



Cinética en la biodegradación de cianuro por *Bacillus sp.* en condiciones alcalinas

Kinetics of cyanide biodegradation by Bacillus sp. under alkaline conditions

^{1a*} César Julio Cáceda Quiroz

¹ Juan Jesús López Villafuerte

^{1b} María Angélica Pacoticona Ccoa

^{1c} Hellen Olenka Barrios Pacco

^{1d} Renato André Medina Postigo

^{1e} Gisela July Maraza Choque

^{1f} Diana Galeska Farfan Pajuelo

^{1g} Edwin Denis Obando Velarde

^{1h*} Milena Carpio Mamani

ARTÍCULO ORIGINAL

¹ Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, Tacna, Perú.

Correspondencia:

*ccacedaq@unjbg.edu.pe,
mcarpiom@unjbg.edu.pe

^a ORCID: 0000-0002-8822-5954

^b ORCID: 0000-0003-1026-2533

^c ORCID: 0000-0002-4646-7939

^d ORCID: 0000-0002-4902-9782

^e ORCID: 0000-0002-0034-2276

^f ORCID: 0000-0002-7644-9774

^g ORCID: 0000-0001-7717-1906

^h ORCID: 0000-0002-1405-6924

Palabras clave: *Biodegradación, Cianuro, Cinética, Bacillus sp.*

Keywords: *Biodegradation, Cyanide, Kinetics, Bacillus sp.*

Información adicional

Presentado: 23/05/2024

Aprobado: 28/07/2024

RESUMEN

El cianuro es un compuesto altamente tóxico que se utiliza en diversas actividades industriales, que representa un riesgo ambiental difícil de controlar. Este estudio tuvo como objetivo aislar cepas de bacterias nativas provenientes de un pasivo ambiental minero con capacidad de tolerar cianuro y determinar la cinética de biodegradación de cianuro de la cepa más eficiente utilizando un biorreactor tipo batch en condiciones alcalinas. Los resultados permitieron aislar siete cepas bacterianas que tuvieron la capacidad de tolerar hasta 800 ppm de cianuro libre y una eficiencia de biodegradación entre 50% y 96%. La cepa 2 de *Bacillus sp.* presentó una eficiencia de degradación del 96,8% en 36 horas. El análisis de la biodegradación siguió una cinética de primer orden ($k_1 = 0,06649 \text{ mg}/(\text{mg}\cdot\text{h})$, $R_2 = 0,97$), lo cual indica que la cepa presenta gran potencial para su aplicación en estudios de biorremediación de áreas contaminadas con cianuro.

ABSTRACT

Cyanide is a highly toxic compound used in various industrial activities, representing a significant environmental risk that is difficult to manage. This study aimed to isolate native bacterial strains from a mining environmental liability capable of tolerating cyanide and to determine the cyanide biodegradation kinetics of the most efficient strain using a batch-type bioreactor under alkaline conditions. The results allowed the isolation of seven bacterial strains capable of tolerating up to 800 ppm of free cyanide, with biodegradation efficiencies ranging from 50% to 96%. Strain 2 of *Bacillus sp.* showed a degradation efficiency of 96,8% within 36 hours. The biodegradation analysis followed first-order kinetics ($k_1 = 0.06649 \text{ mg}/(\text{mg}\cdot\text{h})$, $R_2 = 0,097$), indicating that this strain has great potential for application in bioremediation studies of cyanide-contaminated areas.

INTRODUCCIÓN

Los compuestos cianurados son ampliamente utilizados en diversos procesos industriales, especialmente en la industria minera en procesos de lixiviación de oro y plata (Luque-Almagro *et al.*, 2011; Luque-Almagro *et al.*, 2016, 2018a). Estos procesos generan grandes cantidades de residuos y elementos tóxicos que tienen un impacto significativo en el ambiente (Agboola *et al.*, 2020). El cianuro es un compuesto químico altamente tóxico en su forma de cianuro libre (CN⁻), ácido cianhídrico (HCN); sin embargo, también pueden formar sales inorgánicas simples (NaCN, KCN), complejos metal-cianuro, tiocianatos y nitrilos (Mudder & Botz, 2004).

Las aguas residuales cianuradas generadas en los procesos de cianuración pueden permanecer sin tratamiento durante años, y cuando no se manejan adecuadamente después del cierre de las operaciones mineras, se convierten en una fuente de contaminación difícil de controlar; además, resultan ser muy costosas (Donato *et al.*, 2008; Jafarpour & Khatami, 2021; Khalid *et al.*, 2017). Esto representa un peligro para la salud humana a través de la bioacumulación y magnificación en la cadena trófica alimentaria (Luo, 2019). Para prevenir y mitigar riesgos, las industrias mineras suelen reutilizar y reciclar los líquidos cianurados (Agboola *et al.*, 2020; Araujo *et al.*, 2022). Sin embargo, es necesario tratar el exceso de cianuro para estabilizarlo antes de que entre en contacto con el ambiente.

En este contexto, es necesario fortalecer los estudios en tratamientos biológicos, debido a que han demostrado una mayor eficiencia de biodegradación (Dash *et al.*, 2009; Pal & Kumar, 2014); además, son más económicos y rápidos que los métodos físicos y químicos (Akcil, 2003; Mekuto *et al.*, 2016); asimismo, los microorganismos pueden eliminar entre el 60% al 100% de cianuro (Alvillo-Rivera *et al.*, 2021), debido a que lo utilizan como sustrato para su crecimiento, lo que se refleja en el aumento de la biomasa, formación de productos menos tóxicos con el ambiente como dióxido de carbono (CO₂), formiato y formamida (Raybuck, 1992; Lovasoa *et al.*, 2017; Mekuto *et al.*, 2016). Las bacterias pueden asimilar el cianuro a través de sus rutas metabólicas específicas, actuando como biocatalizadores en la eliminación del contaminante (Gupta *et al.*, 2010; Luque-Almagro *et al.*, 2018), lo que implica reacciones aeróbicas o anaeróbicas, adsorción, asimilación y transformación en biomasa, entre otros (Dursun & Aksu, 2000).

