliamente usado por su bajo costo y estabilidad operativa [41].

La cianuración consiste en utilizar oxígeno como oxidante y el ion CN^- como agente complejante, para lograr que el oro se disuelva en una solución acuosa diluida de cianuro de sodio o de potasio, este proceso se conoce como lixiviación [42]. Piervandi *et al.* sugiere que este mecanismo procede a través de dos pasos formando peróxido de hidrógeno como intermediario. Las reacciones se muestran a continuación [43]:



La Figura 1 muestra la geometría del compuesto $\text{Au}(\text{CN})_2^-$. Es una estructura lineal con ligandos $-\text{CN}$ en cada lado del átomo de oro.

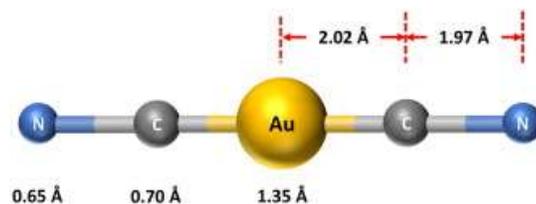


Figura 1. Estructura del complejo cianurado de oro. Tomado de Xia *et al.* 2022 [44]

El complejo cianurado de oro es reducido por zinc metálico, logrando que precipite y se forme cianuro de zinc en solución. La precipitación del oro ocurre de acuerdo con la reacción 3 [42].



El proceso de lixiviación con cianuro se observa en operaciones artesanales en países en vías de desarrollo, principalmente en Colombia, Perú y Ecuador [45,46]. Esta técnica de extracción requiere inversión para implementarlo y habilidades de supervisión e ingeniería para operar correctamente. Algunos mineros no poseen estos recursos razón por la cual tienen rendimientos que no superan el 80 % de recuperación de oro y generan efluentes químicos que descargan al medio ambiente [42,47].

La aplicabilidad de la cianuración está limitada por la mineralización del oro, ya que los sulfuros que rodean las partículas de este metal actúan como cianicidas. Esto resulta en la formación de tiocianato (SCN^-) reduciendo los niveles de cianuro. En consecuencia, se obliga a aumentar la cantidad de lixiviante para favorecer la cinética de disolución del oro.[43]

La Figura 2 muestra un esquema general de la extracción del oro, su proceso de lixiviación, precipitación y fundición.



Figura 2. Esquema del proceso de lixiviación del oro. Adaptado de Botz *et al.* 2016 [18].

1.3 Cianuro.

El termino cianuro se utiliza para designar a un compuesto inorgánico con carga negativa, que tienen un átomo de nitrógeno y carbono unidos por triple enlace [48]. Los cianuros se refieren a las sales del anión CN^- , y pueden estar presentes en el medio ambiente en una variedad de formas, incluyendo sales como cianuro de sodio ($NaCN$) o cianuro de potasio

(KCN), y varios complejos de cianuro entre los cuales destacan cianuro de zinc ($\text{Zn}(\text{CN})_2$) y ferricianuro de potasio ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) [17,49].

El cianuro de hidrogeno (HCN) molecular, tiene una presión de vapor alta: 81.7 kPa a 25 °C. Como consecuencia, se volatiliza a partir de soluciones acuosas. Para minimizar la pérdida de cianuro a la atmósfera, las soluciones de lixiviación se mantienen alcalinas, por lo general con un pH de 10 o superior, de modo que se prefiera el CN^- no volátil al HCN volátil [50].

Los cianuros no se adsorben ni retienen fuertemente en los suelos, por lo que permanecen en la fase acuosa y a menudo, forman complejos con otros contaminantes metálicos como Fe, Cu, Ni y Zn [51]. Aunque el KCN y el NaCN se disocian fácilmente para formar CN^- y HCN a pH neutro, los complejos metálicos de cianuro tienen una amplia gama de estabilidades químicas y biológicas, los cuales se clasifican según la fuerza de su enlace [52].

Los complejos más comunes contienen hierro férrico ($\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$), hierro ferroso ($\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$) o cobre (predominantemente $\text{Cu}(\text{CN})_3^-$) [50]. En la Tabla 2 se muestran los compuestos cianurados que se pueden formar con su toxicidad relativa.

Tabla 2. Especies de cianuradas que se pueden encontrar en soluciones de lixiviación y sus efluentes de desecho. Adaptado de Johnson 2015 [50].

Grupo	Especie	Toxicidad intrínseca
Cianuro libre	CN^-	Alta
	HCN_{aq}	
Complejos débiles	$\text{Zn}(\text{CN})_4^{2-}$	Intermedia
	$\text{Ag}(\text{CN})_2^-$	
	$\text{Cd}(\text{CN})_4^{2-}$	
	$\text{Ni}(\text{CN})_4^{2-}$	
	$\text{Cu}(\text{CN})_3^{2-}$	
	$\text{Cr}(\text{CN})_6^{3-}$	
Complejos fuertes	$\text{Mn}(\text{CN})_6^{3-}$	Baja
	$\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$	
	$\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$	
	$\text{Co}(\text{CN})_6^{4-}$	
Especies relacionadas con el cianuro	$\text{Au}(\text{CN})_2^-$	Alta
	CNO^-	
	SCN^-	
	C_2N_2	
	CNCl	Alta

Los complejos cianometálicos se clasifican como débiles o fuertes por la tendencia a descomponerse en condiciones ácidas. El cianuro disociable en ácido débil (WAD), se disocia bajo reflujo con un ácido débil a pH 4 [53]. Por otro lado, el cianuro disociable en ácido fuerte (SAD) resiste el ataque de un ácido débil, pero se disocia en presencia de un ácido fuerte bajo pH 2 [53,54].

Los aniones relacionados con el cianuro también se pueden formar durante los procesos de lixiviación. El cianato (CNO^-) se forma por oxidación del cianuro, y el tiocianato (SCN^-) se produce por la reacción del cianuro con los minerales sulfurosos [50].

El cianógeno (C_2N_2) y cloruro de cianógeno (CNCl), pueden formarse si las aguas residuales de la lixiviación con cianuro han sido tratadas por cloración alcalina, o donde el pH del medio ha disminuido en presencia de minerales de cobre. Sin embargo, es difícil evaluar el comportamiento de estas especies por la ausencia de datos analíticos publicados [50,55,56].

En las aguas residuales que contienen compuestos cianurados generados por el procesamiento de oro, la concentración de estas especies varía de 50 a 500 ppm, y algunas muestras pueden superar este nivel [57]. Según Chegani *et al.*, la concentración máxima de cianuro disociable en ácido débil (WAD) en el agua, que podría considerarse inofensivo para la vida silvestre, es de 50 ppm [58]. Por otro lado, el límite máximo de concentración de cianuro total establecido por la USEPA (Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos) en aguas residuales es de 0,2 ppm [59].

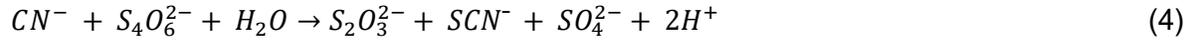
1.4 Tiocianato

El anión tiocianato puede formar compuestos covalentes con una amplia gama de especies. Su estructura de Lewis es lineal con un átomo de carbono ubicado en el centro, y tiene dos estructuras electrónicas: S-tiocianato, SCN^- y N-tiocianato, NCS^- (isotiocianato), que se muestran en la Figura 3 [60]. En consecuencia, la existencia de dos átomos donantes diferentes en el tiocianato da como resultado la coordinación con los metales por el átomo de S o N; por lo que a menudo se lo denomina ligando ambidentado. El tiocianato alterna fácilmente entre sus dos estructuras de resonancia [61].



Figura 3. Estructuras resonantes tiocianato, Adaptado de Azizitorghabeh *et al.* 2021 [60].

El tiocianato es un contaminante común en las aguas residuales de la minería de oro. Las principales reacciones químicas que ocurren en sistemas acuosos de cianuro-azufre a 25 °C durante la lixiviación de oro son las siguientes [62]:



El cianuro reacciona cuantitativamente con tetracionato en solución acuosa, produciendo tiosulfato, tiocianato y sulfato. Politionatos con más átomos de azufre reaccionan con el cianuro, si este se encuentra en exceso estequiométrico [62].



El ion cianuro reacciona con el tiosulfato formando tiocianato y sulfito como se muestra en la reacción 7. De igual manera, puede reaccionar con azufre y polisulfuro para formar tiocianato según lo mostrado en la reacción 8 [62].

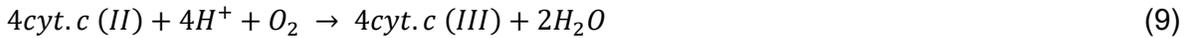
El tiocianato es más estable, resistente a la hidrólisis y menos degradable en comparación con el cianuro [63,64]. También actúa como un inhibidor no competitivo para bloquear una variedad de reacciones enzimáticas en los seres vivos [65].

Se ha reportado que la oxidación incompleta del tiocianato puede resultar en la producción de cianuro [66]; por lo tanto, la concentración de tiocianato en las aguas residuales debe reducirse a un rango ambientalmente aceptable antes de la descarga al medio ambiente (<4 ppm) [67]. Cuando la concentración de tiocianato alcanza los 200~1000 ppm, la demanda química de oxígeno (DQO) y el nitrógeno amoniacal se ven afectados negativamente [68].

Aunque la toxicidad del tiocianato es 7 veces menor que la del cianuro, puede causar un gran daño al medio ambiente y a los humanos cuando su concentración supera un cierto rango. Por lo tanto, la descarga de aguas residuales sin tratar al medio ambiente puede causar serios problemas en los ecosistemas [69].

1.5 Toxicidad de los compuestos cianurados.

Existen diferentes formas de cianuro como se mostró en las anteriores secciones, y no todas tienen la misma toxicidad [70]. El cianuro puede formar un complejo estable con el citocromo *c* oxidasa (CcO), el cual es responsable de casi toda la respiración aeróbica en la tierra. CcO es la enzima terminal en la cadena respiratoria mitocondrial en mamíferos y muchas bacterias aeróbicas, y cataliza la reducción de oxígeno molecular a agua a través de la siguiente reacción general [71]:



El gradiente electroquímico creado por esta acción se utiliza en la producción de ATP, que puede utilizarse en una amplia variedad de procesos celulares constructivos [72]. El cianuro es un potente inhibidor de CcO porque bloquea la función nativa de la oxidasa, la cual es la reducción del oxígeno molecular. Trabajos previos sugieren que la unión del cianuro a la oxidasa tiene una estequiometría 1:1 [71]. La Tabla 3 muestra algunos experimentos de la ecotoxicidad de algunas especies cianuradas en organismos acuáticos y microalgas [73].

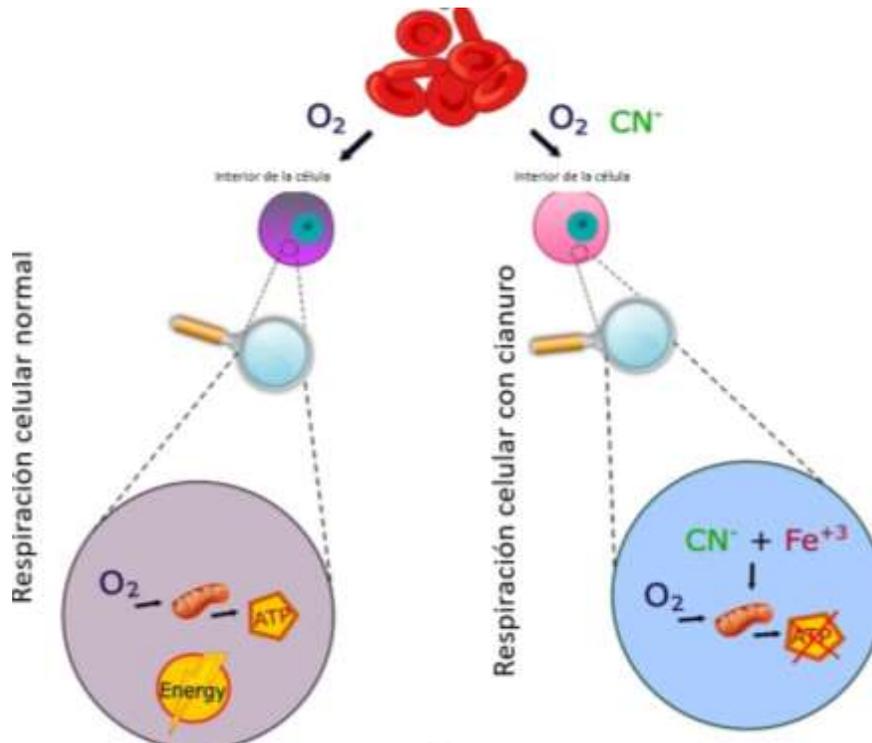


Figura 4. Inhibición de la respiración celular por cianuro. Adaptado de Maciel *et al.* 2023 [74].

Tabla 3. Ecotoxicidad en peces, invertebrados y microalgas, a especies cianuradas expresada como CN⁻, intervalo de confianza (CI) del 95 %. Tomado de Manar *et al.* 2011 [73].

Organismo	Compuesto ensayado	Tiempo de exposición	Efecto	Concentración µg CN/L (CI)
Peces				
<i>Acanthopagrus butcheri</i> ^a	NaCN	96 h	Supervivencia	70 (67–73)
	K ₃ Fe(CN) ₆	96 h	Supervivencia	1730
	K ₄ Fe(CN) ₆	96 h	Supervivencia	20,500
<i>Carassius auratus</i>	NaCN	96 h	Supervivencia	318
<i>Lepomis macrochirus</i>	NaCN	48 h	Supervivencia	134
<i>Lepomis macrochirus</i>	HCN	289 d	Producción de huevos	<5
		42 d	Supervivencia de alevines	15
<i>Macquaria novemaculeata</i>	NaCN	96 h	Supervivencia	109 (107–112)
	K ₃ Fe(CN) ₆	96 h	Supervivencia	2830
	K ₄ Fe(CN) ₆	96 h	Supervivencia	285,000 (218,000–372,000)
<i>Pimephales promelas</i>	NaCN	8 d	Supervivencia	114
<i>Pimephales promelas</i>	HCN	256 d	Reproducción	12.9–19.6
<i>Salvelinus fontinalis</i>	HCN	144 d	Reproducción	5.7–11.2
Invertebrados				
<i>Asellus communis</i>	HCN	112 d	Crecimiento	29–40
			Reproducción	29–40
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	KCN	7 d	Reproducción	98 (83–111)
				42 (18–52.4)
	K ₃ Fe(CN) ₆	7 d	Reproducción	194 (181–208)
				137 (111–161)
	K ₄ Fe(CN) ₆	7 d	Reproducción	216 (189–244)
				61 (40–114)
<i>Chlamys asperrimus</i> ^a	NaCN	48 h	Supervivencia	28.6 (27.7–29.5)
	K ₃ Fe(CN) ₆	48 h	Supervivencia	128 (123–134)
	K ₄ Fe(CN) ₆	48 h	Supervivencia	686 (649–726)
<i>Cyclops viridis</i>	NaCN	96 h	Supervivencia	158
<i>Daphnia magna</i>	NaCN	96 h	Supervivencia	90
<i>Gammarus fasciatus</i>	NaCN	96 h	Supervivencia	900
<i>Gammarus pseudolimnaeus</i>	HCN	83 d	Crecimiento	21–32
			Reproducción	16–21
Algas				
<i>Nitzschia closterium</i> ^a	NaCN	72 h	Crecimiento de población	57 (51–61)
				10
	K ₃ Fe(CN) ₆	72 h	Crecimiento de población	127 (113–142)
				31–62
	K ₄ Fe(CN) ₆	72 h	Crecimiento de población	267 (238–301)
				31–62
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	KCN	72 h	Crecimiento de población	116 (112–125)
				55 (28–71)
				133 (91–141)

La toxicidad del cianuro en el humano se debe a su capacidad para inhibir el transporte de oxígeno, ya que este se une a la proteína hemoglobina en los glóbulos rojos, formando ciano-metahemoglobina. Esto impide el transporte de oxígeno a los tejidos del cuerpo, causando dificultad para respirar, dolor de cabeza, debilidad, náuseas, vómitos, convulsiones y pérdida de conciencia. Los efectos tóxicos del cianuro pueden ser agudos o crónicos, dependiendo de la exposición y en casos graves puede ser fatal [75].

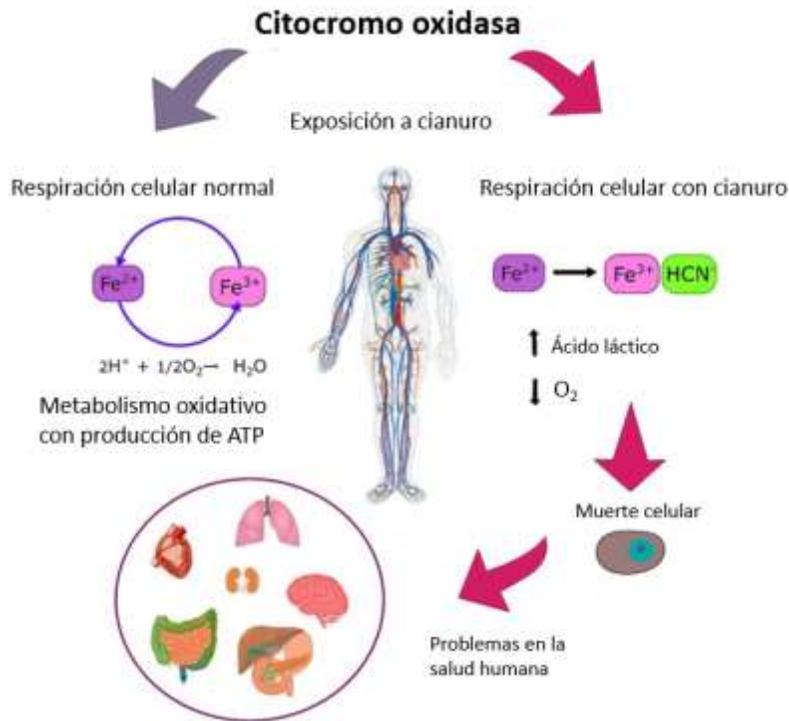


Figura 5. Esquema del impacto del cianuro en el cuerpo humano. Adaptado de Maciel et al. 2023 [74].

La toxicidad del tiocianato es en una dosis letal mínima de 500 mg de NaSCN kg^{-1} de peso corporal para todas las especies animales. El tiocianato inhibe varios sistemas enzimáticos particularmente a las ATPasas al unirse a su ion Mg^{2+} [13].

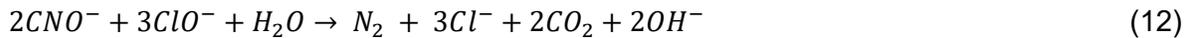
Estudios en trucha muestran toxicidad aguda del tiocianato entre 177 y 264 ppm, a las 96 h de exposición [76]. Los huevos de trucha arcoíris expuestos a KSCN y NaSCN en concentraciones por debajo de 1000 ppm, durante 3 h, no mostraron ningún efecto sobre el éxito de la fertilización o la mortalidad; sin embargo, se observó un aumento en las deformidades de los peces en todas las concentraciones evaluadas [77].

La sobrecarga de exposición a SCN^- podría resultar en una reducción en el crecimiento de la biomasa, la eficiencia del uso del agua, contenido total de clorofila y actividades enzimáticas de algunas las plantas [65].

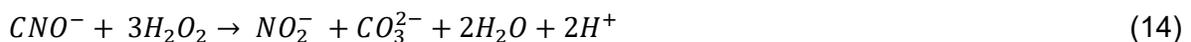
1.6 Métodos de tratamiento de compuestos cianuro

Debido a los efectos negativos de los compuestos cianurados en el medio ambiente, se han desarrollado muchos métodos para descomponerlos y minimizar su capacidad toxica, a continuación, se muestra algunos [40]:

Cloración alcalina: Se lleva a cabo utilizando oxidantes como el hipoclorito de sodio y el cloro líquido. Las reacciones de la cloración alcalina se dividen en dos etapas, en la primera, el CN^- se oxida a CNO^- a un pH de más de 10. Luego, el CNO^- se oxida a N_2 y CO_2 a un pH de 7.5–8.0. Las reacciones entre los cianuros y el hipoclorito se muestran en las ecuaciones a continuación [78]:



Oxidación con peróxido de hidrógeno: Se realiza utilizando H_2O_2 como oxidante fuerte. Se reporta que la adición de 2,5 ml L^{-1} de peróxido de hidrogeno al 30 %, eliminó aproximadamente el 90 % de los cianuros de efluentes mineros, las reacciones se muestran a continuación [79,80]:



Oxidación con $Na_2S_2O_5$ -aire: En este método el $S_2O_5^{2-}$ se usa como fuente de SO_2 . Se utiliza una mezcla de $Na_2S_2O_5$ de 4,0 g L^{-1} y aire en presencia de iones de cobre como catalizador, a un pH de 8–10, con agitación fuerte durante 2.5 h, para oxidar selectivamente las especies de cianuro libres y complejas. A continuación, se muestra la reacción involucrada [81]:



Hidrólisis en autoclave: Los cianuros se hidrolizarían en formiato y amoníaco en condiciones alcalinas con altas temperaturas y presión. Se reporta el tratamiento de aguas cianuradas con concentración de 300–400 ppm, a un pH de 7–9 y 170–190 °C durante 12 h, bajo estas condiciones se eliminó más del 99 % de los cianuros presentes [80].

Adsorción: Es un método que utiliza materiales adsorbentes para eliminar el cianuro del agua. Es eficaz en altas concentraciones de cianuro y requiere bajos niveles de pH, sin embargo, el material adsorbente debe ser regenerado o reemplazado con regularidad y puede ser costoso [82].

Biorremediación: Utilizan plantas o microorganismos específicos para degradar los compuestos cianurados en compuestos no tóxicos. Es un método económico y ambientalmente amigable, pero puede ser limitado por la disponibilidad de microorganismos adecuados y las condiciones ambientales.

Los métodos biológicos con el pasar del tiempo han adquirido más fuerza en el tratamiento de contaminantes hídricos, los microorganismos tienen un protagonismo especial por su alta especificidad y por las grandes cantidades de sustratos que pueden metabolizar [49,83]. La Tabla 4 muestra un resumen de algunas técnicas para el tratamiento de aguas cianuradas.

Tabla 4. Características destacadas de varias tecnologías de eliminación de cianuro. Adaptado de Dash *et al.* 2009 [49].

Métodos de eliminación	Ventajas	Desventajas	¿Tratamiento adicional?	Remueve			
				CN ⁻	SC N ⁻	WAD	SAD
Biodegradación	Enfoque natural, bien recibido por los reguladores Alcanza grandes volúmenes de muestra a tratar Relativamente barato La biomasa se activa por aireación No se necesita equipo de manipulación costoso	La tecnología no está bien establecida Requiere una combinación de metalurgia, biología e ingeniería de procesos Muy específico con el tipo de sustrato a tratar. No puede tratar altas concentraciones	No	Si	Si	Si	Si
Cloración alcalina	Tecnología bien establecida El cianato es relativamente menos tóxico y se oxida aún más a carbono Produce dióxido de carbono y nitrógeno Eliminar metales a través de la precipitación a pH elevado	Añade cationes/aniones potencialmente contaminantes El exceso de hipoclorito es tóxico El cloro puede reaccionar con compuestos orgánicos para formar compuestos clorados Un control deficiente del proceso da como resultados intermediarios tóxicos	Si	Si	Si	Si	No
Peróxido de hidrógeno	El exceso de reactivo se descompone en agua y oxígeno Relativamente simple de operar No es tan reactivo con tiocianato	Reactivo costoso Si precipita ferrocianuros con cobre, debe eliminar el precipitado Requiere una medición precisa de la dosis química	Si	Si	No	Si	Si
SO ₂ /aire	El reactivo es muy barato Se utiliza en un amplio rango de pH Sirve para el tratamiento de soluciones acuosas y lodos residuales de minas de oro	Si precipita ferrocianuros con cobre, debe eliminar el precipitado El proceso agrega sulfatos al agua tratada	Si	Si	No	Si	Si
Hidrólisis/destilación	Metodología simple	Alta temperatura, presión y requerimientos de aire	Si	Si	No	No	No
Carbón activado	Método eficaz Utilizado como proceso final	Costoso Se utiliza sólo para bajas concentraciones de cianuro	Si	No	No	Si	Si

1.7 Biorremediación microbiana para el tratamiento de compuestos cianurados

La biorremediación de compuestos cianurados emplea microorganismos aerobios o anaerobios en reactores para degradar el cianuro en compuestos menos tóxicos [25]. Los organismos unicelulares pueden seguir diversos mecanismos de biorremediación debido a su alta especificidad por diferentes sustratos [84]. En la mayoría de los casos, la biodegradación de los compuestos de cianuro depende directamente de la disponibilidad de nutrientes y oxígeno, porque los mecanismos de degradación los consumen [85,86]

La biodegradación microbiana de compuestos cianurados se ve afectada por la presencia de contaminantes metálicos, ya que estos modifican la conformación activa de las enzimas, causando su ruptura [87]. Los metales también pueden inhibir directamente la función de las enzimas sin modificarlas, al adherirse directamente en su sitio activo. Las enzimas pueden degradar varios tipos de sustratos, pero algunos pueden ser más difíciles de asimilar [83]. La Figura 6 muestra las rutas metabólicas que se pueden presentar.

Algunos microorganismos desarrollan la habilidad de degradar nitrilos y cianuros en ambientes contaminados. En la biodegradación del cianuro en condiciones aeróbicas los microorganismos consumen HCN, generando cianato de hidrógeno (HCNO), para después transformarse en amoníaco y dióxido de carbono a través de hidrólisis. Como ruta alterna se tiene la acción de una dihidratasa, para formar ácido acético y amoníaco. Una enzima monohidratasa puede asimilar el cianuro para formar directamente formamida. [74].

Degradar tiocianato es un proceso complejo, los microorganismos como las bacterias y los hongos son capaces de degradar este sustrato mediante la reacción de una sulfotransferasa en presencia de agua, para liberar bisulfuro y formar cianato. Seguido por acción de una Cianasa se obtiene amonio, bicarbonato y sulfato. La velocidad y la eficacia de estos procesos varían significativamente entre diferentes especies de microorganismos dependiendo de las condiciones ambientales [88]. El mecanismo de la reacción descrita se muestra en las siguientes reacciones:



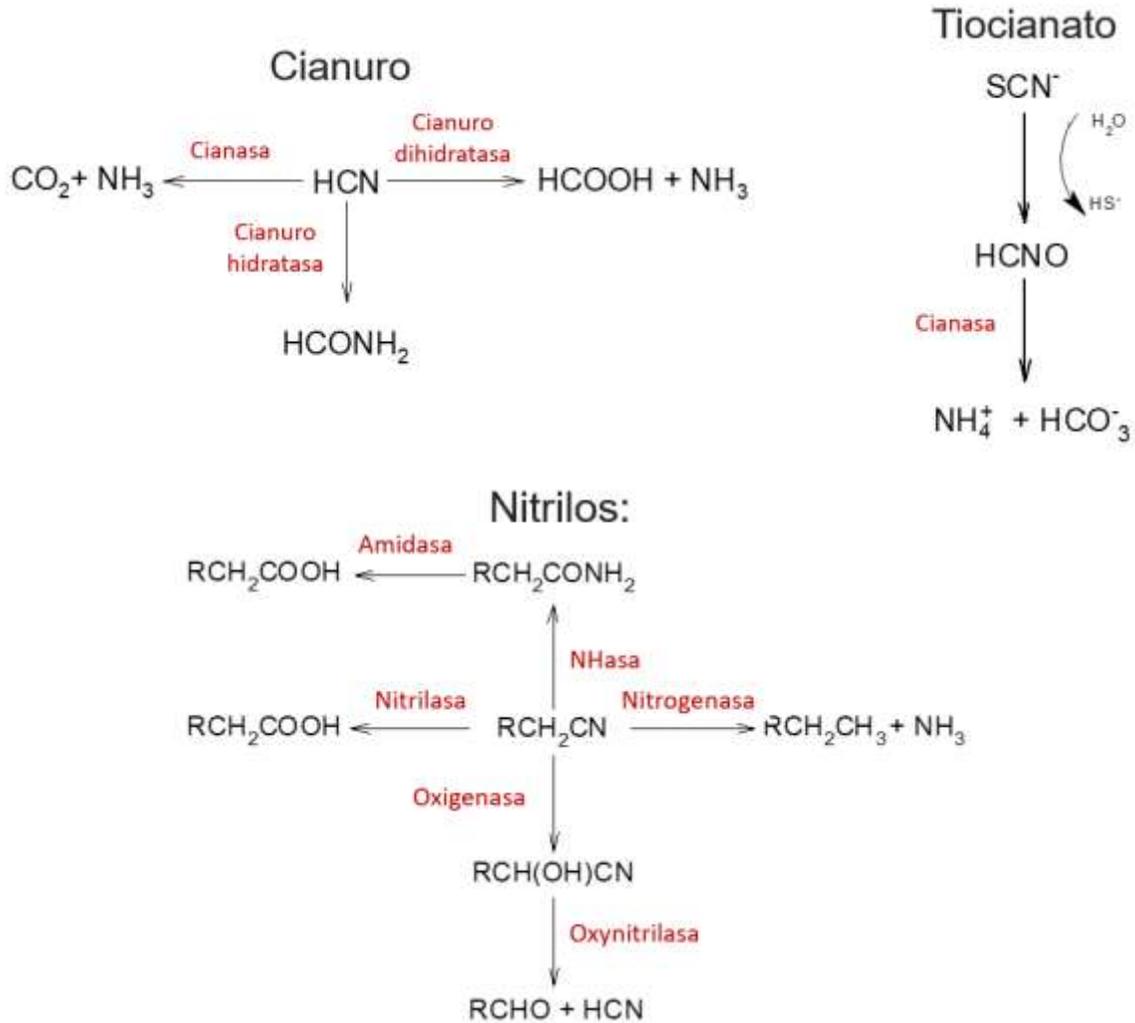


Figura 6. Esquema general de las rutas metabólicas en la degradación de cianuro, tiocianato y nitrilos por microorganismos. Adaptado de Maciel *et al.* 2023 [74]

En la Tabla 5 se presenta las rutas de degradación de cianuros por diversos tipos de microorganismos. En función de las enzimas específicas que posean, se pueden observar diferentes resultados en las reacciones de degradación. Estos resultados pueden incluir la formación de ácido fórmico, formamida o amoníaco como productos intermedios, que a su vez pueden transformarse en nitrito o nitrato [83,89,90].

Varios autores reportan tratamiento de especies cianuradas con microorganismos, la fuente de estos en su mayoría son efluentes cargados con contaminantes producidos en industrias. Por ejemplo, Razanamahandry *et al.* reportaron un estudio en el cual bacterias degradantes de cianuro aisladas de las aguas residuales mineras tuvieron rendimientos satisfactorios, con tasas de biodegradación de 2.114 g CN⁻ L⁻¹. Utilizando la reacción en

cadena de la polimerasa (PCR), y la identificación molecular se estableció que los microorganismos presentes eran *Pseudomonas* sp, *Acinetobacter* sp y *Proteus* sp [91].

Tabla 5. Ejemplos de microorganismos y sus vías de degradación de cianuros. Adaptado de Alvillo *et al.* 2021 [83].

Ruta de degradación	Microorganismo	Referencia
Hidrolítica		
		[83]
Cianuro hidratasa	Especies de hongos (<i>Fusarium</i> sp.) y bacterias (<i>Pseudomonas fluorescens</i>)	
Cianurasa	<i>Alcaligenes xylosooxidans</i> , <i>Alcaligenes xylosoxidans</i> , <i>Bacillus pumillus</i> , <i>Pseudomonas stutzeri</i> .	
Nitrilo hidratasa	<i>Pseudomonas (marginales, putida)</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Brevibacterium</i> ,	
Nitrilasa	<i>Rhodococcus rhodochrous</i> , <i>Pseudonocardia thermophila Klebsiella</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Nocardia Rhodococcus rhodochrous</i> , <i>Klebsiella ozaenae</i> , <i>Arthrobacter</i> sp., <i>Alcaligenes faecalis</i> , <i>Acinetobacter</i> sp., <i>Fusarium solani</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>Nocardia</i> sp.	
Oxidativa		
		[92]
Cianuro monooxigenasa	<i>Pseudomonas</i> sp.	
Cianasa	<i>Escherichia coli</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	
Cianuro dioxigenasa	<i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Pseudomonas cereus</i> , <i>Bacillus pumillus</i> , <i>Escherichia coli</i>	
Reductiva		
		[93]
Nitrogenasa	<i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Rhodopseudomonas gelatinosa</i> , <i>Streptomyces thermoautotrophicus</i> , <i>Herbaspirillum seropedicae</i> , <i>Azotobacter</i> sp., <i>Azospirillum</i> sp., <i>Rhodospirillum rubrum</i>	
Sustitución		
		[88,94]
Tiosulfato sulfurtransferasa (Rhodanasa)	<i>Azotobacter vinelandii</i> , <i>E. coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Ferrobacillus ferrooxidans</i> , <i>Thermobacillus denitrificans</i> , <i>Desulfotomaculum nitrificans</i> , <i>Fusarium</i> sp.	

En otro estudio Nwakoby *et al.* analizaron muestras de efluentes de sembrados de yuca, obteniendo una población microbiana de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus* sp, *Streptococcus* sp, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus* sp y *Candida* sp. Entre estos microorganismos, *Bacillus* sp. y *P. aeruginosa* tenían la capacidad de degradar el cianuro [95].

Vu *et al.* estudiaron varios factores, incluidos el pH, las concentraciones de SCN⁻, fosfato, amonio, y la concentración de carbono orgánico, para determinar sus efectos en la

biodegradación de SCN^- por bacterias. Los resultados mostraron que la biodegradación de SCN^- ocurrió en un rango de pH entre 7.0 y 7.5. A niveles menores de 220 ppm de SCN^- el grado de biodegradación fue mayor, mientras que a concentraciones mayores a 350 mg/L, la degradación fue sustancialmente menor. Este estudio demostró la importancia de usar glucosa en los medios de reacción para favorecer la degradación de los sustratos [96].

Por su parte Mekuto *et al.* usaron *Thiobacillus* sp. y *Serratia* sp. Para evaluar la biodegradación de tiocianato y cianuro libre en condiciones neutras y alcalinas. La reacción se realizó durante 7 días, con concentraciones de SCN^- entre 100–1000 ppm y CN^- entre 200–450 ppm, a temperatura ambiente (21–25 °C). Obtuvieron degradación de estos dos sustratos por encima del 80 %, excepto cuando los microorganismos sufrieron un impacto temporal por un aumento del pH. Los resultados demostraron el potencial degradador de estas bacterias para tratar aguas residuales cargadas de CN^- y SCN^- [97].

Guamán *et al.* evaluaron *Bacillus* sp en la degradación de cianuro presente en aguas residuales. Utilizaron un pH básico de 10.5, una temperatura de 20 °C y un inóculo del 1 %. Bajo estas condiciones el microorganismo logró una remoción del 97 % de un medio que contenía concentraciones iniciales de cianuro por encima de 50 ppm [98].

La Tabla 6 presenta una selección de microorganismos con capacidad de degradar cianuro. Se indica las respectivas concentraciones iniciales y finales de este sustrato, así como el porcentaje de degradación alcanzado.

Tabla 6. Porcentaje de biodegradación de cianuro por diferentes microorganismos.

Microorganismo	$[\text{CN}^-]_i$ (ppm)	$[\text{CN}^-]_f$ (ppm)	Remoción (%)	Referencia
<i>Pseudomonas parafulva</i>	200	12	94	[99]
<i>Bacillus</i> sp.	300	9	97	[100]
<i>Bacillus</i> sp., <i>Klebsiella</i> ,	250	7.5	97	[101]
<i>Bacterial consortia</i>	80	4	95	[102]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1352	38.98	97.1	[103]
<i>Escherichia coli</i>	1352	325.1	75.95	[104]
<i>Aneurinibacillus</i>	10	0.02	99.8	
<i>tyrosinisolvens</i>	20	0.42	97.9	[105]
	30	1.02	96.6	
<i>Bacillus subtilis</i>	500	0	100	[106]

1.8 Consorcios microbianos en los procesos de biodegradación de compuestos cianurados

Los consorcios microbianos son grupos de microorganismos que trabajan juntos en procesos de biodegradación de contaminantes en diferentes medios. Cada tipo de microorganismo en el consorcio tiene una función específica, y la colaboración entre ellos es esencial para una degradación eficiente [107]. Los consorcios pueden degradar contaminantes complejos que los microorganismos individuales no podrían, y pueden adaptarse y evolucionar para degradar diferentes tipos de contaminantes haciéndolos útiles en aplicaciones de biorremediación para limpiar suelos y aguas contaminadas [108].

Los consorcios microbianos que degradan especies cianuradas contienen diferentes tipos de bacterias como *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, entre otros, los cuales trabajan en conjunto para transformar estos sustratos en compuestos menos tóxicos y estables químicamente como dióxido de carbono y nitrógeno. Para utilizar estos consorcios en la biorremediación de especies cianuradas y lograr buenos rendimientos en la reacción metabólica, es necesario proporcionar las condiciones adecuadas para su crecimiento, incluyendo un pH óptimo, sales inorgánicas y una fuente de nutrientes, para estimular su crecimiento [109,110].

Los consorcios microbianos que se utilizan para la biorremediación de especies cianuradas son aislados de diferentes fuentes, como suelos contaminados con cianuro, muestras de aguas residuales de la industria minera, lodos de plantas de tratamientos de aguas residuales e incluso de efluentes residuales industriales. Estos consorcios se pueden obtener mediante técnicas de cultivo en laboratorio, como el aislamiento de colonias individuales y su posterior identificación mediante técnicas moleculares como la secuenciación del ADN [109,111,112].

Razanamahandry *et al.*, recolectaron muestras de suelo y agua de una cuenca hidrográfica en el país de Burkina Faso donde se realiza extracción artesanal ilegal de oro mediante cianuración. Las muestras se utilizaron para evaluar la presencia de bacterias degradadoras de cianuro. Se detectaron estos consorcios bacterianos conformados por *Bacillus sp*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes* y *Rhodococcus sp*. Se procedió a probar la capacidad efectiva de degradación de cianuro por parte del consorcio bacteriano. Estas bacterias se cultivaron en medios de crecimiento que contenían 40, 60 y 80 ppm de cianuro, a pH 9.5 y a temperatura ambiente. Más del 95 % del cianuro se degradó en 25 h, favoreciendo el crecimiento bacteriano y la producción de amonio. Sin embargo,

concentraciones iniciales cianuro superiores a 100 ppm inhibieron el crecimiento de los consorcios y la degradación de este sustrato [113].

En otro estudio Khamar *et al.* obtuvieron un total de 310 aislamientos bacterianos de estanques contenedores de aguas residuales de la minería de oro en la provincia de Khorasan-Razavi, en el noreste de Irán. La tolerancia de estas cepas al cianuro se evaluó en un medio suplementado con concentraciones entre 50 y 350 ppm de cianuro. Nueve cepas mostraron el nivel más alto de tolerancia y podían crecer en los medios suplementados. De estos, dos aislamientos, fueron capaces de metabolizar el cianuro como única fuente de nitrógeno en 5 días, a una temperatura de 25 °C y con un volumen de inóculo 2.5 % (v/v), manteniendo una concentración inicial de cianuro de 50 ppm. Las remociones obtenidas fueron de 66 % y 50 % a pH 9.5. El análisis de la secuencia genética del ADNr 16S reveló que las cepas degradadoras pertenecen al género de *Halomonas*, una de ellas es *Halomona daqingensis*, mientras que la otra no se pudo relacionar con algún taxón [114].

Por su parte Xiao *et al.*, empleó un consorcio bacteriano aislado de lodos activados para la remediación de aguas residuales cargadas con tiocianato. El proceso lo realizó a 32 °C, pH 7.19 y una velocidad de agitación de 185 rpm durante 6 días en un reactor en continuo. Encontró que este consorcio podía degradar completamente hasta 154.64 mM de tiocianato, con una tasa de degradación máxima de 1.53 mM h⁻¹. El análisis de secuenciación e identificación mostró que *Thiobacillus* era el género bacteriano predominante en el consorcio empleado [115].

1.9 Bacterias empleadas en esta investigación

***Pseudomonas putida*:** Es una bacteria Gram negativa de enorme potencial para la biotecnología industrial y ambiental, debido a su notable versatilidad metabólica y capacidad para soportar reacciones redox complejas. Además, sus simples requerimientos nutricionales, rápido crecimiento, metabolismo flexible, y modelos metabólicos a escala genómica refuerzan la implementación de *P. putida* en biotransformaciones industriales [116].

Singh *et al.*, aislaron bacterias del suelo en sitios contaminados por efluentes de hornos de coque ricos en fenol y cianuro. Emplearon dos aislamientos que toleraron concentraciones de fenol de 1800 mg L⁻¹ y 340 mg L⁻¹ de cianuro. Los aislamientos fueron inmovilizados en una columna de carbón activado, y el efluente contaminado pasó por ella con un caudal de

5 ml min⁻¹. Las cepas mostraron una degradación del fenol de 80.5 % y 80.6 % para cianuro. La identificación molecular mediante ADN ribosomal 16S de los aislamientos mostró que correspondían a *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas stutzeri*, respectivamente [117].

Según Zhao *et al.*, es un gran desafío biorremediar la contaminación por tiocianato en la lixiviación del oro. Ellos emplearon con éxito *Pseudomonas putida* TDB-1, para degradar completamente 1000 mg L⁻¹ de tiocianato a pH de 10. Las tasas máximas de transformación de S y N del tiocianato a los productos finales de SO₄²⁻ y NO₃⁻ fueron 88.98 % y 92.71 %, respectivamente. Además, la secuenciación del genoma confirmó que el gen biomarcador de la bacteria que degrada el tiocianato, *CynS*, se identificó en la cepa TDB-1 [118].

Pseudomonas veronii: Este microorganismo es una bacteria Gram negativa del género *Pseudomonas*, que se encuentra en diversos ambientes naturales y clínicos. Tiene aplicaciones importantes en biotecnología e industria, incluyendo la producción de polímeros biodegradables, la biorremediación de compuestos orgánicos, el biocontrol de patógenos en alimentos frescos y la producción de enzimas con aplicaciones en la industria alimentaria y farmacéutica [119–122].

Se realizó una búsqueda en Scopus utilizando las palabras clave "*Pseudomonas + veronii + cyanide*", y se encontraron tres artículos relacionados con estas palabras. Sin embargo, es importante destacar que ninguno de estos artículos se enfoca en el comportamiento de la degradación de cianuro por esta cepa. Por otro lado, al reemplazar la palabra "cianuro" por "tiocianato", no se encontró ningún artículo relacionado.

Raoultella terrigena: Es una bacteria Gram negativa de la familia Enterobacteriaceae que se encuentra en ambientes naturales como suelo, agua y materia orgánica en descomposición. Puede producir enzimas útiles en la industria alimentaria, farmacéutica y de detergentes, además puede degradar contaminantes ambientales como hidrocarburos y metales pesados, haciéndola útil para la biorremediación [123–126].

Se realizó una búsqueda en Scopus utilizando las palabras clave "*Raoultella + terrigena + cyanide*" y se encontró un artículo relacionado, aunque este no aborda la degradación de cianuro por este microorganismo. Al reemplazar la palabra "cianuro" por "tiocianato", no se encontraron artículos relacionados.

Rahnella aquatilis: Esta bacteria es Gram negativa que se encuentra en ambientes naturales y clínicos. Ha sido objeto de varios estudios debido a su capacidad para producir diversas enzimas y metabolitos de interés industrial, así como para degradar contaminantes

ambientales y producir biopolímeros. También se ha demostrado que puede producir compuestos antimicrobianos y antifúngicos, lo que la convierte en una posible fuente de nuevos agentes terapéuticos. Además, puede aumentar la resistencia de las plantas a las enfermedades, lo que podría ser útil en la agricultura [127–129].

Al igual que con las cepas anteriores se realizó una búsqueda en Scopus con las palabras clave relacionadas a este microorganismo y no se encontraron estudios como tampoco reportes de la degradación de cianuro o tiocianato mediada por *Rahnella aquatilis*.

1.9 Biorreactores en el tratamiento de especies cianuradas.

Un biorreactor es un sistema que posee organismos vivos o una parte de ellos para realizar procesos biológicos, controlando las condiciones aeróbicas o anaeróbicas, los nutrientes, el nitrógeno, el pH, el oxígeno, la temperatura, entre otras [17]. Los procesos biológicos se pueden clasificar por el tipo de unión microbiana que utilizan, es decir, sistemas de biomasa suspendida o inmovilizada [84].

A continuación, se describen los sistemas de biomasa suspendida e inmovilizada, así como algunos estudios realizados a escala de laboratorio, utilizando cada uno de estos sistemas para la degradación biológica del cianuro con cepas puras o consorcios microbianos.

Sistemas de biomasa suspendida: En estos sistemas los microorganismos se combinan completamente, con los sustratos y nutrientes dentro de reactores cerrados. La mezcla se realiza por aire difuso, aireación o agitación mecánica. Se han realizado varios estudios de laboratorio para tratar el cianuro libre utilizando diferentes cepas de bacterias puras, incluyendo: *Bacillus cereus*, *Pseudomonas resinovorans*, *Pseudomonas fluorescens*, *P. psedudoalcaligenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Rhodococcus sp* y *Ralstonia sp*, y hongos como *Trametes versicolor* [83].

Las mejores remociones se obtuvieron con consorcios bacterianos que contienen diferentes cepas de *Pseudomonas*. Esto lo reporta por Deloya *et al.* [130], Restrepo *et al.* [131], y Moradkhani *et al.* [132], obteniendo respectivamente remociones de cianuro de 95 %, 95 % y 94 %.

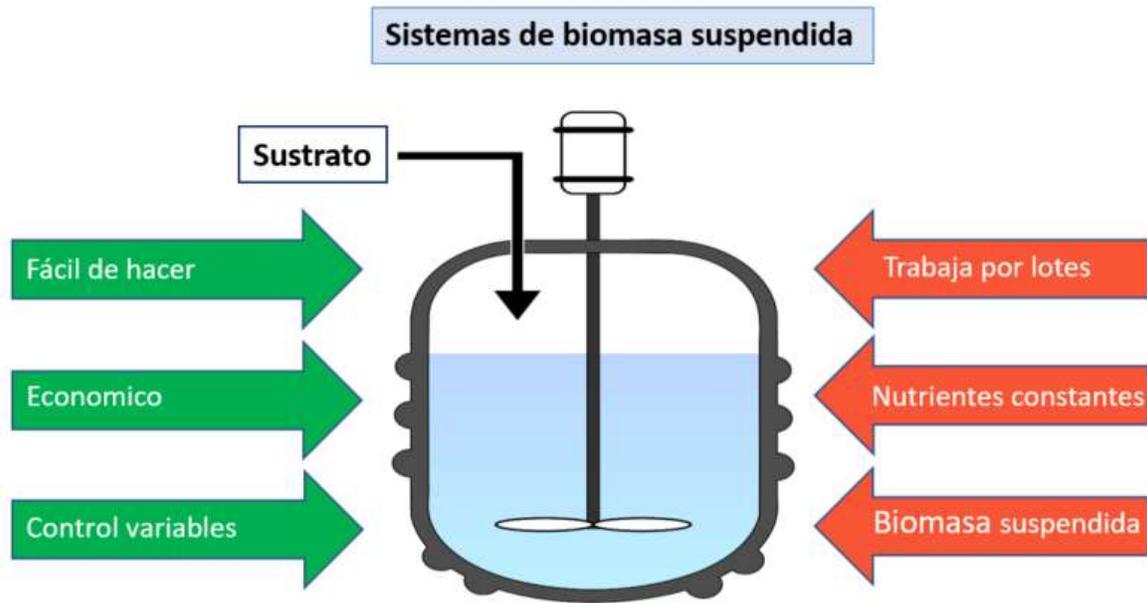


Figura 7. Esquema general de un reactor de biomasa suspendida

La Tabla 7 ofrece una visión general de los estudios bacterianos realizados en reactores *Batch*, diseñados para la eliminación de compuestos cianurados. En esta tabla, se muestran los microorganismos empleados, el tipo de un sustrato cianurado, y las condiciones de operación junto con la cantidad de inóculo utilizada.

Tabla 7. Biodegradación de cianuro con sistemas de biomasa suspendida. Adaptado de Alvillo *et al.* 2021 [84].

