

**DEGRADACIÓN DEL CIANURO PROVENIENTE DE LOS VERTIMIENTOS DE
UNA INDUSTRIA DE TRATAMIENTO TÉRMICO UBICADA EN BOGOTÁ
UTILIZANDO MICROORGANISMOS**

Yeraldi Viviana Carreño Parrado

Universidad Nacional Abierta y a Distancia- UNAD

Escuela de Ciencias Agrarias, Pecuarias y del Medio Ambiental

Bogotá- Colombia

2018

**DEGRADACIÓN DEL CIANURO PROVENIENTE DE LOS VERTIMIENTOS DE
UNA INDUSTRIA DE TRATAMIENTO TÉRMICO UBICADA EN BOGOTÁ
UTILIZANDO MICROORGANISMOS**

Yeraldi Viviana Carreño Parrado

Proyecto de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:

Ingeniera Ambiental

Director:

Carlos Andrés Fajardo

Codirector:

Diana Marcela Fúquene Yate

Línea de Investigación:

Biotecnología

Universidad Nacional Abierta y a Distancia – UNAD

Escuela de Ciencias Agrarias, Pecuarias y del Medio Ambiental

Bogotá, Colombia

2018

*“Nunca consideres el estudio como una obligación,
sino como una oportunidad para penetrar
en el bello y maravilloso mundo del saber”*

Albert Einstein

Agradecimientos

Primeramente, a dios quien me regaló un día más de vida y las bendiciones que hoy me permiten haber cursado este programa de formación.

A mis padres, quienes me educaron con los mejores valores, quienes siempre cuidan de mí, quienes me enseñaron las cosas más valiosas de la vida, quienes son mi mayor inspiración para terminar este proceso de formación.

A mi hermano, que con su amor, compañía y ocurrencias estuvo siempre a mi lado alegrando mis días.

A la ingeniera Diana Marcela Fúquene Yate de quien aprendí bastante, quien me asesoró en mi anteproyecto de grado y me permitió pertenecer a el semillero que encabeza, en el cual adquirí conocimientos que me fueron de gran ayuda para el desarrollo de mi proyecto de grado y en mi formación profesional y quien adicionalmente fue mi codirectora en el proyecto aportando bastante en el éxito de éste.

A todos los miembros de los distintos semilleros de quienes en cada reunión aprendí bastante.

Al director de tesis Carlos Fajardo, quien me acompañó durante el proceso de elaboración de este documento aportando bastante en el éxito de este proyecto de investigación.

Resumen

Este Proyecto de investigación tiene como objetivo identificar microorganismos capaces de resistir y degradar concentraciones de cianuro, provenientes de los vertimientos de una industria de tratamiento térmico. Para lograr ésto, se inició con una revisión documental, la cual permitió identificar el medio de cultivo que fue el encargado de aportar a los microorganismos los micronutrientes y macronutrientes necesarios para su supervivencia y adaptación. Luego se realizó un aislamiento por el método de agotamiento por estría, a partir de muestras de agua residual resultante de los tratamientos térmicos; Las muestras fueron enriquecidas en medio nutritivo lv obteniendo crecimiento de microorganismos a los cuales se les identificó sus características macroscópicas y microscópicas directas. Finalmente, los microorganismos aislados se sometieron a un aumento en las concentraciones de cianuro de 100 ppm, 125 ppm, 150 ppm y 260 ppm, para de esta manera, establecer cuáles de los microorganismos aislados tienen la capacidad de resistir la mayor concentración de cianuro. Con base en lo anterior, se encontró que la cepa bacteriana 2 (bacilo Gram positivo) es capaz de resistir el cianuro en concentraciones de hasta 260 ppm; Por último, se realizaron experimentos con el colorímetro (Hanna C-200) para establecer si el medio suplementado con cianuro de potasio muestra una disminución en la concentración de cianuro, Como resultado la cepa 2 en un tiempo de 48 horas llega a una concentración de cianuro de 112.5 ppm lo cual permitió concluir que la cepa 2 es capaz de resistir y degradar el cianuro, como investigación futura se sugiere establecer la taxonomía de la cepa 2.

Palabras claves: bacterias, Tratamiento biológico, Vertimientos de tratamientos térmicos, Biomimesis, caracterización fenotípica, cianuro, genotipo.

Abstract

This research project has the aim to identify cyanide-resistant and cyanide-degrading microorganism, from the spill of a heat treatment industry. To achieve this, it began with a documentary review of culture media for microbial growth to provide optimal conditions for the screening of potential degrading microorganisms. Then, an isolation was made by the method of depletion by groove, from waste water samples resulting from heat treatments; The samples were enriched in nutrient medium LB. Microorganisms were identified by macroscopic and microscopic characteristics, Finally, isolated microorganisms were cultured to an increase in cyanide concentrations of 100 ppm, 125 ppm, 150 ppm y 260 ppm, valuing their capacity to resist the highest concentration of cyanide. It was found that bacterial strain 2 (Gram positive bacillus) is capable of resisting cyanide in concentrations until of 260 ppm; The determination of the Cyanide concentration was made with the colorimeter (Hanna C-200). Biological Assays with the strain 2 showed a decrease in the concentration of cyanide after 48 hours of incubation on liquid media this allowed to conclude that strain 2 is capable of resisting and degrading cyanide. Future research were suggested to establish taxonomy of the strain two.

Keywords: Bacterium, Biological treatment, Thermal treatment wastewater, Biomimicry, Phenotypic characterization, cyanide, genotype.

1 Tabla de contenido

Introducción	1
Planteamiento del problema	2
Justificación	4
Objetivos	5
General.....	5
Específicos.....	5
Antecedentes.....	6
Marco teórico	10
Metodología	17
Primera fase	17
Segunda fase	17
Tercera fase.....	26
Resultados y análisis	29
Primera fase	29
Segunda fase	33
Tercera fase.....	39
Conclusiones	43
Recomendaciones	45

Lista de ilustraciones

Ilustración 1 Técnica aséptica, establecimiento del área de trabajo	18
Ilustración 2 Técnica aséptica, esterilización del asa bacteriológica.....	19
Ilustración 3 Siembra por agotamiento de asa en zigzag	20
Ilustración 4 Tinción Gram, frotis bacteriano	21
Ilustración 5 Tinción Gram, aplicación de cristal violeta.....	22
Ilustración 6 Tinción Gram, aplicación de Lugol.....	22
Ilustración 7 Tinción Gram, aplicación de alcohol acetona	23
Ilustración 8 Tinción Gram, aplicación de fucsina.....	23
Ilustración 9 Tinción Gram, aplicación de aceite de inmersión para observación en el microscopio	24
Ilustración 10 Morfología de las colonias bacterianas	25
Ilustración 11 Colorímetro de pilas marca Hanna C-200 series.....	27
Ilustración 12 Toma de muestra de los vertimientos.....	34
Ilustración 13 Aislados de las cepas muestreadas	38
Ilustración 14 Características microscópicas de la cepa 2.....	39
Ilustración 15 Degradación de cianuro cepa 2	40

Lista de tablas

Tabla 1 Morfología microscópica de los microorganismos.....	26
Tabla 2. Revisión documental medio de cultivo para bacterias degradadoras de cianuro.....	31
Tabla 3. Materiales requeridos para el experimento.....	36
Tabla 4. Características macroscópicas de las cepas aisladas.....	37

Lista de símbolos y abreviaturas

Símbolos con letras latinas

Símbolo	Término
---------	---------

HCN	Cianuro de hidrogeno
-----	----------------------

g/L	Gramos por litro
-----	------------------

ml	Mililitros
----	------------

ppm	Partes por millón
-----	-------------------

Símbolos con letras griegas

Símbolo	Término
---------	---------

α	Alfa
----------	------

β	Beta
---------	------

Abreviaturas

Abreviatura	Término
-------------	---------

EPA	Agencia de Protección Ambiental (Por sus siglas en inglés)
-----	--

etc.	Etcétera
------	----------

Abreviatura	Término
°C	Grados centígrados
CLCN	Cloruro de cianógeno
CO	Monóxido de carbono
CON	Cianato
COOH	Acido carboxílico
CH ₄	Metano
DL	Dosis letal
Fe	Hierro
H ₂ O	Agua
H ₂	Di hidrogeno
Mg	Magnesio
NH ₄	Amonio
NO ₂	Dióxido de nitrógeno
NaCN	Cianuro de sodio
K	Potasio
KCN	Cianuro de Potasio

Introducción

En la industria metalúrgica es indispensable realizar tratamientos térmicos que permitan cambios estructurales en el metal según lo exija el proceso de producción y el tipo de metal que se pretende transformar, de este tipo de actividad se encargan las industrias transformadoras de metales las cuales deben aplicar tratamientos térmicos bien sea para conseguir el endurecimiento o ablandamiento del material mediante la aplicación de procesos de temple, cementación, nitruración, revenido, carbonitruración, recocido, sulfinado y normalizado (Cimiano, 2002) de los cuales como remanente quedan contaminantes como aceites, salmueras, cianuros, cromo, óxido de aluminio, carbonato de sodio, sales de potasio, cloruro de potasio, carbonato de potasio, lodos de sal, compuestos de bario, solventes y carburo de silicio (CEPIS Publicaciones, 1992) que terminan por afectar el medio ambiente. Para el desarrollo de esta investigación se estudió el efecto que se da sobre el cuerpo hídrico por el vertimiento de aguas contaminadas con cianuro.

Teniendo en cuenta los problemas ambientales que acarrea la contaminación del agua por los vertimientos sin tratar, que son arrojados a las fuentes hídricas por parte de las industrias de tratamientos térmicos, se propone la identificación de microorganismos con capacidad de degradar el cianuro de los vertimientos generados por dicha actividad industrial. Se aislaron los que provengan de los diferentes procesos que estas industrias realizan dentro de su actividad económica, lo que aseguró que los microorganismos son capaces de sobrevivir a las condiciones extremas que trae el vertimiento, como lo son los pH ácidos y alcalinos, las elevadas temperaturas y la alta carga de metales pesados.

Planteamiento del problema

Los tratamientos térmicos se realizan con el fin de proporcionar a los materiales propiedades mecánicas o eléctricas las cuales se encargan de intervenir en la estabilidad dimensional del material, permitiendo que el material sea utilizado en otra actividad (CEPIS Publicaciones, 1992) por medio de procesos de calentamiento y enfriamiento de las piezas para efectuar cambios en la estructura del material, los cuales a su vez modifican sus propiedades mecánicas. Al realizar esta actividad productiva se generan residuos en todas y cada una de las etapas del proceso, como por ejemplo en el recocido, el temple y el revenido (Escuela Colombiana de Ingeniería, 2008).

Durante el proceso denominado temple se generan lodos de sal, vertimientos y salmueras resultantes de los baños de aceites usados para enfriar piezas en los procesos de cianuración, carburación o nitrificación líquida (CEPIS Publicaciones, 1992) durante la etapa de limpieza y revestimiento de las piezas se generan residuos de solventes (Agency Environmental Protection, 1992) y también se generan residuos como cianuros, cloro, compuestos de azufre y fósforo, fenoles, cresoles y álcalis (Protection, 1990). Al ser el cianuro, una sustancia muy tóxica, esta investigación se centra específicamente en la eliminación de este contaminante contenido en el agua que es vertida por las industrias de tratamientos térmicos.

El cianuro en la industria química es toda sustancia que contiene un grupo ciano lo que se traduce en que tiene un triple enlace de carbono y nitrógeno cuya fórmula química es CN , este químico es demasiado tóxico y suele ser uno de los contaminantes más dañinos para el medio ambiente, ya que cuando es vertido al agua en grandes cantidades impide que el cuerpo pueda aprovechar el

oxígeno causando asfixia en humanos y animales que estén en contacto con el agua contaminada (Barrick, 2012).

Con el fin de eliminar la toxicidad por cianuro del vertimiento de una industria de tratamientos térmicos ubicada en la ciudad de Bogotá, se van a tomar microorganismos nativos, provenientes de los efluentes líquidos de los procesos de cementación, decapado y ténifer, los cuales fueron objeto de estudio en el laboratorio con la finalidad de aislar los que sean capaces de degradar cianuro y que logren una remediación eficaz y productiva. Por lo tanto, es preciso plantear la siguiente pregunta, que será el centro de esta investigación, ¿Cuáles de los microorganismos contenidos en los vertimientos de la industria de tratamiento térmico poseen la capacidad de degradar cianuro?