El potencial biotecnológico de las bacterias radica en que tienen la capacidad de adaptarse y vivir en una amplia variedad de condiciones ambientales extremas, por lo que se han usado en procesos de biorremediación de residuos industriales cianurados. Se han reportado bacterias que tienen la capacidad de degradar cianuro como *Bacillus subtilis* (Cáceda *et al.*, 2023), *Bacillus cereus* (Alvarado-López *et al.*, 2023; Farfan *et al.*, 2023), *Pseudomonas pseudoalcaligenes* (Cobos *et al.*, 2015; Tiong *et al.*, 2015), *Bacillus sp.* (Arce-Inga *et al.*, 2022; Javaheri *et al.*, 2017a), *Pseudomonas putida* (Kandasamy *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2018), *Pseudomonas fluorescens* (Nepali & Bhattarai, 2020) *Pseudomona*, *Pseudomonas aeruginosa* (Razanamahandry *et al.*, 2019), *Bacillus licheniformis* (Uribe-Ramírez *et al.*, 2024), entre otros organismos, las cuales han mostrado una capacidad de degradar hasta 500 ppm de cianuro libre con una eficiencia de degradación superior al 93,5%; también, se han utilizado consorcios bacterianos nativos para degradar cianuro en aguas residuales sintéticas alcalinas (Alvarado-López *et al.*, 2023). Sin embargo, las condiciones de biodegradación difieren según el tamaño del inóculo, condiciones de agitación, temperatura, pH, tipo de reactor, disponibilidad de oxígeno y fuente de carbono (Huertas *et al.*, 2010; Karamba *et al.*, 2016; Moradkhani *et al.*, 2018). Por lo tanto, es necesario estandarizar los parámetros que permitan desarrollar una adecuada biodegradación y optimización del proceso, para que sea considerado como una alternativa eficiente, proporcionando una línea base para el diseño óptimo en la biodegradación (Alvarado-López *et*

al., 2023). También, se deben considerar los parámetros cinéticos que permiten seleccionar esquemas de tratamiento adecuados y escalar los procesos de biodegradación a nivel industrial (Kavamura *et al.*, 2019).

Este estudio tiene como objetivo aislar cepas de bacterias nativas procedentes de un pasivo ambiental minero que presente la capacidad de tolerar cianuro y caracterizar cinéticamente la cepa más eficiente en la biodegradación un biorreactor tipo batch en condiciones alcalinas. En este sentido, se destaca la importancia de utilizar microorganismos nativos debido a que puede aumentar la eficiencia en la biorremediación, al tener un mayor potencial para sobrevivir en el entorno natural (Bôto *et al.*, 2021; Kumar & Gopal, 2015).

MATERIAL Y MÉTODOS

Recolección de muestras, aislamiento y tolerancia a de microorganismos a cianuro libre

La mina corresponde a un pasivo ambiental ubicado en la provincia de Candarave, Tacna, Perú, con coordenadas 19K 0359773 E, 8113655 N y a 4624 m s. n. m. Se recolectaron muestras de residuos mineros a una profundidad de 0 - 10 cm de acuerdo a la guía de muestreo de suelos D.S. No 002-2013-MINAM, en bolsas plásticas de primer uso y fueron transportados al laboratorio de biorremediación de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann.

Para el aislamiento bacteriano se pesó 100 g de muestra de residuo minero, en 200 ml de agua destilada estéril, se agitó durante 1 h a temperatura ambiente a 150 rpm; posteriormente, se transfirió 10 ml del sobrenadante, en 90 ml de medio de enriquecimiento de infusión cerebro corazón (ICC), que se incubó a 30 °C por 24 h. Posteriormente, se sembró en placas con agar tripticasa soya (ATS). Se seleccionaron colonias diferentes, las cuales se analizaron según sus características microscópicas, macroscópicas y pruebas bioquímicas.

Eficiencia en la biodegradación de cianuro libre

Para seleccionar las cepas bacterianas con capacidad de tolerar cianuro se siguieron los procedimientos descritos por Khamar *et al.*, (2015) y Moradkhani *et al.*, (2018), en los que utilizan medio mineral 9M con y sin extracto de levadura, que fueron suplementados con concentraciones de cianuro de 0 a 800 ppm, en intervalos de 100 ppm (es necesario indicar que el carbonato de calcio y sulfuro de magnesio se usaron como trazas para evitar el precipitado del medio 9M). El cianuro fue esterilizado por filtración y el pH del medio fue ajustado a 10,5 con hidróxido de sodio (2N), luego se incubó en un agitador rotatorio a 30 °C a 150 rpm por 24 h, después se procedió a sembrar en placas con Agar Tripticasa Soya (ATS). Posteriormente, se seleccionó la bacteria con mayor capacidad a la tolerancia al cianuro y se repitió el procedimiento utilizando medio mineral 9M sin extracto de levadura en las mismas condiciones descritas anteriormente. Las colonias representativas del aislamiento se mantuvieron en viales con Agar Luria Bertani (ALB) a 4 °C y, posteriormente, fueron conservadas en Caldo Luria Bertani, suplementado con glicerol al 30% (v/v) a -80 °C.

Se procedió a reactivar la cepa en caldo nutritivo incubado a 30 °C por 24 h y con una velocidad de agitación de 150 rpm; posteriormente, se realizó la producción del inóculo y el proceso de biodegradación, utilizando medio 9M suplementado con cianuro como única fuente de nitrógeno.

La biodegradación de cianuro se realizó con un inóculo al 10% (v/v) (Khamar *et al.*, 2015). Se determinó el crecimiento bacteriano mediante densidad óptica (OD) y las mediciones de cianuro, utilizando el método

colorimétrico (APHA-American Public Health Association, 1992) y para la determinación de la eficiencia de biodegradación de cianuro por la bacteria, se utilizó la siguiente fórmula (Kandasamy *et al.*, 2015):

$$DE(\%) = \left(\frac{I_C - F_C}{I_C} \right) \times 100$$

Donde:

DE (%) = eficiencia de degradación en porcentaje

I_C = concentración inicial de cianuro (mg/L)

R_C = concentración final de cianuro (mg/L)

Cinética de crecimiento microbiano y modelos de biodegradación de cianuro

Para la determinación de la cinética microbiana, se parte del supuesto que el cultivo se desarrolla en condiciones adecuadas (inóculo viable, medio nutritivo no limitante, ausencia de inhibidores, ambiente fisicoquímico adecuado) (Panikov, 2019). Después de la inoculación microbiana, se cuantificó el crecimiento exponencial bacteriano en función del tiempo para determinar la velocidad específica de crecimiento mediante regresión lineal, utilizando la siguiente ecuación:

$$\mu = \ln \ln X_t - \ln \ln X_0 / t \quad (1)$$

Dónde:

μ = tasa de crecimiento específica

X_t = concentración de bacteriana en el punto t

X_0 = concentración de bacteriana en el punto 0

t = tiempo operativo

La siguiente fórmula se utilizó para calcular el tiempo de duplicación:

$$dt = \frac{\ln \ln(2)}{\mu} \quad (2)$$

Dónde:

dt = tiempo de duplicación

$\ln(2)$ = es igual a 0,693

μ = tasa de crecimiento específica, según el modelo de Monod (Monod, 1949), la tasa de crecimiento está relacionada con la concentración de un solo sustrato limitante y relaciona el rendimiento con la tasa específica de crecimiento y la tasa específica de utilización de sustrato (Kovar & Egli, 1998; Okpokwasili &

Nweke, 2006). Los cálculos de rendimiento de biomasa por unidad de sustrato ($\frac{Y_X}{S}$), así como la formación de producto por unidad de sustrato ($\frac{Y_P}{X}$), se realizaron según las siguientes ecuaciones.

$$\frac{Y_X}{S} = \frac{X_{max} - X_i}{S_i - S_f}$$

$$\frac{Y_P}{X} = \frac{P_{max} - P_i}{X_f - X_i}$$

$\frac{Y_X}{S}$: rendimiento de biomasa por unidad de sustrato (cianuro)

$\frac{Y_P}{X}$: rendimiento de producto por unidad de biomasa

X_{max} : concentración celular máxima

X_i : concentración inicial de sustrato

S_i : sustrato inicial

S_f : sustrato final

P_{max} : producto de sustrato máximo

P_i : producto inicial

X_f : biomasa final.

