

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS, BIOQUÍMICAS**  
**Y BIOTECNOLÓGICAS**  
**PROGRAMA PROFESIONAL DE INGENIERÍA**  
**BIOTECNOLÓGICA**



**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD BIODEGRADATIVA DEL**  
**GENERO PSEUDOMONA SP. SOBRE CIANURO DE SODIO EN**  
**EL EFLUENTE MINERO “PLANTA D-CRAIN S.R.L.”**  
**DISTRITO DE OCOÑA – AREQUIPA.**

**Trabajo de Investigación de Tesis presentado por el**  
**Bachiller en Ingeniería Biotecnológica.**  
**CESAR MIGUEL ÁNGEL VIZCARRA RODRÍGUEZ**  
**Para optar el Título Profesional de:**  
**INGENIERO BIOTECNÓLOGO.**

**AREQUIPA – PERÚ**

**2013**

## ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN .....	V
ABSTRACT.....	VII
<b>CAPITULO I.</b>	
INTRODUCCIÓN.....	01
HIPÓTESIS .....	04
OBJETIVOS .....	04
<b>CAPITULO II.</b>	
<b>MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>05</b>
2.1.- Aguas Contaminadas con Cianuro .....	05
2.1.1.- Química del Cianuro.....	05
2.1.1.1.- Hidrólisis del Cianuro.....	05
2.1.1.2.- Reacción con el CO <sub>2</sub> .....	08
2.1.1.3.- Oxidación .....	08
2.1.1.4.- Reacción con el S <sup>0</sup> , Polisulfuros, HS <sup>-</sup> , S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> .....	09
2.1.1.5.- Reacción con los Metales Pesados .....	10
2.1.1.6.- Reacción con los Minerales.....	11
2.1.2.- Formas de Cianuro en Residuos Minero-Metalúrgicos.....	13
2.1.3.- Ciclo de Vida del Cianuro en la Extracción del Oro .....	16
2.2.- Degradación Biológica del Cianuro .....	17
2.3.- Generalidades de <i>Pseudomonas</i> .....	20
2.4.- Método de Identificación de Bacterias .....	21
2.4.1.- Tinción Gram .....	21
2.4.2.- Triple azúcar hierro - Agar TSI.....	23
<b>CAPITULO III.</b>	
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>26</b>
3.1.- Lugar de Ejecución.....	26
3.2.- Descripción de la Planta de Procesamiento de Mineral “D-CRAIN S.R.L” .....	26

3.2.1.- Tamaño de la planta “D-CRAIN S.R.L”.....	26
3.2.2.- Localización.....	27
3.2.3.- Programa de producción.....	29
3.2.4.- Factores condicionantes del tamaño.....	29
3.2.5.-Características del relave de la Planta Minera “D-CRAIN SRL” - Ocoña ....	31
3.3.- Materiales.....	32
3.4.- Toma de Muestra de Material Biológico.....	35
3.5.- Aislamiento bacteriano.....	36
3.6.- Diseño experimental.....	40
3.6.1.- Planeamiento de la pruebas.....	41
3.7.- Preparación de los medios de cultivo para la experimentación.....	46
3.8.- Determinación de Cianuro por medio del método Titulometrico.....	47
3.9.- Método de recuento directo al microscopio.....	50
<b>CAPITULO IV.</b>	
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>54</b>
4.1.- Resultados obtenidos de la siembra del relave.....	54
4.2.- Resultados obtenidos en las pruebas de Biodegradación de Cianuro de Sodio.....	56
4.3.- Tratamiento estadístico.....	62
4.3.1.- Efectos principales.....	63
4.3.2.- Deducción del modelo codificado estimado.....	65
4.3.3.- Análisis de varianza.....	65
4.3.4.- Cálculo del cuadrado de las sumatorias totales.....	66
4.3.5.- Cálculo del cuadrado de las sumatorias de los efectos.....	67
4.3.6.- Calculo de la sumatoria del cuadrado de los errores.....	68
4.3.7.- Decodificación del modelo.....	69
4.4.- Curva de crecimiento.....	70
4.5.- Discusión.....	74

**CAPITULO V.**

CONCLUSIONES ..... 83

**CAPITULO VI.**

SUGERENCIAS ..... 84

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS ..... 85

ANEXOS ..... 91





## RESUMEN

Se evaluó la capacidad Biodegradativa del cianuro por parte de un aislado bacteriano del Genero *Pseudomona* del relave minero D-CRAIN, se tomó como variable de estudio: la Agitación; y como variable independiente: la Concentración de Cianuro con dos niveles, el experimento consistió en someter a un diseño factorial completo  $2^2$ . Para empezar las pruebas primero se aisló un cultivo de bacterias con capacidad biodegradativa de Cianuro; para lo cual se tomaron muestras de distintas zonas del depósito de relaves provenientes del proceso de lixiviación de oro, las cuales fueron transportadas hacia los laboratorios de Universidad Católica de Santa María, para su respectiva caracterización e inoculación en medios de Agar Nutritivo y se comprobó la presencia de *Pseudomona* nativa, luego de su incubación durante 48 horas se procedió a seleccionar placas con mayor desarrollo microbiano para la obtención de un cultivo más homogéneo con capacidad de degradación de cianuro, luego se procedió a trasladar hacia un caldo de cultivo con concentraciones moderadas de

Cianuro esto para obtener un inóculo homogéneo óptimo para iniciar el diseño experimental. Para determinar la concentración de Cianuro se siguió el método Titulométrico con Nitrato de Plata, el cual funciona bastante bien hasta concentraciones por encima del orden 50 ppm.

En el diseño experimental se realizaron 3 repeticiones para cada prueba con volúmenes de aproximadamente 500 ml, incluso se repitió el experimento pero esta vez cambiando el sistema inicial de agitación escogido (agitación en Shaker) por el sistema de agitación en mesa de rodillos, luego de analizar estadísticamente los datos recolectados se pudo comprobar a un 95 % de confianza y para ambas pruebas que la concentración de cianuro tiene un efecto negativo en cuanto a la capacidad de degradación de Cianuro, por otro lado la agitación no ha provocado un efecto apreciable al menos en el volumen estudiado. La variable concentración de cianuro tuvo un efecto inverso según el modelo matemático:  $Y = 385,69 - 16,33 Z_1$ , es decir que a mayor concentración de Cianuro la capacidad de degradación bacteriana descende. Matemáticamente a menor concentración de Cianuro mejor resulta la adaptación y crecimiento de bacterias del género *Pseudomona*, respecto a la agitación para el nivel trabajado ésta no es influyente en el crecimiento.

Los bioensayos en los que se valoró mayor biodegradación de cianuro por parte del aislado fueron, de acuerdo a la experiencia, para los niveles de 250 ppm de CN y 120 rpm de agitación, la adaptación y el crecimiento fue más rápido y mayor respecto a las demás pruebas experimentales como ha quedado demostrado en este estudio.

**Palabras clave:** Aislado bacteriano, inóculo, degradación, Shaker, niveles de caracterización, Cianuro, variables, análisis estadístico.

## ABSTRACT

Assessed ability of biodegradation of cyanide by bacterial isolated native D-CRAIN mining tailings, which were taken as study variable the agitation; and the concentration of cyanide as independent variable with two levels, the experiment, consisted in submitting to a full factorial design 22. To start the tests first isolated a culture of bacteria with the ability biodegradation of cyanide for which samples were taken from different areas of the deposit of tailings from the process of leaching of gold, which were transported to the Catholic University of Santa Maria laboratories for their respective characteristics and inoculation in nutrient Agar media and found the presence of pseudomonas native, after incubation for 48 hours proceeded to select the boards with further development microbial to obtain a more heterogeneous crop capacity degradation of cyanide, then it was to move towards a breeding ground with moderate concentrations of cyanide this to obtain a homogeneous inoculum optimal to start the experimental design. To determine the concentration of cyanide is followed the method title metric with silver nitrate, which works pretty well even for concentrations above the order 50 ppm.

Were conducted in experimental design 3 replicates for each test with approximately 500 ml volumes, even repeated the experiment but this time changing the initial agitation system chosen (agitation in Shaker) by the agitation in roller table system, after statistically analyzing the data collected could be proven to a 95% confidence and for both evidence that the concentration of cyanide has a direct negative effect in terms of degradation ability cyanide, on the other hand the agitation has an appreciable effect however in the designed volume. The variable concentration of cyanide has a reverse effect according to the mathematical model:  $Y = 385,69 - 16,33 Z_1$ , i.e. that a higher concentration of cyanide bacterial degradation ability descends. Mathematically to lower concentration of cyanide will be better adaptation and growth of Pseudomonas, regarding the agitation for the working level is not influential in the growth.