Justificación

En la industria metalúrgica es indispensable realizar tratamientos que permitan ejecutar cambios estructurales en el metal según lo exija el proceso de producción y el tipo de metal que se pretende transformar, de este tipo de actividad se encargan las industrias de tratamiento térmico las cuales deben aplicar una serie de tratamientos en los cuales se involucran procesos los cuales como remanente generan contaminantes que terminan por afectar el medio ambiente, en este caso específico el efecto que se estudia se genera sobre las fuentes hídricas.

Teniendo en cuenta los problemas ambientales que acarrea la contaminación del agua por los vertimientos que son arrojados a las fuentes hídricas por parte de las industrias de tratamiento térmico, se propone la identificación de microorganismos con capacidad de degradar el cianuro presente en los vertimientos resultantes de la actividad industrial anteriormente nombrada, aislando los que provengan de los procesos de cementación, decapado y ténifer, garantizando que los microorganismos sobreviven a las condiciones extremas del agua (pH, temperatura y carga de metales pesados), con el fin de aportar conocimiento para que la remediación funcione de manera adecuada y sea una solución al problema de contaminación de las fuentes hídricas contaminadas por cianuro.

Objetivos

General

Descubrir microorganismos capaces de degradar cianuro, provenientes de los vertimientos de una industria de tratamiento térmico ubicada en Bogotá.

Específicos

- Evaluar diferentes estrategias de cultivo que permitan aislar microorganismos capaces de degradar el cianuro proveniente de los vertimientos de una industria de tratamientos térmicos de Bogotá.
- Clasificar las características morfológicas de los microorganismos con capacidad para degradar cianuro, aislados en el laboratorio.
- Evaluar el comportamiento de los microorganismos aislados en el laboratorio para analizar su utilidad en muestras de agua residual industrial provenientes de industrias de tratamientos térmicos.

Antecedentes

Los tratamientos térmicos involucran varios procesos de calentamiento y enfriamiento para efectuar los cambios en la estructura de un material, dichos procesos a su vez modifican propiedades mecánicas con la intención de proporcionar a los materiales unas propiedades específicas que les permitan ser utilizadas en otra actividad, retomando la actividad de las industrias de tratamiento térmico en esta se generan una cantidad de residuos los cuales se van acumulando durante todas las etapas del proceso productivo, residuos como lodos de sal, vertimientos de las aguas de proceso y salmueras las cuales provienen del baño de enfriamiento (CEPIS Publicaciones, 1992). En otra de las etapas, específicamente en la de limpieza y revestimiento de las piezas, se generan residuos de solventes (Agency Environmental Protection, 1992), cianuro, cloro, compuestos de azufre y fósforo, fenoles, cresoles y álcalis (Protection, 1990). Teniendo en cuenta que de los residuos mencionados anteriormente el más tóxico es el cianuro se decide elegirlo objeto de esta investigación y se procede a realizar una revisión bibliográfica sobre los microorganismos capaces de degradar cianuro proveniente de los vertimientos de las industrias de tratamientos térmico o de industrias similares, es decir, que contengan las condiciones extremas de pH, temperatura y metales pesados.

Según (Coley & Zapata, 2006) es posible degradar el cianuro proveniente de la minería del oro por medio de distintas alternativas que pueden ser químicas y/o biológicas con ayuda de bacterias que sobreviven en condiciones aeróbicas para la nitrificación y en el caso contrario para bacterias en condiciones anóxicas para la desnitrificación. El tratamiento biológico ha sido utilizado para

remover cianuro en condiciones aeróbicas y para tal efecto se utilizan microorganismos como *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Alcaligenes*, *Trichoderma* spp y *Trichoderma harzianum*.

A continuación, se presentan los resúmenes y las conclusiones de las investigaciones realizadas sobre los microorganismos capaces de degradar cianuro proveniente de los vertimientos de las industrias de tratamiento térmico o de industrias similares:

Biodegradación de desechos de cianuro de industrias mineras y de joyería.

Según los autores, organismos cianotróficos como la bacteria *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 proveniente del lodo tomado del río Guadalquivir, tiene la capacidad de usar el cianuro y sus derivados como fuente de nitrógeno para su crecimiento; específicamente, la cepa bacteriana *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CETC 5344 puede crecer en un pH de 9,5 y tolerar la presencia de metales (Luque, Conrado, & Roldan, 2016).

Biodegradación del cianuro por una nueva cepa aislada bajo condiciones alcalinas y optimización por la metodología de superficie de respuesta (RSM)

La cepa C2 gramnegativo y de condiciones aeróbicas presenta una eficiencia del 86% en la remoción de cianuro con la particularidad de que también es capaz de degradar amoníaco, lo cual sería bastante útil para degradar cianuro presente en efluentes alcalinos industriales. Los investigadores realizaron todo el proceso experimental cultivando la muestra en un matraz erlenmeyer de 500 ml en el cual había una cantidad de 100 ml de caldo nutritivo con cambios de concentración de cianuro de 30 a 100 mg/L, durante el proceso experimental se realizaron subcultivos cada 3 días durante 2 semanas con inóculos del 10% en medio fresco y al cuarto día las bacterias degradadoras de cianuro se aislaron haciendo rayas en medio de agar nutritivo para

posteriormente obtener medios puros de cultivo realizando sub- cultivos (Shabnam, Sohelia, & Zahra, 2014).

Degradación de cianuro por Pseudoalcaligenes cepa W2 aislada de Efluentes mineros

En la mina de oro ubicada en Kuala Lipis, Pahang se realizó el aislamiento de microorganismos capaces de degradar cianuro proveniente de la actividad minera. La cepa bacteriana identificada como *Pseudomonas Pseudoalcaligenes* W2 podría ser utilizada para la biorremediación de aguas residuales contaminadas con cianuro (Tiong, y otros, 2015).

Evaluación de la Capacidad Degradativa de Cianuro por Bacterias Alcalófilas Aisladas de los Relaves de la Planta Concentradora de Metales Mesapata CÁTAC-ANCASH

Las cepas P-KING 2, P-NUT 1 y P-CIAN 2 mostraron un buen rendimiento durante la prueba de degradación con una efectividad del 91,85 y 77% respectivamente. El investigador identificó las cepas P-KING 2 y P-NUT 1 como *Chromobacterium violaceum* y *Pseudomonas pseudoalcaligenes*; sin embargo, la cepa que fue nombrada P-CIAN 2 mostró un perfil inaceptable lo que le impidió al investigador identificarla dentro de su taxonomía (Tuya, 2014).

Desintoxicación biológica de aguas residuales de procesamiento de metales preciosos

Las bacterias del género *Pseudomonas* conformaban una biomasa que se adhería a un disco de plástico, el cual fue utilizado en ensayos que demostraron que más del 90% de todos los componentes tóxicos de las aguas fueron eliminados entre ellos el cianuro, el cual es degradado en la primera y segunda etapa. La implementación de biotecnología para el tratamiento de aguas

residuales del proceso de cianuración sería de gran interés para la actividad minera porque presenta aspectos positivos como los bajos costos y el alto rendimiento de las cepas (Whitlock, 1990).

Biodegradación del cianuro libre por especies bacterianas aisladas del área de captación minera de oro artesanal contaminada con cianuro en clima saheliano en Burkina Faso

Las actividades auríferas que se llevaban a cabo en África Occidental, específicamente en la región de Burkina Faso, afectan demasiado al ambiente, ya que el F-CN contaminó casi toda la cuenca con concentraciones de 23 mg/L en muestras de agua cuyas especies bacterianas que tenían la capacidad de degradar cianuro estaban presentes en la misma cuenca; estas fueron muestreadas y llevadas al laboratorio en donde se cultivaron en medios de crecimiento que contenían 40, 60 y 80 mg F-CN/ L a pH 9,5 y temperatura ambiente; el resultado fue que más del 95% del F-CN se degradó en 25 horas por la acción bacteriana (Razanamahandry, Andrianisa, Karoui, Kouakou, & Hamma, 2016).

Marco teórico

El cianuro (CN) a mediano y largo plazo puede contaminar y acidificar el recurso hídrico generando graves impactos en la supervivencia de poblaciones y biodiversidad del ecosistema acuático, adicionalmente el cianuro al ser vertido en cuerpos hídricos permanece mucho tiempo y al entrar en contacto con los peces genera una amplia cadena de afectación, la cual suele terminar en los humanos, bien sea por acción de la venta de estos como producto alimenticio o por alimentos que han sido regados con aguas contaminadas (Guiza, 2011).

Se han presentado casos de muertes masivas de peces por descargas de cianuro, uno de los casos más recordados es el ocurrido en Canadá en el cual los efluentes de minas que contenían cianuro procedente de un estanque de relaves que se derramó en un arroyo cercano matando a por lo menos 20.000 truchas (Mouwerick, Stevens, Dupleer, Basham, & Irwin, 1997) los peces son organismos demasiado sensibles a presencia de cianuro pues basta tan sólo 0.1 mg/L para que mueran, por tal motivo, la presencia de cianuro en ambientes acuáticos es una amenaza (Montenegro, 2006).

En el caso de las plantas acuáticas el cianuro es fitotóxico lo que interfiere en la fotosíntesis de las plantas; en algunos animales grandes también causa afectaciones al tener estos, contacto con el agua contaminada con cianuro bien sea por que lo absorben por la piel, lo ingieren o porque ingresa al sistema respiratorio por inhalación, cuando la concentración es de por lo menos 200 ppm se considera letal (Montenegro, 2006).

Los seres humanos pueden verse afectados por contacto con el cianuro bien sea por vía dérmica, oral o por inhalación; tras haber sido ingerido la persona puede presentar síntomas como dolor abdominal, náuseas y vómitos; en caso de ser inhalado los síntomas que se puede presentar son:

una baja del ritmo cardiaco y de la frecuencia respiratoria, inconciencia y puede desencadenar en un paro respiratorio, esto cuando las concentraciones son sumamente altas; de otra manera, cuando la concentración es más baja los síntomas pueden ser debilidad, dolor de cabeza, y confusión caso en el cual quien estuvo en contacto si llega a recuperarse posiblemente presentaría secuelas en el sistema nervioso central (Ramírez, 2010).

En todos los casos sin importar la vía por la que se haya absorbido el cianuro es letal, las dosis letales para el cerebro está entre 0.06 y 1.37 mg/100g y de 0.22 a 0.91 mg/100g en la mucosa gástrica y para órganos como el corazón, sangre, riñones, páncreas es de 0.75, 0.42- 0.41, 0.33- 0.30 y 0.32 mg/100g (Ramírez, 2010).

En los apartes anteriores se han enumerado una serie de afectaciones que causa el cianuro sobre fuentes hídricas, especies acuáticas tanto de animales como de plantas y en el consumidor final que es el humano, pero también existen otras afectaciones de tipo indirecto, puesto que estas aguas pueden ser utilizadas para la irrigación de cultivos de alimentos los cuales terminarán por afectar la salud de humanos y animales terrestres que la consuman; uno de los antecedentes más conocidos de esta situación fue el evento ocurrido en Stari Slankamen a 50 Kilómetros al norte de Belgrado en el cual aguas contaminadas con altos niveles de cianuro fueron vertidas al río y como consecuencia 2.5 millones de personas tuvieron serios problemas de abastecimiento y por lo menos dos toneladas de peces murieron con el agravante de que las aguas contaminadas fueron utilizadas para irrigación de cultivos, lo que terminó afectando a humanos y especies animales que consumieron dichos productos a lo largo de Rumania y Hungría (EL PAIS, 2000).

El cianuro como contaminante es sumamente peligroso para el medio ambiente y para la vida en general, en la mayoría de los casos la mayor causante de la contaminación por cianuro es la industria, debido a que no sólo es utilizado en la minería para extracción de oro sino también en

otras actividades económicas menores que tienen la capacidad de generar las mismas afectaciones ambientales como es el caso de las industrias de transformación térmica.

El tratamiento térmico incluye procesos de calentamiento y enfriamiento con el fin de proporcionar a los metales unas propiedades específicas adecuadas para el uso final, en el tratamiento térmico no se modifica la composición química de los metales, pero si se realizan cambios en la estructura, granulometría y en las propiedades mecánicas de las piezas sometidas a estos tratamientos. Las etapas de la transformación térmica son (Escuela Colombiana de Ingeniería, 2008):

- Calentamiento hasta la temperatura fijada: Consiste en elevar la temperatura en intervalos de entre 850°-875° (Pérez, 1996) que debe ser uniforme en la pieza.
- Permanencia en la temperatura fijada: La finalidad es transformar por completo la estructura de partida, la permanencia debe ser de por lo menos dos minutos por milímetro de espesor a una temperatura de 875°C (Pérez, 1996).
- Enfriamiento: El enfriamiento debe ser rigurosamente controlado en función del tipo de tratamiento que se va a realizar.