Microorganismo	Fuente de nitrógeno	Fuente de carbono	[CN ⁻] _i (ppm)	[CN ⁻] _f (ppm)	Tiempo (h)	Agitación (rpm)	pH	T (°C)	Inoculo	Remoción (%)	Referencia
<i>Pseudomonas parafulva</i> , <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	KCN	Glucosa	200	12	312	150	9.5	32	1 × 10 ⁷ CFU mL ⁻¹	94	[133]
	NaCN	NR	0.6	0	NR	NR	9.0	30	NR	100	[134]
<i>Pseudomonas</i> sp.	NaCN	Buffer carbonato	1	0.34	144	NR	9.5	36	4 mL (1.3 × 10 ⁹)	66	[83]
<i>Pseudomonas resinovorans</i>	KAg(CN) ₂ K ₄ Fe(CN) ₆	Glucosa	36 11	36 11	72	230	5	30	50 µL	0	[135]
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Cianuro		2500	288	125	NR	9–10.5	25	NR	95	[130]
<i>P. pseudoalcaligenes</i>	NaCN y NH ₄ Cl	(C ₂ H ₃ NaO ₂)	45	18	57.6	450 L d ⁻¹	10	30	5 mL	60	[29]
<i>P. fluorescens</i>	NaCN	NR	500	25	236	NR	NR	25	1 % v/v	95	[136]
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> CECT5344	KCN	Acetato de sodio (50 mM)	0.13	0.007	144	250	9.5	30	1 mL	95	[22]
<i>Bacillus</i> sp.	KCN	Sucralosa	300	9	10	5	10.5	20	15 % v/v (2.5 × 10 ⁷)	97	[100]
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KCN	Glucosa	0.31	0.0372	72	150	7	25	NR	88	[137]
<i>Klebsiella oxytoca</i> SYSU-011	KCN	Glucosa (0.8%)	0.038	0.003	4	NR	7	30	0.105 mg mL ⁻¹	92	[138]
<i>Rhodococcus</i> sp.	KCN	Glucosa	0.006	0.0012	48	160	6.5	30	10 % v/v	80	[139]
<i>Trametes versicolor</i>	KCN	NaOH/NaHCO ₃	100	25	42	150	10.5	30	0.75 g	75	[140]
<i>Klebsiella pneumoniae</i> and <i>Ralstonia</i> sp.	KSCN	Glucosa	1	0.24	48	100	6	37	NR	76	[141]
<i>Bacillus</i> sp., <i>Klebsiella</i> , <i>providencia</i> , <i>Pseudomonas</i>	SCN	Glucosa	250	7.5	160	180	10	30	1 % v/v	97	[101]
<i>Pseudomonas</i> , <i>Bacillus</i> and <i>Alcaligenes</i>	KCN	NR	50	7.5	119	NR	9.5	25	2.5 % v/v	85	[142]
Consortio bacteriano <i>Azotobacter vinelandii</i>	NaCN	Azúcar y urea	150	52.5 15.0	20	20 L d ⁻¹	7–9	25	2500– 3000 mg L ⁻¹	65 90	[143]
Consortio bacteriano	NaSCN	NR	150	9	10	NR	7.5	30	2500 mg L ⁻¹	94	[144]
Consortio bacteriano	KCN	Glucosa	80	4	24	200	9.5	30	0.062 CFU L ⁻¹	95	[102]

*NR: No reporta

Reactor de biomasa inmovilizada: Los sistemas de biomasa inmovilizada se pueden dividir en dos tipos: sistemas estacionarios o de lecho fijo (el agua se mueve a través de un medio fijo) y sistemas de medio móvil o reactores de lecho móvil (un medio sólido se mueve a través de un líquido) [83].

En los reactores de biofilm de lecho móvil (MBBR), la biomasa crece en los soportes del reactor específicamente en la superficie y en su interior formando una biopelícula debido a la producción de sustancias poliméricas extracelulares que mantienen unidos entre sí a los microorganismos con la superficie [145].

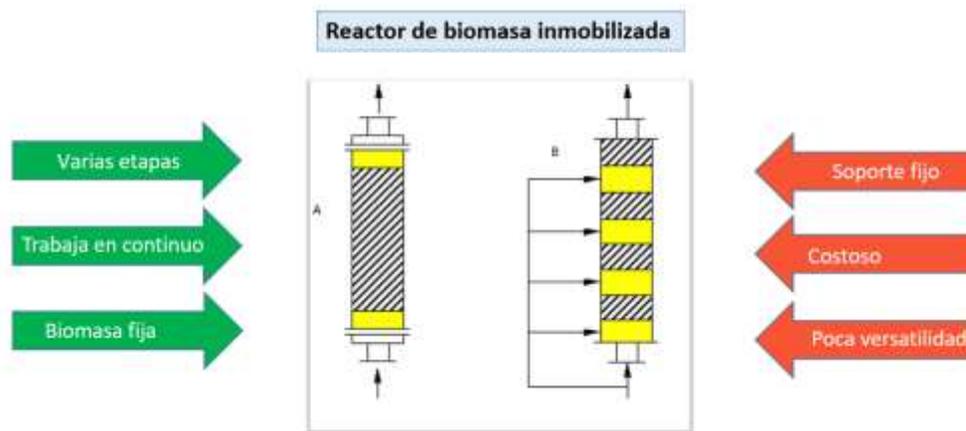


Figura 8. Características de un reactor de biomasa fija, aspectos positivos y negativos

Los reactores en continuo tienen como ventaja la capacidad de mantener una producción constante porque se tiene un flujo ininterrumpido. También suelen ser más eficientes en términos de consumo de energía y materiales, porque se pueden optimizar para operar de manera constante y estable. Sin embargo, tienen como desventaja la complejidad en su diseño y operación inicial, así como la dificultad de hacer cambios rápidos en las condiciones de reacción [97,146].

La Tabla 8 presenta varios sistemas empleados en la degradación de compuestos cianurados utilizando diferentes tipos de reactores en continuo, en ella se describen las condiciones óptimas de operación, los microorganismos empleados, el tipo de sustrato y los porcentajes de rendimiento obtenidos.

Tabla 8. Biodegradación de cianuro con sistemas de biomasa inmovilizada. Adaptado de Alvillo *et al.* 2021.[84]

Microorganismo	Fuente de nitrógeno	Fuente de carbono	[CN ⁻] _i (ppm)	[CN ⁻] _f (ppm)	Tiempo (h)	Agitación (rpm)	pH	T (°C)	Inoculo	Remoción (%)	Referencia
<i>Bacillus sp.</i>	KCN	Sucralosa	300	9	10	5	10.5	20	15 % v/v (2.5 × 10 ⁷)	97	[98]
<i>Bacillus sp.</i>	F-CN	Leche	500	25	80	260 mL d ⁻¹	9.88	33,6	44 g	95	[147]
<i>Thiobacillus sp.</i>	NaSCN y KOCN	C ₆ H ₁₁ FeNO ₇	165	101.5	566	N.R.	7.5	25	63 % Fijado (30 L)	38.5 62.6	[148]
<i>A. awamori</i>	KCN	Cítricos (1%)	280	56	8	3 mL h ⁻¹	>9	30	10 × 10 ⁶	80	[84]
<i>Rhodococcus erythropolis</i> CCM2595	CN ⁻	NR	0.8–242	0.7–3.1	TRH = 4.1–10.4 d	170 m ³ d ⁻¹	8	10–40	130 m ³ soporte (10 g L ⁻¹)	75–99	[149]
<i>K. oxytoca</i>	KCN	NR	0.07	0.03	12	200	7	30	3500 mg L ⁻¹	65	[150]
<i>K. oxytoca</i>	KCN	Glucosa (0.8 %)	0.46	0.322	20	NR	7	25	NR	30	[150]
<i>Trichoderma koningii</i>	CN ⁻	ninguno	500	50	27 d	140	6.5	28	0.78 g masa de hongo 1:1 w/v	90	[151]
<i>Fusarium oxysporum</i> CCM1 876	CN ⁻	Glucosa	0.3	0.042	40	13 mL h ⁻¹	8	30	1:1 w/v	86	[152]
<i>Methylobacterium sp.</i> RXM CCM1 908				0.048						84	
Consorcio bacteriano	NaCN	Glucosa	50	15	24	NR	NR	NR	3500 mg L ⁻¹ (20 L)	70	[153]
Consorcio bacteriano	SCN ⁻ CN ⁻	Glucosa	100–500 SCN ⁻ 10CN ⁻	0.78–1.32 SCN ⁻ CN ⁻ 0.5	200 d	TRH = 3 h	7.4–7.6	5	NR	98–99 SCN ⁻ CN ⁻ 95	[154]

*NR: No reporta

Los biorreactores tienen un propósito en común, transformar los sustratos contaminantes en especies inertes o menos tóxicas, para verificar el comportamiento exitoso del biorreactor es necesario tener métodos de análisis que permitan hacer seguimiento a los cambios que sufren los sustratos. En esta investigación se realizó el seguimiento utilizando fotometría UV-Vis para cianuro y cromatografía iónica para tiocianato, estas técnicas se describen a continuación.

1.10 Análisis de especies cianuradas por fotometría

El análisis de especies cianuradas mediante fotometría se basa en la capacidad de los compuestos cianurados de absorber luz en ciertas longitudes de onda. Los métodos de fotometría más utilizados incluyen la absorción atómica que utiliza una llama para excitar los iones cianuro y luego mide la cantidad de luz absorbida en una longitud de onda específica [155].

Otro método empleado es la espectrofotometría de absorción molecular que detecta la absorción de luz en un rango específico de longitudes de onda, se utiliza para medir concentraciones de cianuro en solución dándole una mayor capacidad de análisis ya que puede detectar una variedad de compuestos cianurados [156,157].

Saraji *et al.*, desarrolló un método analítico simple, basado en la reacción de cloramina-T/piridina-ácido barbitúrico, con cianuro. Durante la reacción, el cianuro se convirtió en cloruro de cianógeno, que se extrajo y se recogió sobre un papel impregnado con piridina-ácido barbitúrico. El color que apareció en el papel se utilizó para cuantificar el analito utilizando un software de procesamiento de imágenes asistido por escaneo. En condiciones óptimas, la curva de calibración fue lineal en el rango de 3,0 a 100 μgL^{-1} con un límite de detección de 0,7 μgL^{-1} [158]. La Figura 9 muestra lo obtenido experimentalmente.

Afkhami *et al.*, describen un método basado en la medición espectrofotométrica, para la determinación simultánea de iones CN^- y SCN^- . El método se basa en la diferencia en la velocidad de reacción entre estos iones con cloramina-T, en una solución tampón de pH 4.0 a 30 °C. Los perfiles cinéticos de absorción de las soluciones se controlaron midiendo la absorbancia a 578 nm en un rango de tiempo de 20 a 180 s. Los resultados mostraron que se podía realizar una determinación simultánea en el rango de 10.0 a 900.0 y 50.0 a 1200.0 ng mL^{-1} para los iones CN^- y SCN^- , respectivamente. El método propuesto se aplicó con éxito a la determinación simultánea de cianuro y tiocianato en muestras de agua [159].

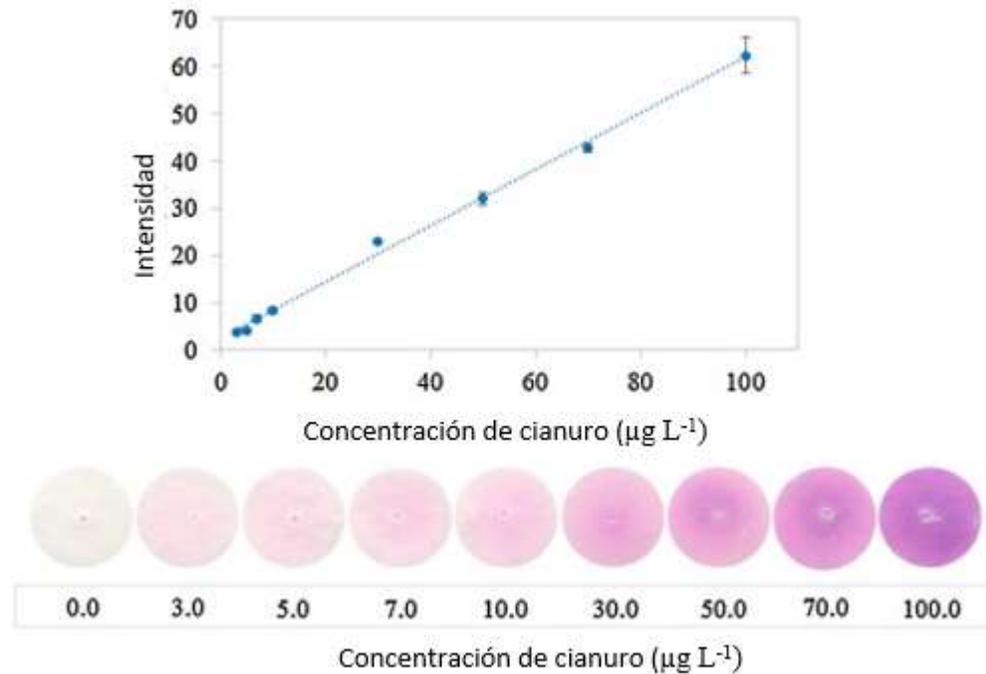


Figura 9. Gráfico de calibración de la intensidad del color en función de la concentración de cianuro. Adaptado de Saraji *et al.* 2018 [158].

1.11 Análisis de especies cianuradas por cromatografía iónica.

La cromatografía iónica es una técnica de separación y análisis que permite identificar y cuantificar compuestos en una muestra. Se basa en la interacción iónica o de adsorción entre los compuestos de la matriz de estudio y el estado iónico de la columna de separación, permitiendo separar los compuestos y detectarlos mediante un detector de masas o de conductividad. Esta técnica es precisa y sensible para el análisis de especies cianuradas y sus productos de degradación [160].

Para llevar a cabo el análisis por cromatografía iónica, la muestra se inyecta en la columna y se mueve a través de esta bajo un flujo de eluyente. Los compuestos se separan en la columna y luego son detectados, la selectividad de los compuestos separados se controla mediante la selección de la columna de separación y la elección del eluyente, por ejemplo, se puede utilizar una columna selectiva para tiocianato y un eluyente que preferentemente eluya especies otras especies cianuradas. La cromatografía iónica es una técnica ampliamente utilizada en la industria y en la investigación para controlar la calidad y la seguridad ambiental [161,162].

Un cromatógrafo iónico generalmente consta de una fase móvil que se usa para transportar las muestras a través del sistema, una columna que está llena de un material poroso cargado y a través de ella pasa la fase móvil con la muestra, un inyector que es la entrada de la muestra al sistema, un supresor de carga que reduce la fuerza iónica del eluente para facilitar la detección, un detector el cual es responsable de revelar la presencia de las muestras separadas, un sistema de registro de datos que permite analizar y organizar los datos de la separación y un sistema de bomba que se encarga de bombear la fase móvil a través del sistema [163,164]. La Figura 10 muestra los componentes del cromatógrafo iónico.

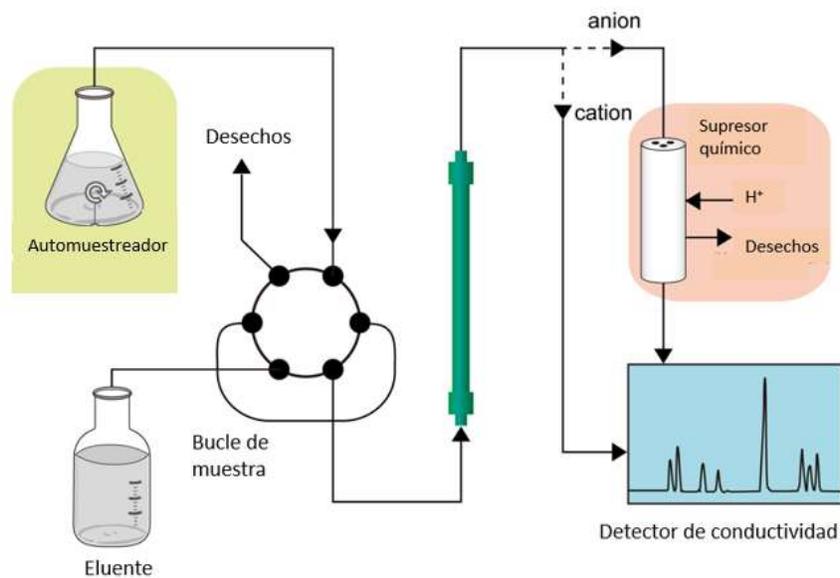


Figura 10. Esquema de un sistema de separación de cromatografía iónica. Adaptado de Yoshimura *et al.* 2018 [165]

Ma *et al.* llevaron a cabo un análisis rápido de tiocianato mediante cromatografía de pares iónicos, utilizando una columna monolítica a base de sílice. Los aniones se identificaron usando un detector de conductividad. Como eluyente utilizaron hidróxido de tetrabutilamonio (TBA), ácido ftálico y acetonitrilo. Los autores investigaron los efectos de la concentración del eluyente, el valor del pH, la temperatura de la columna y el flujo sobre el tiempo de retención del tiocianato. Las condiciones cromatográficas optimizadas para la determinación de tiocianato fueron las siguientes: 0.25 mmol L⁻¹ de TBA; 0.18 mmol L⁻¹ de ftalato; 7 % de acetonitrilo, a pH 5.5, temperatura de la columna de 30 °C y flujo de 6.0 mL min⁻¹. La curva de calibración entre el área del pico y la concentración de tiocianato fue

lineal en el rango de 2.0 a 100.0 mg L⁻¹. Este método fue aplicado en la determinación de tiocianato en líquidos iónicos [166].

Por su parte Destanoğlu *et al.* desarrollaron un método selectivo, sensible y confiable para la determinación simultánea directa de cianato, tiocianato y cromo hexavalente mediante cromatografía iónica (IC) con detección de conductividad. Las separaciones cromatográficas en la columna de intercambio aniónico se lograron utilizando NaOH como eluente en gradiente de concentración. El método propuesto se aplicó para la determinación simultánea de cianuros y cromo hexavalente en aguas residuales industriales. Los cianuros y el cromo se pudieron medir en rangos lineales de 0.6 a 961.5 y 0.9 a 118.5 μmol L⁻¹, respectivamente. El límite de detección y el límite de cuantificación de los cianuros fueron 0.18 y 0.61 μmol L⁻¹, para el cromo (VI) los valores fueron 0.26 y 0.86 μmol L⁻¹, respectivamente [167].

2. Capítulo II – Metodología

2.1 Estandarizar las condiciones cromatográficas para la cuantificación de especies cianuradas por cromatografía de intercambio iónico con detector de conductividad

El tiocianato y otros aniones de interés se identificaron y cuantificaron empleando cromatografía de intercambio iónico, se realizó un diseño experimental para establecer las mejores condiciones de análisis de esta técnica. Se determinaron parámetros analíticos como la linealidad, precisión y exactitud. El cianuro se cuantificó por espectrometría UV-Vis. La Figura 11 muestra un esquema general de la metodología empleada.

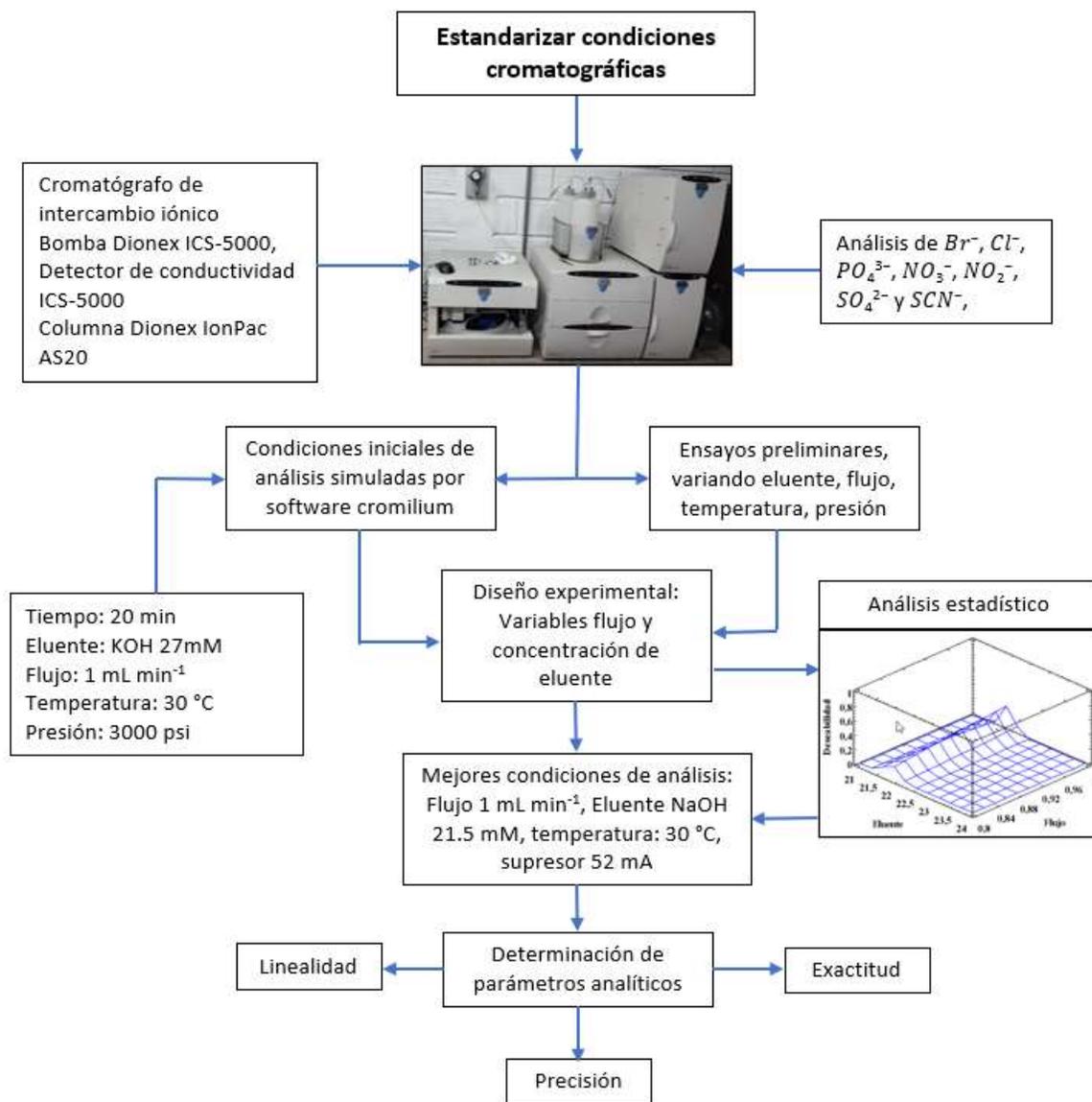


Figura 11. Desarrollo experimental para dar cumplimiento a el objetivo 1.

2.1.1 Reactivos

Se empleó estándares Sigma Aldrich de bromuro de sodio, cloruro de sodio, fosfato monobásico de potasio, nitrato de sodio, nitrito de sodio, sulfato de sodio y tiocianato de sodio. Se utilizó agua tipo I purificada mediante un sistema Direct-Q Millipore.

2.1.2 Análisis mediante cromatografía iónica

Se usó un cromatógrafo de intercambio iónico Thermo Scientific, con bomba Dionex ICS-5000, generador de eluente Dionex ICS-5000, automuestreador Dionex AS-AP, detector de conductividad Dionex ICS-5000, columna Dionex IonPac AS20 (4 x 250 mm), y un supresor electrolítico aniónico (Dionex ADRS, 4 mm) con corrientes que variaron entre 50.0 y 70.0 mA. El software empleado para el análisis de los datos fue Chromeleon versión 7.2 [168].

Como método instrumental inicial se modificó el protocolo de Destanoğlu *et al.* [167], teniendo en cuenta las condiciones dadas por el simulador que incorpora el software cromilium. Se empleó un tiempo de corrida de 20 minutos, usando KOH como eluente isocrático a concentración 27 mM, inyectando 25 µL de muestra, con flujo de 1 mL min⁻¹ a 30 °C de temperatura en la columna y rango de presión entre 100 a 3000 psi, [169].

Usando estándares de aniones y teniendo como base el método anterior, se realizó ensayos preliminares variando la concentración de eluente en un rango de 20 mM a 30 mM, y el flujo en rango de 0.8 mL min⁻¹ a 1.2 mL min⁻¹. Por último, se varió la temperatura de inyección en un rango de 25 a 30 °C [167].

2.1.3 Determinación de las mejores condiciones de análisis por cromatografía iónica.

Se realizó un diseño experimental factorial multinivel por triplicado, con un modelo de interacción de 2 factores, con estas condiciones se estableció un total de 42 análisis y 35 grados de libertad. Como variable respuesta se usó la resolución (R) de cada pico cromatográfico; y como factores controlables se empleó el flujo de la fase móvil en un rango de 0.8 a 1 mL min⁻¹, y la concentración de eluente en un rango de 21 a 24 mM. Ambas variables se manejaron como continuas [170]. La Tabla 9 muestra cómo se definió cada variable respuesta en este diseño y la ecuación 1 muestra la función del modelo empleado.

$$Y = \alpha + \alpha_1 A + \alpha_2 B + \alpha_3 AB \quad [1]$$

Se preparó una solución de concentración 50 ppm de los aniones bromuro (Br^-), cloruro (Cl^-), fosfato (PO_4^{3-}), nitrato (NO_3^-), nitrito (NO_2^-), sulfato (SO_4^{2-}) y tiocianato (SCN^-), para realizar cada uno de los análisis del diseño experimental.

Los resultados se analizaron y optimizaron con el software Statgraphics centurión XVII en modo demo [170].

Tabla 9. Condiciones de análisis de las variables respuestas definidas en el diseño experimental.

Nombre	Analizar	Objetivo	Impacto	Sensibilidad	Bajo	Alto
R1	Media	Maximizar	3.0	Medio		
R2	Media	Rango	5.0	Muy alto	1.2	1.5
R3	Media	Rango	5.0	Muy alto	1.2	1.5
R4	Media	Maximizar	3.0	Medio		
R5	Media	Maximizar	3.0	Medio		
R6	Media	Maximizar	3.0	Medio		

* R es la resolución de cada pico cromatográfico

2.1.4 Determinación de parámetros analíticos del método usado.

2.1.4.1 Linealidad.

Se realizó una curva de calibración con los aniones Br^- , Cl^- , PO_4^{3-} , NO_3^- , NO_2^- , SO_4^{2-} y SCN^- , a diez niveles con concentración (10.0, 20.0, 30.0, 40.0, 50.0, 60.0, 70.0, 80.0, 90.0 y 100.0) ppm con 3 réplicas para un total de 30 datos por anión. Cada solución se preparó disolviendo los reactivos sólidos en agua tipo I [171].

Se determinó la ecuación de la recta mediante regresión lineal y se analizó los coeficientes de correlación de regresión para determinar, los límites de confianza, desviación estándar del intercepto (S_a), desviación estándar de la pendiente (S_b), límite de detección, límite de cuantificación y el coeficiente de variación (CV) del factor de respuesta [171].

2.1.4.2 Precisión

Repetitividad instrumental: Se prepararon 3 soluciones de concentración 20.0, 50.0 y 80.0 ppm con los aniones Br^- , Cl^- , PO_4^{3-} , NO_3^- , NO_2^- , SO_4^{2-} y SCN^- , posteriormente se inyectó en el cromatógrafo iónico cada solución realizando 7 repeticiones. Se determinó la media, desviación estándar y coeficiente de variación (CV) de cada anión [171].

Precisión intermedia: Se prepararon 3 soluciones de concentración 20.0, 50.0 y 80.0 ppm con los aniones Br^- , Cl^- , PO_4^{3-} , NO_3^- , NO_2^- , SO_4^{2-} y SCN^- , seguido se inyectó en el cromatógrafo iónico cada solución realizando 5 repeticiones durante 3 días diferentes. Se calculó la media, desviación estándar y coeficiente de variación de cada anión [171].

2.1.4.3 Exactitud

Una muestra de agua residual de minería almacenada de proyectos anteriores se diluyó con agua tipo I en razón 1 a 50. Esta muestra se analizó por cromatografía iónica para determinar la concentración inicial de los iones sulfato y tiocianato, posteriormente se adicionó estándar a esta dilución, hasta llevar cada anión de estudio a tres niveles diferentes de concentración: bajo (20.0 ppm), medio (50.0 ppm) y alto (80.0 ppm), por último, se determinó el porcentaje de recuperación a los diferentes niveles de concentración [171].

2.1.5 Determinación de cianuro

El cianuro se determinó espectrofotométricamente con el método de ácido barbitúrico y piridina, las condiciones vienen normalizadas para el espectrofotómetro Nanocolor 91830 con el test 1-30. Teniendo en cuenta que el rango de análisis de este método varía entre 0.001 a 0.200 ppm de cianuro, se tomó una alícuota de 10 µL de cada muestra a analizar y se llevó a volumen de 25 mL, adicionando los reactivos dados por el kit de análisis [172].

2.2 Aislar e identificar un consorcio de microorganismos con potencial degradador de especies cianuradas

A continuación, se resume lo realizado experimentalmente para lograr el objetivo 2: se evaluó el potencial degradador de especies cianuradas utilizando *Pseudomonas putida* ATCC 31483, la cual es una cepa reportada en la degradación de estos sustratos [173–175]. Inicialmente se reactivó el microorganismo para después evaluar su tolerancia en agar cetrimide a diferentes concentraciones de tiocianato y cianuro.

Se realizaron ensayos en agares minerales, enriquecidos con cianuro y tiocianato como única fuente de nitrógeno, para evaluar la degradación de estos mediada por *P. putida*. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se optó por aislar e identificar un consorcio microbiano proveniente de efluentes mineros, y establecer su potencial degradador de especies cianuradas. Se aisló y purificó cada bacteria que presento actividad degradativa para después ser identificada molecularmente. Las actividades realizadas se resumen en las Figuras 12 y 13:

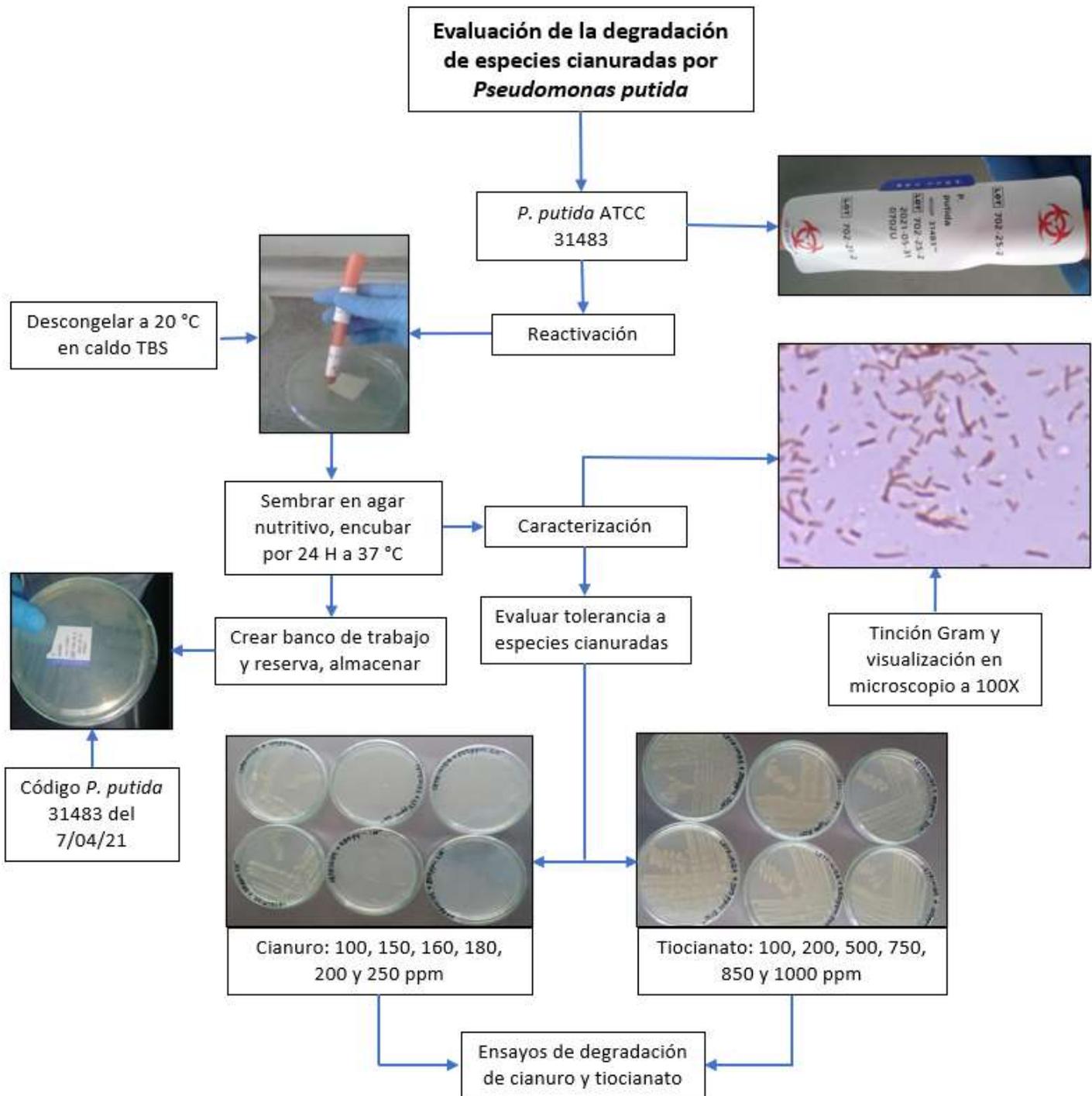
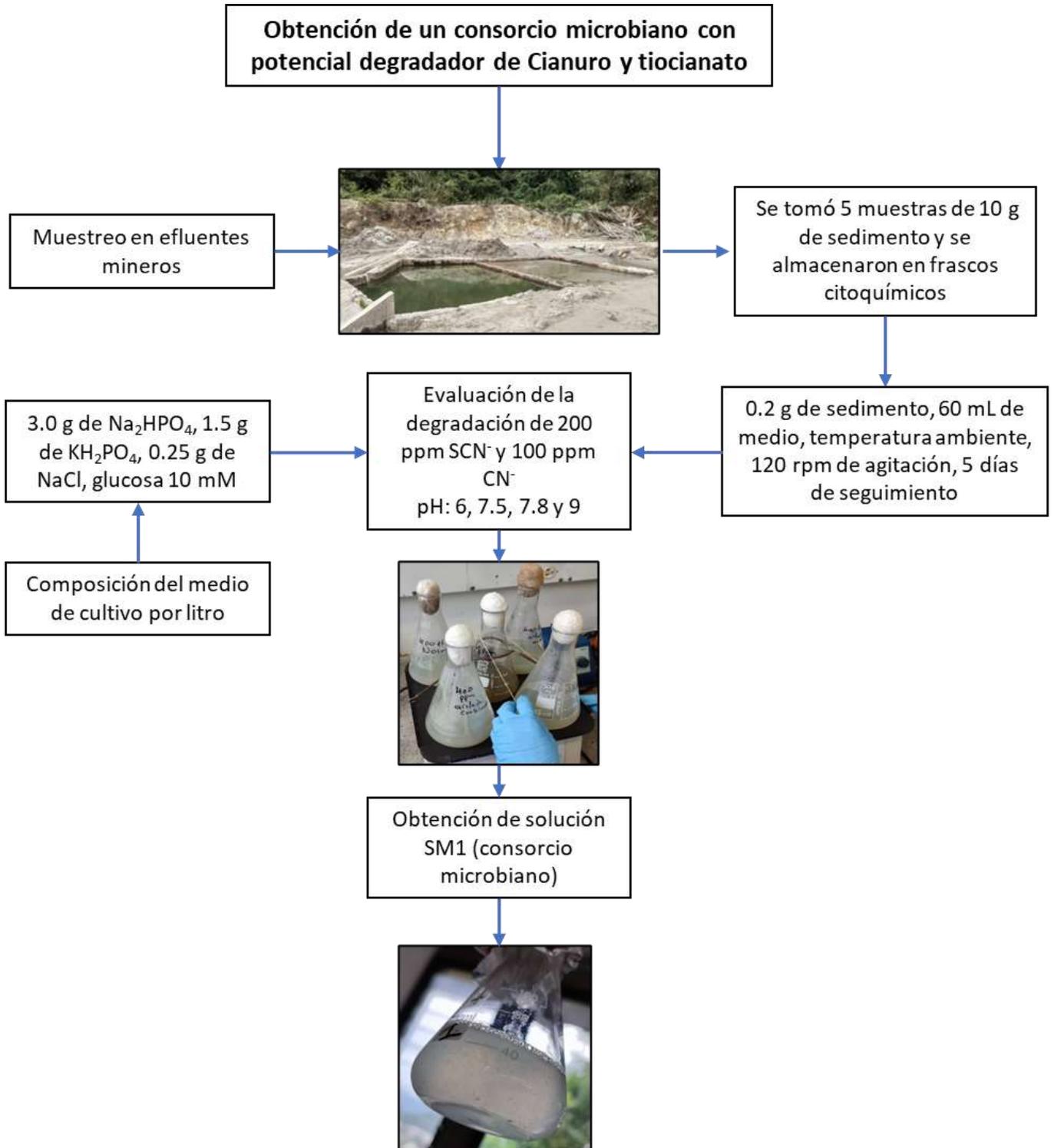


Figura 12. Esquema general de la metodología empleada para evaluar la capacidad degradadora de especies cianuradas mediante *P. putida* ATCC 31483

A.



B.

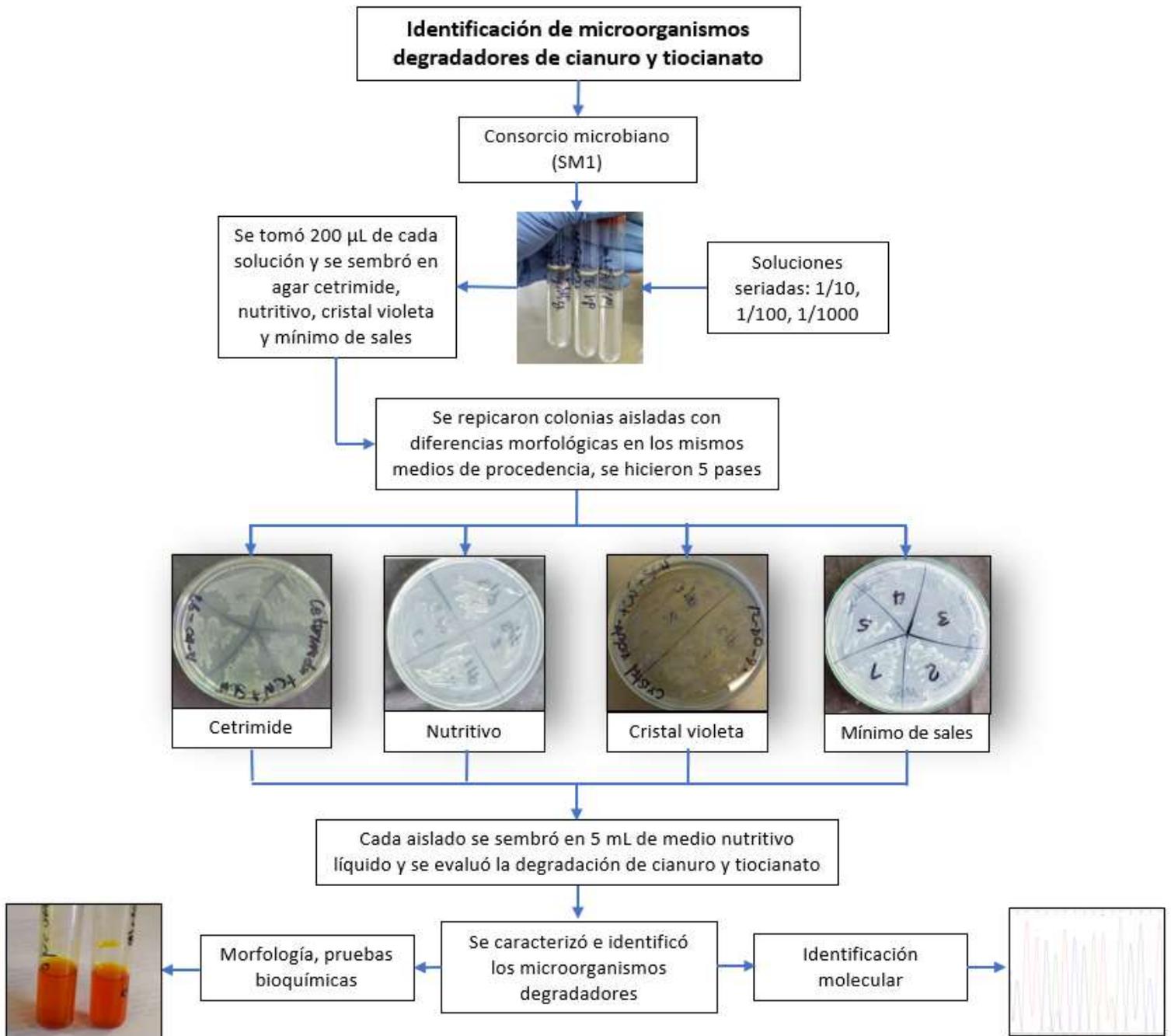


Figura 13. Esquema general de la metodología empleada para evaluar la capacidad degradadora de especies cianuradas mediada por un consorcio microbiano. **A.** Muestra cómo se realizó el muestreo de un consorcio microbiano degradador de cianuro y tiocianato. **B.** Muestra cómo se aislaron e identificaron los microorganismos degradadores de especies cianuradas presentes en el consorcio aislado.

2.2.1 Ensayos preliminares de la evaluación de la capacidad degradadora de especies cianuradas por *Pseudomonas putida*

2.2.1.1 Reactivación, conservación y condiciones de cultivo de *P. putida*

Los ensayos preliminares de la evaluación de la capacidad degradadora de especies cianuradas, se realizaron empleando la bacteria *P. putida* ATCC 31483, (*American Type Culture Collection*) suministrada por *Microbiologics*. La activación de la cepa se realizó a temperatura ambiente en caldo TSB siguiendo el protocolo suministrado por la casa comercial (Anexo 1). Posteriormente se cultivó en cajas Petri con 20 mL de agar nutritivo a 37°C por 24 h.

Para crear el banco de trabajo y almacenamiento, se siguió el protocolo de Saha *et al.* [176]. De la cepa activada se realizaron repiques en cajas Petri con 20 mL de agar cetrimide, sembrado por agotamiento e incubando por 24 h a 37 °C. De los repiques obtenidos se dejaron 4 cajas de reserva las cuales fueron almacenadas a 4°C en el laboratorio de microbiología aplicada de la Universidad de Caldas, con código *P. putida* 31483 del 7 de abril del 2021. Se dejaron 4 cajas de trabajo, de donde se tomaron los repiques para los ensayos de caracterización bacteriana y degradación de cianuro y tiocianato posteriores.

2.2.1.2 Caracterización de *P. putida* y evaluación preliminar de su tolerancia a especies cianuradas

Después del proceso de reactivación y conservación de *P. putida* se realizó su caracterización microscópica mediante tinción de Gram y visualización en microscopio (LEICA DM500 con aumento de 100X), siguiendo el protocolo ilustrado en el Anexo 2 [177].

La evaluación de la tolerancia de *P. putida* ATCC 31483 a especies cianuradas, se realizó en agar cetrimide, suplementado con cianuro en concentraciones de: 100, 150, 160, 180, 200 y 250 ppm. De igual forma, el medio cetrimide se suplementó con tiocianato en concentraciones de: 100, 250, 500, 750, 850 y 1000 ppm [99,178].

En cada uno de los medios sólidos suplementados, se realizaron repiques por duplicado de *P. putida* reactivada y se incubaron durante 48 horas a 37 °C, en ausencia de luz y sin agitación.

2.2.1.3 Ensayos de degradación de cianuro y tiocianato mediada por *P. putida* en medio mínimo de sales.

Se realizó una evaluación preliminar de la degradación por separado de cianuro a una concentración de 100 ppm y de tiocianato a 200 ppm. Para esto, se prepararon 4 tipos de

medios mínimo de sales sólidos, siguiendo el protocolo indicado en el Anexo 3 [94,107,179,180].

Se prepararon un total de 16 medios, 8 suplementados con cianuro y 8 con tiocianato. En cada uno de ellos se sembró *P. putida* reactivada por agotamiento. Los ensayos de realizaron en cajas Petri con 20 mL del medio sólido.

Se realizó un proceso de adaptación de *Pseudomonas putida* ATCC 31483 a los sustratos de cianuro y tiocianato. Se empleo el medio 4 (ver anexo 3), por cada litro este medio se adicionaron 10 g de peptona como fuente de nitrógeno. Gradualmente se disminuyó la fuente de nitrógeno así: primero se sembró *P. putida* en un medio que contenía 100 % de peptona. Posteriormente cuando se observó la formación de colonias, se realizaron repiques a un medio de cultivo con 30 % de peptona. De allí, se repicaron las colonias a un medio que contenía 15 % de peptona. Para finalizar el proceso de adaptación de *P. putida*, las colonias se repicaron en un medio sólido que ya no contenía peptona como fuente nitrógeno [181–184].

2.2.2 Muestreo y aislamiento de un consorcio microbiano con capacidad degradadora de especies cianuradas

2.2.2.1 Zona de muestreo

Las muestras fueron tomadas en la zona minera de Maltería en Manizales Caldas, ubicada a 16.1 Km del centro de la ciudad, en las coordenadas geográficas 5°02'52.8"N 75°24'41.7". El muestreo fue realizado por Fernando Chaves Vallejos estudiante de maestría de la Universidad de Caldas.

Con el fin de obtener un consorcio con capacidad para degradar especies cianuradas, se decidió recuperar microorganismos del sedimento de las aguas residuales producidas por la actividad minera de la zona, siguiendo el protocolo establecido por Razanamahandry *et al.* [185]. Se tomaron 5 muestras de aproximadamente 10 g cada una y se almacenaron en frascos citoquímicos estériles a temperatura ambiente. Se transportaron las muestras inmediatamente al laboratorio del grupo de investigación GEAAS en la Universidad de Caldas, y se almacenaron en refrigeración a 4 °C.

2.2.2.2 Ensayos de actividad del consorcio microbiano en la degradación de especies cianuradas

Para la selección de los microorganismos degradadores de especies cianuradas se siguió la metodología propuesta por Path *et al.* [179]. Se preparó un medio líquido mínimo de sales

denominado medio A, usando 3.0 g de Na_2HPO_4 , 1.5 g de KH_2PO_4 , 0.25 g de NaCl, glucosa 10 mM y 1 mL de solución de metales traza por cada litro de solución (Anexo 4).

Se evaluó la actividad degradadora de todas las muestras recolectadas, para esto se adicionó 0.2 g de sedimento de cada frasco citoquímico en 60 mL de medio líquido A, que se preparó en fiolas de 125 mL, cubiertas con tapones de algodón estéril y papel aluminio.

La evaluación de la degradación de las especies cianuradas se realizó por triplicado a diferentes pH: 6, 7.5, 7.8 y 9, utilizando concentraciones de 200 ppm de tiocianato y 100 ppm de cianuro. Los ensayos se realizaron a temperatura ambiente con agitación constante de 120 rpm, durante 5 días, en presencia de luz natural cuando estaba disponible, siguiendo la metodología de Razanamahandry *et al.* [186].

Las fiolas que degradaron cianuro a pH de 7.8, fueron almacenados a 4 °C y se rotularon como SM1, a partir de esta solución se tomaron los inóculos para realizar los ensayos en toda la investigación.

Se realizó el conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC) presentes en la solución SM1, para esto se realizaron diluciones seriadas 1:10, 1:100 y 1:1000 en agua destilada estéril. Se sembró una alícuota de estas soluciones en 20 mL de agar nutritivo, seguido se dispersó el inóculo con una aza metálica. Se incubó a temperatura de 22 °C por 24 h en ausencia de luz, se realizó inspección a los agares para contar las colonias en donde sea posible [187].

2.2.2.3 Aislamiento de los microorganismos presentes en el consorcio microbiano

Se prepararon cajas de Petri con 20 mL de agar cetrímide, nutritivo, cristal violeta y medio A, siguiendo el protocolo mostrado en el anexo 5. Cada medio fue suplementado con 200 ppm de tiocianato y 100 ppm de cianuro [113].

Para el aislamiento de los microorganismos presentes en el consorcio se realizaron algunas modificaciones a la metodología propuesta por Jayan *et al.* [188]. A partir de la solución SM1, se prepararon diluciones seriadas 1/10, 1/100 y 1/1000 en agua destilada esterilizada. Para evaluar el crecimiento bacteriano en cada dilución, se tomaron 200 μL de cada una y se inoculó en cuatro tipos de medios de cultivo: agar cetrímide, nutritivo, cristal violeta y medio A, dando un total de 12 ensayos. Todos los agares se incubaron a 22 °C haciendo inspección cada 24 horas, para evidenciar el crecimiento de los microorganismos. Se hizo seguimiento por 96 horas [188].

A partir de cada uno de los cultivos en medios sólidos previamente mencionados, se seleccionaron colonias que mostraban características morfológicas distintas. Con un asa, estas colonias se transfirieron y sembraron en agares idénticos a los medios originales de donde procedían [188].

Para garantizar la pureza de cada aislado, se repitió este procedimiento 5 veces. Después con un asa, se tomó una muestra de cada cultivo aislado y purificado para ser sembrado individualmente, en tubos de ensayo que contenían 5 mL de medio nutritivo líquido, se agitó con un vortex por 30 s y se incubó durante 24 horas, posteriormente se realizaron los ensayos de degradación de cianuro y tiocianato con cada cepa.