Para analizar la cinética de biodegradación de cianuro, se ajustó un modelo de primer orden a los datos experimentales (Singh & Balomajumder, 2016; Alvarado-López *et al.*, 2023). Este modelo asume que la velocidad de reacción es proporcional a la concentración de cianuro, descrita matemáticamente como:

$$S = S_0 e^{-k_1 t}$$

Donde:

S_0 : es la concentración inicial de cianuro (mg/L)

S : es la concentración de cianuro (mg/L)

t : es el tiempo (h)

k_1 (1/h): es la constante de velocidad de primer orden.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico en la biodegradación de cianuro libre se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar diferencias significativas en la eficiencia de la biodegradación. Además, se realizó el análisis de regresión lineal para examinar la relación cuantitativa entre la biodegradación y la concentración inicial de cianuro o el tiempo de degradación. El crecimiento microbiano en función del tiempo se analizó utilizando el modelo de crecimiento exponencial y el modelo cinético de primer orden para la tasa de degradación en la cinética de crecimiento microbiano.

RESULTADOS

Aislamiento de cepas tolerantes a cianuro en un pasivo ambiental

Se obtuvieron siete cepas bacterianas que tuvieron la capacidad de tolerar hasta 800 ppm de cianuro libre (Figura 2A), con una eficiencia de biodegradación que osciló entre 50% y 90% (Figura 2B) en condiciones aerobias y alcalinas. A partir de esta selección se utilizó el microorganismo con mayor capacidad de biodegradación de cianuro libre que correspondía a la cepa 2, la cual tuvo la capacidad de degradar 800 ppm de cianuro libre en aproximadamente 36 h, alcanzando una eficiencia de degradación del 96,8%. Según las características microscópicas y pruebas bioquímicas (Tabla 1). La cepa se identificó como un bacilo Gram positivo (Figura 1A) que tiene la capacidad de fermentar la glucosa y alcalinizar la prueba de TSI, generando acetoina. Además, esta cepa fue positiva para VP, agar almidón, SIM y ácida para rojo de metilo, que correspondería a una cepa de *Bacillus sp.* Asimismo, la viabilidad de la cepa bacteriana se visualizó utilizando una cámara Petroff-Hausser (Figura 1B).

Tabla 1

Pruebas bioquímicas para Bacillus sp.

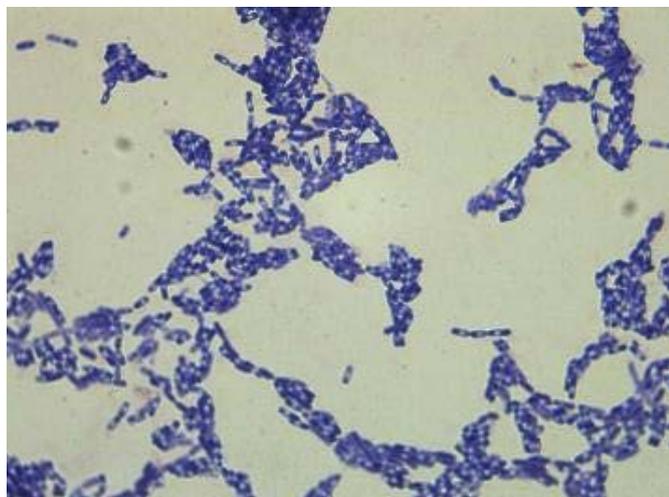
Características	Cepa 2
Gram positivo	+
Catalasa	+
TSI	K/A
LIA	-
VP	+
UREA	+
AA	+
OF	-
SIM	+
Citrato	+
Nitrato	-

Nota. Agar hierro triple azúcar (TSI), agar lisina hierro (LIA), Voges Proskauer (VP), urea, agar almidón (AA), medio basal con glucosa (OF), medio de sulfuro indol para movilidad (SIM), citrato, Gram positiva y la prueba de reducción de nitrato.

Figura 1

Características microscópicas. A: Coloración Gram de Bacillus sp. (100x). B: Observar mediante la cámara Petroff-Hausser (63x)

(A)

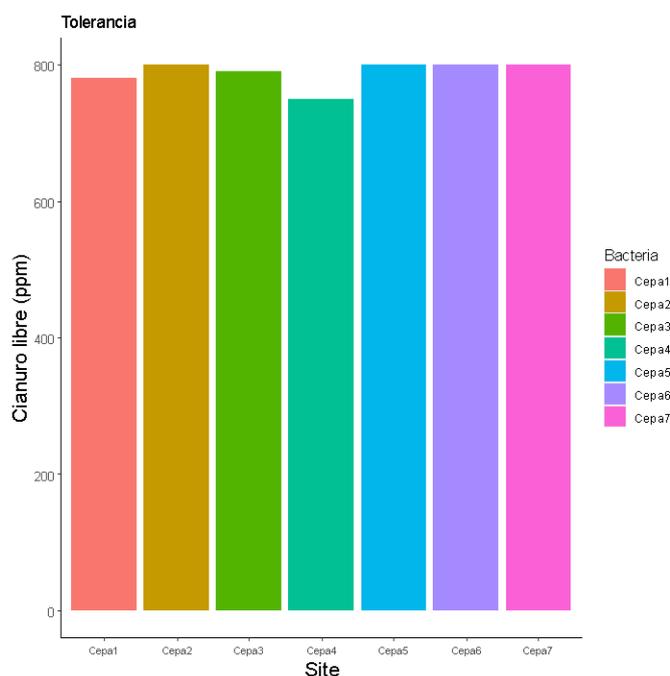


(B)

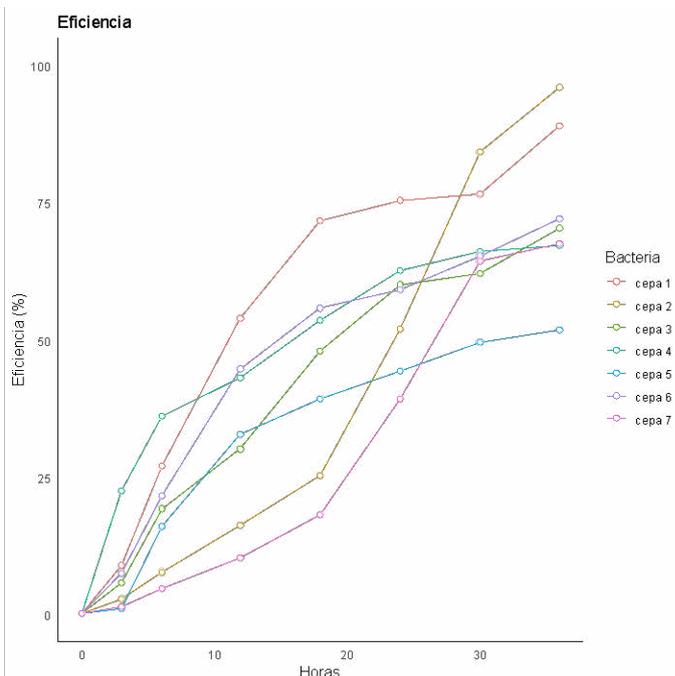
**Figura 2**

Tolerancia (A) y Eficiencia (B) en la degradación de cianuro para las siete cepas de bacterias aisladas.