The bioassays in which assessed increased biodegradation of cyanide by the isolated were, according to experience, for levels of 120 rpm agitation and 250 ppm of CN, adaptation and growth was faster and greater with respect to the other experimental evidence as it has been demonstrated in this study.

**Key words:** isolated bacterial inoculum, degradation, shaker, levels, characterization, cyanide, variables, and statistical analysis.

# CAPITULO I

## INTRODUCCIÓN

El Perú es uno de los principales países a nivel de Latinoamérica y del mundo en la extracción de minerales de gran importancia económica, como son el oro, zinc, plomo, estaño, plata y cobre, más aún la zona sur del país, como Arequipa que tiene dentro de sus regiones, varios denuncios mineros; muchos estudios evidencian que en las aguas próximas a la actividad minera se vierten los vaciados mineros que son altamente tóxicos debido a que contienen metales pesados como el cianuro y muchas veces estas aguas contaminadas son consumidos por animales y humanos así como por la industria agrícola y ganadera causando un impacto negativo en la salud, ambiente y la industria.

La industria minera día a día va creciendo en el Perú, así también crecen los problemas de contaminación ocasionados por la actividad minera ilegal que contamina el ambiente con metales pesados como el cianuro. La realización de prácticas de cianuración de minerales con oro y plata a nivel de la pequeña minería genera residuos peligrosos que son eliminados inadecuadamente al ambiente produciendo contaminación en la comunidad donde se desarrolla el proceso.

La actividad minera indudablemente tiene un impacto ambiental debido a que aumenta la producción de residuos (según datos del Instituto Nacional de Estadística e Informática la actividad minera genera aproximadamente el 75 % de los residuos industriales) y altera irreversiblemente la capa superficial natural

dejando un paisaje inerte además de afectar los acuíferos y los cursos de agua próximos poniendo así en peligro la flora y fauna del lugar por el arrastre de las partículas en el agua.

El Cianuro es altamente tóxico. Sin embargo, al contrario del Mercurio, el Cianuro es biodegradable. La toxicidad del cianuro se debe a que bloquea las enzimas celulares, evitando que procesos como la respiración celular y la fotosíntesis puedan darse correctamente.

El cianuro se encuentra en los diques de colas, que constituyen el efluente de la planta recuperadora de oro o plata, en concentraciones de entre 600 a 1000 ppm de NaCN, el cual es acumulado en pozos de tratamiento para su degradación natural, sin embargo dependiendo de varios factores esta degradación puede durar semanas y aun meses, lo cual significa un peligro latente de posibles derrames, percolaciones a un acuífero cercano y emanaciones de HCN gaseoso cerca del pozo de tratamiento.

Al contrario de algunos tecnólogos que defienden la degradación natural del Cianuro de Sodio en los pozos de tratamiento, se sabe que niveles de 150 a 300 ppm de NaCN son letales al ser humano y que niveles de 50 ppm de NaCN se pueden percibir con el olfato. La dosis letal de HCN es de 90 a 100 ppm y se puede percibir desde los 20 a 30 ppm de HCN<sup>-</sup>.

Una tecnología pionera empleada en el tratamiento de aguas contaminadas con productos orgánicos resistentes a la biodegradabilidad son los procesos de oxidación avanzada (AOP), estos se emplean como un pretratamiento que

modifica la estructura de los contaminantes, que se transforman en sustancias menos nocivas y productos intermedios fácilmente biodegradables, permitiendo entonces que un procedimiento biológico complete la degradación de la carga contaminante después de un tratamiento fotocatalítico.

Los resultados de una investigación en la que se desarrolló un consorcio autóctono de microorganismos degradadores del Cianuro para poder aplicarse en el tratamiento biológico de los desechos peligrosos del cianuro mostraron que el consorcio de microorganismos presentó, viabilidad del 70 al 80%, con porcentajes de remoción del Cianuro mayores al 95%, además menciona que el consorcio de microorganismos utilizado puede aplicarse en la biodegradación de los desechos del Cianuro procedentes de las minas de oro y/o de cualquier otro desecho de Cianuro como los baños de electrodeposición de metales, además de aquellos procedentes de la industria manufacturera y joyas.

En la actualidad se ha evidenciado la voluntad de solucionar la problemática causada por la industria minera, implementado programas ambientales de manejo de aguas industriales. Con la intención de contribuir a solucionar y buscar alternativas para la problemática de contaminación del agua con cianuro es que se realizó este trabajo de investigación con el fin de evaluar técnicamente la capacidad de biodegradación del cianuro por medio de microorganismos asilados de relave minero.

## HIPÓTESIS

Los microorganismos del genero *Pseudomonas* aislados del efluente minero de la planta D-CRAIN SRL tendrán la capacidad para degradar el Cianuro en otras sustancias químicas más estables y menos tóxicas.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la capacidad biodegradativa de bacterias del género *Pseudomona* como potencial degradador de compuestos cianurados en el relave minero “D – CRAIN S.R.L.”, distrito de Ocoña - Camaná.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Identificar la presencia de bacterias del género *Pseudomona* por medio de pruebas bioquímicas y diferenciales en los relaves recogidos de la planta procesadora “D-Crain” ubicada en Ocoña - Camaná.
2. Obtener los parámetros óptimos según un Diseño Factorial de las variables Concentración de Cianuro (CN-) y Agitación, en la biodegradación del Cianuro en una simulación del relave extraído de la planta de beneficio de mineral de oro ubicada en el distrito de Ocoña - Camaná.
3. Determinar la influencia de las variables Concentración de Cianuro y Agitación en cuanto a la capacidad biodegradativa del microorganismo estableciendo un modelo matemático.
4. Evaluar a escala de laboratorio, la biorremediación del Cianuro presente en los efluentes del proceso de lixiviación de mineral.

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1.- AGUAS CONTAMINADAS CON CIANURO

Se entiende como aguas contaminadas con Cianuro a la fracción del volumen de agua que es usada en la obtención de minerales de oro y plata, y que no retornan a la planta de procesamiento, es decir son descargadas al medio ambiente con el respectivo impacto ambiental. Estas aguas con contenidos de Cianuro y sus derivados serán considerados como la materia prima para la elaboración del presente estudio.

##### 2.1.1.- QUÍMICA DEL CIANURO.

Básicamente el cianuro ( $\text{CN}^-$  o  $(\text{C}^\ominus\text{N})^-$ ) se presenta como cianuro de hidrógeno ( $\text{HCN}$ ) que es un gas o en forma de cristales como el cianuro de sodio ( $\text{NaCN}$ ) o el cianuro de potasio ( $\text{KCN}$ ).

El Cianuro es capaz de reaccionar con facilidad, inclusive en muy bajas concentraciones con metales pesados y preciosos además se presenta generalmente como cianuro libre y complejos de cianuro o metalocianuros.