2.2.2.4 Ensayos de degradación preliminar de especies cianuradas utilizando los microorganismos aislados

Se evaluó la degradación preliminar de tiocianato mediante cromatografía iónica y de cianuro por espectrofotometría UV-Vis, con cada uno de los 16 morfotipos aislados. Para esto, se preparó el medio líquido A, a pH 7.8 y se adicionó como fuente de nitrógeno 100 ppm de cianuro y 200 ppm de tiocianato. Cada sustrato fue evaluado de manera independiente [186].

Se prepararon 68 fiolas de 125 mL, con 60 mL del medio líquido descrito anteriormente, cada fiola se inoculó por duplicado con 60 µL de cada uno de los aislamientos por separado. En total se realizaron 34 fiolas para cianuro y 34 para tiocianato. Las reacciones se realizaron a temperatura ambiente, con agitación constante de 120 rpm, en presencia de luz natural, durante 5 días. Cada ensayo se realizó con blanco de medio. La fórmula empleada para determinar el porcentaje de remoción se muestra en la ecuación 2:

$$\% R = \frac{(C_i - C_f)}{C_i} * 100 \quad [2]$$

Se determinó que aislamientos realizaron degradación de especies cianuradas, estableciendo las concentraciones iniciales y finales de cada sustrato. En la degradación de cianuro, se cuantificó la concentración de este sustrato mediante espectrometría UV-Vis, siguiendo la metodología mostrada en la sección 2.1.5. En paralelo, se determinó la concentración de tiocianato usando cromatografía iónica. Los aislamientos que presentaron actividad en la degradación de cianuro y tiocianato se rotularon como: M1, M2, M3, M4, y M5 [158,167].

2.2.2.5 Conservación de los microorganismos empleados en esta investigación.

Se realizó el banco de reserva mediante una criopreservación de los microorganismos con glicerina modificando el protocolo de Guo *et al* [189], para esto se sembró la bacteria *P. putida* ATCC 31483, cada morfotipo aislado y el consorcio bacteriano en tubos de ensayo que contenían 5 mL de agar nutritivo, se dejó crecer a temperatura de 22 °C durante 48 h. Cuando se evidenció la formación de colonias, se adicionó glicerol al 5 % estéril y se almacenó a temperatura de -18 °C. Cada muestra se almacenó en el cepario del laboratorio de microbiología aplicada de la Universidad de Caldas. Con los códigos *P putida* ATCC 31483; M1, M2, M3, M4, M5, para los aislamientos bacterianos, y SM1 para el consorcio bacteriano.

2.2.2.6 Caracterización microscópica y macroscópica de los aislamientos M1, M2, M3, M4, y M5.

Se sembró los aislamientos M1, M2, M3, M4, y M5 por agotamiento en 20 mL de agar nutritivo, se incubó a 22°C por 24 h y se realizó una descripción macroscópica de las colonias formadas, teniendo en cuenta su apariencia, forma, color y textura por. Para la descripción microscópica se realizó tinción de Gram a cada morfotipo y visualización a 100X en un microscopio (LEICA DM500) [187].

2.2.2.7 Pruebas bioquímicas para los aislamientos M2 y M3

Para establecer si los aislamientos que presentaron características microscópicas y macroscópicas similares (M2 y M3) eran la misma especie de bacteria, se realizaron pruebas bioquímicas de oxidasa, catalasa, TSI (agar Triple Sugar Iron), fermentación aerobia y anaerobia de la glucosa.

Para la prueba de oxidasa se tomó una colonia fresca de los aislamientos M1 y M2 y se transfirieron a una tira de papel impregnada con el reactivo de oxidasa de marca Bactident®. Para la prueba de catalasa se tomó una colonia de los aislamientos M1 y M2 y se colocaron en un portaobjetos limpio y seco. Posteriormente, se añadieron unas gotas de peróxido de hidrógeno al 3 % sobre las colonias [190].

Se realizaron pruebas de fermentación aerobia y anaerobia de la glucosa. Para esto, en dos tubos de ensayo se adicionó un medio que contiene peptona al 0.2 % y glucosa al 1 %, junto con azul de bromotimol como indicador de pH. En cada tubo, se adicionó aceite estéril para evitar el ingreso de oxígeno, y se inoculó con los aislamientos M2 y M3 por separado utilizando un asa, y se dejó en incubación a 32 °C durante 48 h [191].

Por último, se realizó la prueba TSI disolviendo 6.25 g de este agar en 100 mL de agua, posteriormente se agitó vigorosamente en calentamiento hasta lograr la disolución total. Este medio se depositó en 2 tubos de ensayo de 10 mL hasta ocupar la tercera parte de estos, se esterilizó en autoclave a 121 °C. Se dejó solidificar el agar en pico de flauta profundo acostando el tubo de ensayo. Por último, se sembró los aislamientos M2 y M3 con una aguja de inoculación picando el fondo y extendiendo hasta la superficie. Se incubó a 33 °C durante 24 horas [192].

2.2.2.8 Identificación de los microorganismos mediante secuenciamiento del gen ADNr 16S

Los aislamientos puros M1 a M5, fueron repicados en cajas de Petri con 20 mL de agar nutritivo, para ser enviados al Grupo de investigación en Bacteriología Agrícola y Ambiental de la Universidad de Antioquia, para su identificación molecular mediante secuenciación del gen ADNr 16S. La extracción de ADN se realizó empleando el kit DNeasy® blood and tissue kit de QIAGEN®. Posteriormente, llevaron a cabo la amplificación de la región hipervariable del ADNr 16S utilizando los cebadores (*primers*) 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492R (3'-AAGTCGTAACAAGGTAACC-5') [176].

El secuenciamiento se efectuó mediante el método capilar Sanger, utilizando los mismos cebadores 8F y 1492R. El proceso de limpieza de las secuencias se realizó editando manualmente con el software BioEdit los archivos AB1, verificando los cromatogramas y asegurando que las bases incluidas tengan un Phred score límite de al menos 30, para garantizar la calidad y la confiabilidad de las secuencias, las cuales tenían una longitud de pares de bases mayores a 1200.

Posteriormente se realizó un consenso de la secuencia forward y reverse por medio del alineamiento clustal, para después realizar el análisis bioinformático por alineamiento local básico mediante la herramienta BLAST (algoritmo Blastn) del Centro Nacional de Información Biotecnológica de los Estados Unidos (www.ncbi.nlm.nih.gov) [176].

2.3 Evaluación preliminar a escala de laboratorio la capacidad degradadora de especies cianuradas por consorcio microbiano

Las actividades realizadas para dar cumplimiento al presente objetivo estuvieron enmarcadas en la evaluación y optimización de la degradación de especies cianuradas utilizando el consorcio bacteriano. En primer lugar, se realizaron ensayos a escala de laboratorio para determinar las mejores condiciones de degradación de las especies cianuradas. Posteriormente, se trasladaron los experimentos a un reactor en continuo. A continuación, se describe de manera general la metodología empleada.

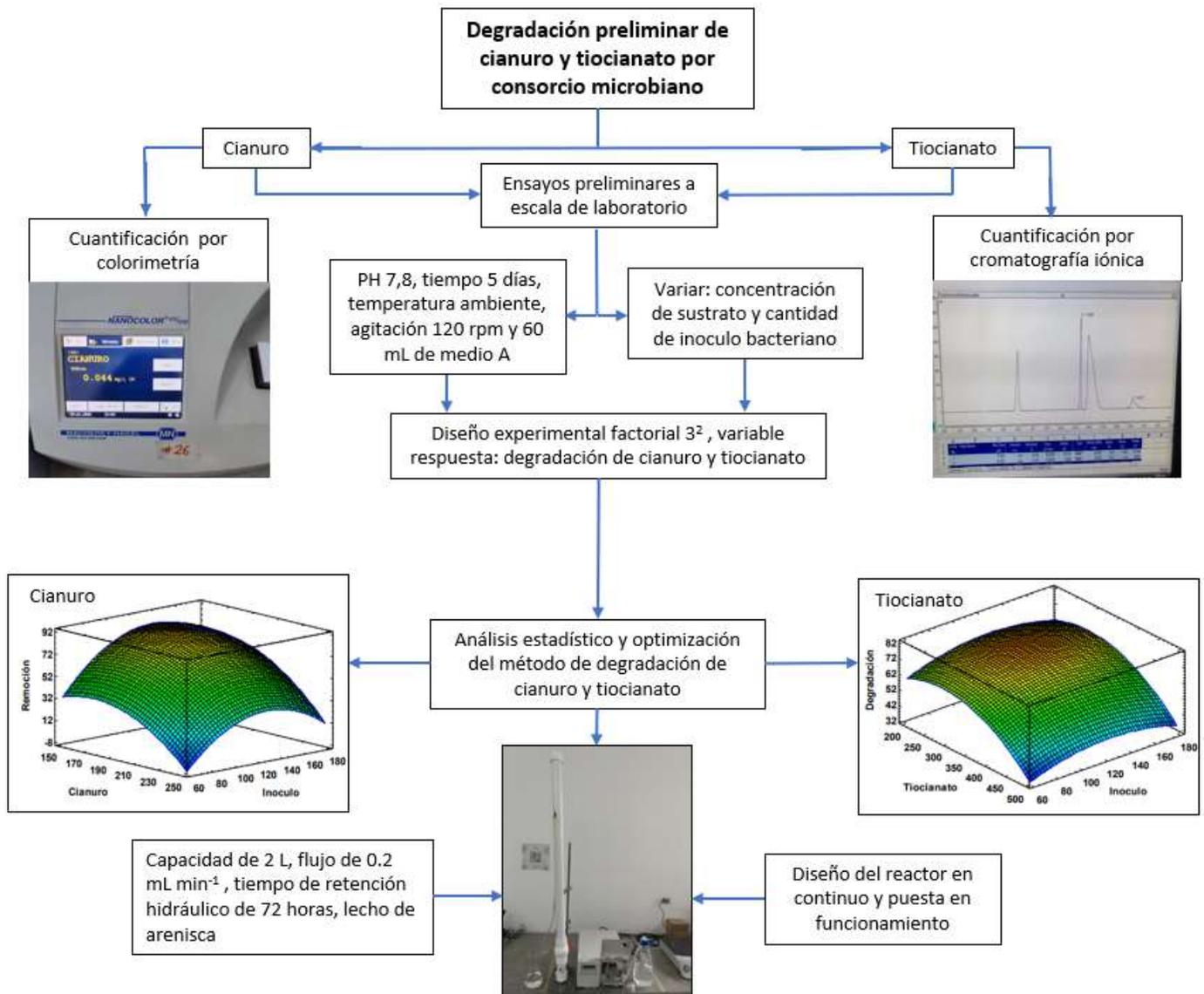


Figura 14. Esquema general para determinar preliminarmente la degradación de cianuro y tiocianato utilizando consorcio microbiano

2.3.1 Diseño experimental para la degradación de cianuro a escala de laboratorio

Se realizó un diseño factorial 3^2 aleatorizado, por triplicado con un modelo cuadrático, con estas condiciones se planteó 27 ejecuciones. Se utilizó el porcentaje de degradación de cianuro como la variable respuesta, con el objetivo de maximizarla. Los factores experimentales fueron la concentración inicial de cianuro y el volumen de inóculo, ambas variables de tipo continuo. La Tabla 10 muestra los factores experimentales que variaron en estos ensayos y la ecuación 3 muestra la función del modelo empleado [170,193].

$$Y = \alpha + \alpha_1 A + \alpha_2 B + \alpha_3 AB + \alpha_4 A^2 + \alpha_5 B^2 \quad [3]$$

Tabla 10. Factores experimentales empleados en el diseño de degradación de cianuro

<i>Nombre</i>	<i>Unidades</i>	<i>Tipo</i>	<i>Papel</i>	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>
A: Cianuro	ppm	Continuo	Controlable	150.0	250.0
B: Inoculo	μ L	Continuo	Controlable	60.0	180.0

Cada ensayo se realizó en fiolas de 125 mL, en los cuales se adicionó 60 mL de medio de cultivo A, ajustando el pH a 7.8 con las condiciones de cianuro e inóculo dadas por el diseño, y con agitación constante de 120 rpm. Se hizo seguimiento a cada experimento durante 5 días, al final de este tiempo se cuantificó la concentración de cianuro por espectrometría UV-Vis [170]. Los resultados se analizaron y optimizaron con el software Statgraphics centurión XVII en modo demo.

2.3.2 Diseño experimental para la degradación de tiocianato a escala de laboratorio

Se elaboró un diseño experimental factorial 3^2 aleatorizado, con un modelo cuadrático igual al mostrado en la ecuación 3, para evaluar el efecto de la concentración inicial de tiocianato y el volumen de inóculo en el porcentaje de degradación de tiocianato. Cada ensayo se replicó tres veces, dando un total de 27 ejecuciones. La tabla 11 muestra como variaron los factores experimentales [170,193].

Tabla 11. Factores experimentales empleados en el diseño de degradación de tiocianato

<i>Nombre</i>	<i>Unidades</i>	<i>Tipo</i>	<i>Papel</i>	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>
A: Tiocianato	ppm	Continuo	Controlable	200.0	500.0
B: Inoculo	μ L	Continuo	Controlable	60.0	180.0

Los ensayos se llevaron a cabo en fiolas de 125 mL, cada uno con 60 mL de medio de cultivo a pH 7.8, bajo las condiciones de tiocianato e inóculo establecidas por el diseño

experimental, con agitación constante de 120 rpm. Los experimentos se siguieron durante 5 días. La variable respuesta fue el porcentaje de degradación de tiocianato [170].

2.3.3 Diseño preliminar y puesta en marcha del reactor en continuo para evaluar la degradación preliminar de tiocianato y cianuro

Se construyó un reactor cilíndrico de PVC con una capacidad de 1.5 litros, su diámetro fue de 5.08 cm y su altura 75 cm. Se incorporó una válvula de entrada graduable en la parte inferior del reactor y una válvula de salida a 74 cm en la parte superior. Se reguló el flujo de entrada con una bomba de cromatografía líquida a una tasa constante de 0.2 mL min^{-1} , para garantizar un tiempo de retención hidráulico de 75 horas, la salida de la bomba se conectó con la válvula inferior del reactor. Se utilizó como eluyente medio de cultivo A descrito en la sección 2.2.2.2 [97].

El lecho fijo del reactor se construyó fijando el consorcio microbiano en piedras de arenisca estériles, de volumen irregular que se encontraba en un rango de 0.06 cm^3 a 0.12 cm^3 , para esto se sumergió las piedras en medio de cultivo A enriquecido con 100 ppm de cianuro y 200 ppm de tiocianato, se dejaron en agitación a 120 rpm durante 5 días [97,194].

Se incorporó al reactor el lecho de arenisca con una fracción de relleno del 40 %. Se puso en funcionamiento el reactor enriqueciendo el eluyente con 175 ppm de cianuro. Se hizo seguimiento diario de la reacción, determinando la concentración de cianuro por espectrometría UV-Vis hasta observar estado estacionario, es decir concentración constante en diferentes días de funcionamiento [90,97]

Finalizado el estudio con cianuro, se fijó nuevamente el consorcio microbiano en el lecho fijo y se incorporó en el reactor con una fracción de relleno del 40 %. Se enriqueció el eluyente con 300 ppm de tiocianato. Se hizo seguimiento diario de la reacción, y se cuantifico la concentración de tiocianato mediante cromatografía iónica hasta observar estado estacionario [94,97]

3. Capítulo III – Resultados y discusión

3.1 Estandarizar las condiciones cromatográficas para la cuantificación de especies cianuradas por cromatografía de intercambio iónico con detector de conductividad

3.1.1 Análisis mediante cromatografía iónica

La cromatografía iónica (IC) ha sido una técnica apropiada para la determinación de varios iones orgánicos e inorgánicos pequeños, la eficiencia de separación en IC depende principalmente de parámetros como el sustrato, tipo de columna, tamaño de partícula, temperatura, eluente, presión, entre otros factores [195]. Teniendo en cuenta lo anterior es necesario establecer los valores óptimos de cada parámetro y de esta manera lograr una separación eficiente de los analitos evaluados con esta técnica.

El análisis cromatográfico se realizó utilizando una columna Dionex IonPac AS20 (4 x 250 mm), de la cual hay reportes de presentar buena selectividad por los aniones empleados en esta investigación. Se reporta también separaciones de estos aniones utilizando KOH como eluente, variando su concentración entre 10 y 30 mM [162].

Inicialmente, se analizó la separación de los aniones de interés empleando el método sugerido por el simulador de condiciones de separación que incorpora el software Chromeleon versión 7.2. La Figura 15 muestra el cromatograma obtenido con estos parámetros.

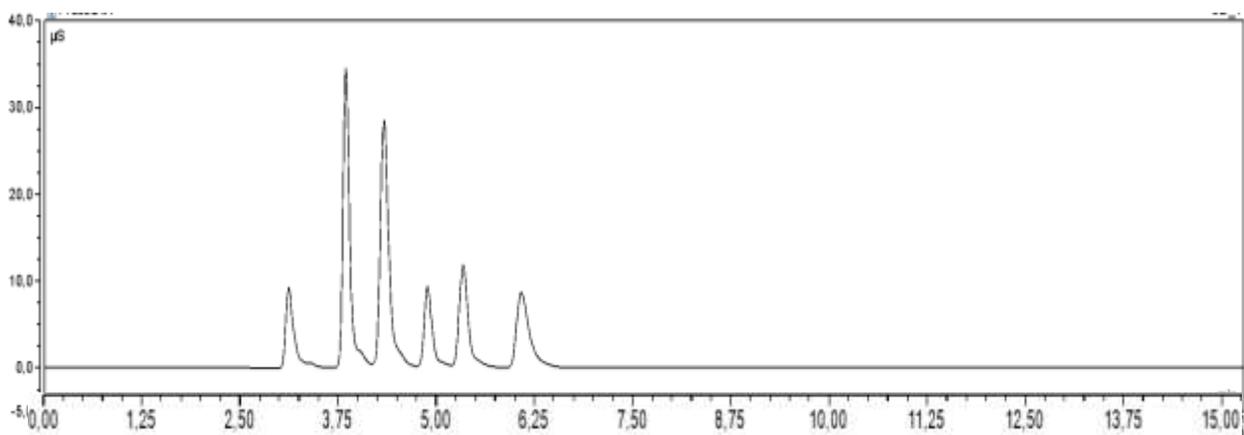


Figura 15. Cromatograma inicial con condiciones simuladas. Condiciones de análisis: flujo 1 mL min^{-1} , Eluente 27 mM de KOH, Temperatura $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$, Supresor 67 mA.

Los aniones inyectados fueron Br^- , Cl^- , PO_4^{3-} , NO_3^- , NO_2^- , SO_4^{2-} y SCN^- . En el cromatograma se observan seis picos de los siete esperados, esto sugiere que el método empleado no es apropiado para la separación de cada ion.

Se modificó el flujo en un rango de 0.8 mL min^{-1} a 1.2 mL min^{-1} , teniendo en cuenta los reportes de Lammarino *et. al.* [197], Haddad *et. al.* [198], y Gen *et. al.* [199], quienes en sus experimentos mantuvieron constante el flujo en 1.0 mL min^{-1} , sugiriendo que para la matriz de aniones analizada este factor no influye significativamente en la separación, porque las interacciones iónicas entre la fase móvil y la fase estacionaria son más fuertes que el efecto del flujo. Por su parte Zhang *et. al.* [200], utilizó diferentes valores de flujo en un rango de 0.4 mL min^{-1} a 0.8 mL min^{-1} , pero en matrices que contienen aniones orgánicos de mayor volumen en los cuales las interacciones iónicas son más débiles, sugiriendo que en este tipo de compuestos el flujo influye significativamente en la separación. Cabe resaltar que, en los estudios realizados por Zhang, los tiempos de análisis aumentaron considerablemente.

Experimentalmente se evidenció leves variaciones en la separación de los aniones estudiados en un rango de 0.8 mL min^{-1} a 1.0 mL min^{-1} , ya que únicamente cambiaban los tiempos de retención de cada anión, pero persistía el solapamiento de señales. No se trabajó con flujos por debajo de 0.8 mL min^{-1} , porque el tiempo de elución de cada pico aumentaría, provocando que los tiempos de análisis de todo el conjunto de aniones estudiados aumente considerablemente. Por otra parte, no se utilizó flujos por encima de 1.0 mL min^{-1} , porque esto puede provocar fraccionamiento en la fase estacionaria de la columna o acumulación de residuos en ella, afectando su capacidad de separación [195].

Teniendo como base el método sugerido por software Chromeleon, se realizaron variaciones en la concentración de eluyente entre 20 mM a 30mM, Chen *et. al.*, sugiere que este rango de concentraciones de eluyente es adecuado para separar estos aniones [196]. En la figura 15 se observó que a concentración de 27 mM de KOH hay un pico solapado, al bajar esta concentración hasta 25 mM, se evidenció la aparición de un nuevo pico, pero existe solapamiento en la señal de dos aniones (figura 16). Al disminuir la concentración de eluyente hasta 24 mM se encontró que la separación de los picos mejora porque aparece una señal para cada anión inyectado (figura 17).

Al disminuir la concentración por debajo de 21 mM de KOH, se obtuvo un nuevo solapamiento entre los picos. Con los resultados obtenidos se determinó que el eluyente afecta significativamente la separación de los picos, pero es necesario establecer cuál es

el mejor valor para emplear en el método, dentro del rango que se obtuvieron separaciones (21 mM-24 mM).

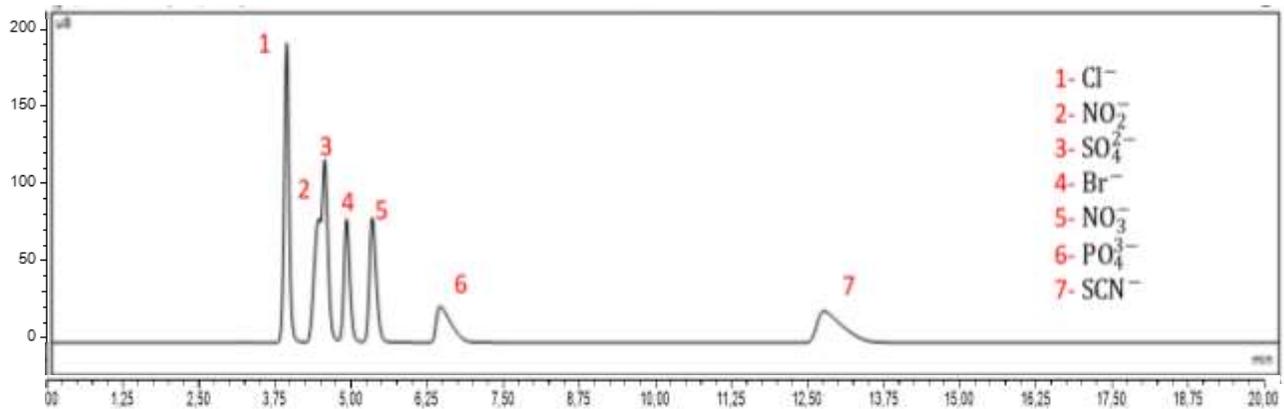


Figura 16. Ensayos preliminares en la separación de picos. Condiciones de análisis: flujo 1 mL min^{-1} , Eluente 25 mM de KOH, Temperatura $30 \text{ }^\circ\text{C}$, Supresor 59 mA .

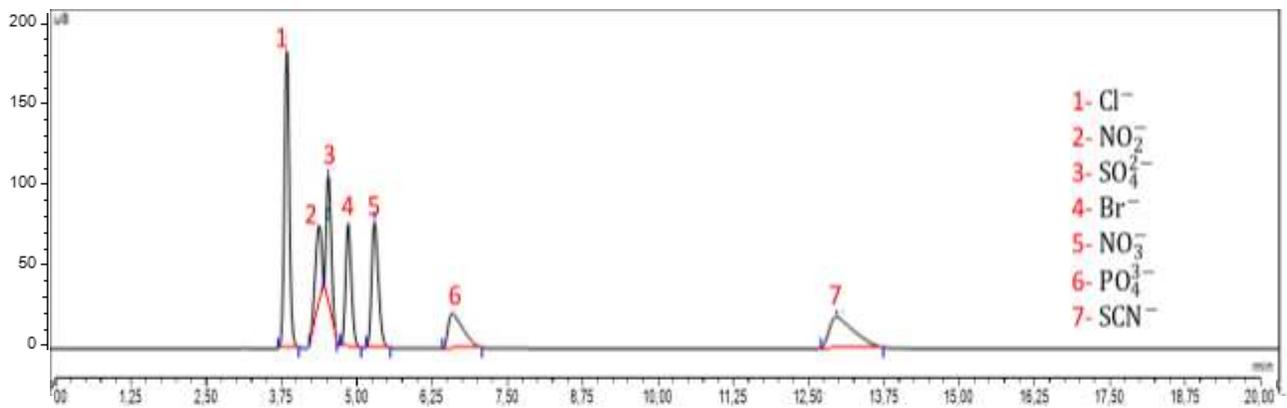


Figura 17. Ensayos preliminares en la separación de picos. Condiciones de análisis: flujo 1 mL min^{-1} , Eluente 24 mM de KOH, Temperatura $30 \text{ }^\circ\text{C}$, Supresor 56 mA .

La resolución indica la capacidad de una columna para separar los picos de interés, permitiendo medir la calidad de una separación [201]. En este punto se pudo separar los picos de cada analito estudiado, pero no se tiene una buena resolución de ellos, la Tabla 12 muestra los resultados obtenidos para cada anión analizado.

Según la tabla y el cromatograma los picos 2 y 3 se encuentran muy cercanos, evidenciando resoluciones bajas para el pico 3. Es necesario mejorar el método buscando valores óptimos para este parámetro cromatográfico, obteniendo valores por encima de 1.5 y en caso de no ser posible lograr llevarlo a 1.3, que es un valor aceptable según la literatura [202].

Tabla 12. Resoluciones preliminares de los picos estudiando por cromatografía iónica

Pico	Aniones	Tiempo de retención (t _r) (min)	Resolución (R)
1	Cloruro	3.912	2.920
2	Nitrito	4.454	1.540
3	Sulfato	4.727	1.220
4	Bromuro	4.959	2.490
5	Nitrato	5.412	5.070
6	Fosfato	7.118	9.730
7	Tiocianato	13.315	n.a.

De acuerdo a los ensayos preliminares, se ha obtenido información sobre el comportamiento de algunas variables en el método cromatográfico, lo que facilitó el diseño experimental a realizar para lograr la optimización del método y mejorar la resolución de los picos de interés.

3.1.2 Determinación de las mejores condiciones de análisis por cromatografía iónica

Con los ensayos preliminares, fue posible establecer que la temperatura y la presión del cromatógrafo no afectan significativamente en la separación de los aniones. Sin embargo, la concentración de eluyente y posiblemente el flujo afecte la resolución de cada pico.

Para optimizar el método se hizo un diseño experimental con seis variables respuestas, las cuales son la resolución de cada pico mostrado en los cromatogramas (R1, R2, R3, R4, R5, R6). Se buscó valores por encima de 1.5 para este factor cromatográfico, ya que en la literatura se reporta separación óptimas que presenten este valor de parámetro [202].

En la Tabla 12 se observa que la mayoría de las resoluciones están por encima del valor óptimo, sin embargo, la resolución 3 no tienen un valor adecuado y no se evidencia una buena separación en el cromatograma de la Figura 17. Debido a esto, en el diseño experimental se dio una sensibilidad muy alta a las resoluciones 2 y 3, por estar en conflicto mutuo, buscando valores cercanos a 1.5 para ambas. También se les asignó un impacto de 5 para darle la máxima importancia a estas dos respuestas en el experimento y de esta manera, evitar afectar las otras variables respuestas.

Experimentalmente se observó como al favorecer las condiciones para R2 disminuye el valor de R3, por lo tanto, se optó por no maximizar estas variables respuestas. En consecuencia, se estableció como objetivo del diseño experimental lograr que ambas lleguen a un valor que se encuentre en un rango de 1.3 a 1.5.

En contraste, a las otras variables respuestas se les otorgó una sensibilidad media e impacto de 3 buscando maximizar sus valores porque no hay ningún tipo de conflicto entre ellas. Esto se hizo con el fin de lograr una optimización global del método cromatográfico, considerando tanto la separación de los picos de interés como el buen rendimiento general del análisis. La tabla 13 muestra la hoja de trabajo y los resultados obtenidos en el diseño experimental.

Tabla 13. Diseño experimental empleado, se muestra los resultados de cada experimento y como varia la resolución al modificar cada factor experimental

Ejecución	Eluente (mM)	Flujo (mL/min)	Resolución					
			R1	R2	R3	R4	R5	R6
1	21.0	0.8	2.969	1.786	1.070	2.629	5.309	9.559
2	21.5	0.8	2.952	1.468	1.262	2.481	4.972	8.966
3	22.0	0.8	2.943	1.216	1.504	2.412	4.799	10.344
4	22.5	0.8	3.016	1.009	1.768	2.386	4.362	10.734
5	23.0	0.8	3.204	0.832	2.174	2.356	3.992	11.110
6	23.5	0.8	7.790	0.906	2.455	2.333	3.639	11.454
7	24.0	0.8	5.900	1.353	2.137	2.302	3.315	11.725
8	21.0	1.0	2.950	1.835	1.078	2.568	5.075	8.957
9	21.5	1.0	2.913	1.543	1.216	2.485	5.069	9.725
10	22.0	1.0	2.883	1.254	1.427	2.387	4.601	9.833
11	22.5	1.0	3.220	1.019	1.702	2.323	4.215	9.984
12	23.0	1.0	3.086	0.863	2.023	2.295	3.864	10.494
13	23.5	1.0	3.289	0.571	2.367	2.278	3.586	11.024
14	24.0	1.0	6.807	1.062	2.336	2.249	3.279	11.439
15	21.0	0.8	2.952	1.780	1.086	2.614	5.220	9.191
16	21.5	0.8	2.952	1.468	1.262	2.486	5.038	9.741
17	22.0	0.8	2.961	1.204	1.504	2.412	4.713	10.286
18	22.5	0.8	3.039	1.007	1.789	2.386	4.298	10.458
19	23.0	0.8	3.212	0.829	2.155	2.356	3.985	11.156
20	23.5	0.8	7.756	0.963	2.461	2.316	3.653	11.599
21	24.0	0.8	6.118	1.237	2.224	2.293	3.291	11.685
22	21.0	1.0	2.947	1.923	1.009	2.626	5.448	9.219
23	21.5	1.0	2.931	1.550	1.192	2.490	5.002	9.435
24	22.0	1.0	2.899	1.259	1.427	2.387	4.568	9.683
25	22.5	1.0	2.939	1.040	1.684	2.328	4.269	10.135
26	23.0	1.0	3.086	0.863	2.023	2.295	3.893	10.529
27	23.5	1.0	3.300	0.619	2.321	2.294	3.569	10.888
28	24.0	1.0	7.253	0.853	2.562	2.265	3.228	11.289
29	21.0	0.8	2.969	1.797	1.065	2.627	5.275	9.253
30	21.5	0.8	2.956	1.464	1.266	2.477	4.931	9.624
31	22.0	0.8	2.943	1.216	1.504	2.412	4.799	10.344
32	22.5	0.8	3.004	0.996	1.796	2.373	4.316	11.087
33	23.0	0.8	3.190	0.840	2.149	2.347	3.992	11.177
34	23.5	0.8	7.790	0.915	2.466	2.320	3.656	11.483
35	24.0	0.8	6.328	1.180	2.262	2.306	3.409	12.014
36	21.0	1.0	2.929	1.923	1.027	2.633	5.440	9.250
37	21.5	1.0	3.637	2.310	1.262	2.841	8.656	14.895
38	22.0	1.0	2.915	1.239	1.425	2.381	4.691	9.987
39	22.5	1.0	2.953	1.044	1.678	2.333	4.248	10.087
40	23.0	1.0	3.101	0.868	2.023	2.295	3.864	10.390
41	23.5	1.0	3.272	0.609	2.340	2.278	3.579	10.914
42	24.0	1.0	6.720	1.122	2.290	2.261	3.256	11.536

En este diseño experimental como factores experimentales controlables se utilizó la concentración mM del eluente KOH en un rango de 21 a 24 mM. Este rango se seleccionó en base a los resultados obtenidos en los ensayos preliminares y por la separación obtenida en los cromatogramas mostrados en las Figuras 16 y 17. Se ha reportado que el flujo de corrida puede afectar la separación de los picos cromatográficos, por esta razón se utilizó esta variable como continua en un rango de 0.8 y 1.0 mL min⁻¹ [203].

Con estas condiciones se optó por emplear un diseño experimental factorial multinivel, porque permite estudiar múltiples factores y sus interacciones al mismo tiempo en un número relativamente bajo de experimentos. Cada ensayo se realizó por triplicado, dando un total de 42 ejecuciones. Con estas condiciones se tiene 38 grados de libertad en el error del método, lo que asegura que los efectos estimados sean estadísticamente significativos.

El análisis estadístico de los resultados se realizó con un modelo de interacciones entre los dos factores experimentales: flujo y concentración de eluente. La Tabla 14 muestra un resumen de los resultados del diseño experimental para todas las resoluciones estudiadas.

Para cada variable respuesta, se obtuvieron p-valores por debajo de 0.05, esto indica que el modelo estadístico ajustado bajo los parámetros establecidos es estadísticamente significativo al 5 % de significancia. El estadístico R-cuadrado muestra el porcentaje de variación en la respuesta que ha sido explicado por el modelo ajustado, en este caso el rango de valores de R-cuadrado varía de 73.68 % a 94.29 % [170].

Tabla 14. Resumen del análisis estadístico de los resultados del experimento

	R1	R2	R3	R4	R5	R6
Transformación	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno
p-valor	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Error estándar	1.1810	0.2580	0.1270	0.0700	0.5700	0.8500
R²	82.8700	73.6800	94.2900	75.6400	69.1000	77.5500
R² ajustado	76.3200	68.6400	93.5000	72.2600	64.8100	70.2600
Durbin-Watson	1.9962	1.7980	2.1411	1.8771	2.3195	2.3236
Autocorrelación residual lag 1	-0.0341	0.1930	-0.1991	0.1389	-0.1603	-0.1653

Los p-valor indican que los resultados de los experimentos son significativos y no se deben al azar, teniendo en cuenta los valores de R² hay margen para mejorar la capacidad de explicación del modelo y comprender mejor la relación entre los factores controlables y la

resolución de los picos cromatográficos. Con más ajustes y experimentos adicionales, es posible aumentar el R-cuadrado y obtener una comprensión más precisa y completa del proceso de separación cromatográfica [204].

Para establecer la influencia de cada ejecución en el diseño experimental, se calculó el estadístico Leverage (anexo 8), el cual fue de 0.1428. Repeticiones con valores altos de este estadístico tendrán un impacto inusual en el modelo ajustado comparado con otras ejecuciones [205].

En este diseño experimental no hay ensayos con más de tres veces el valor de Leverage medio, indicando un comportamiento normal de todas las repeticiones realizadas. La ausencia de errores en la medición de datos es un indicativo importante para la validez de los resultados y aumenta la confianza en la interpretación de los efectos de los factores controlables, sobre la resolución de los picos cromatográficos que en este caso es la variable respuesta [170,204].

El estadístico de Durbin-Watson es una prueba estadística que se utiliza para detectar la presencia de autocorrelación serial, un valor cercano a 2 indica que no hay autocorrelación serial, lo cual es un requisito para que un modelo de regresión sea válido [170,206]. Experimentalmente todas las variables respuestas estudiadas tuvieron un valor cercano a 2 para este estadístico, por lo tanto, no hay indicación de autocorrelación serial en los residuos, teniendo en cuenta lo anterior, los resultados del modelo no estarán sesgados y podrá explicar la relación entre las respuestas y las variables experimentales.

La autocorrelación residual de Lag 1 es una medida de la correlación entre los residuos de un modelo de regresión y sus valores anteriores. Un valor cercano a 0 indica que no hay autocorrelación residual. Si los residuos están correlacionados, entonces el modelo puede no estar ajustado adecuadamente a los datos [204,207]. Para todas las respuestas estudiadas se obtuvieron valores cercanos a 0 para este parámetro estadístico, lo cual sugiere que los residuos son independientes, indicando que el modelo está ajustado adecuadamente a los datos.

Para entender el comportamiento de cada variable respuesta en el experimento, es necesario analizar los estadísticos obtenidos, la tabla 15 resume el análisis de varianza para cada R. La tabla ANOVA divide la variabilidad de las respuestas en piezas separadas para cada uno de los efectos, entonces prueba la significancia estadística de estos comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental [206].

En la variable respuesta R1, se observa que un efecto tiene un p-valor menor que 0.05, indicando que la variable “eluyente” afecta significativamente la variabilidad de la respuesta con un nivel de confianza del 95.0 %. Por otro lado, la variable “flujo” y su interacción con la concentración de eluyente tienen p-valores mayores que 0.05, indicando que su influencia en la resolución de los picos cromatográficos no es estadísticamente significativa [208]. Los resultados obtenidos en el análisis de varianza para todas las variables respuestas muestran un comportamiento común, con valores-P por debajo de 0.05 para la concentración de eluyente. Esto demuestra que, en todas las respuestas esta variable es muy importante para explicar cómo se afecta la respuesta. Por otro lado, el flujo y su interacción con el eluyente no afectan significativamente a la varianza de la respuesta.

Tabla 15. Análisis de varianza individual para las resoluciones de cada pico cromatográfico.

Fuente	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Razón-F	p-valor
R1				
A: Eluyente	54.027	54.027	38.700	0.000
B: Flujo	2.836	2.836	2.030	0.162
AB	2.596	2.596	1.860	0.181
Error total	53.052	1.396		
R2				
A: Eluyente	3.855	3.855	60.300	0.000
B: Flujo	0.000	0.000	0.000	0.953
AB	0.304	0.304	4.760	0.035
Error total	2.393	0.064		
R3				
A: Eluyente	9.564	9.565	624.190	0.0000
B: Flujo	0.022	0.021	1.400	0.2448
AB	0.011	0.011	0.730	0.3994
Error total	0.582	0.015		
R4				
A: Eluyente	0.524	0.524	109.620	0.0000
B: Flujo	0.002	0.002	0.540	0.4680
AB	0.010	0.010	2.170	0.1493
Error total	0.181	0.005		
R5				
A: Eluyente	24.779	24.779	75.550	0.0000
B: Flujo	0.141	0.141	0.430	0.5153
AB	0.497	0.497	1.510	0.2260
Error total	12.463	0.327		
R6				
A: Eluyente	19.411	19.411	26.200	0.0000
B: Flujo	0.259	0.259	0.350	0.5580
AB	1.756	1.757	2.370	0.1320
Error total	28.158	0.741		

La tabla de distribución F proporciona los valores críticos de la prueba F para diferentes niveles de significancia y grados de libertad [206]. El valor crítico obtenido fue de 2,39 para un nivel de significancia de 0.05. En la tabla 15 se observa que la razón F del factor

experimental eluente, para todas las respuestas es mayor que el valor crítico, indicado que este factor tiene un efecto significativo en la variable respuesta. En contraste, la razón F para el flujo en todos los casos está por debajo del valor crítico, lo que sugiere que este no tiene un efecto significativo. La Figura 18 muestra los diagramas de Pareto para cada respuesta lo que permite una mejor comprensión del análisis de varianza [209].

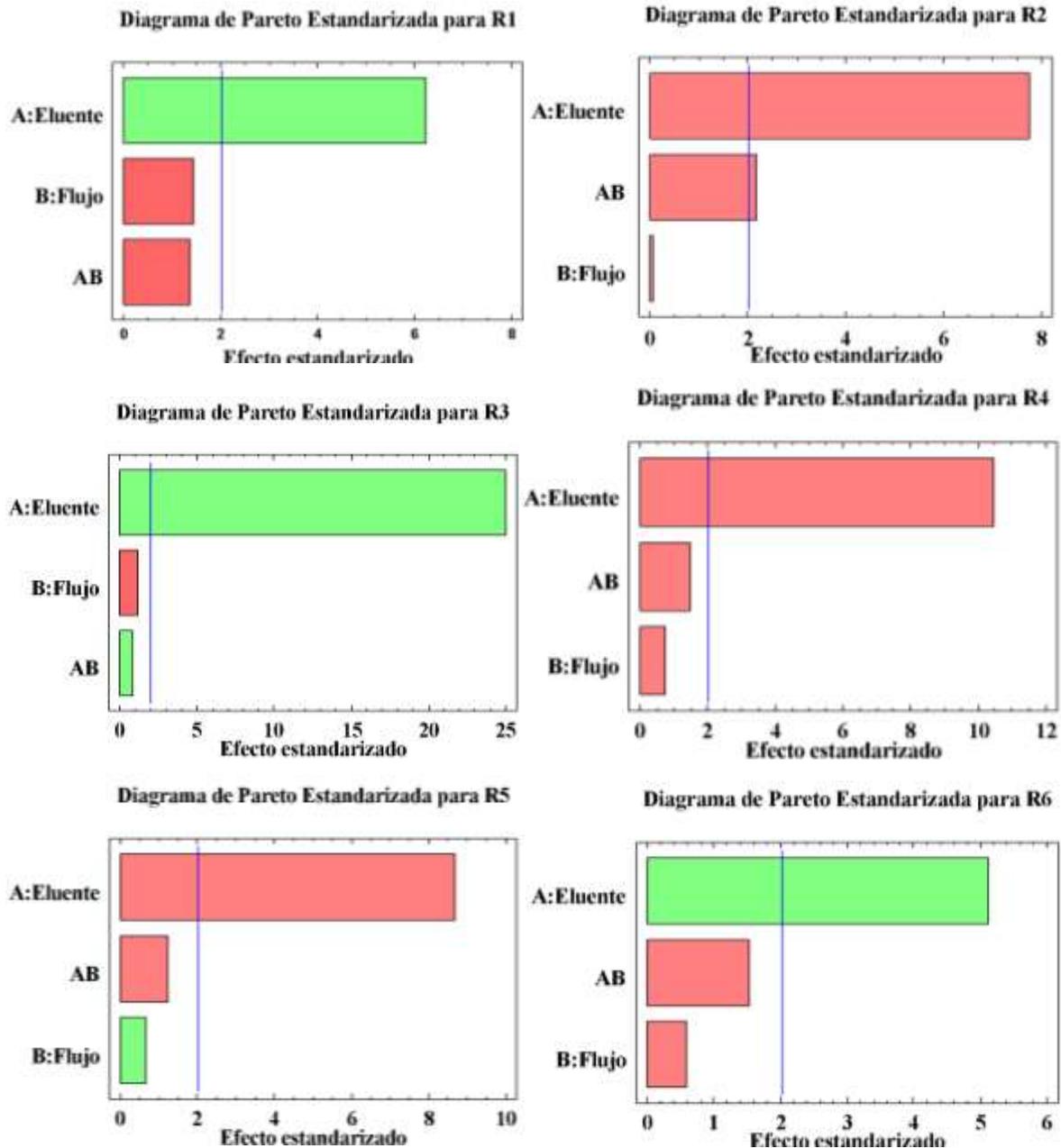


Figura 18. Diagramas de Pareto para todas las variables respuesta. Las barras en verde muestran que la variable respuesta aumenta al aumentar estos factores, lo contrario ocurre con las barras en rojo

La longitud de cada barra es proporcional al valor del estadístico *t* calculado para el efecto de cada factor experimental. Las barras fuera de la línea vertical azul son estadísticamente significativas para el diseño experimental con un nivel de confianza del 95 % [170].

En este caso, la concentración de eluente presenta un efecto principal que sobresale en todas las respuestas (*R*) analizadas. Esto indica que esta variable tiene un impacto significativo en el experimento. Por otro lado, el efecto del flujo y las interacciones entre eluente-flujo no tienen un efecto estadísticamente significativo, razón por la cual se podría fijar el flujo en experimentos futuros y variar únicamente la concentración de eluente [210]. Lo anterior se puede comprender mejor observando los gráficos de efectos principales mostrados en la Figura 19.

Cada línea indica el cambio estimado en el valor de la resolución (*R*) de los picos cromatográficos a medida que cada factor experimental se mueve de su nivel bajo a su nivel alto, mientras que todos los demás factores se mantienen constantes en un valor intermedio.

Según los diagramas de Pareto, se determinó que la concentración de eluente tiene un mayor impacto en la respuesta que los demás factores. Esto se confirma observando una pendiente más pronunciada para este factor, mostrando como la respuesta varía más al modificar los valores de concentración de eluente en todas las resoluciones analizadas. Por otro lado, se evidencia como el flujo no afecta significativamente el valor de la resolución en ninguno de los casos estudiados [211].

Para comprender mejor el diseño experimental y describir las relaciones entre los factores experimentales y cada variable de respuesta, se determinó las ecuaciones teniendo en cuenta que se realizó un modelo de interacción entre dos factores, estas se muestran a continuación:

$$R1 = -69.64 + 3.37A + 53.34B - 2.49AB \quad [4]$$

$$R2 = -9.19 + 0.46A + 19.13B - 0.85AB \quad [5]$$

$$R3 = -5.48 + 0.33A - 3.88B + 0.16AB \quad [6]$$

$$R4 = 1.80 + 0.030A + 3.45B - 0.16AB \quad [7]$$

$$R5 = -0.87 + 0.21A + 25.05B - 1.087AB \quad [8]$$

$$R6 = -45.46 + 2.52A + 45.23B - 2.04AB \quad [9]$$

Donde *R* corresponde a la resolución de cada pico cromatográfico, *A* es la concentración de eluente y *B* es el flujo del eluente.

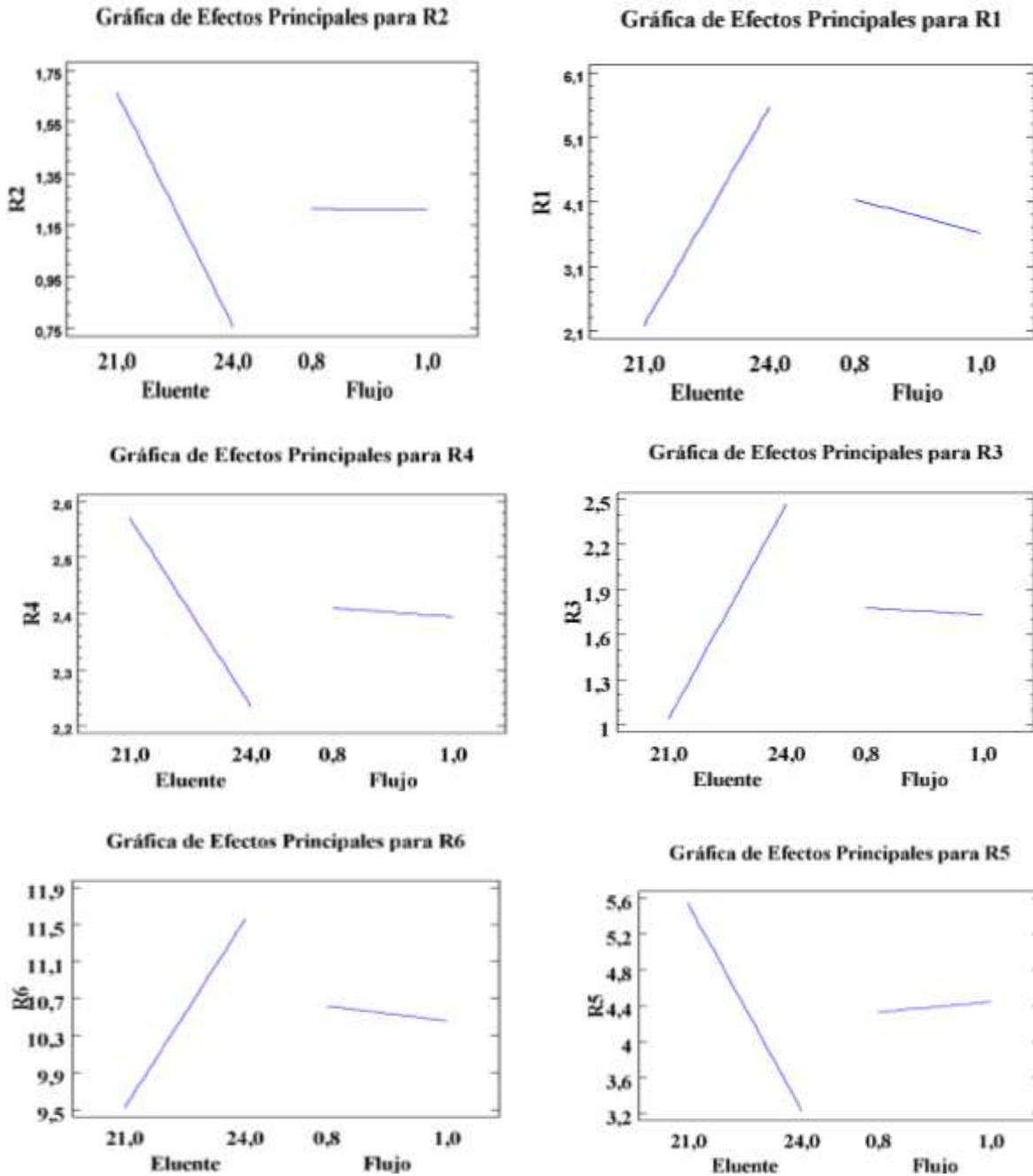


Figura 19. Graficas de efectos principales para todas las respuestas. En todas las respuestas se evidencia pendientes más pronunciadas en la variable eluente.

