



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

ESCUELA DE POSGRADO

**TESIS DE MAGÍSTER EN CIENCIAS
CON MENCIÓN EN:**

BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR

**BIORREMEDIACIÓN DE RELAVES MINEROS CON UN
CONSORCIO MICROBIANO NATIVO CARACTERIZADO
MOLECULARMENTE Y PRODUCTOR DE ENZIMAS
DEGRADADORAS DE CIANURO Y DERIVADOS**

MELITZA DE LOURDES CORNEJO LA TORRE

TUMBES, PERÚ

2016



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

ESCUELA DE POSGRADO

**TESIS DE MAGÍSTER EN CIENCIAS
CON MENCIÓN EN:**

BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR

**BIORREMEDIACIÓN DE RELAVES MINEROS CON UN
CONSORCIO MICROBIANO NATIVO CARACTERIZADO
MOLECULARMENTE Y PRODUCTOR DE ENZIMAS
DEGRADADORAS DE CIANURO Y DERIVADOS**

**MELITZA DE LOURDES CORNEJO LA TORRE
TUMBES, PERÚ**

2016

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

Yo **Melitza de Lourdes Cornejo La Torre** declaro que los resultados reportados en esta tesis, son producto de mi trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a su concepción y análisis. Asimismo, declaro que hasta donde yo sé no contiene material previamente publicado o escrito por otra persona excepto donde se reconoce como tal a través de citas y con propósitos exclusivos de ilustración o comparación. En este sentido, afirmo que cualquier información presentada sin citar a un tercero es de mi propia autoría. Declaro, finalmente, que la redacción de esta tesis es producto de mi propio trabajo con la dirección y apoyo de mi asesor de tesis y mi jurado calificador, en cuanto a la concepción y al estilo de la presentación o a la expresión escrita.

Melitza De Lourdes Cornejo La Torre

ACTA DE REVISIÓN Y DEFENSA DE TESIS

RESPONSABLES

MELITZA DE LOURDES CORNEJO LA TORRE

EJECUTOR

Dr. ERIC MIALHE MONTANNIER. PhD. DE

ASESOR

JURADO DICTAMINADOR

Dr. VICTOR CARRIL FERNANDEZ

PRESIDENTE

Dr. AUBERTO HIDALGO MOGOLLÓN

SECRETARIO

Dra. VIRNA CEDEÑO. PhD.

VOCAL

CONTENIDO

RESUMEN	XI
ABSTRACT.....	XII
1. INTRODUCCIÓN	- 13 -
2. MARCO DE REFERENCIA DEL PROBLEMA:	- 15 -
2.1. Antecedentes:	- 15 -
2.2. Bases Teórico-Científicas:	- 18 -
2.3. Definición de Términos Básicos:	- 21 -
3. MATERIALES Y MÉTODOS	- 23 -
3.1. Localidad y periodo de ejecución:	- 23 -
3.2. Población, muestreo y muestra:	- 23 -
3.3. Material y métodos:	- 24 -
3.4. Procesamiento de las muestras:	- 24 -
3.4.1. Aislamiento, identificación y caracterización de microorganismos: ...	- 24 -
a) Aislamiento de microorganismos:	- 24 -
b) Extracción de ADN de bacterias:	- 24 -
c) Extracción de ADN de hongos:	- 25 -
d) Identificación y caracterización de microorganismos:	- 26 -
3.4.2. Análisis de las comunidades microbianas:	- 27 -
3.4.3. Determinación de las condiciones óptimas de cultivo de las cepas aisladas:	- 29 -
3.4.4. Amplificación de genes degradadores:	- 30 -

3.4.5. Identificación y caracterización de las enzimas degradadoras mediante espectrometría de masas:	- 33 -
3.4.6. Formulación de un consorcio microbiano:.....	- 34 -
3.4.7. Ensayos de degradación:.....	- 34 -
4. RESULTADOS	- 36 -
4.1. Parámetros físico-químicos de las muestras de suelos y aguas	- 36 -
4.2. Estructura de las comunidades microbianas: microbiota y metagenómica.	- 37 -
4.2.1. Monitoreo de la comunidad microbiana durante la degradación natural del cianuro y derivados tóxicos:.....	- 37 -
4.2.2. Caracterización de la microbiota nativa de los suelos y aguas recientemente contaminados con cianuro mediante técnica independiente de cultivo <i>in vitro</i>	- 39 -
a) Análisis metagenómico de suelos contaminados con cianuro:	- 39 -
b) Análisis metagenómico de suelos no contaminados con cianuro:	- 41 -
c) Análisis metagenómico de agua contaminada con cianuro:	- 43 -
d) Análisis metagenómico de agua no contaminada con cianuro:	- 45 -
4.2.3. Caracterización de la microbiota nativa de los suelos y aguas contaminados con cianuro mediante técnica dependiente de cultivo <i>in vitro</i>	- 47 -
4.3. Efectos del ph, temperatura, tamaño de inóculo y concentración del contaminante sobre el crecimiento microbiano:	- 50 -
4.3.1. Efecto del ph sobre el crecimiento microbiano:.....	- 50 -
4.3.2. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento microbiano:	- 51 -
4.3.3. Efecto de la concentración del inóculo sobre el crecimiento microbiano y la degradación del cianuro:.....	- 53 -
4.4. Identificación genómica de enzimas degradadoras de cianuro y derivados tóxicos:.....	- 54 -

4.5. Análisis proteómico de las enzimas degradadoras de cianuro presentes en los microorganismos aislados:	- 56 -
4.6. Elaboración de un consorcio microbiano para la biorremediación de cianuro:	- 58 -
4.7. Ensayos de degradación en laboratorio a diferentes concentraciones de cianuro:	- 60 -
4.8. Ensayos de biorremediación <i>in situ</i> :	- 62 -
5. DISCUSION	- 73 -
6. CONCLUSIONES	- 87 -
7. RECOMENDACIONES	- 88 -
8. BIBLIOGRAFÍA	- 89 -
9. ANEXOS	- 104 -

RESUMEN

La lixiviación con cianuro es actualmente el proceso principalmente utilizado por la industria minera para extraer oro y plata. El cianuro es un compuesto tóxico para la mayoría de los organismos vivos, sin embargo, muchos microorganismos son capaces de tolerarlo e incluso degradarlo.

En el presente trabajo ha sido caracterizada y analizada, por metagenómica dirigida al ADNr, la composición de las comunidades microbianas de suelos y aguas, prístinos o contaminados por residuos de cianuro producto de la actividad minera en la Región La Libertad.

Se logró aislar e identificar molecularmente 89 cepas microbianas, siendo los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Alcaligenes* los más abundantes. La capacidad de degradación del cianuro ha sido establecida en base a pruebas *in vitro* considerando estas cepas, ya sea individualmente o en consorcios.

El mejor consorcio constituido por 8 cepas de los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Alcaligenes* ha permitido una reducción de cianuro en un 97 y 99% tras 15 días de tratamiento en laboratorio y 22 días en situación real de biorremediación en el campo respectivamente.

Genes de enzimas degradadores de cianuro (cianasa, cianidasa) y proteínas enzimáticas han sido detectados respectivamente por PCR con secuenciación de amplicones y por espectrometría de masa MALDI TOF TOF con secuenciación de péptidos

Palabras clave: cianuro, minería, metagenómica, suelos, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Alcaligenes*, cianasa, cianidasa, biorremediación

ABSTRACT

Cyanide leaching process is currently mainly used by the mining industry to extract gold and silver. Cyanide is a toxic to most living organisms; however, many microorganisms are capable of tolerating and even degrading.

In the present work we characterized and analyzed, by rDNA targeted metagenomics, the composition of microbial communities in soil and water, pristine or polluted by cyanide waste product of mining activity in the region La Libertad.

It was isolated and molecularly identify 89 microbial strains, being the genera *Pseudomonas*, *Bacillus* and *Alcaligenes* the most abundant. The ability of cyanide degradation has been established based on *in vitro* assays considering these strains, either individually or in consortia.

Best consortium containing 8 strains of the genera *Pseudomonas*, *Bacillus* and *Alcaligenes* has allowed a reduction of cyanide by 97 and 99% after 15 days of treatment in laboratory and 22 days of treatment in real bioremediation field situation respectively.

Cyanide degrading enzyme genes (cyanase, cyanidase) and enzyme proteins were detected respectively by PCR with amplicon sequencing and by mass spectrometry MALDI TOF/TOF with peptide sequencing.

Keywords: cyanide, mine, metagenomics, soils, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Alcaligenes*, cyanase, cyanidase, bioremediation

1. INTRODUCCIÓN

En el 2015, la economía peruana se consolidó como una de las más dinámicas en la región, lo que le permitió ubicarse en el segundo lugar después de Panamá en el ranking de los países hispanoamericanos con las mayores tasas de crecimiento económico en los primeros 15 años de este milenio. Dicho crecimiento se ha visto reflejado en los diversos sectores productivos, especialmente la minería, la cual alcanzó un volumen de producción de 1.7 millones de toneladas métricas finas (UMF) reflejándose en un crecimiento de 22.36% respecto al año 2014. Este incremento se debió principalmente al incremento en la extracción de plata en las regiones Lima, Ancash, Pasco y del oro en las regiones Áncash, Madre de Dios y Cusco.

El Perú es el tercer productor mundial de plata y cobre; así mismo, es el primer productor de oro, zinc, estaño, plomo y molibdeno en América Latina. La minería aurífera peruana es uno de los sectores extractivo más activo con una producción promedio entre los 5 y 6 millones de onzas por año. Es también un sector en plena expansión y en estructuración principalmente frente a la formalización de la pequeña minería, que representa entre informales e ilegales el 20% del oro producido en el país.

La principal técnica empleada para la extracción de oro de las rocas de forma eficiente, barata y simple es la lixiviación con cianuro. Los residuos de cianuro y sus derivados con varios metales pesados representan así un riesgo enorme para los ecosistemas y la salud pública. La producción anual de oro en el Perú es aproximadamente de 160TM por año, lo que requiere 24 000TM de cianuro por año que deben ser neutralizados. Los residuos de cianuro pueden ser sólidos o líquidos y así contaminar el suelo, el agua superficial y subterránea provocando grandes alteraciones en el paisaje, alterando con ello el entorno ecológico de los microorganismos y subsecuentemente la estabilidad funcional de la comunidad.

Varios tipos de tratamientos pueden ser realizados para la remediación del cianuro y sus derivados, especialmente al final del período de extracción. Actualmente los desechos de cianuro son degradados eficientemente por químicos pero los tratamientos son problemáticos, en términos de productos secundarios, y casi inconcebibles en términos de costos, en particular en las situaciones de cierre de minas y de pasivos ambientales. La búsqueda de tecnologías alternativas para degradar el cianuro, que no generen productos tóxicos y que sean menos impactantes para el ambiente, ha impulsado las investigaciones para sustituir los métodos convencionales ya que estos son costosos y corrosivos, además de que generan desechos que a veces son más contaminantes que los iniciales, lo que aumenta los costos de operación del proceso.

Tratamientos alternativos para la degradación del cianuro y sus derivados corresponden entonces a una prioridad para el sector minero, el cual actualmente se encuentra en una situación crecientemente más conflictiva con las comunidades y poblaciones aledañas a las zonas de influencia de este sector.

Los tratamientos biotecnológicos microbiológicos de los residuos de cianuro han sido establecidos en base a la capacidad de degradación biológica para su utilización como fuente de nitrógeno. Sin embargo, estos tratamientos son generalmente empíricos con microorganismos mal caracterizados, en términos funcional y molecular y prácticamente no monitoreados *in situ* por falta de herramientas moleculares.

Por consiguiente, el objetivo de la presente investigación es el aislamiento, identificación, caracterización y utilización de microorganismos nativos degradadores de cianuro para la implementación de un proceso de biorremediación de sitios contaminados con cianuro producto de la actividad minera aurífera y argentífera en la región La Libertad.

2. MARCO DE REFERENCIA DEL PROBLEMA:

2.1. Antecedentes:

A nivel mundial, la bioremediación del cianuro y sus derivados tóxicos se ha beneficiado de los inmensos progresos alcanzados recientemente por la biología y biotecnología molecular para identificar, caracterizar, utilizar y monitorear microorganismos *in situ*, preferencialmente nativos, con actividades enzimáticas de degradación de los productos contaminantes. Un centenar de publicaciones básicas y aplicadas está relacionado con este tema. Sin embargo, el sector minero aurífero peruano no dispone hasta ahora de tecnologías de bioremediación con bacterias nativas degradadores de cianuro y sus derivados.

Los complejos de cianuros con metales (oro, plata, cadmio, zinc, cobre, cobalto y hierro) son extremadamente estables pero pueden ser degradados por algunas bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Acinetobacter* y hongos de los géneros *Fusarium*, *Trichoderma* y *Penicillium* (Knowles y Bunch 1986; Gupta, Balomajumder y Agarwal 2010; Huertas *et al.* 2010; Ozel *et al.* 2010; Deloya 2012; Tuya 2014).

La degradación microbiana del cianuro fue examinada por primera vez a mediados de 1950 (Pettet *et al.* 1954). Mudder y Whitlock (1984) emplearon una cepa mutante de *Pseudomonas paucimobilis* para degradar cianuros, tiocianatos y complejos cianurados presentes en aguas residuales y cuya primera demostración comercial exitosa fue en la industria minera por la Homestake Gold Mine, USA a mediados de 1980 (Akcil y Mudder, 2003).

Varias otras investigaciones de la degradación microbiana del cianuro han sido luego reportadas, incluyendo trabajos de laboratorio, pruebas piloto y aplicaciones en situación real.

Gantzer y Maier en 1988 mostraron la habilidad de *Anabaena*, una cianobacteria fijadora de nitrógeno, para degradar el cianuro, observando principalmente que las tasas de degradación del cianuro están relacionadas directamente con los valores de pH de los ensayos.

Kunz *et al.* en 1992 emplearon la cepa *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764 para la degradación de cianuro de potasio (KCN) con la formación de productos menos contaminantes como CO₂, amonio, formamidas y formiatos en proporciones dependientes de las concentraciones iniciales de KCN.

Varias aplicaciones comerciales han sido implementadas, basadas sobre procesos aeróbicos como anaeróbicos, para tratamientos de contaminaciones activas o pasivas.

Homestake Mining Company fue la empresa minera líder en el desarrollo e implementación de sistemas de tratamiento biológico para la destrucción de cianuro. La instalación a gran escala ha estado en operación continua para el tratamiento de grandes volúmenes de solución de residuos durante casi dos décadas en EEUU (Akcil y Mudder 2003).

En México White y Markwiese (1994) potenciaron la capacidad de degradación del cianuro *in situ* de los microorganismos nativos presentes en pilas de lixiviación de oro, mostrando que la incorporación de una fuente de carbono incrementa significativamente las tasas de degradación del cianuro y sus derivados.

En Colombia, Montoya (2001) realizó una propuesta de detoxificación de ambientes mineros mediante métodos químicos y biológicos, considerando concentraciones extremadamente elevadas de cianuro de sodio, de hasta 700 ppm.

Diversas especies de microorganismos, principalmente del género *Pseudomonas*, son responsables de la asimilación completa del cianuro presente en aguas residuales mediante la oxidación de cianuro, tiocianato y amoníaco.

Luque-Almagro en el 2005, empleando medios de cultivo suplementados con cianuro, logró aislar una cepa de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* (CECT5344) capaz de crecer en medios alcalinos, hasta pH 11.5, siendo 9.5 el valor de pH óptimo para la degradación del cianuro, asimilado en su totalidad debido principalmente a la actividad de la enzima cianasa inducida en presencia de cianuro. Este mismo autor en el 2008 comprueba molecularmente que esta cianasa cataliza la descomposición del cianato a CO₂ y amonio. La enzima mostró una actividad óptima a 65°C y pH de 8.5. Mediante la generación de un mutante para esta enzima cianasa, se comprobó que los cianatos no son un metabolito central en la asimilación del cianuro por parte de esta cepa.

Las investigaciones han permitido, en particular con los recientes progresos biotecnológicos en genómica, metagenómica y proteómica, profundizar a nivel molecular las bases teórico-científicas de la degradación microbiana del cianuro involucrando varias enzimas identificadas en varios grupos microbianos (Meyer 2010; Gupta, Balomajumder y Agarwal 2010).

2.2. Bases teórico-científicas:

Los recientes progresos biotecnológicos en genómica, metagenómica y proteómica han conducido al desarrollo conceptual y las aplicaciones de la biotecnología ambiental, en particular en el monitoreo de los impactos ambientales y en los procesos de biorremediación basados en el uso de microorganismos biodegradadores (Evans y Furlong 2011).

La alta toxicidad del cianuro para todos los organismos aeróbicos es relacionada a su reactividad con iones metálicos, tales como Fe, Zn y Cu, cofactores de enzimas que participan en la cadena respiratoria a nivel mitocondrial, específicamente la forma oxidada del citocromo a_3 (Dzombak, Ghosh y Wong-Chong 2006; Gupta, Balomajumder y Agarwal 2010). La toxicidad y el efecto inhibitorio en la respiración están relacionados con la especiación fisicoquímica del cianuro, siendo HCN y CN^- las más tóxicas, mientras que los complejos con metales $Fe(CN)_6^{3-}$, $Fe(CN)_6^{4-}$ son relativamente menos tóxicos (Dzombak, Ghosh y Wong-Chong 2006).

La cianogénesis es un proceso natural para varios tipos de organismos y microorganismos (Luque-Almagro 2005; Dzombak, Ghosh y Wong-Chong 2006; Meyer 2010) así como su degradación biológica (Knowles y Bunch 1986). La cianogénesis es también un proceso artificial asociados a varias prácticas industriales, tales como la electrólisis de aluminio, gasificación de carbón, varias producciones farmacéuticas, la elaboración de fibras sintéticas y plásticos, etc. (Akcil *et al.* 2003).

La degradación del cianuro y sus derivados tóxicos presentes en varios tipos de desechos está actualmente realizada con buenos resultados por tratamientos con métodos físicos y químicos. Se conocen variedad de técnicas químicas para la destrucción del cianuro, entre las más usadas se encuentran: la cloración alcalina, la destrucción con peróxido de hidrogeno y la destrucción con ácido de caro (Dzombak, Ghosh y Wong-Chong 2006).

En la cloración alcalina se obtiene como primer producto de la reacción cloruro de cianógeno, gas altamente tóxico de solubilidad limitada. Su toxicidad puede superar la de concentraciones iguales de cianuro. La cloración alcalina es un proceso relativamente rápido, que depende de la constante de disociación, que también determina la toxicidad. Esta técnica se enfoca únicamente en la oxidación de cianuro que es sensible a la cloración. Los complejos de cianuro metálico, como níquel, cobalto, plata y oro, no se disocian fácilmente, por lo que la reacción de cloración necesita más tiempo y un exceso considerable de cloro. Los cianuros de hierro no se oxidan por cloración porque no disocian en absoluto (Dzombak, Ghosh y Wong-Chong 2006).

Se han desarrollado dos procesos para la oxidación de cianuro con peróxido de hidrogeno: uno de ellos se conoce como proceso Kastone, el cual utiliza una solución de peróxido de hidrogeno al 41% con pocos mg/L de formaldehído y cobre; en el segundo proceso se emplea una solución de peróxido de hidrógeno y sulfato de cobre en diferentes concentraciones, demostrando que no es necesario el uso del formaldehído. En la oxidación con ácido de Caro, también conocida como oxidación con ácido peroximonosulfúrico (H_2SO_5), este degrada el cianuro de los efluentes de cianuración provocando que el cianuro se oxide a cianato, compuesto menos tóxico que el cianuro. Posteriormente el cianato se hidroliza formando NH_3 , CO_2 y OH^- . La degradación del cianuro con el ácido de Caro se da a pH 9, debido a que la adición del ácido a las colas de las plantas en los procesos de extracción de oro en minería, disminuye los valores normales de estas que varían entre pH 10.5 y 11.5 (Dzombak, Ghosh y Wong-Chong 2006).

Estos procesos de degradación de cianuro han mostrado resultados muy eficientes. Sin embargo, la búsqueda de tecnologías alternativas biológicas para degradar el cianuro, que no generen productos tóxicos y que sean menos impactantes para el ambiente, ha impulsado las investigaciones para sustituir los métodos convencionales (Dasha, Gaur y Balomajumder 2009; Deloya 2012).

Los métodos biológicos, y particularmente los microbiológicos, se constituyen en alternativas eficientes porque son específicos respecto a los focos en los que se pretende que actúen y, luego de estandarizarse, pueden resultar más económicos que los procesos químicos (Knowles y Bunch 1986; Dumestre *et al.* 1997; Akcil *et al.* 2003; Luque-Almagro 2005; Dasha, Gaur y Balomajumder 2009; Huertas *et al.* 2010; Ozel *et al.* 2010; Naveen *et al.* 2011; Li *et al.* 2014).

El éxito de la biodegradación depende de la presencia de microorganismos, preferencialmente nativos, con capacidades fisiológicas y metabólicas para degradar los contaminantes en el medio ambiente (Deloya 2012; Naveen *et al.* 2011). En los suelos o las aguas, la disponibilidad de nutrientes, tales como carbono, fósforo, oxígeno y ciertos parámetros, tales como la temperatura y el pH, pueden afectar la biodegradación de compuestos de cianuro (Luque-Almagro 2005; Deloya 2012, Mekuto, Ntwampe y Jackson, 2015).

Dentro de las vías involucradas en la biodegradación microbiana del cianuro se incluyen reacciones de hidrólisis, oxidación, reducción, sustitución y transferencia correspondientes a genes codificantes para varias enzimas (Gupta, Balomajumder y Agarwal 2010).

La degradación del cianuro y derivados corresponde, en las bacterias a las enzimas cianuro-oxigenasas, cianuro-dihidratasas y nitrogenasas y en los hongos a la enzima cianuro-hidratasa (Luque-Almagro 2005; Gupta, Balomajumder y Agarwal 2010; Naveen *et al.* 2011).

Las enzimas cianuro oxigenasas, conocidas también como cianasas, catalizan la oxidación completa hasta dióxido de carbono y amoníaco. Estas enzimas han sido reportadas para *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764 (Kunz *et al.* 1992; Wang *et al.*, 1996; Dumestre *et al.* 1997; Jandhyala *et al.* 2003; Fernandez *et al.* 2004) y para *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 (Luque-Almagro 2005; Ebbs *et al.* 2006; Luque-Alamago *et al.* 2008; Luque-Almagro, Moreno-Vivia y Roldán 2016).

Las enzimas cianuro-dihidratasa, conocidas también como cianidasa, convierten el cianuro a formiato, un compuesto relativamente menos tóxico. Estas enzimas han sido reportadas para *Alcaligenes xylosoxidans* subsp. *Denitrificans* DF3, *Bacillus pumilus* C1 y *Pseudomonas stutzeri* AK1 (Ingvorsen, Godtfredsen y Hojer-Pedersen 1991; Meyers *et al.* 1991; Luque-Almagro 2005; Gupta, Balomajumder y Agarwal 2010).

Las enzima nitrilasa, del grupo de las nitrilasas, catalizan la hidrólisis de nitrilos a ácido carboxílico y amonio sin la formación de amidas libres intermediarias. Las nitrilasas están involucradas en la biosíntesis de proteínas y sus modificaciones post traduccionales en plantas, animales y algunos procariotas. Las nitrilasas han sido reportadas en *Nocardia sp.*, *Rhodococcus rhodochrous* J1, *R. rhodochrous* K22, *Rhodococcus rhodochrous* PA-34, *Arthrobacter sp.* J1, *Alcaligenes faecalis* JM3, *Acinetobacter sp.* AK226, *Pseudomonas thermophila* JCM3095, *Klebsiella ozaenae*, *Fusarium solani* y *Fusarium oxysporum* (Harper 1977; Kobayashi *et al.* 1990; Bhalla *et al.* 1992; Liu, Wu y Hsu 1992; Kao *et al.* 2003; Chen, Kao y Chen 2008 y Gupta, Balomajumder y Agarwal 2010).

2.3. Definición de términos básicos:

Atenuación natural: un proceso o método para disminuir la contaminación por el uso de mecanismos naturales para la remoción de contaminantes, incluyendo la volatilización, biodegradación, adsorción, oxidación y fotodescomposición (Álvarez *et al.* 2004).

Bioaugmentación: un método para introducir microorganismos cultivados en laboratorio dentro de un ambiente contaminado, a fin de mejorar la bioremediación de contaminantes (Kouzuma y Watanabe 2011).

Bioestimulación: un método para modificar las condiciones ambientales a fin de estimular los microorganismos existentes que son capaces de degradar los contaminantes (Kouzuma y Watanabe 2011).

Biorremediación: un método para acelerar la degradación biológica y/o precipitación de contaminantes, incluyendo la bioestimulación y bioaumentación (Kouzuma y Watanabe 2011).

Consorcio microbiano: conjunto de diversas especies de microorganismos que interactúan para su mutuo beneficio, dentro de una comunidad (Brenner, You y Arnold 2008).

Exoproteoma: el termino exoproteoma se refiere al conjunto de proteínas que pueden ser encontradas en la proximidad extracelular de un sistema biológico dado (Armengaud *et al.* 2012).

Lixiviación: proceso en el cual se extraen solutos de un sólido mediante la utilización de un disolvente líquido. Ambas fases entran en contacto y el soluto o los solutos pueden difundirse desde el sólido a la fase líquida (SNMPE 2014).

Metagenómica: genómica ambiental, es el estudio del genoma recuperado de muestras ambientales, dejando de lado la necesidad del aislamiento y cultivo en laboratorio de especies individuales (Kouzuma y Watanabe 2011).

MALDI TOF: MALDI-Matrix-assisted laser desorption/ionization (desorción/ionización láser asistida por matriz) y TOF—Time Of Flight (tiempo de vuelo) es una técnica de ionización que permite al análisis de biomoléculas y moléculas orgánicas mediante la producción de iones intactos en fase gaseosa haciendo uso de una matriz, elemento importante para el éxito de método de desorción y la ionización, en el cual se basa esta técnica (Hoffmann y Stroobant 2007).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Localidad y periodo de ejecución:

La presente investigación se realizó en los laboratorios de la empresa INCABIOTEC SAC y la Universidad Nacional de Tumbes durante el desarrollo del programa magistral en biotecnología molecular comprendido entre los años 2014 – 2016. Parte importante del desarrollo de la presente investigación (toma de muestra y ensayos *in situ*) se desarrollaron en dos zonas mineras de la Región La Libertad (cerro Urcopongo, del Distrito de Usquil, Provincia de Otuzco y el cerro El Toro, Distrito de Shiracmaca, Provincia Sánchez Carrión).

3.2. Población, muestreo y muestra:

La lixiviación con cianuro es la principal técnica empleada para la recuperación de oro y plata en la mayoría de minas a nivel mundial. En nuestro estudio, las muestras de suelo y agua contaminadas con cianuro fueron colectadas en el área de concesión de la empresa WF Silva Ingenieros S.R.L ubicada en el cerro Urcopongo, del distrito de Usquil, Provincia de Otuzco, Región la Libertad.