Tipos de tratamientos térmicos (Escuela Colombiana de Ingeniería, 2008):

Temple: Es un tratamiento térmico en el cual se aumenta la temperatura a más o menos 1000°C se trata de aumentar la dureza y la resistencia mecánica del material, en este proceso se transforma toda la masa en Austenita con el calentamiento y posteriormente con el enfriamiento denominado brusco porque se emplean aceites, agua o salmuera se reconvierte en Martensita que es el constituyente duro que es característico de los aceros templados. En este proceso de temple es sumamente significativa la fase de enfriamiento y la velocidad alta del mismo. La temperatura siempre debe ser superior a la temperatura crítica para poder así obtener la Martensita.

Revenido: Este tratamiento es el siguiente al temple, en este proceso la pieza templada se calienta hasta cierta temperatura para disminuir así las tensiones internas.

Recocido: En este proceso se calienta el material hasta una temperatura dada y después se realiza el proceso de enfriamiento lentamente.

Normalizado: Este tratamiento sirve para eliminar tensiones internas sufridas por el material después de la formación mecánica, en el normalizado se calienta rápidamente el material hasta una temperatura crítica y se mantiene en esta durante un tiempo.

Cementación: En este tratamiento se aumenta la cantidad de carbono de la capa exterior del acero lo cual mejora la dureza superficial y la resiliencia aportando en que las piezas sean lo más resistentes posible a golpes y al desgaste (Villalba, 2009).

Nitruración: En este tratamiento se añade nitrógeno, que ha sido obtenido del amoníaco con el fin de endurecer la superficie de los aceros (Villalba, 2009).

Cianuración o Carbo-nitruración: En este tratamiento se introduce carbono y nitrógeno, es una mezcla de cementación y nitruración, en este proceso la temperatura debe ser intermedia entre la que se usa para la cementación y la nitruración que es menor que aquella (Villalba, 2009).

Sulfinacion: En este tratamiento se introduce al metal azufre, nitrógeno y carbono con el fin de aumentar la resistencia al desgaste (Villalba, 2009).

En los tratamientos anteriormente enumerados se generan residuos líquidos y sólidos que impactan de forma negativa en el medio ambiente, por ejemplo, del temple se generan lodos de sal resultantes de los baños de aceite usado para enfriar las piezas metálicas en los procesos de Cianuración, carburación o nitrificación líquidas y además se generan vertimientos de agua y

salmueras las cuales se utilizan en este proceso para la Cianuración líquida, carburación líquida y nitruración líquida de las piezas y como último residuo se generan vertidos arrastrados por el temple en procesos que difieren al endurecimiento superficial, esto sin tener en cuenta el aceite usado para enfriar también en el proceso de temple (CEPIS Publicaciones, 1992).

En el proceso de limpieza y revestimiento de las piezas se generan residuos de solventes, cloro, compuestos de azufre y fósforo, fenoles, cresoles y álcalis (Agency Environmental Protection, 1992).

Argumento suficiente para investigar alternativas que sirvan de tratamiento para los graves impactos ambientales causados por la actividad económica de las industrias de tratamiento térmico y los diferentes vertimientos que estas generan en cada una de las etapas de producción. Aunque existen métodos químicos para la mitigación y/o remediación de los impactos, estos resultan ser costosos, puesto que aunque descontaminan una sustancia por acción de otra se vuelve a presentar el mismo problema de contaminación, sin embargo la biotecnología es una buena alternativa en la cual es necesario realizar cultivos de microorganismos e identificar su utilidad en la degradación de los diversos contaminantes, por tal razón es necesario comprender la estructura, nutrición y comportamiento de los microorganismos.

Los microorganismos son los seres más primitivos y numerosos existentes en la tierra, son capaces de colonizar cualquier ambiente desde el de más bajo punto de congelación pasando por el más salado de los ambientes y terminando en el más cálido y son considerados claves en el funcionamiento de los sistemas biológicos y el mantenimiento de la vida sobre el planeta; estos se agrupan en dos conjuntos, los procariotas y los eucariotas, al grupo de los procariotas pertenecen las bacterias las cuales son esenciales en la mayoría de investigaciones (Montaño, Sandoval, & Sánchez, 2010).

Para la degradación biológica del cianuro se aprovecha la capacidad que tienen ciertos microorganismos principalmente las bacterias para utilizar compuestos cianurados como su principal fuente de carbono y nitrógeno lo que convierte el material tóxico en algo totalmente inofensivo. El cianuro al ser degradado termina en la formación de amonio pues los microorganismos que se encargan de degradar esta sustancia tóxica poseen sistemas enzimáticos los cuales les permiten sobrevivir en ambientes extremos (Guerrero, 2013).

Básicamente, estos microorganismos asimilan el cianuro y lo utilizan como fuente de nitrógeno y/o carbono teniendo como intermediario NH_3 (amoníaco). Son variados los sistemas que los microorganismos utilizan para la degradación del cianuro, en uno de esos mecanismos el microorganismo utiliza la enzima Cianuro hidratasa para convertir al cianuro en formamida la cual por último es transformada en CO_2 y NH_3 . Pero el cianuro también puede ser convertido en -cianoalanina o en un -amino nitrilo por acción de la enzima -cianoalanina sintetasa, seguida de la hidrólisis de productos para liberar un ácido y NH_3 (Guerrero, 2013).

Otra de las rutas que utilizan los microorganismos para la degradación del cianuro monooxigenasa es catalizar la conversión de HCN en cianato (HOCN), lo que las lleva a la descomposición catalítica con otra enzima como intermediaria Cianasa para producir CO_2 y NH_3 , es necesario aclarar que la Cianasa es inductible con el cianato y que es diferente con la enzima cianuro monooxigenasa que no lo es, en el caso de algunas cepas bacterianas transforman directamente el cianuro en CO_2 y NH_3 por medio de la enzima Cianuro dioxigenasa, sin la formación de un cianato que actué como intermediario (Guerrero, 2013).

La degradación microbiana envuelve reacciones enzimáticas y condiciones específicas de concentración de cianuro (CN), niveles de oxígeno, pH, temperatura, nutrientes disponibles, iones metálicos, etc. (Tuya, 2014).

Los microorganismos que tienen la capacidad de degradar cianuro pueden emplear una variedad de fuentes de carbono, estos pueden ser azúcares simples como glucosa, acetato, melaza de caña y fenol, aunque algunos microorganismos utilizan solamente el cianuro como fuente de carbono y nitrógeno (Tuya, 2014).

Metodología

La metodología que va a seguir esta investigación es de tipo exploratorio; ya que se efectúa sobre un tema poco conocido, por lo tanto, sus resultados constituyen una visión aproximada de la capacidad que tienen los microorganismos para degradar el cianuro proveniente de las industrias de tratamientos térmicos. Se divide en tres fases:

Primera fase:

Se baso en un diseño documental, en el cual mediante una revisión bibliográfica del estado del arte de la degradación del cianuro se identificó el medio de cultivo que permite aislar los microorganismos capaces de degradar cianuro.

Segunda fase:

Se compone de una fase experimental, en la que se buscó identificar los microorganismos capaces de degradar cianuro, obtenidos de los vertimientos industriales de una industria de tratamientos térmicos, con el fin de estudiar su morfología, mediante la caracterización microscópica y macroscópica de las cepas aisladas en el laboratorio, para lo cual se prosiguió con los siguientes pasos:

- 1- Muestreo de los vertimientos industriales provenientes de una industria de tratamientos térmicos de Bogotá.
- 2- Cultivo de los microorganismos con capacidad de resistir a concentraciones de cianuro, utilizando el medio de cultivo identificado en la primera fase.

Aislamiento físico por cultivos sólidos diferenciados de los microorganismos con capacidad degradadora de cianuro, utilizando la técnica aséptica (Urzúa, 2014) cuyos pasos a seguir se describen a continuación:

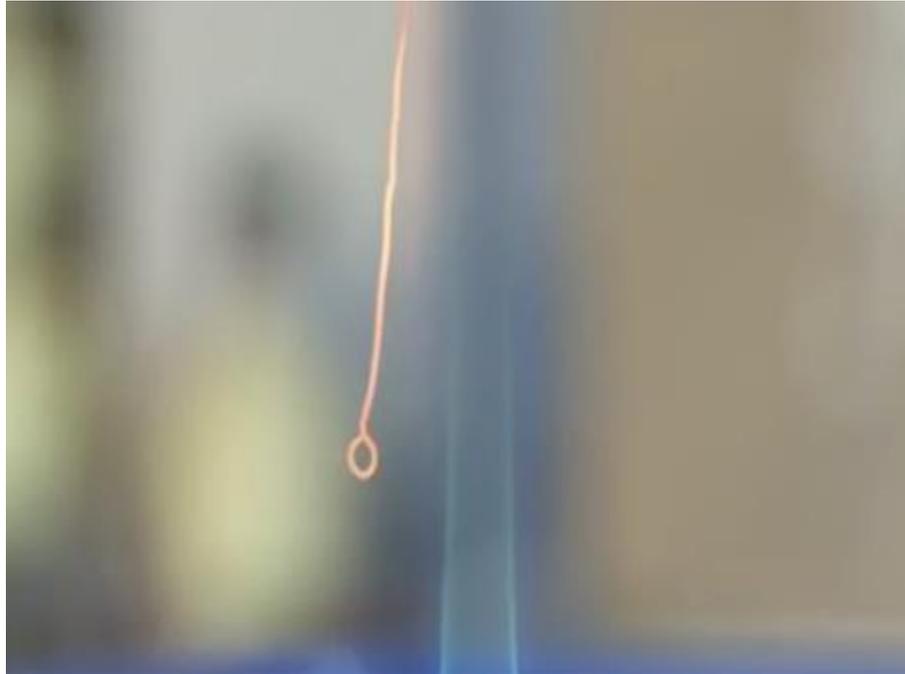
- a) Se limpia y desinfecta el área de trabajo con alcohol antiséptico, luego se organiza y etiqueta el material necesario.
- b) Se crea un área aséptica donde se pueda manipular el material estéril, para esto se enciende el mechero y se ubican los 12cm del área aséptica que proporciona este.

Ilustración 1 Técnica aséptica, establecimiento del área de trabajo



Fuente: (Urzúa, 2014)

- c) Se esteriliza el asa bacteriológica acercando su punta al mechero y se calienta hasta que esté al rojo vivo colocándola en forma vertical, permaneciendo así durante unos segundos. Posteriormente se deja enfriar el asa, manteniéndola siempre dentro de la zona de asepsia.