##### 2.1.1.1.- HIDRÓLISIS DEL CIANURO.

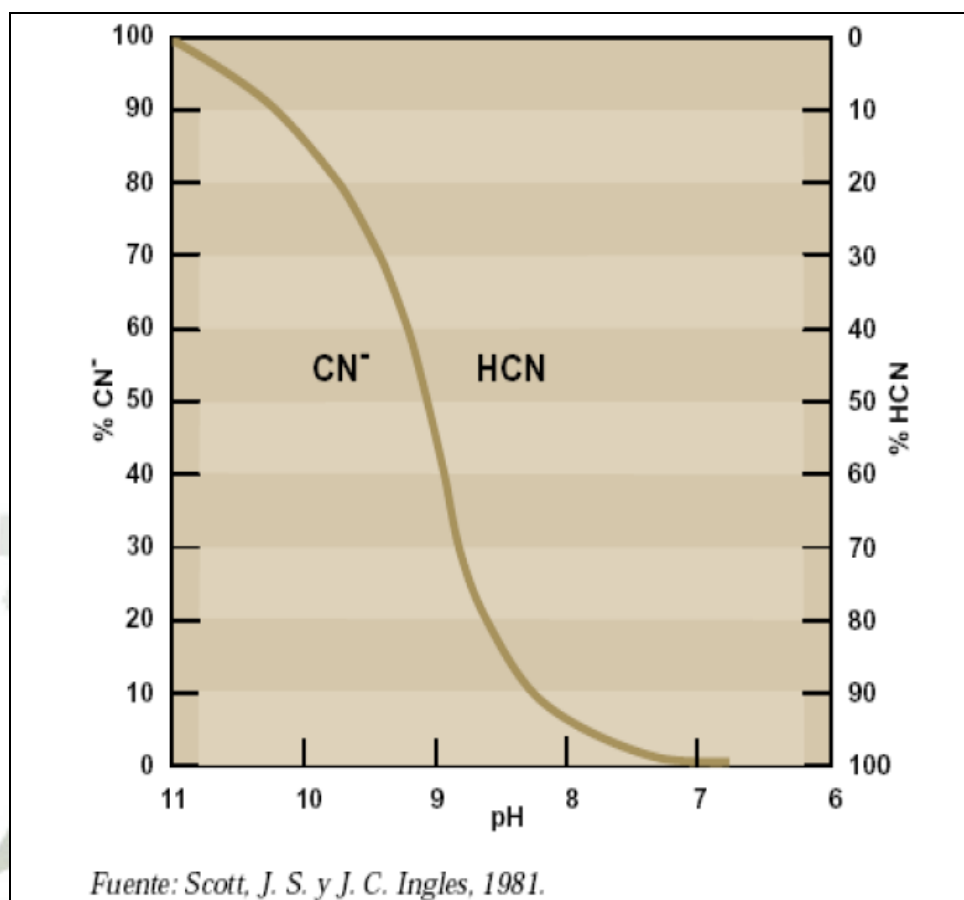
El cianuro como ion cianuro ( $\text{CN}^-$ ) se hidroliza en el aire húmedo y en soluciones acuosas de acuerdo con la siguiente reacción [1]:



La constante de disociación del ácido hidrocianico es de  $4,36 \times 10^{-10}$ , y el equilibrio depende fuertemente del pH (Smith and Martell, 1976).

En condiciones normales de presión y temperatura, las concentraciones de HCN y  $\text{CN}^-$  son iguales a un valor de pH de aproximadamente 9,38. En la Figura 1 se muestra el equilibrio del cianuro de hidrogeno (HCN) y el ion cianuro ( $\text{CN}^-$ ) con el pH, el cual da origen a un gráfico que se convierte en una herramienta de manejo del cianuro. A un pH 11, el 99 % del cianuro permanece en la solución como  $\text{CN}^-$ , mientras que a pH 7, el 99 % del cianuro existirá como HCN. Aunque el HCN es altamente soluble en agua, su solubilidad disminuye con el aumento de la temperatura y bajo condiciones altamente salinas.

**Figura 1:** Equilibrio del cianuro de hidrogeno (HCN) y el ion cianuro (CN<sup>-</sup>) con el pH.



El HCN como gas y líquido son incoloros y tienen el olor de almendras amargas, aunque no todos los individuos pueden detectar el olor. Estas formas de cianuro libre son importantes porque se consideran como los cianuros más tóxicos. Sin embargo, también son las formas que se eliminan fácilmente de las soluciones mediante bien elaborados procesos de tratamiento y mecanismos naturales de atenuación.

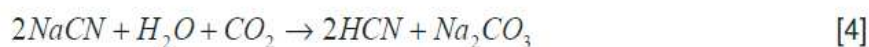
Como resultado de la ruptura de la cadena de C por la hidrólisis, el HCN se transformará lentamente a la forma de amonio, así tenemos las siguientes reacciones [2] y [3]:



La reacción [3] depende de la temperatura.

#### 2.1.1.2.- REACCIÓN CON EL CO<sub>2</sub>.

El cianuro como Cianuro de Sodio (NaCN) en presencia de CO<sub>2</sub> forma HCN, según Habashi, 1967 muestra la siguiente reacción [4]:



Por consiguiente, la alcalinidad libre debe estar presente para reaccionar con el ácido carbónico y mantener la disociación del HCN. Si se utiliza cal, formaría CaCO<sub>3</sub>, el cual precipitará. En ausencia de álcalis, el HCN puede formar polímeros que precipitan en la forma de coloraciones pardas o puede irse como gas a la fase vapor.

#### 2.1.1.3.- OXIDACIÓN

Desde el punto vista de la oxidación, el ion cianuro puede ser rápidamente oxidado con el hipoclorito, el peróxido, el ozono, mezclas de dióxido de azufre/aire o por electrólisis.

El oxígeno atmosférico reacciona lentamente con el cianuro a menos que sea catalizado.

Las reacciones generales son las siguientes [5], [6], [7] y [8]:



#### 2.1.1.4.- REACCIÓN CON EL S<sup>0</sup>, POLISULFUROS, HS<sup>-</sup>, S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>

El Cianuro reacciona fácilmente con el azufre y con los compuestos de azufre para formar tiocianatos, CNS<sup>-</sup>.

La formación de tiocianatos es la mayor fuente de consumo de cianuro en el proceso de cianuración.

Los compuestos no saturados de azufre son el producto de reacción de los sulfuros, sulfosales o azufre elemental con el oxígeno durante el almacenamiento, molienda o aireación.

Las reacciones de este proceso son las siguientes [9], [10] y [11]:



Las concentraciones del ion sulfuro de 0,5 mg/l han demostrado que puede reducir a la mitad la cinética de lixiviación del oro (Fink and Putnam, 1950).

Las sales del plomo (tal como el  $Pb(NO_3)_2$ ) se agregan para reducir la reacción del cianuro con los sulfuros; el resultado es la formación de  $PbS$  o  $PbSO_4$ .

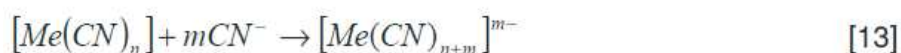
### 2.1.1.5.- REACCIÓN CON LOS METALES PESADOS

Las reacciones entre el cianuro y las menas polimetálicas o el concentrado de flotación proceden en varias etapas.

La reacción general puede ser escrita como sigue [12]:



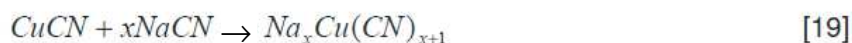
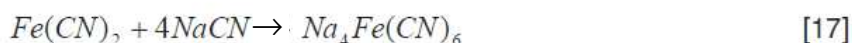
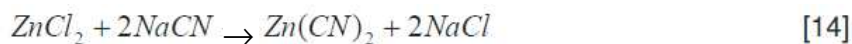
Donde **Me** representa un metal pesado y  $n = 1$  ó  $2$ . Los compuestos producto de la reacción son levemente solubles en agua, pero rápidamente solubles en exceso de  $CN^{-}$ , tal como se muestra en la siguiente reacción [13]:



Donde  $m = 1, 2, 3, 4, 6$ . Estos complejos no revelan en gran medida las propiedades del ion  $CN^{-}$  pero son complejos con baja toxicidad.

De hecho las sales de Fe y Co son utilizadas como antídotos para el

envenenamiento con cianuro. Los ejemplos se muestran en las siguientes reacciones [14], [15], [16], [17], [18] y [19]:



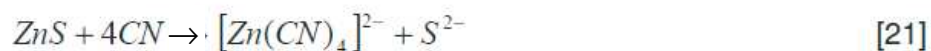
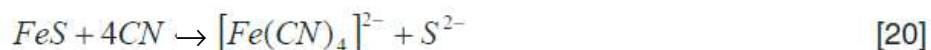
Donde  $x = 1, 2$  o  $3$ .

#### **2.1.1.6.- REACCIÓN CON LOS MINERALES.**

El Cianuro puede reaccionar fácilmente con muchos minerales, especialmente minerales de metal base para formar complejos de metal base; las reacciones con los minerales no solamente consumen Cianuro y Oxígeno, sino que los productos resultantes pueden también influir en la superficie del oro y reducir severamente la cinética de disolución del oro.