Con el propósito de comprender el modelo ajustado, se representó gráficamente con superficie de respuesta estimada el comportamiento de cada variable respuesta, que en este caso es la resolución de cada pico en el cromatograma, los resultados se muestran en la Figura 20.

En los gráficos de superficie de respuesta, la altura representa el valor pronosticado del rendimiento en el espacio de concentración de eluente y flujo. Al analizar las gráficas obtenidas para la resolución de cada pico (R1 a R6), se observa un comportamiento irregular, es decir, los valores de resolución no siempre aumentan o disminuyen de manera consistente al variar la concentración de eluente o flujo.

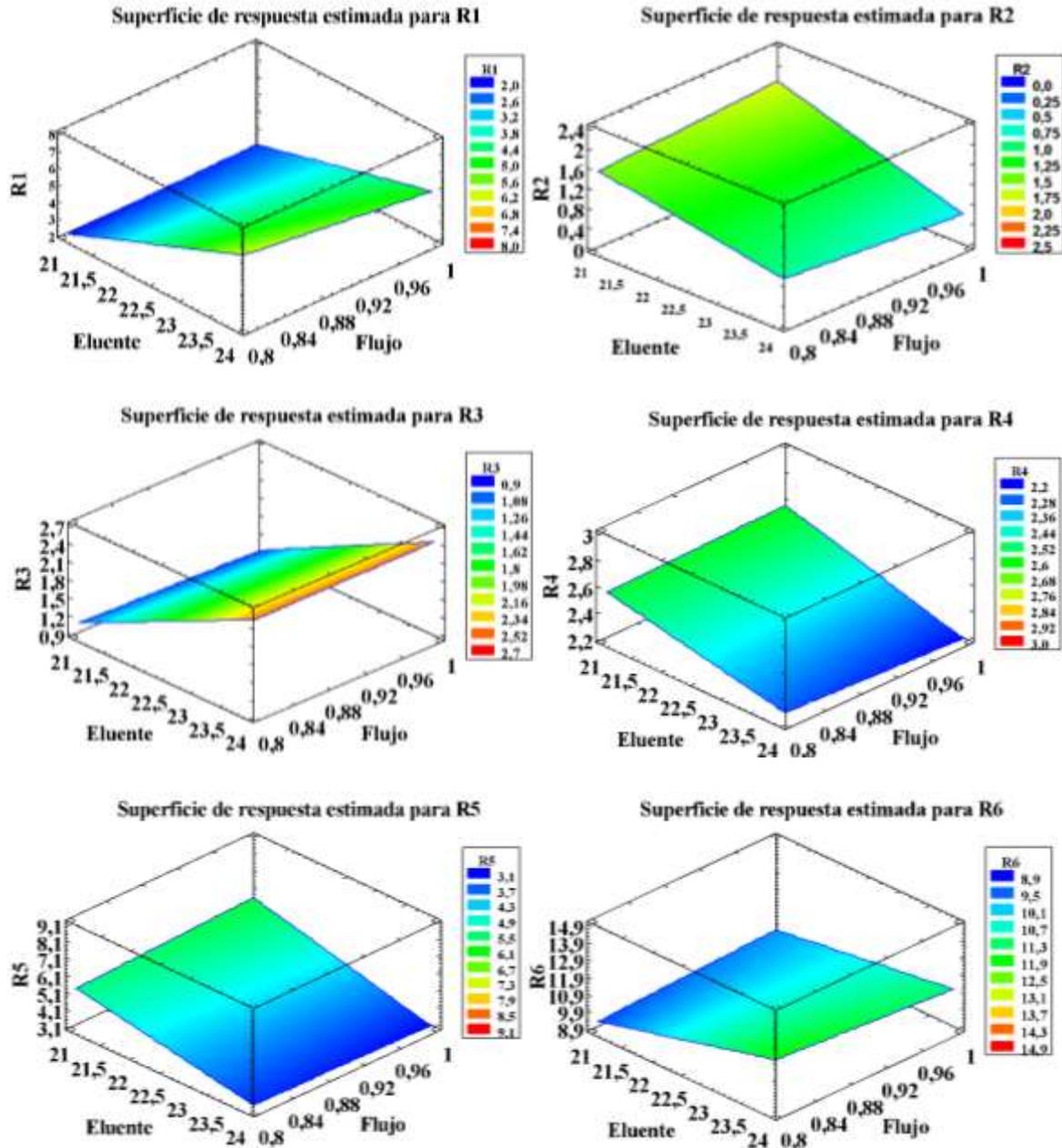


Figura 20. Gráficos de superficie de respuesta. La superficie en rojo indica los valores máximos de la respuesta, lo contrario ocurre con la coloración azul.

Se evidencian superficies de respuestas planas debido que la interacción entre las variables respuestas y los factores experimentales son lineales, tal como se evidencia en las ecuaciones del modelo ajustado (ecuaciones 4-9). Probablemente el modelo empleado en el diseño experimental no tiene la suficiente complejidad para capturar la relación no lineal, pero es probable que las superficies de respuesta planas sean una aproximación válida del comportamiento real.

En la superficie de respuesta de un modelo lineal, la concavidad o convexidad de la superficie se determina por los signos de los coeficientes del modelo. Si todos los coeficientes son positivos, la superficie será convexa. Si todos los coeficientes son negativos, la superficie será cóncava. Si algunos de los coeficientes son positivos y otros negativos, la superficie puede ser plana o tener una forma más compleja [238]. En todas las respuestas obtenidas experimentalmente los signos de los coeficientes de modelo fueron positivos y negativos, favoreciendo la formación plana en las superficies de respuesta mostradas en la figura 20.

Se ha determinado que las resoluciones R1, R3 y R6 se ven favorecidas al aumentar la concentración de eluyente, mientras que ocurre lo contrario con el resto de las resoluciones. Este fenómeno representa un problema aún mayor debido al comportamiento completamente opuesto entre las resoluciones 2 y 3. En este caso, un aumento en la concentración de eluyente favorece a uno, pero perjudica al otro.

Según la Tabla 13, en la ejecución 9 se obtuvieron los valores más altos en la resolución de cada pico cromatográfico. Sin embargo, no se puede utilizar las condiciones de análisis de esa repetición, porque el valor de la resolución en los picos 2 y 3 se encuentra por debajo del valor mínimo aceptado para este parámetro cromatográfico [212], el cromatograma se presenta en la Figura 21.

Según Rudnykh *et al.*, un gráfico de deseabilidad es una herramienta utilizada en el diseño de experimentos y la optimización de procesos para evaluar y visualizar cuán deseables son múltiples respuestas en un solo gráfico [207]. Según lo anterior y teniendo en cuenta que se realizó un diseño experimental con múltiples respuestas y que estas resultaron conflictivas entre sí, por variar su comportamiento de manera diferente conforme cambian las variables experimentales, se planteó encontrar las condiciones óptimas que maximicen todas las respuestas al mismo tiempo mediante un gráfico de deseabilidad.

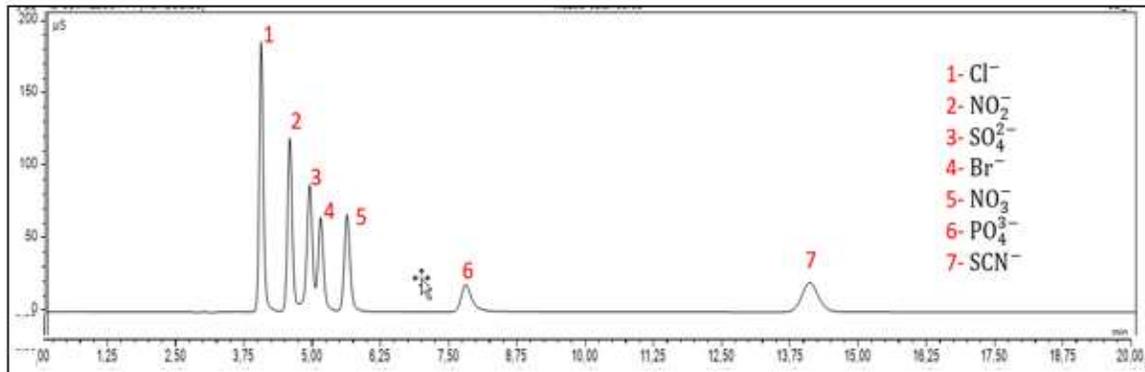


Figura 21. Cromatograma con las mejores condiciones establecidas en el diseño experimental.

Para lo anterior, se calculó la deseabilidad general del método, considerando la deseabilidad de cada respuesta [170,206]. Se dio mayor peso a la deseabilidad de las respuestas R2 y R3, correspondientes a las resoluciones de los picos 2 y 3, porque son los resultados más conflictivos y que se encuentran por debajo del valor de 1.5 el cual es aceptado para este parámetro cromatográfico [210,212].

El resultado se muestra en la Figura 22, donde se presenta la configuración óptima de los factores experimentales que garantizan la máxima resolución para todos los picos cromatográficos.

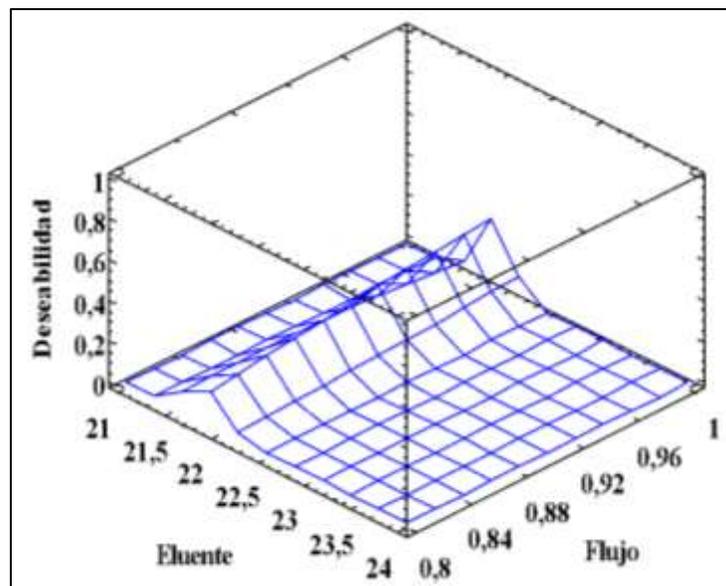


Figura 22. Gráfico de deseabilidad especificado para el diseño experimental. Este modelo tiene en cuenta todas las variables respuestas siendo las más importantes R2 y R3.

El gráfico obtenido, representa la deseabilidad global en función de los valores de eluente y flujo. Se encontró un conjunto de condiciones que maximiza la deseabilidad global, experimentalmente se obtuvo un valor de 0.30, esto indica que el diseño experimental es relativamente bueno para satisfacer los objetivos del estudio, pero que hay un margen de mejora, teniendo en cuenta todos los criterios de interés.

Cabe resaltar que el valor obtenido para la deseabilidad es bajo por las condiciones específicas que se suministraron a cada variable respuesta. Al analizar deseabilidad predicha para cada ejecución se encontró que la más alta fue en la ejecución 38, obteniendo un valor de 0.63, posiblemente si se diera el mismo impacto y sensibilidad a cada variable respuesta, el valor de la deseabilidad global sería más alto, Experimentalmente no se comprobó lo anterior por la imposibilidad de cambiar las condiciones de análisis en el software estadístico.

En este caso, en el máximo valor de deseabilidad se establece una concentración de eluente de 21.9 mM y un flujo de 1 mL min⁻¹. En la Tabla 16 se presentan los resultados predichos para cada respuesta bajo estas condiciones, así como sus respectivos límites de confianza y los resultados experimentales obtenidos.

Tabla 16. Resultados obtenidos bajos las mejores condiciones de análisis predichas y resultados experimentales

Respuesta	Predicción	Límite inferior 95.0 %	Límite superior 95.0 %	Experimental
R1	3.150	2.560	3.741	3.100
R2	1.414	1.288	1.541	1.510
R3	1.471	1.410	1.534	1.400
R4	2.620	2.528	2.520	2.510
R5	4.913	4.627	5.110	5.890
R6	10.209	9.779	10.640	12.080

Con este método, se logró obtener las mejores resoluciones para cada pico cromatográfico. Los resultados experimentales se encuentran dentro de los límites de confianza predichos por el software, destacando especialmente las respuestas R2, R3 y R4, las cuales presentaban mayores dificultades para alcanzar sus resultados óptimos.

Además, los valores de resolución para cada pico cromatográfico se encuentran dentro de los rangos aceptados según la literatura [202,203]. La Figura 23 muestra el cromatograma obtenido con las mejores condiciones de análisis obtenidas.

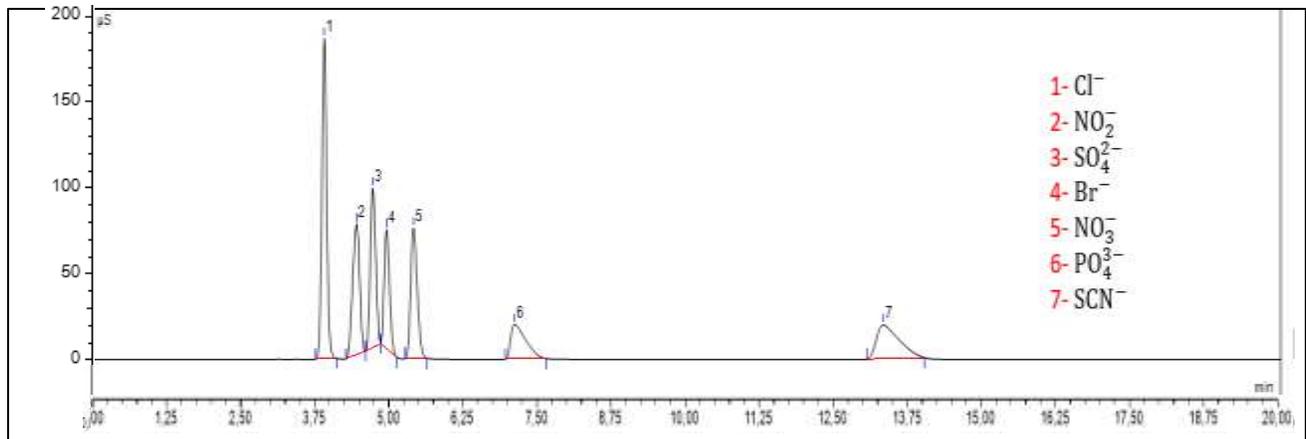


Figura 23. Cromatograma con las condiciones de optimización. Condiciones: flujo: 1 mL min⁻¹, eluyente: Isocratico 21.9 mM, temperatura: 30°C, Supresor: 53 mA.

La Tabla 17 resume los tiempos de retención y su repetibilidad en términos del coeficiente de variación para los aniones estudiados, se evidencia buena repetibilidad en la elución porque los valores del coeficiente de variación son inferiores a 0.103 % en todos los casos, indicando que la distribución de cada conjunto de datos está muy cerca de la media [212].

Tabla 17. Repetibilidad de los tiempos de retención bajo las condiciones óptimas del método cromatográfico

Pico	Aniones	Tiempo de retención (t _r) (min)	Desviación estándar (min)	Coefficiente de variación (CV) (%)
1	Cloruro	3.912	0.004	0.103
2	Nitrito	4.454	0.002	0.052
3	Sulfato	4.727	0.004	0.074
4	Bromuro	4.959	0.003	0.070
5	Nitrato	5.412	0.004	0.075
6	Fosfato	7.118	0.005	0.071
7	Tiocianato	13.315	0.004	0.030

Con los parámetros estadísticos obtenidos y análisis realizado se puede establecer que se cuenta con un método apropiado, para la identificación y cuantificación de tiocianato y otros aniones que pueden estar presentes en las aguas residuales. Sin embargo, es necesario establecer y verificar que este método cumple ciertos parámetros analíticos para poder ser empleado en el análisis de las especies mencionadas, en la siguiente sección se describe los resultados obtenidos para cada parámetro.

3.1.3 Determinación de parámetros analíticos del método usado.

3.1.3.1 Linealidad

El ajuste lineal de cada analito se realizó por regresión lineal teniendo en cuenta todas la replicas, para evaluar el comportamiento del área en función de la concentración en los diferentes niveles.

El supuesto de normalidad fue verificado mediante la prueba Shapiro-Wilk, analizando los residuos. Experimentalmente se obtuvo un valor de significancia mayor a 0.05 (p-valor 0.657), indicando que este conjunto de datos tiene una distribución normal.

El supuesto de independencia se verificó mediante la correlación entre datos experimentales. Se obtuvieron valores cercanos a 1 para cada analito, indicando una correlación positiva fuerte entre los datos.

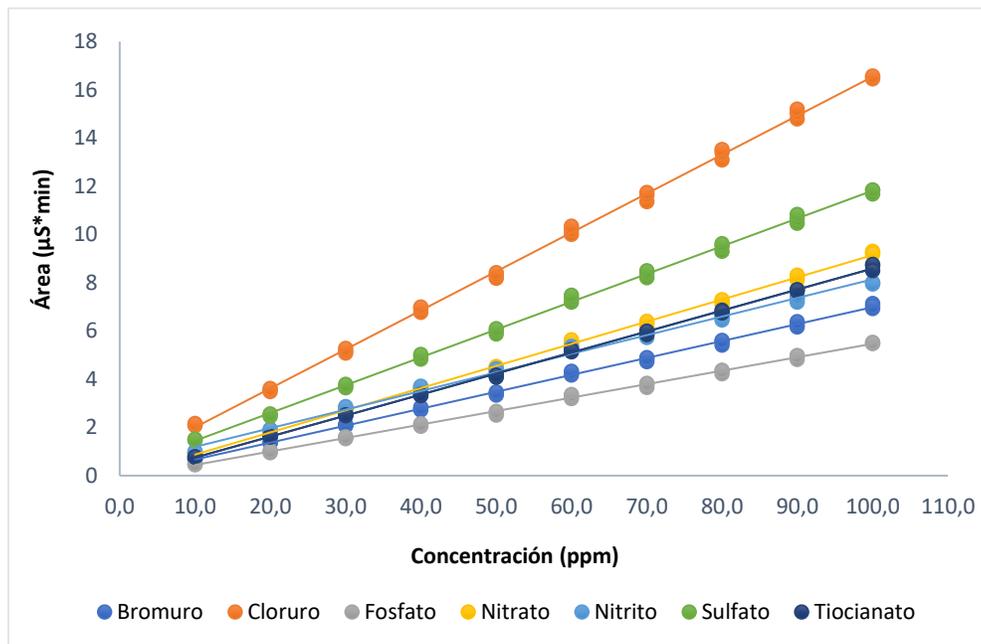


Figura 24. Recta de calibración del método de cuantificación para siete aniones, se evidencia un comportamiento lineal para cada analito

La verificación de la homocedasticidad se realizó mediante la prueba de Bartlett, obteniendo un p-valor de 0.075, lo que indica que las varianzas de la señal para los diferentes niveles de concentración son iguales [213].

Todos los supuestos fueron trabajados con una significancia del 5 %, de acuerdo con lo anterior los datos cumplen con los supuestos necesarios para realizar el ajuste lineal y obtener resultados confiables entre el área y la concentración de los analitos [213].

En el análisis de varianza se obtuvo un p-valor < 0.015 lo que indica que existe una relación significativa entre el área de cada pico y la concentración, con una significancia del 5 %, por lo tanto, se determinaron los parámetros representativos del modelo con sus desviaciones estándar y los coeficientes de determinación del análisis de la regresión. Los resultados se muestran en la Tabla 18.

Tabla 18. Análisis de regresión para los aniones

Analito	Intercepto b ($\mu S * min$)	Desviación estándar de b ($\mu S * min$)	Pendiente m ($\frac{(\mu S * min)}{ppm}$)	Desviación estándar de m ($\frac{(\mu S * min)}{ppm}$)	Coefficiente determinación R^2
Bromuro	-0.0400	0.0300	0.0702	0.0005	0.9986
Cloruro	0.3900	0.0600	0.1620	0.0010	0.9990
Fosfato	-0.1200	0.0300	0.0558	0.0004	0.9983
Nitrato	-0.0500	0.0400	0.0919	0.0006	0.9989
Nitrito	0.4200	0.0600	0.0772	0.0009	0.9959
Sulfato	0.2900	0.0500	0.1153	0.0008	0.9988
Tiocianato	-0.1200	0.0300	0.0870	0.0005	0.9992

3.1.3.2 Límite de detección y límite de cuantificación

El límite de detección (LOD) del método para cada anión fue determinado matemáticamente empleando la ecuación $LOD = 2 * t_{0.05;n-2} * s_0$, donde s_0 es la desviación estándar de la concentración predicha para una muestra blanco y n es el número total de puntos de la recta de calibrado por analito. El límite de cuantificación (LOQ) corresponde a 10 veces la desviación estándar del blanco ($LOQ = 10 * s_0$). Con base en estas ecuaciones se obtiene que los LOD y LOQ para los siete aniones son inferiores a 5.46 ppm y 13.33 ppm respectivamente, valores muy favorables porque permiten detectar y cuantificar concentraciones muy bajas de los analitos de interés [214].

3.1.3.3 Sensibilidad de calibrado

La sensibilidad de calibrado (S_C) corresponde a la pendiente de la curva de calibración (β_1) utilizada para la cuantificación ($S_C = \beta_1$). Se realizó una prueba de hipótesis t-student para determinar si existía una relación entre la variación de la señal a medida que cambia la concentración de analito. Se rechazó la hipótesis nula, es decir, la pendiente de la recta de

calibrado es diferente de 0 con una significancia del 5 % (p-valor < 0,001) en todos los casos [213].

Experimentalmente se obtuvieron valores por debajo de $0.1616 \mu\text{S}\cdot\text{min ppm}^{-1}$ para cada recta de calibración, indicando una buena sensibilidad del método porque registra variaciones en esa magnitud del área de cada pico por cada unidad (1 ppm) de variación en la concentración [213].

3.1.3.4 Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica (γ) es definida por la relación entre la sensibilidad de calibrado y el ruido instrumental (S_y) ($\gamma = \frac{S_c}{S_y}$). La sensibilidad analítica del método cromatográfico es un parámetro que permite realizar comparaciones entre diferentes métodos de análisis, se determinó el inverso de la sensibilidad analítica (γ^{-1}), la cual presentó valores inferiores a 1.19 ppm, indicando que, para la técnica analítica utilizada en 1.0 L de muestra, la mínima cantidad de analito que puede apreciarse es menor a 1.19 mg [214].

3.1.3.5 Rango lineal

Para determinar el cumplimiento del rango lineal se realizó la prueba de carencia de ajuste, la cual se determinó a partir de una prueba F, con esto se pretende determinar si la relación lineal entre el área de cada pico y la concentración es estadísticamente significativa o si puede ser explicada por el azar.

Se calculó el valor experimental de la prueba F, el cual está dado por la $F_{Exp} = \frac{(S_{y/x})^2}{(S_y)^2}$ donde F_{Exp} hace referencia a la falta de ajuste del modelo y $S_{y/x}$ es la desviación estándar debido a la falta de ajuste en el modelo de regresión. Las variables de la prueba F fueron determinadas a partir de la recta de calibración. En ninguna de las curvas de calibrado realizadas se pudo rechazar la hipótesis nula ($F_{Exp} < F$), es decir, no hacen falta términos de orden superior en ninguno de los modelos, y por ende los datos se comportan linealmente desde su límite de cuantificación hasta la máxima concentración evaluada (100 ppm), con una significancia del 5 % [213,215].

En la Tabla 19 se resumen las cifras de mérito evaluadas para cada uno de los siete aniones analizados mediante el método cromatográfico óptimo.

Tabla 19. Parámetros de validación para cada anión estudiado

Cifras de mérito	Bromuro	Cloruro	Fosfato	Nitrato	Nitrito	Sulfato	Tiocianato
Límite de detección (ppm)	3.1900	2.7100	3.4800	2.8400	5.4600	2.9400	2.4700
Límite de cuantificación (ppm)	7.7800	6.6100	8.4900	6.9300	13.3300	7.1700	6.0400
Sensibilidad de calibrado ($\mu\text{S}\cdot\text{min}$) / (ppm)	0.0702	0.1616	0.0558	0.0919	0.0772	0.1153	0.0871
Sensibilidad analítica (ppm) ⁻¹	0.9240	1.1210	0.8430	1.2120	0.9290	0.9690	1.4250
Inverso de la sensibilidad analítica (ppm)	1.0800	0.8900	1.1900	0.8300	1.0800	1.0300	0.7000
Rango lineal (ppm)	7.7800 – 100.0000	6.6100 – 100.0000	8.4900 – 100.0000	6.9300 – 100.0000	7.7800 – 100.0000	7.1700 – 100.0000	6.0400 – 100.0000

3.1.3.6 Precisión

La precisión establece que tan cerca están entre sí múltiples mediciones, en este caso se analizó este parámetro evaluando la repetibilidad instrumental en tres niveles de concentración: bajo (20.0 ppm), medio (50.0 ppm) y alto (80.0 ppm), utilizando como variable respuesta el área de cada pico [213].

La precisión intradiaria (repetibilidad) se evaluó en términos del coeficiente de variación (CV) inyectando en el mismo cromatógrafo y día, siete réplicas para cada nivel de concentración, por el mismo analista [171].

La precisión interdía (intermedia) fue expresada por el CV de los resultados de quince réplicas realizadas en tres días sucesivos (cinco análisis por día para cada nivel de concentración), que fueron realizadas por el mismo analista y en el mismo instrumento [171]. Los resultados obtenidos de las áreas y las pruebas realizadas se presentan en la Tabla 17.

Por lo general, cuanto menor sea el coeficiente de variación, más consistente y preciso será el valor promedio de la respuesta, esta manera, se afirma de acuerdo con los resultados obtenidos que el método cuantitativo es preciso, dado que en todos los niveles de concentración donde se evaluó la precisión, el coeficiente de valoración fue menor al 5 %, valores aceptados por la bibliografía para este tipo de análisis [171,215].

Tabla 20. Resultados de las precisiones intradiarias e interdiarias a tres niveles de concentración

Analito	Intradía									Interdía (n = 15)		
	Día 1 (n = 5)			Día 2 (n = 5)			Día 3 (n = 5)					
	\bar{x}	s	CV	\bar{x}	s	CV	\bar{x}	s	CV	\bar{x}	S	CV
Concentración de 20 ppm												
Cloruro	3.3190	0.0380	1.1380	3.4120	0.0250	0.7220	3.3430	0.0150	0.4590	3.3580	0.0480	1.4260
Nitrito	1.7770	0.0210	1.2010	1.8750	0.0390	2.0750	1.8130	0.0080	0.4420	1.8210	0.0480	2.6530
Sulfato	2.4180	0.0220	0.9180	2.4950	0.0230	0.9220	2.4640	0.0140	0.5630	2.4590	0.0380	1.5320
Bromuro	1.3630	0.0130	0.9820	1.4130	0.0170	1.2040	1.4090	0.0100	0.6790	1.3950	0.0270	1.9040
Nitrato	1.7710	0.0170	0.9520	1.8220	0.0170	0.9300	1.8080	0.0090	0.5160	1.8010	0.0260	1.4580
Fosfato	0.9440	0.0050	0.5470	0.9990	0.0450	4.5050	0.9740	0.0140	1.4330	0.9720	0.0340	3.5380
Tiocianato	1.6000	0.0090	0.5480	1.6710	0.0090	0.5580	1.6470	0.0100	0.6280	1.6390	0.0320	1.9360
Concentración de 50 ppm												
Cloruro	8.5430	0.0140	0.1610	8.6800	0.0120	0.1360	8.3970	0.0290	0.3410	8.5400	0.1210	1.4160
Nitrito	4.2960	0.0390	0.9150	4.4840	0.0530	1.1900	4.2040	0.0440	1.0400	4.3280	0.1280	2.9540
Sulfato	6.1830	0.0240	0.3840	6.2980	0.0300	0.4770	6.1090	0.0220	0.3660	6.1970	0.0840	1.3510
Bromuro	3.5950	0.0130	0.3690	3.6780	0.0290	0.7870	3.5810	0.0190	0.5310	3.6180	0.0480	1.3360
Nitrato	4.6740	0.0180	0.3940	4.7630	0.0120	0.2480	4.6260	0.0080	0.1780	4.6880	0.060	1.2830
Fosfato	2.6690	0.0290	1.0920	2.7930	0.0380	1.3720	2.6490	0.0290	1.1090	2.7040	0.0730	2.6950
Tiocianato	4.3040	0.0280	0.6470	4.4480	0.0230	0.5220	4.3130	0.0280	0.6420	4.3550	0.0730	1.6680
Concentración de 80 ppm												
Cloruro	13.8020	0.0510	0.3690	14.0190	0.0850	0.6060	13.5470	0.1040	0.7650	13.7890	0.2140	1.5520
Nitrito	6.6350	0.0540	0.8170	6.7510	0.0650	0.9570	6.4290	0.0520	0.8160	6.6050	0.1480	2.2340
Sulfato	9.9360	0.0280	0.2870	10.0480	0.0710	0.7100	9.6940	0.0160	0.1680	9.8930	0.1580	1.6010
Bromuro	5.9130	0.0170	0.2790	5.9890	0.0450	0.7470	5.7750	0.0140	0.2470	5.8920	0.0960	1.6260
Nitrato	7.6660	0.0230	0.3050	7.7700	0.040	0.5210	7.5070	0.0120	0.1570	7.6480	0.1150	1.5010
Fosfato	4.5380	0.0290	0.6480	4.6270	0.0390	0.8440	4.4310	0.0400	0.9050	4.5320	0.0900	1.9800
Tiocianato	7.1300	0.0590	0.8280	7.3060	0.0470	0.6400	7.0590	0.0800	1.1320	7.1650	0.1220	1.7080

Por lo general, cuanto menor sea el coeficiente de variación, más consistente y preciso será el valor promedio de la respuesta, esta manera, se afirma de acuerdo con los resultados obtenidos que el método cuantitativo es preciso, dado que en todos los niveles de concentración donde se evaluó la precisión, el coeficiente de valoración fue menor al 5 %, valores aceptados por la bibliografía para este tipo de análisis [171,215].

Para comparar las diferencias entre las mediciones realizadas en los diferentes días se realizó un análisis anova. La hipótesis nula que se estableció es que no hay diferencias significativas entre las mediciones realizadas en diferentes días. La hipótesis alternativa es

que al menos una de las mediciones es diferente. La tabla 21 muestra los resultados obtenidos.

Tabla 21. Análisis estadístico anova para la precisión

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F	p-valor
Día	2	0.02	0.01	0.4	0.68
Residuo	18	0.05	0.003		
Total	20	0.07	0.003		

Dado que el valor p es mayor que la significancia estadística de 0,05, no se rechaza la hipótesis nula. Esto significa que no hay evidencia estadística de que las diferencias entre las mediciones realizadas en diferentes días sean significativas. Por lo tanto, se puede concluir que el método es preciso para la determinación de la concentración de un analito en las tres concentraciones estudiadas.

3.1.3.7 Exactitud

La exactitud se refiere a qué tan cercana está una medición al valor verdadero. Para evaluarla, se utilizó un proceso en el que se midió el porcentaje de recuperación en tres niveles de concentración: bajo, medio y alto, agregando una cantidad conocida de una sustancia de referencia a una muestra problema, hasta alcanzar las concentraciones establecidas [171].

El porcentaje de recuperación a los diferentes niveles de concentración de los analitos se calculó a partir de la ecuación 10:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{CS-C}{S} * 100 \% \quad [10]$$

Donde S corresponde al Spike o concentración de analito adicionado a la muestra, C es la concentración de analito en la muestra y CS es la concentración de analito después del dopaje [216]. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 22.

Se realizó un análisis de varianza el cual mostro que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los tres niveles de concentración evaluados, con una significancia del 5 %, previa verificación de los supuestos de normalidad, independencia y homocedasticidad de los datos.

Los porcentajes de recuperación obtenidos muestran mejores resultados a nivel bajo. Sin embargo, aunque se evidencie menor recuperación a niveles medio y alto a causa de los

valores de desviación estándar, los valores siguen estando por debajo de los recomendados para este tipo de análisis. Esto nos dice que el método de análisis cromatográfico tiene buenos valores de exactitud, porque sus resultados se acercan mucho al valor real de análisis [213,217].

Tabla 22. Porcentajes de recuperación en los niveles de dopaje empleados

Concentración dopaje (ppm)	Analito	% Recuperación	Desviación estándar
20	Sulfato	99.30	0.21
	Tiocianato	96.17	0.80
50	Sulfato	97.04	1.75
	Tiocianato	98.93	5.89
80	Sulfato	95.35	1.16
	Tiocianato	98.19	3.19

3.2 Aislar e identificar un consorcio de microorganismos con potencial degradador de especies cianuradas

A continuación, se resume brevemente los resultados obtenidos en este objetivo el cual se desarrolló en dos etapas. En la primera se evaluó el potencial degradador de especies cianuradas utilizando *Pseudomonas putida* ATCC 31483. En la segunda etapa se estudió la capacidad degradadora de cianuro y tiocianato con consorcio microbiano.

El microorganismo *P. putida* tolera elevadas concentraciones de cianuro y tiocianato en agar cetrimide, medio que posee una fuente de nitrógeno fácilmente asimilable. Al hacer la evaluación preliminar de la degradación de los sustratos mencionados en medio mineral (anexo 3), la bacteria no presentó crecimiento ni degradación de los compuestos cianurados. Se optó por hacer un proceso de adaptación el cual consistía en suministrar al medio, una fuente de nitrógeno de fácil asimilación como lo es la peptona y hacer repiques de esta bacteria en medios cianurados, disminuyendo gradualmente la concentración de peptona.

La bacteria no se adaptó a las condiciones, por lo tanto, no se logró degradar cianuro ni tiocianato con *P. putida*. Se realizó un muestreo en la zona minera de Manizales encontrando un consorcio microbiano con capacidad degradadora de sustratos cianuro y tiocianato. A continuación, se detalla los resultados mencionados en este resumen.

3.2.1 Ensayos preliminares de la evaluación de la capacidad degradadora de especies cianuradas por *Pseudomonas putida*

3.2.1.1 Reactivación, conservación y condiciones de cultivo de *P. putida*

Se adquirió *P. putida* ATCC 31483 para evaluar su capacidad degradadora de cianuro y tiocianato, ya que hay reportes de su capacidad de degradar contaminantes presentes en aguas residuales, como fenol y derivados de cianuro [175], debido a que estas bacterias han desarrollado adaptaciones metabólicas produciendo enzimas como la cinasa, la cual convierte el cianuro en compuestos inocuos, al utilizarlo como fuente de carbono y nitrógeno [49,175].

Inicialmente, la bacteria se encontraba inactiva y criopreservada. Para activarla y permitir su multiplicación y funcionamiento, se realizaron cambios ambientales y se suministraron nutrientes a través de un caldo nutritivo a base de soja tréptica. Estas nuevas condiciones condujeron a un cambio en los parámetros físicos en donde se encontraba el microorganismo, favoreciendo su crecimiento [178].

Para activar la bacteria se mezcló vigorosamente con el caldo TSB, posteriormente se procedió a sembrar en agar nutritivo para continuar la reactivación. Finalmente se hicieron nuevos repiques en agar cetrímide, que es un medio selectivo específico para este tipo de bacterias. El agar cetrímide permite el crecimiento exclusivo de bacterias del género *Pseudomonas* y facilita su identificación [22,176,178].

Se guardaron cajas Petri del último cultivo en agar cetrímide como banco de reserva, mientras que otras cajas se utilizaron como banco de trabajo, a partir del cual se obtuvieron las muestras necesarias para llevar a cabo los repiques requeridos en los experimentos a realizar con esta bacteria.

3.2.1.2 Caracterización de *P. putida* y evaluación preliminar de su tolerancia a especies cianuradas

La caracterización de una bacteria se debe realizar describiendo todas sus propiedades físicas visibles en las colonias formadas, como también se debe describir sus características a nivel microscópico haciendo uso de la tinción Gram y el microscopio (anexo 2). La Figura 25 muestra el cultivo de *P. putida* ATCC 31483 en agar cetrímide y su respectiva tinción Gram.

Morfológicamente las colonias obtenidas son elípticas, con superficie convexa, bordes bien definidos, blandas al tacto y textura lisa y uniforme, presentan color amarillo claro sin

formación de halo a su alrededor. Al observar la bacteria en el microscopio se determinó que es Gram negativo, en forma de bacilos y se encuentran agrupados en su mayoría, su apariencia morfológica sugiere la presencia de un flagelo, lo cual coincide con la descripción reportada por Singh *et al.* y Babu *et al.* [173,175].

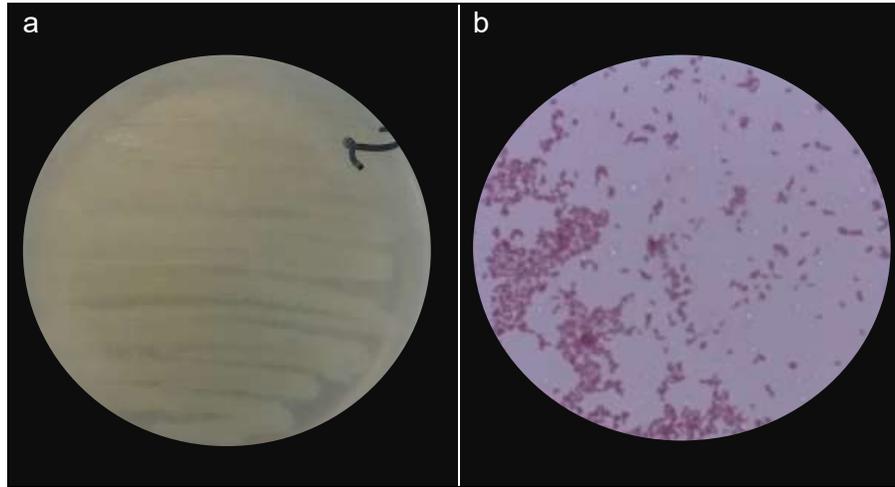


Figura 25. a. Cultivo de *P. putida* ATCC 31483 en agar cetrimide. b. Tinción Gram del cultivo de *P. putida* ATCC 31483 (100x)

Adicionalmente, con el objetivo de evaluar la tolerancia de *P. putida* ATCC 31483 frente a cianuro y tiocianato se prepararon medios sólidos de Agar cetrimide suplementado con estos compuestos (sección 2.2.1.2) [174]. Para este ensayo la concentración máxima de cianuro empleada fue de 250 ppm mientras que para tiocianato fue de 1000 ppm, estos valores son cercanos a los presentados en aguas residuales de minería. La Figura 26 muestra los cultivos de *P. putida* en medio cetrimide suplementado con cianuro, mientras que la Figura 27 muestra los cultivos obtenidos en medio cetrimide enriquecido con tiocianato.

La bacteria *P. putida* ATCC 31483 demostró tener tolerancia para crecer en agar cetrimide suplementado con concentraciones de cianuro inferiores a 180 ppm en 48 horas. Por encima de esta concentración, no se observó crecimiento bacteriano en 5 días de inspección. Lo anterior sugiere que el microorganismo *Pseudomonas* empleado cuenta con mecanismos de defensa y resistencia, que pueden incluir enzimas que permiten la asimilación del cianuro y su transformación en otros compuestos [178]. Sin embargo, estos mecanismos son limitados, ya que, a concentraciones más elevadas de cianuro, se inhibe el metabolismo celular y se evita que el oxígeno se aproveche para realizar la fosforilación oxidativa [178].

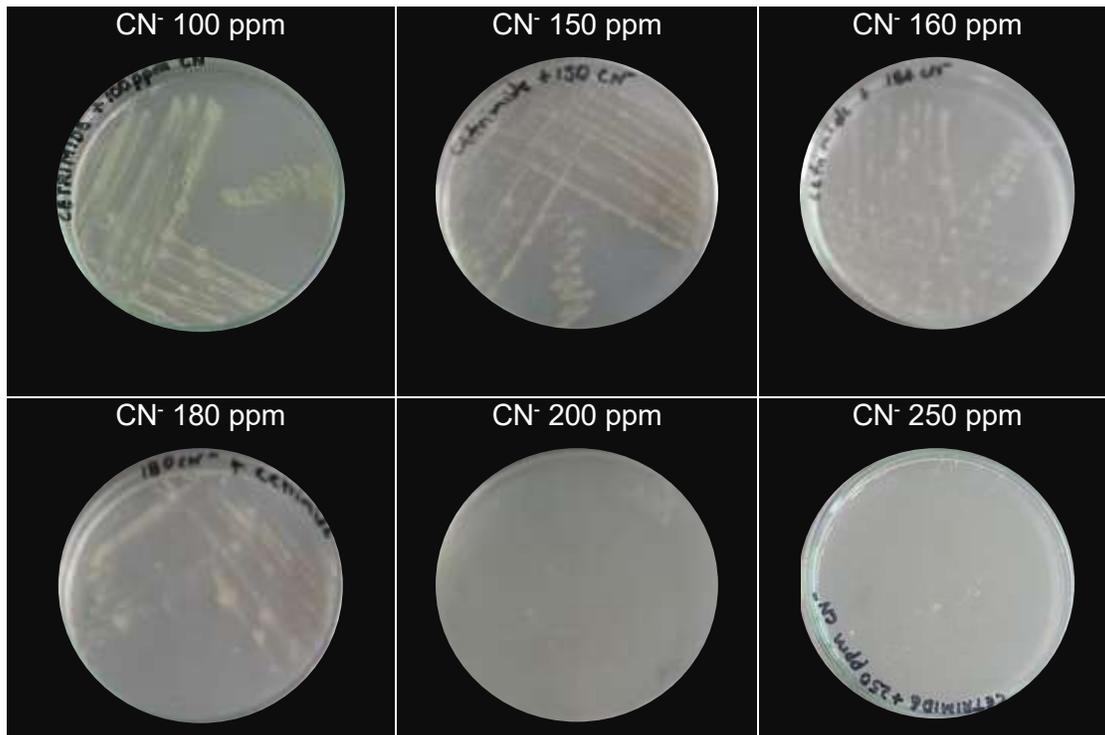


Figura 26. Prueba de tolerancia en cianuro. Se muestra en crecimiento de *P. putida* ATCC 31483 en varios niveles de concentración de cianuro empezando en 100 ppm hasta 250 ppm

La bacteria *P. putida* ATCC 31483 demostró tener tolerancia para crecer en agar cetrimide suplementado con concentraciones de cianuro inferiores a 180 ppm en 48 horas. Por encima de esta concentración, no se observó crecimiento bacteriano en 5 días de inspección. Lo anterior sugiere que el microorganismo *Pseudomonas* empleado cuenta con mecanismos de defensa y resistencia, que pueden incluir enzimas que permiten la asimilación del cianuro y su transformación en otros compuestos [178]. Sin embargo, estos mecanismos son limitados, ya que, a concentraciones más elevadas de cianuro, se inhibe el metabolismo celular y se evita que el oxígeno se aproveche para realizar la fosforilación oxidativa [178].

Los resultados mostrados en la Figura 27 muestran que *P. putida* ATCC 31483, crece en agar cetrimide con concentraciones de tiocianato por encima de 500 ppm en 24 horas. Esto indica que este compuesto es más tolerable en comparación con el cianuro. Además, sugiere que *P. putida* empleada puede asimilar mejor estos compuestos sin afectar sus procesos metabólicos vitales [218].

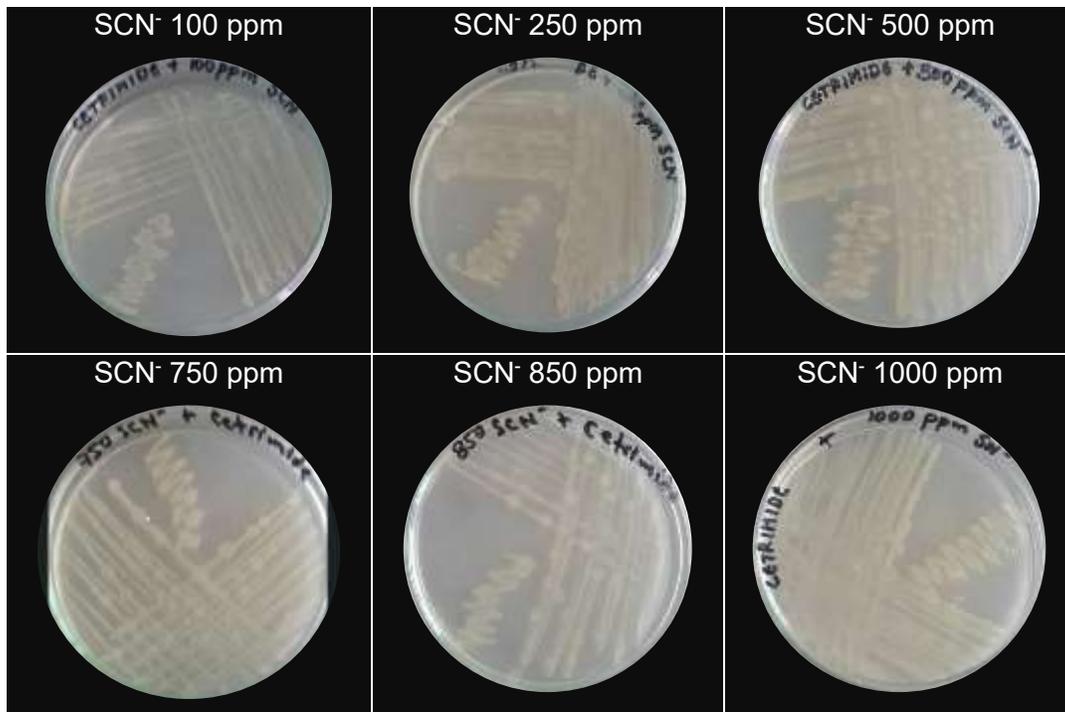


Figura 27. Prueba de tolerancia en tiocianato. Se evidencia el crecimiento de *P. putida* ATCC 31483 en varios niveles de concentración de 100 ppm hasta 1000 ppm

Los resultados muestran la capacidad de adaptación de *Pseudomonas putida* ATCC 31483 a compuestos de cianuro y tiocianato en agar cetrimide, lo que sugiere que poseen mecanismos de defensa y adaptación específicos. Sin embargo, estos mecanismos tienen límites, y concentraciones altas de cianuro son letales para la bacteria, mientras que el tiocianato es mejor tolerado [116,173].

Por otra parte, los ensayos se realizaron sobre medio cetrimide, el cual dentro de su composición posee nitrógeno de fácil asimilación. Posiblemente la bacteria *P. putida* tolera los compuestos cianurados, pero no los usa como fuente de nitrógeno porque prefiere asimilar el nitrógeno que le otorga el medio cetrimide el cual es más fácil de metabolizar [173,219]. Por esta razón se debe analizar la degradación de cianuro y tiocianato en medios que no tengan una fuente de nitrógeno, pero que contenga los minerales y nutrientes básicos para lograr el crecimiento del microorganismo *P. putida*.

3.2.1.3 Ensayos de degradación de cianuro y tiocianato mediado por *P. putida* en medio mínimo de sales.

El medio mínimo de sales se utiliza para el crecimiento de bacterias y hongos, y se compone de sales inorgánicas esenciales, así como una fuente de carbono y nitrógeno. La

composición de estos medios puede variar según los nutrientes específicos que necesite el microorganismo en estudio para su crecimiento. En este experimento, se probaron cuatro medios de cultivo sólidos diferentes (anexo 4), utilizando cianuro y tiocianato como fuentes de nitrógeno, y glucosa como fuente de carbono [94,107,179,180].

En los medios realizados, se sembró por agotamiento *Pseudomonas putida* ATCC 31483, con el fin de evaluar el crecimiento de esta cepa al metabolizar las especies cianuradas. En ningún medio empleado se evidenció crecimiento de esta bacteria. Esto sugiere posiblemente que *P. putida* usada es incapaz de asimilar el cianuro o tiocianato para usarlo como fuente de carbono y nitrógeno, y de esta manera alcanzar su proceso de replicación [175]. Experimentalmente se hizo seguimiento durante 5 días, pero al final de este tiempo, ningún medio de cultivo mostró crecimiento bacteriano.

Se optó por repetir los experimentos, pero adicionando peptona al medio 4, buscando un proceso de adaptación de la bacteria *Pseudomonas putida* a los sustratos cianurados para que los utilice como fuente de nitrógeno [15,174]. Se realizaron ensayos disminuyendo gradualmente la cantidad de peptona (Figura 21) y manteniendo constante la concentración de cianuro y tiocianato [183,184,220].

Al utilizar el 100 % de peptona, se observa un crecimiento abundante de colonias de *P. putida* ATCC 31483. A partir de este medio, se realizó un repique a un agar con una concentración de peptona del 30 %. La bacteria continúa creciendo, aunque en menor medida. De esta caja, se hizo un repique a un medio que contenía un 15 % de peptona, donde se observó un crecimiento escaso de colonias de *Pseudomonas*.

Posteriormente, se realizó una última transferencia a un medio que no contenía peptona, y se evidenció que el microorganismo no creció, lo que indica que la adaptación de la bacteria no fue posible.