(A)



(B)

**Eficiencia en la biodegradación de cianuro libre**

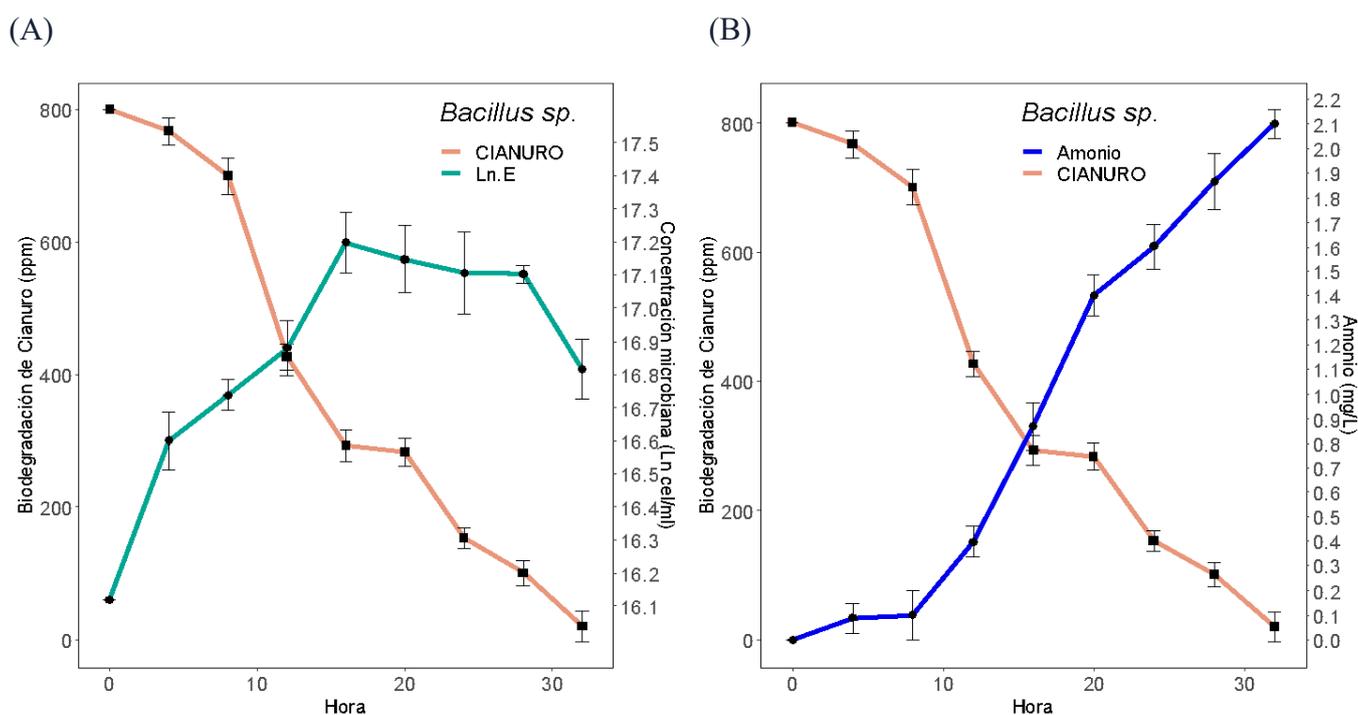
Se determinó la cinética de crecimiento, que se presenta mediante la relación entre la tasa de crecimiento específica y la concentración de cianuro libre. En la Figura 3 se presenta el crecimiento bacteriano en presencia de cianuro, partiendo de una concentración inicial de 800 ppm.

La cepa 2, que corresponde al género *Bacillus sp.*, mostró una eficiencia de degradación del 96,8% con un cianuro residual de 10 ppm y una producción de amonio del 2,1 mg/L.

La relación entre la biodegradación y el crecimiento microbiano se puede observar en la Figura 3A, que indica que la concentración de cianuro disminuye con el tiempo, lo que sugiere la biodegradación del cianuro por la cepa 2, debido a que la concentración microbiana aumenta en las primeras horas y posteriormente disminuye ligeramente. Esto sugiere que la población bacteriana crece inicialmente en respuesta a la disponibilidad de cianuro, pero luego se estabiliza a medida que disminuye la concentración de cianuro. En la Figura 3A, se observa la relación entre la disminución de cianuro y la generación de amonio, que sugiere que a medida que el cianuro es degradado, la concentración de amonio aumenta. Esto indica que el proceso de biodegradación del cianuro está asociado con la producción de amonio, resultando como un subproducto de la actividad metabólica.

Figura 3

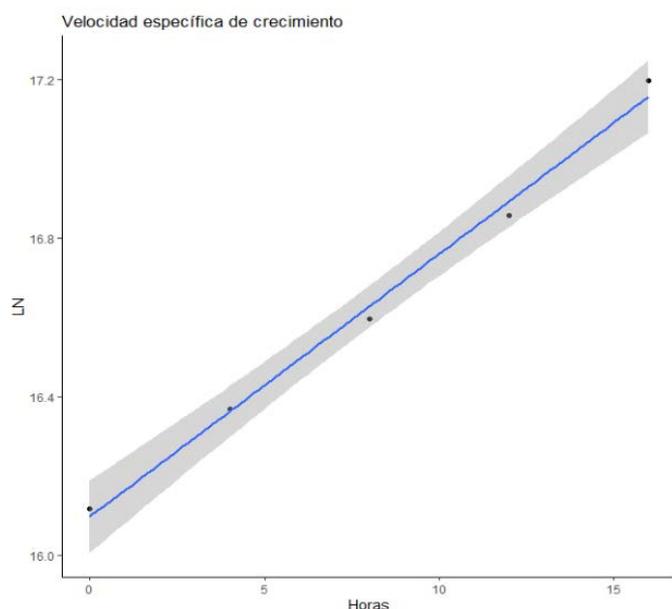
Relación de la biodegradación de cianuro y crecimiento bacteriano (A), biodegradación de cianuro y producción de amonio (B).