El complejo de Cianuro o metalocianuro es el término con que se designa a los elementos metálicos base que se combinan con el Cianuro para formar especies solubles, en las cuales existe una amplia gama de interacciones químicas y físicas entre estos componentes complejos y que impactan en diverso grado al medio

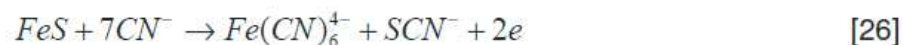
ambiente. Algunos de estos complejos de metalocianuro se muestran en las siguientes reacciones [20], [21] y [22]:

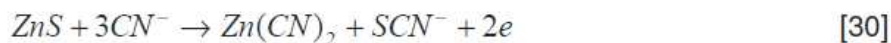
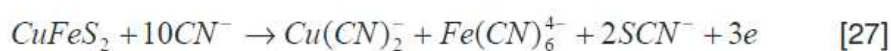


Luthy and Bruce (1979) han mostrado que la reacción de los polisulfuros y tiosulfatos forman tiocianatos los cuales se describen en las siguientes reacciones [23] y [24]:



Sandra L. McGill *et al.* (1984) demostraron que la reacción de los sulfuros metálicos y el azufre con el cianuro contenidos en los residuos o relaves de cianuración o flotación producen tiocianatos ( $SCN^-$ ) los cuales se muestran en las siguientes reacciones [25], [26], [27], [28], [29], [30] y [31]:





La minimización de la formación del tiocianato es particularmente importante porque es consumidor de grandes cantidades de reactivos utilizados en el tratamiento oxidante del cianuro en los residuos de cianuración reduce la velocidad de disolución del oro e incrementa el consumo de Cianuro. (McCreedy *et al.*, 1961)

### 2.1.2.-FORMAS DE CIANURO EN RESIDUOS MINERO-METALÚRGICOS

Una gran variedad de compuestos de Cianuro y sus derivados están presentes en la solución pobre (barren) o efluentes residuales que salen de las plantas extractivas de oro/plata y de los laboratorios metalúrgicos de enseñanza e investigación. Scout (1981) clasifico a estos compuestos como:

- 1.- Cianuro libre,
- 2.- Compuestos simples (fácilmente solubles y relativamente insolubles) y
- 3.- Compuestos complejos que agrupan complejos débiles, complejos moderadamente fuertes y complejos fuertes.

*El Cianuro libre* en solución es la concentración total de  $CN^-$  y  $HCN$  por lo que la cantidad relativa de  $CN^-$  y  $HCN$  en solución se predice por la siguiente reacción [32]:



La reacción anterior es fuertemente dependiente del pH de la solución. Así tenemos que a pH 9,38 la concentración de  $HCN$  y  $CN^-$  son iguales y a valores de pH por debajo 9,38, el 99 % del Cianuro libre se encuentra como  $HCN$ .

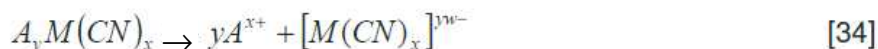
*Los Cianuros simples* están representados por la fórmula  $A(CN)_x$ , donde **A** es un álcali o un metal y **x** la valencia de **A**, representa el número de grupos Cianuro presentes.

Los cianuros alcalinos se ionizan para liberar iones-cianuro acuerdo a la reacción [33]:



*Los cianuros complejos alcalino-metálicos* pueden estar representado por la fórmula  $A$  y  $M(CN)_x$ , donde **A** es el alcalino, e “**y**” es el número de átomos alcalinos, **M** es el metal pesado (hierro férrico o ferroso, Cd, Cu, Ni, Ag, etc.) y **x** es el número de grupos  $CN^-$ . El valor de **x** es igual a la valencia de **A** y a veces más la valencia del metal pesado.

*Los Cianuros complejos solubles* se disocian en el ion complejo M (CN)<sub>x</sub> más no en el grupo CN por la reacción [34]:



Donde **w** es el estado de oxidación de **A** en la molécula original. El ion complejo puede disociarse, liberando el ion Cianuro.

**Tabla 1: Estabilidad relativa de los complejos de cianuro en agua**

Términos		Ejemplos presentes en soluciones de procesamiento de oro y plata
1. Cianuro libre		$CN^-$ , $HCN$
2. Compuestos simples		
a. Fácilmente solubles		$NaCN$ , $KCN$ , $Ca(CN)_2$ , $Hg(CN)_2$
b. Relativamente insolubles		$Zn(CN)_2$ , $CuCN$ , $Ni(CN)_2$ , $AgCN$
3. Complejos débiles (fácil de ionizar)		$Zn(CN)_4^{2-}$ , $Cd(CN)_3^-$ , $Cd(CN)_4^{2-}$
4. Complejos moderadamente fuertes, moderadamente ionizables)		$Cu(CN)_2^-$ , $Cu(CN)_3^{2-}$ , $Ni(CN)_4^{2-}$ , $Ag(CN)_2^-$
5. Complejos fuertes (muy estables)		$Fe(CN)_6^{4-}$ , $Co(CN)_6^{4-}$ , $Au(CN)_2^-$
Inorgánicos (Inestables)		$SCN^-$ , $CON^-$
Orgánicos (Nitrilos)	Alifáticos	Acetonitrilo, Acilonitrilo, Adiponitrilo, Propionitrilo
	Aromáticos	Benzonitrilo

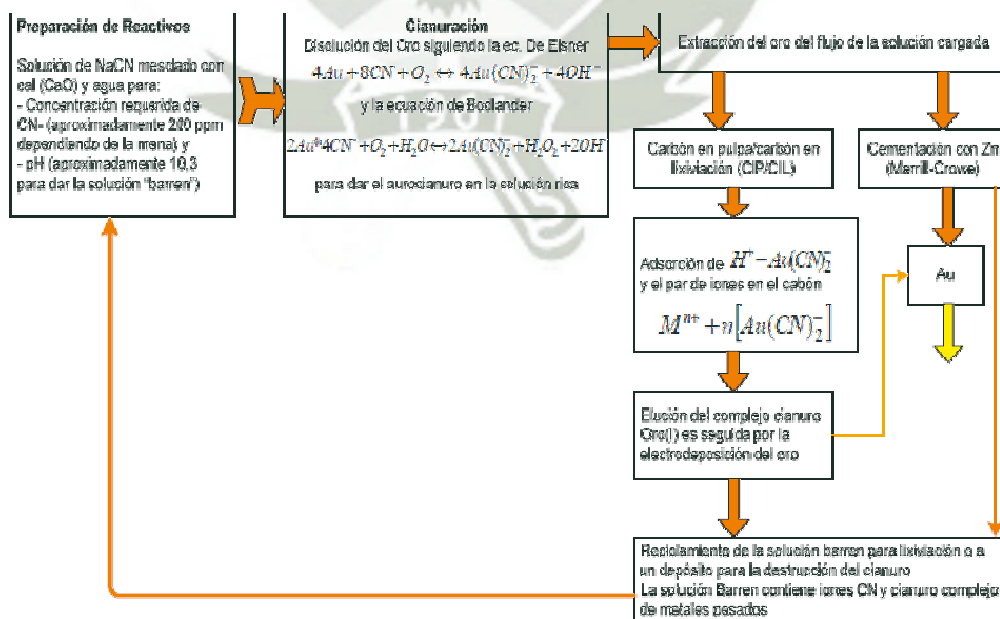
Fuente: Deshenes, G, Goo, H. 2005.

La tabla 1 muestra la estabilidad relativa de los complejos del cianuro- metal, así mismo se observa que los complejos se enumeran en el orden de aumento relativo de estabilidad.

### 2.1.3.- CICLO DE VIDA DEL CIANURO EN LA EXTRACCIÓN DEL ORO.

El esquema que muestra gráficamente el ciclo global de vida del cianuro en el proceso de extracción del oro se muestra en la Figura 2. En las plantas de procesamiento de mineral, se conoce que el oro es lixiviado en cianuro acuoso mediante oxidación con un oxidante, tal como el oxígeno disuelto, a un complejo con el cianuro a la forma estable de complejo cianuro auroso, donde la concentración del cianuro es variante, pues depende de la composición mineralógica de la mena donde siempre habrá otros metales como el Cu, Zn, Fe, Hg, Cd, etc; estos metales también consumen cianuro es decir forman complejos estables que pueden tener un doble impacto ambiental y debido a ello merecen un tratamiento especial y seguro. En la tabla 2 se muestran las constantes de estabilidad de iones complejos de cianuros metálicos.