Esto se puede deber a el medio de cultivo puede ser demasiado hostil para la bacteria y está ya está adaptada a otro medio. Según Nikolaev *et. al.* [221], si el microorganismo proviene de un entorno natural, puede estar adaptado a un medio que contiene una variedad de nutrientes y otros factores ambientales. Si se coloca en un medio de cultivo artificial, puede ser difícil que se adapte a las nuevas condiciones.

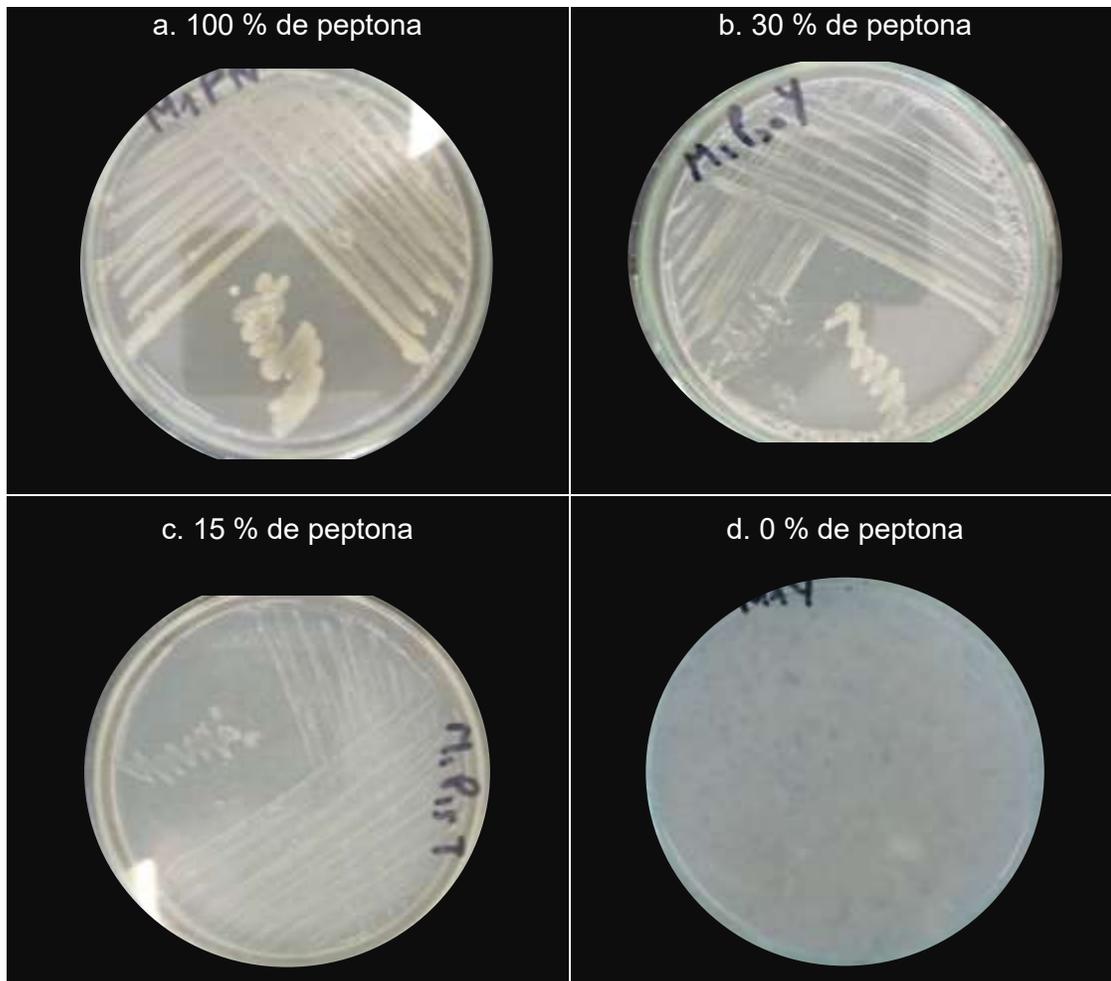


Figura 28. Resultados del proceso de adaptación del microorganismo a diferentes cantidades de peptona, empleando el medio 4.

De acuerdo con estos resultados, se concluye que la bacteria *P. putida* ATCC 31483 no es adecuada para la degradación de cianuro o tiocianato. Según Zhao *et al.* existe un gen biomarcador que provoca una característica biológica que permite degradar tiocianato llamado *CynS* identificado en una cepa de *Pseudomonas putida* [118]. Si bien es cierto que se empleó el mismo género de bacteria en esta investigación, las cepas son diferentes, es probable que la cepa ATCC 31483, no tenga este biomarcador o este inhibido debido a que en el entorno del que fue aislado no tenía la necesidad de activarlo, esto provocó que la bacteria no tenga las enzimas requeridas para asimilar el cianuro y tiocianato, para metabolizarlo y usarlo como fuente de carbono y nitrógeno.

Teniendo en cuenta los anteriores resultados, se optó por buscar un microorganismo nativo, de una zona minera que tuviera capacidad degradadora de estos compuestos.

3.2.2 Muestreo y aislamiento de un consorcio microbiano con capacidad degradadora de especies cianuradas.

3.2.2.1 Zona de muestreo

Los microorganismos degradadores de contaminantes, son capaces de utilizar estos compuestos como fuente de carbono y nitrógeno para su metabolismo y obtener energía [90,101]. En las aguas residuales de minería es posible encontrar diversas especies de bacterias, que se han adaptado a vivir en concentraciones elevadas de compuestos cianurados, debido a su exposición constante. Esta adaptación es posible porque activan enzimas que les permiten asimilar estos sustratos, para metabolizarlos y utilizarlos como fuente de nutrientes, transformándolos en otros compuestos inertes [222].

En Manizales, la zona de Malteria coordenadas geográficas 5°02'52.8"N 75°24'41.7". es uno de los sitios representativos de la actividad minera en nuestra región. Los efluentes contaminados con especies cianuradas producidos en las plantas de extracción de oro, se descargan directamente al medio ambiente. De acuerdo con la revisión bibliográfica, es posible encontrar microorganismos en esta zona capaces de degradar estas especies. Por tanto, se llevaron a cabo muestreos en esta área para encontrar un consorcio microbiano que permita degradar cianuro y tiocianato [107,108,115,147,179].

3.2.2.2 Ensayos de actividad del consorcio microbiano en la degradación de especies cianuradas.

Los microorganismos necesitan elementos y compuestos mínimos para lograr su crecimiento y reproducción, el medio de cultivo A usando 3.0 g de Na₂HPO₄, 1.5 g de KH₂PO₄, 0.25 g de NaCl, glucosa 10 mM y 1 mL de solución de metales traza por cada litro de solución (anexo 4), aporta estas características y ha sido reportado en la degradación de compuestos cianurados con un consorcio bacteriano. Sin embargo, es necesario establecer las condiciones óptimas en las cuales los microorganismos presenten mejor actividad biológica [179].

Para evaluar la degradación de las especies cianuradas se realizaron ensayos preliminares por triplicado utilizando 60 mL de medio de cultivo A líquido y 0.2 g de sedimento de la zona de muestreo; garantizando un contacto constante entre los microorganismos y los sustratos mediante una agitación a 200 rpm. Los ensayos se realizaron a diferentes pH durante 5 días de reacción [110,223]. La Tabla 23 muestra los resultados obtenidos en estos ensayos.

Tabla 23. Ensayos de degradación de cianuro y tiocianato utilizando consorcio microbiano de zona minera.

Fiola	pH	Promedio degradación CN ⁻ (%)	Promedio degradación SCN ⁻ (%)
1-3	6.0	0	
4-6	7.5	59	
7-9	7.8	69	
10-12	9.0	0	
Blanco	6.0, 7.5, 7.8, 9.0	0	
13-15	6.0		0
16-18	7.5		47
19-21	7.8		58
22-24	9.0		0
Blanco	6.0, 7.5, 7.8, 9.0		0

Los experimentos se realizaron con un blanco de control que consiste en el medio de cultivo A sin inóculo, en cada nivel de pH. Experimentalmente se observó que los medios de cultivo no presentan cambios significativos en la degradación de especies cianuradas cuando el pH está por debajo de 7.2 o por encima de 8.1. Esto sugiere que los microorganismos no están llevando a cabo sus funciones vitales en esos rangos de pH [223].

Sin embargo, en un intervalo de pH entre 7.5 y 7.8 se observaron cambios en los medios de cultivo, ya que se volvieron turbios con la formación de aglomerados de color blanco. Esto indica que los microorganismos están tomando el cianuro y tiocianato como fuente de nitrógeno para metabolizarlo y realizar sus procesos vitales y reproducirse [110]. Lo anterior se confirmó mediante lecturas en el espectrofotómetro UV-Vis para determinar la concentración de cianuro, y en el cromatógrafo iónico para determinar la concentración de tiocianato, después de la reacción.

Se observó la degradación de estas especies en diferentes rangos, demostrando que los compuestos cianurados fueron metabolizados por los microorganismos, utilizando estos compuestos como fuentes de nitrógeno. Estos resultados se ilustran en la Figura 29.

El cromatograma azul corresponde al análisis de la muestra en el día 1, aquí se observa el pico 4 que corresponde al tiocianato, mientras que el pico 2 corresponde al sulfato. En el cromatograma rosa, correspondiente al día 3 de reacción, se observa que el pico 4 del tiocianato va disminuyendo y el pico 2 del sulfato aumenta. Por último, en el cromatograma

negro, correspondiente al día 5 de reacción, se muestra que el pico del tiocianato ha alcanzado su mínimo, mientras que el pico del sulfato ha alcanzado su máximo.

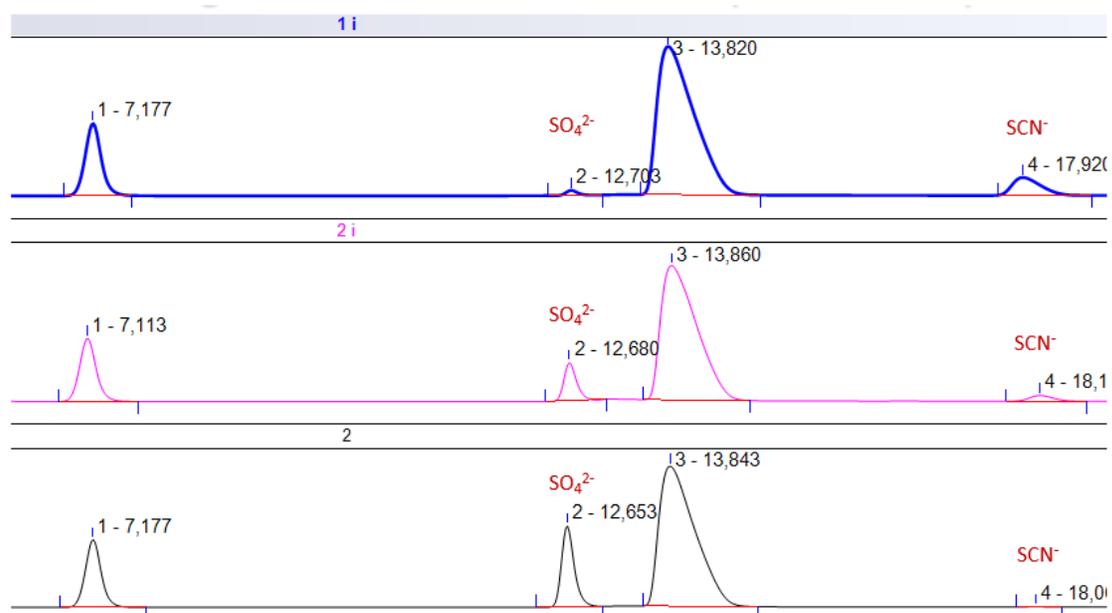


Figura 29. Cromatograma mostrando como la concentración de tiocianato disminuye en 3 días diferentes. Azul corresponde a día 1, rosa a día 3 y negro a día 5.

La degradación máxima de tiocianato en estos experimentos estuvo alrededor del 58 %. Estas observaciones sugieren que el consorcio bacteriano metaboliza este compuesto, transformándolo en sulfato y otras especies [65]. Esto concuerda con lo expuesto por Douglas *et al.* quien explica que el tiocianato se hidroliza inicialmente a cianato y sulfuro, posteriormente el cianato se hidroliza a amoníaco y dióxido de carbono por la enzima cianasa y el sulfuro se oxida a sulfato [224].

Por otra parte, Zhao *et al.* logro degradar tiocianato con un rendimiento del 79 %, el autor señala que los productos finales de la biodegradación fueron sulfato y nitrato [225]. Comparando estos resultados con este estudio, se obtuvo como subproducto sulfato, pero no nitrato, probablemente el nitrógeno tomó otra ruta metabólica para formar amonio [145]. No es preciso comparar los resultados de la biodegradación de tiocianato, porque los reportados por el autor se encuentran optimizados, mientras que los reportados en esta etapa de la investigación son los resultados preliminares.

La degradación máxima de cianuro determinada por espectrometría UV-Vis fue de 69 %, a un PH de 7.8, siguiendo la descripción realizada en la sección 2.1.5

Los cultivos líquidos que presentaron mayor porcentaje de degradación de cianuro y tiocianato a pH de 7.8, fueron almacenados y codificados como SM1 y SM2 respectivamente. La solución SM1 demostró actividad en la degradación de tiocianato, el cromatograma se muestra en el anexo 6, por esta razón se optó por realizar todos los ensayos de esta investigación con este consorcio microbiano.

Se determinó la cantidad de microorganismos presentes en la solución SM1, para esto se calcularon las unidades formadoras de colonia haciendo diluciones seriadas y sembrando en medio nutritivo sólido. La Figura 30 muestra el conteo de colonias obtenido.

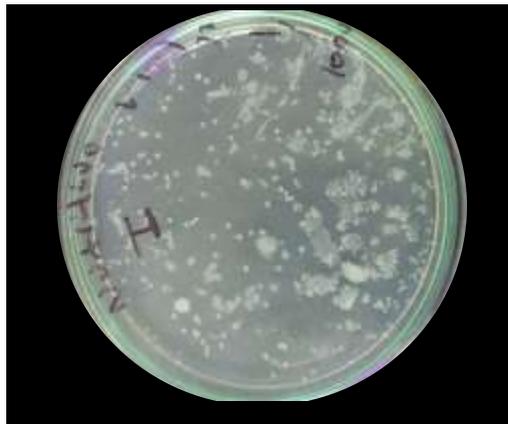


Figura 30. Unidades formadoras de colonia de la solución SM1 en una dilución 1/1000

Para esta solución se calcularon 2.4×10^7 UFC mL⁻¹, es decir se tiene esa cantidad viable de microorganismos por cada mililitro de solución, es una concentración que se encuentra en los mismos rangos exponenciales que lo reportado por otros autores, que utilizaron consorcios microbianos en la degradación de especies cianuradas [100,133].

Se identificó un consorcio microbiano capaz de degradar cianuro con rendimientos cercanos a los reportados por Khamar *et al.* [114] para este sustrato. Además, el mismo consorcio demostró habilidad para degradar tiocianato, aunque en menor proporción que lo reportado por Xiao *et al.* [115]. Es importante destacar que el consorcio empleado es capaz de degradar ambos sustratos cianurados, lo cual no es común según la revisión bibliográfica realizada. Esta capacidad podría ser de gran utilidad en el tratamiento de efluentes contaminados con estas dos especies.

Para conocer que microorganismos están presentes en el consorcio degradador que se encuentra en la solución SM1, se realizó un proceso de aislamiento y purificación para posteriormente secuenciar su ADN e identificarlos molecularmente.

3.2.2.3 Aislamiento de los microorganismos presentes en el consorcio microbiano

Para el aislamiento de microorganismos de la SM1 que contiene el consorcio microbiano, es necesario cultivar colonias en medios sólidos. Sin embargo, cuando se parte de soluciones con concentraciones elevadas de bacterias, es posible que no se evidencie la formación de colonias aisladas. Por lo tanto, se requiere preparar diferentes diluciones seriadas de la solución inicial como se describe en la sección (sección 2.2.3), para facilitar la formación de colonias y permitir un aislamiento más efectivo de los morfotipos diferentes [108,147].

Se realizó una siembra masiva de cada dilución en los agares cetrimide, nutritivo, cristal violeta y medio A. Al final del proceso, se observó la formación de colonias aisladas con características morfológicas diferentes a simple vista. Es importante destacar que se seleccionaron los medios sólidos en donde no se evidenció crecimiento masivo de microorganismos, para facilitar la inspección y recolección de morfotipos diferentes macroscópicamente hablando [226].

Cada medio fue suplementado con compuestos de cianuro y tiocianato, para procurar que los microorganismos no pierdan su actividad biológica frente a estos sustratos. Los agares fueron incubados a 24 °C. Se evidenció crecimiento en 24 horas en los medios cetrimide y nutritivo, mientras que en el medio cristal violeta demoro 48 horas y en el medio mínimo de sales el crecimiento empezó a los tres días, finalizando al quinto día. La Figura 31 muestra los resultados obtenidos.

Se utilizaron diferentes medios de cultivo sólidos en el proceso de aislamiento, ya que cada uno está diseñado para promover el crecimiento de grupos específicos de bacterias, lo que facilita su posterior identificación [95]. En este sentido, se realizó una inspección visual de cada medio con el fin de identificar colonias que presentaran características distintas entre sí. Se utilizaron como criterios: el color de la colonia, la forma de crecimiento, el borde, la textura, la consistencia y el tamaño. La Figura 32 muestra los morfotipos obtenidos en cada medio.



Figura 31. Medios sólidos usados en el crecimiento de colonias aisladas. a. Medio cetrimide con las diluciones 2 y 3, b. medio nutritivo con las diluciones 1 y 3. c. Medio cristal violeta con las diluciones 2 y 3. d. Medio mínimo de sales con las diluciones 1 y 2.

En el medio cetrimide y mínimo de sales se lograron identificar 5 morfotipos diferentes para cada uno. En el medio nutritivo se identificaron 4, mientras que en el medio cristal violeta se identificaron 2. Cada morfotipo aislado se repicó 5 veces en agar con características idénticas a los medios de los cuales provenían, con el objetivo de lograr su purificación.

En esta etapa, se lograron aislar un total de 16 morfotipos diferentes, cada uno de los cuales exhibió distintas características físicas como forma de la colonia, color y patrones de crecimiento, entre otros. Si bien es cierto que se encontró una amplia variedad de microorganismos con características únicas, no es posible determinar cuáles de ellos son capaces de degradar especies cianuradas, ya que todos los medios de cultivo utilizados contienen una fuente de nitrógeno de fácil asimilación, a excepción del medio mínimo de sales.

Por lo tanto, resulta necesario seleccionar aquellos microorganismos que pueden llevar a cabo la degradación de cianuro y tiocianato, para posteriormente realizar su identificación. En la siguiente sección se muestra los resultados obtenidos en la degradación preliminar de especies cianuradas con cada aislado.

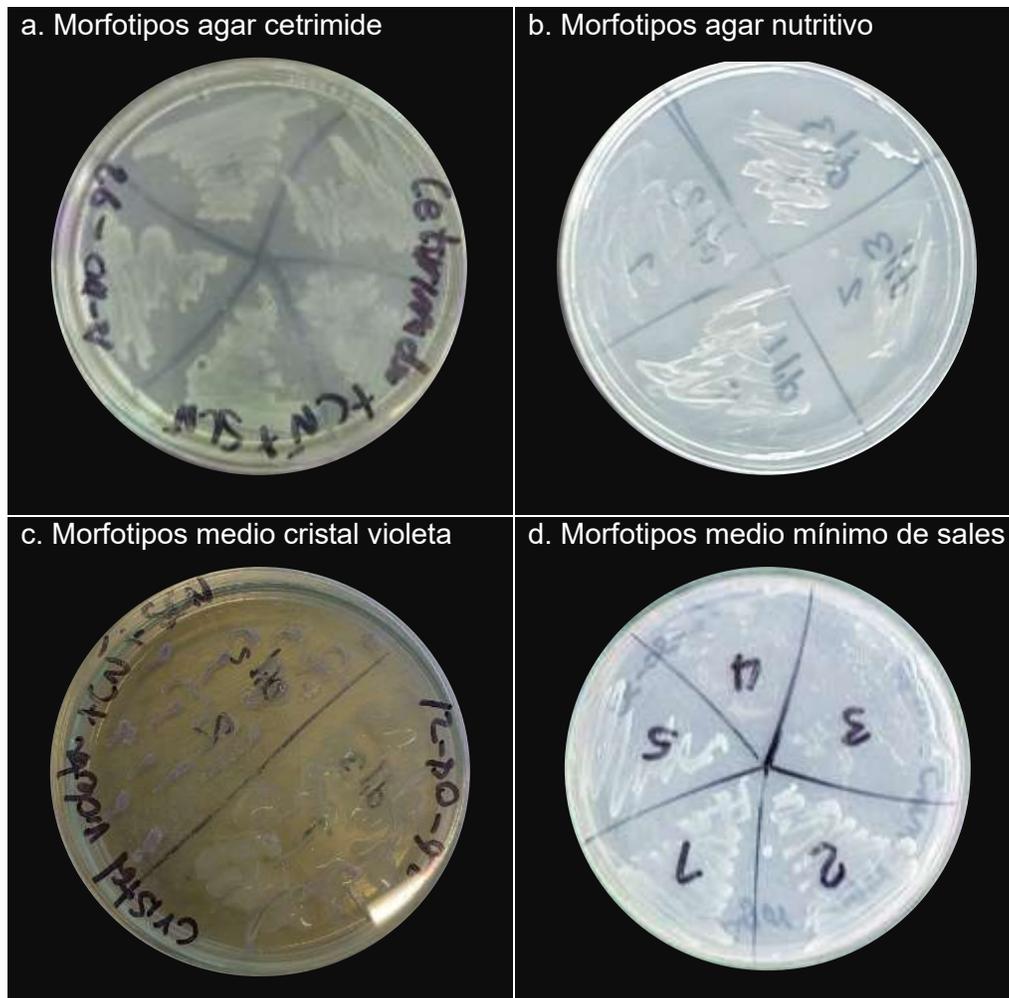


Figura 32. Morfotipos aislados en diferentes medios, los medios cetrimide y mínimo de sales fueron los que más morfotipos mostraron.

3.2.2.4 Ensayos de degradación preliminar de especies cianuradas utilizando los microorganismos aislados.

Antes de proceder con la caracterización macroscópica, microscópica y las pruebas bioquímicas de cada morfotipo aislado y purificado, se decidió ensayar la degradación de estos frente a cianuro y tiocianato, para caracterizar únicamente los microorganismos que presentaron actividad biológica frente a estos sustratos.

Se utilizó el medio líquido A, y como fuente de nitrógeno se emplearon tiocianato a una concentración de 200 ppm y cianuro a 100 ppm, siguiendo los protocolos establecidos previamente en el laboratorio para este medio (sección 2.2.2.2). Cada aislado se sembró en un medio independiente para probar la degradación por separado tanto del cianuro como del tiocianato por triplicado.

Los morfotipos aislados de los medios de cultivo cetrimide, cristal violeta y nutritivo no mostraron actividad biológica en la degradación del cianuro o tiocianato. Lo anterior posiblemente se deba a que los aislamientos obtenidos en estos medios inhibieron las enzimas capaces de fijar el cianuro o tiocianato, ya que se hicieron 5 pases para su purificación en medios con nitrógeno fácilmente asimilable, cada nueva generación de microorganismos creció en un entorno más favorable del cual provenían, posiblemente reorganizaron su conjunto enzimático adaptándose a las nuevas condiciones, inhibiendo antiguas rutas metabólicas y activando nuevas [111,184,227].

Otra posible explicación de estos resultados es que las bacterias que utilizan energía y recursos para degradar el cianuro y tiocianato, pueden verse superadas por aquellas que utilizan rutas metabólicas más eficientes para crecer en el nuevo medio que posee una fuente de nitrógeno fácil de metabolizar. Esto podría llevar a la proliferación de bacterias que no pueden degradar especies cianuradas [184,227].

Los aislamientos provenientes de los medios de cultivo mínimo de sales fueron los únicos que degradaron estos sustratos, aunque en porcentajes bajos en comparación con la degradación del consorcio bacteriano (Tabla 23). Es posible que los microorganismos al estar en un consorcio se ayuden mutuamente para asimilar mejor las especies cianuradas. Al separarlos pierden esta característica, lo que explicaría los resultados obtenidos [97,107,228].

Teniendo en cuenta lo anterior, se descartaron todos los aislamientos que no mostraron actividad biológica frente a ningún sustrato cianurado, y se procedió a la descripción microscópica de los aislamientos obtenidos a partir de los medios de cultivo mínimo de sales. La Tabla 24 muestra la degradación de los aislamientos mencionados. Los cromatogramas se muestran en el anexo 6.

Tabla 24. Degradación de especies cianuradas realizada por los aislamientos obtenidos en laboratorio

Aislado	Promedio degradación de cianuro (%)	Promedio degradación de tiocianato (%)
M1	28.57	44.90
M2	28.57	24.25
M3	14.28	22.17
M4	14.28	19.02
M5	42.85	32.51
Consortio	85.71	71.98
Blanco	0.00	0.00

Si bien es cierto que los aislamientos al ser sometidos a la degradación de compuestos cianurados presentan una baja actividad, cuando se trabaja con el pool completo esto cambia drásticamente obteniendo degradación mayor al 85 % para cianuro, y por encima del 71 % para tiocianato.

Una posible explicación de los resultados obtenidos se puede deber a que según Ochoa *et al.*, un consorcio microbiano es una asociación natural de dos o más poblaciones microbianas, de diferentes especies, que actúan conjuntamente como una comunidad en un sistema complejo, donde todos se benefician de las actividades de los demás [229], esta característica le permitirá al consorcio asimilar y degradar sustancias cianuradas de manera más eficiente en comparación con los microorganismos por separado.

También hay que tener en cuenta que en un consorcio microbiano se tiene diversidad genética, al contener una variedad de microorganismos con diferentes conjuntos de enzimas y habilidades metabólicas. Esta diversidad genética puede permitir que el consorcio degrade una amplia gama de contaminantes incluidos los cianurados [108,147,179,227]

Hasta este punto, se lograron aislar 5 morfotipos con características diferentes entre ellos lo que sugiere que se podrían tratar de diferentes microorganismos, cada uno de ellos presento actividad en la degradación de cianuro y tiocianato. Esta degradación fue en menor proporción que la realizada con el consorcio microbiano.

Cada microorganismo usado en esta investigación fue preservado para mantener cepas y cultivos puros para estudios y experimentos posteriores, los resultados se describen en la siguiente sección.

3.2.2.5 Conservación de los microorganismos empleados en esta investigación

Cada uno de los morfotipos aislados, así como *P. putida* y el consorcio bacteriano, se cultivaron en 5 mL de agar nutritivo. Estos microorganismos se dejaron en crecimiento durante 48 h, posteriormente se adiciono glicerol al 5 % a cada uno de los cultivos. El glicerol se utilizó como crioprotector para garantizar la supervivencia de las bacterias durante el proceso de congelación [189]. Los tubos de ensayo con los microorganismos y el glicerol se almacenaron en una unidad de congelación a una temperatura de -18 °C.

Todas las muestras criopreservadas se almacenaron en el cepario del Laboratorio de Microbiología Aplicada de la Universidad de Caldas, con los códigos *P putida* ATCC 31483;

M1, M2, M3, M4, M5, para los aislamientos bacterianos, y SM1 para el consorcio bacteriano (Figura 33).



Figura 33. Cepas aisladas y almacenadas en criopreservación en el cepario de la universidad de Caldas, laboratorio de microbiología

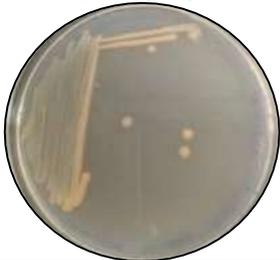
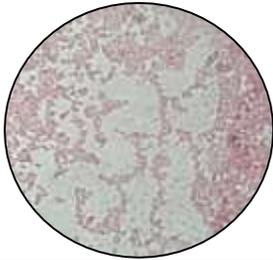
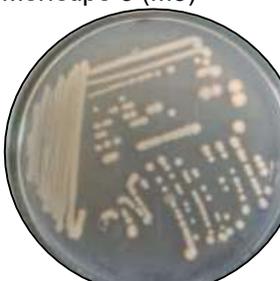
3.2.2.6 Caracterización microscópica y macroscópica de los aislamientos M1, M2, M3, M4, y M5

Ya separados los morfotipos presentes en el consorcio microbiano se realizó la caracterización de cada uno de ellos. Después de 5 repiques, se evidencia la formación de colonias puras de cada aislado; sin embargo, es necesario comprobar esto mediante tinción Gram y descripción microscópica. La Tabla 25 muestra las características macroscópicas y microscópicas encontradas para cada morfotipo.

Se usó la tinción de Gram para establecer si los morfotipos aislados son bacterias u hongos, ya que esta técnica se basa en las diferencias en la composición de la pared celular de las bacterias y su reacción a los reactivos de tinción de Gram [177]. Los hongos poseen una estructura celular muy diferente a la de las bacterias, razón por la cual no mostrarían información al realizar la tinción Gram [230].

Por otro lado, las bacterias son más pequeñas en comparación con los hongos y poseen formas simples, como esferas (cocos), bastones (bacilos) o espirales (espiroquetas) [95,192].

Tabla 25. Características microscópicas y macroscópicas de cada aislamiento

Aislamiento	Descripción macroscópica	Descripción microscópica
Morfotipo 1 (M1) 	Colonias planas, con borde ondulado de forma irregular, con superficie lisa de aspecto mate, tiene apariencia húmeda y su color es blanco opaco.	Bacilos Gram negativos 
Morfotipo 2 (M2) 	Colonias planas convexas, con borde lobulado de forma irregular, con superficie lisa de aspecto mate, tiene apariencia húmeda y su color es blanco opaco.	Bacilos Gram negativo esporulado 
Morfotipo 3 (M3) 	Colonias con elevación acuminada, con borde lobulado de forma fusiforme, aspecto brillante tiene apariencia húmeda y su color es blanco traslucido.	Bacilos Gram negativo esporulados muy pequeñas 
Morfotipo 4 (M4) 	Colonias con elevación planoconvexa, con borde redondeado de forma irregular, aspecto mate tiene apariencia húmeda y su color es blanco traslucido.	Bacilos Gram negativo, empalizados sin esporas 
Morfotipo 5 (M5) 	Colonias planas con borde redondeado, de forma irregular con superficie lisa de aspecto mate, tiene apariencia seca y su color es blanco opaco.	Bacilos Gram negativo con limitación en el crecimiento 

Teniendo en cuenta las características descritas en la tabla, se puede establecer que todos los aislamientos obtenidos en el laboratorio son bacterias y se encuentran puros, por la uniformidad que presentan las visualizaciones microscópicas y la tinción Gram.

Para proceder a la identificación molecular de cada aislado, es necesario establecer que todos sean diferentes entre sí. Según la Tabla 24 las muestras M1, M3 y M5 presentan características únicas que los diferencian claramente. Sin embargo, las muestras M2 y M3 presentan características similares entre ellas, para determinar si estos dos aislamientos son diferentes, se realizaron pruebas bioquímicas las cuales se describen en la siguiente sección.

3.2.2.7 Pruebas bioquímicas para los aislamientos M2 y M3.

Se realizaron pruebas de oxidasa, catalasa, TSI, fermentación aerobia y anaerobia de azúcar, para establecer diferencias bioquímicas entre los aislamientos M2 y M3 y comprobar experimentalmente si se tratan de una misma cepa.

La prueba de oxidasa se basa en la capacidad de la enzima oxidasa para catalizar la transferencia de electrones a un aceptor artificial, como la dimetil-p-fenilendiamina (DMPD), que se oxida y cambia a color morado. Se realizaron las pruebas de oxidasa a los aislamientos M2 y M3, siendo positiva para ambos, esto demuestra la presencia de citocromo oxidasa en los microorganismos evaluados, dando un indicio de su identidad, puesto que esta enzima es característica del género de *Pseudomonas*, la cual es una bacteria Gram negativa [191,192].

La prueba de catalasa permite determinar la presencia de la enzima catalasa, la cual es clave en la protección celular contra los efectos tóxicos del peróxido de hidrógeno, porque lo descompone en agua y oxígeno molecular. Esta prueba fue positiva para ambos morfotipos, característica común en bacterias aeróbicas y algunas facultativas anaeróbicas. El género *Pseudomonas* generalmente son catalasa positiva, esto podría ayudar a confirmar que las muestras M2 y M3 corresponden a alguna especie de *Pseudomonas* [191].

Cabe resaltar que en ambos morfotipos se evidenció la hidrólisis del peróxido de hidrógeno mediante un burbujeo, pero este ocurrió primero en el aislado M3. Esto podría ser un indicio de que se tratan de diferentes morfotipos. La Figura 34 muestra los resultados de estas pruebas.

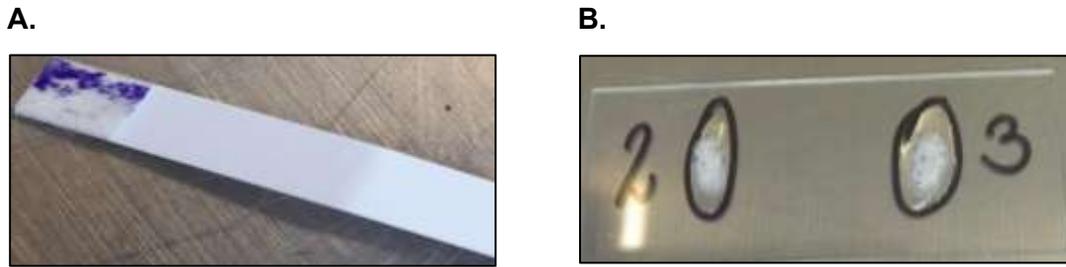


Figura 34. A. Prueba de oxidasa positiva. **B.** Prueba de catalasa positiva.

Se realizaron pruebas de fermentación de azúcar aerobia y anaerobia, con esto se buscó determinar la capacidad de los aislamientos de crecer y realizar sus procesos metabólicos, en presencia de oxígeno o en ausencia de este [192].

La prueba de fermentación aerobia fue positiva para los dos aislamientos, indicando que las bacterias pueden fermentar sustratos en presencia de oxígeno. En la fermentación anaerobia se evidenció la formación de burbujas de gas para el aislado 3 únicamente, esto indica que posiblemente estos dos morfotipos son diferentes y que el aislado 2 no fermenta ciertos sustratos en ausencia de oxígeno.

También se realizó una prueba TSI, para identificar y caracterizar bacterias mediante su capacidad para fermentar azúcares con producción de ácido y gas [192]. Para los aislamientos M2 y M3 se evidenció crecimiento y formación de un fondo amarillo, con evidencia de formación de gas. Estas características son representativas de la degradación de glucosa, lactosa y sacarosa, indicando que posiblemente los dos aislamientos pertenecen al género Enterobacteriaceae, el cual es Gram negativo. La Figura 35 muestra los resultados de estas pruebas.

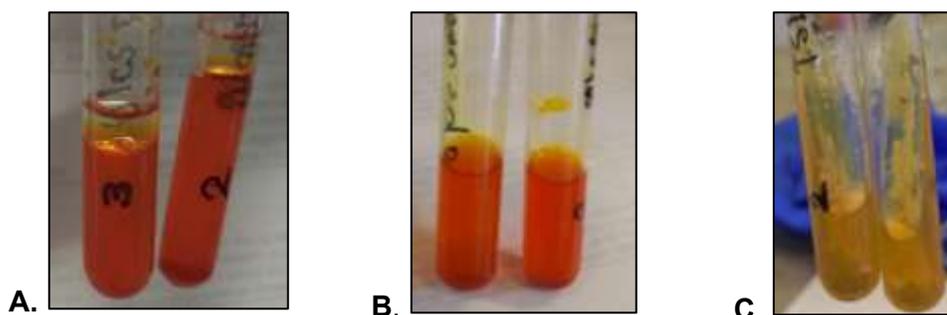


Figura 35. Pruebas de oxidación de azúcares. **A.** Fermentación anaerobia. **B.** Fermentación aerobia. **C.** Prueba TSI

La Tabla 26 muestra los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas para los aislamientos M2 y M3.

Tabla 26. Resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas para los aislamientos M2 y M3

Prueba bioquímica	M2	M3
Oxidasa	Positiva	Positiva
Catalasa	Positiva	Positiva
Fermentación anaerobia	Negativa	Positiva
Fermentación aerobia	Positiva	Positiva
TSI	Positiva	Positiva

En este punto se tuvieron 5 tipos de morfotipos diferentes con actividad biológica en la degradación de compuestos cianurados, aunque existen dudas en cuanto a los morfotipos 2 y 3, sin embargo, se realizó identificación molecular a cada uno de estos aislamientos por las diferencias encontradas en la prueba de glucosa anaerobia.

3.2.2.8 Identificación de los microorganismos mediante ADNr 16S

Se identificaron los aislamientos bacterianos mediante el análisis de secuencias parciales de nucleótidos del ADNr 16S, una técnica de genética molecular que permite una identificación y clasificación más precisa y rápida de bacterias, en comparación con los métodos tradicionales basados en características fenotípicas y bioquímicas. El gen 16S ADNr es altamente conservado en las bacterias, y contiene regiones específicas que permiten la identificación de especies bacterianas [176]. La identificación molecular la realizó el Grupo de investigación en Bacteriología Agrícola y Ambiental de la Universidad de Antioquia.

Ellos extrajeron y amplificaron el ADNr de cada aislado y obtuvieron secuencias con pares de bases de longitud mayores a 1000. Posteriormente, se realizaron un análisis bioinformático utilizando la herramienta BLAST del Centro Nacional de Información Biotecnológica de los Estados Unidos, para alinear localmente las secuencias y comparar su similitud con las bases de datos de ADNr 16S de arqueas y bacterias [32]. La identificación se asigna de acuerdo con las accesiones de más alta similitud en secuencia, usando como criterio un valor límite de >97 % (preferiblemente >99 %). Las secuencias se depositaron en el GenBank, los códigos junto con los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 27.

Según los resultados de la identificación molecular, los aislamientos M1, M2 y M5 corresponden a *Pseudomonas veronii* con similitud del 98.68 %, 99.87 % y 100.00 % respectivamente. Sin embargo, teniendo en cuenta lo evidenciado en la caracterización

macroscópica, microscópica y las pruebas bioquímicas, se estableció que estas bacterias eran diferentes. Estas observaciones se pueden justificar porque según Elomari *et al.* la bacteria *Pseudomonas veronii* es un microorganismo con alta variabilidad genética [231], posiblemente en nuestro estudio encontramos diferentes cepas de *Pseudomonas veronii*, pero cada una de ellas es diferente por el conjunto enzimático que tengan activado y disponible.

Tabla 27. Similitud de las secuencias de ADN con las bases de datos

Descripción	Nombre científico	Similitud	Numero de acceso al GenBank
M1: OR889003			
<i>Pseudomonas veronii</i> strain MT5 16S ribosomal RNA gene	<i>Pseudomonas veronii</i>	98.68 %	MN449463.1
<i>Pseudomonas veronii</i> strain MT3 16S ribosomal RNA gene	<i>Pseudomonas veronii</i>	98.68 %	MN449461.1
<i>Pseudomonas veronii</i> strain MT2 16S ribosomal RNA gene	<i>Pseudomonas veronii</i>	98.68 %	MN449460.1
<i>Pseudomonas veronii</i> strain MT1 16S ribosomal RNA gene	<i>Pseudomonas veronii</i>	98.68 %	MN449459.1
M2: OR889004			
<i>Pseudomonas veronii</i> strain MT5 16S ribosomal RNA gene	<i>Pseudomonas veronii</i>	99.87 %	MN449463.1
<i>Pseudomonas veronii</i> strain MT3 16S ribosomal RNA gene,	<i>Pseudomonas veronii</i>	99.87 %	MN449461.1
<i>Pseudomonas veronii</i> strain MT2 16S ribosomal RNA gene	<i>Pseudomonas veronii</i>	99.87 %	MN449460.1
<i>Pseudomonas veronii</i> strain MT1 16S ribosomal RNA gene	<i>Pseudomonas veronii</i>	99.87 %	MN449459.1
M3: OR889005			
<i>Raoultella terrigena</i> strain 4635 16S ribosomal RNA gene	<i>Raoultella terrigena</i>	99.80 %	MT545123.1
<i>Raoultella terrigena</i> strain JH01 chromosome, complete genome	<i>Raoultella terrigena</i>	99.80 %	CP050508.1
<i>Raoultella terrigena</i> strain PGP374 16S ribosomal RNA gene	<i>Raoultella terrigena</i>	99.80 %	MN256357.2
<i>Raoultella terrigena</i> strain NCTC919 genome assembly, chromosome: 1	<i>Raoultella terrigena</i>	99.80 %	LR595855.1
M4: OR889006			
<i>Rahnella aquatilis</i> strain DGE4 16S ribosomal RNA gene	<i>Rahnella aquatilis</i>	99.82 %	MK764975.1
<i>Rahnella aquatilis</i> strain CZ-BHG006 16S ribosomal RNA gene	<i>Rahnella aquatilis</i>	100.00 %	KT765843.1
<i>Rahnella aquatilis</i> strain ICMP 6471 16S ribosomal RNA gene	<i>Rahnella aquatilis</i>	100.00 %	OM200144.1
<i>Rahnella aquatilis</i> strain SL18-1 16S ribosomal RNA gene	<i>Rahnella aquatilis</i>	99.82 %	MN709206.1
M5: OR889007			
<i>Pseudomonas veronii</i> strain TN-1 16S ribosomal RNA gene	<i>Pseudomonas veronii</i>	100.00 %	OP704175.1
<i>Pseudomonas veronii</i> strain HY-93 16S ribosomal RNA gene	<i>Pseudomonas veronii</i>	100.00 %	MZ895437.1
<i>Pseudomonas veronii</i> strain P101 16S ribosomal RNA gene	<i>Pseudomonas veronii</i>	100.00 %	MN560131.1
<i>Pseudomonas veronii</i> strain MB2 16S ribosomal RNA gene,	<i>Pseudomonas veronii</i>	100.00 %	MN449455.1

De acuerdo con la literatura este microorganismo es una bacteria Gram negativa del género *Pseudomonas*. Es importante destacar que el hecho de que no se hayan encontrado artículos relacionados con la degradación de cianuro y tiocianato por *Pseudomonas veronii* muestra la importancia y originalidad de este estudio [119–121]. Los resultados obtenidos

en esta investigación pueden ser de útiles para la comprensión de la capacidad de esta bacteria para degradar contaminantes en ambientes con alta concentración de especies cianuradas y así contribuir al desarrollo de estrategias de biorremediación más efectivas y sostenibles.

El aislado M3 corresponde a *Raoultella terrigena* con una similitud del 99.80 %, de este microorganismo se reporta que es una bacteria Gram negativa de la familia Enterobacteriaceae [126]. De acuerdo a la revisión bibliográfica no se encontraron artículos relacionados a la degradación de especies cianuradas empleando este microorganismo, lo que sugiere que este estudio es uno de los primeros en investigar la capacidad de *Raoultella terrigena* para degradar cianuro y tiocianato.

Por último, el aislado M4 corresponde a *Rahnella aquatilis* con una similitud del 100 %, de este microorganismo se reporta que es una bacteria Gram negativa que se encuentra en ambientes naturales. La revisión bibliográfica muestra pocos reportes de la degradación de cianuro o tiocianato mediada por *Rahnella aquatilis*. Este estudio contribuye a ampliar el conocimiento sobre como esta bacteria puede ser usada en la remediación ambiental al degradar especies químicas diferentes a las reportadas.

3.3 Evaluar preliminarmente a escala de laboratorio la capacidad degradadora de especies cianuradas por consorcio microbiano

Con base en los resultados obtenidos hasta el momento, se puede establecer lo siguiente:

- El pH óptimo para la actividad de degradación es de 7.8.
- Los microorganismos empleados tienen actividad biológica a temperatura ambiente.
- Se requiere una agitación constante para garantizar un contacto continuo entre los sustratos y las bacterias.
- Se dispone de un medio de cultivo (Medio A) adecuado que satisface los requerimientos nutricionales de cada microorganismo.

Con esta información, se plantearon los diseños experimentales adecuados para garantizar la máxima degradación de los compuestos de interés utilizando el consorcio microbiano. Inicialmente se evaluó esta degradación a escala de laboratorio para después ser evaluada en un reactor de lecho fijo. A continuación, se detalla los resultados obtenidos.

3.3.1 Diseño experimental para la degradación de cianuro a nivel de laboratorio

Para determinar las mejores condiciones en la degradación de cianuro empleando el consorcio microbiano, se realizó un diseño experimental factorial 3^2 , utilizando la concentración inicial de cianuro y la cantidad de inóculo como factores controlables del proceso y la remoción de cianuro como variable respuesta. Los resultados del diseño experimental para la degradación de cianuro se muestran en la Tabla 28.

Tabla 28. Diseño experimental para la degradación de cianuro y resultados de la remoción obtenidos.

Ejecución	Cianuro (ppm)	Inoculo (μL)	Remoción (%)	Predicho
1	150	60	33.33	32.96
2	200	60	25.00	32.96
3	150	180	66.67	69.07
4	250	120	20.00	32.41
5	150	120	83.33	81.30
6	250	60	0.00	-7.59
7	200	180	62.50	60.74
8	250	180	20.00	11.85
9	200	12	87.50	77.13
10	150	60	33.33	32.96
11	200	60	25.00	32.96
12	150	180	66.67	69.07
13	250	120	20.00	32.41
14	150	120	83.33	81.30
15	250	60	0.00	-7.59
16	200	180	62.50	60.74
17	250	180	20.00	11.85
18	200	120	87.50	77.13
19	150	60	33.33	32.92
20	200	60	25.00	32.96
21	150	180	66.67	69.07
22	250	120	20.00	32.41
23	150	120	83.33	81.30
24	250	60	0.00	-7.59
25	200	180	50.00	60.74
26	250	180	10.00	11.85
27	200	120	87.50	77.13

Los diseños experimentales factoriales permiten estudiar múltiples factores y sus interacciones al mismo tiempo en un número relativamente bajo de experimentos. Además,

son eficaces para detectar interacciones entre factores experimentales que puedan afectar a la respuesta. Cada experimento se realizó por triplicado dando en total 27 ejecuciones, los grados de libertad del diseño fueron 26, esto garantiza más flexibilidad en el análisis para detectar diferencias significativas o patrones en los datos [170]. El análisis se realizó ajustando los resultados con un modelo cuadrático de interacción entre los dos factores experimentales. La Tabla 29 muestra un resumen de los resultados del experimento

Tabla 29. Resumen del análisis anova de los resultados del experimento de degradación de cianuro

	Remoción (%)
Transformación	Ninguno
p-valor	0.000
Error estándar	8.268
R-cuadrado	93.980

La variable respuesta mostró un p-valor por debajo de 0.05, lo que indica que el modelo estadístico ajustado bajo los parámetros establecidos tiene 5 % de significancia según los parámetros establecidos. El estadístico R-cuadrado indica el porcentaje de variación en la respuesta mediante el modelo ajustado, en este caso, el valor de R-cuadrado es del 93.980 %, sugiriendo que la variación en la remoción de cianuro se explica adecuadamente con las condiciones establecidas [204].

Se determinó el estadístico Leverage (anexo 8) para medir la influencia de cada ejecución en la determinación de los coeficientes del modelo estimado. El valor medio de este parámetro fue de 0.222. Las ejecuciones con un valor de Leverage elevado tendrán un impacto inusualmente alto en el modelo ajustado en comparación con otras ejecuciones [206]. No se encontraron ejecuciones con un Leverage más de 3 veces mayor al promedio para el diseño experimental utilizado, esto sugiere que las observaciones individuales no tienen un impacto excesivo en el ajuste del modelo y que no se han identificado puntos atípicos o influencias significativas en los datos [206,232,233]. La Tabla 30 muestra el análisis de varianza obtenido para el porcentaje de remoción de cianuro a causa de las variables controlables del diseño experimental.

La tabla muestra los valores de inflación de la varianza (VIF), este parámetro permite evaluar el aumento de la varianza de los factores estimados debido a la falta de ortogonalidad en el diseño [232]. Estos VIF son útiles para analizar el efecto de cada factor por separado. Por lo general, los VIF superiores a 10 indican problemas significativos de

falta de ortogonalidad [206,234]. En el diseño experimental realizado no se observan tales problemas, los efectos de los diferentes factores experimentales son independientes entre sí y no están correlacionados, esto permite explicar la variabilidad de la respuesta en función de la concentración inicial de cianuro y el volumen de inóculo por separado.

Tabla 30. Análisis de varianza para el porcentaje de remoción de cianuro

Fuente	Suma de Cuadrados	Error estándar	VIF	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	p-valor
A: Cianuro	10755.6	0.236	1.0	1	10755.6	157.33	0.0000
B: Inóculo	3472.23	0.236	1.0	1	3472.23	50.79	0.0000
AA	2467.13	0.408	1.0	1	2467.13	36.09	0.0000
AB	208.335	0.289	1.0	1	208.335	3.05	0.0955
BB	5500.46	0.408	1.0	1	5500.46	80.46	0.0000
Error total	1435.65			21	68.3642		
Total	23839.4			26			

La tabla ANOVA divide la variabilidad de las respuestas en piezas separadas para cada uno de los efectos y prueba la significancia estadística de estos, comparando su cuadrado medio con un estimado del error experimental [206].