Nota: % Volatilización de $[CN^-]$ = < 1%

Es importante destacar que la carga microbiana y la concentración de cianuro (Figura 3) son fundamentales en el proceso de biodegradación de cianuro. En la Figura 4 se visualiza la regresión lineal de *Bacillus sp.* en un medio mineral 9M, suplementado con cianuro en condiciones aireadas y alcalinas. El modelo obtenido presenta una velocidad específica de crecimiento de 0,0662 h⁻¹ (R²=0,9942). En la Tabla 2 se presentan los parámetros calculados. En el proceso se obtuvo la formación de producto de 0,003 mg CN⁻/mg NH₄⁺, que indica que por cada miligramo de amonio producido se requiere 0,003 mg de cianuro libre.

El *Bacillus sp.* presentó una alta capacidad de degradar cianuro, sin embargo, mostró una baja producción de amonio, posiblemente porque se está produciendo la utilización de amonio como fuente de energía.

Figura 4*Velocidad específica de crecimiento de Bacillus sp.***Tabla 2***Parámetros cinéticos*

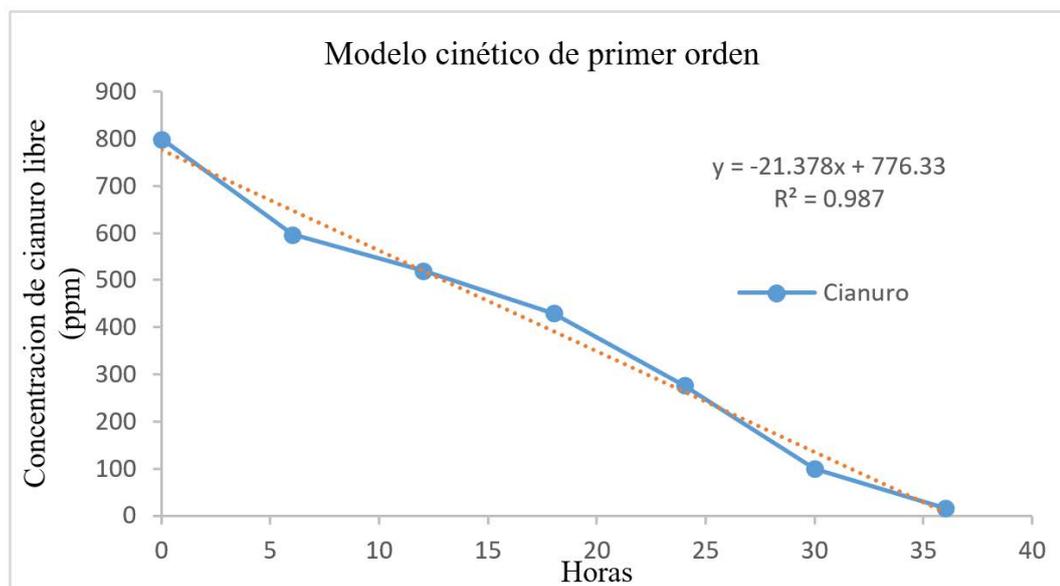
Parámetro	Valor
Velocidad específica de crecimiento (μ)	0,0662 h ⁻¹
Tiempo de duplicación (T_d)	10,46
Rendimiento Y_s	0,003 mg CN ⁻ /mg NH ₄ ⁺
Eficiencia (%) ^p	96,8

Cinética de crecimiento microbiano y modelos de biodegradación de cianuro

El perfil de cinética de biodegradación se ajustó al modelo de primer orden (Figura 5), con una alta correlación ($R^2 > 0,98$), tal como lo reportaron en una correlación de biodegradación cinética de primer orden con una $R^2 > 0,97$ y una constante de velocidad cinética estimada k_1 para la biodegradación de cianuro inicial (CN⁻) fue de $0,12 \pm 0,011$ d⁻¹ (Alvarado-López *et al.*, 2023).

Figura 5

Cinética de degradación de cianuro de *Bacillus sp.*

**DISCUSIÓN**

La generación de residuos cianurados representa un problema significativo, debido a su alta toxicidad y su capacidad para persistir en el ambiente por largos períodos de tiempo. Para abordar este desafío, es fundamental acelerar la degradación de estos residuos mediante el uso de microorganismos nativos, que en los últimos años se han convertido en alternativa prometedora de tratamiento de los compuestos tóxicos (Kumar & Gopal, 2015; Razanamahandry *et al.*, 2016). En este estudio, la cepa nativa aislada demostró la capacidad para tolerar hasta 800 ppm de cianuro libre en condiciones alcalinas. En diversas investigaciones se ha reportado que *Bacillus sp.* toleró 976 ppm (Javaheri *et al.*, 2017b); también, la cepa de *Bacillus sp.* CN-22 mostró una capacidad de tolerar hasta 700 ppm de cianuro (Wu *et al.*, 2014). En nuestro estudio, la cepa aislada de *Bacillus sp.* alcanzó una eficiencia de degradación del 96,8% a 30 °C, similar a lo descrito por Wu *et al.*, (2014), en el que se obtuvo una eficiencia de biodegradación de cianuro del 96,7% en 72 h a 193 rpm. Sin embargo, la concentración de degradación óptimo en la mayoría de las investigaciones es de 200 ppm de cianuro, a una temperatura de 31 °C. En nuestra investigación se logró una tolerancia superior; además, se obtuvo mayor eficiencia en el proceso de biodegradación de cianuro libre.

En estudios realizados en *B. subtilis* se inició con 500 ppm y se obtuvo una eficiencia de degradación del 100% en 3 días, con un inóculo de 10^{11} UFC/ml y 190 rpm a 27 °C (Alvarez *et al.*, 2022). El consumo total de cianuro posiblemente se debe al incremento en el tiempo de evaluación y a la alta concentración de inóculo utilizado. Con *B. licheniformis*, se demostró una eficiencia de degradación del 99% en 500 ppm de cianuro libre a 190 rpm (Vallenas-Arévalo *et al.*, 2018).

Los resultados obtenidos también son comparables a los ensayos de biodegradación utilizando consorcios microbianos, en los que se utilizó un consorcio de bacterias identificadas como *Bacillus sp.*, que tuvo una eficiencia de degradación de 96,9% a partir de 300 mg/L de cianuro en tan solo 10 horas, utilizando un reactor biológico giratorio (Guamán & Nieto, 2018).