**Figura 2. Ciclo del Cianuro en el proceso de extracción del oro**



**Tabla 2: Constantes de estabilidad de complejos de cianuros metálicos**

Ion Complejo	Constante de estabilidad <sup>*</sup>	Ion Complejo	Constante de estabilidad <sup>*</sup>
$Cr(CN)_6^{-3}$	$10^{33}$	$Cu(CN)_3^{-2}$	$10^{29,2}$
$Cr(CN)_6^{-4}$	$10^{21}$	$Cu(CN)_4^{-2}$	$10^{30,7}$
$Fe(CN)_6^{-4}$	$10^{35,4}$	$Ag(CN)_2^{-1}$	$10^{20,4}$
$Co(CN)_6^{-4}$	$10^{50}$	$Ag(CN)_3^{-2}$	$10^{21,9}$
$Ni(CN)_4^{-2}$	$10^{30}$	$Au(CN)_2^{-1}$	$10^{37}$
$Pd(CN)_4^{-2}$	$10^{42}$	$Au(CN)_4^{-1}$	$10^{85}$ (estimado)
$Pt(CN)_4^{-2}$	$10^{40}$	$Zn(CN)_4^{-2}$	$10^{21}$
$Cu(CN)_2^{-1}$	$10^{23,9}$	$Cd(CN)_4^{-2}$	$10^{19}$

Fuente: Broderius, 1973.

## 2.2.- DEGRADACIÓN BIOLÓGICA DEL CIANURO.

La degradación biológica del cianuro es una opción a los procedimientos industriales, los métodos biológicos y particularmente los microbiológicos constituyen una alternativa eficiente debió a que son específicos y pueden resultar muy económicos, respecto a los procesos químicos. Otra ventaja de estos procesos es su diseño simple y el control que se posee del proceso operativo, los bajos costos de las sustancias químicas y la capacidad de tratar por este método todas las formas de cianuro y sus subproductos (Fuente: Dumestre et al., 1997; Oudjehani et al., 2002; Akcil y Mudder, 2003; Roshan et al., 2007).

La degradación biológica de cianuro aprovecha la capacidad de ciertos grupos de microorganismos, en su mayoría bacterias, de utilizar cianuro como fuente de carbono y nitrógeno convirtiendo el compuesto tóxico en sustancia inocua (Salomons y Forstner, 1987). Entre los microorganismos con capacidad de degradar cianuros, se conocen los hongos (*Fusarium*, *Hasemula*) y bacterias (*E.coli*, *Pseudomonas*, *Citrobacter*, *Bacillus subtilis* y otros) quienes asimilan cianuro y lo usan como fuente de nitrógeno y/o carbono, teniendo como intermediario el  $\text{NH}_3$ . Algunas cepas bacterianas transforman directamente cianuro en  $\text{CO}_2$  y  $\text{NH}_3$  por medio del cianuro dioxigenasa, sin la formación de cianato como intermediario.

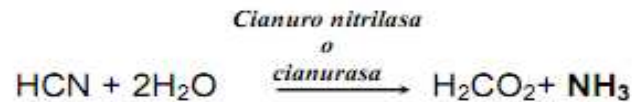
Son diversos los mecanismos empleados para utilizar o romper la molécula de cianuro. Uno de los mecanismos involucra a la enzima **cianuro hidratasa**, que resulta en la conversión irreversible del cianuro en formamida, que finalmente es transformada en  $\text{CO}_2$  y  $\text{NH}_3$ . El cianuro también puede ser convertido en -cianoalanina o en un -aminonitrilo por la -**cianoalanina sintetasa**, seguida de la hidrólisis de los productos para liberar un ácido y  $\text{NH}_3$ . Una tercera ruta involucra la utilización de la **cianuro monoxigenasa** para catalizar la conversión de HCN en cianato ( $\text{HOCN}$ ), lo que lleva a una descomposición catalítica mediada por otra enzima, **cianasa**, para producir  $\text{CO}_2$  y  $\text{NH}_3$ . La cianasa es inducible con el cianato mientras que la enzima cianuro monoxigenasa no lo es. Algunas cepas bacterianas transforman directamente cianuro en  $\text{CO}_2$  y  $\text{NH}_3$  por medio del **cianuro dioxigenasa**, sin la formación de cianato como intermediario.

Los tratamientos biológicos se han convertido en una alternativa interesante para la industria minera debidos principalmente al éxito obtenido por *Homestake Mining* en su planta de Lead, South Dakota, Estados Unidos. En esta planta, un proceso aeróbico es empleado para remover cianuro, tiocianato, cianato, amonio y metales provenientes de soluciones cianuradas. En una segunda etapa, el amonio, altamente tóxico para la vida acuática, es transformado en nitrato. El principal microorganismo involucrado en la aplicación de la tecnología es *Pseudomonas sp.* El proceso se realiza empleando Reactores Biológicos Rotatorios donde películas de bacterias se encuentran adheridas a discos giratorios que rotan de manera lenta para permitir el adecuado contacto, y degradación de cianuro, entre el microorganismo y el efluente cianurado.

Se han reportado enzimas producidas por el género *Pseudomona* que intervienen en el metabolismo del cianuro, tales como la fumarasa, aconitasa y la Malato Quinona Oxidoreductasa (MQO) (**Fuente:** *F. Merchan et al., 2008* ). También hay reportes de actividad metabólica de cianuro nitrilasas y cianuro oxigenasas (**Fuente:** *Atsushi et al., 1988; Kunz et al., 1992, 1994, 1998; Megan et al., 2003*) siendo estas la base de la biodegradación del

Las cianurasas o cianuro nitrilasas catalizan la hidrólisis del ácido cianhídrico, hasta ácido fórmico y amoníaco. Esta biodegradación se ha reportado para *Pseudomona stutzeri* (Atsushi et al., 1998), *Pseudomona fluorescens* (Kunz et al., 1992, 1994, 1998) *Pseudomona aureoginosa* (Megan et al., 2003) y *Pseudomona sp.* *Alcaligenes xylosooxidans*

subespecie de nitrificans. También se ha encontrado en otros géneros como *Bacillus pumilus* (Meyers, et al., 1991,1993), *Fusarium solani* y en algunas plantas como *Pisum sativum* (Dumestre et al., 1997) y algas como *Scenedesmus obliquus* (Gurbuz et al., 2004; 2009).



Los cianuros oxigenasas o cianasas catalizan la oxidación completa hasta dióxido de carbono y amoníaco. Estas enzimas se han reportado para *Pseudomona fluorescens* NCIMB 11764 (Kunz et al., 1992; Kunz et al., 1994; Wang et al., 1996; Dumestre et al.,1997; Kunz et al.,1998; Dakshina et al.,2003; Fernández et al., 2004) y para *Pseudomona pseudoalcaligenes* CECT5344 (**Fuente:** Martínez et al., 2008; F. Merchan et al.,2008).

### 2.3.- GENERALIDADES DE *Pseudomona*

Las especies pertenecientes a los géneros *Pseudomona* y *Burkholderia* son en general catalasa y oxidasa positivas. Morfológicamente son indistinguibles en una tinción Gram y se presentan como bacilos Gram negativos rectos o ligeramente curvos.

Las especies del género *Pseudomonas* se pueden encontrar ampliamente distribuidos en el ambiente (suelo y agua) y formando parte de la flora normal de animales y del hombre. Debido a su habilidad de sobrevivir en

ambientes húmedos y de poseer una resistencia innata a los antibióticos, este patógeno es particularmente importante en infecciones intrahospitalarias y como son agentes patógenos oportunistas, pueden producir infecciones serias en pacientes con compromiso inmunológico; convirtiéndose así en agentes importantes de infecciones nosocomiales. Otra característica peculiar de este género es que ha sido utilizado en muchas investigaciones para ayudar a degradar compuestos altamente tóxicos como el cianuro.

Entre las especies más importantes del género *Pseudomonas* se pueden encontrar a: *Pseudomona. aeruginosa* y *Pseudomona fluorescens*.