Para la variable respuesta de remoción, se observa que cuatro efectos tienen un p-valor menor que 0.05, lo que indica que la concentración inicial de cianuro, el volumen de inóculo y las interacciones entre ellas afectan significativamente la variabilidad de la respuesta con un nivel de confianza del 95.0 %.

Por otro lado, el efecto de interacción entre las variables concentración inicial de cianuro y volumen de inóculo tiene un p-valor mayor que 0.05, lo que indica que su influencia en la variable respuesta no es estadísticamente significativa [206,235]. La Figura 36 muestra los diagramas de Pareto para cada respuesta, lo que permite una mejor comprensión del análisis de varianza.

La longitud de cada barra es proporcional al valor del estadístico t calculado para el efecto de cada factor experimental. Las barras ubicadas fuera de la línea vertical azul son estadísticamente significativas para el diseño experimental con un nivel de confianza estadística del 95 % [206].

En este caso, se identificaron 4 efectos principales que sobresalen para el diseño experimental ajustado, corroborando lo planteado en el análisis de la varianza presentado en la Tabla 29. Para comprender cómo cada factor experimental afecta la variable respuesta, se realizó un gráfico de efectos principales que se muestra en la Figura 37.

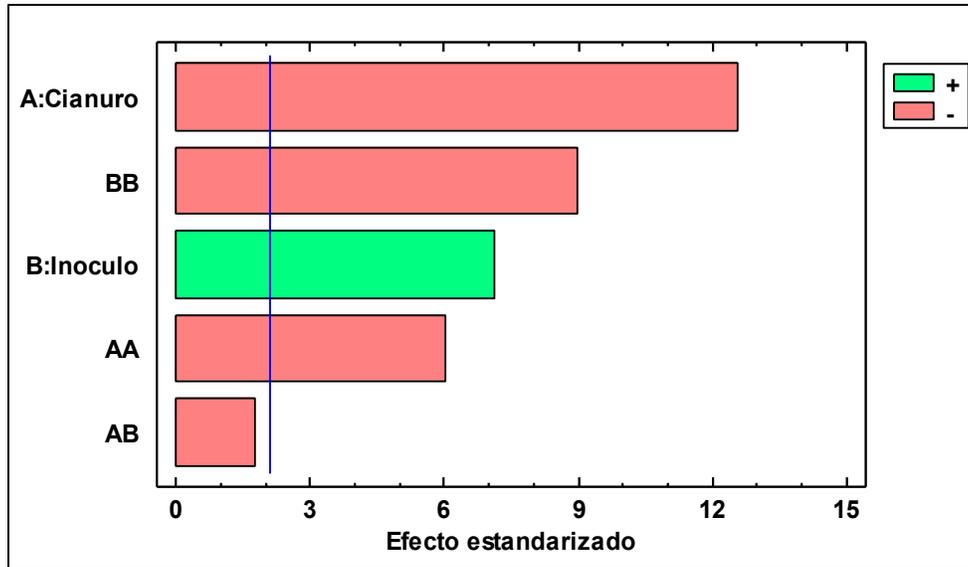


Figura 36. Diagrama de Pareto para la remoción de cianuro, las barras en verde indican que la respuesta se ve favorecida por el aumento de esa variable, lo contrario ocurre con las barras en rojo.

Cada línea de la gráfica muestra el cambio estimado en el rendimiento del porcentaje de remoción de cianuro cuando un factor experimental se mueve de su nivel bajo a su nivel alto, manteniendo todos los demás factores experimentales constantes en un valor intermedio.

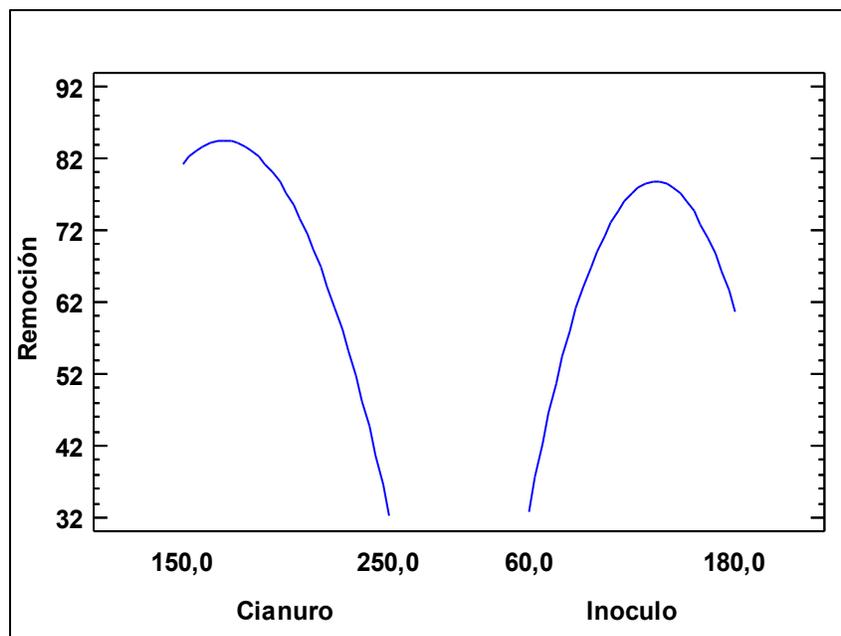


Figura 37. Gráfica de efectos principales para el porcentaje de remoción de cianuro

Los diagramas de Pareto indicaron que la concentración inicial de cianuro (A) tiene un mayor impacto en la respuesta que los demás factores, lo cual se confirma al observar que la gráfica de la remoción alcanza un valor máximo más alto en comparación con la otra variable. Para ambos factores se observa un comportamiento cuadrático, en el cual la respuesta aumenta al aumentar los valores de las variables hasta alcanzar un punto máximo, momento en el cual la respuesta disminuye al aumentar el valor de estos factores experimentales.

Para comprender mejor el diseño experimental y describir las relaciones entre los factores experimentales y cada variable de respuesta, se determinó la ecuación teniendo en cuenta que se realizó un modelo cuadrático, esta se muestra a continuación: La ecuación del modelo ajustado es:

$$\% \text{ Remoción} = -331,75 + 2,92A + 2,53B - 0,01A^2 - 0,001AB - 0,01B^2 \quad [11]$$

Donde A es la concentración inicial de cianuro en ppm y B el volumen de inóculo en μL . Con esta ecuación se puede estimar el porcentaje de remoción de cianuro a diferentes concentraciones de cianuro e inóculo. Es útil contar con una ecuación del modelo para determinar los valores que tomará la variable respuesta al utilizar diferentes valores de los factores experimentales [206].

Para comprender completamente el modelo ajustado, lo mejor es representarlo gráficamente, para esto se realizó gráficos de superficie de respuesta estimada el cual se muestra en la Figura 38.

En la superficie de respuesta se observa como el porcentaje de remoción aumenta al aumentar el volumen de inóculo y concentración inicial de cianuro hasta llegar a un máximo, momento en el cual la variable respuesta disminuye si se siguen aumentando los factores experimentales, aunque esta disminución es más notoria al aumentar la concentración inicial de cianuro, lo cual posiblemente se deba que el consorcio bacteriano no tolera elevadas cantidades de cianuro [145].

La optimización del método se realizó con el software Statgraphics, determinando los máximos de la superficie de respuesta, la Tabla 31 muestra las condiciones sugeridas, los resultados esperados y los resultados obtenidos.

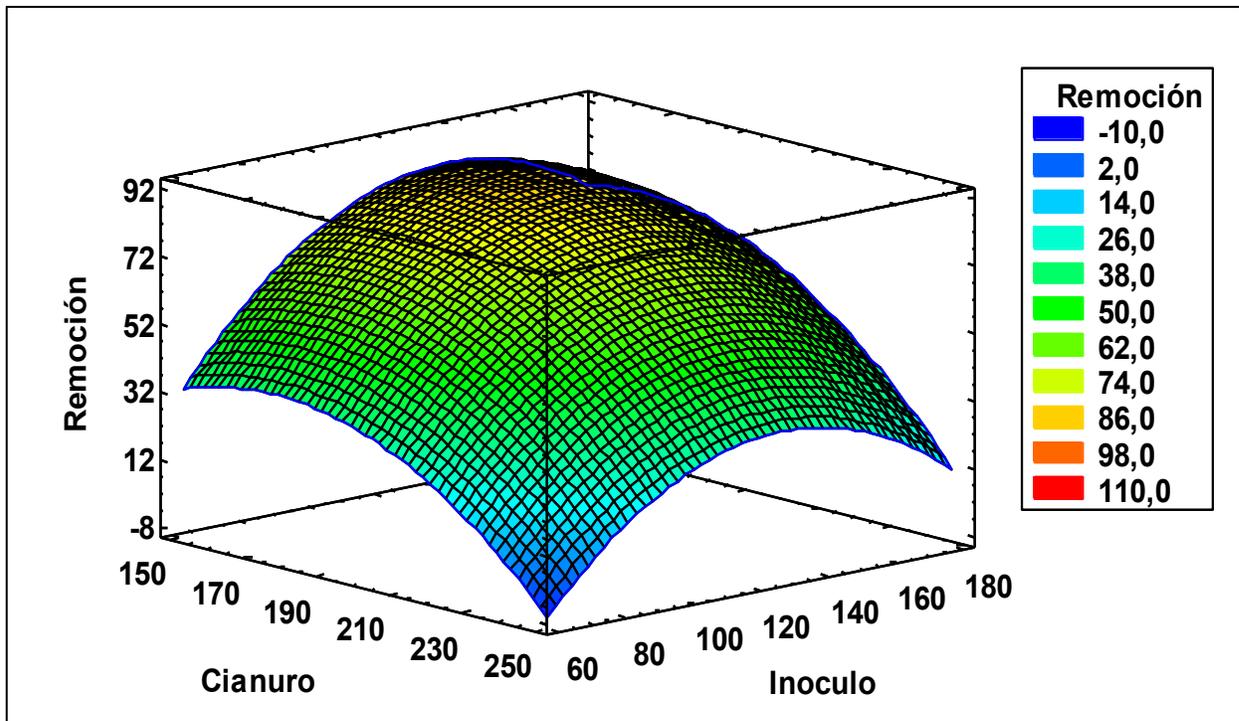


Figura 38. Gráfico de superficie de respuesta para la remoción de cianuro

Tabla 31. Optimización del método y validación del modelo

Método	Cianuro inicial (ppm)	Inoculo (µL)	Resultado (%)	% error
Optimizado	168.455	136.326	86.733	
Experimental	175.000	136.000	85.710	1.179

Los límites de confianza inferior y superior calculados para la remoción de cianuro en la optimización fueron 80.39 % y 93.08 %. Los resultados experimentales se encontraron dentro de este rango lo que valida las condiciones de optimización dadas por el diseño experimental.

Los estadísticos calculados y los análisis realizados demuestran que el modelo ajustado es adecuado para explicar la degradación de cianuro con las variables experimentales especificadas.

La degradación de cianuro a escala de laboratorio, bajo condiciones optimizadas fue de 85.71 %, es un valor alto y similar a lo reportado por Lay-Son *et al.*, quien uso un consorcio microbiano en este tipo de reactores, obteniendo porcentajes de degradación del 90 % [144]. De igual manera, el valor obtenido experimentalmente se acerca a los resultados

obtenidos por Kaewkannetra *et al.*, quien, bajo condiciones similares a las realizadas en esta investigación, logro degradar 94 % de cianuro con consorcio microbiano. Ambos autores utilizaron una concentración inicial de cianuro de 150 ppm [143], ligeramente menor a la empleada por nosotros en este ensayo.

Los resultados obtenidos por Razanamahandry *et al.* quien, con un consorcio microbiano aislado bajo condiciones similares a las utilizadas en esta investigación, logro degradar más del 95 % de cianuro [90], nuestros resultados esta más alejados, pero en hay que tener en cuenta que en estos experimentos se utilizó el doble de la concentración de cianuro que la reportada por el autor.

Se utilizó el valor medio de la cantidad de inóculo empleada correspondiente a 120 μ L para estudiar la degradación de cianuro a diferentes concentraciones durante 5 días, los resultados se muestran en la Tabla 32 y Figura 39.

Tabla 32. Degradación de cianuro en diferentes días y a diferentes concentraciones de este sustrato

Dia	150 ppm		200 ppm		250 ppm		Blanco
	Concentración (ppm)	Remoción (%)	Concentración (ppm)	Remoción (%)	Concentración (ppm)	Remoción (%)	Remoción (%)
1	150	0,0	200	0	250	0	0
2	125	16.7	175	12.5	250	0	0
3	100	33.3	150	25	250	0	0
4	50	66.7	75	62.5	225	10	0
5	25	83.3	25	87.5	200	20	0

A los niveles bajos y medios de concentración inicial de cianuro, se observan los mejores resultados en la degradación de este compuesto. Esto sugiere una buena tolerancia de los microorganismos a estas concentraciones de cianuro. Sin embargo, a medida que aumenta la concentración inicial, la degradación disminuye significativamente, tal como se observa en la gráfica cuando la concentración inicial de cianuro es 250 ppm.

Es posible que este fenómeno se deba a que los microorganismos no se adaptan adecuadamente a estas altas concentraciones de cianuro, porque este podría actuar como un inhibidor del crecimiento microbiano y afectar su capacidad para degradar el compuesto [236]. Por lo tanto, al diseñar un proceso de degradación microbiana, es importante considerar cuidadosamente la concentración inicial de cianuro, y asegurar que se mantenga dentro de los niveles óptimos para lograr la mayor eficiencia en la degradación.

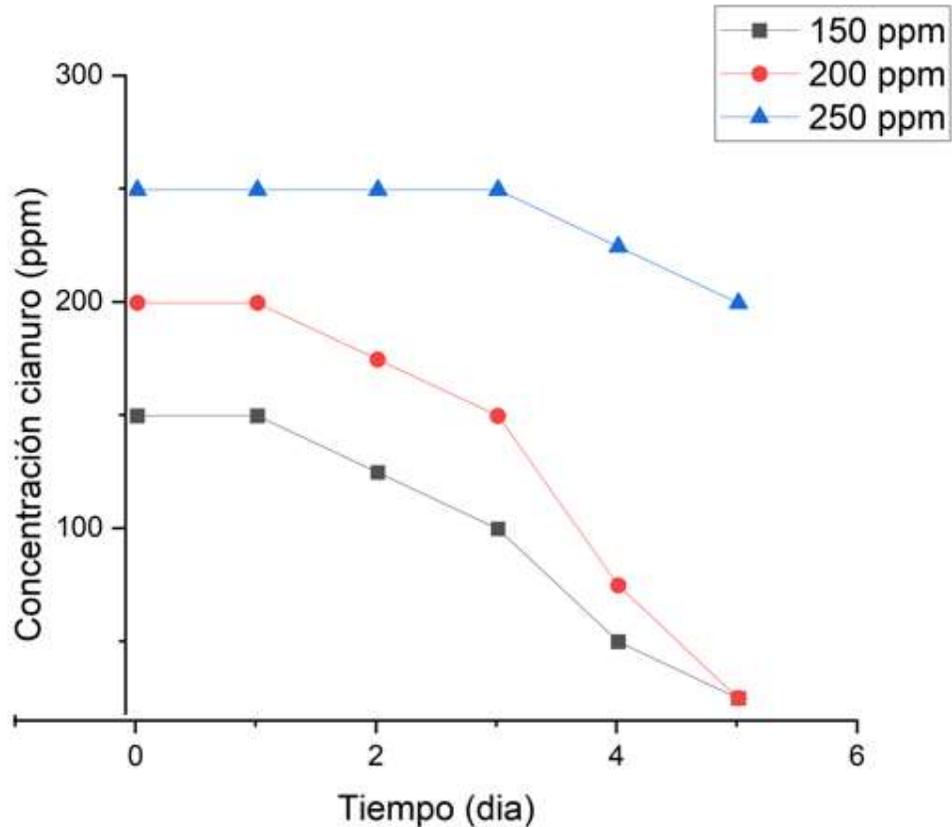


Figura 39. Seguimiento de la reacción de degradación de cianuro, se evidencia un comportamiento decreciente en todos los casos.

Con concentraciones iniciales de 150 y 200 ppm de cianuro se tiene un comportamiento similar en la degradación de este sustrato, en el segundo día se evidencia cambio en la concentración de cianuro, la cual va disminuyendo hasta el día 5, logrando buenos porcentajes de remoción.

3.3.2 Diseño experimental para la degradación de tiocianato a escala de laboratorio

Para determinar las mejores condiciones en la degradación de tiocianato empleando el consorcio microbiano, se realizó un diseño experimental factorial de tres niveles 3^2 , utilizando la concentración inicial de tiocianato y la cantidad de inóculo como factores controlables del proceso y la remoción de cianuro como variable respuesta. Las condiciones de análisis y los resultados del diseño experimental para la degradación de tiocianato se muestran en la Tabla 33.

Al igual que con el diseño experimental de la degradación de cianuro, se realizó un análisis ajustando los resultados con un modelo cuadrático de interacciones entre los dos factores

experimentales. La Tabla 34 muestra un resumen de los resultados de la anova obtenida en el experimento.

Tabla 33. Diseño experimental para la degradación de tiocianato y resultados de la remoción obtenidos.

Ejecución	Tiocianato (ppm)	Inoculo (μL)	Remoción (%)	Predicho (%)
1	205.22	180	63.12	63.1431
2	505.64	120	40.09	42.5005
3	205.22	60	58.37	59.2638
4	505.64	60	33.80	32.502
5	346.13	180	63.27	64.9377
6	346.13	120	71.98	71.6379
7	346.13	60	61.19	61.4457
8	205.22	120	70.59	69.6496
9	505.64	180	37.02	35.6066
10	205.22	180	62.94	63.1431
11	505.64	120	40.33	42.5005
12	205.22	60	58.28	59.2638
13	505.64	60	32.88	32.502
14	346.13	180	64.91	64.9377
15	346.13	120	72.94	71.6379
16	346.13	60	62.00	61.4457
17	205.22	120	71.25	69.6496
18	505.64	180	36.97	35.6066
19	205.22	180	62.36	63.1431
20	505.64	120	40.61	42.5005
21	205.22	60	58.59	59.2638
22	505.64	60	33.25	32.502
23	346.13	180	63.59	64.9377
24	346.13	120	72.85	71.6379
25	346.13	60	61.32	61.4457
26	205.22	120	70.70	69.6496
27	505.64	180	36.87	35.6066

Tabla 34. Resumen del análisis anova de los resultados del experimento de degradación de tiocianato

	Remoción (%)
Transformación	Ninguno
p-valor	0.0000
Error estándar	1.3411
R-cuadrado	99.29

La variable respuesta que en este caso es la remoción de tiocianato, ha arrojado un p-valor inferior a 0.05, lo que indica que el modelo estadístico aplicado es adecuado con una significancia del 5 %, bajo los parámetros establecidos. El estadístico R-cuadrado tiene un valor de 99.290 %, un valor muy alto que garantiza la correcta planeación experimental [206].

Es importante destacar que el diseño utilizado cuenta con 26 grados de libertad. Por lo general, se recomienda tener 4 grados de libertad en el error para que los efectos estimados sean estadísticamente significativos [206]. El diseño experimental cuenta con flexibilidad en el análisis para detectar diferencias significativas en los resultados obtenidos.

Se determinó el estadístico de Leverage para medir la influencia de cada ejecución en la determinación de los coeficientes del modelo estimado (anexo 8). En este caso, una ejecución media tendrá un Leverage de 0.222. No se encontraron ejecuciones con un Leverage más de 3 veces mayor que el promedio para el diseño experimental empleado, lo que sugiere que no se han identificado puntos atípicos o influencias significativas en los datos [234].

La Tabla 35 muestra el análisis de varianza obtenido para el porcentaje de remoción a causa de las variables controlables las cuales son tiocianato inicial e inculo.

Tabla 35. Análisis de varianza para la remoción de tiocianato y estudio del aporte de cada variable independiente a la respuesta.

Fuente	Suma de Cuadrados	Error estándar	VIF	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	p-valor
A: Tiocianato	3316.84	0.235	1.0	1	3316.84	1844.24	0.0000
B: Inculo	54.87	0.236	1.0	1	54.87	30.51	0.0000
AA	1453.21	0.408	1.0	1	1453.21	808.02	0.0000
AB	0.45	0.289	1.0	1	0.45	0.25	0.6221
BB	428.03	0.408	1.0	1	428.03	237.99	0.0000
Error total	37.77			21	1.80		
Total	5291.17			26			

A y B representan la concentración inicial de tiocianato y el volumen de inculo respectivamente. Realizando un análisis similar al realizado en el apartado anterior en la remoción de cianuro, se evidencia que en este estudio no hay problemas de falta de ortogonalidad del diseño experimental porque los valores de VIF son inferiores a 10 garantizando que las variables independientes no se correlacionan entre sí [206,234].

En la variable respuesta correspondiente a la remoción de tiocianato, se observa que cuatro efectos tienen un p-valor menor a 0.05, lo que indica que la concentración inicial de tiocianato, el volumen de inoculo y sus interacciones entre sí tienen un impacto significativo en la variabilidad de la respuesta con un nivel de confianza del 95,0 % [170,204].

Por otro lado, el efecto de la interacción entre las variables de tiocianato e inoculo tiene un p-valor mayor a 0.05, lo que indica que su influencia en la variable respuesta no es estadísticamente significativa [206,234]. La Figura 40 muestra los diagramas de Pareto correspondientes para cada respuesta, lo que ayuda a comprender mejor el análisis de varianza.

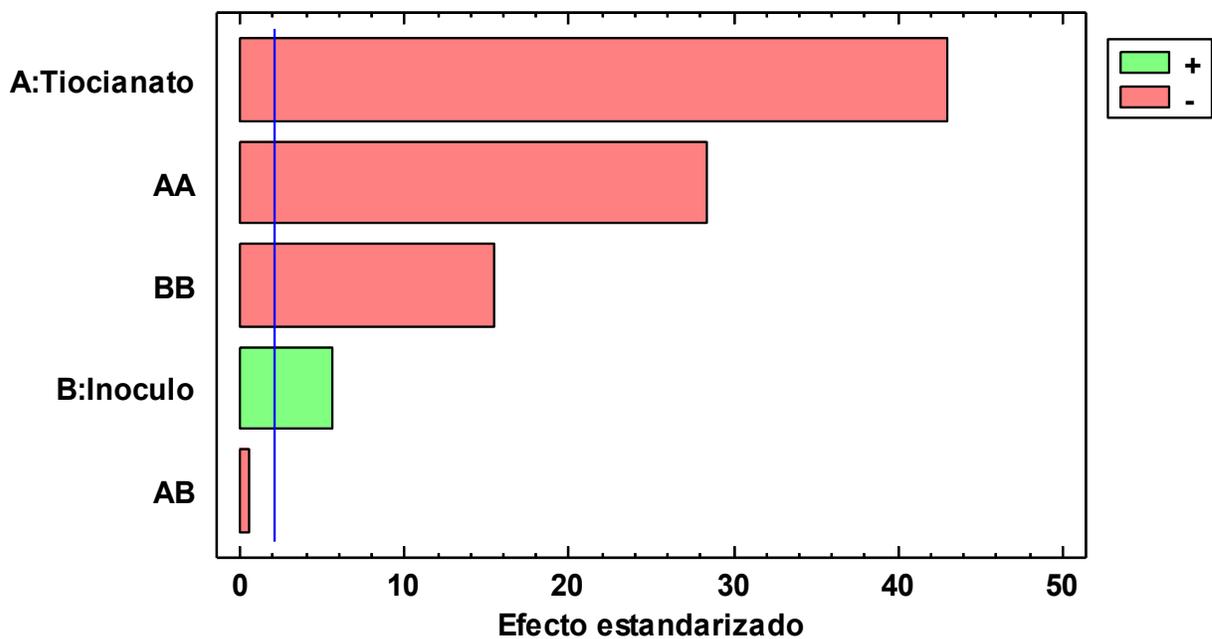


Figura 40. Diagrama de Pareto para la remoción de tiocianato, las barras en verde indican que la respuesta se ve favorecida por el aumento de esa variable, lo contrario ocurre con las barras en rojo.

En este diseño experimental, se identificaron cuatro efectos principales que tienen una influencia significativa en la variable respuesta. Esto respalda lo que se presentó en la tabla ANOVA. Para comprender cómo cada factor experimental afecta la variable respuesta, se realizó un gráfico de efectos principales que se muestra en la Figura 41.

La concentración inicial de tiocianato tiene el mayor impacto en la respuesta, como se ve en la gráfica de Pareto. Ambos factores experimentales muestran un comportamiento cuadrático, alcanzando un valor máximo antes de disminuir.

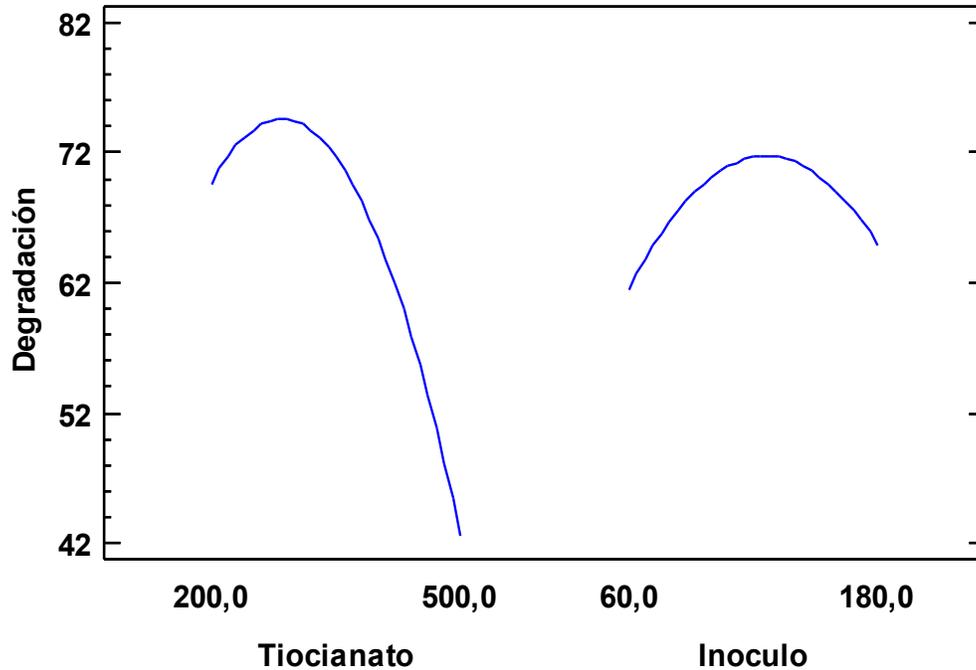


Figura 41. Gráfica de efectos principales para la remoción de tiocianato, las dos variables independientes muestran un comportamiento similar con un máximo en la remoción

Para comprender mejor el diseño experimental y describir las relaciones entre los factores experimentales y cada variable de respuesta, se determinó la ecuación teniendo en cuenta que se realizó un modelo cuadrático, esta se muestra a continuación: La ecuación del modelo ajustado es:

$$\%Remoción = -19,60 + 0,40A + 0,60B - 0,001A^2 - 0,00002AB - 0,002B^2 \quad [12]$$

Donde A es la concentración inicial de tiocianato en ppm y B el volumen de inoculo en μL . Con esta ecuación se puede determinar el porcentaje de degradación de tiocianato para diferentes valores de los factores experimentales. Los estadísticos calculados y los análisis realizados demuestran que el modelo ajustado es adecuado para explicar la degradación de tiocianato con las variables experimentales especificadas [206]. Para comprender completamente el modelo ajustado, lo mejor es representarlo gráficamente, para esto se realizó gráficos de superficie de respuesta estimada el cual se muestra en la figura 42.

En la superficie de respuesta se observa como el porcentaje de remoción aumenta al aumentar el volumen de inoculo y concentración inicial de tiocianato hasta llegar a un máximo, momento en el cual la variable respuesta disminuye si se siguen aumentando los factores experimentales, al igual que con el cianuro esta disminución es más notoria al

augmentar la concentración inicial de tiocianato, lo cual posiblemente se deba a que el consorcio bacteriano se le dificulte asimilar el tiocianato por la complejidad de degradar este compuesto que reporta Zhao *et al.* [225]

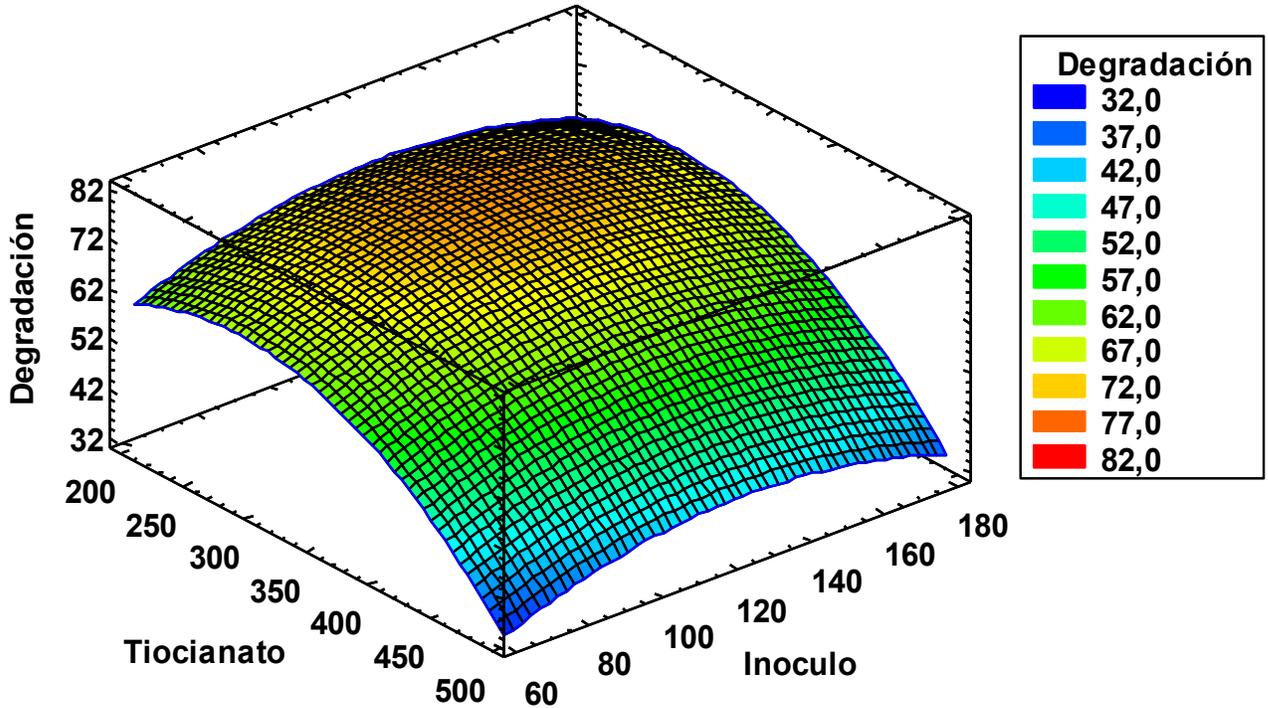


Figura 42. Gráfico de superficie de respuesta para la degradación de tiocianato.

La optimización del método se realizó con el software Statgraphics, determinando los máximos de la superficie de respuesta, la Tabla 36 muestra las condiciones sugeridas, los resultados esperados y los resultados obtenidos

Tabla 36. Optimización del método y resultados experimentales obtenidos.

Método	Tiocianato inicial (ppm)	Inoculo (µL)	Resultado (%)	% error
Optimizado	319.250	132.075	73.784	
Experimental	312.587	132.000	71.980	2.445

Los límites de confianza inferior y superior calculados para la remoción de tiocianato en la optimización fueron 73.784 % y 71.980 %. El método optimizado logró obtener los mejores porcentajes de remoción de tiocianato, ya que los resultados experimentales están dentro de los límites de confianza predichos por el software, además de tener un bajo porcentaje de error, lo que garantiza la validación del método.

A escala de laboratorio el mayor porcentaje de degradación de tiocianato fue 71.98 %, un valor similar al obtenido por Chaudhari *et al.*, quien empleo *Klebsiella pneumoniae* y *Ralstonia sp*, en reactores *batch* degradando 76 % de este sustrato [141].

Por otra parte, Zhao *et al.* logro degradar tiocianato con un rendimiento del 79 %, utilizando *Pseudomonas putida* TDB-1 [225]. El autor manifiesta que biodegradar tiocianato es un proceso complejo porque se requiere la presencia del biomarcador *CynS* en las bacterias, el cual no es común de encontrar. En esta investigación se obtuvieron rendimientos cercanos a los reportados por el autor, lo que sugiere que en el consorcio microbiano empleado alguna bacteria posea este biomarcador.

Se utilizó el valor medio de la cantidad de inóculo empleada correspondiente a 120 μL , para estudiar la degradación de tiocianato a diferentes concentraciones durante 5 días, los resultados se muestran en la Tabla 37 y Figura 43.

Tabla 37. Degradación de tiocianato en diferentes días y a diferentes niveles de tiocianato

Día	200 ppm		350 ppm		500 ppm		Blanco Remoción (%)
	Concentración (ppm)	Remoción (%)	Concentración (ppm)	Remoción (%)	Concentración (ppm)	Remoción (%)	
1	205.8868	0.0000	339.1265	0.0000	507.7647	0.0000	0
1	204.9156	0.0000	347.7447	0.0000	504.6260	0.0000	0
1	204.8546	0.0000	351.5128	0.0000	504.5239	0.0000	0
3	127.7292	37.7596	266.3685	23.0434	442.5572	12.4755	0
3	126.9057	38.1609	272.9267	21.1486	451.9223	10.6234	0
3	127.5105	37.8661	271.2963	21.6197	450.5139	10.9019	0
4	98.0366	52.2283	214.2286	38.1071	397.6393	21.3589	0
4	98.5705	51.9682	213.3219	38.3691	398.5416	21.1805	0
4	98.3152	52.0925	210.0344	39.3189	397.1920	21.4474	0
5	60.3463	70.5942	96.9678	71.9850	302.9445	40.0867	0
5	58.9889	71.2556	93.6582	72.9412	301.7059	40.3317	0
5	60.1176	70.7056	93.9834	72.8472	300.2642	40.6168	0

A 200 y 350 ppm de concentración inicial de tiocianato se observaron los mejores resultados en la degradación del compuesto, esto indica buena tolerancia de los microorganismos a estas concentraciones. Sin embargo, a medida que se aumenta la concentración inicial de tiocianato la degradación disminuye significativamente, lo que podría indicar una falta de adaptación de los microorganismos a estas altas concentraciones [115].

En las 3 concentraciones evaluadas se evidencia que el consorcio bacteriano empleado degrada el tiocianato, en el día 2 la degradación aumenta hasta finalizar el día 5.

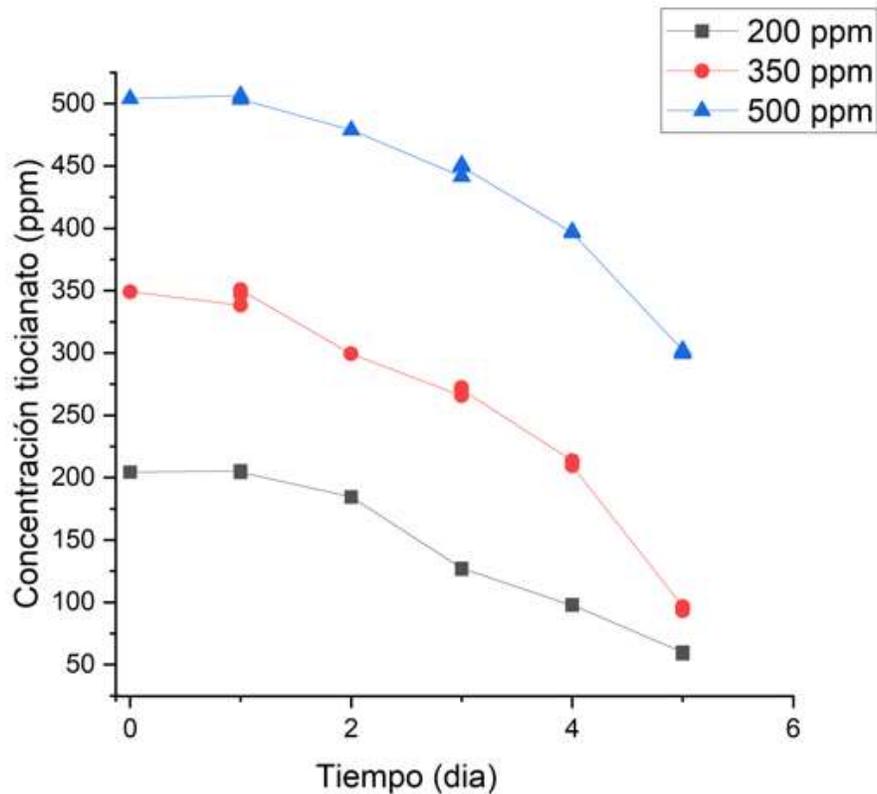


Figura 43. Seguimiento de la reacción de degradación de tiocianato, en todos los casos este sustrato decrece.

3.3.3 Diseño preliminar y puesta en marcha del reactor en continuo para evaluar la degradación preliminar de tiocianato y cianuro

El diseño de un reactor en continuo ofrece varias ventajas en comparación con los experimentos realizados a escala de laboratorio. Ya que permite una operación continua y estable, garantizando un suministro constante de sustratos a tratar y sus productos finales. Además, ofrece mayor eficiencia al optimizar los parámetros de operación y utilizar eficientemente los recursos [237]. Se evaluó la degradación de cianuro y tiocianato por separado en concentraciones constantes de 175 y 300 ppm respectivamente, valores cercanos a los optimizados en la etapa anterior.

Teniendo en cuenta los experimentos realizados a escala de laboratorio, en donde se evidenció que los procesos de degradación de cianuro y tiocianato empiezan activamente entre el segundo y tercer día, se diseñó un reactor con un volumen y flujo que permitan un tiempo de retención hidráulico, es decir un tiempo de reacción mínimo de 3 días, la Figura 44 muestra el diseño final del reactor en continuo utilizado.

El consorcio bacteriano se fijó en soportes de arenisca para minimizar la liberación de biomasa al medio líquido. Experimentalmente se observó que después de cinco días se formó una biopelícula en los soportes, los cuales se depositaron en el reactor para iniciar su funcionamiento, cabe resaltar que se llenó el reactor con los soportes en un 40 % de su capacidad, para garantizar el tiempo de retención hidráulico de 72 horas. Como eluente se empleó el medio líquido A, enriquecido con las cantidades de cianuro y tiocianato ya mencionados, la Figura 45 muestra la formación de esta biopelícula en los soportes [145].

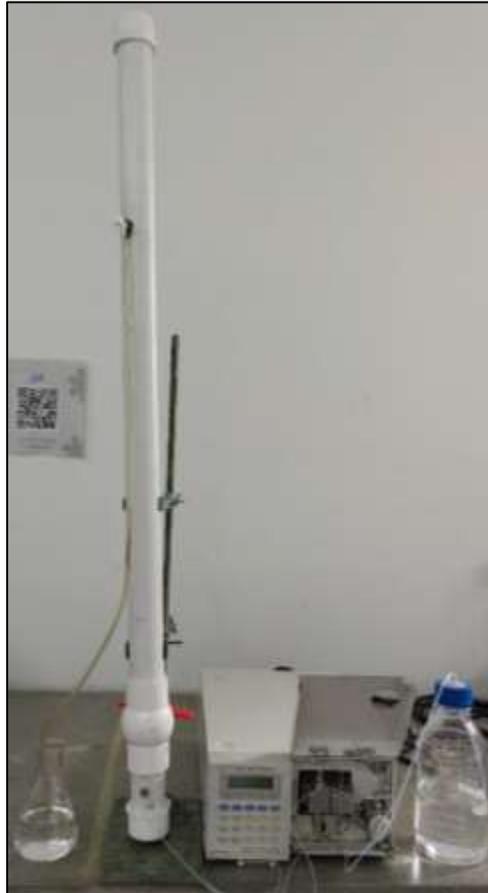


Figura 44. Reactor en continuo diseñado, a la derecha inferior se encuentra el eluente junto con la bomba, la cual está conectada a la parte inferior del reactor.

El reactor se puso en marcha inicialmente evaluando la capacidad de degradación de cianuro, al tercer día se evidenció la salida del medio líquido, de aquí en adelante se recolectaron muestras diarias por triplicado, verificando que el pH no cambie de 7.8 y evaluando la degradación del sustrato por espectrometría UV-Vis. La Tabla 38 muestra los resultados obtenidos en el primer ciclo del funcionamiento del reactor, en ella se muestran los promedios de la concentración



Figura 45. Formación de biopelícula en los soportes de arenisca después de 5 días de reacción.

Tabla 38. Seguimiento de la reacción en el reactor para cianuro evaluando la remoción final

Día	Concentración CN⁻ (ppm)	Remoción (%)
0	175	0.00
1	150	14.29
2	125	28.57
3	75	57.14
4	50	71.43
5	25	85.71
6	25	85.71
7	25	85.71

El día 0 corresponde a la concentración inicial del medio líquido, el día 1 se contó desde el momento en el cual el eluyente comienza a salir del reactor, se observa como la concentración de cianuro va disminuyendo progresivamente hasta el día 5, momento en el cual esta tiende a permanecer constante, en este punto se tiene una remoción del 85 % para este compuesto, la cual es significativa si la comparamos con los resultados de otros autores [114,223]. La Figura 46 muestra los resultados obtenidos.

El estado estacionario se evidenció después del quinto día, en este punto la degradación de cianuro alcanzada fue del 85.71 %, valor más alto que el obtenido por White *et al.* [153] quien reportó una degradación del 70 % de este sustrato, empleando un consorcio

microbiano en condiciones parecidas a las trabajadas en esta investigación. Por otro lado, comparando los resultados con los obtenidos por Guamán *et al.* [98] quien reporta una degradación del 97 % de cianuro usando *Bacillus* sp, podríamos decir que los resultados obtenidos son buenos, ya que la degradación fue ligeramente menor que la reportada, pero el autor muestra una metodología en el diseño del reactor mucho más elaborada tecnológicamente hablando.

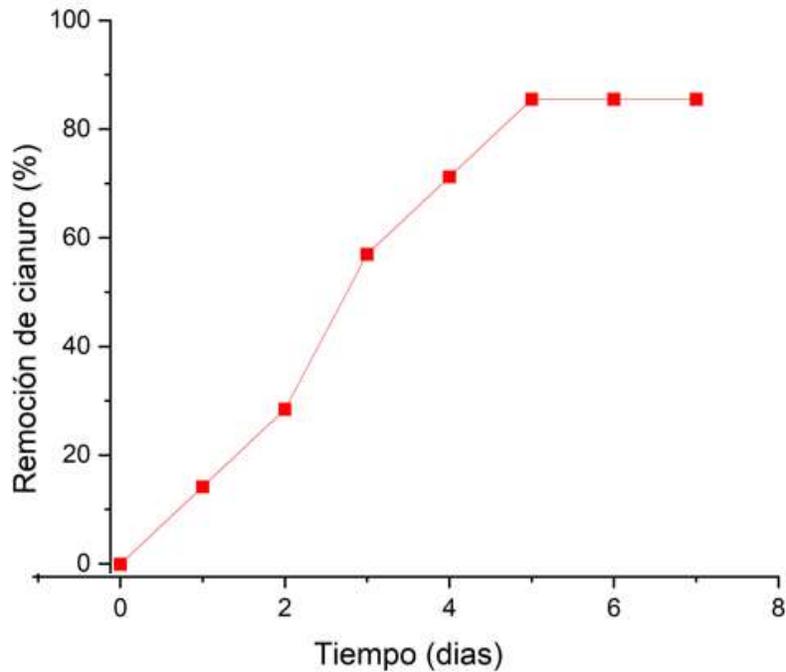


Figura 46. Gráfica de la reacción de degradación de cianuro en un reactor continuo de lecho fijo

La Figura 47 muestra la coloración de las soluciones en la determinación de cianuro por espectrofotometría, se evidencia por la intensidad del color, la tendencia mostrada en la Tabla 38 y Figura 46 relacionada con este proceso.



Figura 47. Resultados de la determinación de cianuro en el reactor por colorimetría

Ya realizado el análisis para cianuro se puso en marcha nuevamente el reactor, para analizar la degradación de tiocianato, el estudio se realizó en condiciones idénticas a las realizadas con cianuro, pero enriqueciendo el medio A con 300 ppm de tiocianato, los resultados se muestran en la Tabla 39.

Tabla 39. Seguimiento de la reacción en el reactor para tiocianato evaluando la remoción final

Día	Concentración SCN⁻ (ppm)	Remoción (%)
0	303.70265	0.0000
1	252.8901	16.7310
2	215.26305	29.1205
3	208.8174	31.2428
4	201.25085	33.7343
5	166.56545	45.1551
6	170.5877	43.8307
7	165.9395	45.3612

Los cromatogramas obtenidos en esta etapa se muestran en el anexo 7, para entender mejor el comportamiento de los resultados mostrados en la anterior tabla, se realizó un gráfico de dispersión el cual se muestra en la Figura 48.

Se evidencia un comportamiento similar a los obtenidos con el cianuro, la degradación inicial es lenta, pero va aumentando ligeramente hasta el día 4, momento en el cual la degradación sube a su máximo para permanecer constante. Al final se obtiene un rendimiento en la remoción del 45 % aproximadamente. Este es un valor bajo en comparación con el cianuro, pero es muy significativo para el tratamiento del tiocianato, teniendo en cuenta que muchos autores reportan que este sustrato es más difícil de metabolizar, por la formación de puentes de sulfuro que se pueden formar con las enzimas presentes en las bacterias y el átomo de azufre de este compuesto cianurado [94,174,179].

Comparando con los resultados que obtuvo Xiao *et al.* [115] quien empleo un consorcio microbiano para degradar completamente 154.64 ppm de tiocianato, obtuvimos un rendimiento mucho menor, sin embargo, la concentración inicial empleada por el autor es la mitad de la concentración que usamos en este ensayo, esto muestra que el consorcio microbiano que aislamos puede degradar concentraciones más altas de tiocianato en comparación con las concentraciones empleadas por otros autores.

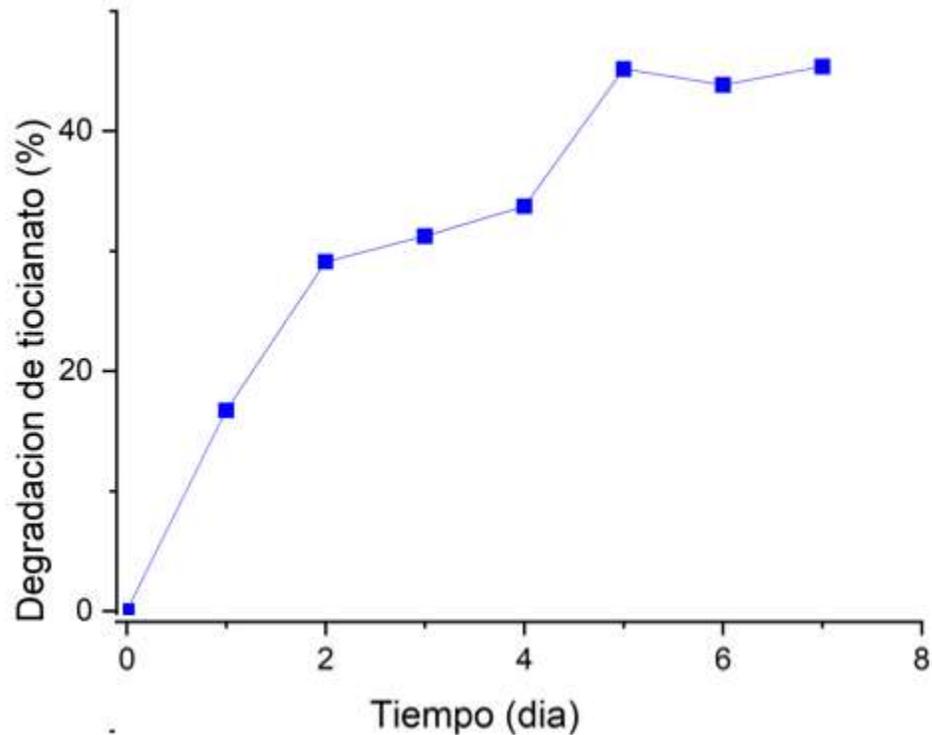


Figura 48. Gráfica de la reacción de degradación de tiocianato en un reactor de lecho fijo Villemur *et al.* [148], reporto una degradación de tiocianato del 38.5 %, empleando *thiobacillus sp* y una concentración inicial de este sustrato de 165 ppm, valores cercanos a los obtenidos en esta investigación, el auto recalca que degradar este sustrato es más complejo porque se requieren microorganismos con enzimas que tengan el sitio activo específico para incorporar el tiocianato y poderlo metabolizar.