Ilustración 2 Técnica aséptica, esterilización del asa bacteriológica

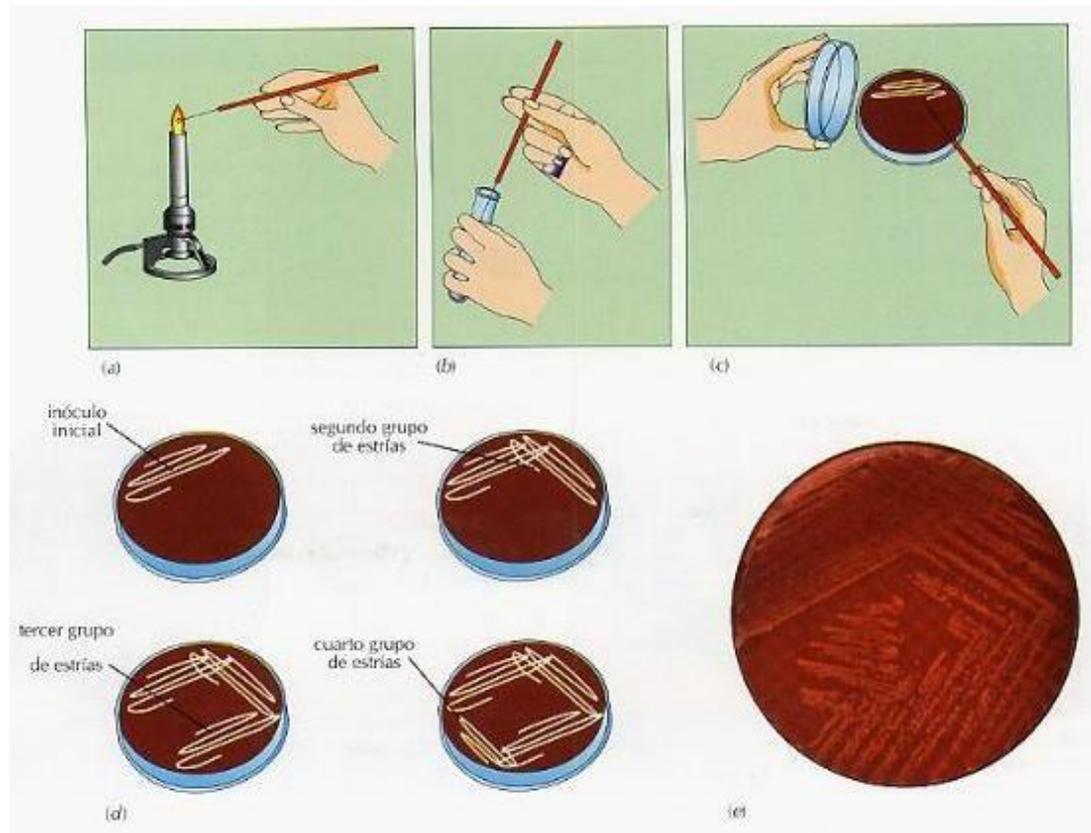
Fuente: (Urzúa, 2014)

- d) Con la otra mano se toma el tubo de ensayo donde se encuentra la muestra de interés y se flamea la boca del tubo, para evitar que los microorganismos que se encuentren en la parte externa del mismo contaminen el inóculo.
- e) Se introducen el asa bacteriológica, se enfría dentro del tubo y se toma el inóculo retirando el asa en forma recta teniendo cuidado de no tocar las paredes del tubo y se mantiene dentro del área aséptica.
- f) Una vez se tiene la muestra, se flamea la boca del tubo y se cierra, realizando todo en la zona de asepsia.

Para el paso del inóculo a la caja de Petri, se usa el método del agotamiento por estría (Microbiololigiabohio, 2017) en todas las cajas necesarias para la investigación, cuyos pasos se enumeran a continuación:

- a) Esterilizar a fuego el asa bacteriológica y dejar enfriar por unos pocos minutos.
- b) Se carga el asa bacteriológica con muestra del agua residual teniendo en cuenta que en la punta del asa quede una gota del agua residual la cual será sembrada en el medio.
- c) En medio de cultivo sólido (caja de Petri) se realizan una serie de estrías en zigzag con ayuda del asa bacteriológica y se tapa la caja de Petri girándola 90°

Ilustración 3 Siembra por agotamiento de asa en zigzag



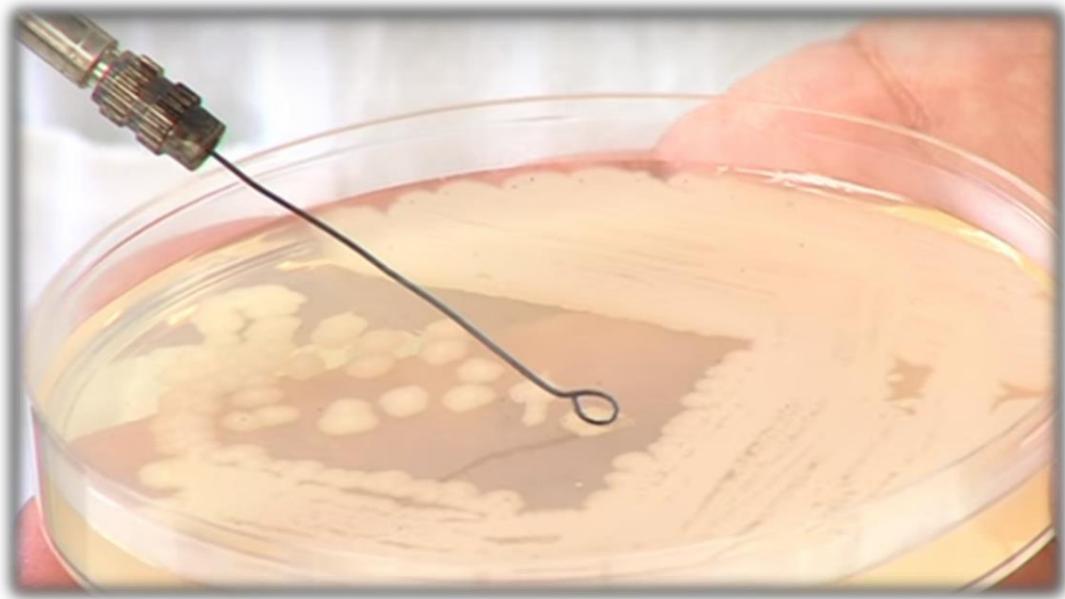
Fuente: Jiménez A., 2011

- d) Se esteriliza nuevamente el asa bacteriológica como se indica en el numeral a y se procede a enfriar el asa en una zona donde no haya presencia de muestra (esquina de la caja). Luego se arrastra un poco de muestra y se realizan estrías en forma de zigzag.
- e) Finalmente, se repite el procedimiento en los cuatro cuadrantes de la caja de Petri.

3- Inspección de las características macroscópicas de los microorganismos aislados, mediante la tinción Gram (SAVUNISEVILLA, 2014) de la siguiente manera:

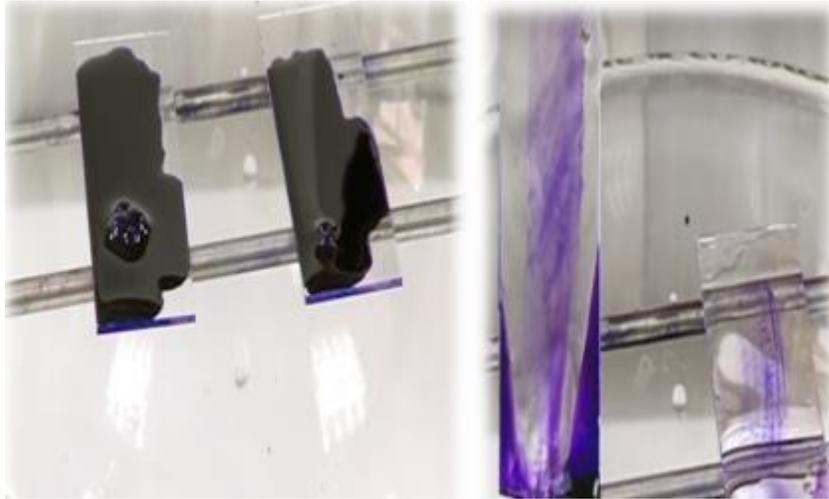
- a) Se toma una pequeña cantidad de muestra desde la placa de Petri con ayuda del asa bacteriológica.

Ilustración 4 Tinción Gram, Frotis bacteriano



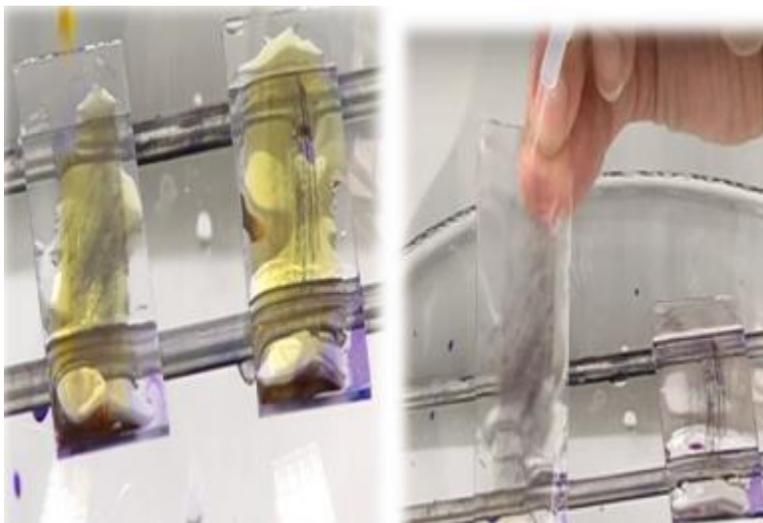
Fuente: Savunisevilla, 2014

- b) Se pone una gota de agua destilada en el portaobjetos y se mezcla con la colonia que se desea observar al microscopio, distribuyéndola por la superficie de la lámina
- c) Se fija el frotis flameando el portaobjetos por el lado que no tiene microorganismo.
- d) Se procede a agregar los reactivos de la coloración en el siguiente orden:
 - 1) Colorante cristal violeta durante 1 minuto, se lava el exceso de cristal violeta con agua destilada y se escurre el portaobjetos.

Ilustración 5 Tinción Gram, Aplicación de Cristal Violeta

Fuente. SAVUNISEVILLA, 2014

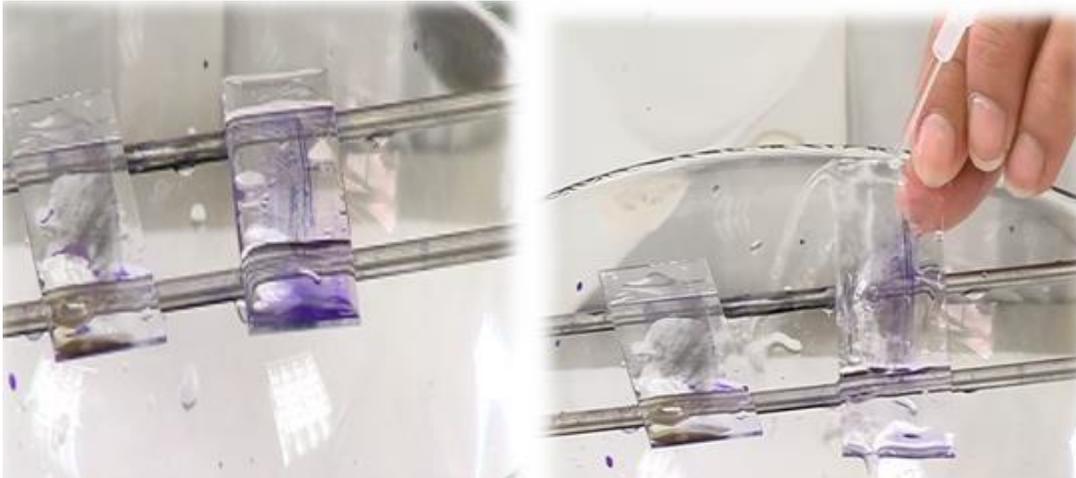
- 2) Se agrega Lugol durante 1 minuto, se elimina el exceso con agua destilada y se escurre el portaobjetos

Ilustración 6 Tinción Gram, Aplicación de Lugol

Fuente. SAVUNISEVILLA, 2014

- 3) Se procede a añadir el alcohol acetona por 30 segundos y se lava de inmediato con agua destilada.

Ilustración 7 Tinción Gram, Aplicación de Alcohol Acetona



Fuente. SAVUNISEVILLA, 2014

- 4) Se añade fucsina por 1 minuto y se lava el exceso de Fucsina con agua destilada y se escurre el portaobjetos

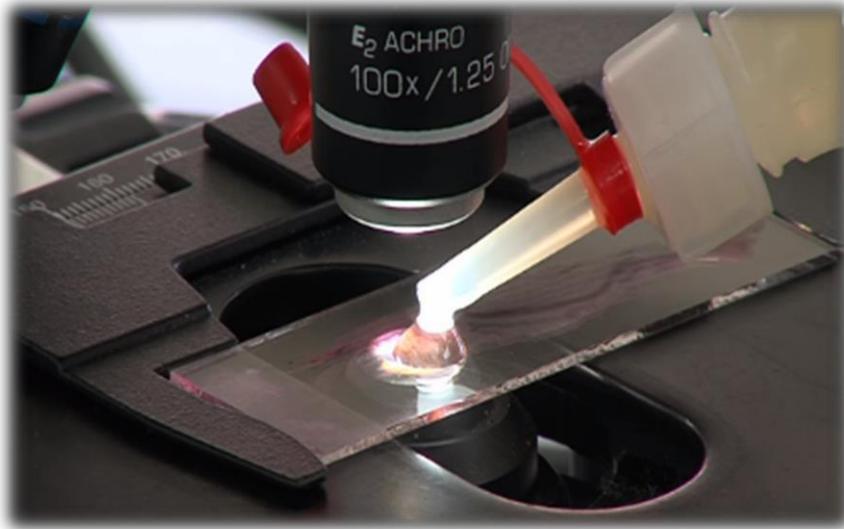
Ilustración 8 Tinción Gram, Aplicación de Fucsina



Fuente. SAVUNISEVILLA, 2014

- e) Se procede a analizar en el microscopio a través del objetivo de 100X. Para este fin se debe aplicar una gota de aceite de inmersión lo cual ayuda a aumentar la resolución del microscopio.