En investigaciones realizadas utilizando consorcios microbianos del género *Bacillus sp.*, que se

presentaban como compuestos mixtos de cepas de *B. safensis*, *B. licheniformis* y *B. tequilensis*, tuvieron la capacidad de biodegradar cianuro y obtener una eficiencia del 65,5% para una concentración inicial de 200 ppm de [CN⁻] y de 44,3% para 400 ppm de [CN⁻] (Mekuto, *et al.*, 2014). Con los consorcios bacterianos del género *Bacillus*, en los cuales se utilizó una concentración inicial de 250 mg de CN⁻/L, se logró obtener una eficiencia de biodegradación del 97,3% después de 150 horas. En general, se recomienda que los procesos de biodegradación de cianuro se realicen en condiciones alcalinas para evitar la volatilización del cianuro en forma de ácido cianhídrico. Sin embargo, en diversas investigaciones se han realizado los procesos de degradación de cianuro en condiciones de pH neutro, obteniéndose una eficiencia de biodegradación 95,87% con una concentración inicial de cianuro de 100 mg/L, a un pH 7 a 35 °C por un periodo de 48 h (Mondal *et al.*, 2017), en este contexto, un factor relevante a considerar es la volatilización de cianuro.

Es necesario obtener bacterias con alto potencial en la degradación de cianuro para que puedan ser utilizados en procesos de biorremediación.

En el proceso de biodegradación se utilizó una carga microbiana de $2,3 \times 10^{-7}$ UFC/ml; sin embargo, es necesario recalcar que cuando se incrementa el tamaño del inóculo, aumentará el crecimiento bacteriano y la eficiencia de biodegradación. En este estudio se utilizó un volumen de inóculo del 10%; sin embargo, según la literatura, puede variar entre 5% a 10% (v/v). En algunos estudios, cuando se alcanzó un crecimiento bacteriano de 15,95 log UFC/ml, se obtuvo una eficiencia de biodegradación del 84,6%, pero cuando el volumen del inóculo fue del 5%, se obtuvo un crecimiento bacteriano de 15,5 log UFC/mL con una eficiencia del 50,2%. Entonces podríamos indicar que, a mayor concentración de inóculo, mayor será la eficiencia en la biodegradación de cianuro, e incluso se podría obtener un 100% de degradación en 3 días cuando el inóculo es de 1011 UFC/ml (Vallenas-Arévalo *et al.*, 2018).

Según los resultados obtenidos, el crecimiento bacteriano y la eliminación de cianuro se relacionan, lo que indicaría que *Bacillus sp.* utiliza cianuro como sustrato (Moradkhani *et al.*, 2018); además, la presencia de amonio como uno de los productos finales podría indicar que la cepa 2 sigue la ruta metabólica hidrolítica, con la intervención de la enzima cianuro dihidratasa, que comprende un grupo de enzimas bacterianas que incluye desnitrificantes que convierten fácilmente el cianuro en formiato relativamente no tóxico (Alvillo-Rivera *et al.*, 2021; Gupta *et al.*, 2010; Karamba *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2018). Además, podemos afirmar que el tiempo de degradación está relacionado con las condiciones de degradación especialmente con el uso de aireación, la cual es importante para el crecimiento bacteriano, específicamente con las mediciones de oxígeno disuelto. Considerar la tolerancia y degradación de cianuro es importante debido a que elevadas concentraciones pueden producir un efecto inhibitorio en la degradación, puesto que la bacteria puede reducir su capacidad metabólica, pudiendo alterar la eficiencia de degradación e incluso puede inhibir el crecimiento bacteriano. El perfil de cinética de biodegradación se ajustó a modelos de primer orden, que son similares a lo reportado por Alvarado-López *et al.* (2023), que confirmaron una correlación de biodegradación cinética de primer orden con una $R^2 > 0,97$ y una constante de velocidad cinética estimada k_1 para la biodegradación de cianuro inicial (F-CN), que fue de $0,12 \pm 0,011 \text{ d}^{-1}$.

Estos parámetros podrían proporcionar información básica para realizar el escalamiento del proceso y en algunos casos para determinar el tamaño de los reactores aerobios en procesos industriales (Lobo *et al.*, 2016). Además, es necesario identificar adecuadamente los factores que influyen en el proceso de degradación debido a que cuando supera el parámetro óptimo de tolerancia, puede alterar la degradación de cianuro y la supervivencia de la bacteria (Kaksonen *et al.*, 2014; Razanamahandry *et al.*, 2016).

CONCLUSIONES

En esta investigación se obtuvieron siete bacterias degradadoras de cianuro a partir de muestras provenientes de un pasivo ambiental minero, entre las cuales destaca la cepa 2 que corresponde al género *Bacillus sp.*, que demostró una elevada eficiencia en el proceso de biodegradación que fue del 96,8%. Los parámetros cinéticos en la biodegradación de cianuro evidenciaron elevada velocidad específica de crecimiento, con la cual *Bacillus sp.* lograría duplicar su biomasa en un tiempo de 10 horas y la biodegradación cinética de primer orden con una $R^2 > 0,97$. Además, la cepa aislada presenta un alto potencial para ser usada con fines de remediación debido a que logró la biodegradación en poco tiempo y por su capacidad de crecer en diferentes condiciones ambientales, por lo que puede ser eficaz para el tratamiento de áreas contaminadas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agboola, O., Babatunde, D. E., Sunday, O., Fayomi, I., Sadiku, R., Article, R., Thangarasu-Sarasvathi, P., Rosano-Ortega, G., Anusha, P., Natarajan, D., Araujo, F. S. M., Taborda-Llano, I., Nunes, E. B., Radbury, J. O. H. N. F. B., Cesário, C., Takeshi, L., Mendes, E., Pine, W., Antonio, J., ... Predictions, T. (2020). A review on the impact of mining operation: Monitoring, assessment and management. 1(October), 1070-1072. *Results in Engineering*, 8. <https://doi.org/10.1016/j.rineng.2020.100181>
- Akcil, A. (2003). Destruction of cyanide in gold mill effluents: Biological versus chemical treatments. *Biotechnology Advances*, 21(6), 501–511. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(03\)00099-5](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(03)00099-5)
- Alvarado-López, M. J., Garrido-Hoyos, S. E., Raynal-Gutiérrez, M. E., El-Kassis, E. G., Luque-Almagro, V. M., & Rosano-Ortega, G. (2023). Cyanide Biodegradation by a Native Bacterial Consortium and Its Potential for Goldmine Tailing Biotreatment. *Water*, 15(8), 1595. <https://doi.org/10.3390/w15081595>
- Alvarez Rosario, C. G., Vallenias-Arévalo, A. T., Arévalo, S. J., Romano Espinosa, D. C., & Soares Tenório J. A. (2022). Biodegradation of cyanide using a *Bacillus subtilis* strain isolated from artisanal gold mining tailings. *Braz. J. Chem. Eng.* <https://doi.org/10.1007/s43153-022-00228-4>
- Alvillo-Rivera, A., Garrido-Hoyos, S., Buitrón, G., Thangarasu-Sarasvathi, P., & Rosano-Ortega, G. (2021). Biological treatment for the degradation of cyanide: A review. *Journal of Materials Research and Technology*, 12, 1418–1433. <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2021.03.030>
- Araujo, F. S. M., Taborda-Illano, I., & Nunes, E. B. (2022). Recycling and Reuse of Mine Tailings : A Review of Advancements and Their Implications.
- Arce-Inga, M., González-Pérez, A. R., Hernandez-Diaz, E., Chuquibala-Checan, B., Chavez-Jalk, A., Llanos-Gomez, K. J., Leiva-Espinoza, S. T., Oliva-Cruz, S. M., & Cumpa-Velasquez, L. M. (2022). Bioremediation Potential of Native *Bacillus sp.* Strains as a Sustainable Strategy for Cadmium Accumulation of *Theobroma cacao* in Amazonas Region. *Microorganisms*, 10(11). <https://doi.org/10.3390/microorganisms10112108>
- Bôto, M. L., Magalhães, C., Perdigão, R., Alexandrino, D. A. M., Fernandes, J. P., Bernabeu, A. M., Ramos, S., Carvalho, M. F., Semedo, M., LaRoche, J., Almeida, C. M. R., & Mucha, A. P. (2021). Harnessing the Potential of Native Microbial Communities for Bioremediation of Oil Spills in