Conclusiones

Se desarrollo un método por cromatografía iónica con detector de conductividad para la determinación simultánea de tiocianato, bromuro, cloruro, fosfato, nitrito, nitrato y sulfato. El método desarrollado es confiable, preciso, selectivo, sensible y adecuado para el análisis de muestras de agua que contengan estos aniones. Se obtuvieron recuperaciones aceptables y valores de coeficiente de variación acordes a los métodos de validación estipulados por la EPA (Environment Protection Agency) tanto en soluciones estándar como en muestras reales.

Se activó la cepa comercial de *Pseudomonas putida* ATCC 31483 y se encontró que esta bacteria tolera concentraciones de 180 ppm de cianuro y 1000 ppm de tiocianato en medio de cultivo cetrimide. Sin embargo, al examinar su capacidad degradadora de estos compuestos en medio mínimo de sales, no se evidenció crecimiento bacteriano.

Para lograr que la bacteria *Pseudomonas putida* ATCC 31483 logre metabolizar el cianuro y tiocianato en medio mínimo de sales, se realizó un proceso de adaptación gradual frente a estos sustratos. Inicialmente, se introdujo peptona como fuente de nitrógeno, con la intención de reemplazarla por cianuro y tiocianato. Se evidenció crecimiento bacteriano cuando se tenía 100 % de peptona en el medio, pero la formación de colonias fue disminuyendo al ir reemplazando la peptona con el cianuro y tiocianato, hasta que la bacteria no creció al llegar a un 0 % de peptona en el medio. A pesar de estos esfuerzos, no fue posible lograr la adaptación necesaria. Como consecuencia de esta situación, se tomó la decisión de no emplear este microorganismo en el desarrollo de esta investigación.

Se buscaron microorganismos degradadores de especies cianuradas realizando muestreos en efluentes de minería del oro. Se encontró un consorcio microbiano que logro degradar 69 % de cianuro y 58 % de tiocianato en medio mínimo de sales líquido a pH de 7.8. Este mismo consorcio no demostró actividad biológica a pH superior a 9.0 y menor a 6.0.

A partir del consorcio microbiano encontrado, se aislaron 5 morfotipos degradadores de compuestos cianurados, cada uno presentó diferentes características macroscópicas que se corroboraron a nivel microscópico. Para garantizar que cada morfotipo era diferente se realizaron pruebas bioquímicas lo que en un inicio ayudo a distinguir como especies independientes cada uno de los 5 aislamientos. Sin embargo, al hacer identificación molecular se encontró que se tenían 3 especies diferentes, una correspondiente a *Raoultella terrigena*, otra de *Rahnella aquatilis*, y tres cepas de *Pseudomonas veronii*.

Los aislamientos obtenidos mostraron actividad biológica frente a los compuestos cianurados, en el mejor de los casos se obtuvo degradación del 42.85 % para cianuro y 44.9 % para tiocianato. Si bien son rendimientos importantes, al hacer las degradaciones con el consorcio bacteriano aislado inicialmente, se encontró remoción de cianuro y tiocianato de 85.71 % y 71.98 % respectivamente, bajo condiciones optimizadas. Esto sugiere que se tiene un consorcio de microorganismos con potencial degradador de especies cianuradas, apropiado para el tratamiento de agua de origen minero.

Se optimizaron los procesos de degradación de cianuro y tiocianato a escala de laboratorio utilizando el consorcio microbiano. En esta etapa se lograron establecer valores óptimos de factores como el pH, la cantidad de inóculo, la concentración de sustrato y los tiempos de reacción para cada especie. La concentración inicial de cianuro óptima encontrada fue de 168.455 ppm y de inóculo fue 136.326 μL , bajo estas condiciones se logró degradar 85.71 % de cianuro. Para el tiocianato la optimización de variables estableció 319.250 ppm de concentración inicial y 132.075 μL de inóculo. Con estas condiciones se logró una degradación de 71.98 % de tiocianato.

Con la información obtenida en los ensayos a escala de laboratorio, se pudo diseñar el reactor en continuo que permitió la degradación de 85.71 % de cianuro y 45.36 % de tiocianato. La degradación de cianuro fue igual a escala de laboratorio y en el reactor en continuo; mientras que la degradación de tiocianato fue mucho menor en el reactor. Esto se puede deber a la dificultad que poseen los microorganismos para degradar este sustrato por el azufre que posee su molécula, razón por la cual se deben tener condiciones mucho más controladas durante la reacción para lograr maximizar su eliminación.

Recomendaciones.

Validar un método para la identificación y cuantificación de cianuro usando cromatografía iónica o HPLC, para tener un método moderno, exacto y preciso para el análisis de esta especie.

Desarrollar un método para el análisis de cationes por cromatografía iónica, ya que posiblemente se obtengan iones positivos como subproductos de la degradación de especies cianuradas.

Evaluar la degradación de otros sustratos contaminantes empleando *Pseudomonas putida* adquirida en esta investigación, existen reportes en los cuales este microorganismo puede degradar fenol o colorantes.

Valorar que otros contaminantes pueden degradar los aislamientos microbianos identificados en esta investigación, de igual manera evaluar los metabolitos que pueden producir para determinar futuras aplicaciones.

Realizar un estudio completo a cada aislado microbiano obtenido con el fin de saber cuáles de ellos son patógenos y cuales se puede ser usados en procesos industriales.

Evaluar en que soporte se podría adherir el consorcio microbiano, para intentar incorporarlo en un reactor de lecho móvil el cual se reporta que posee mayor versatilidad y eficiencia en la degradación de contaminantes.

Realizar un estudio a escala piloto de los reactores desarrollados en esta investigación con el consorcio bacteriano y evaluar la degradación de las especies cianuradas.

Utilizar otra fuente de carbono en la degradación de especies cianuradas utilizando el consorcio microbiano empleado en esta investigación. Probar sustratos contaminantes como fenol.

Productos científicos de esta investigación

Artículo publicado en la revista Científica, de la Universidad distrital Fransico Jose de Caldas



Revista
Científica

<http://revistas.udistrital.edu.co/ojs/index.php/revcie/index>



ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

Desarrollo de un método analítico por cromatografía iónica para la cuantificación de aniones en aguas residuales de origen minero

Development of an Analytical Method by Ion Chromatography for the Quantification of Anions in Wastewater of Mining Origin

Desenvolvimento de método analítico por cromatografia de íons para quantificação de ânions em águas residuais de origem mineira

Julio-Andrés Cardona-Castaño¹

Juan-David Rivera-Giraldo²

Fernando-Antonio Chávez-Vallejo³

Recibido: julio de 2022

Aceptado: diciembre de 2022

Para citar este artículo: Cardona-Castaño, J. A., Rivera-Giraldo, J. D. y Chávez-Vallejo, F. A. (2023). Desarrollo de un método analítico por cromatografía iónica para la cuantificación de aniones en aguas residuales de origen minero. *Revista Científica*, 46(1), 122-133. <https://doi.org/10.14483/23448350.19427>

Participación en la Cumbre de Sostenibilidad e Innovación Ambiental, el Congreso Nacional e Internacional de Innovación Ambiental CNIIA 2023 y el 5º Encuentro Nacional de Autoridades Ambientales



The banner features a green and white color scheme with a wavy line design. At the top, it lists three events: '5º Encuentro Nacional de Autoridades Ambientales', 'Cumbre Internacional de Sostenibilidad e Innovación Ambiental', and 'CNIIA 2023'. The central text reads 'La Corporación Autónoma Regional de Cundinamarca - CAR' and 'CERTIFICA LA PARTICIPACIÓN EN MODALIDAD DE PÓSTER DE'. Below this, the name 'Fernando Antonio Chaves' is prominently displayed, followed by 'Con el trabajo titulado: Degradación de especies cianuradas en aguas de origen minero por consorcios microbianos'. A paragraph describes the events held in Bogotá in August 2023. A signature of Luis Fernando Sanabria Martínez, Director General of CAR Cundinamarca, is shown with five gold award icons below it. The bottom of the banner shows a photograph of an event with logos for 'PRISA MEDIA', 'Universidad Externado de Colombia', and 'CAR'.

Cumbre Internacional de Sostenibilidad e Innovación Ambiental

5º Encuentro Nacional de Autoridades Ambientales

CNIIA 2023

XV

La Corporación Autónoma Regional de Cundinamarca - CAR

CERTIFICA LA PARTICIPACIÓN EN MODALIDAD DE PÓSTER DE:

Fernando Antonio Chaves

Con el trabajo titulado:

Degradación de especies cianuradas en aguas de origen minero por consorcios microbianos

En la Cumbre Internacional de Sostenibilidad e Innovación Ambiental, el 4to Congreso Internacional de Investigación e Innovación Ambiental y el 5to Encuentro Nacional de Autoridades Ambientales realizados los días 23, 24 y 25 de agosto del 2023 en el Centro de Convenciones Ágora Bogotá.

El evento tuvo una duración de 72 horas.

Se firma en Bogotá a los 08 días del mes de septiembre del 2023.


Luis Fernando Sanabria Martínez
Director general de la CAR Cundinamarca





Referencias.

- [1] Krausmann F, Wiedenhofer D, Lauk C, Haas W, Tanikawa H, Fishman T, et al. Global socioeconomic material stocks rise 23-fold over the 20th century and require half of annual resource use. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017;114:1880–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.1613773114>.
- [2] Pérez C, Cuélla M. The formation of crystalline minerals and their role in the origin of life on Earth. *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials* 2022;68. <https://doi.org/10.1016/j.pcrysgrow.2022.100558>.
- [3] Costa M, Rios F. The gold mining industry in Brazil: A historical overview. *Ore Geol Rev* 2022;148:105005. <https://doi.org/10.1016/j.oregeorev.2022.105005>.
- [4] García O, Veiga M, Cordy P, Suescún OE, Molina JM, Roeser M. Artisanal gold mining in Antioquia, Colombia: A successful case of mercury reduction. *J Clean Prod* 2015;90:244–52. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2014.11.032>.
- [5] Ospina J, Osorio J, Henao A, Palacio-Acevedo DA, Giraldo-Builes J. Retos y oportunidades para la industria minera como potencial impulsor del desarrollo en Colombia. *TecnoLógicas* 2021;24:e1683. <https://doi.org/10.22430/22565337.1683>.
- [6] Zapata G, Puentes C, Rojas G, Enrique P, Carvajal P, Chamat V, et al. Política minera de Colombia bases para la minería del futuro. Ministerio de minas y energía. Bogotá: 2016.
- [7] Kinyondo A, Huggins C. State-led efforts to reduce environmental impacts of artisanal and small-scale mining in Tanzania: Implications for fulfilment of the sustainable development goals. *Environ Sci Policy* 2021;120:157–64. <https://doi.org/10.1016/j.envsci.2021.02.017>.
- [8] Verbrugge B, Lanzano C, Libassi M. The cyanide revolution: Efficiency gains and exclusion in artisanal- and small-scale gold mining. *Geoforum* 2021;126:267–76. <https://doi.org/10.1016/j.geoforum.2021.07.030>.
- [9] Li H, Oraby E, Eksteen J. Extraction of precious metals from waste printed circuit boards using cyanide-free alkaline glycine solution in the presence of an oxidant. *Miner Eng* 2022;181. <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2022.107501>.
- [10] Tran Q, Lohitnavy M, Phenrat T. Assessing potential hydrogen cyanide exposure from cyanide-contaminated mine tailing management practices in Thailand's gold mining. *J Environ Manage* 2019;249. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109357>.
- [11] Zhang Y, Cui M, Wang J, Liu X, Lyu X. A review of gold extraction using alternatives to cyanide: Focus on current status and future prospects of the novel eco-friendly synthetic gold lixiviants. *Miner Eng* 2022;176. <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2021.107336>.
- [12] Monteiro T, Coelho A, Moreira M, Viana A, Almeida M. Interfacing the enzyme multiheme cytochrome c nitrite reductase with pencil lead electrodes: Towards a

- disposable biosensor for cyanide surveillance in the environment. *Biosens Bioelectron* 2021;191. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113438>.
- [13] Douglas Gould W, King M, Mohapatra BR, Cameron RA, Kapoor A, Koren DW. A critical review on destruction of thiocyanate in mining effluents. *Miner Eng* 2012;34:38–47. <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2012.04.009>.
- [14] Alvillo-Rivera A, Garrido-Hoyos S, Buitrón G, Thangarasu-Sarasvathi P, Rosano-Ortega G. Biological treatment for the degradation of cyanide: A review. *Journal of Materials Research and Technology* 2021;12:1418–33. <https://doi.org/10.1016/J.JMRT.2021.03.030>.
- [15] Kumar R, Saha S, Dhaka S, Kurade M, Kang C, Baek SH, et al. Remediation of cyanide-contaminated environments through microbes and plants: a review of current knowledge and future perspectives. *Geosystem Engineering* 2017;20:28–40. <https://doi.org/10.1080/12269328.2016.1218303>.
- [16] Khamar Z, Makhdoumi A, Mahmudy MH. Remediation of cyanide from the gold mine tailing pond by a novel bacterial co-culture. *Int Biodeterior Biodegradation* 2015;99:123–8. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.01.009>.
- [17] Kuyucak N, Akcil A. Cyanide and removal options from effluents in gold mining and metallurgical processes. *Miner Eng* 2013;50–51:13–29. <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2013.05.027>.
- [18] Botz M, Mudder T, Akcil A. Cyanide Treatment. *Gold Ore Processing*, Elsevier; 2016, p. 619–45. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-63658-4.00035-9>.
- [19] Andrianandraina S, Dionne J, Darvishi H, Blais J. Effect of grain size on the bacterial oxidation of a refractory gold sulfide concentrate and its dissolution by cyanidation. *Miner Eng* 2022;176. <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2021.107360>.
- [20] Luque M, Huertas M, Sáez L, Luque M, Vivián C, Castillo F, et al. Characterization of the *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 cyanase, an enzyme that is not essential for cyanide assimilation. *Appl Environ Microbiol* 2008;74:6280–8. <https://doi.org/10.1128/AEM.00916-08>.
- [21] Luque V, Moreno C, Roldán M. Biodegradation of cyanide wastes from mining and jewellery industries. *Curr Opin Biotechnol* 2016;38:9–13. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.12.004>.
- [22] Luque V, Blasco R, Huertas M, Martínez- M, Moreno C, Castillo F, et al. Alkaline cyanide biodegradation by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. vol. 33. 2005. <https://doi.org/10.1042/BST0330168>
- [23] Baxter J, Cummings SP. The current and future applications of microorganism in the bioremediation of cyanide contamination. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* 2006;90:1–17. <https://doi.org/10.1007/s10482-006-9057-y>.

- [24] Dash R, Gaur A, Balomajumder C. Cyanide in industrial wastewaters and its removal: A review on biotreatment. *J Hazard Mater* 2009;163:1–11. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.06.051>.
- [25] Sharma S. Bioremediation: Features, Strategies and applications. *Asian Journal of Pharmacy and Life Science* 2012;2:202–13. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00303>
- [26] Khamar Z, Makhdoumi-Kakhki A, Mahmudy Gharai MH. Remediation of cyanide from the gold mine tailing pond by a novel bacterial co-culture. *Int Biodeterior Biodegradation* 2015;99:123–8. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.01.009>.
- [27] Suh Y-J, Park JM, Yang J-W. Biodegradation of cyanide compounds by *Pseudomonas fluorescens* immobilized on zeolite. 1994. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(94\)90025-6](https://doi.org/10.1016/0141-0229(94)90025-6)
- [28] Li J, Wen J, Guo Y, An N, Liang C, Ge Z. Bioleaching of gold from waste printed circuit boards by alkali-tolerant *Pseudomonas fluorescens*. *Hydrometallurgy* 2020;194. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2020.105260>.
- [29] Huertas M, Sáez L, Roldán M, Luque M, Martínez M, Blasco R, et al. Alkaline cyanide degradation by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 in a batch reactor. Influence of pH. *J Hazard Mater* 2010;179:72–8. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.02.059>.
- [30] Razanamahandry L, Andrianisa H, Karoui H, Kouakou K, Yacouba H. Biodegradation of free cyanide by bacterial species isolated from cyanide-contaminated artisanal gold mining catchment area in Burkina Faso. *Chemosphere* 2016;157:71–8. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.05.020>.
- [31] Almagro V, Cabello P, Sáez L, Olaya-Abril A, Moreno-Vivián C, Roldán MD. Exploring anaerobic environments for cyanide and cyano-derivatives microbial degradation. *Appl Microbiol Biotechnol* 2018;102:1067–74. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8678-6>.
- [32] Siddig E, Verbon A, Bakhiet S, Fahal AH, van de Sande WWJ. The developed molecular biological identification tools for mycetoma causative agents: An update. *Acta Trop* 2022;225. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2021.106205>.
- [33] Hung Y, Lu T, Tsai M, Lai L, Chuang E. EasyMAP: A user-friendly online platform for analyzing 16S ribosomal DNA sequencing data. *N Biotechnol* 2021;63:37–44. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2021.03.001>.
- [34] Sheela Devi C, Vivian Joseph Ratnam P, Ramya SR, Kanungo R, Sampath E, Parameswaran S, et al. Detection of 16S rRNA gene for rapid identification of bacterial pathogens causing peritonitis in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Indian J Med Microbiol* 2022. <https://doi.org/10.1016/j.ijmmb.2022.03.011>.
- [35] Klemm D, Klemm R, Murr A. Gold of the Pharaohs – 6000 years of gold mining in Egypt and Nubia. *Journal of African Earth Sciences* 2001;33:643–59. [https://doi.org/10.1016/S0899-5362\(01\)00094-X](https://doi.org/10.1016/S0899-5362(01)00094-X).

- [36] Acemoglu D, García-Jimeno C, Robinson JA. Finding Eldorado: Slavery and long-run development in Colombia. *J Comp Econ* 2012;40:534–64. <https://doi.org/10.1016/j.jce.2012.07.003>.
- [37] Betancur B, Loaiza C, Denich M, Borgemeister C. Gold mining as a potential driver of development in Colombia: Challenges and opportunities. *J Clean Prod* 2018;199:538–53. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.07.142>.
- [38] SIMCO. Producción de oro por departamento. Http://WwwUpmeGovCo/Generadorconsultas/Consulta_SeriesAspx?IdModulo=4&tipoSerie=116&grupo=356 2017.
- [39] Specht D, Ros-Tonen MAF. Gold, power, protest: Digital and social media and protests against large-scale mining projects in Colombia. *New Media Soc* 2017;19:1907–26. <https://doi.org/10.1177/1461444816644567>.
- [40] Kuyucak N, Akcil A. Cyanide and removal options from effluents in gold mining and metallurgical processes. *Miner Eng* 2013;50–51:13–29. <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2013.05.027>.
- [41] Li Q, Xie F, Chang Y, Feng, Wang W, Behavior and mechanism of cyanide loss in ultrasound-assisted gold leaching process. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China* 2023;33:609–18. [https://doi.org/10.1016/S1003-6326\(22\)66132-6](https://doi.org/10.1016/S1003-6326(22)66132-6).
- [42] Torkaman P, Veiga M. Comparing cyanidation with amalgamation of a Colombian artisanal gold mining sample: Suggestion of a simplified zinc precipitation process. *Extr Ind Soc* 2023;13:101208. <https://doi.org/10.1016/J.EXIS.2022.101208>.
- [43] Piervandi Z. Pretreatment of refractory gold minerals by ozonation before the cyanidation process: A review. *J Environ Chem Eng* 2023;11:109013. <https://doi.org/10.1016/J.JECE.2022.109013>.
- [44] Xia J, Marthi R, Twinney J, Ghahreman A. A review on adsorption mechanism of gold cyanide complex onto activation carbon. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 2022;111:35–42. <https://doi.org/10.1016/J.JIEC.2022.04.014>.
- [45] García O, Veiga MM, Cordy P, Suescún OE, Molina JM, Roeser M. Artisanal gold mining in Antioquia, Colombia: a successful case of mercury reduction. *J Clean Prod* 2015;90:244–52. <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2014.11.032>.
- [46] Gonçalves A, Marshall BG, Kaplan RJ, Moreno-Chavez J, Veiga MM. Evidence of reduced mercury loss and increased use of cyanidation at gold processing centers in southern Ecuador. *J Clean Prod* 2017;165:836–45. <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2017.07.097>.
- [47] Kondos PD, Deschênes G, Morrison RM. Process optimization studies in gold cyanidation. *Hydrometallurgy* 1995;39:235–50. [https://doi.org/10.1016/0304-386X\(95\)00032-C](https://doi.org/10.1016/0304-386X(95)00032-C).
- [48] Ma J, Dasgupta PK. Recent developments in cyanide detection: A review. *Anal Chim Acta* 2010;673:117–25. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.05.042>.

- [49] Dash R, Gaur A, Balomajumder C. Cyanide in industrial wastewaters and its removal: A review on biotreatment. *J Hazard Mater* 2009;163:1–11. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.06.051>.
- [50] Johnson C. The fate of cyanide in leach wastes at gold mines: An environmental perspective. *Applied Geochemistry* 2015;57:194–205. <https://doi.org/10.1016/J.APGEOCHEM.2014.05.023>.
- [51] Ebbs S. Biological degradation of cyanide compounds. *Curr Opin Biotechnol* 2004;15:231–6. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2004.03.006>.
- [52] Kao C, Chen K, Liu J, Chou S, Chen S. Enzymatic degradation of nitriles by *Klebsiella oxytoca*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2006;71:228–33. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0129-0>.
- [53] Ibnul N, Russell J, Dennen K, Tripp CP. Quantification of free and weakly bound cyanide in water using infrared spectroscopy. *Talanta* 2024;266:124939. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2023.124939>.
- [54] Welman M, Hansen R. Cyanide within gold mine waste of the free state goldfields: A geochemical modelling approach. *Environmental Pollution* 2023;318:120825. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120825>.
- [55] Moran R. Cyanide uncertainties: Observations on the chemistry, toxicity and analysis of cyanide in mining-related waters. Mineral Policy Center; 1998. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2004.09.005>
- [56] Oraby E, Eksteen J. Gold dissolution and copper suppression during leaching of copper–gold gravity concentrates in caustic soda-low free cyanide solutions. *Miner Eng* 2016;87:10–7. <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2015.08.006>.
- [57] Saim A, Darteh F, Cobbinah I, Botchwey T, Ofori-Sarpong G, Amankwah RK. Synthesis of ASB-CuO nanocomposite for efficient cyanide degradation from aqueous systems: Fundamentals and potential applications to tailings water from gold operations. *Hydrometallurgy* 2023;218:106059. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2023.106059>.
- [58] Chegeni M, Shahedi A, Darban A, Jamshidi A, Homae M. Simultaneous removal of lead and cyanide from the synthetic solution and effluents of gold processing plants using electrochemical method. *Journal of Water Process Engineering* 2021;43:102284. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2021.102284>.
- [59] Montalvo P, Ticona , Illachura M, López L, Cárdenas M, Teixeira LAC. Combined treatment based on synergism between hydrodynamic cavitation and H₂O₂ for degradation of cyanide in effluents. *Miner Eng* 2021;171:107119. <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2021.107119>.
- [60] Azizitorghabeh A, Wang J, Ramsay JA, Ghahreman A. A review of thiocyanate gold leaching – Chemistry, thermodynamics, kinetics and processing. *Miner Eng* 2021;160:106689. <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2020.106689>.

- [61] Hannachi A, Valkonen A, Rzaigui M, Smirani W. Thiocyanate precursor impact on the formation of cobalt complexes: Synthesis and characterization. *Polyhedron* 2019;161:222–30. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2018.12.039>.
- [62] Duru N, Nesbitt C. Remediation of reduced sulfur species effects on gold and silver recovery during cyanide leaching. *Hydrometallurgy* 2021;205:105756. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2021.105756>.
- [63] Dong K, Xie F, Chang Y, Chen C, Wang W, Lu D, et al. A novel strategy for the efficient decomposition of toxic sodium cyanate by hematite. *Chemosphere* 2020;256:127047. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127047>.
- [64] Rahman S Kantor R, Huddy R, Thomas BC, van Zyl A, Harrison STL, et al. Genome-resolved metagenomics of a bioremediation system for degradation of thiocyanate in mine water containing suspended solid tailings. *Microbiologyopen* 2017;6:e00446. <https://doi.org/10.1002/mbo3.446>.
- [65] Wang L, An X, Xiao X, Li N, Xie D, Lai F, et al. Treatment of thiocyanate-containing wastewater: a critical review of thiocyanate destruction in industrial effluents. *World J Microbiol Biotechnol* 2023;39:35. <https://doi.org/10.1007/s11274-022-03481-4>.
- [66] Oulego P, Collado S, Garrido L, Laca A, Rendueles M, Díaz M. Wet oxidation of real coke wastewater containing high thiocyanate concentration. *J Environ Manage* 2014;132:16–23. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.10.011>.
- [67] Raper E, Stephenson T, Fisher R, Anderson DR, Soares A. Characterisation of thiocyanate degradation in a mixed culture activated sludge process treating coke wastewater. *Bioresour Technol* 2019;288:121524. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121524>.
- [68] Kim Y, Park D, Lee D, Park J. Inhibitory effects of toxic compounds on nitrification process for cokes wastewater treatment. *J Hazard Mater* 2008;152:915–21. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.07.065>.
- [69] Fan C, Guo C, Zhang J, Ding C, Li X, Reinfelder JR, et al. Thiocyanate-induced labilization of schwertmannite: Impacts and mechanisms. *Journal of Environmental Sciences* 2019;80:218–28. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2018.12.015>.
- [70] Quiroga P. N, Olmos M ;, Valentina R. Revisión de la toxicocinética y la toxicodinamia del ácido cianhídrico y los cianuros. vol. 17. 2009. Disponible en: <http://www.scielo.org.ar/pdf/ata/v17n1/v17n1a03.pdf>
- [71] Su L, Kelly JB, Hawkrige FM, Rhoten MC, Baskin SI. Characterization of cyanide binding to cytochrome c oxidase immobilized in electrode-supported lipid bilayer membranes. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 2005;581:241–8. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2005.04.023>.
- [72] Donato D Nichols O, Possingham H, Moore M, Ricci PF, Noller B. A critical review of the effects of gold cyanide-bearing tailings solutions on wildlife. *Environ Int* 2007;33:974–84. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2007.04.007>.

- [73] Manar R, Bonnard M, Rast C, Veber A, Vasseur P. Ecotoxicity of cyanide complexes in industrially contaminated soils. *J Hazard Mater* 2011;197:369–77. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.09.095>.
- [74] Maciel A, Da R, Pena S, Diniz Do Nascimento L, Almeida De Oliveira T, Celso G, et al. Health exposure risks and bioremediation of cyanide in cassava processing effluents: An overview. *Journal of Water Process Engineering* 2023;55:2214–7144. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2023.104079>.
- [75] Knoblauch A, Farnham A, Ouoba J, Zanetti J, Müller S, Jean-Richard V, et al. Potential health effects of cyanide use in artisanal and small-scale gold mining in Burkina Faso. *J Clean Prod* 2020;252. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.119689>.
- [76] Speyer M, Raymond P. The acute toxicity of thiocyanate and cyanate to rainbow trout as modified by water temperature and pH. *Environ Toxicol Chem* 1988;7:565–71. <https://doi.org/10.1002/etc.5620070705>.
- [77] Lanno R, Dixon D. The comparative chronic toxicity of thiocyanate and cyanide to rainbow trout. *Aquatic Toxicology* 1996;36:177–87. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(96\)00815-6](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(96)00815-6).
- [78] Lv C, Ding J, Qian P, Li QC, Ye SF, Chen YF. Comprehensive recovery of metals from cyanidation tailing. *Miner Eng* 2015;70:141–7. <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2014.09.007>.
- [79] Tu Y, Han P, Wei L, Zhang X, Yu B, Qian P, et al. Removal of cyanide adsorbed on pyrite by H₂O₂ oxidation under alkaline conditions. *Journal of Environmental Sciences* 2019;78:287–92. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2018.10.013>.
- [80] Dong K, Xie F, Wang W, Chang Y, Lu D, Gu X, et al. The detoxification and utilization of cyanide tailings: A critical review. *J Clean Prod* 2021;302:126946. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.126946>.
- [81] Qiu S, GUo P, Zheng Q, Yan B. Treatment of cyanide tailing slurry by Na₂S₂O₅⁻ air method. *Nonferrous Met* 2015:59–62. <https://doi.org/10.3390/app11052091>
- [82] Dash R, Gaur A, Balomajumder C. Cyanide in industrial wastewaters and its removal: A review on biotreatment. *J Hazard Mater* 2009;163:1–11. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.06.051>.
- [83] Alvillo A, Garrido S, Buitrón G, Thangarasu P, Rosano G. Biological treatment for the degradation of cyanide: A review. *Journal of Materials Research and Technology* 2021;12:1418–33. <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2021.03.030>.
- [84] Alvillo A, Garrido S, Buitrón G, Thangarasu-Sarasvathi P, Rosano-Ortega G. Biological treatment for the degradation of cyanide: A review. *Journal of Materials Research and Technology* 2021;12:1418–33. <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2021.03.030>.
- [85] Sharma M, Akhter Y, Chatterjee S. A review on remediation of cyanide containing industrial wastes using biological systems with special reference to enzymatic

- degradation. *World J Microbiol Biotechnol* 2019;35. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2643-8>.
- [86] Luque V, Moreno-Vivián C, Roldán MD. Biodegradation of cyanide wastes from mining and jewellery industries. *Curr Opin Biotechnol* 2016;38:9–13. <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2015.12.004>.
- [87] Dash R, Gaur A, Balomajumder C. Cyanide in industrial wastewaters and its removal: A review on biotreatment. *J Hazard Mater* 2009;163:1–11. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.06.051>.
- [88] Xiao X, An X, Jiang Y, Wang L, Li Z, Lai F, et al. A newly developed consortium with a highly efficient thiocyanate degradation capacity: A comprehensive investigation of the degradation and detoxification potential. *Environmental Pollution* 2023;318. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120878>.
- [89] Luque V, Cabello P, Sáez L, Olaya A, Moreno-Vivián C, Roldán M. Exploring anaerobic environments for cyanide and cyano-derivatives microbial degradation. *Appl Microbiol Biotechnol* 2018;102:1067–74. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8678-6>.
- [90] Razanamahandry L, Andrianisa H, Karoui H, Kouakou KM, Yacouba H. Biodegradation of free cyanide by bacterial species isolated from cyanide-contaminated artisanal gold mining catchment area in Burkina Faso. *Chemosphere* 2016;157:71–8. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.05.020>.
- [91] Razanamahandry L, Onwordi C, Saban W, Bashir AKH, Mekuto L, Malenga E, et al. Performance of various cyanide degrading bacteria on the biodegradation of free cyanide in water. *J Hazard Mater* 2019;380:120900. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.120900>.
- [92] Copari A. Biodegradation of cyanide by *Klebsiella* sp under different conditions of physicochemical factors at the aerated bioreactor level [Tesis]. Tacna, Peru: Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann-Tacna 2019. Disponible en: <https://revistas.unjbg.edu.pe>
- [93] Luque M, Cabello P, Sáez LP, Olaya-Abril A, Moreno-Vivián C, Roldán MD. Exploring anaerobic environments for cyanide and cyano-derivatives microbial degradation. *Appl Microbiol Biotechnol* 2018;102:1067–74. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8678-6>.
- [94] Lee C, Kim J, Do H, Hwang S. Monitoring thiocyanate-degrading microbial community in relation to changes in process performance in mixed culture systems near washout. *Water Res* 2008;42:1254–62. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.09.017>.
- [95] Nwakoby N, Ezeogo J, Orji MU, Ejimofor CF. Isolation and Identification of Bacteria and Fungi from Cassavamill Effluent in Afikpo, Ebonyi State Nigeria. *South Asian Journal of Research in Microbiology* 2021:18–28. <https://doi.org/10.9734/sajrm/2021/v10i430235>.

- [96] Vu H, Moreau J. Effects of Environmental Parameters on Thiocyanate Biodegradation by *Burkholderia phytofirmans* Candidate Strain ST01hv. *Environ Eng Sci* 2018;35:62–6. <https://doi.org/10.1089/ees.2016.0351>.
- [97] Mekuto L, Ntwampe SKO, Utomi CE, Mobo M, Mudumbi JB, Ngongang MM, et al. Performance of a continuously stirred tank bioreactor system connected in series for the biodegradation of thiocyanate and free cyanide. *J Environ Chem Eng* 2017;5:1936–45. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2017.03.038>.
- [98] Guamán Guadalupe MP, Nieto Monteros DA. Evaluation of the rotational speed and carbon source on the biological removal of free cyanide present on gold mine wastewater, using a rotating biological contactor. *Journal of Water Process Engineering* 2018;23:84–90. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2018.03.008>.
- [99] Moradkhani M, Yaghmaei S, Ghobadi Nejad Z. Biodegradation of Cyanide under Alkaline Conditions by a Strain of *Pseudomonas Putida* Isolated from Gold Mine Soil and Optimization of Process Variables through Response Surface Methodology (RSM). *Periodica Polytechnica Chemical Engineering* 2017;62:265–73. <https://doi.org/10.3311/PPch.10860>.
- [100] Guamán Guadalupe MP, Nieto Monteros DA. Evaluation of the rotational speed and carbon source on the biological removal of free cyanide present on gold mine wastewater, using a rotating biological contactor. *Journal of Water Process Engineering* 2018;23:84–90. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2018.03.008>.
- [101] Mekuto L, Ntwampe SKO, Mudumbi JBN. Microbial communities associated with the co-metabolism of free cyanide and thiocyanate under alkaline conditions. *3 Biotech* 2018;8:93. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1124-3>.
- [102] Park JM, Trevor Sewell B, Benedik MJ. Cyanide bioremediation: the potential of engineered nitrilases. *Appl Microbiol Biotechnol* 2017;101:3029–42. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8204-x>.
- [103] Javaheri Z, Aminzadeh S, Zamani M, Motallebi M. Significant increase in cyanide degradation by *Bacillus* sp. M01 PTCC 1908 with response surface methodology optimization. *AMB Express* 2017;7:200. <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0502-2>.
- [104] Clemente S, Olivera C, Benites E. Microbial Biofilm as a Methodology for Treatment of Cyanide-Contaminated Water. *Chem Eng Trans* 2022;93:151–6. <https://doi.org/10.3303/CET2293026>.
- [105] Wang W, Duan Y, Wu Y, Huang Y, Gao F, Wang Z, et al. Harmless treatment of cyanide tailings by a bifunctional strain JK-1 based on biodegradation and biomineralization. *J Clean Prod* 2021;313:127757. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.127757>.
- [106] Rosario C, Vallenast, Arévalo S, Espinosa D, Tenório J. Biodegradation of cyanide using a *Bacillus subtilis* strain isolated from artisanal gold mining tailings. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 2023;40:129–36. <https://doi.org/10.1007/s43153-022-00228-4>.

- [107] Wang X, Liu L, Lin W, Luo J. Development and characterization of an aerobic bacterial consortium for autotrophic biodegradation of thiocyanate. *Chemical Engineering Journal* 2020;398. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.125461>.
- [108] Qian X, Chen L, Sui Y, Chen C, Zhang W, Zhou J, et al. Biotechnological potential and applications of microbial consortia. *Biotechnol Adv* 2020;40. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107500>.
- [109] Gupta P, Ahammad SZ, Sreekrishnan TR. Improving the cyanide toxicity tolerance of anaerobic reactor: Microbial interactions and toxin reduction. *J Hazard Mater* 2016;315:52–60. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.04.028>.
- [110] Edward C, Smart M, Harrison STL. Towards recycling remediated cyanidation tailings water to the mineral biooxidation process – Impact on microbial community and its performance. *Miner Eng* 2022;176. <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2021.107359>.
- [111] Motsoeneng L, Naidoo V, Mekuto L. Biogas production and metabolite profiling from anaerobic biodegradation of free cyanide using municipal waste activated sludge. *Bioresour Technol Rep* 2023;101442. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2023.101442>.
- [112] Huddy J, Van Zyl AW, Van Hille RP, Harrison STL. Characterisation of the complex microbial community associated with the ASTER™ thiocyanate biodegradation system. *Miner Eng* 2015;76:65–71. <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2014.12.011>.
- [113] Razanamahandry LC, Andrianisa HA, Karoui H, Kouakou KM, Yacouba H. Biodegradation of free cyanide by bacterial species isolated from cyanide-contaminated artisanal gold mining catchment area in Burkina Faso. *Chemosphere* 2016;157:71–8. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2016.05.020>.
- [114] Khamar Z, Makhdoumi-Kakhki A, Mahmudy Gharaie MH. Remediation of cyanide from the gold mine tailing pond by a novel bacterial co-culture. *Int Biodeterior Biodegradation* 2015;99:123–8. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.01.009>.
- [115] Xiao X, An X, Jiang Y, Wang L, Li Z, Lai F, et al. A newly developed consortium with a highly efficient thiocyanate degradation capacity: A comprehensive investigation of the degradation and detoxification potential. *Environmental Pollution* 2023;318:120878. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2022.120878>.
- [116] Martin M, Batiannis C, Bruinsma L, Asin E, Garcia L, Weusthuis RA, et al. A navigation guide of synthetic biology tools for *Pseudomonas putida*. *Biotechnol Adv* 2021;49:107732. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107732>.
- [117] Singh U, Arora NK, Sachan P. Simultaneous biodegradation of phenol and cyanide present in coke-oven effluent using immobilized *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas stutzeri*. *Brazilian Journal of Microbiology* 2018;49:38–44. <https://doi.org/10.1016/J.BJM.2016.12.013>.
- [118] Zhao F, Zhang Q, He L, Yang W, Si M, Liao Q, et al. Molecular level insight of thiocyanate degradation by *Pseudomonas putida* TDB-1 under a high arsenic and alkaline condition. *Science of The Total Environment* 2023;874:162578. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2023.162578>.

- [119] Haque M, Mosharaf M, Khatun M, Haque M, Biswas MS, Islam MS, et al. Biofilm Producing Rhizobacteria With Multiple Plant Growth-Promoting Traits Promote Growth of Tomato Under Water-Deficit Stress. *Front Microbiol* 2020;11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.542053>.
- [120] Montes D, Von Rymon A-L, Ravella S, Groenhagen U, Herrmann J, Zaburannyi N, et al. Long-Chain Alkyl Cyanides: Unprecedented Volatile Compounds Released by *Pseudomonas* and Micromonospora Bacteria. *Angewandte Chemie - International Edition* 2017;56:4342–6. <https://doi.org/10.1002/anie.201611940>.
- [121] Yang W. Components of rhizospheric bacterial communities of barley and their potential for plant growth promotion and biocontrol of Fusarium wilt of watermelon. *Brazilian Journal of Microbiology* 2019;50:749–57. <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00089-z>.
- [122] Song J, Han G, Wang Y, Jiang X, Zhao D, Li M, et al. Pathway and kinetics of malachite green biodegradation by *Pseudomonas veronii*. *Sci Rep* 2020;10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61442-z>.
- [123] Liu G, Cao L, Han R. Plant quercetin degradation by gut bacterium *Raoultella terrigena* of ghost moth Thitarodes xiaojinensis. *Front Microbiol* 2022;13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1079550>.
- [124] Castillo A, Flores A, Llaca J, Pérez F, Casillas N. Microbiología del género *Raoultella*, características clínicas y dificultades para su diagnóstico. vol. 56. 2018. <https://www.medigraphic.com/pdfs/imss/im-2018/im185i.pdf>
- [125] Liu L, Yu S, Zhao W. A novel sucrose isomerase producing isomaltulose from *raoultella terrigena*. *Applied Sciences (Switzerland)* 2021;11. <https://doi.org/10.3390/app11125521>.
- [126] Vejvoda V, Martínková L, Veselá AB, Kaplan O, Lutz-Wahl S, Fischer L, et al. Biotransformation of nitriles to hydroxamic acids via a nitrile hydratase-amidase cascade reaction. *J Mol Catal B Enzym* 2011;71:51–5. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.03.008>.
- [127] Hayat R, Ahmed I, Sheirdil RA. An overview of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) for sustainable agriculture. vol. 9789400741. 2012. https://doi.org/10.1007/978-94-007-4116-4_22.
- [128] Ferchichi N, Toukabri W, Boularess M, Smaoui A, Mhamdi R, Trabelsi D. Isolation, identification and plant growth promotion ability of endophytic bacteria associated with lupine root nodule grown in Tunisian soil. *Arch Microbiol* 2019;201:1333–49. <https://doi.org/10.1007/s00203-019-01702-3>.
- [129] Xu Q, Zhang S, Ren J, Li K, Li J, Guo Y. Uptake of Selenite by *Rahnella aquatilis* HX2 Involves the Aquaporin AqpZ and Na⁺/H⁺ Antiporter NhaA. *Environ Sci Technol* 2023;57:2371–9. <https://doi.org/10.1021/acs.est.2c07028>.
- [130] Deloya A. Treatment of cyanide wastes through bioremediation. *Tecnología en Marcha, Cartago*, v. 29, supl. 1, p. 33-46. <http://dx.doi.org/10.18845/tm.v29i5.2515>.

- [131] Restrepo O Montoya CA, Muñoz N. Microbial degradation of cyanide from gold metallurgical plants utilizing *P. fluorecens*. Año 2006;73:45–51. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/262467370>
- [132] Moradkhani M, Yaghmaei S, Nejad ZG. Biodegradation of cyanide under alkaline conditions by a strain of *Pseudomonas putida* isolated from gold mine soil and optimization of process variables through response surface methodology (RSM). *Periodica Polytechnica Chemical Engineering* 2018;62:265–73. <https://doi.org/10.3311/PPch.10860>.
- [133] Moradkhani M, Yaghmaei S, Ghobadi Nejad Z. Biodegradation of Cyanide under Alkaline Conditions by a Strain of *Pseudomonas Putida* Isolated from gold mine soil and optimization of process variables through response surface methodology (RSM). *Periodica Polytechnica Chemical Engineering* 2017;62:265–73. <https://doi.org/10.3311/PPch.10860>.
- [134] Cabello P, Luque V, Olayl A, Sáez L Moreno- C, Roldán M. Assimilation of cyanide and cyano-derivatives by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344: from omic approaches to biotechnological applications. *FEMS Microbiol Lett* 2018;365. <https://doi.org/10.1093/femsle/fny032>.
- [135] Bouari A, Begum SA, Maiga Y, Egiebor N. Biodegradation of Cyanide Complex Compounds in Aqueous Media by *Pseudomonas resinovorans*. *Environ Eng Sci* 2013;30:757–64. <https://doi.org/10.1089/ees.2013.0254>.
- [136] Restrepo O, Montoya C, Muñoz N. Microbial degradation of cyanide from gold metallurgical plants utilizing *P. fluorecens*. Año 2006;73:45–51. <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2021.03.030>
- [137] Avcioglu N, Bilkay I. Biological treatment of cyanide by using *Klebsiella pneumoniae* Species. *Food Technol Biotechnol* 2016;54. <https://doi.org/10.17113/ftb.54.04.16.4518>.
- [138] Kao C, Liu J, Lou H, Lin C, Chen S. Biotransformation of cyanide to methane and ammonia by *Klebsiella oxytoca*. *Chemosphere* 2003;50:1055–61. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(02\)00624-0](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00624-0).
- [139] Nallapan, Sjahrir F, Ibrahim L, Cass A. Biodegradation of cyanide by *Rhodococcus* UKMP-5M. *Biologia (Bratisl)* 2013;68:177–85. <https://doi.org/10.2478/s11756-013-0158-6>.
- [140] Cabuk A, Unal AT, Kolankaya N. Biodegradation of Cyanide by a White Rot Fungus, *Trametes versicolor*. *Biotechnol Lett* 2006;28:1313–7. <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9090-y>.
- [141] Chaudhari AU, Kodam KM. Biodegradation of thiocyanate using co-culture of *Klebsiella pneumoniae* and *Ralstonia* sp. *Appl Microbiol Biotechnol* 2010;85:1167–74. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2299-7>.
- [142] Sernaque A, Cornejo L, Regard J, Mialhe L. Caracterización molecular de bacterias cultivables y no cultivables procedentes de pozas de lixiviación con cianuro. *Rev Peru Biol* 2019;26:275–82. <https://doi.org/10.15381/rpb.v26i2.16383>.

- [143] Kaewkannetra P, Imai T, Garcia-Garcia FJ, Chiu TY. Cyanide removal from cassava mill wastewater using *Azotobacter vinelandii* TISTR 1094 with mixed microorganisms in activated sludge treatment system. *J Hazard Mater* 2009;172:224–8. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.06.162>.
- [144] Lay-Son M, Drakides C. New approach to optimize operational conditions for the biological treatment of a high-strength thiocyanate and ammonium waste: pH as key factor. *Water Res* 2008;42:774–80. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.08.009>.
- [145] Ibrahim K, Syed M, Shukor M, Ahmad SA. Biological remediation of cyanide: A review. *Biotropia (Bogor)* 2015;22:151–63. <https://doi.org/10.11598/btb.2015.22.2.393>.
- [146] Flores Hernández A, Flores Montiel M, Reyes Reyes J, Astorga Zaragoza C. Diseño y modelado de un bioreactor tipo batch y continuo para aplicaciones de control automático. *Aplicaciones a La Microbiología Industrial* 2013;1:86–92.
- [147] Mekuto L, Ntwampe S, Jackson V. Biodegradation of free cyanide and subsequent utilisation of biodegradation by-products by *Bacillus* consortia: optimisation using response surface methodology. *Environmental Science and Pollution Research* 2015;22:10434–43. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4221-4>.
- [148] Villemur R, Juteau P, Bougie V, Ménard J, Déziel E. Development of four-stage moving bed biofilm reactor train with a pre-denitrification configuration for the removal of thiocyanate and cyanate. *Bioresour Technol* 2015;181:254–62. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.051>.
- [149] Dvořák L, Lederer T, Jirků V, Masák J, Novák L. Removal of aniline, cyanides and diphenylguanidine from industrial wastewater using a full-scale moving bed biofilm reactor. *Process Biochemistry* 2014;49:102–9. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.10.011>.
- [150] Chen CY, Kao CM, Chen SC, Chien HY, Lin CE. Application of immobilized cells to the treatment of cyanide wastewater. *Water Science and Technology* 2007;56:99–107. <https://doi.org/10.2166/wst.2007.699>.
- [151] Zhou X, Liu L, Chen Y, Xu S, Chen J. Efficient biodegradation of cyanide and ferrocyanide by Na-alginate beads immobilized with fungal cells of *Trichoderma koningii*. *Can J Microbiol* 2007;53:1033–7. <https://doi.org/10.1139/W07-070>.
- [152] Campos M, Pereira P, Roseiro JC. Packed-bed reactor for the integrated biodegradation of cyanide and formamide by immobilised *Fusarium oxysporum* CCMI 876 and *Methylobacterium* sp. RXM CCMI 908. *Enzyme Microb Technol* 2006;38:848–54. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.08.008>.
- [153] White DM, Schnabel W. Treatment of cyanide waste in a sequencing batch biofilm reactor. *Water Res* 1998;32:254–7. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(97\)00167-X](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(97)00167-X).
- [154] Vincent S, Dale C, Young B, Laliberté M, Pouzenc A. Gold Mine Effluent Treatment: Cyanide Compounds and Total Nitrogen Biodegradation using Moving Bed Biofilm

- Reactor. Proceedings of the Water Environment Federation 2016;2016:5636–51. <https://doi.org/10.2175/193864716819714474>.
- [155] Rahaman F, Gautam P, Mondal S, Gupta P. Colorimetric detection of cyanide ions using Schiff base derived chemosensor. *Mater Today Proc* 2022;62:5589–92. <https://doi.org/10.1016/J.MATPR.2022.04.805>.
- [156] Hemalatha V, Vijayakumar V. A highly selective colorimetric sensing of CN⁻ ion by a hydrazine appended Schiff base and its application in detection of CN⁻ ion present in tobacco and food samples. *Inorg Chem Commun* 2022;144:109894. <https://doi.org/10.1016/J.INOCHE.2022.109894>.
- [157] Rai P, Mehrotra S, Raj A, Sharma SK. A rapid and sensitive colorimetric method for the detection of cyanide ions in aqueous samples. *Environ Technol Innov* 2021;24:101973. <https://doi.org/10.1016/J.ETI.2021.101973>.
- [158] Saraji M, Bagheri N. Paper-based headspace extraction combined with digital image analysis for trace determination of cyanide in water samples. *Sens Actuators B Chem* 2018;270:28–34. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.05.021>.
- [159] Afkhami A, Sarlak N, Zarei A. Simultaneous kinetic spectrophotometric determination of cyanide and thiocyanate using the partial least squares (PLS) regression. *Talanta* 2007;71:893–9. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2006.05.079>.
- [160] Jaszczak E, Koziół K, Kielbratowska B, Polkowska Ż. Application of ion chromatography with pulsed amperometric detection for the determination of trace cyanide in biological samples, including breast milk. *Journal of Chromatography B* 2019;1110–1111:36–42. <https://doi.org/10.1016/J.JCHROMB.2019.02.008>.
- [161] Madmon M, Shifrovich A, Tamar SY, Weissberg A. Simple and fast determination of free cyanide in drinking water by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry following “in vial” derivatization. *Int J Mass Spectrom* 2021;463:116553. <https://doi.org/10.1016/J.IJMS.2021.116553>.
- [162] Kumar Meher A, Labhsetwar N, Bansiwala A. An improved method for direct estimation of free cyanide in drinking water by Ion Chromatography-Pulsed Amperometry Detection (IC-PAD) on gold working electrode. *Food Chem* 2018;240:131–8. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2017.07.041>.
- [163] Martinez A. Cromatografía iónica, recientes avances instrumentales. Página web: <http://AvibertBlogspotCom/2011/12/Cromatografia-Ionica-Recientes-AvancesHtml> 2011. <http://avibert.blogspot.com/2011/12/cromatografia-ionica-recientes-avances.html> (accessed January 28, 2023).
- [164] Pohl C. Use of Ion Chromatography for Monitoring Ionic Contaminants in Water. *Chemistry and Water: The Science Behind Sustaining the World’s Most Crucial Resource*, Elsevier Inc.; 2017, p. 353–91. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809330-6.00010-6>.
- [165] Yoshimura T, Araoka D, Tamenori Y, Kuroda J, Kawahata H, Ohkouchi N. Lithium, magnesium and sulfur purification from seawater using an ion chromatograph with a

- fraction collector system for stable isotope measurements. *J Chromatogr A* 2018;1531:157–62. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.11.052>.
- [166] Ma Y-J, Li M, Yu H, Li R-S. Fast analysis of thiocyanate by ion-pair chromatography with direct conductivity detection on a monolithic column. *Chinese Chemical Letters* 2013;24:1067–9. <https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2013.06.029>.
- [167] Destanoğlu O, Gümüş Yılmaz G. Determination of cyanide, thiocyanate, cyanate, hexavalent chromium, and metal cyanide complexes in various mixtures by ion chromatography with conductivity detection. *J Liq Chromatogr Relat Technol* 2016;39:465–74. <https://doi.org/10.1080/10826076.2016.1192044>.
- [168] Ye M, Nesterenko PN, Yan Z, Xie P, Chen M. Determination of inorganic anions in weak acids by using ion exclusion chromatography – Capillary ion chromatography switching column technique. *J Chromatogr A* 2019;1588:169–73. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.01.007>.
- [169] Destanoğlu O, Yılmaz G, Apak R. Selective Determination of Free Cyanide in Environmental Water Matrices by Ion Chromatography with Suppressed Conductivity Detection. *J Liq Chromatogr Relat Technol* 2015;38:1537–45. <https://doi.org/10.1080/10826076.2015.1076460>.
- [170] Gutierrez Humberto DLVR. *Análisis y diseño de experimentos*. 2nd ed. Mexico D. F.: McGraw-Hill; 2008.
- [171] Gov W. Office of Water Protocol for Review and Validation of New Methods for Regulated Organic and Inorganic Analytes in Wastewater Under EPA's Alternate Test Procedure Program. 2018. Disponible en: https://www.epa.gov/sites/default/files/2018-03/documents/chemical-new-method-protocol_feb-2018.pdf
- [172] Rorke G, Mühlbauer R. Biological processes for thiocyanate and cyanide degradation, 1999, p. 731–40. [https://doi.org/10.1016/S1572-4409\(99\)80164-3](https://doi.org/10.1016/S1572-4409(99)80164-3).
- [173] Babu G, Wolfram J, Chapatwala K. Conversion of sodium cyanide to carbon dioxide and ammonia by immobilized cells of *Pseudomonas putida*. *J Ind Microbiol* 1992;9:235–8. <https://doi.org/10.1007/BF01569629>.
- [174] Chapatwala K, Babu G, Vijaya O, Kumar K, Wolfram J. Biodegradation of cyanides, cyanates and thiocyanates to ammonia and carbon dioxide by immobilized cells of *Pseudomonas putida*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 1998;20:28–33. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900469>.
- [175] Singh N, Balomajumder C. Simultaneous biosorption and bioaccumulation of phenol and cyanide using coconut shell activated carbon immobilized *Pseudomonas putida* (MTCC 1194). *J Environ Chem Eng* 2016;4:1604–14. <https://doi.org/10.1016/J.JECE.2016.02.011>.
- [176] Saha K, Kabir N, Islam M, Amin M, Hoque K, Halder K, et al. Isolation and characterisation of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from hospital environments in tertiary care hospitals in Dhaka, Bangladesh. *J Glob Antimicrob Resist* 2022;30:31–7. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2022.04.008>.