Las muestras fueron obtenidas siguiendo el plan de muestreo de suelos contaminados (MINAM 2014) con algunas modificaciones, además del seguimiento de algunas consideraciones de la guía ambiental para el manejo de relaves mineros (MINEM s.f.), la guía ambiental para el manejo de cianuro (MINEM 1996) y código Internacional para el manejo del cianuro (ICMI 2014). Las muestras fueron preservadas y transportadas a los laboratorios de la empresa INCABIOTEC SAC en la ciudad de Tumbes, para los análisis respectivos.

3.3. Material y métodos:

Las muestras fueron tomadas a 10 cm de profundidad, previa homogenización en el caso del agua, las muestras fueron colocadas en bolsas y frascos plásticos, éstos fueron sellados herméticamente, rotulados y refrigerados a 4°C hasta el momento de los análisis; para cada una de las muestras, al momento de la colecta se evaluó temperatura, pH y concentración de cianuro usando el medidor portátil de pH/ORP/ISE y Temperatura HANNA HI 98185-01 y el fotómetro portátil HANNA HI 96714 para la cuantificación de cianuro empleando los métodos descritos por el proveedor. Todas las muestras fueron trasladadas a la ciudad de Tumbes para los análisis respectivos.

3.4. Procesamiento de las muestras:

3.4.1. Aislamiento, identificación y caracterización de microorganismos:

a) Aislamiento de microorganismos:

Para el aislamiento, caracterización e identificación de microorganismos se emplearon técnicas microbiológicas y moleculares clásicas, la obtención de colonias puras se realizó mediante diluciones sucesivas de las muestras obtenidas las cuales fueron sembradas en medio agar (TSA y Cetrimide) incubadas a temperatura ambiente durante 24 – 48 horas, la purificación de las cepas se llevó a cabo mediante siembras sucesivas de las colonias crecidas individualmente y la calidad de las mismas se verificó mediante tinción Gram y microscopía. Las cepas fueron conservadas a -20°C empleando glicerol 15% como crioprotector.

b) Extracción de ADN de bacterias:

La extracción de ADN bacteriano se realizó siguiendo el protocolo de (Worden 2009) con algunas ligeras modificaciones. Brevemente, los cultivos bacterianos fueron centrifugados a 12,000rpm por 5 minutos, se agregó 695µL del BUFER CTAB 2X seguido de 1.4µL de β-Mercaptoetanol (0.2%)

y 3.5µL de Proteinasa K (0.1 mg/ml) y se incubaron las muestras a 60°C por 1 hora, se agregó 700ul de Cloroformo-alcohol Isoamilico (24:1) y se mezcló por inversión, las muestras fueron centrifugadas por 10 minutos a 14000 x g a 4°C y se recuperó el sobrenadante adicionándole isopropanol 2/3 del volumen y se incubó a -20°C por 2 horas, pasado este tiempo se centrifugó por 15 min a 14000 x g a 4°C y se descartó el sobrenadante, el pellet fue mezclado con 400µL de etanol al 75% y se centrifugó por 10 min a 14000 x g a 4°C, el pellet fue resuspendido en 50µl de T.E pH 8.0 (10 Mm Tris-HCl 1mM EDTA) y se adicionó 1µl de RNase (10mg/ml) incubándose por 30 minutos a 37°C.

c) Extracción de ADN de hongos:

Para la extracción de ADN de los hongos se tomó 1 cm² de micelio, lavándose con agua destilada estéril, se adicionó buffer CTAB 10% a 60°C y se maceró vigorosamente, se añadió buffer CTAB 2X (395µL del Pre-Buffer con 100µL del CTAB 10% y 5µL de β-Mercaptoetanol) y se adicionó 2.5µL de Proteinasa K (20mg/ml), las muestras se incubaron a 55°C por 1 hora.

Pasado este tiempo se adicionó 700µL de la mezcla fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamilico (25:24:1) y se centrifugó a 13,000rpm por 15 minutos, el sobrenadante fue transferido a un nuevo microtubo y se adicionó 1 volumen de la mezcla cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), se centrifugó a 13,000rpm por 15 minutos y el sobrenadante fue recuperado.

Se adicionó 0.1 volumen de acetato de sodio 3M (pH 5.2) y 500µL de Isopropanol helado incubando a -20°C durante 1 hora, las muestras fueron centrifugadas a 13,000 rpm por 15 minutos y se eliminó el sobrenadante, se adicionó 400µL de etanol al 75% y se centrifugó a 13,000 rpm por 10 minutos, el sobrenadante fue eliminado y el pellet resuspendido con 50µL de TE 1X (Tris-HCl 10 mM pH 8.0 y 1 mM de EDTA pH 8.0), se adicionó

1µL de Rnase 10mg/ml y se incubó a 37°C durante 1 hora. El ADN extraído fue alicuotado para evaluar la calidad mediante determinación de cantidad y pureza empleando del biofotómetro Eppendorf®, las alícuotas restantes fueron conservadas a -20°C para futuros análisis.

d) Identificación y caracterización de microorganismos:

La identificación y caracterización de bacterias y hongos se realizó mediante el análisis de la secuencia del gen rRNA 16S y de la región Espaciadora Transcritora Interna (ITS) respectivamente, mediante amplificación por PCR utilizando como moldes el DNA genómico total extraído siguiendo los protocolos antes mencionados. Los iniciadores universales empleados se observan en la tabla 1.

Tabla 1. Iniciadores usados para la identificación de los microorganismos aislados de muestras contaminadas con cianuro

Organismo	Iniciadores	Dirección	Secuencia (5' - 3')
Bacterias*	27F	Forward	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG
	1492R	Reverse	TACGGYTACCTTGTTACGACTT
Hongos**	ITS1	Forward	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
	ITS4	Reverse	TCCTCCGCTTATTGATATGC

* (Lane 1991)

** (White, Bruns y Tylor 1990)

Las condiciones de PCR para la amplificación de genes taxonómicos bacterianos y de fúngicos se observan en las tablas 2 y 3 respectivamente. Los productos de PCR obtenidos fueron enviados a secuenciar a la empresa MacroGen USA. Las secuencias obtenidas con los iniciadores empleados fueron editadas empleando el software MEGA 6 y confirmando su identidad por comparación con la base de datos mediante BLASTN (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome).

Tabla 2 condiciones de PCR para la amplificación del gen rRNA 16S para la identificación de las bacterias aisladas

Etapas	Temperatura	Tiempo	# Ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	6 minutos	
Desnaturalización	94°C	30 segundos	30
Alineamiento	58°C	45 segundos	
Extensión	72°C	1 minuto	
Extensión final	72°C	4 minutos	
Conservación	4°C	∞	

Tabla 3 condiciones de PCR para la amplificación de la Región Espaciadora Interna ITS para la identificación de los hongos aislados

Etapas	Temperatura	Tiempo	# Ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	6 minutos	
Desnaturalización	94°C	30 segundos	35
Alineamiento	54°C	45 segundos	
Extensión	72°C	45 segundos	
Extensión final	72°C	5 minutos	
Conservación	4°C	∞	

3.4.2. Análisis de las comunidades microbianas:

La caracterización comparativa de comunidades microbianas de suelos y de aguas contaminadas y prístinas (no contaminadas) por el uso de cianuro fue realizada mediante análisis metagenómicos dirigidos (Valenzuela *et al.* 2006) (Gong *et al.* 2013) mediante "secuenciación de próxima generación" (NGS "Next Generation Sequencing") haciendo uso del ADN extraído directamente de las muestras de suelos y agua en estudio usando protocolos previamente estandarizados (Tekere *et al.* 2011)

(CONCEPTOAZUL 2013) y el kit de aislamiento de ADN PowerSoil (Mo Bio Laboratories, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

El ADN extraído fue secuenciado con la tecnología PMG, realizada a través de la región variable V4 del gen 16S rRNA, iniciadores 515/806 (Caporaso *et al.* 2011) fueron usados en un programa de PCR de 30 ciclos usando HotStart Mix Kit (Qiagen, USA) bajo las siguientes condiciones: 94°C por 3 Minutos, 94°C por 30 segundos, 53°C por 40 segundos y 72°C por 1 minuto, con un paso de elongación final de 72°C por 5 minutos.

El secuenciamiento fue desarrollado en un Ion Torrent PGM siguiendo las indicaciones del fabricante. Las secuencias fueron procesadas usando un apropiado análisis pipeline (MR DNA, Shallowater, TX, USA). En resumen, las secuencias fueron separadas de los códigos de barras e iniciadores, las secuencias <150pb, con bases ambiguas y con homopolímeros excediendo los 6pb fueron removidas. La reducción del ruido de las secuencias se realizó por agrupamiento con 3% de divergencia (97% de similitud) seguido por la remoción de las secuencias no ensambladas y quimeras. Los OTUs finales fueron taxonómicamente clasificados usando BLASTn frente a la base de datos curada derivada de GreenGenes, RDP II y NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) (DeSantis *et al.* 2006), <http://rdp.cme.msu.edu>).

El servidor MG-RAST (metagenomics Rapid Annotation using Subsystem Technology) fue usado como herramienta web accesible para el análisis y visualización de los datos metagenómicos obtenidos, el cual en esencia es una plataforma web que anota fragmentos de secuencias individuales, proporcionando clasificación taxonómica y funcional dentro de un solo metagenoma y en comparación entre varios metagenomas. Estos datos se presentan usando varios métodos de visualización y son ajustables sobre el desarrollo del análisis (Meyer *et al.* 2008) (Keegan, Glass y Meyer 2016).

La diversidad microbiana de los datos fue obtenida usando M5RNA como fuente de anotación (97% como el mínimo porcentaje de identidad, 10^{-5} como máximo e-valor y 50pb como la longitud mínima de alineamiento). Los perfiles taxonómicos basados en todos los fragmentos anotados fueron normalizados por la división del número de fragmentos emparejados de un organismo con el tamaño de su genoma para corregir el hecho de que, para la misma abundancia, los organismos con genomas más grandes tendrán más hits que los organismos con genomas pequeños.

Los perfiles taxonómicos también fueron realizados usando el alineamiento de los fragmentos del gene 16S rRNA, para esto las secuencias fueron retiradas de MG RAST y clasificadas a nivel de género usando el “Classifier” herramienta del Ribosomal Database Project (RDP, <http://rdp.cme.msu.edu/>) con un valor de arranque de 98% (Wang *et al.* 2007). Los análisis de similitud se desarrollaron con el método Bray-Curtis mediante ANOVA empleando datos paramétricos.

3.4.3. Determinación de las condiciones óptimas de cultivo de las cepas aisladas:

Los microorganismos aislados inicialmente bajo condiciones aerobias en Agar Tripticasa Soya (TSA), para bacterias y Agar Potato Dextrosa (PDA) con antibióticos para hongos, fueron sometidos a crecimiento bajo diferentes parámetros físicos-químicos, esto a fin de entender los efectos de estas condiciones en la remoción de cianuro.

Las condiciones de crecimiento de los microorganismos y los parámetros químicos se fueron modificando uno a la vez. Los microorganismos aislados fueron reactivados en tubos Falcom de 15ml conteniendo medio mínimo M9 con cianuro de sodio a diferentes concentraciones (25ppm, 50ppm, 100ppm y 200ppm) como única fuente de nitrógeno, el pH del medio fue ajustado a diversos rangos (8.5, 9.5, 10.5 y 11.5) y se emplearon varios tamaños de

inóculo (0.5%, 1.5%, 2.5% y 3.5%) para la siembra. Los cultivos fueron incubados a diferentes temperaturas (20°C, 25°C, 30°C y 35°C) y bajo agitación en shaker a 150rpm. El crecimiento de los microorganismos fue evaluado por la medida de la densidad óptica (DO) del cultivo a 600nm.

3.4.4. Amplificación de genes degradadores:

Los microorganismos que presentaron tolerancia al cianuro fueron seleccionados para la búsqueda por PCR de los genes que codifican para las enzimas involucradas en las diferentes rutas de degradación del cianuro y sus derivados tóxicos; para lo cual se emplearon iniciadores específicos (tabla 4) tomados de investigaciones similares (Brandao, Clapp y Bull 2003) (Luque-Almagro 2005) (Meyer 2010) (Coffey *et al.* 2009) y diseñados mediante el alineamiento de las diferentes secuencias presentes en la base de datos del banco de genes de la NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

Tabla 4. Iniciadores usados para la amplificación de los genes que codifican para las enzimas degradadoras de cianuro y derivados tóxicos

Gen	Iniciadores	Dirección	Secuencia (5' - 3')
Nitrilo-hidratasa*	NhyF	Forward	GTGAACCAGATGTCAGTAACGATCG
	NhyR	Reverse	GCAGGCTCGAGGTAACCCTCG
Cianidasa**	CynF	Forward	CTGTACTGCCGAGCCTTGAATTT
	CynR	Reverse	AGCGATGAAGAGCCAGTCGTTCCG
Cianasa	CynCF	Forward	GACAGGCTACCTGCTGGC
	CynCR	Reverse	AGGTTGTTCCACTCGTTCCA
	CynSF***	Forward	GATTCCAACCTGACCCGWYGATGTATCGCTTC
	CynSR***	Reverse	CGCTCRMATGATGCCATCGCCAAATTTYC
Nitrilasa****	NitF	Forward	ATGCCTCTCGTTTCATCCGAAA
	NitR	Reverse	CTACATCTCTTCCCGGTGCG

* (Brandao, Clapp y Bull 2003) ** (Meyer 2010) *** (Luque-Almagro 2005) **** (Coffey *et al.* 2009)

Las condiciones estandarizadas para la reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) para cada uno de los juegos de iniciadores empleados se muestran en las tablas 5 – 9.

Tabla 5 condiciones de PCR para la amplificación del gen Nhy para la identificación de la enzima Nitrilo-hidratasa

Etapas	Temperatura	Tiempo	# Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	5 minutos	
Desnaturalización	95°C	1 minuto	35
Alineamiento	55°C	45 segundos	
Extensión	72°C	1 minuto	
Extensión final	72°C	5 minutos	
Conservación	4°C	∞	

Tabla 6 condiciones de PCR para la amplificación del gen chy para la identificación de la enzima Cianidasa

Etapas	Temperatura	Tiempo	# Ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	4 minutos	
Desnaturalización	94°C	30 segundos	35
Alineamiento	50°C	1 minuto	
Extensión	72°C	1 minuto	
Extensión final	72°C	4 minutos	
Conservación	4°C	∞	

Tabla 7 condiciones de PCR para la amplificación del gen cyn para la identificación de la enzima Cianasa con iniciadores CynC

Etapas	Temperatura	Tiempo	# Ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	4 minutos	
Desnaturalización	94°C	30 segundos	30
Alineamiento	52°C	1 minuto	
Extensión	72°C	45 segundos	
Extensión final	72°C	5 minutos	
Conservación	4°C	∞	

Tabla 8 condiciones de PCR para la amplificación del gen cyn para la identificación de la enzima Cianasa con iniciadores CynS

Etapas	Temperatura	Tiempo	# Ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	2 minutos	
Desnaturalización	94°C	30 segundos	30
Alineamiento	50°C	1 minuto	
Extensión	72°C	1 minuto	
Extensión final	72°C	3 minutos	
Conservación	4°C	∞	

Tabla 9 condiciones de PCR para la amplificación del gen nit para la identificación de la enzima Nitrilasa

Etapas	Temperatura	Tiempo	# Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	5 minutos	
Desnaturalización	95°C	1 minuto	30
Alineamiento	54°C	1 minuto	
Extensión	72°C	1 minuto	
Extensión final	72°C	5 minutos	
Conservación	4°C	∞	

3.4.5. Identificación y caracterización de las enzimas degradadoras mediante espectrometría de masas:

Para el análisis del exoproteoma las cepas seleccionadas fueron sembradas en medio M9 suplementadas con cianuro de sodio, incubadas a temperatura ambiente y con agitación constante. Las muestras fueron centrifugadas para separar las células del medio, el sobrenadante conteniendo el exoproteoma fue filtrado usando filtros de 0.22µm de tamaño de poro a fin de remover células contaminantes. Las proteínas presentes en el sobrenadante filtrado fueron precipitadas con acetona helada, en una proporción 1:2 y concentradas por centrifugación, el pellet proteínico fue resuspendido en agua grado HPLC con ácido trifluoroacético (TFA) al 0.1% y conservadas a -20°C hasta el desarrollo de los análisis respectivos.

Las proteínas recuperadas fueron migradas en un gel de poliacrilamida al 10% y digeridas para los análisis espectrométricos siguiendo el protocolo de (Shevchenko *et al.* 2006). El análisis por espectrometría de masas se desarrolló usando un espectrómetro de masas MALDI TOF/TOF 5800, los espectros fueron captados en modo MS Reflector Positivo con un láser Nd:YAG de 335nm de longitud de onda, los espectros se obtuvieron con 500 disparos de láser con un potencial de 3000 unidades internas de intensidad de láser. Para el análisis de fragmentos de iones en modo de tiempo de vuelo en tándem (TOF/TOF), se aceleraron los precursores a 8kV y se seleccionaron en la puerta de entrada de iones.

Además, los fragmentos generados por colisión de los precursores con aire en la cámara de disociación inducida por colisión (CID) se aceleraron a 15kV en la fuente 2 y se analizaron sus masas después de pasar por el reflector de iones. El análisis automático de los datos se realizó usando el programa informático 4000 Series Explorer versión 3.5.3 (Applied Biosystem). Los datos MS y MS/MS fueron combinados mediante la búsqueda en el software ProteinPilot™ 4.0 con ayuda del Paragon™

algoritmo (Matrix Science, Boston, MA) usando el GPS Explorer software, Versión 3.6 que permite la búsqueda no redundante de proteínas. Los datos obtenidos fueron contrastados contra de la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica no redundante (NCBIInr).

3.4.6. Formulación de un consorcio microbiano:

Para la formulación de un consorcio microbiano degradador de cianuro se emplearon todas las cepas microbianas que mostraron crecimiento en un medio de cultivo suplementado con cianuro de sodio y se probó su capacidad degradativa en ensayos individuales, aquellos que presentaron degradación fueron sometidas a pruebas de antagonismo a fin de evaluar la interacción microbiana.

Aquellas cepas que presentaron mejores tasas de degradación y no presentaron antagonismo fueron seleccionadas para la elaboración de 3 consorcios microbianos, los cuales fueron evaluados por su capacidad de degradación de cianuro, los consorcios **CBCN001**, **CBCN002** y **CBCN003** fueron incubados a temperatura ambiente (30°C aproximadamente) y con agitación a 150rpm en shaker con una concentración inicial de cianuro de 50ppm, el pH del medio se mantuvo entre 9.5 y 10.5 evaluándose el proceso de degradación diariamente hasta la desaparición total del contaminante. El consorcio que presentó las mayores tasas de degradación fue seleccionado para estudios posteriores.

3.4.7. Ensayos de degradación:

Fueron realizadas a nivel de laboratorio en un bioreactor Brunswick BioFlo 110 Fermentor con control de pH y temperatura, con una capacidad de 5.0 litros de medio y en campo en una zona con las condiciones

climatológicas similares a las de a la zona donde se obtuvieron las muestras para el aislamiento de microorganismos.

El consorcio microbiano fue sembrado en medio mínimo con melaza e hidrolizado e incubado a 30°C en agitación por 24 horas buscando alcanzar una densidad óptica de 0.9 – 1.0 a 600nm; este pre-inóculo se utilizó para preparar el inóculo final agregando 5ml en 500ml del medio, el cual sirvió para su inoculación en biorreactor conteniendo la muestra a tratar. Se colectaron muestras diariamente para realizar pruebas de degradación y evaluación de la comunidad microbiana.

De la misma manera se desarrollaron pruebas de degradación *in situ* en pozas de 1m³ aproximadamente conteniendo material de desecho producto de la lixiviación con cianuro para la extracción de oro. El procedimiento fue desarrollado siguiendo el protocolo desarrollado en laboratorio adecuándose a las condiciones del lugar; además, se tomaron muestras diarias para evaluar parámetros como temperatura, pH y degradación del contaminante.

4. RESULTADOS

4.1. Parámetros físico-químicos de las muestras de suelos y aguas

El pH, la temperatura y la concentración en cianuro (CN) son los principales parámetros físico-químicos de las muestras en relación a los procesos de biorremediación. Se debe mencionar que los límites máximos permisibles (LMP) estipulados por la normativa nacional para el cianuro son: 0.9 ppm en suelos agrícolas y entre 0.8 – 1ppm para la descarga de efluentes líquidos de actividades mineras.

Las muestras de suelos y aguas contaminadas con cianuro presentan valores de concentraciones de CN extremadamente altos, respectivamente 21,5 y 132 ppm, es decir por encima de LMP. Los valores de pH fueron elevados, respectivamente 8.79 y 11.59 (Tabla 10).

Las muestras de suelo y agua prístinas presentan valores de concentraciones de CN extremadamente bajos, respectivamente <0.05 y <0.02, es decir por abajo de LMP. Los valores de pH fueron neutros, respectivamente 6.81 y 7.69 (Tabla 10).

Tabla 10. Parámetros físico-químicos evaluados para los diferentes tipos de muestras seleccionadas para el presente estudio.

Muestra	Código	pH	Temperatura °C	[CN] mg/L
Suelo	MSCN	8.79	21	21.5
	MSP	6.81	20	<0.05
Agua	MACN	11.59	21	132
	MAP	7.69	21	<0.02

MSCN: Muestra de Suelo Contaminado con Cianuro. **MSP:** Muestra de Suelo Prístino. **MACN:** Muestra de Agua Contaminada con Cianuro. **MAP:** Muestra de Agua Prístina.

4.2. Estructura de las comunidades microbianas: microbiota y metagenómica.

4.2.1. Monitoreo de la comunidad microbiana durante la degradación natural del cianuro y derivados tóxicos:

El análisis del proceso de atenuación natural de la contaminación de cianuro en muestras de suelos con una cronosecuencia de hasta 5 años de antigüedad mostró un total de 451477 secuencias de alta calidad con un promedio de 272pb de longitud en promedio.

Se obtuvieron 12414, 26132, 111609, 113462, 114181 y 73677 secuencias de las muestras MCS01, MCS02, MCS03, MCS04, MCS05 y MCS06 respectivamente, las secuencias corresponden a 22 phyla bacterianos diferentes, 35 clases, 80 órdenes, 191 familias, 542 géneros y aproximadamente 1000 especies fueron identificados en todos los sitios evaluados (Tabla 11).

Tabla 11 Metagenomas de la cronosecuencia de la restauración natural de zonas contaminadas con cianuro y derivados tóxicos

	MCS01	MCS02	MCS03	MCS04	MCS05	MCS06
Secuencias	12414	26132	111609	113462	114181	73677
Phyla	5	8	9	18	18	17
Clases	12	15	24	32	40	33
Ordenes	19	32	42	70	72	69
Familia	30	67	100	127	140	120
Géneros	37	114	223	312	314	314
Especies	70	228	481	594	635	628

MCS01=suelos de 1 mes; **MCS02**=suelo de 5 meses; **MCS03**=suelo de 1 año y 5 meses; **MCS04**=suelo de 3 años; **MCS05**=suelos de 4 años; **MCS06**=suelo de 5 años

Los análisis filogenéticos indican que los phyla predominantes en todos los suelos fueron Proteobacteria (12.91%), Firmicutes (11.32%), Bacteroidetes (10.16%), Actinobacteria (11.25%), Verrucomicrobia (8.20%), Acidobacteria (5.73%), Planctomycetes (4.34%), Cyanobacteria (3.33%), Aquificae (2.61%), Nitrospirae (2.52%), Spirochaetes (2.26%), Thermotogae (2.10%), Deinococcus-Thermus (2.04%), Chlamydiae (1.82%), Tenericutes (1.53%), Dictyoglomi (1.26%), y con abundancias menores se encuentran Chloroflexi (0.73%), Synergistetes (0.59%), Thermodesulfobacteria (0.49%), Chlorobi (0.33%), Fibrobacteres (0.001%) y Gemmatimonadetes (0.001%); además, se reportaron también secuencias bacterianas no clasificadas, las cuales representan el 14.48% del total (Fig. 1).

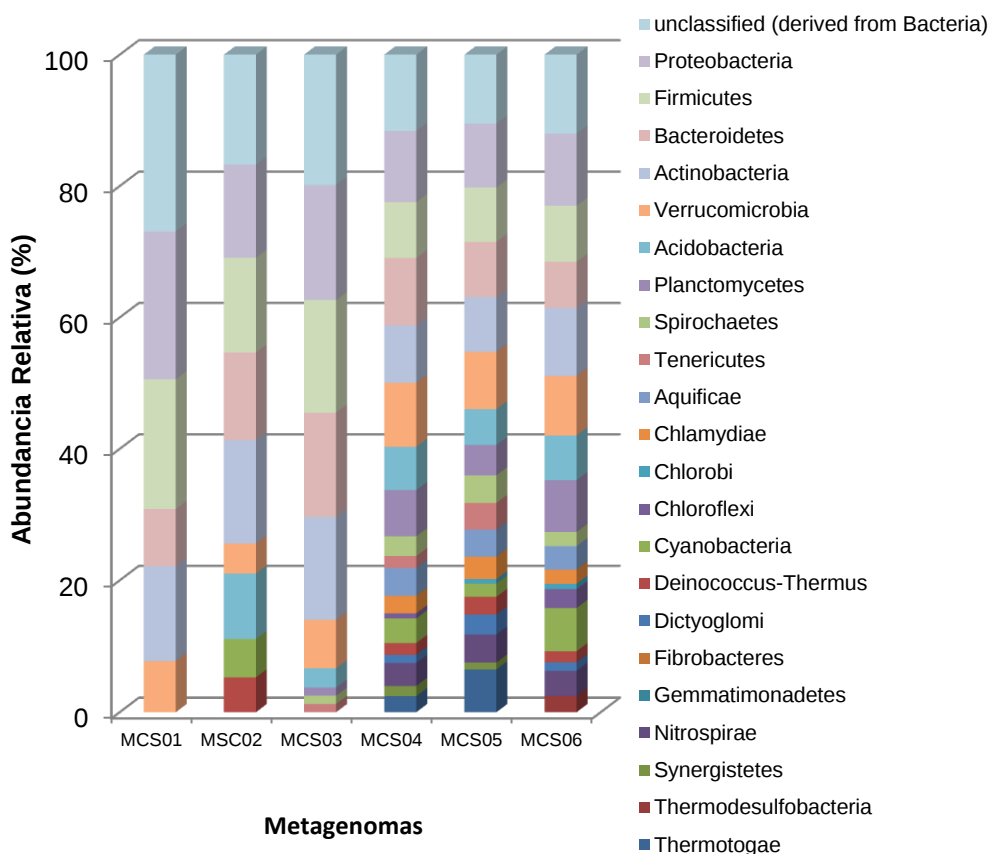


Figura 1 Abundancia relativa de los phyla bacterianos dominantes en todas las muestras analizadas **MCS01** Suelos 1 mes, **MCS02** suelo 5 meses, **MCS03** Suelo de 1 año y 5 meses, **MCS04** Suelo de 3 años, **MCS05** suelo de 4 años, **MCS06** suelo de 5 años.