the Iberian Peninsula NW Coast. *Frontiers in Microbiology*, 12(April). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.633659>

- Cáceda Quiroz, C. J., Fora Quispe, G. d. L., Carpio Mamani, M., Maraza Choque, G. J., & Sacari Sacari, E. J. (2023). Cyanide Bioremediation by *Bacillus subtilis* under Alkaline Conditions. *Water*, 15(20), 3645. <https://doi.org/10.3390/w15203645>
- Dash, R. R., Gaur, A., & Balomajumder, C. (2009). Cyanide in industrial wastewaters and its removal: A review on biotreatment. *Journal of Hazardous Materials*, 163(1), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.06.051>
- Donato, D., Ricci, P. F., Noller, B., Moore, M., Possingham, H., & Nichols, O. (2008). The protection of wildlife from mortality: Hypothesis and results for risk assessment. *Environment International*, 34(6), 727–736. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2007.10.003>
- Dursun, A. Y., & Aksu, Z. (2000). Biodegradation kinetics of ferrous(II) cyanide complex ions by immobilized *Pseudomonas fluorescens* in a packed bed column reactor. *Process Biochemistry*, 35(6), 615–622. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(99\)00110-7](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(99)00110-7)
- Farfan Pajuelo, D. G., Carpio Mamani, M., Maraza Choque, G. J., Chachaque Callo, D. M., & Cáceda Quiroz, C. J. (2023). Effect of Lyoprotective Agents on the Preservation of Survival of a *Bacillus cereus* Strain PBG in the Freeze-Drying Process. *Microorganisms*, 11(11), 2705. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11112705>
- Guamán, M., & Nieto, D. (2018). Evaluation of the rotational speed and carbon source on the biological removal of free cyanide present on gold mine wastewater, using a rotating biological contactor. *Journal of Water Process Engineering*, 23, 84-90. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2018.03.008>
- Gupta, N., Balomajumder, C., & Agarwal, V. K. (2010). Enzymatic mechanism and biochemistry for cyanide degradation: A review. *Journal of Hazardous Materials*, 176(1-3), 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.11.038>
- Huertas, M. J., Sáez, L. P., Roldán, M. D., Luque-Almagro, V. M., Martínez-Luque, M., Blasco, R., Castillo, F., Moreno-Vivián, C., & García-García, I. (2010). Alkaline cyanide degradation by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 in a batch reactor. Influence of pH. *Journal of Hazardous Materials*, 179(1–3), 72–78. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.02.059>
- Jafarpour, A., & Khatami, S. (2021). Analysis of Environmental Costs' Effect in Green Mining Strategy Using a System Dynamics Approach: A Case Study. *Mathematical Problems in Engineering*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/4893776>
- Javaheri Safa, Z., Aminzadeh, S., Zamani, M., & Motallebi, M. (2017a). Significant increase in cyanide degradation by *Bacillus* sp. M01 PTCC 1908 with response surface methodology optimization. *AMB Express*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0502-2>
- Kaksonen, A. H., Mudunuru, B. M., & Hackl, R. (2014). The role of microorganisms in gold processing and recovery - A review. *Hydrometallurgy*, 142, 70-83. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2013.11.008>

- Kandasamy, S., Dananjeyan, B., Krishnamurthy, K., & Benckiser, G. (2015). Aerobic cyanide degradation by bacterial isolates from cassava factory wastewater. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(3), 659-666. <https://doi.org/10.1590/S1517-838246320130516>
- Khalid, S., Shahid, M., Niazi, N. K., Murtaza, B., Bibi, I., & Dumat, C. (2017). A comparison of technologies for remediation of heavy metal contaminated soils. *Journal of Geochemical Exploration*, 182, 247–268. <https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2016.11.021>
- Khamar, Z., Makhdoumi-kakhki, A., & Gharaie, M. H. M. (2015). Remediation of cyanide from the gold mine tailing pond by a novel bacterial co-culture. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 99, 123–128. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.01.009>
- Karamba, K. I., Ahmad, S. A., Zulkharnain, A., Syed, M. A., Khalil, K. A., Shamaan, N. A., Dahalan, F. A., & Shukor, M. Y. (2016). Optimisation of biodegradation conditions for cyanide removal by *Serratia marcescens* strain AQ07 using one-factor-at-a-time technique and response surface methodology. *Rendiconti Lincei*, 27(3), 533-545. <https://doi.org/10.1007/s12210-016-0516-8>
- Kavamura, V. N., Aono, A. H., & Esposito, E. (2019). Biotechnological strategies applied to the decontamination of soils polluted with heavy metals. *Comprehensive Biotechnology*, 6, 240–252. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64046-8.00350-5>
- Kovar, K. K., & Egli, T. (1998). Growth Kinetics of Suspended Microbial Cells: From Single-Substrate-Controlled Growth to Mixed-Substrate Kinetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3), 646-666. <https://doi.org/10.1128/membr.62.3.646-666.1998>
- Kumar, B. L., & Gopal, D. V. R. S. (2015). Effective role of indigenous microorganisms for sustainable environment. *3 Biotech*, 5(6), 867-876. <https://doi.org/10.1007/s13205-015-0293-6>
- Kumar, V., Kumar, V., & Bhalla, T. C. (2018). Alkaline active cyanide dihydratase of *Flavobacterium indicum* MTCC 6936: Growth optimization, purification, characterization and in silico analysis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 116(2017), 591-598. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.075>
- Lobo, C. C., Bertola, N. C., & Contreras, E. M. (2016). Inhibition kinetics during the oxidation of binary mixtures of phenol with catechol, resorcinol and hydroquinone by phenol acclimated activated sludge. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 33(1), 59-71. <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20160331s20150173>
- Lovaso, C. R., Hela, K., Harinaivo, A. A., & Hamma, Y. (2017). Bioremediation of soil and water polluted by cyanide: A review. *African Journal of Environmental Science and Technology*, 11(6), 272–291. <https://doi.org/10.5897/ajest2016.2264>
- Luque-Almagro, V. M., Blasco, R., Martínez-Luque, M., Moreno-Vivián, C., Castillo, F., & Roldán, M. D. (2011). Bacterial cyanide degradation is under review: *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344, a case of an alkaliphilic cyanotroph. *Biochemical Society Transactions*, 39(1), 269–274. <https://doi.org/10.1042/BST0390269>
- Luque-Almagro, V. M., Moreno-Vivián, C., & Roldán, M. D. (2016). Biodegradation of cyanide wastes