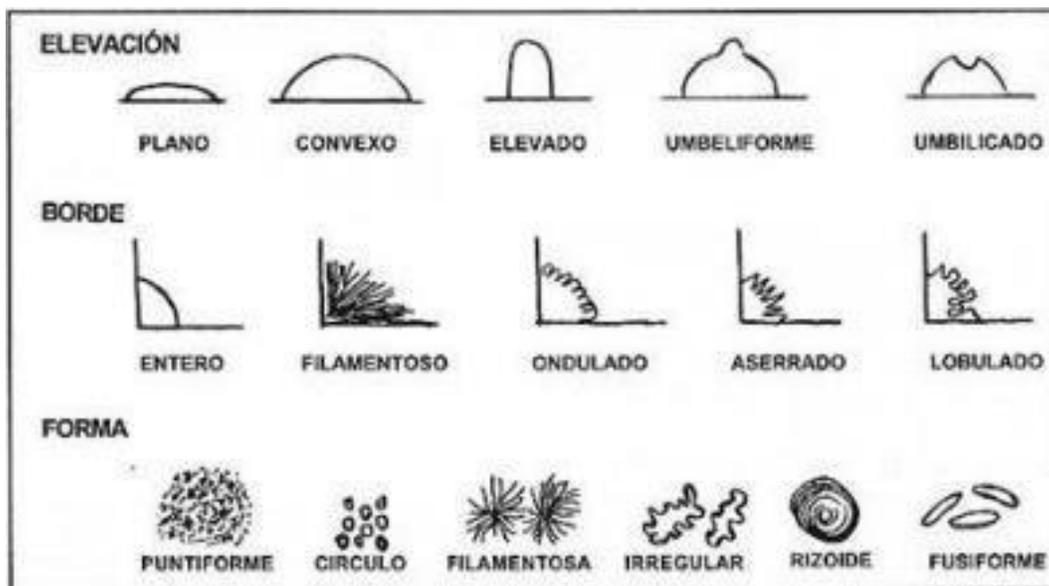
Ilustración 9 Tinción Gram aplicación de aceite de inmersión para observación en el microscopio



Fuente. SAVUNISEVILLA, 2014

Es importante diferenciar entre el crecimiento de una célula individual y el de una población. Este crecimiento celular, se presenta inicialmente con el aumento de tamaño de la célula, y su consecuente división. En un medio de cultivo sólido, es posible evidenciar el crecimiento de conglomerados celulares, originados por una sola unidad funcional viable, en donde a partir de su multiplicación a escala microscópica, es posible que se formen aglomerados celulares con millones de individuos que permiten su observación a simple vista. Para llevar a cabo la caracterización macroscópica se tiene como base comparativa las imágenes contenidas en la ilustración 10.

Ilustración 10. Morfología de las colonias bacterianas



Fuente. Mesa 8. (2015)

Por otra parte, la caracterización microscópica se realiza observando los microorganismos en un microscopio bien sea óptico o electrónico, dicha observación siempre viene acompañada de una tinción, cuya función es mejorar el contraste en la imagen, para permitir una mejor visión en el microscopio. La tinción puede ser de tipo simple, que es en la cual se visualiza un solo color o diferencial, que es en la cual se visualiza más de un color en la muestra (López, y otros, 2014); Para llevar a cabo la caracterización microscópica se tiene como base comparativa las imágenes contenidas en la tabla 1.

Tabla 1. Morfología microscópica de los microorganismos

	Numero	Nombre Morfología
1	1	Cocos
2	2	Diplococos
3	3	Cocos en cadenas
4	4	Cocos en racimos
5	5	Cocos en tétradas
6	6	Cocobacilos
7	7	Bacilos
8	8	Bacilos con bordes redondeados
9	9	Bacilos con bordes rectos
10	10	Bacilos fusiformes
11	11	Vibrios
12	12	Spiniulum
13	13	Borreliia
14	14	Treponema
15	15	Leptospiras

Fuente. Pirez, M & Mota, M. (2008)

Tercera fase:

En esta fase experimental se procede a verificar la capacidad degradadora de cianuro de los microorganismos aislados, mediante el cultivo de los mismos en un medio líquido (según la formulación identificada en la primera fase), Así se realizaron cultivos de la cepa aislada resistente al cianuro, en medios líquidos con una concentración del contaminante de 260 ppm. Para monitorear la degradación, se tomaron muestras cada 24 horas, a partir de las cuales se cuantificó la concentración de cianuro presente, mediante técnicas colorimétricas.

La determinación se realizó utilizando el colorímetro de pilas y corriente marca hanna C-200 series (ilustración 11) cuyas especificaciones son: Rango de medición para cianuro desde 0.000 a 0.200

mg/L cuya resolución es de 0.001 mg/L este cuenta con una precisión de ± 0.005 mg/L (3% de la lectura). El colorímetro cuenta con un diodo emisor de luz a 610 nm con una banda de cuero para las interferencias, el método utilizado por el colorímetro es una adaptación del método piridina-pirazolona del Standart methods for the examination of Water and wastewater, 18ª edición.

Ilustración 11 colorímetro de pilas marca hanna C-200 series



Fuente. Autor

A continuación, se describe el procedimiento establecido por el fabricante para medición de cianuro:

- a) Se enciende el colorímetro
- b) Se selecciona el número de programa correspondiente a cianuro (P13) en la línea inferior del display pulsando program y la flecha arriba
- c) Se ubica la cubeta en el alojamiento asegurándose de que la muesca de la tapa esta sobre la ranura
- d) Se pulsa la tecla ZERO y el mensaje “SIP” parpadeara en el display por unos segundos posteriormente el colorímetro mostrara en el display “-0.0-” en este momento el equipo este puesto a cero y listo para medir

- e) Se retira la cubeta y se añade el contenido de una cucharada de reactivo de cianuro HI 93714A teniendo cuidado de no sobrellenar la cuchara con el reactivo y de cerrar la tapa de inmediato para prevenir el escape de gas cloro
- f) Se agita suavemente la cubeta por unos treinta segundos
- g) Se espera durante treinta segundos y se procede a añadir el contenido de un paquete de reactivo HI 93714B
- h) Se agita la muestra durante diez segundos
- i) De inmediato se añade un paquete de reactivo HI 93714C y se tapa
- j) Se agita vigorosamente durante veinte segundos
- k) Se inserta nuevamente la cubeta en el instrumento
- l) Se pulsa la tecla TIMED y el colorímetro muestra la cuenta atrás previa a la medida, o alternativamente se espera durante veinticinco minutos y se pulsa la tecla READ DIRECT en ambos casos el mensaje "SIP" parpadeara durante la medida.

Nota: El colorímetro de pilas y corriente marca hanna C-200 series visualiza directamente en el display la concentración en mg/L por tal motivo para pasar el resultado a ppm de cianuro potásico (KCN) se multiplica por 2.5.

Interferencias: las interferencias en la medición con el colorímetro de pilas y corriente marca hanna C-200 series se pueden deber a demasiada turbidez lo que causara lecturas elevadas, presencia de agentes oxidantes como el cromo y reductores como es el caso de sulfuro o el dióxido de sulfuro, muestras con un pH elevado deben ser ajustadas a pH aproximado de 7 antes realizar la medición.

Resultados y análisis

Las técnicas biotecnológicas permiten conocer las características de los microorganismos, su comportamiento y su utilidad en los procesos industriales; en este caso puntual, se presentó el aislamiento e identificación de bacterias provenientes de muestras de agua residual que son capaces de degradar el cianuro resultante de los vertimientos de una industria de tratamiento térmico. Para establecer la utilidad de las cepas bacterianas halladas se llevó a cabo un proceso investigativo el cual se describe a continuación:

Primera fase:

En la primera fase de este proyecto de investigación se realizó la inspección y el análisis documental de fuentes académicas sobre medios de cultivo para bacterias degradadoras de cianuro con la finalidad de obtener resultados confiables para conocer y comparar los parámetros necesarios para elegir una formulación adecuada del medio a utilizar en el proceso. De esta revisión bibliográfica se obtuvo información de investigaciones de diferentes autores y se revisó la metodología empleada para así determinar cuál es más acorde al proyecto. El resultado de esta revisión documental se presenta a continuación en la tabla 2:

Tabla 2. Revisión documental medio de cultivo para bacterias degradadoras de cianuro

Autor	Trabajo	Formulación	Resultados
(Karamba, y otros, 2015)	Isolation, screening and characterization of cyanide- degrading <i>Serratia marcescens</i> Strain aq07	<p>Medio de Enriquecimiento 4g/L de NaHPO₄, 2.13 g/L de Na₂SO₄, 3.1 g/L de K₂HPO₄, 0.2 mg/L de CL₂.6H₂O, 0.02 g/L de FeCL₃.6H₂O, 0.01 g/L de CaCL₂</p> <p>Medio Tampón 7.2 g/L de KH₂PO₄, 3.5 g/L de K₂HPO₄, 0.3 g/L de FeSO₄.7H₂O, 0.18 g/L de MgCL₂.6H₂O, 0.13 g/L de Co (NO₃) 2.6 H₂O, 0.04 g/L de CaCl₂, 0.4 g/L de ZnSO₄, 0.02 g/L de MoO₃, 0.5 g/L de extracto de levadura, 0.025 de KCN</p>	En esta investigación se tomaron muestras provenientes de suelo y agua del drenaje de las instalaciones de University Putra Malaysia (UPM) inicialmente se aíslan 28 muestras las cuales se someten a un ensayo de remediación para cianuro in vitro por el método espectrofotométrico y de cribado para el suelo cuyo resultado preliminar son 6 cepas bacterianas las cuales se analizan para verificar su capacidad de degradación usando 25 ppm de KCN en un pH neutro llegando así a la conclusión de que solo 3 de estas cepas tienen el mayor potencial de degradación cuyos valores de eficiencia en remoción de cianuro son de entre 60 % y 75%.
(Shabnam, Sohelia, & Zahra, 2014)	Biodegradation of cyanide by a new Isolated Strain under alkaline conditions and optimization by response Surface methodology (RSM)	<p>4.35 g/L de K₂HPO₄, 4 g/L de NaOH, 0.3 g/L de FeSO₄.7H₂O, 0.18 g/L de MgSO₄.7H₂O, 0.13 g/L de CoCL₂, 0.04 g/L de 4H₂O</p> <p>0.02 g/L de MoO₃, 0.1 % extracto de levadura</p>	En esta investigación el muestreo se realiza en aguas residuales provenientes de un horno de coque utilizado en la fabricación de hierro y acero y el cultivo se realiza por el método de enriquecimiento, se obtuvieron 5 cepas capaces de degradar cianuro de las cuales solo la cepa C2 se seleccionó para los de más estudios esto debido a la mayor eficiencia mostrada en comparación con las demás cuya eficiencia para remoción de cianuro es del 86% en condiciones de pH alcalinas.