4.2.2. Caracterización de la microbiota nativa de los suelos y aguas recientemente contaminados con cianuro mediante técnica independiente de cultivo *in vitro*

Para determinar la composición de las comunidades microbianas de suelos y aguas contaminadas por cianuro, la metagenómica dirigida al gen 16S del ADNr ha sido utilizada ya que permite secuenciar en paralelo miles de amplicones obtenidos a partir de los ADNs metagenómicos extraídos directamente de las muestras de suelos o aguas.

Por otro lado ha sido realizado un co-cultivo microbiano directamente a partir de las muestras de suelos y aguas contaminados para poder luego identificar las especies bacterianas susceptibles de ser cultivadas para uso en operaciones de biorremediación presentes por metagenómica dirigida al gen 16S del ADNr.

a) Análisis metagenómico de suelos contaminados con cianuro:

En las muestras de suelos contaminados 13 phyla fueron identificados. Las secuencias no clasificadas derivadas de bacterias representan en 50.96%. Los principales filos identificados: Proteobacteria (19.04%), Firmicutes (16.8%), Actinobacteria (7.15%) y Bacteroidetes (5.87%); otros phyla bacterianos representan menos del 1% de abundancia (Fig. 2)

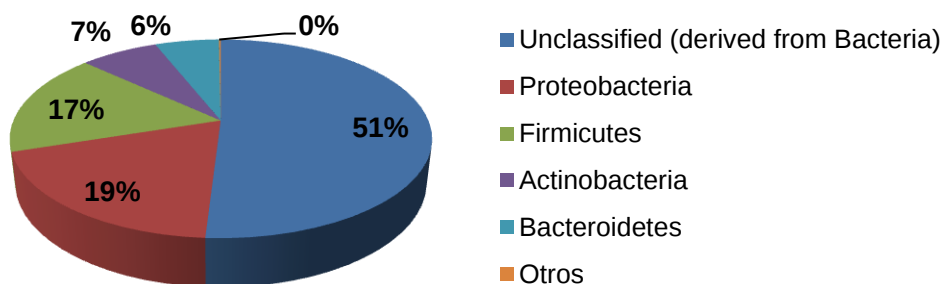


Figura 2 Abundancia relativa de los principales phyla identificados en muestras de suelos contaminados con cianuro

El análisis de los suelos contaminados co-cultivados permitió observar una disminución de las secuencias no clasificadas del 51% en muestras directas a 2.67% y un incremento del phylum Proteobacteria (90.87%) (Fig. 3).

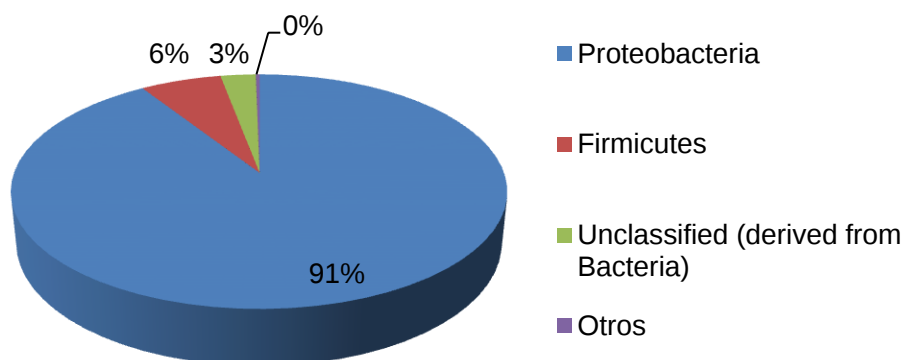


Figura 3 Abundancia relativa de los phyla predominantes en muestras de suelos contaminados en co-cultivo.

Un análisis a nivel de género de las muestras co-cultivadas mostró que la comunidad microbiana que podrían ser aislados está representada por *Pseudomonas* (85.1%), *Bacillus* (6.06%) y *Brevudimonas* (5.24%), los géneros no clasificados representan el 2.67% y otros géneros el 0.9% (Fig. 4).

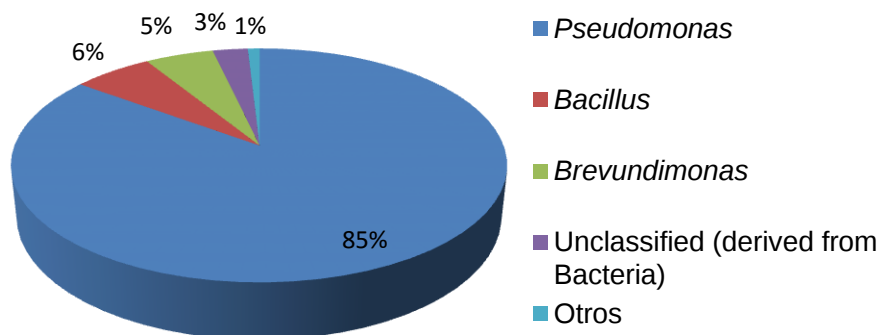


Figura 4 Abundancia relativa de los géneros bacterianos representativos de muestras de suelos contaminados con cianuro en co-cultivo.

Así mismo, el análisis a nivel de especie reveló la lista de las posibles especies que podrían ser aisladas en diversos medios de cultivo (Fig. 5).

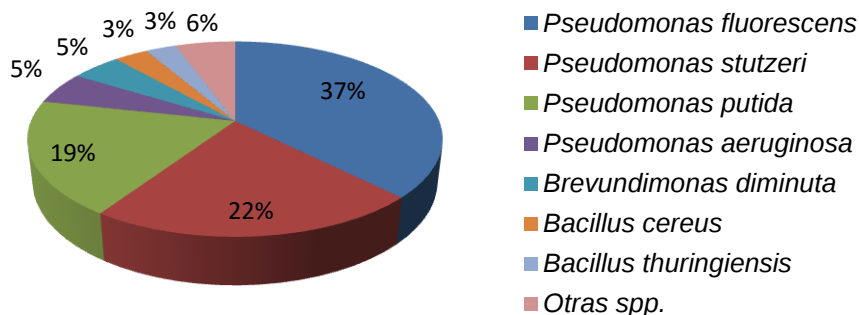


Figura 5 Abundancia relativa de las especies predominantes en muestras de suelo contaminado con cianuro en co-cultivo.

b) Análisis metagenómico de suelos no contaminados con cianuro:

En las muestras de suelos no contaminados con cianuro 19 phyla fueron identificados por metagenómica directa. Las secuencias no clasificadas derivadas de bacterias representan el 47.42%, Proteobacteria (11.33%), Actinobacteria (10.88%), Verrucomicrobia (7.65%), Acidobacteria (5.72%), Firmicutes (5.60%), Gemmatimonadetes (4.52%), Bacteroidetes (2.93%), Planctomycetes (1.75%) y Chloroflexi (1.26%) fueron los representantes, otros phyla bacterianos representan menos del 1% (Fig. 6).

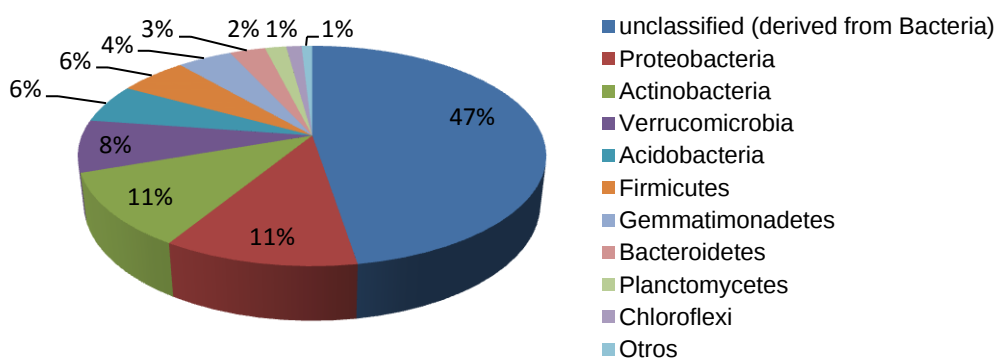


Figura 6 Abundancia relativa de los principales phyla identificados en muestras de suelos no contaminados

El análisis de los suelos no contaminados co-cultivados se observó un incremento en la abundancia del phylum Firmicutes (89.54%) y la disminución del phylum Proteobacteria (4.29%) y la disminución de las secuencias bacterianas no clasificada (Fig. 7).

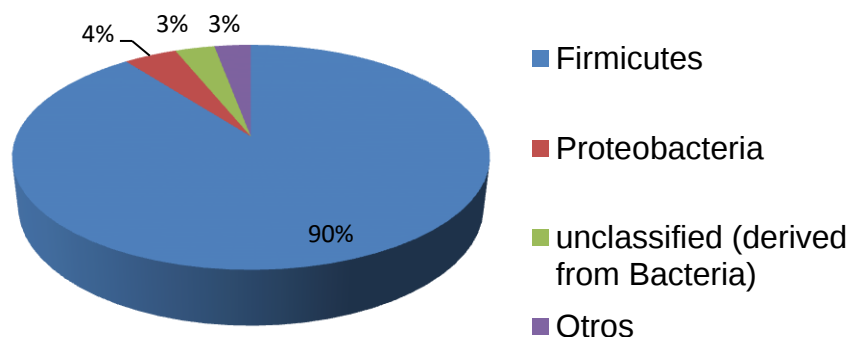


Figura 7 Abundancia relativa de los phyla predominantes en muestras de suelos no contaminados en co-cultivo.

Un análisis a nivel de género de las muestras co-cultivadas mostró que la comunidad microbiana que podrían ser aislados está representada por *Bacillus* (88.08%), *Acetobacter* (2.81%), los géneros no clasificados representan el 3.2% y otros géneros el 5.9% (Fig. 8)

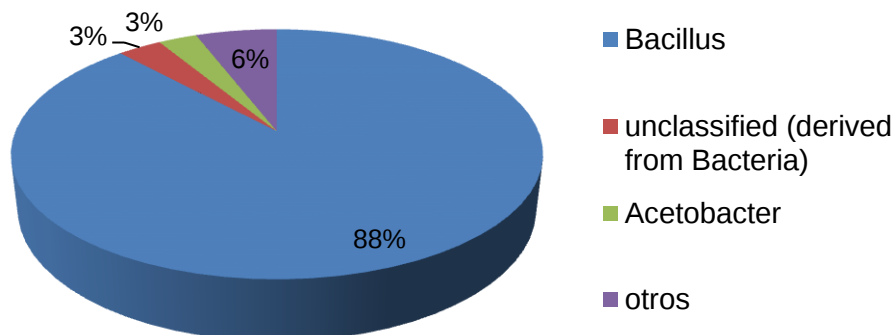


Figura 8 Abundancia relativa de los géneros bacterianos representativos de muestras de suelos no contaminados con cianuro en co-cultivo

Así mismo, el análisis a nivel de especie reveló la lista de las posibles especies que podrían ser aisladas en diversos medios de cultivo (Fig. 9).

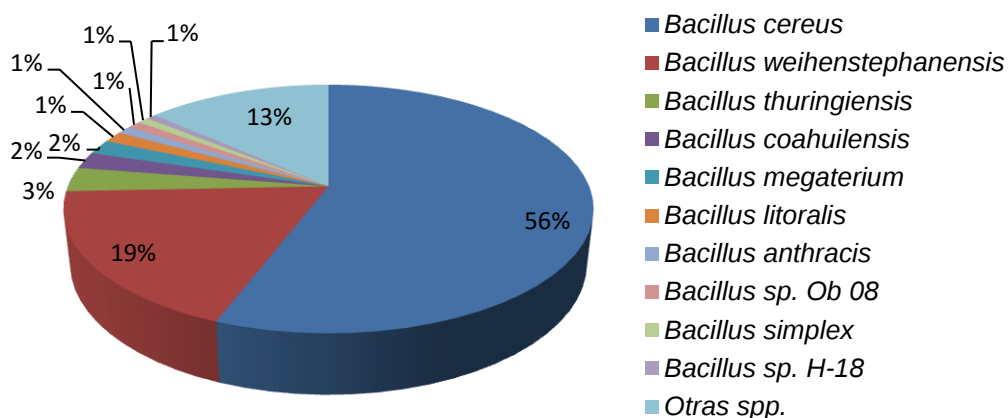


Figura 9 Abundancia relativa de las especies predominantes en muestras de suelo no contaminado con cianuro en co-cultivo

c) Análisis metagenómico de agua contaminada con cianuro:

En las muestras de agua contaminados con cianuro 17 phyla fueron identificados por metagenómica directa, siendo Firmicutes (61.12%), Actinobacteria (36.86%) los phyla con mayor abundancia, las secuencias no clasificadas derivadas de bacterias representan el 0.84%, dentro de los otros phyla con abundancia menores se encuentran Proteobacteria (0.78%), Bacteroidetes (0.17%), Fusobacteria (0.04%), Deinococcus-Thermus (0.04%), Cyanobacteria (0.03%), Acidobacteria (0.01%), Chloroflexi (0.01%), Gemmatimonadetes (0.01%), Tenericutes (0.01%), Planctomycetes (0.007%), Verrucomicrobia (0.007%), Spirochaetes (0.003%), Nitrospirae (0.002%), Synergistetes (0.001%), Chlamydiae (0.0006%) (Fig. 10).

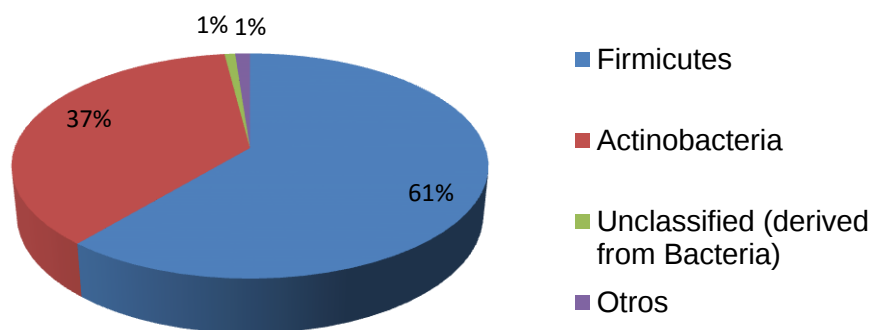


Figura 10 Abundancia relativa de los principales phyla identificados en muestras de agua contaminadas

Un análisis a nivel de género de las muestras de agua contaminadas mostró que la comunidad microbiana está representada principalmente por especies de los géneros *Alkalibacterium* (30,90%), *Staphylococcus* (14,18%), *Leucobacter* (13,42%), *Bogoriella* (8,99%), *Bacillus* (6,61%), *Micrococcus* (4,85%), *Enterococcus* (3,57%), *Vagococcus* (3,56%), *Rathayibacter* (3,42%), *Aeromicrobium* (3,42%), otros géneros con abundancias menores al 1% representan el 7,05% (Fig. 11).

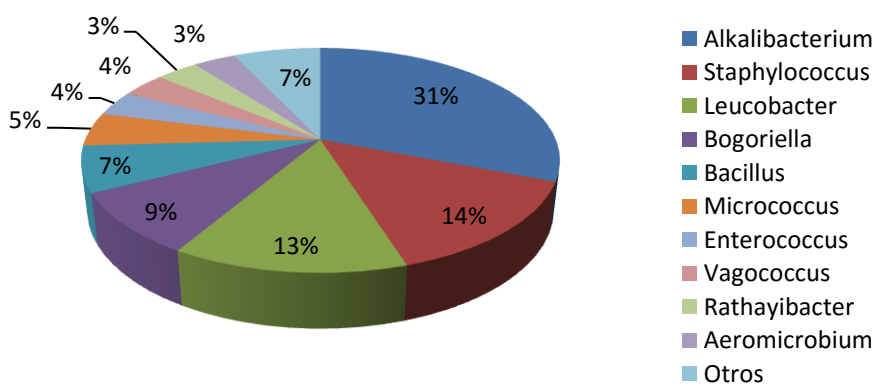


Figura 11 Abundancia relativa de los géneros bacterianos representativos de muestras de suelos no contaminados con cianuro en co-cultivo

La comunidad microbiana en agua contaminada con cianuro está representada en las especies *Alkalibacterium sp* NP13 (30.90%), *Staphylococcus massiliensis* (14.18%), *Leucobacter komagatae* (13.42%), *Bogoriella caseolytica* (8.99%), *Bacillus sp. KSM-K38* (6.53%), *Micrococcus sp. SMCC ZAT351* (4.84%), *Vagococcus fluvialis* (3.56%), *Aeromicrobium marinum* (3.42%), *Rathayibacter tritici* (3.41%), *Enterococcus sp. CSL 7544-3* (2.86%), Otras especies representan el 7.83% de la población (Fig. 12).

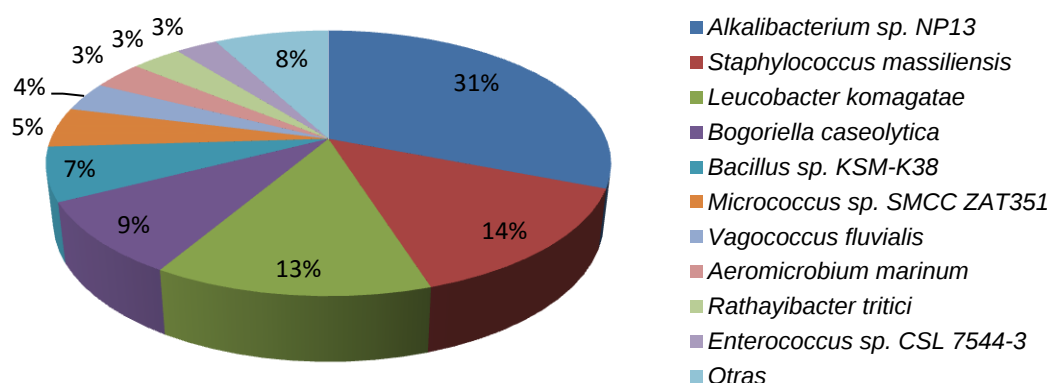


Figura 12 Abundancia relativa de las especies predominantes en muestras de suelo no contaminado con cianuro en co-cultivo

d) Análisis metagenómico de agua no contaminada con cianuro:

En las muestras de agua no contaminados con cianuro 15 phyla fueron identificados por metagenómica directa. Las secuencias derivadas de bacterias no clasificadas representan el 46,08%, Proteobacteria (16,43%), Bacteroidetes (13,85%), Firmicutes (11,73%), Actinobacteria (5,65%), Verrucomicrobia (3,20%), Gemmatimonadetes (1,31%), Planctomycetes (1,07%), otros phyla representan el 0,64% (Fig. 13).

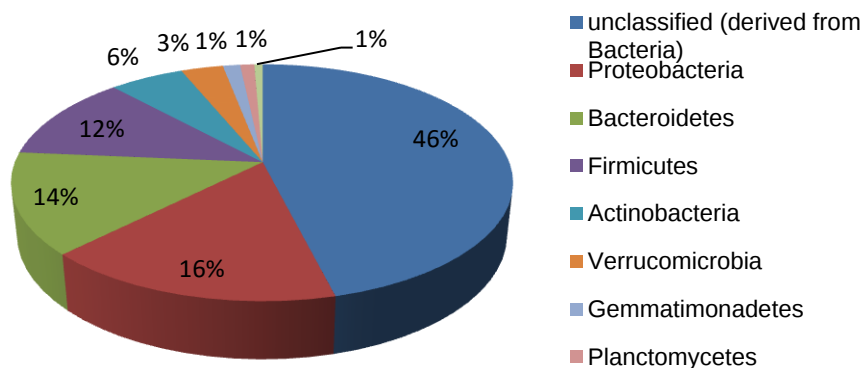


Figura 13 Abundancia relativa de los principales phyla identificados en muestras de agua no contaminadas.

El análisis a nivel de género de las muestras de agua no contaminadas mostró que la mayoría de las secuencias corresponden a bacterias no clasificadas (45.38%) y en abundancia menores se encuentran los géneros Chitinophaga (4.54%), Microbacterium (3.79%), Caulobacter (3.37%), Terrimonas (3.00%), Clostridium (2.71%), Cytophaga (2.18%), Verrucomicrobium (1.62%), Gemmatimonas (1.29%), Robinsoniella (1.11%), otros géneros representan el 29.74% (Fig. 14).

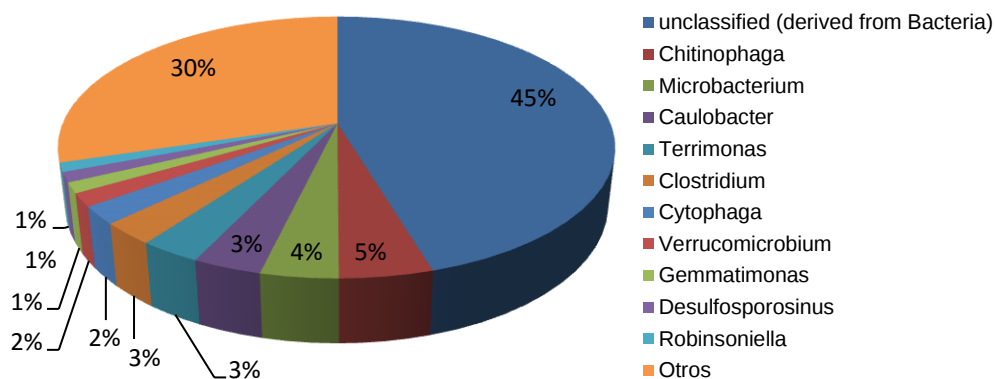


Figura 14 Abundancia relativa de los géneros bacterianos representativos de muestras de suelos no contaminadas con cianuro.

La comunidad microbiana en agua no contaminada con cianuro está representada en las especies cuyas secuencias no han sido clasificadas (43.16%) y en menor abundancia *Microbacterium dextranolyticum* (3.25%), *Caulobacter fusiformis* (3.23%), *Chitinophaga sancti* (2.84%), *Terrimonas ferruginea* (2.45%) *Chitinophaga pinensis* (1.69%), *Cytophaga aurantiaca* (1.53%), *Verrucomicrobium spinosum* (1.48%), *Gemmatimonas aurantiaca* (1.29%), *Rhizobium huautlense* (1.23%), *Clostridium thermocellum* (1.19%), *Clostridiales genomosp. BVAB3* (1.13%), otras especies con abundancias menores representan el (33.99%) de la comunidad (Fig. 15).

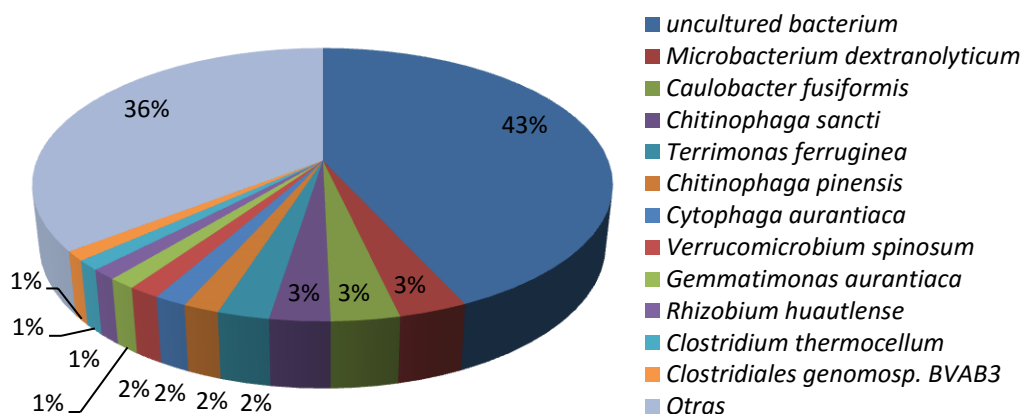


Figura 15 Abundancia relativa de las especies predominantes en muestras de agua no contaminadas con cianuro.

4.2.3. Caracterización de la microbiota nativa de los suelos y aguas contaminados con cianuro mediante técnica dependiente de cultivo *in vitro*

Los resultados corresponden a una primera caracterización de la microbiota nativa de los suelos y aguas contaminados por cianuro mediante técnica dependiente de cultivo *in vitro*. Esta tecnología tiene la ventaja de permitir el establecimiento de una colección de cepas potencialmente benéficas como agentes biodegradadores de cianuro utilizables individualmente o en consorcio para operaciones de biorremediación. Sin

embargo, el número de cepas identificadas es muy reducido y representa generalmente solamente una fracción limitada de los microorganismos constitutivos de la microbiota.

A partir de las muestras de suelo y agua contaminadas por cianuro y derivados tóxicos ha sido posible aislar 89 cepas microbianas, 77 bacterianas y 12 fúngicas. Estas cepas han sido identificadas molecularmente por amplificación por PCR y secuenciación de la región Espaciadora Transcritora Interna (ITS) del gen 16S ADNr.

Los microorganismos bacterianos aislables de muestras de suelos contaminado con cianuro están agrupados en 15 géneros en total, de los cuales *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Acinetobacter* fueron los más abundantes con 19.11%, 17.64% y 11.76% respectivamente. (Fig. 16).

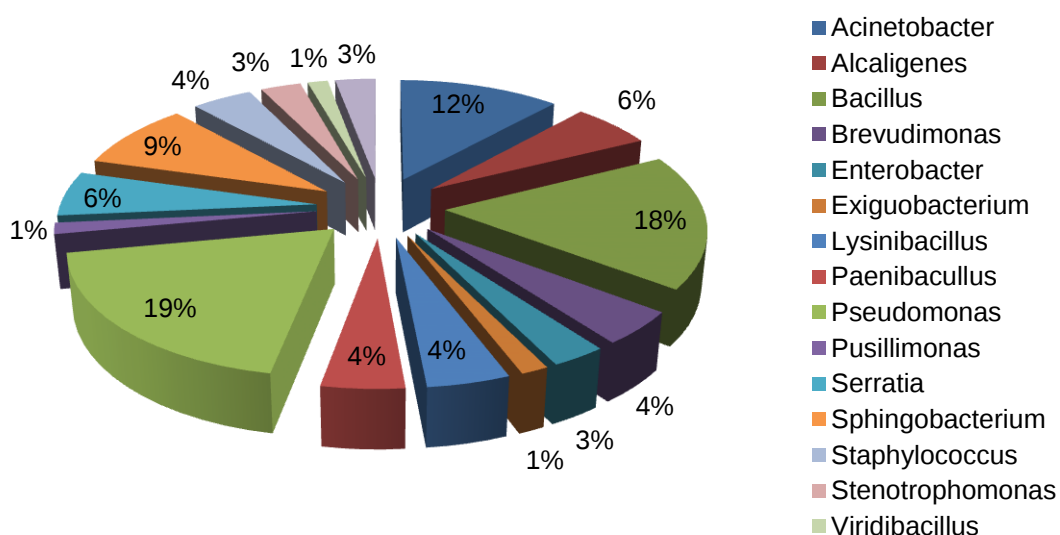


Figura 16 Abundancia relativa de los principales géneros aislados de muestras de suelos contaminados con cianuro y derivados tóxicos.

La población cultivable en las muestras de agua estuvo representada por los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas*, los cuales muestran una abundancia del 30% cada uno, no habiéndose logrado aislar especies del género *Acinetobacter* (Fig. 17).