## 2.4.- MÉTODO DE IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS

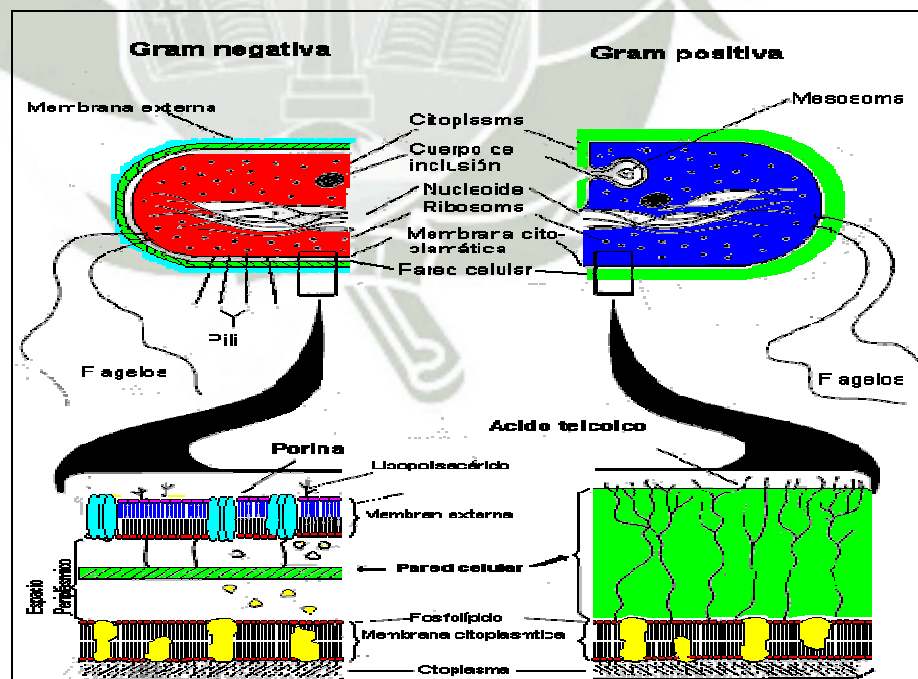
### 2.4.1.- TINCIÓN GRAM:

La tinción de Gram es uno de los métodos de tinción más importantes en el laboratorio bacteriológico, su utilidad práctica es indiscutible para reconocer la morfología celular bacteriana (cocos, bacilos, positivos, negativos, etc.). Esta tinción se denominada así por el bacteriólogo danés Christian Gram, quien la desarrolló en 1844.

Sobre la base de la reacción a la tinción de Gram, las bacterias pueden dividirse en dos grupos, Grampositivas y Gramnegativas debido a las diferencias constitutivas en la estructura de sus paredes celulares.

La pared de la célula bacteriana sirve para dar su tamaño y forma al organismo así como para crear una barrera física contra el medio ambiente externo. El material de la pared celular que le da rigidez es el peptidoglicano. La pared de la célula Gram-positiva es gruesa y consiste en varias capas interconectadas de Peptidoglicano así como algo de ácido Teicoico. La pared de la célula Gram-negativa, por otro lado, contiene una capa mucho más delgada, (solo una unidad de espesor) únicamente de Peptidoglicano y está rodeada por una membrana exterior compuesta de fosfolípidos, lipopolisacáridos, y lipoproteínas. Las diferencias de la pared celular de las bacteria Grampositivas y Gramnegativas se muestra en la figura 3.

**Figura 3: Diferencias de la pared celular de las bacterias Gram negativas y Gram positivas**



Fuente: Cisternas – 2007

Las bacterias Gram-positivas retienen el cristal violeta después de la decoloración y aparecen de color azul intenso. Las bacterias Gram-negativas no son capaces de retener el cristal violeta después de la decoloración, y son teñidas de rojo con el colorante de contraste safranina dando un color rosa suave. (**Fuente:** *Lic. Osvaldo Cisternas – 2007*)

## 2.4.2. PRUEBAS BIOQUÍMICAS (CRECIMIENTO EN AGAR

### TRIPLE AZÚCAR HIERRO- AGAR TSI)

Este medio permite determinar la capacidad de un microorganismo de degradar un hidrato de carbono específico incorporado a un medio básico con o sin producción de gas y de ácido sulfhídrico ( $\text{SH}_2$ ). El medio contiene tres azúcares: lactosa (1%), sacarosa (1%) y glucosa (0.1%) en una relación de 10:10:1 g/ litro, respectivamente.

La degradación del azúcar con formación de productos ácidos se manifiesta por un cambio de color del indicador (rojo de fenol) que vira del naranja al amarillo o al rojo en caso de alcalinización. El tiosulfato es reducido a  $\text{SH}_2$  que reacciona con la sal férrica produciendo  $\text{S}_3\text{Fe}_2$  color negro.

**Agar Triple Azúcar Hierro - TSI (Composición g/l)**

Peptona de caseína	15.0 g.
Peptona de carne	5.0 g.
Extracto de levadura	3.0 g.
NaCl	5.0 g.
Lactosa	10.0 g.
Sacarosa	10.0 g.
Glucosa	1.0 g.
Citrato férrico y amonio	0.3 g.
Tiosulfato de sodio	0.3 g.
Rojo fenol	0.024 g.
Agar	12.0 g.

Disolver en agua de grado reactivo y calentar hasta disolver. Esterilizar en autoclave a 121 °C. pH final 7,4

El medio preparado se sirve en tubos estériles dejándolo solidificar en posición inclinada formando en la superficie un pico de flauta. Para una correcta interpretación de esta prueba es muy importante realizar la lectura luego de 18 a 24 horas.

**Interpretación:** Luego de la incubación pueden observarse:

<b>Lectura (pico de flauta/profundidad)</b>	<b>Interpretación</b>
Alcalino/Acido, con o sin gas <sup>1</sup> ó Rojo/Amarillo	Fermenta la glucosa
Acido/Acido, con o sin gas o Amarillo/Amarillo	Fermenta glucosa y lactosa (sacarosa <sup>2</sup> )
Alcalino/Alcalino o sin cambio o Rojo/Rojo	No fermentan glucosa ni lactosa (sacarosa)

## CAPITULO III

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1.- LUGAR DE EJECUCION

El trabajo de investigación se desarrolló en los laboratorios del pabellón “H” de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas de la Universidad Católica de Santa María, lugar donde se realizaron las pruebas de degradación de cianuro con microorganismos del género *Pseudomona* aislado del relave minero.

#### 3.2.- LUGAR DE OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

La muestra se obtuvo de la planta de procesamiento de mineral “D-CRAIN S.R.L.”

##### 3.2.1.- DESCRIPCIÓN DE LA PLANTA DE PROCESAMIENTO DE MINERAL “D-CRAIN S.R.L.”

La planta “D-CRAIN S.R.L.” se encuentra ubicada en la zona baja del cerro “Quinchin” tiene un área de 575 m<sup>2</sup> como se detalla:

- Área de producción: 350 m<sup>2</sup>
- Laboratorios: 50 m<sup>2</sup>
- Área de administración: 12 m<sup>2</sup>
- Sala de maquinas: 46 m<sup>2</sup>
- Vestuarios aseos: 24 m<sup>2</sup>
- Accesos y vías: 93 m<sup>2</sup>

La empresa Minera “D-CRAIN S.R.L.” se instala el año 1998 con la finalidad de realizar procesos de extracción y explotación de mineral de oro, iniciándose sus labores con el método de carbón lixiviado, en tolva, luego pasó a electrodeposición y actualmente trabaja con el método de lixiviación (cianuración) – agitación y lavado en contracorriente y recuperando los valores auríferos por procesos técnicos.

La empresa minera “D-CRAIN S.R.L.” durante los últimos años ha venido optimizando el tratamiento de los relaves de oro logrando obtener buenos resultados y bajando sus costos de operación. Cabe mencionar que la planta “D-CRAIN S.R.L.” trata los minerales oro por el método de lixiviación logrando obtener a la fecha una recuperación del 57.8. La planta actualmente tiene una capacidad de 300 TMD y trabaja en circuito cerrado recirculando las soluciones.

Las instalaciones y medios técnicos con los que está dotada la planta, permiten producir a escala apropiada los procesos más representativos de la industria minera.

### **3.2.2.- LOCALIZACION**

La planta de procesamiento de mineral “D-CRAIN S.R.L.” se encuentra políticamente situada en el distrito de Ocoña, Provincia de Camana y Departamento de Arequipa y está situada en la zona de la

desembocadura del río Ocoña, al sur y a 8 Km del cerro “Quinchín”, próximo a la carretera Panamericana Sur, km 720 + 250, a orillas del océano pacífico donde se puede ver a simple vista un valle redondo abierto hacia el Noroeste. La altitud promedio de la zona de explotación varía entre los 500 y 1500 msnm. El acceso principal es por vía terrestre, partiendo desde la ciudad de Arequipa hasta la provincia de Camaná mediante carretera asfaltada de 325 Km, contigua a ésta se ubica la planta de procesamiento. Desde un desvío de la carretera panamericana se accede por medio de una trocha carrozable a una distancia de 7,3 Km. En la figura 4 se identifica la zona geográfica donde se encuentra ubicada la planta D-CRAIN S.R.L (haciendo uso del programa Google Eart).