Autor	Trabajo	Formulación	Resultados
(Hurtado & Berastan, 2012)	Optimización de la biorremediación en relaves de cianuración adicionando nutrientes y microorganismos	2.5 g/L de peptona, 1.25 g/L de glicerol, 0.25 g/L de extracto de levadura, 15 g/L de agar	En esta investigación se obtuvo una eficiencia máxima de 88% para degradación de cianuro, cuyas muestras inoculadas BC (1) y BC (2) tenían adiciones de acetato y fosforo respectivamente, en el caso de la bacteria BC (1) se evidencia una disminución en la capacidad de degradar cianuro caso contrario ocurre en la bacteria etiquetada como BC (2) que gracias a esta adición aumenta la eficiencia en la reducción de cianuro.
(Coley & Zapata, 2006)	Aislamiento y purificación de microorganismos degradadores de cianuro	21 g/L de Na ₂ CO ₃ , 9 g/L de NaHCO ₃ , 5 g/L de NaCl, 0.5 g/L de KNO ₃ , 1 g/L de glucosa, 2 g/L de extracto de malta.	En esta investigación se aíslan 15 microorganismos con una concentración de 1ppm de cianuro de los cuales solo 8 resisten, obteniendo 6 cepas diferentes entre sí; Las cepas bacterianas logran resistir hasta una concentración máxima de 150 ppm y se evidencia en el control una volatilización
(Tiong y otros, 2015)	Cyanide Degradation by <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> Strain W2 Isolated from Mining Effluent	0.99 g/L de K ₂ HPO ₄ , 3.4 g/L de KH ₂ PO ₄ , 0.35 g/L de NaCl, 0.12 g/L de MgSO ₄ ·7H ₂ O, 8.3 g/L de FeSO ₄ , 0.45 g/L de NaCl, 0.5 g/L de KCl, y elementos traza como (Na, 5 g/L de EDTA, 0.05 g/L de ZnO, 0.01 g/L de CuCl ₂ ·2H ₂ O, 0.01 g/L de (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O, 0.05 g/L de FeCl ₃ ·6H ₂ O, 0.99 g/l de NaOH)	En esta investigación se tomaron muestras de la presa de relaves de aguas residuales de una mina de oro ubicada en Kuala Lipis, Pahang Malasia, los microorganismos nativos se evaluaron para cianuro y amoníaco encontrando tres colonias las cuales fueron etiquetadas como W1, W2 e Y que mostraron crecimiento significativo en presencia de cianuro, los aislados se cultivaron en medio de sales minerales fase en la cual la cepa etiquetada como W2 mostro mayor crecimiento por tal motivo se elige para continuar con la investigación se conoce entonces que esta cepa es una bacteria Gram negativa en forma de vara. Para la degradación de cianuro la cepa bacteriana fue sembrada en un pH alcalino y evaluada por el método piridina-pirazolona mostrando una eficiencia de remoción de cianuro del 92%

Fuente: Autor

En el proceso de aislamiento y evaluación de las cepas, se utilizó la formulación implementada por (Tiong, y otros, 2015) la cual, comparada con otras investigaciones se encarga de aumentar gradualmente las concentraciones de cianuro de potasio con el fin de conocer la máxima concentración en la cual se evidencia mayor crecimiento y posteriormente teniendo en cuenta solo la cepa de mayor crecimiento se estudió la capacidad de reducción de las concentraciones de cianuro, experimento en el cual el autor obtuvo un buen porcentaje en la eficiencia para remoción de cianuro ; el medio contiene componentes que son ampliamente utilizados en trabajos exploratorios cuyo objetivo principal es el aislamiento de microorganismos con la capacidad degradadora de cianuro, y al ser este un medio mínimo salino, permite el crecimiento de microorganismos con características específicas, su concentración reducida de fuentes de carbono y nitrógeno, establecen una presión selectiva estimulando el crecimiento microbiano y usando el cianuro como fuente de carbono y/o nitrógeno.

Dependiendo del proceso, se ajustó la concentración final de cianuro en el medio de cultivo. Los reactivos utilizados en la metodología de Tiong permiten realizar la siembra sin necesidad de preparar aparte la solución tampón puesto que el K_2HPO_4 y KH_2PO_4 actúan como tampón de pH; adicionalmente, provee todos los micronutrientes y macronutrientes necesarios para el aislamiento se modifica y se ajusta quedando de la siguiente forma: 1.4 g/L de K_2HPO_4 , 0.38 g/L de KH_2PO_4 , 3 g/L de NaCl, 0.1 g/L de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.02 g/L de $FeSO_4$, 20 g/L de extracto de levadura. Durante la inoculación de los microorganismos el cianuro ha sido suprimido de la fórmula y posteriormente se define para el aislamiento una concentración inicial de 100 ppm de cianuro la cual se aumenta gradualmente, empleando una presión selectiva que permitirá conocer la concentración máxima de cianuro que los microorganismos son capaces de resistir.

Segunda fase:

La experimentación científica consiste en demostrar si la hipótesis que se planteó es cierta; que en este caso es: “En los vertimientos de agua generados por las industrias de tratamiento térmico hay presencia de microorganismos capaces de degradar cianuro”. Para esta demostración es necesario reproducir y observar el fenómeno en el laboratorio, así, se planteó un proceso en el cual se incluyó la toma de muestras en una industria de tratamientos térmicos, a partir de las cuales se hizo una búsqueda de microorganismos potencialmente degradadores de cianuro, mediante la implementación de cultivos, ejerciendo una presión selectiva desde la formulación del medio de cultivo en el cual se determinó una concentración de cianuro, primero para establecer si los microorganismos presentes cuentan con la capacidad fisiológica de desarrollarse en presencia de este contaminante.

Muestreo de los vertimientos industriales.

Se realizó un muestreo puntual, a cada uno de los vertimientos generados en los procesos de tratamiento térmico de una empresa ubicada en la ciudad de Bogotá, teniendo en cuenta las directrices para la preservación y manejo de las muestras de agua de la Norma Técnica Colombiana NTC-ISO 5667-3 (ICONTEC, 2004), manteniendo sus condiciones ambientales fue posteriormente llevada al laboratorio de microbiología de la Universidad Nacional Abierta y a Distancia (UNAD).

Ilustración 12 Toma de muestra de los vertimientos



Enfriamiento
tenifer



Lavado
decapado



Lavado
cementación



Lavado tenifer



Enfriamiento
cementación

Fuente. Autor

Cultivo de los microorganismos con capacidad degradadora de cianuro.

Para el aislamiento de los microorganismos, se tomó una alícuota de cada muestra de agua residual, para hacer un enriquecimiento inicial, utilizando el medio de cultivo identificado en la primera fase y suplementando con una concentración de cianuro de potasio de 100 ppm. Los enriquecimientos de cada muestra se incubaron durante 12 horas aproximadamente, a una temperatura de 37°C y posteriormente se realizaron diluciones seriadas en base 10, a partir de las cuales se inocularon cajas de Petri con medio de cultivo sólido (misma formulación líquida más 15% agar agar), y se incubaron durante 48 horas a una temperatura de 37°C.

Para llevar a cabo el proceso experimental en el laboratorio es necesario contar con materiales limpios y/o estériles los cuales serán utilizados durante todos los procesos que comprenden este proyecto de investigación; dichos elementos se describen en la tabla 3.

Tabla 3. Materiales requeridos para el experimento

Proceso	Elemento de laboratorio	Estado
Preparación de caldo nutritivo y medio solido	Frasco Schott tapa rosca 500 ml	limpio
	Matraz erlenmeyer de 500 ml	limpio
	Balanza analítica	N/A
Siembra e inoculación de microorganismos por estrías	Cajas de Petri x 15 unidades	Estériles
	Asas bacteriológicas	Estéril
	Gradillas	N/A
	Mecheros bunsen	N/A
Colorimetría para cuantificación de CN	Pipetas graduadas	limpio
	Tubos de ensayo tapa rosca	limpio
Diluciones en base 10	Puntas para micropipeta	Estériles
	Micropipeta	N/A
	Micropipeta 100-1000	N/A
	Micropipeta 20-200	N/A
Desinfección de zona de trabajo (asepsia)	Alcohol antiséptico	N/A
	Toallas de cocina	N/A
Protección de cajas con cultivos	Papel vinipel	N/A
Marcado de material	Marcador	N/A
Tinción Gram	Laminas portaobjetos	Limpio
	Microscopio óptico	N/A
Fundición de medio sólido para servir cajas de Petri	Plancha de calentamiento	N/A
Proceso de esterilización de medios y material en autoclave	Bandas elásticas y papel craft	Limpio

Fuente. Autor

Aislamiento físico por cultivos sólidos diferenciados.

El medio utilizado para la siembra y aislamiento fue el identificado en la primera fase de esta investigación el cual se esterilizó en autoclave con el método de calor húmedo y posteriormente fue servido en las cajas de Petri teniendo en cuenta la técnica aséptica para evitar contaminación (Urzúa, 2014). Posteriormente se realizó el respectivo aislamiento de las cepas por el método de agotamiento por estrías ([ver metodología segunda fase](#)) y se incubó a 37°C durante 24 horas, después de transcurridas las 24 horas, se realiza la observación macroscópica de cada una de las

cepas aisladas en las cuales inicialmente se obtuvo crecimientos masivos en las cajas de menor dilución, de las cuales no fue posible identificar colonias aisladas para su purificación, por tanto, se tomaron en cuenta las cajas de medio de cultivo en las que se inocularon las mayores diluciones (10^{-4} , 10^{-5}) ya que en estas últimas se observó el crecimiento de colonias con diferentes morfologías macroscópicas, y fácilmente identificables unas de otras, hecho que facilitó la purificación de estas.

Inspección de las características macroscópicas de los microorganismos aislados.

De acuerdo con la metodología establecida, se procedió a realizar la descripción macroscópica de las colonias aisladas, cuyos resultados se presentan en la tabla 4.

Tabla 4. Características macroscópicas de las cepas aisladas.

Muestra	#	Color	Borde	Elevación	Margen
Lavado tenifer	1A	Blanca	Filamentosa	Plana	Filamentoso
	1B	Blanca	Puntiforme	Plana	Entero
Lavado cementación	2	Blanca	Puntiforme	Plana	Entero
Enfriamiento cementación	3	Blanca	Puntiforme	Plana	Entero
Lavado decapado	4A	Blanca	Filamentosa	Plana	Filamentoso

Muestra	#	Color	Borde	Elevación	Margen
	4B	Blanca	Circular	Plana	Entero
Enfriamiento tenifer	5A	Blanca	Circular	Plana	Entero
	5B	Centro blanco borde transparente	Irregular	Plana	Ondulado
	5C	Transparente	Irregular	Plana	Ondulado

Fuente. Autor

Finalmente, para confirmar su resistencia a mayores concentraciones de cianuro se sembraron las cepas aisladas en medio líquido al cual se aumentó la concentración de cianuro a 260 ppm, con el fin de verificar la resistencia de las mismas a este contaminante; Observando que la cepa 2, proveniente del agua residual del lavado del proceso de cementación, fue la única que presentó crecimiento; en las demás no se evidenció turbidez consecuente de la duplicación celular, lo que conlleva a deducir que estas últimas no son resistentes al cianuro, probablemente porque no tienen las características genotípicas y fenotípicas para resistir y duplicarse a una concentración de cianuro de 260ppm.

Al aumentar la concentración de cianuro en 500 ppm, la Cepa 2 detuvo su crecimiento, asociado a las justificaciones dadas anteriormente; Sin embargo, se realizó una investigación sobre el contenido de cianuro en los vertimientos provenientes de los procesos de decapado, tenifer y cementación los valores en partes por millón suelen ser del orden de 250 ppm (US. Government Printing Office, 1992), o estar entre 1 a 10 ppm (J, 2002) o de 100 ppm (California Department of toxic substances control, 1993); teniendo en cuenta lo anterior se puede evidenciar que el

microorganismo (cepa 2) cuya resistencia máxima (260 ppm) obtenida mediante el aumento gradual de las concentraciones de cianuro es acorde con las concentraciones utilizadas en los procesos anteriormente nombrados lo cual respaldaría los resultados obtenidos experimentalmente.

A modo complementario, el inóculo de la cepa 2 con una concentración de 260 ppm muestra presencia de turbidez y de gran cantidad de sedimento (ver ilustración 13, círculo rojo) lo cual a primera luz permite deducir que la cepa anteriormente nombrada no presenta ningún inconveniente para sobrevivir a una concentración de 260 ppm.