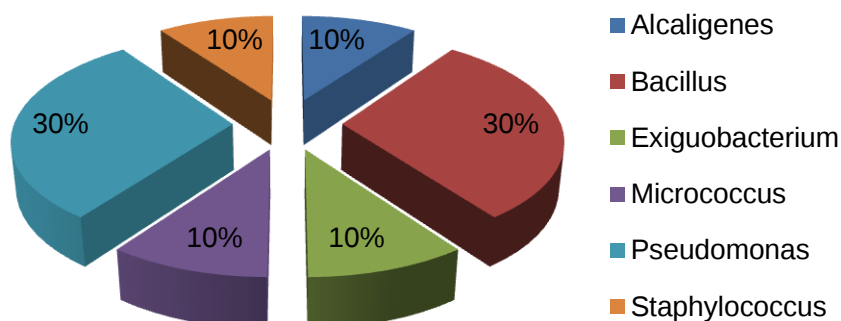


Figura 17 Abundancia relativa de los principales géneros aislados de muestras de suelos contaminados con cianuro y derivados tóxicos

Así mismo, 12 cepas fúngicas han sido identificadas como representantes de los géneros *Mucor* (4 cepas), *Trichoderma* (2 cepas), *Penicillium* (2 cepas), *Weissella* (1 cepa), *Fusarium* (1 cepa), *Alternaria* (1 cepa) y *Aspergillus* (1 cepa) (Fig. 18).

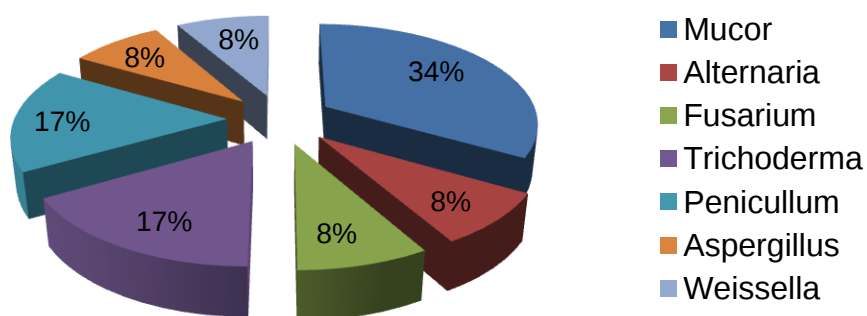


Figura 18 Abundancia relativa de los géneros de hongos aislados de muestras de suelo y agua contaminadas con cianuro

4.3.Efectos del pH, temperatura, tamaño de inóculo y concentración del contaminante sobre el crecimiento microbiano:

Se evaluó la influencia de diversos parámetros sobre el crecimiento microbiano, esto a fin de determinar la dinámica de degradación del cianuro bajo diferentes condiciones.

El análisis estadístico de cada uno de los ensayos realizados mostró que los resultados obtenidos no son consecuencia del azar ($P > 0.005$) y que cada uno de los tratamientos experimentales tiene efecto sobre el crecimiento de las cepas estudiadas, tanto individualmente como en consorcio.

4.3.1. Efecto del pH sobre el crecimiento microbiano:

En conjunto la mayoría de cepas analizadas mostraron mayor porcentaje de multiplicación cuando el pH del medio se mantuvo en 9.5; esto, ligeramente superior a los porcentajes mostrados en los ensayos realizados a pH 10.5 (Fig. 19).

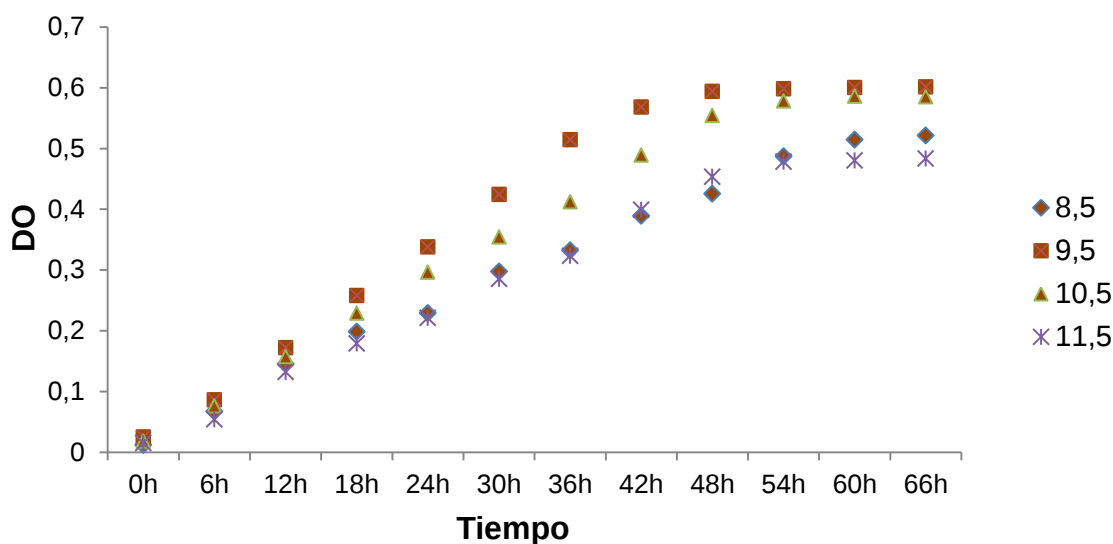


Figura 19 Influencia del pH sobre el crecimiento de las cepas bacterianas analizadas. La gráfica representa el crecimiento promedio de las cepas analizadas

El porcentaje de las cepas con la capacidad de multiplicarse a diferentes rangos de pH puede observarse en la figura 20, en esta imagen se muestra que el mayor porcentaje de supervivencia, explicado en la capacidad de las cepas analizadas para multiplicarse a pH 9.5 y 10.5 fue de 65.6% y 59.4% respectivamente (Fig. 20).

En base a los resultados obtenidos los ensayos de degradación realizados posteriormente fueron realizados en este rango de pH.

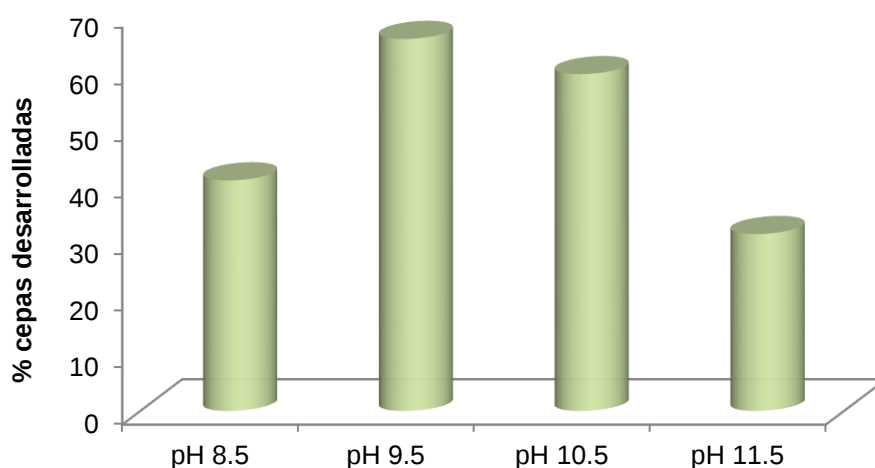


Figura 20 Porcentaje de las cepas microbianas capaces de multiplicarse bajo diferentes niveles de pH

4.3.2. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento microbiano:

De la misma manera, los ensayos para evaluar la influencia de la temperatura en el crecimiento de los microorganismos seleccionados reflejaron que el mayor crecimiento microbiano es obtenido cuando las cepas son incubadas a 25°C.

Los resultados obtenidos bajo este parámetro de crecimiento fueron ligeramente superiores a los obtenidos cuando las cepas seleccionadas se incubaron a 30°C (Fig. 21).

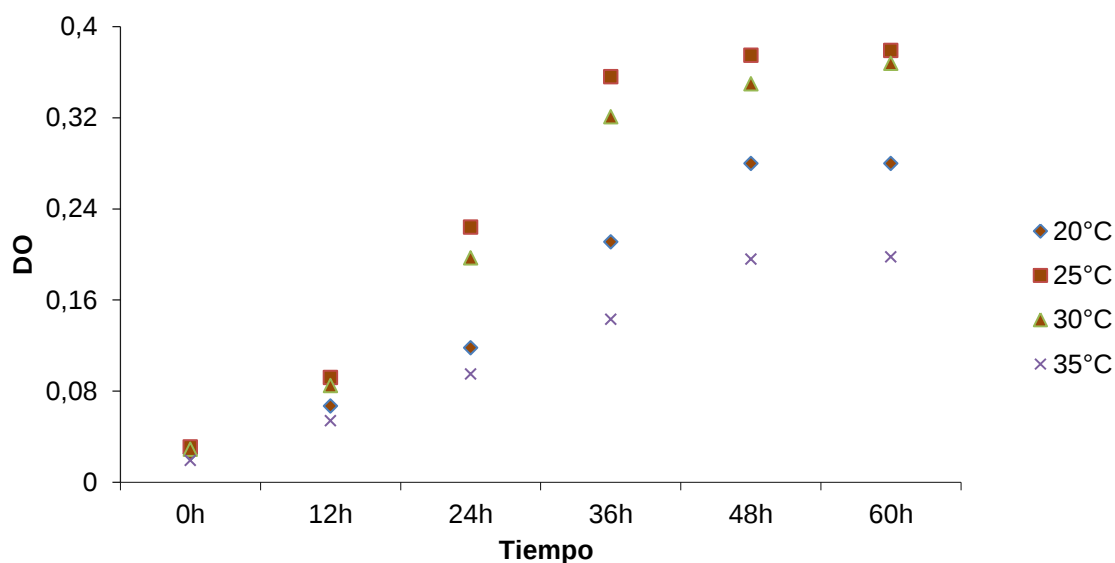


Figura 21 Influencia de la temperatura de incubación sobre el crecimiento promedio de las cepas analizadas.

Además, los resultados de estos ensayos mostraron que los porcentajes de las cepas microbianas con la capacidad de multiplicarse a 25°C y 30°C es de 59.38% y 53.13% respectivamente (Fig. 22); por lo que este rango de temperatura fue empleado en los ensayos posteriores.

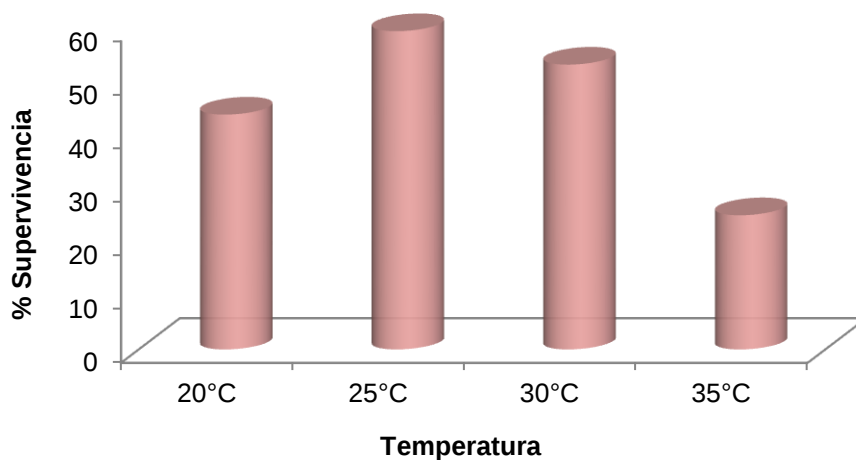


Figura 22 Porcentaje de las cepas microbianas capaces de multiplicarse a diferentes niveles de temperatura de incubación

4.3.3. Efecto de la concentración del inóculo sobre el crecimiento microbiano y la degradación del cianuro:

En cuanto a la concentración del inóculo, los resultados de los ensayos mostraron que las cepas seleccionadas presentan en promedio mayores tasas de supervivencia cuando se empleó como inóculo 2.5% (v/v) del cultivo microbiano (Fig. 23).

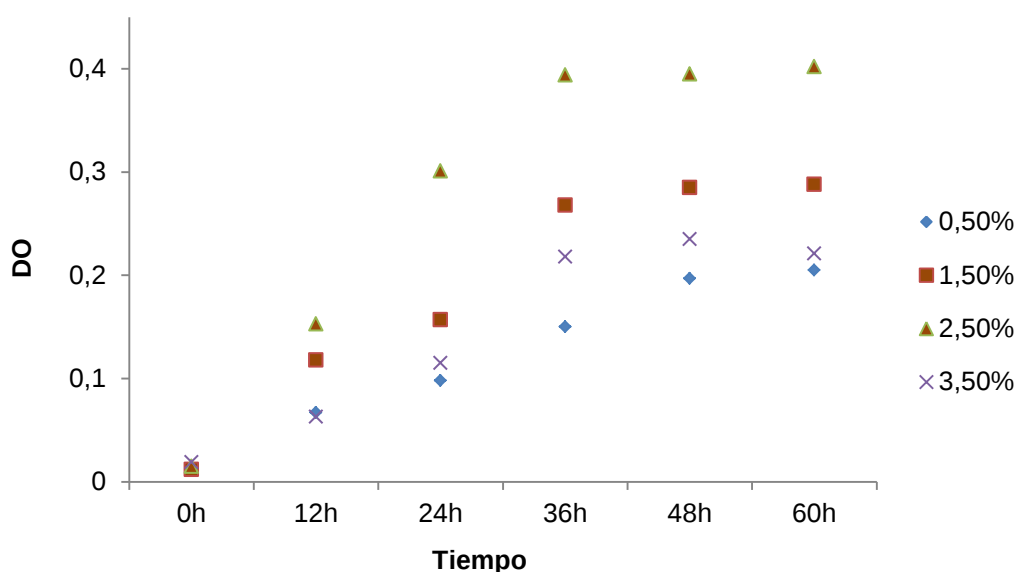


Figura 23 Influencia de la concentración de cultivo microbiano inoculado microbiano sobre el crecimiento del mismo.

Además, las cepas seleccionadas metabolizan en promedio 32%, 45%, 25% y 18% de cianuro de sodio, cuando éste se encuentra en concentraciones iniciales de 25ppm, 50ppm, 100ppm y 200ppm respectivamente. Observándose mayor eficiencia de degradación del contaminante cuando se encuentra inicialmente a 50ppm en los diferentes ensayos realizados (Fig. 24).

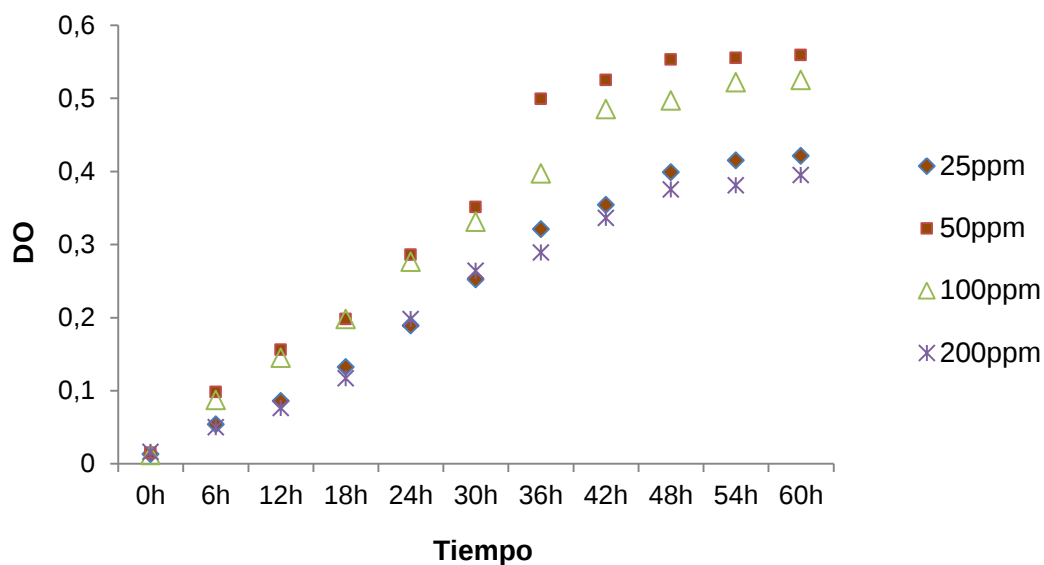


Figura 24 Influencia de la concentración inicial de cianuro de sodio sobre el crecimiento de las cepas seleccionadas.

4.4. Identificación genómica de enzimas degradadoras de cianuro y derivados tóxicos:

Se estandarizaron diferentes condiciones de PCR para la amplificación de las secuencias correspondientes a las enzimas participantes en los procesos de degradación de cianuro y derivados tóxicos (Tablas 5 – 9), lográndose obtener amplificación positiva con los iniciadores CynC y Cyn en dos cepas del género *Pseudomonas*, obteniéndose productos de 800 y 1200 pares de bases. Así mismo, la enzima Nitrilasa mostró amplificación positiva en una cepa del género *Alcaligenes*, mostrando un producto de aproximadamente 1000pb.

El secuenciamiento de los productos de las amplificaciones con los diferentes iniciadores mostró para el caso del gen cyn un 98% de similitud con la secuencia del gen que codifica para una enzima degradadora de cianuro presente en *Pseudomonas stutzeri* (Fig. 25).

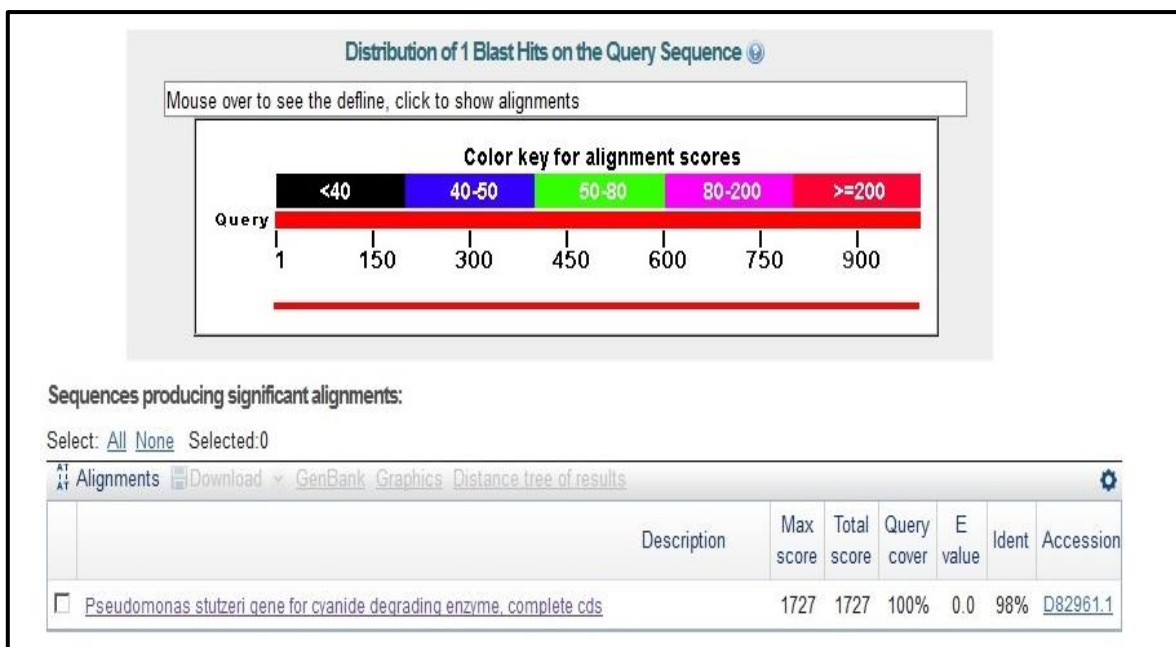


Figura 25 Alineamiento e identificación de una enzima degradadora de cianuro en *Pseudomonas stutzeri* empleando los iniciadores Cyn

De la misma manera, la comparación de la secuencia obtenida con los iniciadores CynC mostraron 100% de similitud con una sección del genoma de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* y específicamente mostró un 98% de similitud con la secuencia del gen cynB que codifica para una sub unidad de la proteína transportadora de la membrana interna tipo ABC (Fig. 26), la cual forma parte del operón cyn de esta bacterias, el cual juega un papel importante en la degradación de cianuro y sus derivados.

Los productos de la PCR para los genes que codifican para las enzimas Nitrilo-hidratasa y Nitrilasa no generaron secuencias de calidad, por lo cual no pudieron ser alineadas con las secuencias de la base de datos.

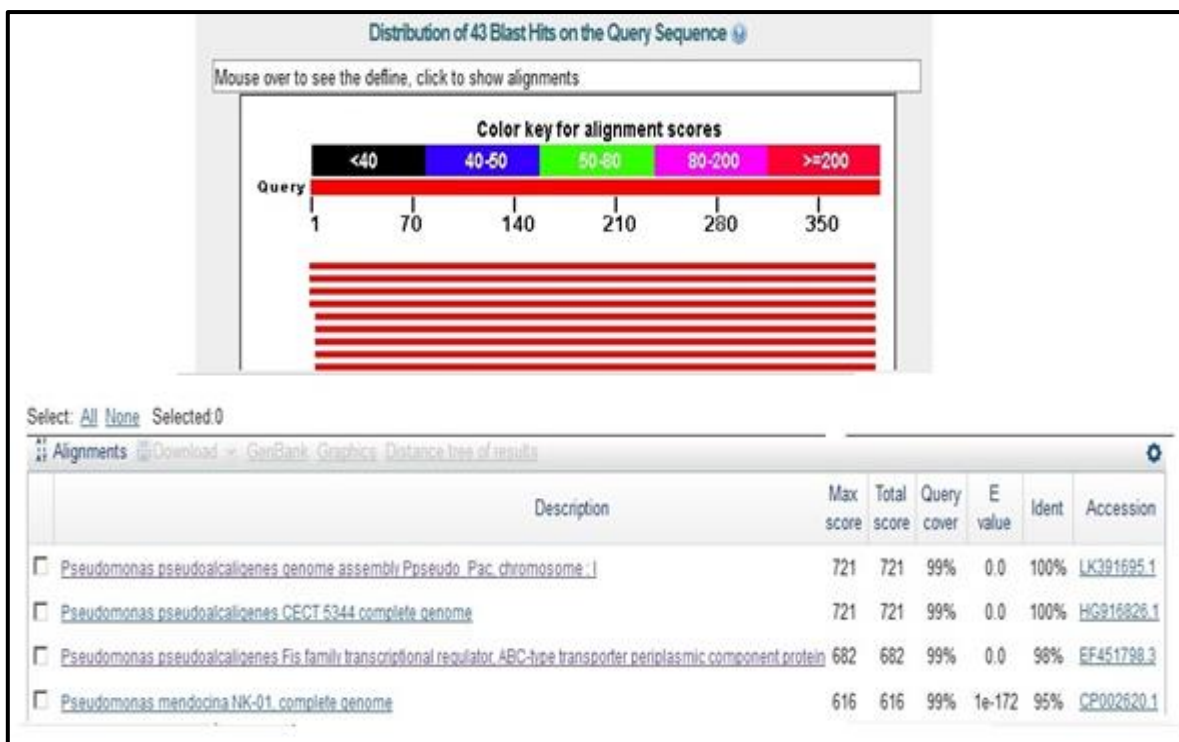


Figura 26 Alineamiento e identificación de las secuencia de una sub unidad de una proteína transportadora tipo ABC presente en la membrana interna de una cepa de *Pseudomonas* empleando los iniciadores CynC

4.5. Análisis proteómico de las enzimas degradadoras de cianuro presentes en los microorganismos aislados:

Las cepas que presentaron actividad de degradación y amplificación positiva para enzimas de degradación fueron sometidas a ensayos para la caracterización del exoproteoma a fin de evaluar la presencia de estas enzimas en el medio en el cual estos se desarrollan.

Estos análisis fueron realizados mediante la combinación de técnicas de recuperación de proteínas por precipitación, resolución mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% y análisis espectrométrico con el espectrómetro de masas MALDI TOF/TOF.

Los análisis MS/MS permitieron la identificación de algunas secuencias de algunas enzimas pertenecientes a las diferentes vías de degradación de cianuro, Cianasa y Cianidasa, en dos cepas del género *Pseudomonas*.

En un primer análisis TOF se logró identificar las masas 1326.6527 y 1326.6337, las cuales fueron seleccionadas para el análisis TOF/TOF (Fig. 27).

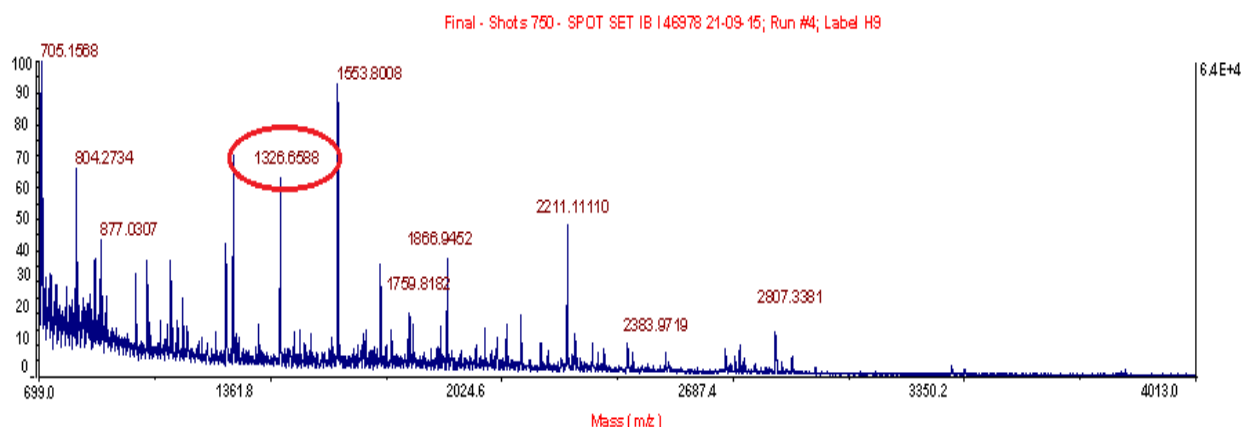


Figura 27 Espectro de masas generado a partir del análisis del exoproteoma de las cepas degradadoras de cianuro

Las masas seleccionadas como precursoras para el segundo análisis TOF generaron una secuencia de 11 aminoácidos **HRKMRASVAER** la cual con 99% de confianza permitió la identificación de la enzima cianuro-dihidratasa o cianidasa perteneciente a *Paenibacillus alvei* como la más próxima a la identidad de la enzima presente en la cepa de *Pseudomonas stutzeri* analizada (Fig. 28).

En la sección anexos se muestran las secuencias de otras enzimas que participan en el proceso de degradación del cianuro y que fueron identificadas en los microorganismos seleccionados en crecimiento individual como en consorcio.