**Figura 4: Vista geográfica de la planta de “D-CRAIN S.R.L.”**



### 3.2.3.- PROGRAMA DE PRODUCCIÓN

El programa de producción de la planta de procesamiento de mineral

“D-CRAIN S.R.L.”, detalla lo siguiente:

- |  |     |
|--|-----|
| a) Horas de trabajo / día                    | 6   |
| b) Turnos de trabajo / día                   | 1   |
| c) Días de trabajo al año                    | 320 |
| d) Días de mantenimiento al año              | 45  |
| e) Requerimientos de materia prima e insumos |     |
| - Agua.                                      |     |
| - Peróxido de hidrógeno.                     |     |
| - Dióxido de Titanio.                        |     |
| f) Volumen de producción de agua tratada.    |     |

### 3.2.4.- FACTORES CONDICIONANTES DEL TAMAÑO

Los factores más importantes que determinan el tamaño de la planta son:

- La disponibilidad de materia prima e insumos.
- La demanda de agua para el tratamiento en la empresa “D-CRAIN SRL”
- La disponibilidad de tecnología.
- La rentabilidad del proyecto.

Con relación al tamaño de producción la explotación es a escala de pequeña minería artesanal, para el año 2012, la planta de procesamiento de mineral “D-CRAIN S.R.L.” tiene una capacidad

de producción de mineral que va desde 25 ton/día hasta 350 ton/día, según datos referenciados del Gobierno Regional de Arequipa.

Para la materia prima y lo que se refiere al programa productivo se calculó una demanda real del recurso hídrico de 720.6 m<sup>3</sup> al año o 2 252.1 litros al día para tratamientos, esta demanda está sujeta en relación directa al crecimiento en capacidad de la planta de procesamiento de mineral “D-CRAIN S.R.L.”, la que actualmente tiene una capacidad instalada para procesar de 20 toneladas de mineral al día. Por lo tanto según el análisis Tamaño – disponibilidad de materia prima se propone la instalación de una planta que trata 2 252 litros al día de mineral, esto teniendo en cuenta principalmente la capacidad de la planta y el programa productivo trazado.

Con relación al factor tecnología se tiene que el tamaño de planta debe superar la escala mínima aplicable industrialmente para garantizar un bajo costo de producción y asegurar una inversión rentable. Es algo difícil establecer con exactitud una escala mínima, pero podemos suponer que el tamaño mínimo requerido para depurar el agua es el de una planta con la mínima capacidad en el margen de pequeña minería es decir una planta de beneficio con capacidad de

25 toneladas al día, la que produciría alrededor de 2 m<sup>3</sup> al día de efluentes líquidos.

### 3.2.5. CARACTERÍSTICAS DEL RELAVE PLANTA MINERA “D-CRAIN SRL” – OCOÑA

La información de las características del relave fue proporcionado por el área de producción de la planta minera “D-CRAIN SRL” y se detalla en la tabla 3.

**Tabla 3: Características del relave de la planta minera “D-CRAIN SRL”**

Descripción	Unidad	Relave fresco	Relave Retratado
Concentración de sólidos, Cp	%	72 – 74	72 – 74
Tensión de fluencia	Pa	50 – 105	20 – 80
Viscosidad	Pa s	0,10 – 0,20	0,10 – 0,20
Pendiente de depositación de relaves	%	4 – 6,2	3,5 – 6,5
Conductividad Eléctrica	mm/día	1,5 – 20	1,5 – 5

El sistema de descarga de relaves considera los siguientes elementos:

## 1. Planta de espesado y sistema de transporte de los relaves

### a) Planta de espesado

La planta de espesado de relaves tiene como función aumentar la concentración de sólidos de los relaves provenientes de las plantas de beneficio existente y la de retratado de relaves provenientes de la planta de procesamiento de relaves.

### b) Sistema de Transporte de Relaves (relaveducto)

El relave es conducido al depósito mediante un sistema de tuberías superficiales que se extienden 1,05 km. Está compuesto por 2 tuberías y 2 bombas de desplazamiento positivo, con sus respectivas válvulas de succión e impulsión asociadas.

## 2. Obras anexas

### a) Sistema de manejo de aguas lluvias

Para el manejo de aguas lluvias, existe un sistema interceptor de las aguas de escorrentía superficial a través de un canal de contorno que se une aguas abajo del canal de contorno existente.

## 3.3.- MATERIALES

### A) Equipos e instrumentos:

- Efluentes líquidos de la empresa minera **D-CRAIN SRL**.
- Balones de fondo plano de 250, 500, 1000 ml.
- Matraces de 250, 500, 1000 ml.
- Matraz con quita sato 500ml.
- Probetas de 100ml.

- Bureta de 50ml.
- Papel filtro.
- Pipetas 5, 10 ml.
- Frascos de vidrio.
- Soportes universales.
- Cronómetro.
- pH- metro.
- Equipo Shaker.
- Sistema de agitación.
- Balanza Analítica (0.01g).
- Espectrocolorímetro.
- Microscopio.
- Placas Petri.
- Estufa.
- Autoclave.

Los materiales mencionados se emplearon en diversas actividades como: preparaciones de medios de cultivo e inóculos y para la realización de los ensayos

La mayoría de los materiales usados fueron de vidrio debido a que poseen resistencia frente a los ácidos, álcalis y responden a determinadas exigencias térmicas y mecánicas como calentar y fundir sustancias.

Los materiales de precisión se usaron para medir masas y volúmenes de sustancias químicas o biológicas.

## B) Reactivos

- Agar Nutritivo.
- Cianuro de sodio.
- Hidróxido de sodio.
- Bicarbonato de sodio.
- Agua destilada.
- Nitrato de plata.
- Bateria tinción Gram.

### 1. Cristal violeta

Cristal violeta	2g
Alcohol Metílico	100ml

### 2. Lugol

Cristal de Iodo	1 g
Yoduro de potasio	2g
Agua destilada	300 ml

### 3. Alcohol acetona

Acetona	40 ml
Alcohol Etílico	120 ml

#### 4. Fucsina Básica

Fucsina Básica	1g
Alcohol etílico 95%	20 ml

### C) Material Biológico

El material biológico estuvo constituido por el aislado bacteriano procedente de los relaves de la planta de procesamiento de mineral “D-CRAIN S.R.L.” Ubicada en el distrito de Ocoña.

### 3.4.- TOMA DE MUESTRA DE MATERIAL BIOLÓGICO

Se tomó la muestra en los efluentes de los relaves de la planta de procesamiento de mineral “D-CRAIN S.R.L.”.

Las muestras se recolectaron en frascos estériles debidamente identificados para cada una de las zonas de muestreo. Una vez recolectadas las muestras se colocaron en un contenedor isotérmico protegidos de la luz solar para su traslado al laboratorio de la Universidad Católica de Santa María, esto en un tiempo no mayor de 24 horas.

Se tomaron muestras de 3 zonas específicas del relave, estas zonas fueron identificadas de la siguiente manera:

ZONA A: Fase Líquida

ZONA B: Fase Sólida (sedimentos)

ZONA C: Interface Líquido – Aire (orillas)

La zona de muestreo se determino debido al estudio realizado por Gil Pavas, 2008 en donde menciona que el patrón de distribución bacteriano en relaves y pozas no es homogéneo y que deben de aplicarse una zonificación que permita lograr un nivel de obtención significativo con la distribución espacial heterogénea de los microorganismos.

### **3.5.- AISLAMIENTO BACTERIANO**

Con ayuda de una aza bacteriológica se sembró por el método de estría o agotamiento un inocuo del relave en 2 medios de cultivo diferentes placas con Agar nutritivo y Agar Mac Conkey.

Para cada muestra se realizaron 3 repeticiones de sembrado

Las placas sembradas se incubaron a 37°C por un periodo de 72 horas.