Ilustración 13 Aislados de las cepas muestreadas

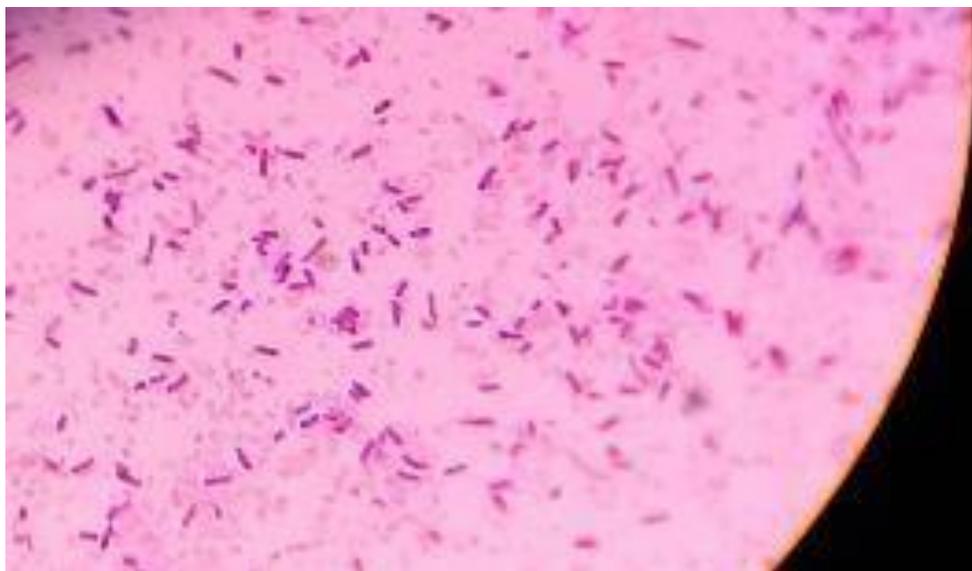


Fuente. Autor

La caracterización microscópica se realizó teniendo en cuenta solo la Cepa 2, la cual presentó resistencia a una concentración de 260 ppm de cianuro. Se realizó la tinción de Gram en la cual se identificó la presencia de bacilos Gram positivos, los cuales se caracterizan por tener una capa

gruesa cuyo tamaño esta de entre 0.02 a 0.06 μm en forma de multicapa, la clasificación de Gram positivas la reciben debido al contenido de peptidoglicano (Pirez, 2002) , que observados al microscopio presentan estructuras en forma de bastón y una coloración rosada (Ilustración 14).

Ilustración 14 Características Microscópicas de la cepa 2



Fuente. Autor

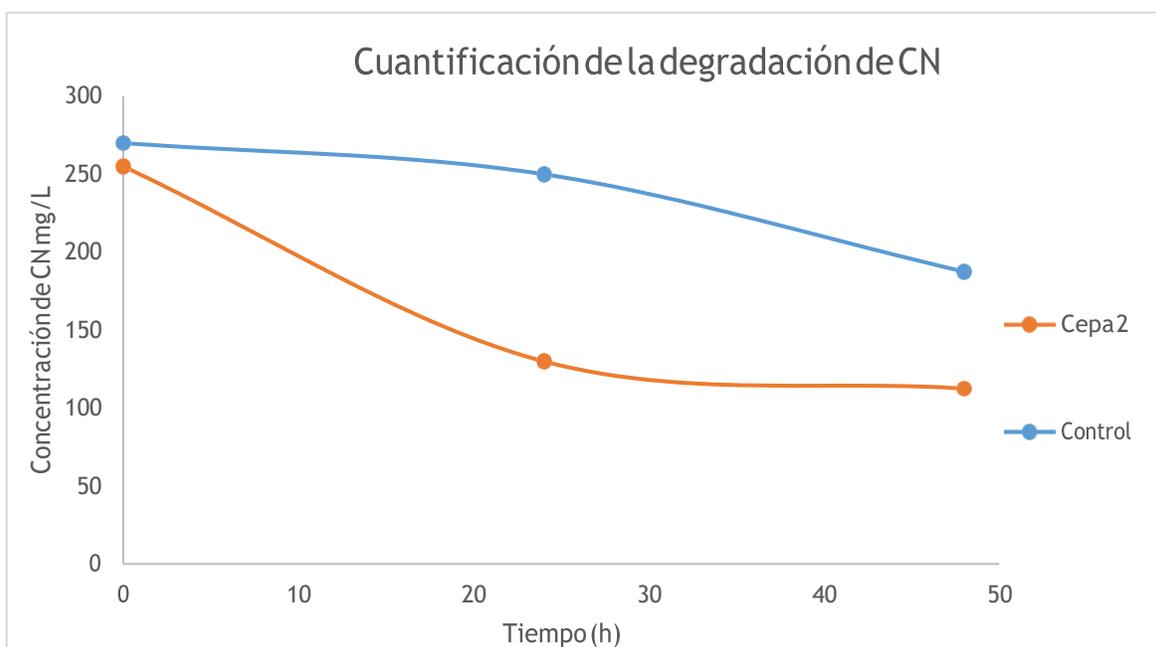
Tercera fase:

En esta fase experimental se procedió a evaluar la capacidad degradadora de cianuro de los microorganismos aislados, mediante el paso de estos a un medio líquido que contiene una concentración de cianuro de 260 ppm (según la formulación identificada en la primera fase), la cual se monitoreó cada 24 horas durante un lapso de tiempo de 48 horas, llevando a cabo la revisión por colorimetría ([ver metodología fase tres](#)), hecho que permite decir si se presenta una degradación del cianuro.

Para verificar la capacidad degradadora de cianuro de la cepa identificada, se sembró el control y la Cepa 2 en medio líquido suplementado con la adición de 260ppm de cianuro y de 4g/L de glucosa como fuente de energía y carbono (Bradley & Bennet, 1982), y se redujo el extracto de levadura a 0.2 g/L; esto de acuerdo a (Akcil, Karahan, Ciftci, & Sagdic, 2003), quien establece que los microorganismos degradadores de cianuro lo utilizan como fuente de nitrógeno.

Se procedió a cuantificar la cantidad de cianuro presente en las muestras control y cepa 2 con ayuda del colorímetro de pilas y corriente marca hanna C-200 series ([ver metodología fase tres](#)) cuyos resultados se relacionan en la Ilustración 15.

Ilustración 15 degradación de cianuro cepa 2



Fuente. Autor

Teniendo en cuenta la gráfica de la Ilustración 15, la cepa 2 suplementada con una concentración de 260 ppm de cianuro, 24 horas después muestra una reducción en la concentración de cianuro cuyo valor ahora reportado es de 130 ppm, finalmente transcurrido un tiempo de 48 horas la

concentración de cianuro se reduce hasta 112,5 ppm, este comportamiento mostrado por la cepa permite establecer que aparte de ser resistente al cianuro, también tendría la capacidad para degradarlo.

Los anteriores resultados fueron comparados con los obtenidos en las siguientes investigaciones:

En la investigación de (Morillo & Guevara, 2015) se realizó un cultivo bacteriano del género de las *Pseudomonas* provenientes de una muestra de agua residual con pH ácido, utilizados como opción de tratamiento biológico para la descontaminación de aguas residuales, con una disminución en la concentración de cianuro a una cantidad de 312 ppm.

En la investigación de (Restrepo, Montoya, & Muñoz, 2006) se emplea un aislamiento de la cepa bacteriana *Pseudomonas fluorescens* procedente de una planta de beneficio de oro ubicada en el municipio de Segovia Antioquia en Colombia. Esta cepa bacteriana fue tratada experimentalmente en condiciones controladas durante un lapso máximo de 24 horas, cuyo resultado es una degradación de cianuro del 50% en reactores que inicialmente contenían concentraciones de 400 y 500 ppm de cianuro.

De acuerdo con lo anterior, se puede establecer que los niveles de degradación de cianuro obtenidos en esta investigación son valores semejantes a los obtenidos por los autores anteriormente nombrados, apuntando así, a que la nueva cepa bacteriana identificada en esta investigación es útil para degradar cianuro lo cual se fundamenta en que el comportamiento mostrado por la cepa en la fase experimental es el siguiente. En el tiempo 0 la concentración de cianuro suplementada fue de 260 ppm la cual después de 24 horas evidencia una reducción de 130 ppm y 48 horas después la reducción en la concentración de cianuro registrada es un valor de 112.5 ppm, lo que da un valor de remoción del 57% a las 48 horas.

En la ilustración 15 se evidencia una curva que corresponde al control que se inoculó al mismo tiempo que la cepa 2, dicho control está compuesto por medio líquido sin presencia de microorganismos, el cual se suplementa también con 260 ppm de cianuro. En esta curva se evidencia una disminución en la concentración de cianuro a medida que transcurre el tiempo, esto puede deberse a la degradación natural del cianuro, la cual teóricamente comienza a surtir efecto desde una temperatura de 21°C (Grupo Transmerquim, 2014), teniendo en cuenta que durante el experimento tanto el control abiótico como la cepa se preservaron a una temperatura constante de 37°C en la incubadora, se da la posibilidad de que disminuya la concentración inicial de cianuro contenida por acción de la temperatura.

Conclusiones

El medio de cultivo elegido para iniciar el aislamiento cuenta con la capacidad nutricional suficiente para permitir el crecimiento de los microorganismos con capacidad de resistir al cianuro, dicho medio aporta concentraciones de sales que se encargan de alimentar a las cepas bacterianas obtenidas y aporta fuentes de carbono, nitrógeno y energía suficientes para garantizar el crecimiento y adaptación de estas.

En cuanto a las características morfológicas de las cepas aisladas, al revisar todos los microorganismos aislados se evidencia similitud en cuanto a características como la elevación, la cual es plana para todos los microorganismos y el color, puesto que por lo menos cuatro de ellas son blancas. Por otra parte, en cuanto a bordes y márgenes, se obtienen características morfológicas diferentes para todas las cepas motivo por el cual no es posible establecer que alguna de estas características sea predominante en las cepas.

Al aumentar la concentración de cianuro en 260 ppm se evidencia que solo la cepa 2 es resistente a esta concentración, lo que permite establecer que las características fisiológicas de la misma son adecuadas para la subsistencia en un ambiente con presencia de cianuro, motivo por el cual es capaz de adaptarse a este ambiente; escenario que permite inferir que este bacilo Gram positivo, tiene la capacidad de degradar cianuro.

Los resultados obtenidos experimentalmente permiten fundar que se obtuvo una reducción en la concentración inicial de cianuro contenidas en el medio líquido utilizado para esta investigación, posteriormente al cotejar con información proveniente de fuentes académicas confiables permite

concluir que la cepa 2, hallada en este proyecto de investigación tiene la capacidad de degradar el cianuro.

Después de realizar los experimentos y el análisis correspondiente de los resultados obtenidos durante la investigación, se comprueba la relevancia que esto aporta al campo de la biotecnología; ya que permite abarcar otras opciones de tratamiento para los problemas de contaminación de las fuentes hídricas por aguas residuales contaminadas con cianuro; lo que termina por contribuir a la conservación del medio ambiente, la preservación del recurso hídrico y la sostenibilidad de los ecosistemas.

Recomendaciones

Es recomendable continuar realizando investigaciones con la cepa 2 que permitan establecer la taxonomía a la cual pertenece, para obtener una información más detallada sobre la genómica del microorganismo, descartar su posible toxicidad para el medio ambiente y establecer las posibles características que esta cepa comparte con las demás especies de cepas bacterianas que cuentan con la capacidad para degradar cianuro.

También se recomienda realizar una investigación en la cual la cepa 2 sea empleada para vertimientos que se encuentren a diferentes rangos de temperatura, lo que permitirá conocer el comportamiento de la cepa hallada según la temperatura a la cual deba adaptarse.

Se recomienda realizar una investigación que permita establecer los porcentajes de remoción de cianuro que la cepa alcanza en periodos de tiempo más largos, bajo condiciones controladas, utilizando otros métodos para la determinación de cianuro. Esto con el fin de analizar los resultados, reactivos e interferencias que se presentan entre las diferentes técnicas y al mismo tiempo identificar diferencias y/o similitudes que se pueden presentar entre los resultados obtenidos. Lo que permitiría desarrollar aún más el conocimiento en lo concerniente no solo a la cepa sino también a los diferentes métodos tanto cualitativos como cuantitativos para detección de cianuro, y de esta manera enriquecer el conocimiento sobre el tema para uso de la comunidad académica.

Por otra parte, la cepa hallada puede ser evaluada en contraposición con otros microorganismos que hayan sido identificados y utilizados en otras investigaciones, con el fin de comparar los

porcentajes de degradación de cianuro y así establecer cual cepa tiene una mejor capacidad de degradación.

Adicional mente, es significativo conocer el comportamiento de la cepa hallada para mayores concentraciones de cianuro, motivo por el cual, es preciso investigar los diferentes elementos traza, macronutrientes y de más necesidades nutricionales especiales que le permitan a esta cepa sobrevivir y adaptarse al medio proporcionado.

Por último, las técnicas de biorremediación permiten descontaminar aguas residuales por acción de microorganismos, motivo por el cual se recomienda realizar una investigación en la cual la cepa 2 sea empleada para biorremediar los vertimientos, estableciendo así las diferencias, ventajas, desventajas y niveles de eficiencia que puede ofrecer la cepa según la técnica ex situ o in situ.