Proteins in Group						Proteins Detected							
N	Unused	Total	Accessio...	Name	Species	N	Unused	Total	% Cov	Accessio...	Name	Species	Peptides(95%)
1	2.00	2.00	tr S9UW...	Cyanide dihydratase...	PAEAL	1	2.00	2.00	3.3	tr S9UW...	Cyanide dihydratase OS=Paenibacillus alvei A6-...	PAEAL	1
1	0.00	2.00	tr S9SVG...	Cyanide dihydratase...	PAEAL	Peptides in Group							
Con...	Conf	Sequence		Modifications		Cleavages	ΔMass	Prec MW	z	Sc			
2.00	99	HRKMRASVAER		Lys->Val@3 Oxidation(M)@4		missed R.K...	-0.0607	1326.63...	1	7			
0.00	99	HRKMRASVAER		Lys->Val@3 Oxidation(M)@4		missed R.K...	-0.0413	1326.65...	1	7			

cyanide dihydratase [Paenibacillus alvei A6-6i-x]
 Sequence ID: [gb|EPY14880.1](#) Length: 334 Number of Matches: 1

Range 1: 127 to 137 [GenPept](#) [Graphics](#) [Next Match](#)

Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
38.8 bits(84)	0.029	11/11(100%)	11/11(100%)	0/11(0%)

Query 1 HRKMRASVAER 11
 HRKMRASVAER
 Sbjct 127 HRKMRASVAER 137

Figura 28 Identificación de la enzima cianuro-dihidratasa o cianidasa con el software Protein Pilot y la búsqueda en protein blast de la secuencia generada durante el análisis espectrométrico.

4.6.Elaboración de un consorcio microbiano para la biorremediación de cianuro:

Los análisis metagenómicos, las evaluaciones en co-cultivo, pruebas de degradación y ensayos de antagonismo permitieron la formulación de un consorcio microbiano degradador de cianuro. De los tres consorcios formulados el consorcio empleado en el ensayo 2, conformado por 8 cepas bacterianas pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Alcaligenes* (C2) y que fue denominado **CBCN002** mostró mejores tasas de degradación en todos los ensayos realizados.

En los ensayos de degradación realizados, este consorcio llegó a degradar aproximadamente el 85.3% del cianuro presente; mientras que, los consorcios **CBCN001** y **CBCN003** fueron capaces de degradar el 60.25% y 69.7% del cianuro presente respectivamente (Fig. 29).

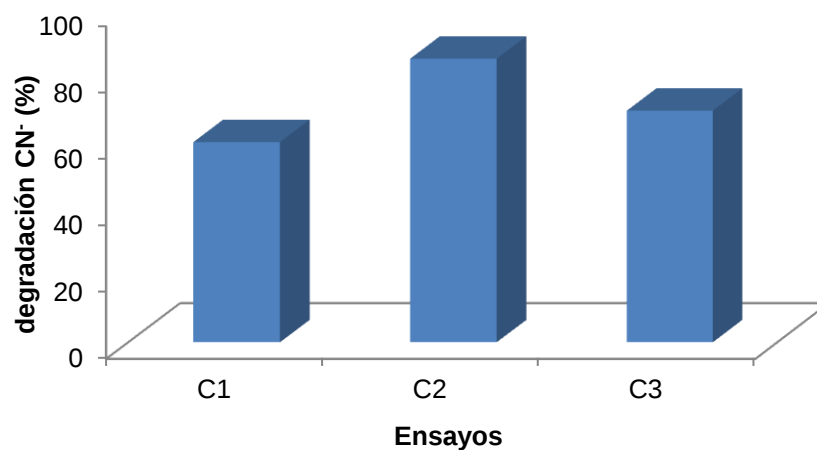


Figura 29 Porcentaje de degradación de cianuro de cada uno de los consorcios formulados y evaluados.

Además, se observó que el consorcio **CBN002** mostró mejor tasa de crecimiento frente a los otros consorcios formulados (Fig. 30).

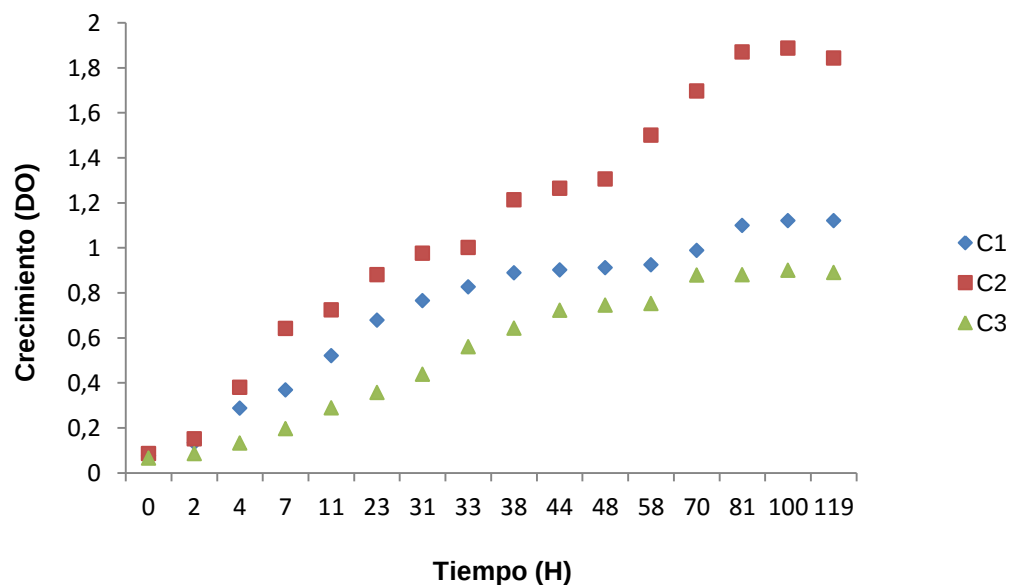


Figura 30 Curvas de crecimiento de los tres consorcios formulados y evaluados durante el proceso de degradación de cianuro. **C1**= CBN001; **C2**= CBN002; **C3**= CBN003

4.7. Ensayos de degradación en laboratorio a diferentes concentraciones de cianuro:

Los ensayos de degradación de cianuro en laboratorio se realizaron con el consorcio formulado anteriormente y que presentó mayores porcentajes de degradación de cianuro.

El consorcio **CBN002** logró reducir el 99% del cianuro presente en los ensayos realizados en aproximadamente 1 semana frente al control (Fig. 31). Sin embargo, para esto fue necesario repetir las inoculaciones diariamente durante tres días correspondientes a un proceso de bioenriquecimiento, a fin de acelerar el inicio del proceso de biodegradación.

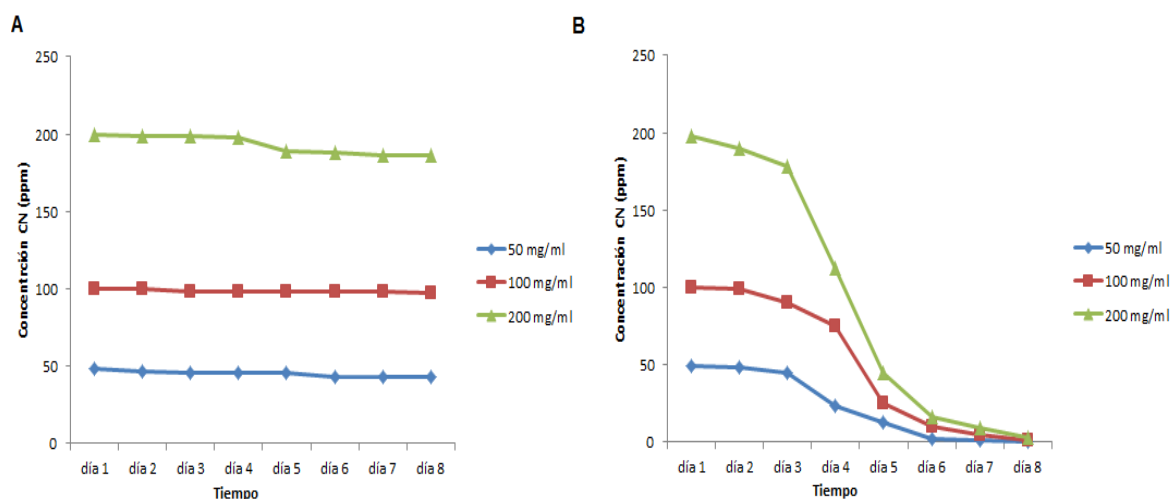


Figura 31. Ensayos de degradación de cianuro en laboratorio con 3 concentraciones diferentes del contaminante. 31A variación de la concentración de cianuro durante el ensayo de degradación en el control. 31B variación de la concentración de cianuro durante el ensayo de degradación en el tratamiento.

De manera complementaria, a fin de evaluar la estabilidad del consorcio durante el proceso de degradación del cianuro se realizó el monitoreo metagenómico. Este análisis mostró que en los primeros dos días luego de inoculado el consorcio microbiano, la población dominante corresponde al género *Alcaligenes* (68.4%), mientras que la abundancia relativa de *Pseudomonas* y *Bacillus* es de 15.78%.

A los 5 días de iniciado el proceso de biorremediación se observó que el género *Pseudomonas* incrementa su población al 33.3%, disminuyendo la abundancia del género *Bacillus* (11.1%) y *Alcaligenes* (55.5%).

A los diez días del proceso de degradación de cianuro, se puede observar que la abundancia de los géneros *Pseudomonas* y *Alcaligenes* se equilibra en un 44.12% aproximadamente, mientras que *Bacillus* (11.76%) se mantiene relativamente estable en comparación con la abundancia mostrada a los 5 días de tratamiento (Figura 32).

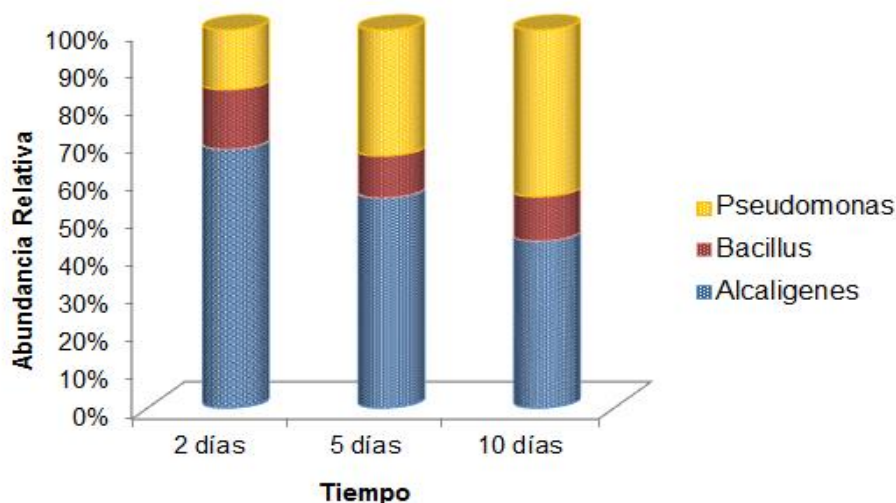


Figura 32. Monitoreo metagenómico de la estructura poblacional del consorcio microbiano degradador de cianuro durante el proceso de biorremediación en laboratorio.

4.8. Ensayos de biorremediación *in situ*:

Los ensayos de degradación en campo se realizaron en pozas de 1m³ de capacidad empleando muestras de relaves mineros sólidos, los cuales son retirados de las pozas luego de una semana aproximadamente de lixiviación con cianuro de sodio, el cual es empleado para la extracción de oro y plata.

El proceso de biorremediación *In situ* mostró que el consorcio microbiano es capaz de reducir el 97% de la concentración inicial de cianuro en aproximadamente 20 días.

Los ensayos se desarrollaron con concentraciones iniciales de 25ppm (Tratamiento) y 23ppm (control), las cuales luego de 20 días de evaluaciones diarias presentaron concentraciones finales de 0.81ppm en la poza tratada y 18.3ppm en la poza control (Fig. 33).

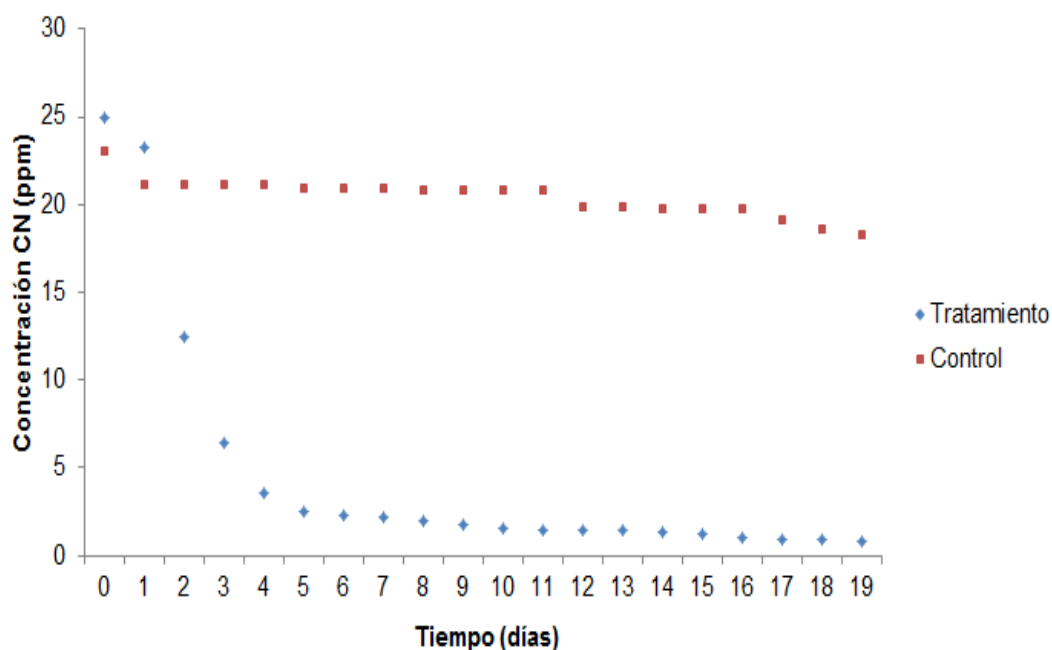


Figura 33. Variación de la concentración de cianuro durante los ensayos de degradación en muestras de relaves mineros en el cerro El Toro – Huamachuco – La Libertad.

Además, el análisis del monitoreo metagenómico del proceso de degradación *in situ* reveló la capacidad de adecuación de los microorganismos constituyentes del consorcio microbiano empleado a las condiciones ambientales naturales, lo cual se ve reflejado en el mantenimiento de la estructura natural de la comunidad de la poza de lixiviación empleada para el presente análisis (Figura 34).

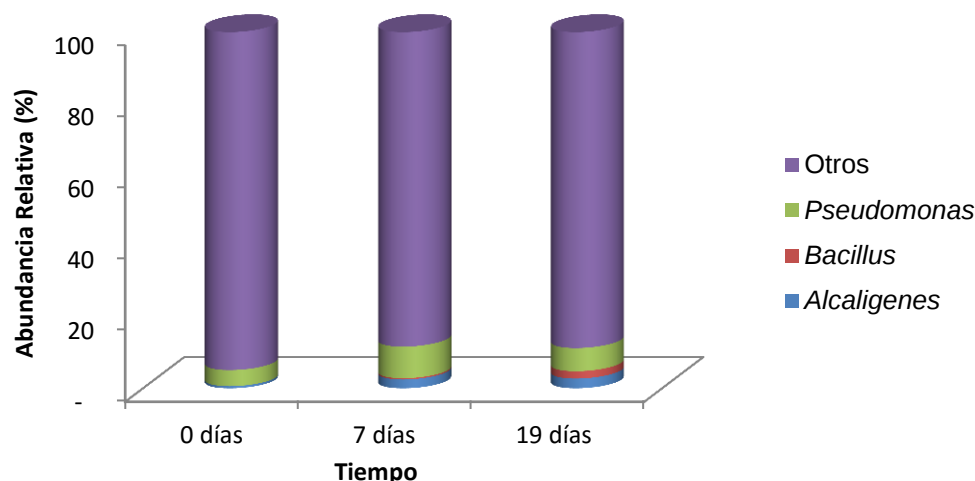


Figura 34 Monitoreo metagenómico de la estructura poblacional del consorcio microbiano degradador de cianuro durante el proceso de biorremediación en pozas de lixiviación.

Así mismo, en la figura 34 se puede observar el incremento en la detección de las especies constituyentes del consorcio (*Pseudomonas* en verde, *Bacillus* en rojo y *Alcaligenes* en azul) en comparación con la poza control (Figura 35), en la cual se puede observar la presencia de las especies constituyentes del consorcio como especies presentes naturalmente en ecosistemas contaminados con cianuro, aunque con abundancias menores.

Por lo cual, podemos resaltar que la incorporación del consorcio microbiano potencia el funcionamiento de los organismos que existen naturalmente en estos ecosistemas para el desarrollo eficiente del proceso de biorremediación sin la alteración de la estructura natural de la comunidad bacteriana.

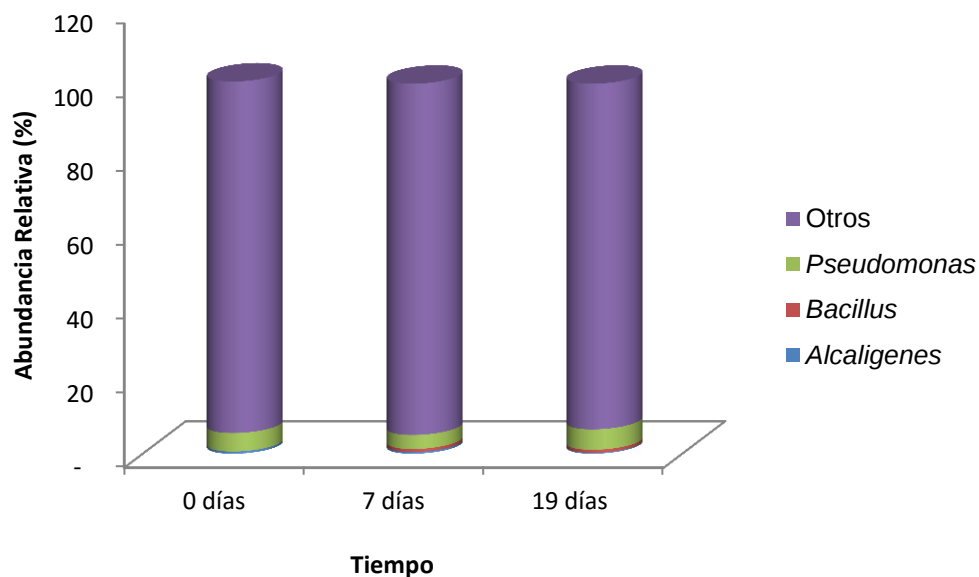
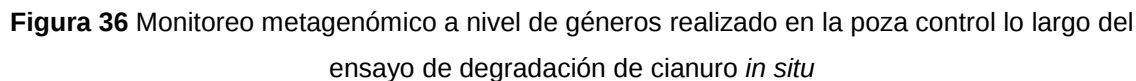


Figura 35 Monitoreo metagenómico de la estructura de la población microbiana en pozas de lixiviación control.

El monitoreo de la variación de la comunidad microbiana natural en la poza control a lo largo del desarrollo del ensayo de degradación de cianuro mostró la presencia de muchos microorganismos, representados por los diversos géneros bacterianos identificados (Figura 36). Además, en esta figura la variación en colores que agrupan los diversos géneros representan los phyla identificados.

Por otro lado, la variación en las barras de color (rojo, verde y azul) representan la variación de la abundancia relativa de los diversos géneros presentes en la poza control al inicio del ensayos, al día 7 de iniciado el tratamiento y al día 19 del mismo respectivamente (Figura 37).



La figura 37 corresponde a una sección de la figura anterior, en la cual se puede observar la dinámica de la variación de la comunidad natural en zonas contaminadas con cianuro.

Algunos géneros bacterianos como *Delftia* y *Taylorella* sólo se encuentran presentes en muestras de suelos recientemente expuestos a cianuro (barras rojas). De la misma manera, algunos géneros bacterianos como *Cupriavidus*, *Pelistega*, *Advenella*, *Hyphomicrobiu*, *Ochrobactrum*, *Bradyrhizobium* y *Rhodopirellula* son ejemplos de algunos de los géneros que se encuentran presentes 7 días después y que posteriormente son reemplazados por los géneros *Albidiferax*, *Bordetella*, *Sphingopyrix*, *Azospirillum*, *Rhodobacter*, *Mesorhizobium* y *Pirellula* que sólo pueden ser identificados 19 días después.

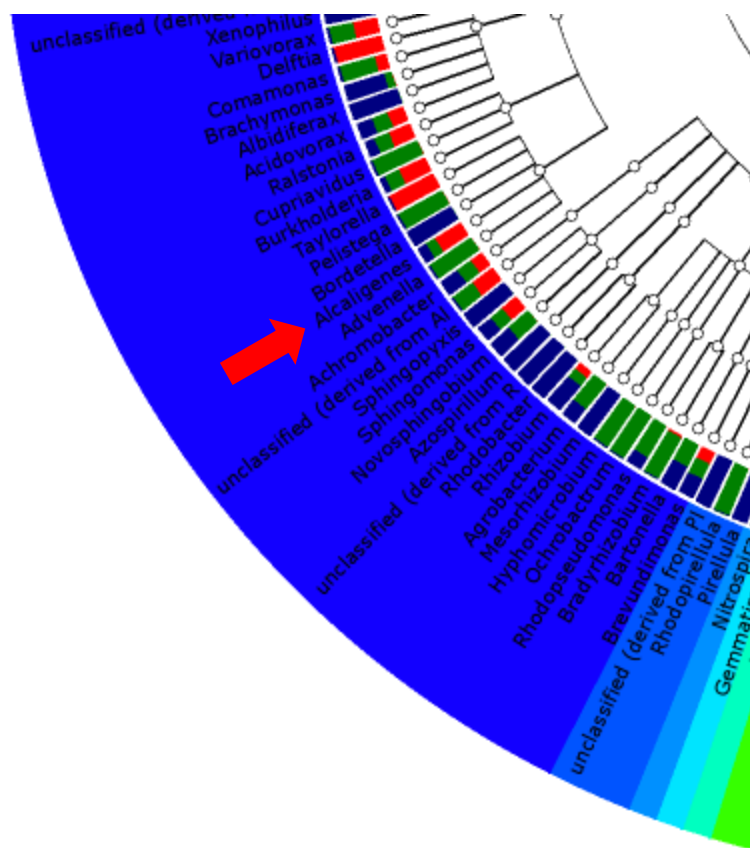
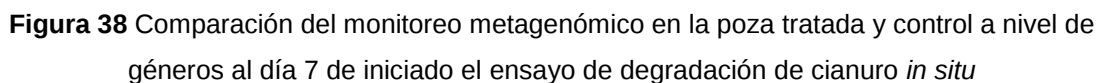


Figura 37 Representación de la variación en la abundancia relativa de los diversos géneros bacterianos identificados en la poza control durante el ensayo de degradación de cianuro *in situ*.

Si se analiza de manera particular uno de los géneros de interés para el presente estudio y que es mostrado en esta sección y señalado por una flecha roja (*Alcaligenes*), este género es reportado a lo largo del monitoreo (0 - 19 días), pero con mayor abundancia a los primeros días, mostrando así la capacidad de adaptación de algunas especies de este género a este tipo de contaminante.

Los resultados anteriores corresponden a sólo una sección analizada de los géneros identificados y mostrados en la imagen 36 que corresponden a la poza control, por lo cual el análisis de variación de la comunidad microbiana es observable en toda la imagen, mostrando además la presencia de microorganismos con la capacidad de degradación en los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Alcaligenes*, entre otros presentes de manera natural, lo cual puede explicar la ligera disminución de la concentración del cianuro en la poza control.

De la misma manera, el monitoreo metagenómico de la comunidad microbiana al día 7 del ensayo de degradación de cianuro, reveló la diferencia en la composición de la comunidad microbiana entre la poza tratada y la poza control, los colores que agrupan a los diferentes géneros reportados corresponden a los Phyla identificados en ambas pozas, mostrando además la variación en la abundancia relativa de cada uno de los géneros en la poza tratada, frente a la poza control, representada por las barras de color rojo y verde respectivamente (Figura 38).



El análisis de los géneros de interés nos permite tener una primera aproximación de lo que la variación de la composición de la comunidad bacteriana en la poza tratada frente a la poza control.

El análisis del género *Alcaligenes* mostró que sólo se pudieron identificar 4 especies en total, de las cuales sólo dos *Alcaligenes sp.* T12RB y *Alcaligenes sp.* 'ESPY2 (A-III)' se encuentran de manera natural en ambas pozas, pero que luego en la poza tratada desaparecen para dar prevalencia a *Alcaligenes sp.* 92 y *Alcaligenes faecalis*, especies que son incorporadas en el consorcio, siendo esta última especie la predominante con el 99.99% de abundancia en comparación con todas las especies identificadas dentro de este género (Figura 39).

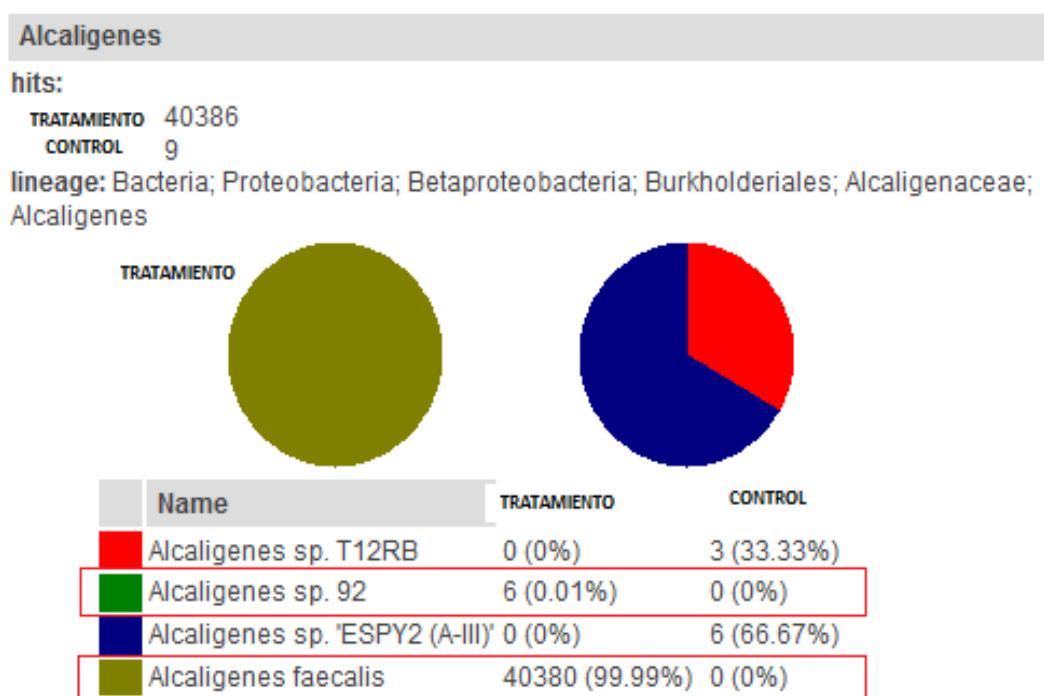


Figura 39 Abundancia relativa de las especies pertenecientes al género *Alcaligenes* en las pozas empleadas para los ensayos de degradación de cianuro.