- [177] Ann C. Smith, Marise A. Hussey. Gram Stain Protocols. 2005. Disponible en: <https://asm.org/getattachment/5c95a063-326b-4b2f-98ce-001de9a5ece3/gram-stain-protocol-2886.pdf>
- [178] Singh U, Arora N, Sachan P. Simultaneous biodegradation of phenol and cyanide present in coke-oven effluent using immobilized *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas stutzeri*. *Brazilian Journal of Microbiology* 2018;49:38–44. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.12.013>.
- [179] Path Y. Isolation of thiocyanate degrading chemoheterotrophic bacterial consortium. *Nature Environment and Pollution Technology* 5(1) 2014;5:135–8. Disponible en: https://papers.ssrn.com/sol3/papers.cfm?abstract_id=2524814
- [180] Paruchuri YL, Shivaraman N, Kumaran P. Microbial Transformation of Thiocyanate *Environ Pollut.* 1990;68(1-2):15-28. DOI: 10.1016/0269-7491(90)90011-z
- [181] Wang W da, Duan Y ting, Wu Y ming, Huang Y, Gao F wei, Wang Z, et al. Harmless treatment of cyanide tailings by a bifunctional strain JK-1 based on biodegradation and biomineralization. *J Clean Prod.* <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2021.127757>.
- [182] Ruger H. Substrate-Dependent Cold Adaptations in Some Deep-Sea Sediment Bacteria. *Syst Appl Microbiol* 1988;11:90–3. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(88\)80053-5](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(88)80053-5).
- [183] Ramasamy K Brugel S, Eriksson K, Andersson A. *Pseudomonas* ability to utilize different carbon substrates and adaptation influenced by protozoan grazing. *Environ Res* 2023;232:116419. <https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2023.116419>.
- [184] Echeverri G. Adaptaci3n de bacterias a diferentes concentraciones de fenol en el laboratorio: aspectos esenciales para un proceso de biodegradaci3n. *Publicaci3n Científica en ciencias biomédicas* 2011;9:60–9. Disponible en: <https://revistas.unicolmayor.edu.co/index.php/nova/article/view/173/346>
- [185] Razanamahandry L, Andrianisa H, Karoui H, Kouakou K, Yacouba H. Biodegradation of free cyanide by bacterial species isolated from cyanide-contaminated artisanal gold mining catchment area in Burkina Faso. *Chemosphere* 2016;157:71–8. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.05.020>.
- [186] Razanamahandry L, Onwordi CT, Saban W, Bashir A, Mekuto L, Malenga E, et al. Performance of various cyanide degrading bacteria on the biodegradation of free cyanide in water. *J Hazard Mater* 2019;380. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.120900>.
- [187] Wang W da, Duan Y ting, Wu Y ming, Huang Y, Gao F, Wang Z, et al. Harmless treatment of cyanide tailings by a bifunctional strain JK-1 based on biodegradation and biomineralization. *J Clean Prod* 2021;313:127757. <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2021.127757>.
- [188] Jayan N, Laxmi M. Isolation and studies on zinc removal using microorganism from contaminated soil. *Mater Today Proc* 2021;44:1892–7. <https://doi.org/10.1016/J.MATPR.2020.12.071>.

- [189] Guo N, Wei Q, Xu Y. Optimization of cryopreservation of pathogenic microbial strains. *J Biosaf Biosecur* 2020;2:66–70. <https://doi.org/10.1016/j.jobb.2020.11.003>.
- [190] Iqbal H, Ishfaq M, Abbas M, Wahab A, Qayum M, Mehsud S. Pathogenic bacteria and heavy metals toxicity assessments in evaluating unpasteurized raw milk quality through biochemical tests collected from dairy cows. *Asian Pac J Trop Dis* 2016;6:868–72. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(16\)61148-9](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(16)61148-9).
- [191] Iqbal H, Ishfaq M, Abbas MN, Wahab A, Qayum M, Mehsud S. Pathogenic bacteria and heavy metals toxicity assessments in evaluating unpasteurized raw milk quality through biochemical tests collected from dairy cows. *Asian Pac J Trop Dis* 2016;6:868–72. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(16\)61148-9](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(16)61148-9).
- [192] Bou G, Fernández-Olmos A, García C, Sáez-Nieto JA, Valdezate S. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2011;29:601–8. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>.
- [193] Dobrosz-Gómez I, Ramos García BD, GilPavas E, Gómez García MÁ. Kinetic study on HCN volatilization in gold leaching tailing ponds. *Miner Eng* 2017;110:185–94. <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2017.05.001>.
- [194] Kim YM, Cho H, Lee DS, Park D, Park J. Comparative study of free cyanide inhibition on nitrification and denitrification in batch and continuous flow systems. *Desalination* 2011;279:439–44. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2011.06.026>.
- [195] Chen D, Shi F, Zhou Y, Xu W, Shen H, Zhu Y. Hyperbranched anion exchangers prepared from polyethylene polyamine modified polymeric substrates for ion chromatography. *J Chromatogr A* 2021;1655. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462508>.
- [196] Chen N, Wu S, Zhu Y. An electrodialytic device for automated inorganic anion preconcentration with determination by ion chromatography-conductivity detection. *J Chromatogr A* 2021;1638:461898. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.461898>.
- [197] Iammarino M, Di Taranto A, Muscarella M, Nardiello D, Palermo C, Centonze D. Development of a new analytical method for the determination of sulfites in fresh meats and shrimps by ion-exchange chromatography with conductivity detection. *Anal Chim Acta* 2010;672:61–5. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.04.002>.
- [198] Haddad P, Shaw MJ, Dicoski GW. New conductivity detection response equation for anions eluted with fully and partially ionised eluents in non-suppressed ion chromatography. *J Chromatogr A* 2002;956:59–64. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)00315-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00315-1).
- [199] Geng X, Zhang S, Wang Q, Zhao Z (Kent). Determination of organic acids in the presence of inorganic anions by ion chromatography with suppressed conductivity detection. *J Chromatogr A* 2008;1192:187–90. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.03.073>.
- [200] Zhang X, Liu Y-Q, Yu H, Zhang R-Q. Rapid and simultaneous determination of piperidinium and pyrrolidinium ionic liquid cations by ion pair chromatography

- coupled with direct conductivity detection. *Chinese Chemical Letters* 2017;28:126–30. <https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2016.05.034>.
- [201] Lopez-Moreno C, Perez IV, Urbano AM. Development and validation of an ionic chromatography method for the determination of nitrate, nitrite and chloride in meat. *Food Chem* 2016;194:687–94. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.017>.
- [202] Nesterenko PN, Paull B. Ion chromatography. *Liquid Chromatography: Fundamentals and Instrumentation: Second Edition*, vol. 1, Elsevier; 2017, p. 205–44. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805393-5.00009-9>.
- [203] Zamora Martínez O, Montaña Hilario J, Galindo Zavala V, Siebe Grabach C, Prado Pano BL. Determinación Simultánea De Cationes Mayoritarios En Muestras De Agua Residual Por Medio De Cromatografía De Iones Con Detección Conductimétrica. *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental* 2016;32:293–301. <https://doi.org/10.20937/RICA.2016.32.03.04>.
- [204] Napolitano H. Educación en Ciencias Químicas, Diseño de Experimentos. Disponible en: https://tuauлавirtual.educatic.unam.mx/pluginfile.php/1760839/mod_resource/content/1/Napolitano%20Dise%C3%B1o%20de%20experimentos.pdf
- [205] Pinillos M, Lopera G. A pharmaceutical formulation development using a experimental mixture design. *Revista de la facultad de Química farmacéutica* 2009;16:338–53. DOI:10.17533/udea.vitae.2804
- [206] Castillo J, Rodríguez M, Wong A, Villalpando P. Diseños experimentales e investigación científica (Experimental designs and scientific research). *Diseños Experimentales Innovaciones de negocios* 2007;4:283–330. Disponible en: <https://revistainnovaciones.uanl.mx/index.php/revin/article/view/190/176>
- [207] Rudnykh S, López V. Elección de la función de deseabilidad para diseños óptimos bajo restricciones. *Revista EIA* 2018;15:13–24. <https://doi.org/10.24050/reia.v15i30.903>.
- [208] Gisbert A, Navarro J, Torres J, García M. Testing experimental designs in liquid chromatography (II): Influence of the design geometry on the prediction performance of retention models. *J Chromatogr A* 2021;1654. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462458>.
- [209] Madji B, Blasco H, Emond P, Mavel S. Liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry-based cell metabolomics: Experimental design, recommendations, and applications. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 2016;75:118–28. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.08.003>.
- [210] Hibbert DB. Experimental design in chromatography: A tutorial review. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2012;910:2–13. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.01.020>.
- [211] Ramezani A, Absalan G, Ahmadi R. Green-modified micellar liquid chromatography for isocratic isolation of some cardiovascular drugs with different polarities through

- experimental design approach. *Anal Chim Acta* 2018;1010:76–85.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.12.021>.
- [212] Atkinson A, Tobias R. Optimal experimental design in chromatography. *J Chromatogr A* 2008;1177:1–11. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.11.045>.
- [213] Dovidauskas S, Okada I, dos Santos F. Validation of a simple ion chromatography method for simultaneous determination of glyphosate, aminomethylphosphonic acid and ions of Public Health concern in water intended for human consumption. *J Chromatogr A* 2020;1632. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461603>.
- [214] Michalski R, Lyko A, Kurzyca I. Matrix influences on the determination of common ions by using ion chromatography Part 1-determination of inorganic anions. *J Chromatogr Sci* 2012;50:482–93. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bms027>.
- [215] Rice EW, Bridgewater L, Association APH. Standard methods for the examination of water and wastewater. vol. 10. American public health association Washington, DC; 2012. Disponible en: <https://www.standardmethods.org/>
- [216] Córdova C, Hepp C, Luna G, Sepúlveda G, Barattini P, Zagal E, et al. An alternative method to measure available sulphur by ion chromatography in volcanic soils. *Chilean J Agric Anim Sci, Ex Agro-Ciencia* 2017;33:118.
<http://dx.doi.org/10.4067/S0719-38902017005000401>
- [217] Jiang J, James CA, Wong P. Bioanalytical method development and validation for the determination of glycine in human cerebrospinal fluid by ion-pair reversed-phase liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 2016;128:132–40. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.05.019>.
- [218] Zhao F, Zhang Q, He L, Yang W, Si M, Liao Q, et al. Molecular level insight of thiocyanate degradation by *Pseudomonas putida* TDB-1 under a high arsenic and alkaline condition. *Science of The Total Environment* 2023;874:162578.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162578>.
- [219] Lucchesi G, Liffourrena An. Adaptive response and degradation of ammonium compounds by *Pseudomonas putida* ATCC 12633. *Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology* 2010:1–7.
- [220] Baxter J, Cummings SP. The Impact of Bioaugmentation on Metal Cyanide Degradation and Soil Bacteria Community Structure. *Biodegradation* 2006;17:207–17. <https://doi.org/10.1007/s10532-005-4219-6>.
- [221] Nikolaev Y. Extracellular Factors of Bacterial Adaptation to Unfavorable Environmental Conditions. *Appl Biochem Microbiol* 2004;40:327–36.
<https://doi.org/10.1023/B:ABIM.0000033907.28096.2e>.
- [222] Razanamahandry L, Onwordi C, Saban W, Bashir AKH, Mekuto L, Malenga E, et al. Performance of various cyanide degrading bacteria on the biodegradation of free cyanide in water. *J Hazard Mater* 2019;380:120900.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.120900>.

- [223] Akcil A, Karahan A, Ciftci H, Sagdic O. Biological treatment of cyanide by natural isolated bacteria (*Pseudomonas* sp.). *Miner Eng* 2003;16:643–9. [https://doi.org/10.1016/S0892-6875\(03\)00101-8](https://doi.org/10.1016/S0892-6875(03)00101-8).
- [224] Douglas Gould W, King M, Mohapatra BR, Cameron RA, Kapoor A, Koren DW. A critical review on destruction of thiocyanate in mining effluents. *Miner Eng* 2012;34:38–47. <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2012.04.009>.
- [225] Zhao F, Zhang Q, He L, Yang W, Si M, Liao Q, et al. Molecular level insight of thiocyanate degradation by *Pseudomonas putida* TDB-1 under a high arsenic and alkaline condition. *Science of The Total Environment* 2023;874:162578. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162578>.
- [226] Razanamahandry L, Andrianisa H, Karoui H, Kouakou K, Yacouba H. Biodegradation of free cyanide by bacterial species isolated from cyanide-contaminated artisanal gold mining catchment area in Burkina Faso. *Chemosphere* 2016;157:71–8. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.05.020>.
- [227] Wang H, de Carvalho LPS. Metabolomic profiling reveals bacterial metabolic adaptation strategies and new metabolites. *Curr Opin Chem Biol* 2023;74:102287. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2023.102287>.
- [228] Mekuto L, Ntwampe SKO, Akcil A. An integrated biological approach for treatment of cyanidation wastewater. *Science of the Total Environment* 2016;571:711–20. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.07.040>.
- [229] Carolina D, Montoya A. Consorcios microbianos: una metáfora biológica aplicada a la asociatividad empresarial en cadenas productivas agropecuarias. *RevFacCiencEcon* 2010;1058.55–74. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/909/90920053003.pdf>
- [230] Corrales R, Caycedo L. Principios físicoquímicos de los colorantes utilizados en microbiología. *Principios físicoquímicos de los colorantes*. Nova 2020;18. <https://doi.org/10.22490/24629448.3701>.
- [231] Elomari M, Coroler L, Hoste B, Gillis M, Iazard D, Leclerc H. DNA Relatedness among *Pseudomonas* Strains Isolated from Natural Mineral Waters and Proposal of *Pseudomonas veronii* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1996;46:1138–44. <https://doi.org/10.1099/00207713-46-4-1138>.
- [232] Karamba K, Ahmad S, Zulkharnain A, Syed M, Khalil K, Shamaan N, et al. Optimisation of biodegradation conditions for cyanide removal by *Serratia marcescens* strain AQ07 using one-factor-at-a-time technique and response surface methodology. *Rendiconti Lincei* 2016;27:533–45. <https://doi.org/10.1007/s12210-016-0516-8>.
- [233] Javaheri S, Aminzadeh S, Zamani M, Motallebi M. Significant increase in cyanide degradation by *Bacillus* sp. M01 PTCC 1908 with response surface methodology optimization. *AMB Express* 2017;7. <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0502-2>.
- [234] Arias N, Vázquez L, Pérez G. Estudio comparativo entre los enfoques de diseño experimental robusto de Taguchi y tradicional en presencia de interacciones de

control por control. *Ingeniería Investigación y Tecnología* 2015;16:131–42.
Disponible en: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-77432015000100013

- [235] Gustavo F, Fernández M, Pérez I, Morón Y, García V, Perdomo I, *et al.* Experimental designs in pharmaceutical technology and control of medicaments. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 2008;39:28–40. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/286656350_Experimental_designs_in_pharmaceutical_technology_and_control_of_medicaments
- [236] Jaszczak E, Polkowska Ż, Narkowicz S, Namieśnik J. Cyanides in the environment—analysis—problems and challenges. *Environmental Science and Pollution Research* 2017;24:15929–48. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9081-7>.
- [237] Sinnott R, Towler G. Chapter 15 - Design of Reactors and Mixers. In: Sinnott R, Towler GBT-CED (Sixth E, editors. *Chemical Engineering Series*, Butterworth-Heinemann; 2020, p. 1039–146. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102599-4.00015-1>.
- [238] Raymond M, Douglas M. *Response surface methodology*. vol. 1. Third. New Jersey: John Wiley & sons; 2009.

Anexos

Anexo 1. Protocolo de reactivación del microorganismo *P. putida* ATCC 31483

Materiales necesarios:

- Muestra criopreservada del microorganismo
- Medio de cultivo adecuado (según las recomendaciones del fabricante)
- Placas de agar o tubos de cultivo
- Incubadora con las condiciones de temperatura y ambiente requeridas
- Material de pipeteo (pipetas, puntas)

Pasos:

Preparación del medio de cultivo: El medio nutritivo se preparó disolviendo a 40 °C, 28 g del reactivo sólido en 1 litro de agua destilada. Este medio se autoclavó durante 1 hora para luego ser servido en cajas Petri. El medio cetrimide se preparó disolviendo 45.3 g del reactivo sólido en un litro de agua destilada, siguiendo el mismo proceso que el realizado en el medio nutritivo.

Descongelación de la muestra: Se retiró la muestra de bacteria criopreservada del almacenamiento en frío y se descongeló rápidamente sumergiéndola en un baño de agua a temperatura ambiente. Se evitó la descongelación excesivamente rápida o prolongada, ya que esto puede dañar las células.

Inoculación del medio de cultivo: Con un asa estéril, se transfirió una pequeña cantidad de la muestra descongelada al medio de cultivo previamente preparado. Se mezcló suavemente para dispersar los microorganismos en el medio.

Incubación: Se colocó los agares en una incubadora a 37 °C, en ausencia de luz.

Observación y cultivo: Luego de la incubación, se observó si había colonias creciendo en las cajas de agar. Estos son indicativos de que el microorganismo se ha reactivado con éxito.

Subcultivo: Para mantener y ampliar el cultivo reactivado. Se transfirió una pequeña cantidad de microorganismos de los agares a nuevos medios de cultivo estériles.

Anexo 2. Protocolo tinción Gram

Materiales necesarios:

- Portaobjetos con frotis bacteriano
- Cristal violeta
- Yodo (solución de Lugol)
- Alcohol-acetona al 95 %
- Safranina
- Microscopio

Pasos:

- Preparación del frotis: Se obtiene una pequeña muestra de bacterias y se extiende en un portaobjetos limpio y seco, permitiendo que se seque al aire.
- Fijación del frotis: El portaobjetos con el frotis se pasa sobre la llama del mechero varias veces para fijar las bacterias al vidrio. Este paso debe realizarse con cuidado para no sobrecalentar y dañar las células.
- Aplicación de cristal violeta: Se cubre el frotis con cristal violeta durante aproximadamente un minuto. Luego se enjuaga suavemente con agua corriente para eliminar el exceso de tinte.
- Aplicación de yodo: La solución de yodo (Lugol) se aplica sobre el frotis durante un minuto. El yodo forma un complejo con el cristal violeta dentro de las bacterias, mejorando la retención del tinte.
- Decoloración: Se lava el frotis con cuidado utilizando alcohol-acetona al 95 % en un movimiento suave durante unos segundos, hasta que el lavado ya no presente color púrpura. Luego, se enjuaga con agua.
- Contratación con safranina: La safranina se aplica al frotis durante aproximadamente 30 segundos. La safranina tiñe las bacterias que perdieron su color durante la decoloración.
- Lavado y secado: Se enjuaga suavemente con agua para eliminar el exceso de tinte. Después, se permite que el frotis se seque al aire.
- Observación microscópica: El portaobjetos se coloca bajo el microscopio y se observa a un aumento de 1000x. Las bacterias Grampositivas se verán de color violeta, mientras que las Gramnegativas aparecerán en tonos rosados o rojos.

Anexo 3. Medios usados en la degradación de cianuro y tiocianato empleando *Pseudomonas putida*

Reactivo	Cantidad reportada (g/L)
Medio 1, pH 8.5	
K ₂ HPO ₄	0.400
NaHCO ₃	0.500
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.200
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.510
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.004
MnSO ₄ .4H ₂ O	0.002
Agar-Agar	15.000
Medio 2, pH 7.8	
KH ₂ PO ₄	0.40
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.01
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.20
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.20
MnSO ₄ .4H ₂ O	0.20
NaCl	0.01
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.20
Agar-Agar	15.00
Medio 3 pH 8.2	
K ₂ HPO ₄	0.590
Na ₂ HPO ₄	0.270
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.200
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.510
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.004
MnSO ₄ .4H ₂ O	0.200
Agar-Agar	15.000
Medio 4, pH 7.5	
Na ₂ HPO ₄	3.000
KH ₂ PO ₄	1.500
NaCl	0.250
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.004
MnCl ₂	0.004
Co	0.004
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.004
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.004
Na ₂ MoO ₄	0.004
Agar-Agar	15.000

Anexo 4. Preparación solución metales traza

En un litro de agua tipo 1 contenida en un erlenmeyer disolver las siguientes cantidades de sales:

Sal	Cantidad (g)
FeCl ₂ .4H ₂ O	1.500
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.190
MnCl ₂ .6H ₂ O	0.100
ZnCl ₂	0.070
H ₃ BO ₃	0.062
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.036
NiCl ₂ .6H ₂ O	0.024
CuCl ₂ .2H ₂ O	0.017

Calentar a 50 °C y agitar por 30 minutos, refrigerar y almacenar

Anexo 5. Preparación de medios sólidos cetrimide, Nutritivo, Cristal violeta y Medio A

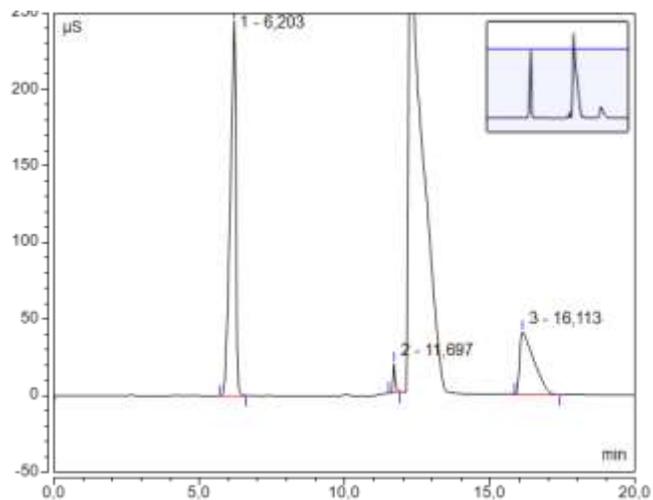
Descripción de los medios empleados en el aislamiento.

Tipo de agar	Nomenclatura	Características
Cetrimide	C	Se utilizó 45.3 g de medio de cultivo cetrimide.
Nutritivo	N	Se utilizó 28 g de medio de cultivo nutritivo.
Cristal violeta	CV	Se utilizó 41.5 g de medio de cultivo cristal violeta
Mínimo de sales	A	Se preparó el medio líquido A y se adicionó 20 g de agar-agar, se ajustó el pH a 7.8

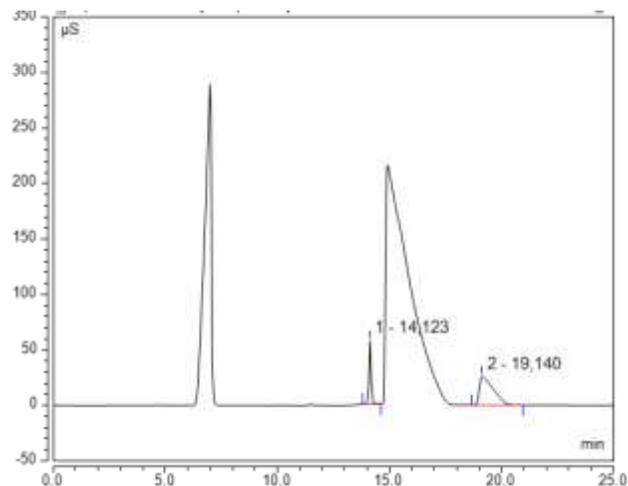
Se disolvió cada medio de cultivo mostrado en la tabla en 1 L de agua destilada se calentó y agitó fuertemente hasta observar una sola fase, se llevó a autoclave a 120 °C y 103 kPa por 1 hora, posteriormente se adicionó tiocianato y cianuro hasta alcanzar una concentración de 200 y 100 ppm de cada uno respectivamente, por último, se sirvió 20 mL del líquido obtenido en cajas Petri, los medios que no se iban a utilizar fueron almacenados en nevera a 4 °C para futuros ensayos [113].

Anexo 6. Cromatogramas degradación de tiocianato por los morfotipos

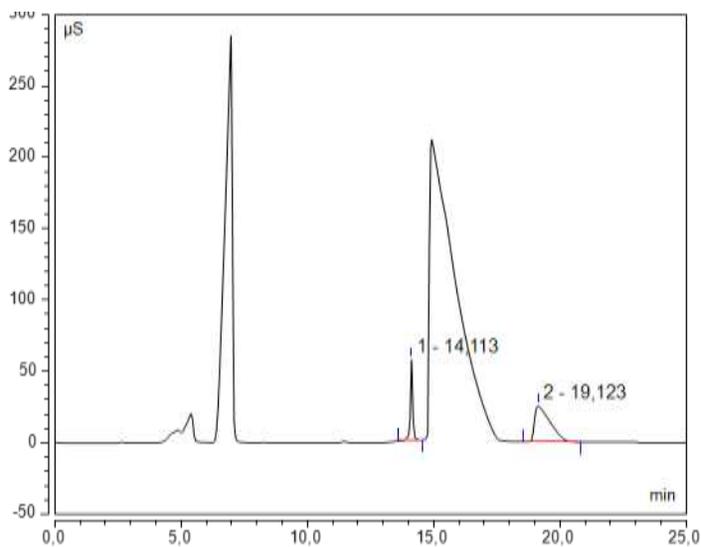
Cromatograma inicial, 200 ppm de tiocianato



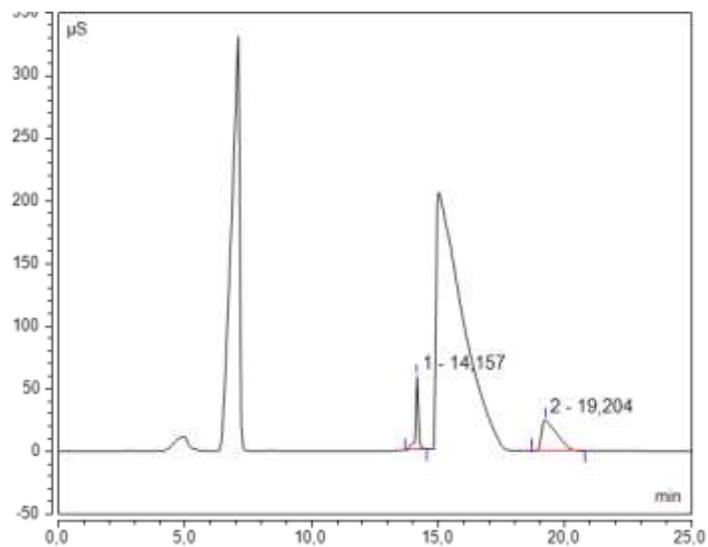
Aislado 2



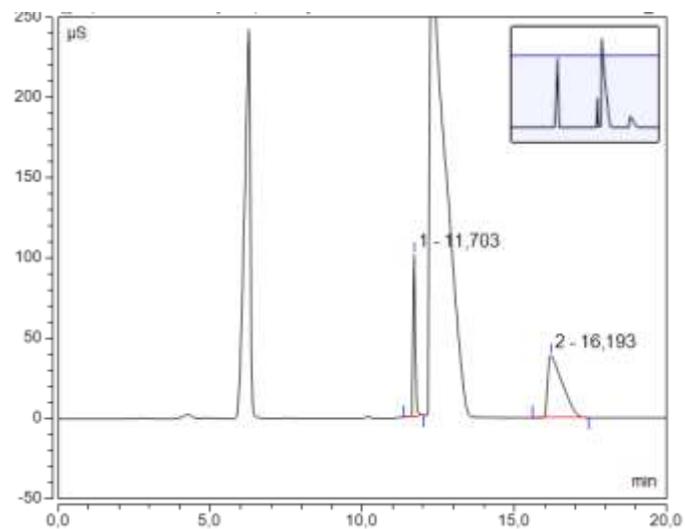
Aislado 3



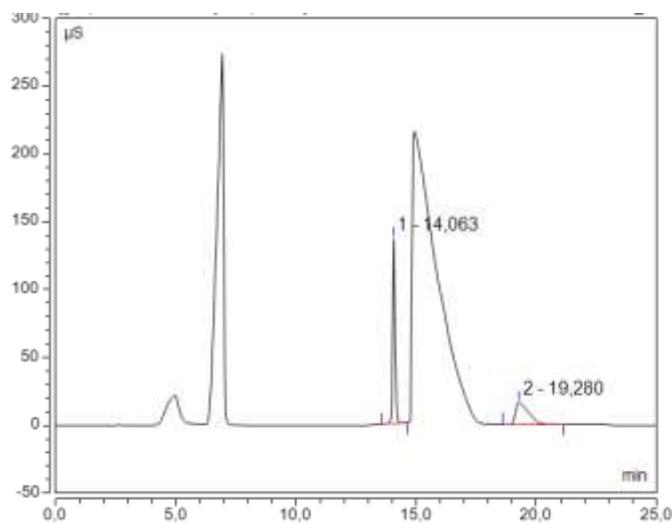
Aislado 4



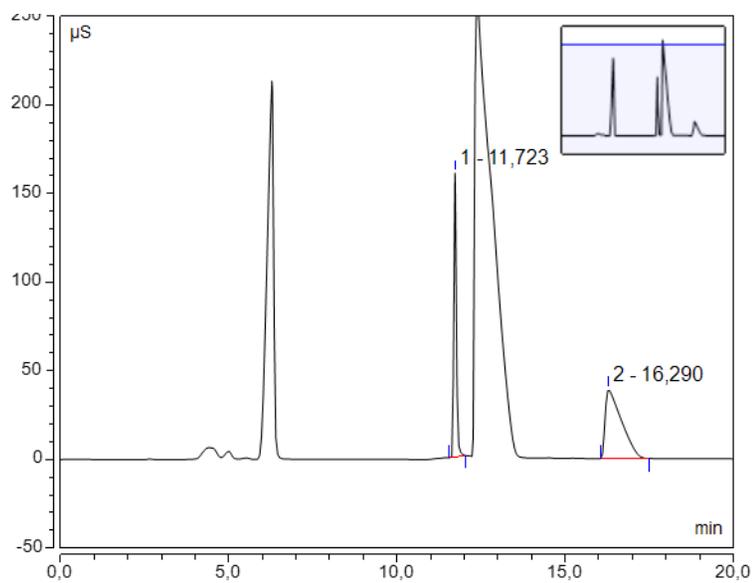
Aislado 5



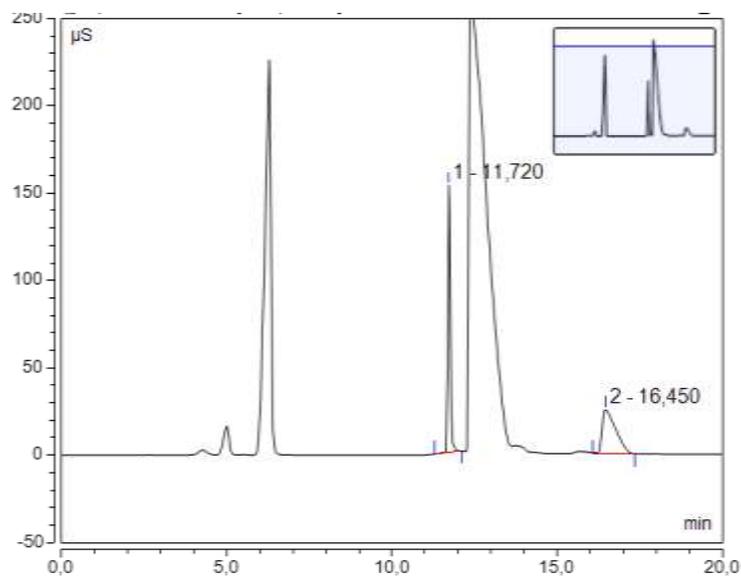
Aislado 1



Consorcio SM1

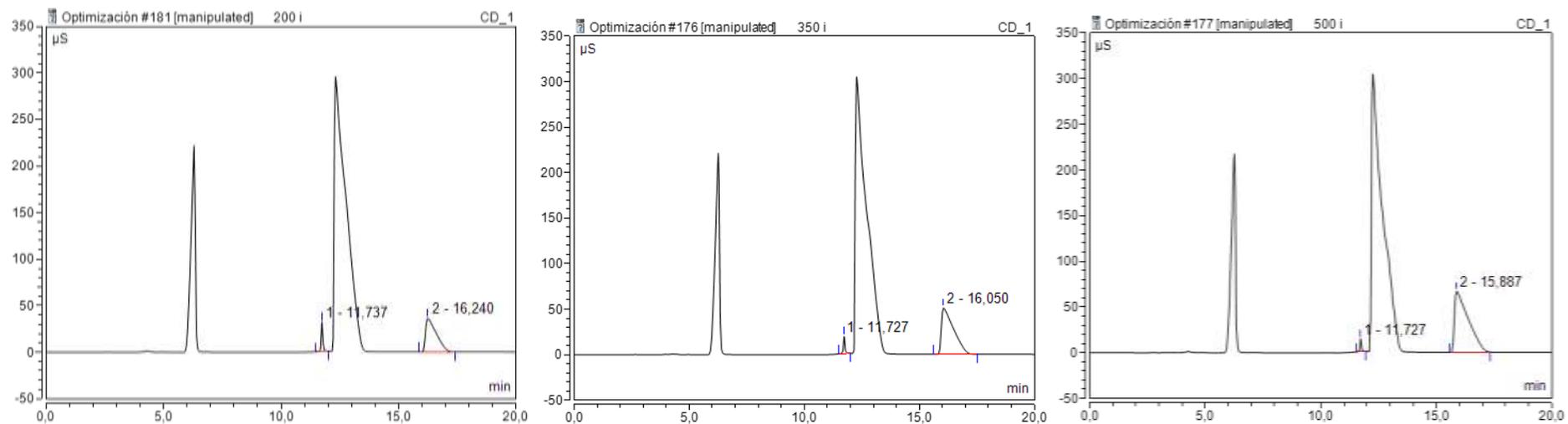


Consorcio SM2

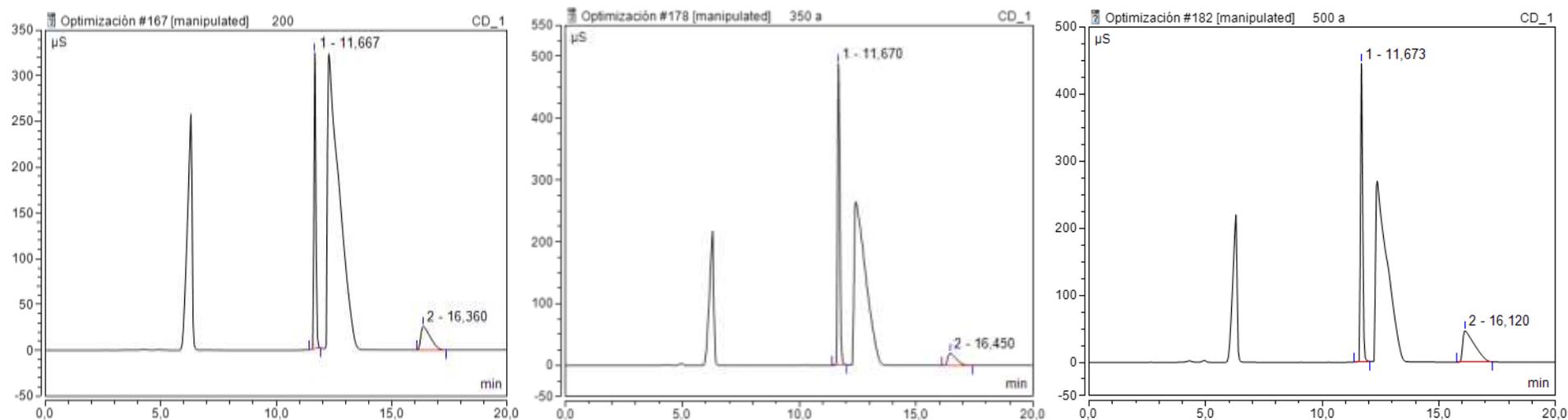


Anexo 7. Algunos cromatogramas del diseño experimental de la degradación de tiocianato

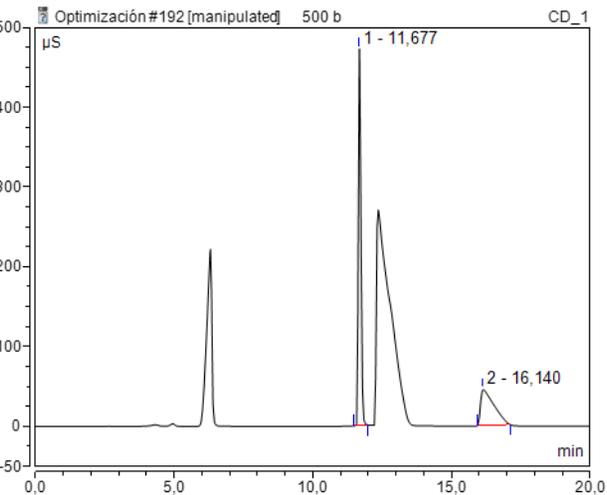
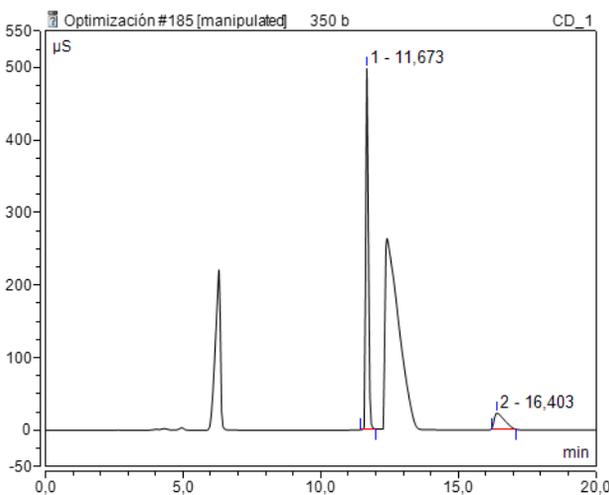
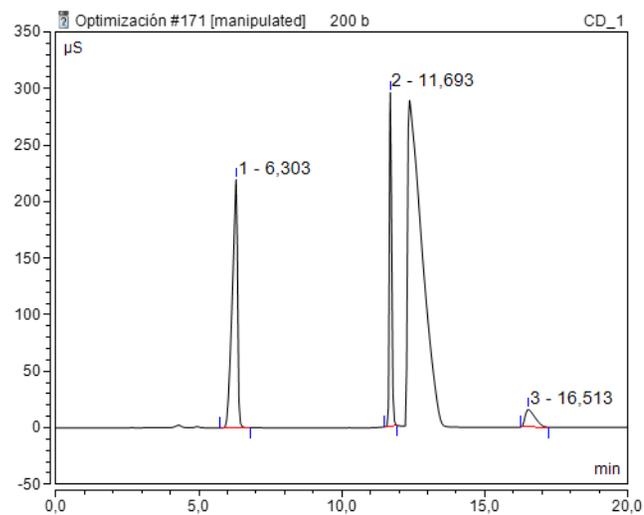
Condiciones iniciales.



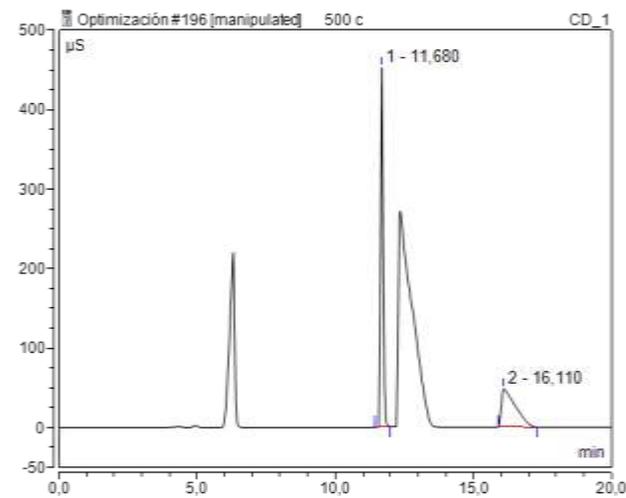
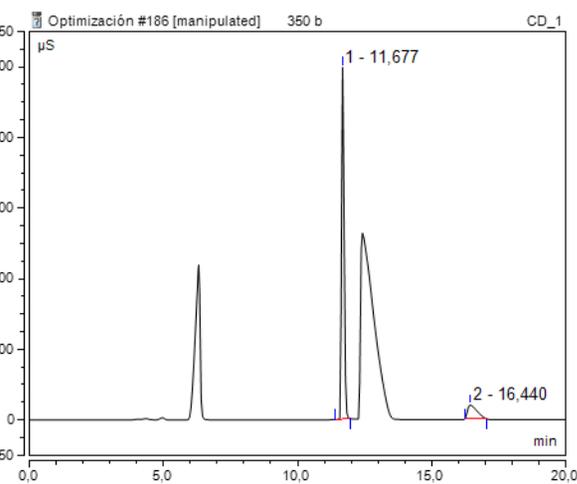
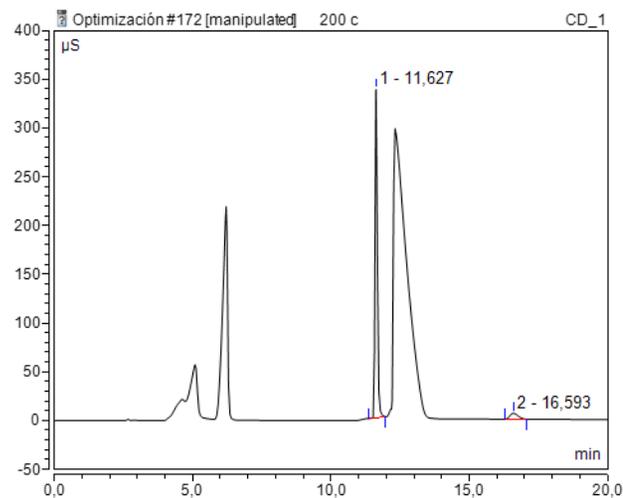
Día 3



Día 4



Día 5



Anexo 8. Determinación de los Leverage para los diseños experimentales realizados

Diseño experimental mejores condiciones de análisis cromatográficas

<i>Ejecución</i>	<i>Leverage</i>	<i>Localización</i>
1	0.202381	Factorial
2	0.142857	Otro
3	0.107143	Otro
4	0.0952381	Cara central
5	0.107143	Otro
6	0.142857	Otro
7	0.202381	Factorial
8	0.202381	Factorial
9	0.142857	Otro
10	0.107143	Otro
11	0.0952381	Cara central
12	0.107143	Otro
13	0.142857	Otro
14	0.202381	Factorial
15	0.202381	Factorial
16	0.142857	Otro
17	0.107143	Otro
18	0.0952381	Cara central
19	0.107143	Otro
20	0.142857	Otro
21	0.202381	Factorial
22	0.202381	Factorial
23	0.142857	Otro
24	0.107143	Otro
25	0.0952381	Cara central
26	0.107143	Otro
27	0.142857	Otro
28	0.202381	Factorial
29	0.202381	Factorial
30	0.142857	Otro
31	0.107143	Otro
32	0.0952381	Cara central
33	0.107143	Otro
34	0.142857	Otro
35	0.202381	Factorial
36	0.202381	Factorial
37	0.142857	Otro
38	0.107143	Otro
39	0.0952381	Cara central
40	0.107143	Otro
41	0.142857	Otro
42	0.202381	Factorial

Leverage medio = 0.142857

Diseño experimental mejores condiciones de remoción de cianuro

<i>Ejecución</i>	<i>Leverage</i>	<i>Localización</i>
1	0.268519	Factorial
2	0.185185	Cara central
3	0.268519	Factorial
4	0.185185	Cara central
5	0.185185	Cara central
6	0.268519	Factorial
7	0.185185	Cara central
8	0.268519	Factorial
9	0.185185	Centro
10	0.268519	Factorial
11	0.185185	Cara central
12	0.268519	Factorial
13	0.185185	Cara central
14	0.185185	Cara central
15	0.268519	Factorial
16	0.185185	Cara central
17	0.268519	Factorial
18	0.185185	Centro
19	0.268519	Factorial
20	0.185185	Cara central
21	0.268519	Factorial
22	0.185185	Cara central
23	0.185185	Cara central
24	0.268519	Factorial
25	0.185185	Cara central
26	0.268519	Factorial
27	0.185185	Centro

Leverage medio = 0.222222

Diseño experimental mejores condiciones de remoción de tiocianato

<i>Ejecución</i>	<i>Leverage</i>	<i>Localización</i>
1	0.268519	Factorial
2	0.185185	Cara central
3	0.268519	Factorial
4	0.268519	Factorial
5	0.185185	Cara central
6	0.185185	Centro
7	0.185185	Cara central
8	0.185185	Cara central
9	0.268519	Factorial
10	0.268519	Factorial
11	0.185185	Cara central
12	0.268519	Factorial
13	0.268519	Factorial
14	0.185185	Cara central
15	0.185185	Centro
16	0.185185	Cara central
17	0.185185	Cara central
18	0.268519	Factorial
19	0.268519	Factorial
20	0.185185	Cara central
21	0.268519	Factorial
22	0.268519	Factorial
23	0.185185	Cara central
24	0.185185	Centro
25	0.185185	Cara central
26	0.185185	Cara central
27	0.268519	Factorial

Leverage medio = 0.222222