- from mining and jewellery industries. *Current Opinion in Biotechnology*, 38, 9–13. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.12.004>
- Luque-Almagro, V. M., Cabello, P., Sáez, L. P., Olaya-Abril, A., Moreno-Vivián, C., & Roldán, M. D. (2018). Exploring anaerobic environments for cyanide and cyano-derivatives microbial degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(3), 1067–1074. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8678-6>
- Luo, Y. (2019). Environmental problems in the mining of metal minerals. *Earth and Environmental Science*, 384(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/384/1/012195>
- Manso Cobos, I. M., Ibáñez García, M. I., Moreno, F. de la P., Sáez Melero, L. P., Luque-Almagro, V. M., Rodríguez, F. C., Ruiz, M. D. R., Jiménez, M. A. P., & Vivián, C. M. (2015). *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344, a cyanide-degrading bacterium with by-product (polyhydroxyalkanoates) formation capacity. *Microbial Cell Factories*, 14(1), 1-12. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0267-8>
- Mekuto, L., Jackson, V. A., & Obed, S. K. (2014). Biodegradation of Free Cyanide Using *Bacillus* Sp. Consortium Dominated by *Bacillus Safensis*, *Lichenformis* and *Tequilensis* Strains: A Bioprocess Supported Solely with Whey. *Journal of Bioremediation & Biodegradation*, 05(02). <https://doi.org/10.4172/2155-6199.S18-004>
- Mekuto, L., Alegbeleye, O. O., Ntwampe, S. K. O., Ngongang, M. M., Mudumbi, J. B., & Akinpelu, E. A. (2016). Co-metabolism of thiocyanate and free cyanide by *Exiguobacterium acetylicum* and *Bacillus marisflavi* under alkaline conditions. *3 Biotech*, 6(173), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0491-x>
- Mondal, P., Balomajumder, C., & Dwivedi, N. (2017). Bioremoval of cyanide from aqueous solution using *Tectona grandis* leaves powder: a potential bioadsorbent. *International Journal of Environmental Technology and Management*, 19(3/4), 198. <https://doi.org/10.1504/ijetm.2016.10003103>
- Monod, J. (1949). The growth of bacterial cultures. *Annual Reviews. Microbiologia*, 3(XI), 371-394.
- Moradkhani, M., Yaghmaei, S., & Nejad, Z. G. (2018). Biodegradation of cyanide under alkaline conditions by a strain of *Pseudomonas putida* isolated from gold mine soil and optimization of process variables through response surface methodology (RSM). *Periodica Polytechnica Chemical Engineering*, 62(3), 265-273. <https://doi.org/10.3311/PPch.10860>
- Mudder, T., & Botz, M. (2004). Cyanide and society: a critical review. *Ejmp & Ep. European Journal of Mineral Processing and Environmental Protection*, 4(1), 62–74. https://www.researchgate.net/publication/267825029_Cyanide_and_society_A_critical_review
- Nepali, B., & Bhattarai, S. (2020). Identification of *Pseudomonas fluorescens* using different biochemical tests. *International Journal of Applied Biology*, 2(2), 27-32. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.23860.40328>
- Okpokwasili, G. C., & Nweke, C. O. (2006). Microbial growth and substrate utilization kinetics. *African Journal of Biotechnology*, 5(4), 305-317.

- Pal, P., & Kumar, R. (2014). Treatment of coke wastewater: A critical review for developing sustainable management strategies. *Separation and Purification Reviews*, 43(2), 89–123. <https://doi.org/10.1080/15422119.2012.717161>
- Panikov, N. S. (2019). Microbial growth dynamics. *Comprehensive Biotechnology*, 1, 231-273. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64046-8.00019-7>
- Raybuck, S. A. (1992). Microbes and microbial enzymes for cyanide degradation. *Biodegradation*, 3(1), 3–18. <https://doi.org/10.1007/BF00189632>
- Razanamahandry, L. C., Andrianisa, H. A., Karoui, H., Kouakou, K. M., & Yacouba, H. (2016). Biodegradation of free cyanide by bacterial species isolated from cyanide-contaminated artisanal gold mining catchment area in Burkina Faso. *Chemosphere*, 157, 71-78. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.05.020>
- Razanamahandry, L. C., Onwordi, C. T., Saban, W., Bashir, A. K. H., Mekuto, L., Malenga, E., Manikandan, E., Fosso-Kankeu, E., Maaza, M., & Ntwampe, S. K. O. (2019). Performance of various cyanide degrading bacteria on the biodegradation of free cyanide in water. *Journal of Hazardous Materials*, 380, 6. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.120900>
- Singh, N., & Balomajumder, C. (2016). Batch growth kinetic studies for elimination of phenol and cyanide using mixed microbial culture. *Journal of Water Process Engineering*, 11, 130-137. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2016.04.006>
- Singh, U., Arora, N. K., & Sachan, P. (2018). Simultaneous biodegradation of phenol and cyanide present in coke-oven effluent using immobilized *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas stutzeri*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49(1), 38-44. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.12.013>
- Tiong, B., Bahari, Z. M., Irwan Shah Lee, N. S., Jaafar, J., Ibrahim, Z., & Shahir, S. (2015). Cyanide degradation by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* strain W2 isolated from mining effluent. *Sains Malaysiana*, 44(2), 233-238. <https://doi.org/10.17576/jsm-2015-4402-10>
- Uribe-Ramírez, D., Cristiani-Urbina, E., & Morales-Barrera, L. (2024). Biodegradation of Free Cyanide by a New Isolated Alkaliphilic *Bacillus licheniformis* Strain. *Microbiology Research*, 15(1), 33-49. <https://doi.org/10.3390/microbiolres15010003>
- Vallenas-Arévalo, A. T., Rosario, C. G. A., Espinosa, D. C. R., & Tenório, J. A. S. (2018). Bacterial degradation of free cyanide in alkaline medium using *Bacillus licheniformis* strain. *Minerals, Metals and Materials Series, Part F6*, 367-373. https://doi.org/10.1007/978-3-319-72362-4_32
- Wu, C. F., Xu, X. M., Zhu, Q., Deng, M. C., Feng, L., Peng, J., Yuan, J. P., & Wang, J. H. (2014). An effective method for the detoxification of cyanide-rich wastewater by *Bacillus* sp. CN-22. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(8), 3801-3807. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5433-5>