El análisis de las especies identificadas pertenecientes al género *Bacillus*, mostró que las especies incorporadas en el consorcio (*Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* y *Bacillus sp.*) se encuentran presentes de manera natural en la poza control pero en abundancias muy bajas; por otro lado, estas mismas especies presentan abundancias relativamente mayores en la poza tratada, en la cual se puede observar la prevalencia de *Bacillus cereus* con el 59.85% de abundancia de todas las especies identificadas dentro de este género (Figura 40).

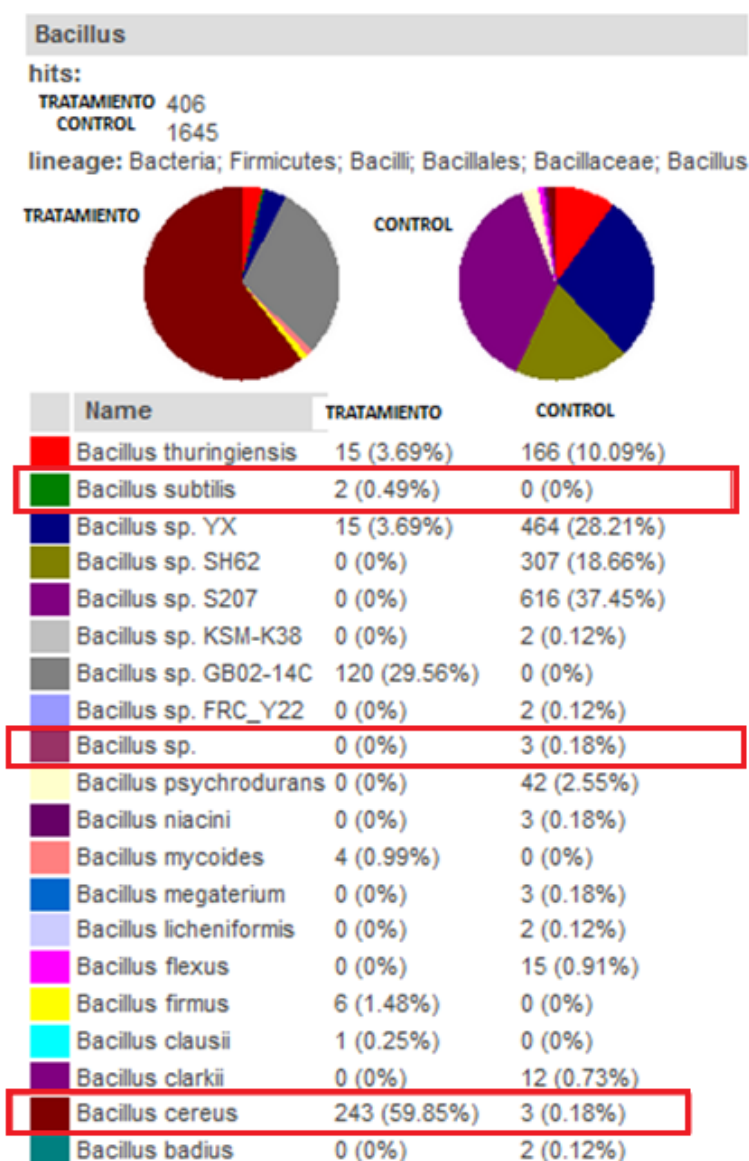


Figura 40 Abundancia relativa de las especies pertenecientes al género *Bacillus* en las pozas empleadas para los ensayos de degradación de cianuro.

Así mismo, el análisis de las especies pertenecientes al género *Pseudomonas* identificadas en ambas pozas mostró una diferencia significativa en la abundancia de las especies incorporadas en el consorcio frente a las que existen de manera natural en la poza control, siendo *Pseudomonas stutzeri* la más abundante con 62.18% del total de especies identificadas en la poza tratada y 14.92% en la poza control (Figura 41).

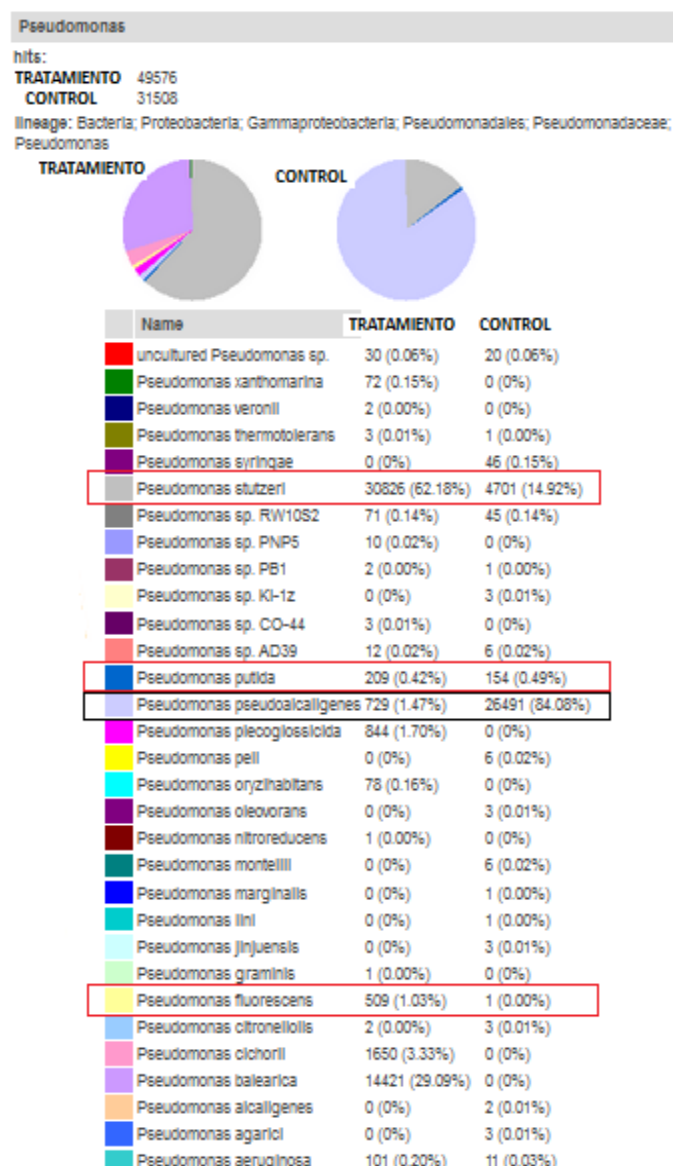


Figura 41 Abundancia relativa de las especies pertenecientes al género *Pseudomonas* en las pozas empleadas para los ensayos de degradación de cianuro.

Finalmente, es importante mencionar que *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, una especie bacteriana ampliamente reportada y empleada para procesos de degradación de cianuro también fue identificada y mostrada como parte importante de la comunidad natural de suelos contaminados con cianuro, pero cuya abundancia disminuye significativamente en la poza tratada con el consorcio microbiano formulado y en la cual la abundancia de las especies de este género que fueron incorporadas es mayor en comparación con la abundancia de estas mismas especies en la poza control (Figura 42).

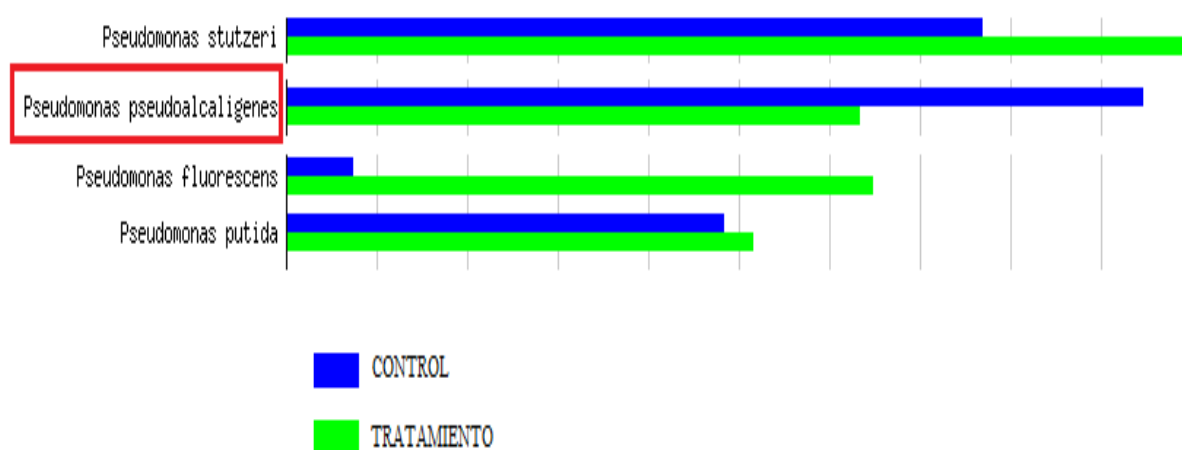


Figura 42 Abundancia relativa de las especies pertenecientes al género *Pseudomonas* en las pozas empleadas para los ensayos de degradación de cianuro.

5. DISCUSION

Muestras de suelo y agua contaminadas con cianuro producto de la actividad minera en la Región La Libertad fueron utilizadas para el estudio de la comunidad microbiana presente en este tipo de ecosistema y el aislamiento de microorganismos nativos, a fin de obtener aquellos capaces de degradar cianuro o sus derivados tóxicos. Las muestras seleccionadas correspondieron a relaves mineros que han estado expuestos a altas concentraciones de cianuro durante la etapa de lixiviación para extracción de oro y plata.

Los ambientes contaminados con cianuro han sido ampliamente estudiados a fin de obtener la información necesaria para la implementación de estrategias de biorremediación (Adams, Komen y Pickett 2001, Akcil y Mudder 2003; Luque-Almagro 2005; Dasha, Gaur y Balomajumderb 2009; Deloya 2012, Luque-Almagro, Moreno-Vivia y Roldán 2016), un factor importante considerado por estos autores es la calidad física-química de las muestras en estudio, siendo característico de éstas las elevadas concentraciones del contaminante y valores de pH extremadamente elevados. Los análisis físico-químicos de las muestras empleadas para el presente estudio poseen concentraciones de cianuro más altas a los límites máximos permisibles estipulados en los Estándares de Calidad Ambiental (ECA) establecidos por la normativa nacional (MINAM 2013) y niveles de pH altamente alcalinos.

En el proceso de extracción artesanal de oro, los suelos son descargados directamente al ambiente, luego del proceso de lixiviación para extraer los minerales contenidos en él, mientras que el agua es almacenada para posteriormente ser recargada con cianuro e incorporarla en un proceso de recirculación para continuar lixivando suelos con mineral, las muestras altamente cargadas con este contaminante que son ineficientemente descargadas al ambiente constituyen un factor de riesgo importante para la estructura de la comunidad existente y la diversidad de las poblaciones microbianas (Baxter y Cummings 2006) y cuyo impacto es pobremente conocido debido a la escasez de herramientas que permitan evaluar el efecto causado por este contaminante y

la búsqueda de estrategias de mitigación. Este vacío de información se observa claramente en los estudios de zonas contaminadas con cianuro, de manera particular en el Perú, lo que ha limitado los estudios y las estrategias de biorremediación.

Numerosos artículos han resaltado la importancia de la metagenómica como una herramienta promisorio para la biorremediación (Cowan y Stafford 2007) (Gabor *et al.* 2007) (George, Bouhajja y Agathos 2011) (Devarapall y Kumavath 2015) y de manera particular al entendimiento de la estructura, interacción y potencial metabólico de las comunidades microbianas degradadoras de cianuros (Wang *et al.* 2015) (Kantor *et al.* 2015) (Luque-Almagro, Moreno-Vivia y Roldán 2016). El presente estudio es el primer reporte en presentar un análisis comparativo de la diversidad bacteriana de zonas contaminadas con cianuro producto de la actividad minera en la región La Libertad – Perú.

A través de un análisis molecular independiente de cultivo, proporcionamos una primera aproximación de recuperación natural de las comunidades microbianas de los suelos a los impactos causados por la actividad minera, específicamente por la contaminación con cianuro. Los resultados muestran que la comunidad microbiana está compuesta principalmente por miembros de los phyla Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Verrucomicrobia y Acidobacteria, este perfil analizado a nivel de phylum es similar al mostrado en otros suelos y ambientes (Rastogi *et al.* 2010) (Huang *et al.* 2011) (Li *et al.* 2014). En general, la variación de la comunidad a través de la recuperación natural siguió una tendencia específica, la cual está representada por el incremento de la abundancia de los diversos niveles taxonómicos analizados a mayor tiempo de rehabilitación.

Independientemente del tiempo de la recuperación de los suelos analizados, en promedio el phylum Proteobacteria es el más abundante, resultado que es consistente con los resultados mostrados en otras investigaciones en las cuales se muestra a este phylum como el más abundante y común en diferentes suelos (Kuffner, *et al.* 2012)(Bastida, *et al.* 2013) (Li, *et al.* 2014).

En el presente estudio, reportamos una alteración significativa en la estructura de la comunidad microbiana, reflejada en la menor abundancia y diversidad de la comunidad bacteriana en las muestras de suelos recientemente impactadas comparados con la abundancia y diversidad de las muestras de suelos con tiempos de recuperación mayores. Resultados similares fueron reportados en estudios de recuperación de suelos tras la finalización de las actividades mineras (Banning, *et al.* 2011) (Li, *et al.* 2014). Estos reportes dejan en claro la complejidad y poco entendimiento de la estructura de la comunidad microbiana, así mismo, nuestros resultados muestran que la comunidad bacteriana de los suelos impactados por cianuro es altamente compleja reflejada en la gran abundancia de los phyla y especies reportadas.

Finalmente, el resultado de nuestro estudio muestra el impacto de las actividades mineras, principalmente la lixiviación con cianuro, en la fertilidad del suelo, reflejado en la disminución de especies, lo que afecta negativamente la estructura, función y estabilidad de la microflora de los suelos, especialmente durante la recuperación natural temprana.

Los microorganismos aislables constituyen solo una fracción minoritaria de la diversidad microbiana global, la cual puede comprender millones de especies, después de un siglo de esfuerzos para mejorar las técnicas de cultivo microbiano, alrededor del 70 - 80% de la diversidad microbiana aún permanece sin cultivar (Rashid y Stingl 2015), en la búsqueda de solución a estos inconvenientes se han desarrollado métodos basados en el secuenciamiento del ADN, dando lugar al nacimiento de un nuevo campo de estudio conocido como metagenómica (Tringe y Rubin 2005). Uno de los objetivos importantes en todos los estudios metagenómicos es poder establecer la estructura de la comunidad microbiana en una muestra, un lugar o un ambiente (Tringe y Rubin 2005) (Kouzuma y Watanabe 2011) (Cowan *et al.* 2015).

Empleando este enfoque se analizaron muestras de suelo y agua contaminados y no contaminados con cianuro, a fin de conocer la composición de las comunidades microbianas e identificar las especies bacterianas

susceptibles a ser cultivadas y empleadas en procesos de biorremediación del cianuro y sus derivados tóxicos. Los miembros del phylum Proteobacteria han sido frecuentemente reportados en estudios de las comunidades microbianas de zonas mineras de oro (Reis *et al.* 2013) (Keshri y Mankazana 2014) y en otros sistemas conteniendo cianuro (Shange *et al.* 2013) (Wang *et al.* 2015).

En las muestras de suelos contaminados con cianuro y empleados para el presente estudio las secuencias bacterianas sin clasificar fueron las más abundantes, representando aproximadamente la mitad de las secuencias identificadas, esto probablemente puede deberse a que estas secuencias pertenecen a bacterias del suelo con genomas que aún no han sido registrados en la base de datos. Por lo tanto esto ofrece una oportunidad de exploración del entorno de los ecosistemas contaminados con cianuro.

Es ampliamente reportado que miembros del phylum Proteobacteria son frecuentemente encontrados en suelos de diferentes tipos de minas (Moreels, *et al.* 2008) (Khan, *et al.* 2013) (Li, *et al.* 2014), así mismo, el phylum Firmicutes es uno de los grupos bacterianos más comunes en ambientes extremos, ya que muchos de sus miembros tiene la capacidad de tolerar una amplia gama de condiciones desfavorables (Khan, *et al.* 2013). Los resultados del presente estudio mostrarán que los phyla Proteobacteria y Firmicutes fueron los más abundantes en muestras de suelos contaminados con cianuro.

Los resultados metagenómicos muestran que el género más abundante en este tipo de muestras es *Pseudomonas*, el cual alberga especies distribuidas en diversos hábitats, incluyendo zonas ricas en nutrientes y han sido particularmente reportadas por su capacidad de degradar una gran variedad de moléculas orgánicas complejas (Horner-Devine, Carney y Bohannon 2004) (Devarapall y Kumavath 2015). En el presente estudio mostramos que el género *Pseudomonas* es uno de los principales géneros identificados y representa el mayor porcentaje de abundancia en muestras de suelo expuesto al cianuro, siendo además frecuentemente reportado como uno de los géneros bacterianos

más fácilmente aislables en suelos contaminados con cianuro (Akcil, *et al.* 2003) (Luque-Almagro 2005) (Grigor'eva *et al.* 2008) (Parmar *et al.* 2012)

Una de las claves para una rápida y satisfactoria biorremediación es la estimulación específica de los microorganismos de rápido crecimiento y degradadores de cianuro que se encuentran naturalmente presente en zonas contaminadas (Fang, Liang y Li 2013) y con el fin de tener éxito, se necesita un mejor entendimiento de la ecología de las comunidades microbiana que habitan estos lugares, así como la comprensión de las interacciones intra e inter específicas y las que estos tienen con su entorno (Rittman *et al.* 2006) (George, Bouhajja y Agathos 2011). En la búsqueda de la comprensión de estas interacciones los suelos contaminados con cianuro fueron sometidos a co-cultivo, mostrando que aproximadamente el 30% de la población microbiana total puede ser aislable en medio de cultivo, especialmente especies del género *Pseudomonas* y que han sido reportadas por su capacidad de crecer en co-cultivo interactuando estratégicamente en el tratamiento de altas concentraciones de cianuro de plantas metalúrgicas (Grigor'eva *et al.*, 2008).

Otro género bacteriano identificado como más abundante en muestras de suelos contaminados y co-cultivados fue *Bacillus*, el cual también posee miembros que han sido aislados de zonas contaminadas y con la capacidad de degradar el cianuro (Meyers *et al.* 1991) (Arutchelvan *et al.* 2005) (Perumal, Prabakaran y Kamaraj 2013) (Nwokoro y Uju Dibua 2014). Estos resultados nos permitieron enfocar el diseño de nuestra estrategia de biorremediación a la estimulación de las principales especies identificadas mediante los análisis metagenómicos realizados de las muestras contaminadas.

Es ampliamente conocido que la mayoría de bacterias que habitan sistemas contaminados son capaces de desarrollar varios tipos de mecanismos para adaptarse y resistir a la toxicidad de estos contaminantes; otro factor de importancia para la adaptación de los microorganismos a ambientes hostiles es el pH, cuando este es superior a 9 normalmente el crecimiento bacteriano es restringido a aquellos organismos conocidos como alcalófilos (Neilson y Allard

2013). En las muestras de agua contaminada con cianuro empleadas en este estudio y cuya característica principal después de la elevada concentración de cianuro fue su alcalinidad, se pudo observar que la diversidad microbiana de esta muestra está representada por el género *Alkalibacterium*, un género bacteriano que alberga cepas categorizadas como bacterias ácido lácticas alcalófilas halófilas y que han sido ampliamente reportadas por su habilidad de crecer en ambientes hostiles (Yumoto, Hirota y Nakajima 2014) y posiblemente sea este el primer reporte de la presencia de especies de este género en muestras de agua alcalina empleada en minería y con elevada concentración cianuro.

Una ventaja de utilizar microorganismos nativos de sitios contaminados es que éstos ya están adaptados tanto al contaminante así como al entorno complicado; por lo tanto, tienen la capacidad de hacer frente a las propiedades físicas y químicas de los tóxicos que les rodean. A pesar de su toxicidad el cianuro es un compuesto natural ampliamente usado por muchos microorganismos (Akcil *et al.* 2003) (Ebbs *et al.* 2006) (Tekere *et al.* 2011) y probablemente su participación en el origen de la vida (Dzombak, Ghosh y Wong-Chong 2006) ha posibilitado el desarrollo de mecanismos de tolerancia y vías de asimilación en algunos microorganismos.

La capacidad de degradación de cianuro presentado por algunos hongos y bacterias ha sido ampliamente estudiada con fines de bioremediación (Ingvorsen, Godtfredsen y Hojer-Pedersen 1991) (Luque-Almagro 2005) (Akcil *et al.* 2003) (Meyer 2010) (Tekere *et al.* 2011) (Nwokoro y Uju Dibua 2014) (Sujatha Kandasamy *et al.* 2015) y de manera particular, en especies bacterianas cultivables pertenecientes a los géneros aislados y reportados con mayor abundancia en el presente estudio.

Diversos factores ambientales afectan el crecimiento y metabolismo de los microorganismos, los cuales presentan un rango de tolerancia a estos factores, sin embargo, cuando las condiciones ambientales están más allá de este rango, la degradación de contaminantes es significativamente menos eficaz y a veces

puede afectar la supervivencia de estos en el medio (Shumei, Xilong y Chunyan 2013).

Los factores que intervienen en el proceso de biorremediación son variados, y entre los más importantes para la biorremediación del cianuro se encuentran el pH, la temperatura y la concentración del cianuro (Akciil, Mudder 2003) (Baxter y Cummings 2006) (Gupta, Balomajumder y Agarwal 2010) (Deloya 2012) (Shumei, Xilong y Chunyan 2013).

Los mecanismos de biodegradación del cianuro en los diferentes microorganismos se basan en su capacidad de tolerar este contaminante. Cuando la concentración de cianuro se incrementa la fase latencia puede extenderse y disminuir la tasa de biodegradación o en última instancia inhibir completamente el crecimiento celular (Tuya 2014). Los resultados de la presente investigación mostraron que una concentración de 50mg/L de cianuro es óptima para el crecimiento de las cepas seleccionada; sin embargo, estas cepas presentaron crecimiento a concentraciones de hasta 200mg/L con lo cual el consorcio demostró tener la capacidad de degradar cianuro, en concentraciones mayores a las reportadas en trabajos similares (Hurtado y Berastain 2012) (Tuya 2014).

Existe un gran número de reportes de la tolerancia de diversos microorganismos al cianuro. Luque-Almagro (2005) reporta que *Pseudomona pseudoalcaligenes* podría crecer en concentraciones de hasta 780 mg/L; concentraciones mucho mayores a las reportadas por (Boucabeille, Ollivier y Michael 1994) para un consorcio formado por *Pseudomonas spp.*, sin embargo, existen especies bacterianas que pueden crecer a concentraciones de hasta 1200mg/L, pero que tienen un crecimiento óptimo alrededor de 350mg/L (Khamar, Makhdoumi-Kakhki y Mahmudy Gharaie 2015).

Así mismo; Mekuto, Jackson y Ntwampe (2013) reportaron la capacidad de un consorcio bacteriano dominado por especies del género *Bacillus* de soportar concentraciones de hasta 400mg/L de cianuro. Sin embargo, la tolerancia a las

concentraciones más altas de cianuro han sido reportadas para *Alcaligenes xylosoxidans* subsp. *dinitrificans* (Ingvorsen, Godtfredsen y Hojer-Pedersen 1991).

El pH es un factor clave para la degradación de compuestos cianurados, en soluciones con $\text{pH} < 9.2$ el cianuro tiende a volatilizarse y perderse como cianuro libre en la forma de ácido cianhídrico (HCN) tóxico (Khamar, Makhdoumi-Kakhki y Mahmudy Gharaie 2015); aunque el HCN puede ser asimilado y degradado por algunos microorganismos, resulta poco claro establecer si la disminución ocurre por acción de los microorganismos o por pérdida a través de volatilización (Luque-Almagro 2005) muchas investigaciones orientadas a la bioremediación de cianuro se han realizado en pH cercanos a la neutralidad (Dursun y Aksu 2000) (Kao *et al.* 2003) (Chen, Kao y Chen 2008), sin embargo, existen algunos reportes de degradación de cianuro por diferentes microorganismos a pH alcalinos (Adjei y Ohta 2000) (Luque-Almagro 2005) (Gurbuz, Ciftci y Akcil 2009) (Huertas *et al.* 2010) (Mirzadeh, Yaghmaei y Nejad 2014) (Tuya 2014) (Morillo y Guevara 2015) (Razanamahandry *et al.* 2016). Todas las cepas seleccionadas mostraron mejores tasas de crecimiento y degradación del cianuro cuando el rango de pH se mantuvo entre 9.5 – 10.5. Los altos niveles de tolerancia a las condiciones alcalinas pueden explicarse a los elevados valores de pH que presentaba las muestras de donde estos microorganismos fueron aislados, representando una ventaja frente a la implementación de procesos de bioremediación alcalinos, a fin de evitar tratamientos adicionales de reducción del pH a niveles neutrales y así evitar la emisión de HCN al medio.

La temperatura es otro de los factores claves para la degradación de cianuro, ya que la mayoría de bacterias mesófilas productoras de enzimas degradadoras/asimiladoras de cianuro tienen una temperatura óptima de crecimiento entre 20 – 40°C (Dursun y Aksu 2000) (Akcil *et al.* 2003) (Luque-Almagro 2005) (Shumei, Xilong y Chunyan 2013) (Tuya 2014). Todas las cepas seleccionadas presentaron mejores tasas de crecimiento en el rango de 25°C a 30°C, el cual coincide con el rango de crecimiento reportado por Khamar,

Makhdoumi-Kakhki y Mahmudy Gharai (2015) para un co-cultivo conformado por dos especies de bacterias aisladas de muestras de tanques de relaves de minería de oro contaminados con cianuro.

El efecto del tamaños de inóculo también fue investigado como uno de los parámetros claves para el adecuado crecimiento de los microorganismos y la eficiencia en la degradación de cianuro, existen muchos reportes en los cuales el tamaño del inóculo empleado para una eficiente degradación de cianuro es del 10% (v/v) (Akci *et al.* 2003) (Huertas *et al.* 2010) (Tuya 2014), sin embargo, en el presente estudio las cepas seleccionadas presentan mayor eficiencia de degradación cuando 2.5% (v/v) es empleado como volumen de inóculo. Morillo y Guevara 2015 reportan el uso de un inóculo de 4% de un cultivo de *Pseudomonas sp.* para desarrollar ensayos de degradación de cianuro. En trabajos como los de (Ingvorsen, Godtfredsen y Hojer-Pedersen 1991) y (Baxter y Cummings 2006) un volumen de inóculo de 2% (v/v) fue suficiente para una eficiente degradación de cianuro.