Referencias bibliográficas

Agencia para Sustancias Tóxicas y el registro de Enfermedades. (2016). *Resúmenes de Salud Pública- Cianuro (Cyanide)*. Obtenido de www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs8.html

Agency Environmental Protection. (1992). *Guides to Pollution Prevention Metal Casting and Heat-Treating Industry*. Obtenido de <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyNET.exe/30004KGC.TXT?ZyActionD=ZyDocument&Client=EPA&Index=1991+Thru+1994&Docs=&Query=&Time=&EndTime=&SearchMethod=1&TocRestrict=n&Toc=&TocEntry=&QField=&QFieldYear=&QFieldMonth=&QFieldDay=&IntQFieldOp=0&ExtQFieldOp=0&XmlQuery=>

Akcil, A., Karahan, A., Ciftci, H., & Sagdic, O. (2003). Biological treatment of cyanide by natural isolated bacteria (*Pseudomonas* sp.). *Minerals Engineering*, 16(7), 643-649. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0892687503001018>

Barrick. (28 de junio de 2012). *Cianuro*. Obtenido de <https://barricklatam.com/barrick/medioambiente/cianuro/cianuro/2012-06-28/095522.html>

Bradley, F., & Bennet, T. (1982). *BIOQUIMICA*. España: Editorial Reverte S.A. Obtenido de https://books.google.com.co/books?id=aDPwknCkRgC&pg=PA461&lpg=PA461&dq=glucosa+como+fuentes+de+energia+y+carbono+para+bacterias&source=bl&ots=DISRuFX0DY&sig=Op9qcxCDkUn_EdtqZd7tW8ciCOw&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwjy4JifpMzaAhXOzFMKHeMaA-8Q6AEINDAB#v=onepage

California Department of toxic substances control. (1993). *Hazardous waste minimization checklist & assessment manual for the metal finishing industry*. Obtenido de https://www.dtsc.ca.gov/HazardousWaste/Cyanide/upload/P2_SB14MetalFinishingChecklist.pdf

CEPIS Publicaciones. (septiembre de 1992). *Lineamientos para la Prevención de la Contaminación Industrial y Tratamiento Térmico de Metales*. Obtenido de <http://www.bvsde.paho.org/eswww/fulltext/epa/meta/metaguia.html>

Cimiano, G. (01 de julio de 2002). *Introducción a los tratamientos térmicos*. Obtenido de Bautermic, s.a: <http://www.interempresas.net/MetalMecanica/Articulos/2506-Introduccion-a-los-tratamientos-termicos.html>

Coley, T., & Zapata, D. (2006). *Aislamiento y purificación de microorganismos degradadores*. Obtenido de

- https://repository.eafit.edu.co/bitstream/handle/10784/391/Tatiana_ColeyBenjumea_2006.pdf;sequence=1
- EL PAIS. (14 de febrero de 2000). El Derrame de Cianuro Procedente de Rumania Llega al Danubio a su Paso por Yugoslavia las Autoridades cortan el Suministro de Agua Potable a 2,5 Millones de Personas. *Sociedad* . Obtenido de https://elpais.com/diario/2000/02/14/sociedad/950482804_850215.html
- Escribano, M. (2016). *Análisis transcriptómico y proteómico de Pseudomonas pseudoalcaligenes CECT5344 en respuesta a cianuro* . Obtenido de helvia.uco.es/xmlui/handle/10396/13825
- Escuela Colombiana de Ingenieria . (2008). *Tratamientos Termicos Protocolo Curso de Materiales* . Obtenido de Facultad de Ingenieria Industrial : http://www.escuelaing.edu.co/uploads/laboratorios/1537_tratamientostermicos2.pdf
- Guerrero, J. (noviembre de 2013). Cianuro: Toxicidad y Destruccion Biologica. *ResearchGate*, 35(1), 22-25. Obtenido de <https://www.researchgate.net/publication/258499252>
- Grupo Transmerquim. (2014). *HOJA DE SEGURIDAD CIANURO DE POTASIO*. Obtenido de <http://www.gtm.net/images/industrial/c/CIANURO%20DE%20POTASIO.pdf>
- Guiza, L. (2011). Perspectiva Juridica de los Impactos Ambientales sobre los Recursos Hidricos provocados por la Mineria en Colombia. *Revista de Opinion Juridica*, 10(spe), 123-139. Obtenido de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-
- Hurtado, J., & Berastan, A. (2012). Optimización de la biorremediación en relaves de cianuración adicionando nutrientes y microorganismos. *Revista Peruana de Biología*, 19(2), 187-192. Obtenido de <http://www.scielo.org.pe/pdf/rpb/v19n2/a10v19n2.pdf>
- Iañez, E. (2005). *Microbiologia general*. Obtenido de <https://www.ugr.es/~eianez/Microbiologia/index.htm>
- ICONTEC. (3 de Noviembre de 2004). *Norma Tecnica Colombiana NTC-ISO 5667-3*. Obtenido de <http://files.control-ambiental5.webnode.com.co/200000140-e3b67e5121/NTC-ISO%205667-03-2004.%20Directrices%20para%20la%20preservacion%20y%20manejo%20de%20muestras.pdf>
- J, D. (2002). Process selection guide . *Surface Hardening of Steels* , 1-16. Obtenido de <http://allaboutmetallurgy.com/wp/wp-content/uploads/2017/04/Surface-Hardening-Treatments-for-Steels.pdf>
- Karamba, K., Shukor, M., Syed, M., Zulkharnain, A., Yasid, N., Khalid, A., & Ahmad, S. (2015). Isolation, screening and characterisation of cyanide-degrading *Serratia marcescens* strain aq07. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences*, 8(2), 401-406. Obtenido de

<https://uitm.pure.elsevier.com/en/publications/isolation-screening-and-characterisation-of-cyanide-degrading-ser>

- Lambert, J., Ramasamy, J., & Paukstelis, J. (1975). Stable reagents for the colorimetric determination of cyanide by modified Koenig reactions. *Analitical Chemistry*, 47(6), 916-918. Obtenido de <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac60356a036>
- LINE, E. O. (1900). *Impactos Ambientales y Actividades Productivas* . Obtenido de <https://www.estrucplan.com.ar/Producciones/imprimir.asp?IdEntrega=310>
- Lopez, L., Hernandez, M., Colin, C., Ortega, S., Gonzalez, G., & Cendejas, R. (2014). Las Tinciones Básicas en el Laboratorio de Microbiología. *Investigacion en Discapacidad*, 3(1), 10-18. Obtenido de <http://www.medigraphic.com/pdfs/invdiss/ir-2014/ir141b.pdf>
- Luque, V., Conrado, V., & Roldan, M. (2016). Biodegradation of Cyanide Wastes From Mining and Jewerly Industries. *Current Opinion in Biotecnology*, 38, 9-13. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958166915001676>
- Microbiololigiabohio. (2017). *Microbiologia Clinica* . Obtenido de <https://microbioligiabohio.wordpress.com/2017/11/03/practica-8-siembra-por-agotamiento-de-asa/>
- Montaño, M., Sandoval, A. C., & Sanchez, J. (2010). Los Microorganismos Pequeños Gigantes. *Elementos*, 17(77), 15. Obtenido de <http://www.elementos.buap.mx/num77/htm/15.htm>
- Montenegro, R. (01 de Enero de 2006). *Efectos Sanitarios y Ambientales Del Cianuro y Otras Sustancias*. Obtenido de <https://noalamina.org/informacion-general/impactos-de-la-mineria/item/120-efectos-sanitarios-y-ambientales-del-cianuro-y-otras-sustancias>
- Morillo, J., & Guevara, J. (2015). Degradacion de cianuro de sodio por Pseudomonas sp. a dos temperaturas y tres pH. *REBIOLEST*, 1(3), 24-32. Obtenido de revistas.unitru.edu.pe/index.php/ECCBB/article/download/892/821
- Mouwerick, M., Stevens, L., Dubleer, M., Basham, W., & Irwin, R. (1997). *Environmental Contaminants Encyclopedia Entry on Cyanide (s) In Gneral*. Obtenido de <https://www.nature.nps.gov/hazardssafety/toxic/cyanide.pdf>
- Panay, A., & Mosquera, C. (2013). *Biorremediación con bacterias degradadoras de*. Obtenido de http://repository.icesi.edu.co/biblioteca_digital/handle/10906/77408
- Perez, J. (1996). Tratamientos termicos de los aceros. San Nicolas de la Garza, Nuevo Leon . Obtenido de <http://eprints.uanl.mx/435/1/1020115008.PDF>
- Pirez, M. (2002). *MORFOLOGIA Y ESTRUCTURA BACTERIANA* . Obtenido de <http://www.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap%209.pdf>

- Protection, A. E. (1990). *Guides to pollution prevention: The Fabricated Metal Products Industry*. Obtenido de National Service Center for Environmental Publications (NSCEP): <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyNET.exe/30004DR1.TXT?ZyActionD=ZyDocument&Client=EPA&Index=1986+Thru+1990&Docs=&Query=&Time=&EndTime=&SearchMethod=1&TocRestrict=n&Toc=&TocEntry=&QField=&QFieldYear=&QFieldMonth=&QFieldDay=&IntQFieldOp=0&ExtQFieldOp=0&XmlQuery=>
- Ramirez, A. (2010). Toxicidad del Cianuro. *anales de la facultad de medicina*, 71(1), 54-61. Obtenido de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-55832010000100011
- Razanamahandry, L., Andrianisa, H., Karoui, H., Kouakou, M., & Hamma, Y. (2016). Biodegradation of free cyanide by bacterial species isolated from cyanide-contaminated artisanal gold mining catchment area in Burkina Faso. *Chemosphere*, 157, 71-78. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004565351630649X>
- Restrepo, O., Montoya, C., & Muñoz, N. (2006). DEgradacion Microbiana de Cinuro Procedente de plantas de Beneficio de Oro Mediante una Cepa Nativa de P.fluorecens. 73(149), 45-51. Obtenido de <http://www.redalyc.org/html/496/49614905/>
- SAVUNISEVILLA (Dirección). (2014). *TICNCION DE GRAM* [Película]. Obtenido de <https://www.youtube.com/watch?v=FceD8FFhuew&feature=youtu.be>
- Shabnam, M., Soelia, Y., & Zahra, G. (2014). Biodegradation of cianide by a new isolated strain under alkaline conditions and optimization by response surface methodology (RSM). *Journal of environmental health science & engineering.*, 12, 2-9. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4036835/>
- Tiong, B., Bahari, Z., Shah, N., Jaafar, J., Ibrahim, Z., & Sahir, S. (2015). Cyanide Degradation by Pseudomonas Pseudoalcaligenes Strain W2 Isolated From Mining Effluent. *Sains Malaysiana*, 44(2), 233-238. Obtenido de http://journalarticle.ukm.my/8307/1/10_Belinda_Tiong.pdf
- Tuya, J. (2014). Evaluacion de la Capacidad Degradativa de Cianuro por Bacterias Alcalofilos Aisladas de los Relaves de la Planta Concentradora de Metales Mesapata CATAC-ANCASH. *Universidad Nacional Mayor de San Marcos*. Obtenido de http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/3641/Tuya_sj.pdf?sequence=1
- Urzúa, C. (23 de enero de 2014). Técnica aséptica. [archivo de video]. México: Universidad Nacional Autónoma de México. Obtenido de <http://mediacampus.cuaed.unam.mx/node/4209>

- US. Government Printing Office . (1992). *Code of Federal Regulations* . Federal Register .
Obtenido de
https://books.google.com.co/books?id=J2G5MVPqwE0C&pg=PA124&lpg=PA124&dq=cyanide+content+in+residues+of+pickling&source=bl&ots=IIVGWaRy8z&sig=cZcUQf4foYb7WrCnIvS_kmgv420&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwIj4ay1vdHaAhVSswFkKHYGJBVcQ6AEINjAB#v=onepage&q=cyanide%20con
- Villalba, I. (2009). *Tratamientos Termicos de los Metales* . Obtenido de Herbastecnologia:
<https://iesvillalbahervastecnologia.files.wordpress.com/2009/09/tratamientos-termicos.pdf>
- Whitlock, J. (1990). Biological Detoxification of Precious Metal Processing Wastewater. *Geomicrobiology Journal*, 8(3-4), 241-249. Obtenido de
<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01490459009377896>