La transformación biológica involucra la degradación y asimilación de cianuro en la forma de aminoácidos, tiocianato, beta-cianoalanina y vitaminas por los microorganismos y plantas (Baxter y Cummings 2006) (Ebbs *et al.* 2006) (Gupta, Balomajumder y Agarwal 2010). Los microorganismos que degradan cianuro poseen varios sistemas enzimáticos y condiciones específicas tipo pH, temperatura, concentración de cianuro, etc. que les permiten establecerse y desarrollarse en ambientes con alta concentración de cianuro. Varias investigaciones han descrito varios organismos que usan diferentes vías para la degradación de cianuro (Gupta, Balomajumder y Agarwal 2010). Algunas veces más de una vía puede ser usada para degradar cianuro por el mismo microorganismo. Generalmente cinco vías han sido enlistadas para la biodegradación de cianuro, de las cuales tres son vías de degradación en donde las enzimas catalizan la conversión de cianuro a moléculas orgánicas e inorgánicas simples, las que posteriormente se convierten a amonio, metano, CO₂, ácido fórmico y ácido carboxílico, las otras dos vías son para la asimilación

del cianuro como fuente de nitrógeno y carbono (Gupta, Balomajumder y Agarwal 2010) (Hernández 2010). Se diseñaron cebadores específicos para algunos genes degradadores de cianuro involucrados en las diferentes vías metabólicas. Con el objetivo de identificar mediante PCR los genes que codifican las enzimas degradadoras a partir de las secuencias consenso. Los resultados mostraron amplificaciones positivas en dos cepas del género *Pseudomonas*, los iniciadores Chy diseñados para amplificar el gen que codifica para la enzima cianuro-hidratasa o cianidasa mostraron un 98% de identidad con la secuencia del gen para una enzima degradadora de cianuro en una cepa del género *Pseudomonas*, esta cepa fue identificada como *Pseudomonas stutzeri* y ha sido ampliamente reportada por poseer actividad degradadora de cianuro en el cual la principal enzima involucrada es la identificada en el presente estudio (Gupta, Balomajumder y Agarwal 2010) (Meyer 2010) (Crum *et al.* 2015).

La utilización de iniciadores diseñados para la identificación de las enzimas involucradas en la degradación de cianuro en un amplio número de taxones permitió identificar con 98% de similitud la presencia de la secuencia del gen *cynB* de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* en una de las cepas aisladas perteneciente al género *Pseudomonas*. El gen *cynB* en *P. pseudoalcaligenes* ha sido reportado por pertenecer al grupo de genes *cyn*, el cual codifica para una proteína de membrana que en algunas especies de *Pseudomonas* está involucrada en el transporte de nitritos, sulfanatos, bicarbonatos y del cianato (Luque-Alamago *et al.* 2008), la presencia de un miembro del conjunto de genes *cyn* refleja la capacidad de un microorganismo para ser un candidato para la degradación de algún compuesto cianurado tal como es el caso del cianato reportado ampliamente en diferentes organismos (Sung y Fuchs 1988) (Carepo *et al.* 2004) (Kamennaya y Post 2011).

La caracterización por perfiles de masa mediante la técnica de MALDI-TOF ha venido demostrando en los últimos años su gran capacidad para ser empleada en los laboratorios de microbiología, principalmente en el área clínica (Carbonnelle *et al.* 2011) (Lavigne *et al.* 2013). Sin embargo, esta técnica ha sido

empleada para caracterizar microorganismos ambientales como *Pseudomonas*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, entre otros, los cuales fueron aislados de agua de mar, ambientes contaminados y plantas infectadas (Lebedev 2013). Asimismo, se reconoce la ventaja de obtener información complementaria a la obtenida mediante la secuenciación del gen ARNr 16S, generándose una huella digital química para los microorganismos aislados (Mellmann *et al.* 2008). La espectrometría de masas es en la actualidad empleada en la ciencia analítica para determinar la presencia de moléculas exactas en una muestra en particular, este enfoque biofísico ha tenido amplio impacto sobre la biotecnología ambiental para evaluar la presencia de contaminantes o sustratos, monitoreo de sus variaciones, procesos de caracterización biológicos de interés biotecnológico, además de la interacción y fisiología de los microorganismos (Armengaud *et al.* 2012; Armengaud 2016).

Existen algunos reportes de análisis proteómico de extractos celulares de organismos degradadores de cianuro (Jandhyala *et al.* 2003) (Luque-Almagro, Moreno-Vivia y Roldán 2016) (Huertas *et al.* 2006) así como de los enfocados a entender la respuesta fisiológica de la degradación de cianuro (Tang *et al.* 2010) (Chen *et al.* 2011). En el presente estudio se empleó el enfoque proteómico para la identificación de las enzimas involucradas en las diversas vías de degradación de cianuro y sus derivados tóxicos, logrando identificar con 99% de confianza un fragmento de 11 aminoácidos correspondiente a la enzima cianidasa en la cepa identificada como *Pseudomonas stutzeri* (Watanabe, Yano y Ikebukuro 1998) (Gupta, Balomajumder y Agarwal 2010); además, esta secuencia mostró 98% de similitud con la secuencia de una enzima degradadora de cianuro presente en *Pseudomonas stutzeri* y reportada en la base de datos de proteínas. Estos resultados corresponden al primer reporte de la presencia de enzimas degradadoras de cianuro en el medio de cultivo suplementado con cianuro como fuente de nitrógeno.

Varias vías enzimáticas han sido reportadas para la degradación de cianuro (Gupta, Balomajumder y Agarwal 2010) existen microorganismos especializados

que pueden degradar cianuro empleando más de una vía enzimática haciendo más eficiente el proceso de degradación (Mufaddal y Lynch 2012). Los consorcios microbianos se han perfilado como una alternativa óptima para la biodegradación de diversos compuestos, esto debido al alto grado de comunicación e interacción que se da entre sus miembros, permitiéndoles soportar fluctuaciones del medio ambiente y el potenciamiento de las diferentes habilidades metabólicas de cada uno de las especies que este alberga (Brenner, You y Arnold 2008). La formulación del consorcio degradador de cianuro constituido por 8 cepas agrupadas en 3 géneros bacterianos, mostró la capacidad de degradar el cianuro presente en el medio de manera más eficiente, el cual fue reflejado en el incremento de la biomasa microbiana en los medios de cultivo y la disminución del contaminante.

Los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Alcaligenes* han sido reportados por presentar diversa especies bacterianas con capacidad de degradar diversos compuestos cianurados. Meyer (2010) logró reducir el 98% del cianuro presente en el medio empleando un consorcio microbiano constituido por especies del género *Bacillus*; de la misma manera, Nwokoro y Uju Dibua (2014) formularon un consorcio empleando *Pseudomonas stutzeri* y *Bacillus subtilis* el cual redujo el 88.5% del cianuro presente en muestras de suelo, un nivel superior al reportado en ensayos empleando las cepas individuales 72% y 66.9% para *Pseudomonas* y *Bacillus* respectivamente. Estos resultados son similares a los obtenidos en el presente estudio; en el cual, la eficiencia de degradación del cianuro es mayor cuando los microorganismos son cultivados en consorcio frente a la eficiencia de degradación de las cepas individuales, lo que ratifica que la asociación microbiana permite remover en mayor porcentaje la concentración del contaminante.

Los ensayos de degradación en laboratorio mostraron la capacidad del consorcio formulado para degradar en promedio el 97% del cianuro presente en el medio en aproximadamente una semana y a diferentes concentraciones del contaminante, a nivel de laboratorio y de aproximadamente el 99% en

aproximadamente 20 días de tratamiento en pruebas en campo, estos resultados son similares a los mostrados por (Deloya 2012) en el cual la reducción del cianuro en aproximadamente 95% se obtuvo en 15 días de ensayos, la estrategia de biorremediación de la investigación de (Deloya 2012) se basó en la capacidad de adaptación de los microorganismos al contaminante, el cual fue observado en la tercera generación. En la presente investigación se empleó la estrategia de bioenriquecer los tratamientos con la incorporación de tres inóculos consecutivos cada 24 horas, permitiendo con esto la obtención de microorganismos más fuertes y más eficientes para la remoción del cianuro, lo cual fue corroborado con el monitoreo metagenómico del proceso de biorremediación, en el cual se observa la estabilidad de la comunidad microbiana constituyente del consorcio en el 5 día de tratamiento.

La mayoría de trabajos sobre biodegradación del cianuro han sido realizados en condiciones de cultivo con pH cercanos a la neutralidad y empleando glucosa como fuentes de carbono. Sin embargo, estas condiciones pueden sobrevalorar el rendimiento del proceso degradativo ya que en soluciones con $\text{pH} < 9,2$ el cianuro tiende a volatilizarse y perderse en forma de HCN gaseoso (Dzombak, Ghosh y Wong-Chong 2006). Aunque el HCN puede ser asimilado y degradado por algunos microorganismos, resulta casi imposible establecer si la disminución de la concentración de cianuro ocurre por acción de metabolismo microbiano o por volatilización (Luque-Almagro 2005). En trabajos como los de (Meyers *et al.* 1991), (Akci y Mudder 2003) (Luque-Almagro 2005) (Tuya 2014) y el presente, se emplean microorganismos capaces de degradar el cianuro en condiciones alcalinas ($\text{pH} > 9,5$), para nuestro caso tanto en los ensayos de laboratorio y campo. La ventaja de usar microorganismos alcalófilos en procesos de biodegradación del cianuro es que los efluentes no requieren de un tratamiento previo para reducir sus valores de pH. El mantenimiento de las condiciones permitieron la obtención de resultados favorables tanto en ensayos en laboratorio como campo.

Por último, el presente trabajo constituye el primer reporte del éxito del proceso de biorremediación del cianuro en ensayos *in situ*; sin embargo, existen muchos factores que pueden haber restado eficiencia al proceso de biorremediación, ya que la concentración de compuestos de cianuro en el suelo y el agua tiene un impacto importante en la degradación microbiana (Dasha, Gaur y Balomajumderb 2009). Akcil *et al.* (2003), reportaron que la velocidad de degradación de cianuro a diferentes concentraciones por miembros del género *Pseudomonas* fue significativamente diferente cuando se empleó aguas residuales como material a tratar, lo cual hace vital el potenciamiento del consorcio degradador formulado para la optimización de la eficiencia y rapidez de la biorremediación del cianuro en diferentes sustratos y bajo diferentes condiciones, especialmente las presentadas en campo.

6. CONCLUSIONES

La variación de la estructura de la comunidad bacteriana de suelos contaminados con cianuro evaluada durante un proceso de biorremediación natural está directamente relacionada con el tiempo de recuperación de los suelos.

Se lograron aislar 89 cepas microbianas 77 bacterianas y 12 fúngicas procedentes de ambientes contaminados con cianuro.

Las cepas bacterianas mostraron mayores ventajas para su implementación en procesos de biorremediación, de las cuales 32 fueron seleccionadas por su capacidad de tolerar y asimilar el cianuro.

Se formularon tres consorcios bacterianos, de los cuales el consorcio denominado **CBCN002** y conformado por 8 cepas pertenecientes a 3 géneros bacterianos mostró mayor eficiencia para degradar cianuro bajo diferentes condiciones.

Se logró reducir aproximadamente el 97% del cianuro presente en ensayos de degradación a nivel de laboratorio y el 99% del cianuro presente en pozas de lixiviación en ensayos en campo, logrando llevar las concentraciones del cianuro, en ambos casos, por debajo de los límites máximos permisibles estipulados por la normativa nacional.

Por lo cual, los tres grupos aislados de microorganismos *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Alcaligenes* tanto individualmente así como en consorcios pueden desempeñar un papel vital en la biorremediación de sitios contaminados con cianuro producto de la actividad de extracción de oro y plata.

7. RECOMENDACIONES

Los análisis metagenómicos realizados en la presente investigación nos permitieron tener una idea inicial de la diversidad microbiana en ambientes contaminados con cianuro; sin embargo, es necesario desarrollar estudios dirigidos a explorar la diversidad genética y funcionalidad de estos ambientes, permitiendo así, no sólo la reconstrucción de los genomas microbianos, si no también proporcionar conocimiento de la estructura y el potencial metabólico de esta compleja comunidad.

Cada microorganismo presente en el consorcio formulado juega un papel vital en el proceso de degradación de cianuro, sin embargo, los mecanismos de cómo lo realizan es aún desconocido; por lo cual, la exploración del genoma completo de estos microorganismos se hace necesario a fin de conocer no sólo los genes involucrados en la asimilación y resistencia al cianuro en estas especies, sino también el descubrimiento de genes con otros potenciales biotecnológicos; lo cual sumado a análisis transcriptómicos y proteómicos permitirá establecer la base de los mapas metabólicos de estos microorganismos, a fin de predecir la fisiología y potencial metabólico de de estos para su aplicación en procesos de biorremediación de cianuro.

Finalmente, esta investigación refleja la habilidad de un consorcio bacteriano con la capacidad de degradar cianuro tanto en laboratorio como campo. Futuros estudios son necesarios para examinar la habilidad de este consorcio para degradar este contaminante bajo condiciones ambientales. Si los experimentos a escala piloto continúan demostrando la habilidad de este consorcio en el tratamiento de residuos cianurados, se debe desarrollar un estudio a gran escala para determinar la viabilidad técnica y económica del proceso de biorremediación.

8. BIBLIOGRAFÍA (Listado en orden de citación)

- Adams, DJ, J Van Komen, y TM Pickett. 2001. «Biological cyanide degradation» *Applied Bioscience Corporation*. Disponible en: http://www.inotec.us/uploads/5/1/2/8/5128573/tms-cn_paper.pdf
- Adjei, M, y Y Ohta. 2000. «Factors Affecting the Biodegradation of Cyanide by Burkholderia cepacia Strain C-3» *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 89(3):271-277. DOI: 10.1016/S1389-1723(00)88833-7
- Akcil, A, A.G. Karahan, H. Ciftci, y O Sagdic. 2003. «Biological treatment of cyanide by natural isolated bacteria (*Pseudomonas sp.*)» *Minerals Engineering* 16:643–649.
- Akcil, A, y Mudder, Terry. 2003. «Microbial destruction of cyanide wastes in gold mining: process review.» *Biotechnology Letters* 25:445–450.
- Álvarez, R, A Ordóñez, T Martínéz, J Loredó, F Pendás, y P Younger. 2004. «Passive Treatment for the Removal of Residual Cyanide in Drainage from Closed Gold Mine Tailing Ponds.» *Mine Water* 1:35-42.
- Armengaud, J, J Christie-Oleza, G Clair, V Malard, y K Duport. 2012. «Exoproteomics: exploring the world around biological systems» *Expert Rev. Proteomics*, 9(5):561–575. DOI: 10.1586/epr.12.52.
- Armengaud, J. 2016. «Next-generation proteomics faces new challenges in environmental biotechnology» *Curr Opin Biotechnol* 38:174-182. DOI: 10.1016/j.copbio.2016.02.025.
- Arutchelvan, V, R Elangovan, K Venkatesh, y S Nagarajan. 2005. «Biodegradation of cyanide using *Bacillus Megaterium*.» *Jr. of Industrial Pollution Control*, 247- 254.

- Banning, NC, DB Gleeson, AH Grigg, CD Grant, GL Andersen, EL Brodie, y D.V. Murphy. 2011. «Soil microbial community successional patterns during forest ecosystem restoration» *Appl Environ Microbiol* 77, 6158–6164.
- Bastida, F, T Hernández, J Albaladejo, y C García. 2013. «Phylogenetic and functional changes in the microbial community of long-term restored soils under semiarid climate.» *Soil Biol Biochem* 65, 12–21.
- Baxter, J, y S Cummings. 2006. «The impact of bioaugmentation on metal cyanide degradation and soil bacteria community structure» *Biodegradation* 17(3):207–217.
- Bhalla, T.C, A Miura, A Wakamoto, Y Ohba, y K Furuhashi. 1992. «Symmetric hydrolysis of α -aminonitriles to optically active amino acids by a nitrilase of *Rhodococcus rhodochrous* PA-34,» *Appl. Microbiol. Biotechnol* 37(2):184–190.
- Boucabeille, C, P Ollivier, y G Michael. 1994. «Microbial degradation of metal complexed cyanides and thiocyanate from mining wastewaters» *Environmental Pollution* 84(1):1994: 59-67.
- Brandao, P, JP Clapp, y A Bull. 2003. «Diversity of Nitrile Hydratase and Amidase Enzyme Genes in *Rhodococcus erythropolis* Recovered from Geographically Distinct Habitats» *Applied and Environmental Microbiology* 69(10):5754–5766. DOI: 10.1128/AEM.69.10.5754-5766.2003
- Brenner, K, L You, y FH Arnold. 2008. «Engineering microbial consortia: a new frontier in synthetic biology» *Trends Biotechnol* 26(9):483-489. DOI: 10.1016/j.tibtech.2008.05.004.
- Caporaso, JG, CL Lauber, WA Walters, D Berg-Lyons, CA Lozupone, y PJ et al Turnbaugh. 2011. «Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample» *PNAS*, 4516-4522. DOI: 10.1073/pnas.1000080107

- Carbonnelle, E, et al. 2011. «MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory» *Clinical Biochemistry*, 44(1):104–109. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2010.06.017.
- Carepo, M, J Nina de Azevedo, J Porto, A Bentes-Sousa, J da Silva Batista, y A Da Silva. 2004. «Identification of *Chromobacterium violaceum* genes with potential biotechnological application in environmental detoxification» *Genetic and Molecular Research* 3(1):181-194
- Chen, CY, CM Kao, y SC Chen. 2008. «Application of *Klebsiella oxytoca* immobilized cells on the treatment of cyanide wastewater.» *Chemosphere* 71(1):133–139.
- Chen, W, T Tang, Y Hseu, Ch Chen, K Huang, y S Chen. 2011. «A proteome analysis of the tetracyanonickelate (II) responses in *Klebsiella oxytoca*» *Environmental Microbiology Reports*, 3(1):106-111. DOI: 10.1111/j.1758-2229.2010.00194.x.
- Coffey, L, A Clarke, P Duggan, K Tambling, S Horgan, D Dowling, C O'Reilly. 2009. «Isolation of identical nitrilase genes from multiple bacterial strains and real-time PCR detection of the genes from soils provides evidence of horizontal gene transfer» *Arch Microbiol* 191(10):761–771. DOI: 10.1007/s00203-009-0507-6.
- CONCEPTOAZUL. 2013. «Standardization of a protocol for extracting genomic DNA direct soil» Guayaquil.
- Cowan, D, y W Stafford. 2007. «Metagenomic methods for the identification of active micro-organisms and genes in biodegradation processes». Ch. 58 in *ASM Manual of Environmental Microbiology*, 3rd Edition, ed by CJ Hurst, et al. Washington, DC: American Society for Microbiology
- Cowan, DA, J-B Ramond, TP Makhalanyane, y P De Maayer. 2015. «Metagenomics of extreme environments» *Current Opinion in Microbiology*, 97-102.

- Crum, M, J Park, A Mulelu, T Sewell, y M Benedik. 2015. «Probing C-terminal interactions of the *Pseudomonas stutzeri* cyanide-degrading CynD protein» *Applied Genetics and Molecular Biotechnology* 99(7):3093–3102. DOI: 10.1007/s00253-014-6335-x.
- Dasha, R, A Gaur, y C Balomajumder. 2009. «Cyanide in industrial wastewaters and its removal: A review on biotreatment» *Journal of Hazardous Materials* 163(1):1–11. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2008.06.051
- Deloya, A. 2012. «Tratamiento de desechos del cianuro por bioremediación» *Tecnología en Marcha* 25: 61-72.
- DeSantis, TZ, P Hugenholtz, N Larsen, M Rojas, EL Brodie, K Keller, T Huber, D Dalevi, P Hu, GL Andersen. 2006. «Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB» *Applied and Environmental Microbiology* 72(7):5069-5072.
- Devarapall, P, y RN Kumavath. 2015. «Metagenomics — A Technological Drift in Bioremediation» En *Advances in Bioremediation of Wastewater and Polluted Soil*, de Naofuni Shiomi, 73-91. Copyright. DOI: 10.5772/60749
- Dumestre, A, T Chone, J Portal, M Gerard, y J, Berthelin. 1997. «Cyanide Degradation under Alkaline Conditions by a Strain of *Fusarium solani* Isolated from Contaminated Soils.» *Applied and Environmental Microbiology* 63:2729–2734.
- Dursun, A, y Z Aksu. 2000. «Biodegradation kinetics of ferrous(II) cyanide complexes by immobilized *Pseudomonas fluorescens* in a packed bed column reactor» *Process Biochemistry* 35(6):615–622. DOI:10.1016/S0032-9592(99)00110-7
- Dzombak, David, Rajat Ghosh, y George Wong-Chong. 2006. *CYANIDE in WATER and SOIL Chemistry, Risk, and Management*. New York: Taylor & Francis Group.

- Ebbs, S, G Wong-Chong, B Bond, J Bushey, y E Nauhauser. 2006. «Biological Transformation of Cyanide in Water and Soil.» En *CYANIDE in WATER and SOIL Chemistry, Risk, and Management*, de D Dzombak y R y Wong-Chong, G Ghosh, 93-121. New York: Taylor & Francis Group.
- Evans, Gareth., y Judith Furlong. 2011. *Environmental Biotechnology: theory and applications*. Segunda edición. UK: Wiley-Blackwell.
- Fang, S, X Liang, y Ch Li. 2013. «Bioremediation of Cyanide Contamination and Its Applications» *Biotechnology Bulletin*, 0(8):36-42.
- Fernandez, R, E Dolgih, y DA Kunz. 2004. «Enzymatic Assimilation of Cyanide via Pterin-Dependent Oxygenolytic Cleavage to Ammonia and Formate in *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764.» *Applied and Environmental Microbiology*, 121-128.
- Gabor, E, K Liebeton, F Niehaus, J Eck, y P Lorenz. 2007. «Updating the metagenomics toolbox» *Biotechnology Journal* 2(2):201–206. DOI: 10.1002/biot.200600250
- Gantzer, C.J, y W.J. Maier. 1988. «*Biological degradation of cyanide by nitrogen-fixing cyanobacteria*». Cincinnati: hazardous waste engineering research laboratory.
- George, IF, E Bouhajja, y SN Agathos. 2011. «Metagenomics for Bioremediation.» En *Comprehensive Biotechnology*, de M Moo-Young, 47-57. Amsterdam: Elsevier.
- Gong, JS, ZM Lu, H Li, ZM Zhou, JS Shi, y ZH Xu. 2013. «Metagenomic technology and genome mining: emerging areas for exploring novel nitrilases.» *Appl Microbiol Biotechnol* 97(15):6603–6611. DOI: 10.1007/s00253-013-4932-8.
- Grigor'eva, N, Yu Smirnova, S Terekhova, y G Karavaiko. 2008. «Isolation of an Aboriginal Bacterial Community Capable of Utilizing Cyanide, Thiocyanate,

- and Ammonia from Metallurgical Plant Wastewater» *Applied Biochemistry and Microbiology* 44(5):554–558.
- Gupta, N, Chandrajit Balomajumder, y V.K. Agarwal. 2010. «Enzymatic mechanism and biochemistry for cyanide degradation: A review.» *Journal of Hazardous Materials*, 1–13.
- Gurbuz, F, H Ciftci, y A Akcil. 2009. «Biodegradation of cyanide containing effluents by *Scenedesmus obliquus*» *Journal of Hazardous Materials* 162(1): 74-79. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2009.11.038. DOI:
- Harper, D.B. 1977. «*Microbial metabolism of aromatic nitriles: Enzymology of C–N cleavage by Nocardia sp. NCIB 11216*» *J. Biochemical* 165(2):309–319.
- Hernández, L. 2010. *EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE UN AISLADO BACTERIANO NATIVO DE PSEUDOMONAS SP. COMO POTENCIAL DEGRADADOR DE COMPUESTOS CIANURADOS*. Tesis de Maestría en Biotecnología, Medellín : Universidad Nacional de Colombia.
- Hoffmann, E, y V Stroobant. 2007. *Mass Spectrometry principles and applications*. Tercera edición. England: John Wiley & Sons Ltd.
- Horner-Devine, M, K Carney, y B Bohannan. 2004. «An ecological perspective on bacterial biodiversity» *Proceeding Biological Science. R Soc Lond*, 271(1535):113–122.
- Huang, LN, WH Zhou, KB Hallberg, CY Wan, Li J, y WS Shu. 2011.«Spatial and temporal analysis of the microbial community in the tailings of a Pb-Zn mine generating acidic drainage» *Appl Environ Microbiol* 77(15):5540–5544. DOI: 10.1128/AEM.02458-10
- Huertas, M, VM, Luque-Almagro, M. Martínez-Luque, R. Blasco, C. Moreno-Vivián, F. Castillo, y M.D, Roldán. 2006. «Cyanide metabolism of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344: role of siderophores.» *Biochemical Society Transactions* 34:152-155.

- Huertas, M.J, LP Sáez, MD Roldán, VM Luque-Almagro, M Martínez-Luque, R Blasco, F Castillo, *et al.* 2010. «Alkaline cyanide degradation by *Pseudomonas psuedoalcaligenes* CECT5344 in a batch reactor: Influence of pH» *Journal of Hazardous Materials*: 72-78.
- Hurtado, J, y B Berastain. 2012. «Optimización de la biorremediación en relaves de cianuración adicionando nutrientes y microorganismos» *Revista Peruana de Biología*, 187 - 192.
- ICMI. 2014. «Cyanidecode.» *Cyanidecode*. Disponible en: <http://www.cyanidecode.org/> (último acceso: 3 de 3 de 2016).
- Ingvorsen, K, S Godtfredsen, y B Hojer-Pedersen. 1991. «Novel cyanide-hydrolyzing enzyme from *Alcaligenes xylosoxidans* subsp. *denitrifans* .» *Applied & Environmental Microbiology*, 1783-1789.
- Jandhyala, D, M Berman, P Meyers, T Sewell, R Willson, y M Benedik. 2003. «CynD, the Cyanide Dihydratase from *Bacillus pumilus*: Gene Cloning and Structural Studies» *Applied and environmental Microbiology*, 69(8):4794-4805.
- Kamennaya, N, y A Post. 2011. «Characterization of Cyanate Metabolism in Marine *Synechococcus* and *Prochlorococcus* spp.» *Appl Environ Microbiol*, 77(1):291–301. DOI: 10.1128/AEM.01272-10
- Kantor, S, W van Zyl, P van Hill, B Thoma, S Harrison, y J Banfield. 2015. «Bioreactor microbial ecosystems for thiocyanate and cyanide degradation unravelled with genome-resolved metagenomics» *Environmental microbiology* 17(12):4929–4941. DOI: 10.1111/1462-2920.12936.
- Kao, C.M., J.K. Liu, H.R. Lou, C.S. Lin, y S.C. Chen. 2003. «Biotransformation of cyanide to methane and ammonia by *Klebsiella oxytoca*» *Chemosphere* 50(8):1055–1061. DOI:10.1016/S0045-6535(02)00624-0

- Keegan, K, E Glass, y F Meyer. 2016. «MG-RAST, a Metagenomics Service for Analysis of Microbial Community Structure and Function» *Microbial Environmental Genomics (MEG)*, 207-233.
- Keshri, J, y B Mankazana. 2014. «Profile of bacterial communities in South African mine-water samples using Illumina next-generation sequencing platform» *Environmental Biotechnology*. 99(7):3233-3242. DOI: 10.1007/s00253-014-6213-6.
- Khamar, Z, A Makhdoumi-Kakhki, y M Mahmudy Gharaie. 2015. «Remediation of cyanide from the gold mine tailing pond by a novel bacterial co-culture» *International Biodeterioration & Biodegradation* 99: 123-128. DOI:10.1016/j.ibiod.2015.01.009
- Khan, NH, FV Bondici, PG Medihala, JR Wolfaardt, GM Lawrence, J, Warner, y DR Korber. 2013. «Bacterial Diversity and Composition of an Alkaline Uranium Mine Tailings-Water Interface» *Journal of Microbiology* 51(5): 558–569. DOI: 10.1007/s12275-013-3075-z.
- Knowles, Christopher J, y Alan W. Bunch. 1986. « Microbial cyanide metabolism.» *Advances in Microbial Physiology* 27:73–111. DOI: 10.1016/S0065-2911(08)60304-5.
- Kobayashi, M, N Yanaka, T Nagasawa, y H Yamada. 1990. «Purification and characterization of a novel nitrilase of *Rhodococcus rhodochrous* K22 that acts on aliphatic nitriles.» *J. Bacteriol* 172(9):4807–4815.
- Kouzuma, A, y K Watanabe. 2011. «Molecular Approaches for the Analysis of Natural Attenuation and Bioremediation». En *Comprehensive Biotechnology*, de M Moo-Young, 25-36. Amsterdam: Elsevier.
- Kuffner, M, B Hai, T Rattei, C Melodelima, M Schlöter, S Zechmeister-Boltenstern, R Jandl, A Schindlbacher, y A Sessitsch. 2012. «Effects of season and experimental warming on the bacterial community in a temperate mountain

- forest soil assessed by 16S rRNA gene pyrosequencing» *FEMS Microbiol Ecol* 82: 551–562.
- Kunz, D.A, O. Nagappan, J. Silva-Avalos, y G.T. DeLong. 1992. «Utilization of cyanide as nitrogenous substrate by *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764: evidence for multiple pathways of metabolic conversion» *Applied and Environmental Microbiology* 58:2022-2029.
- Lane, DJ. 1991. «16S/23S rRNA sequencing .» En *Nucleic acid techniques in bacterial systematics* , de E Stackebrandt y M Goodfellow, 115-176. New York: N.Y.: John Wiley & Sons, Inc.
- Lavigne, J, P Espinal, C Dunyach-Remy, N Messad, A Pantel, y A Sotto. 2013. «Mass spectrometry: a revolution in clinical microbiology?» *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 51(2):257–270.
- Lebedev, AT. 2013. «Environmental Mass Spectrometry» *Annual Review of Analytical Chemistry*, 6:163-189. DOI: 10.1146/annurev-anchem-062012-092604
- Li, Y, H Wen, L Chen, y T Yin. 2014. «Succession of Bacterial Community Structure and Diversity in Soil along a Chronosequence of Reclamation and Re- Vegetation on Coal Mine Spoils in China» *PLoS ONE* 9-12. DOI: journal.pone.0115024
- Liu, J.K, Y.W Wu, y C.H Hsu. 1992. «Physiological adaptability of a cyanide-utilizing *Klebsiella oxytoca* strain.» *Proc. Natl. Sci. Council* 16:188–193.
- Luque-Almagro, V. 2005. *Metabolismo del cianuro y del cianato en Pseudomonas pseudoalcaligenes CECT 5344. Aplicaciones Biotecnológicas*. Málaga. España. Analistas Económicos de Andalucía.
- Luque-Almagro, V, M.J. Huertas, L.P Sáez, M Luque-Romero, C Moreno-Vivián, F Castillo, R.D Roldán, y R Blasco. 2008. «Characterization of the *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 cyanase, an Enzyme that is

not essential for cyanide assimilation» *Applied and Environmental Microbiology* 6280–6288.

Luque-Almagro, V, C Moreno-Vivia, y M Roldán. 2016. «Biodegradation of cyanide waste from mining and jewellery industries.» *Current Opinion in Biotechnology*, 9-13.

Mekuto, L, S Ntwampe, y V Jackson. 2015. «Biodegradation of free cyanide and subsequent utilisation of biodegradation by-products by *Bacillus* consortia: optimisation using response surface methodology.» *Environ Sci Pollut Res*. DOI 10.1007/s11356-015-4221-4.

Mekuto, L, V Jackson, y S Ntwampe. 2013. «Biodegradation of Free Cyanide Using *Bacillus* Sp. Consortium Dominated by *Bacillus Safensis*, *Lichenformis* and *Tequilensis* Strains: A Bioprocess Supported Solely with Whey» *Bioremediation & Biodegradation*.

Mellmann, A, J Cloud, T Maier, U Keckevoet, I Ramminger, P Iwen, J Dunn, *et al*. 2008. «Evaluation of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry in Comparison to 16S rRNA Gene Sequencing for Species Identification of Nonfermenting Bacteria» *Journal of Clinical Microbiology*, 46(6):1946-1954 .DOI: 10.1128/JCM.00157-08

Meyer, F, D Paarmann, M D'souza, R Olson, EM Glass, M Kubal, T Paczian, *et al*. 2008. «The metagenomics RAST server—a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes» *BMC Bioinformatics* 9: 386–394. DOI: 10.1186/1471-2105-9-386

Meyer, W. 2010. «*Isolation and Genetic Characterization of a Microbial Consortium Capable of Cyanide Degradation*». Tesis Magistral, South Africa: University of the Free State Bloemfontein.

Meyers, P, P Gokool, D Rawlings, y D Woods. 1991. «An efficient cyanide-degrading *Bacillus pumilus* strain» *Journal of General Microbiology*, 1397-1400.

- MINAM. 2014. «Ministerio del Ambiente.» *Ministerio del Ambiente*. Disponible en: http://www.minam.gob.pe/wp-content/uploads/2014/04/GUIA-MUESTREO-SUELO_MINAM1.pdf (último acceso: 3 de 2 de 2016).
- . «Ministerio del Ambiente.» 25 de marzo de 2013. <http://www.minam.gob.pe/calidadambiental/estandares-de-calidad-ambiental/> (último acceso: 21 de marzo de 2016).
- MINEM. «Ministerio de Energía y Minas.» *Ministerio de Energía y Minas*. s.f. <http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/cd27/compendio-manejo.pdf>. (último acceso: 3 de 3 de 2016).
- Mirizadeh, S, S Yaghmaei, y Z Nejad. 2014. «Biodegradation of cyanide by a new isolated strain under alkaline conditions and optimization by response surface methodology (RSM)» *Journal of Environmental Health Science & Engineering*, 2-9. DOI: 10.1186/2052-336X-12-85.
- Montoya, Carlos. 2001. «Cianuro, oro y medio ambiente en la minería del nordeste antioqueño» *Revista Facultad de Ingeniería*, 43-49.
- Moreels, D, G Crosson, C Garafola, D Monteleone, S Taghavi, JP Fitts, D Van der Lelie. 2008. «Microbial community dynamics in uranium contaminated subsurface sediments under biostimulated conditions with high nitrate and nickel pressure» *Environ. Sci. Pollut. Res*, 15(6):481–491. DOI: 10.1007/s11356-008-0034-z.
- Morillo, J, y J Guevara. 2015. «Degradación de cianuro de sodio por pseudomonas sp. a dos temperaturas y tres pH» *Revista Científica de Estudiantes*, 23-32.
- Mudder, T, y J Whitlock. 1984. Strain of *Pseudomonas paucimobilis*. USA Patente 4,461,834. 24 de Julio de 1984.
- Mufaddal, I, y J Lynch. 2012. «Cyanide catabolizing enzymes in *Trichoderma spp.*» *Enzyme and Microbial Technology*, 31(7):1042–1047. DOI: 10.1016/S0141-0229(02)00238-7

- Naveen, D., C.B Majumder, P Mondal, y D. Shubha. 2011. «Biological Treatment of Cyanide Containing Wastewater» *Research Journal of Chemical Sciences* 1(7):15-21.
- Neilson, A, y A Allard. 2013. *Organic chemicals in the environment mechanisms of degradation and transformation* . Taylor and Francis Group.
- Nwokoro, O, y M Uju Dibua. 2014. «Degradation of soil cyanide by single and mixed cultures of *Pseudomonas stutzeri* and *Bacillus subtilis*.» *Arh Hig Rada Toksikol*, 113-119.
- Ozel, Y.K, S Gedikli, P Aytar, A Unal, M Yamaç, A Cabuc, N Colankaya. 2010. «New fungal biomass for cyanide biodegradation.» *Journal of Bioscience and Bioengineering* 110:431-435. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2010.04.011.
- Parmar, P, A Soni, K Vyas, y P Desai. 2012. «Isolation and characterization of cyanide degrading bacterial strains from contaminated soil» *International Journal of Environmental Sciences*, 2(4):2006-2014. DOI: 10.6088/ijes.00202030086.
- Perumal, M, J Prabakaran, y M Kamaraj. 2013. «Isolation and Characterization of Potential Cyanide Degrading *Bacillus nealsonii* from Different Industrial Effluents.» *International Journal of ChemTech Research*, 2357-2364.
- Pettet, A.E.J y E.V. Mills. 1954. «Biological treatment of cyanides with and without sewage.» *Journal of Applied Chemistry* 4:434-444.
- Rashid, M, y U Stingl. 2015. «Contemporary molecular tools in microbial ecology and their application to advancing biotechnology» *Biotechnology Advances*, 1755–1773.
- Rastogi, G, S Osman, PA Vaishampayan, GL Andersen, LD Stetler, y RK Sani. 2010. «Microbial Diversity in Uranium Mining-Impacted Soils as Revealed by High-Density 16S Microarray and Clone Library» *Microbial Ecology* 59(1):94–108. DOI: 10.1007/s00248-009-9598-5.

- Razanamahandry LC, HA Andrianisa, H Karoui, KM Kouakou, y H Yacouba. 2016. «Biodegradation of free cyanide by bacterial species isolated from cyanide-contaminated artisanal gold mining catchment area in Burkina Faso». *Chemosphere* 157:71-8. DOI:10.1016/j.chemosphere.2016.05.020.
- Reis, MP, FA Barbosa, E Chartone-Souza, y AM Nascimento. 2013. «The prokaryotic community of a historically mining-impacted tropical stream sediment is as diverse as that from a pristine stream sediment» *Extremophiles* 17(2):301–309. doi: 10.1007/s00792-013-0517-9.
- Rittman, B, M Hausner, F Löffler, N Love, G Muyzer, S Okabe, D Oerther, et al. 2006. «A vista for microbial ecology and environmental biotechnology» *Environmental Science and Technology*, 1096–1103.
- Shange, R, R Ankumah, Y Maiga, M Scott, y N Egiebor. 2013. *Assessing impacts of cyanide treatments on soil microbial community composition and structure*. Minneapolis, 6 de agosto de 2013.
- Shevchenko, A, H Tomas, J Havlis, J Olsen, y M Mann. 2006. «In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes» *Nature Publishing Group. Nature Protocols*. 1:2856 - 2860. DOI: 10.1038/nprot.2006.468
- Shumei, F, L Xilong, y L Chunyan. 2013. «Bioremediation of Cyanide Contamination and Its Applications» *Biotechnology Bulletin*, 36-42.
- SNMPE. 2014. *La lixiviación*. Informe Quincenal, Lima: Sociedad Nacional de Minería Petróleo y Energía.
- Sujatha Kandasamy, S, Dananjeyan Balachandar, Kumar Krishnamurthy, y Gero Benckiser. 2015. «Aerobic cyanide degradation by bacterial isolates from cassava factory wastewater» *Braz J Microbiol*, 46(3):659-666. DOI: 10.1590/S1517-838246320130516

- Sung, YC, y JA Fuchs. 1988. «Characterization of the cyn operon in Escherichia coli K12.» *J Biol Chem*, 14769-14775.
- Tang, P, Y Hseu, H Chou, K Huang, y S Chen. 2010. «Proteomic Analysis of the Effect of Cyanide on Klebsiella oxytoca» *Current Microbiology*, 60(3):224-228. DOI: 10.1007/s00284-009-9529-1.
- Tekere, M, A Lötter, J Olivier, N Jonker, y S Venter. 2011. «Metagenomic analysis of bacterial diversity of Siloam hot water spring, Limpopo, South Africa» *African Journal of Biotechnology* 10(78):18005-18012.
- Tringe SG, y Rubin EM. 2005. «Metagenomics: DNA Sequencing of environmental samples» Nature Publishing Group, 6(11):804-814.
- Tuya, Jonathan. 2014. «Evaluación de la capacidad degradativa de cianuro por bacterias alcalófila aisladas de los relaves de la planta concentradora de metales Mesapata Cátac - Ancash». Tesis Biólogo Microbiólogo Parasitólogo, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Valenzuela, L, A Chi, S Beard, A Orell, N Guillian, J Shababwitz, DF Hunt y CA Jerez. 2006. «Genomics, metagenomics and proteomics in biomining microorganisms» *Biotechnol Adv* 24(2):197-211.
- Wang, Ch, DA Kunz, y B Venables. 1996. «Incorporation of Molecular Oxygen and Water during Enzymatic Oxidation of Cyanide by Pseudomonas fluorescens NCIMB 11764.» *Applied Environmental and Microbiology*, 2195–2197.
- Wang, Q, G. M Garrity, J. M Tiedje, y J. R Cole. 2007. «Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy» *Appl Environ Microbiol*, 73(16):5261-5267. DOI: 10.1128/AEM.00062-07
- Wang, Z, L Liu, F Guo, y T Zhang. 2015. «Deciphering Cyanide-Degrading Potential of Bacterial Community Associated with the Coking Wastewater

Treatment Plant with a Novel Draft Genome» *Environmental Microbiology*.
DOI: 10.1007/s00248-015-0611-x

- Watanabe, A, K Yano, y K Ikebukuro. 1998. «Cyanide hydrolysis in a cyanide-degrading bacterium, *Pseudomonas stutzeri* AK61, by cyanidase» *Microbiology*, 1677-1 682.
- White, Carleton, y James, Markwiese. 1994. «Assessment of the Potential for *In Situ* Bioremediation of Cyanide and Nitrate Contamination at a Heap Leach Mine in Central New Mexico» *Journal of Soil Contamination* 3:271-283.
- White, TJ, T Bruns, y J Tylor. 1990. «Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics» *PCR protocols: a Guide to Methods and applications*, 315-322.
- Worden, A. 2009. «DNA Extraction - CTAB Method» Protocolo de trabajo, California. http://www.mbari.org/wp-content/uploads/2015/11/CTAB-DNA-Extract_GenomeSeq-quality.pdf
- Yumoto, I, K Hirota, y K Nakajima. 2014. «The genus *Alkalibacterium*.» En *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy*, de W Holzapfel y B Wood, 147-158. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.

9. ANEXOS

AGRADECIMIENTOS

La realización de la presente investigación fue posible gracias al financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica - CONCYTEC, la subvención del Fondo de Investigación y Desarrollo para la Competitividad (FIDECOM) administrado por el Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad - INNOVATE PERÚ, la empresa WF SILVA INGENIEROS SRL y bajo la asesoría científica de INCABIOTEC SAC.

Este proyecto contempla parte de los resultados obtenidos durante el desarrollo del proyecto titulado **“BIOREMEDIACIÓN DE SUELOS Y AGUAS AFECTADOS POR ACTIVIDADES MINERAS AURÍFERAS Y ARGENTÍFERAS EN LA REGIÓN LA LIBERTAD MEDIANTE EL USO DE UN CONSORCIO DE BACTERIAS Y/O HONGOS NATIVOS PRODUCTORES DE ENZIMAS DEGRADADORAS DEL CIANURO Y DE SUS DERIVADOS TÓXICOS”** código de proyecto **PIPEI-7-P-286-073-13** y con contrato **214 – FINCYT– FIDECOM–PIPEI-2014**.

En primer lugar, a mi director, Dr. Eric Mialhe PhD. DE y el equipo de asesores de INCABIOTEC SAC (Dra. Virna Cedeño. PhD, Dr. Emmerick Motte. PhD, MSc. Benoit Diringer, MSc. Juan Quimi) por la confianza para formar parte del grupo de investigación durante todo este tiempo.

De la misma manera al equipo de profesionales de WF SILVA INGENIEROS SRL (Jerome Regard, Walter Silva, Ely Silva, Cinthia Silva) por la confianza puesta en mi persona para el desarrollo de la investigación.

A la plana docente de la Universidad Nacional de Tumbes y especialmente al equipo coordinador del Programa Magistral en Biotecnología Molecular, sin su trabajo no hubiera sido posible este logro.

A mis compañeros de equipo (Akemy, Yacory, Carlos, Verónica) gracias por tantos buenos momentos y por estar siempre dispuestos a ayudarme en todas y cada una de actividades consideradas en este trabajo.

Al equipo técnico de INCABIOTEC SAC (César, Petter, Pedro, Rodrigo, Paola) por el apoyo en las actividades de laboratorio y por siempre estar cuando fue necesario.

Al CONCYTEC por concederme una beca en el Programa Magistral en Biotecnología Molecular que me ha permitido realizar este trabajo.

A mi familia, que de un modo u otro siempre han estado ahí.

Y por último, muchas gracias a todas las personas que de algún u otro modo han contribuido y participado en este trabajo.

GALERIA FOTOGRÁFICA



Imagen 1 Poza artesanal empleada para la lixiviación de oro con cianuro



Imagen 2 Toma de muestra de suelo contaminado con cianuro

Imagen 3 Análisis microbiológico de muestras de suelo y agua contaminadas con cianuro

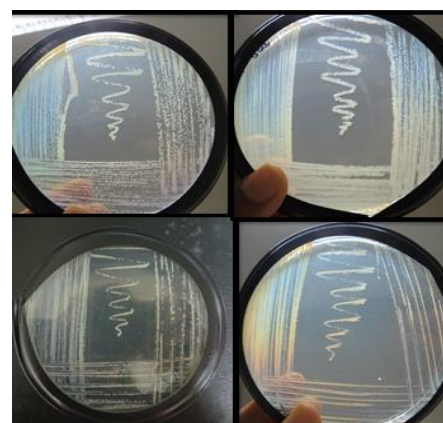
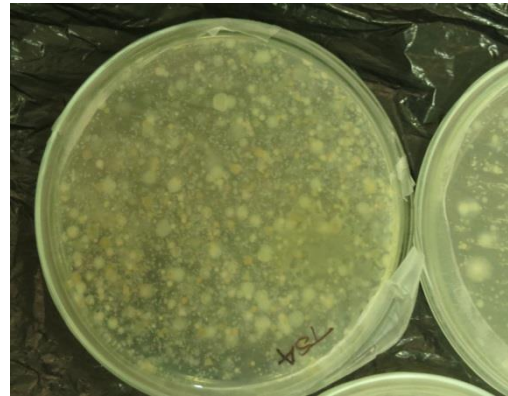
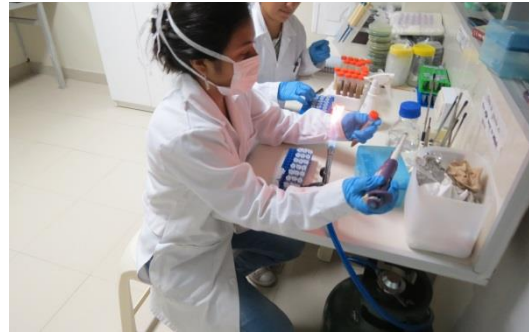
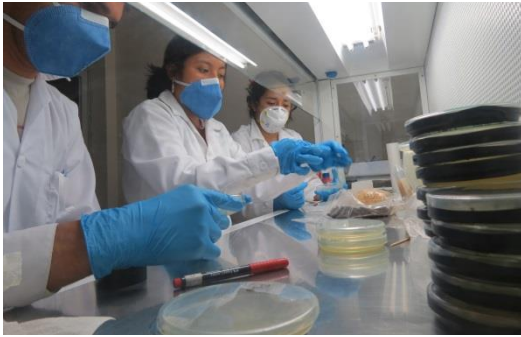


Imagen 4 Análisis genómico y proteómico de muestras de suelo y agua contaminadas con cianuro

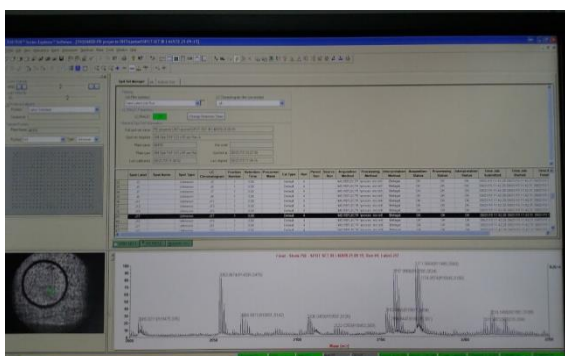
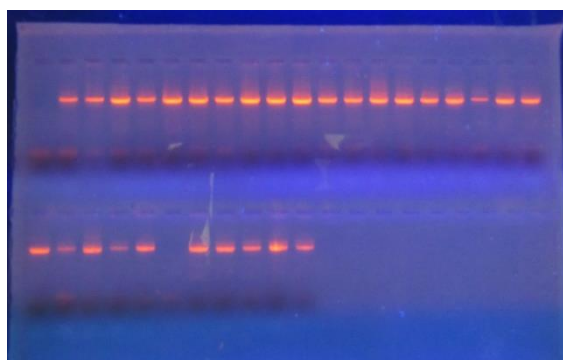
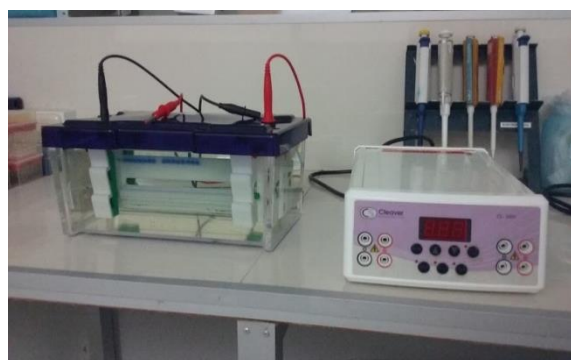


Imagen 5 Ensayos de degradación de cianuro a nivel de laboratorio y campo



SECUENCIAS DE LAS ENZIMAS IDENTIFICADAS MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS PRESENTES EN LOS MICROORGANISMOS ESTUDIADOS.

Tabla 12 Secuencias de péptidos asociados a la identificación de enzimas degradadoras de cianuro y derivados tóxicos presentes en el cultivo del consorcio microbiano formulado.

PREC M/Z	BEST SEQUENCE	THEOR MW	PUTATIVE ENZYME
1078,199	KVDVTTMIR	1077,5852	cyanate hydratase
1566,259	KHAITTLDTSLIPR	1564,8937	cyanate hydratase
1585,311	ISAITEQLLAACKAK	1583,9611	cyanate hydratase
2310,321	NYGSRLPDSVRVGSVQYKQR	2309,1877	nitrilase/cyanide hydratase
2886,4919	AGDDMVVADLDLPLCTGRRWIR	2885,4529	nitrilase
804,0438	NGNGGSLDA	803,3409	aliphatic nitrilase
1736,26	ARAMENQIYIIGANR	1734,8835	nitrilase/cyanide hydratase
2886,5139	SVQRLITMAEHNDITILAGLFKDR	2885,5068	nitrilase

Tabla 13 Secuencias de péptidos asociados a la identificación de enzimas degradadoras de cianuro y derivados tóxicos presentes en el cultivo *Pseudomonas spp.*

PREC M/Z	BEST SEQUENCE	THEOR MW	PUTATIVE ENZYME
1147,076	AFAPRLASSAR	1145,6305	cyanate hydratase
2758,2859	VAIAQHEIAPTLDEGLRRTTELTR	2757,4521	cyanide hydratase
1891,23	WAWLVLGTAAHLLAVGGR	1890,0629	nitrilase
1898,434	VKGADIILNPAMWGIKR	1897,0608	nitrilase
804,0264	NGNGGSLDA	803,3409	aliphatic nitrilase
1041,224	GSTFGGFVGGGR	1040,5039	nitrilase
2886,3711	SVQRLITMAEHNDITILAGLFKDR	2885,5068	nitrilase

Tabla 14 Secuencias de péptidos asociados a la identificación de enzimas degradadoras de cianuro y derivados tóxicos presentes en el cultivo *Bacillus spp.*

PREC M/Z	BEST SEQUENCE	THEOR MW	PUTATIVE ENZYME
1856,92	IISTKVAQGIQWADVAR	1856,0156	cyanate hydratase
2791,5359	NLAKYLDIDHATLEAQMSPDRGK	2790,3647	cyanate hydratase
2281,333	PIMSKSEAAHVDSARIRQGR	2280,1758	cyanase
2791,75	RNDVTEKIITVKVAKGLKWEDVAR	2790,5869	cyanate hydratase
1078,218	KVDVTTMIR	1077,5852	cyanate hydratase
1078,189	LGYRMPEGR	1077,5389	nitrilase
2791,75	LHGIDVGLTICEDLWQQGGPITVAR	2790,46	NH(3)-dependent NAD(+) synthetase
1517,239	RLDDARLRMKAR	1515,8416	carbon-nitrogen hydrolase
1891,23	WAWLVLGTAHLLAVGGR	1890,0629	nitrilase
1846,2271	VHNTALLIDPNGLELAR	1845,0109	nitrilase/cyanide hydratase
1846,207	VHNTALLIDPNGLELAR	1845,0109	apolipoprotein N-acyltransferase
1078,218	AIESGYALVR	1077,5819	nitrilase
2000,333	KRRLTVGLVQMRTGIDR	1999,1473	nitrilase 1-like protein
804,0264	NGNGGSLDA	803,3409	aliphatic nitrilase
2886,3711	SVQRLITMAEHNDITILAGLFKDR	2885,5068	nitrilase
1898,4771	VKGADIILNPAMWGIKR	1897,0608	nitrilase
2281,2141	GAQAYTIVANFIGTSYDFKGR	2280,1062	nitrilase
1807,525	DLWLSSMRHIAHEGR	1806,8948	nitrilase

Tabla 15 Secuencias de péptidos asociados a la identificación de enzimas degradadoras de cianuro y derivados tóxicos presentes en el cultivo *Alcaligenes spp.*

PREC M/Z	BEST SEQUENCE	THEOR MW	PUTATIVE ENZYME
2791,5359	NLAKYLDIDHATLEAQMSGFPDRGK	2790,3647	cyanate hydratase
1078,218	KVDVTTMIR	1077,5852	cyanate hydratase
1078,189	LGYRMPEGR	1077,5389	nitrilase
2758,2859	VAIAQHEIAPTLDEGLRRTEELTR	2757,4521	Nitrilase/cyanide hydratase
1517,239	RLDDARLRMKAR	1515,8416	carbon-nitrogen hydrolase
1846,207	VHNTALLIDPNGLELAR	1845,0109	apolipoprotein N-acyltransferase
1078,218	AIESGYALVR	1077,5819	nitrilase
2000,333	KRRLTVGLVQMRTGIDR	1999,1473	nitrilase 1-like
1041,224	GSTFGGFVGGR	1040,5039	nitrilase
2447,5701	PLIAGGSVIVGPMGDVLAGPLRGER	2446,3367	nitrilase