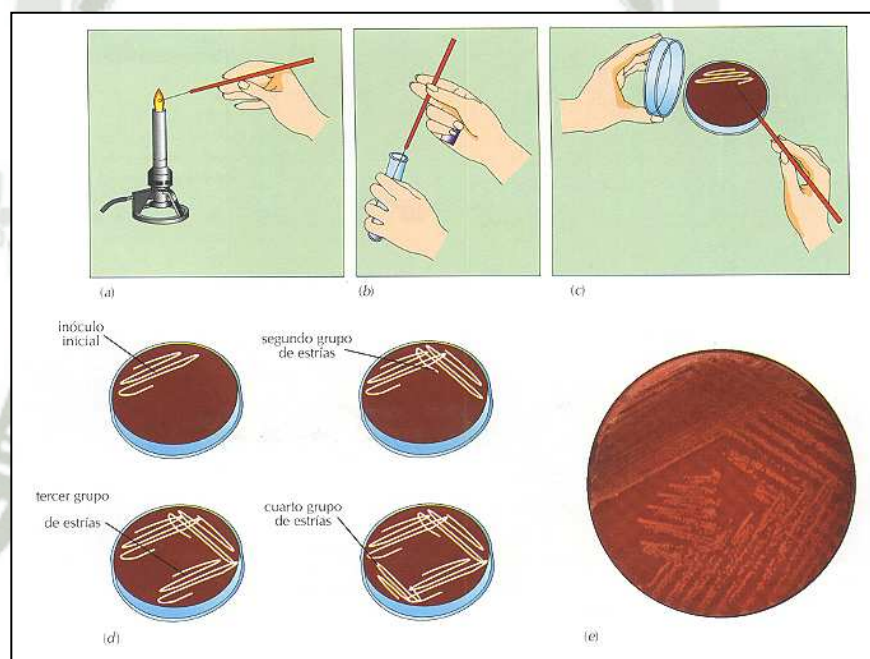
#### **Procedimiento del método de siembra por estría en una placa.**

La figura 5 muestra la siembra por estría en una placa, el cual se describe a continuación:

- (a) Esterilizar por flameado directo a la llama del mechero una aza bacteriológica.
- (b) Esperar que el aza bacteriológica enfríe para poder coger un inoculo de la muestra.
- (c) Sembrar por estría o agotamiento en una placa de Agar nutritivo y Agar Mac Conkey

- (d) Incubar las placas sembradas en estufa o incubadora a 37°C por un periodo de 72 horas.
- (e) Observar el crecimiento o desarrollo de las colonias en las placas de Agar nutritivo y Agar Mac Conkey durante las 24, 48 y 72 horas.

**Figura 5: Método de siembra por estría o agotamiento en una placa**



A cada una de las colonias que desarrollaron en Agar Nutritivo y Agar Mac Conkey se le realizó una tinción Gram y se le resembró en agar TSI para poder identificar cuál de ellas pertenece al género *Pseudomonas*.

Los microorganismos fueron mantenidos vivos en agar nutritivo, renovando el cultivo cada 4 días

Identificados los microorganismos del género *Pseudomonas* se seleccionó al que presento mayor crecimiento en Agar Nutritivo y Agar Mac Conkey para adaptarlo antes de usarlo en las pruebas de biodegradación.

**Adaptación del microorganismo en un medio de cultivo que contiene 250 ppm de NaCN:**

La figura 6 muestra el diagrama de flujo a seguir para la adaptación del microorganismo, tal como se describe a continuación:

- (a) Retirar con una lanceta estéril el medio de cultivo que contiene el microorganismo de interés.
- (b) Colocar el medio de cultivo que contiene el microorganismo en un matraz con caldo nutritivo que contiene 250 ppm de NaCN y homogenizar.
- (c) Incubar el matraz a 37°C por 24 a 48 horas. }
- (d) Después de la incubación observar el crecimiento del microorganismo debido a la presencia de turbidez.
- (e) Utilizar 10 mL de este cultivo como inculo en cada prueba a realizar.

**Figura 6:** Diagrama de flujo para la adaptación del microorganismo y obtención del inculo a usar en las pruebas experimentales



**Fuente:** “Edison Gil Pavas y Catalina Giraldo –2005”

### 3.6.- DISEÑO EXPERIMENTAL

La preparación y ejecución del conjunto de pruebas se realizaron con el objetivo de verificar la validez de la hipótesis sobre las causas o factores del fenómeno en estudio. Además de obtener información de calidad que permita comprender mejor el proceso (degradación de complejos de cianuro) y tomar decisiones sobre como optimizarlo.

Se uso un diseño factorial para evaluar estadísticamente como influyen los factores y los niveles elegidos. El diseño factorial elegido fue el  $2^k$  experimentos, donde  $k$  = factores (Concentración de Cianuro y Agitación), cada uno con dos niveles, por lo que la matriz del experimento es:

	<b>X<sub>1</sub></b>	<b>X<sub>2</sub></b>
<b>1</b>	-	-
<b>2</b>	+	-
<b>3</b>	-	+
<b>4</b>	+	+

En las pruebas se utilizo 2 soluciones de cianuro de sodio; una con 250ppm de NaCN y otra con 500 ppm de NaCN, ambas soluciones se mantuvieron a pH 10.5 con la adición de buffer carbonato y se considero dos niveles de agitación una baja de 25 rpm y otra alta de 120 rpm durante las 24 y 48 horas de incubación. Al término de cada prueba se determino la capacidad

de las bacterias en degradar el compuesto cianurado,

Para cada prueba se dispuso de tres bioensayos, de acuerdo con las pruebas preliminares, el tiempo de duración para cada uno fue de 48 horas y el receso entre uno y otro fue de dos días.

La variable respuesta se determinó en ppm de cianuro, al final de cada tiempo de incubación para cada bioensayo, para la determinación del cianuro se utilizó el método titulométrico (APHA, 1998).

### **3.6.1.- PLANEAMIENTO DE LAS PRUEBAS.**

Para determinar la capacidad degradadora de cianuro de sodio por el aislado bacteriano del género *Pseudomonas* se evaluaron las variables concentración de cianuro en ppm y la agitación, tal como se detalla en la tabla 4.

En el estudio de la variable cianuro de sodio se eligió dos concentraciones una de 250 ppm y otra de 500 ppm y en de la variable agitación se considero dos velocidades una a 25 rpm y a otra a 120 rpm.

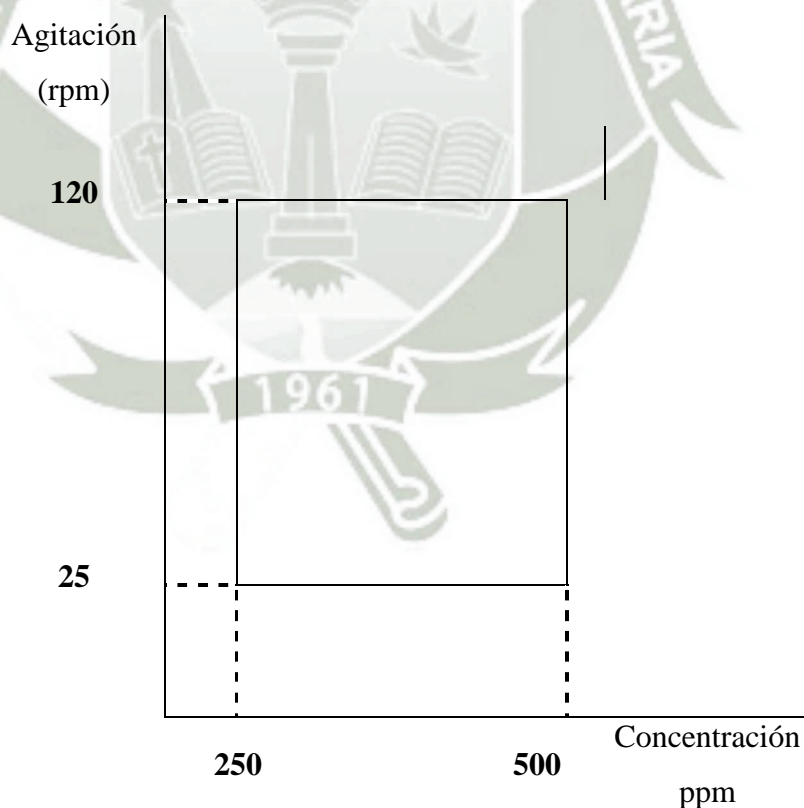
La solución donde se desarrollo la prueba se fijó a pH 10.5 utilizando un buffer de carbonato, ( $\text{NaHCO}_3$  y  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) a concentración de 2gr para cada matraz.

**Tabla 4:** Variables y niveles de experimentación usadas en las pruebas de biodegradación.

Variable	Nivel (-)	Nivel (+)
Concentración de CN en ppm	250	500
Agitación en rpm	25	120

La figura 7 grafica los valores de cada variable (concentración de cianuro y agitación) a usar en las pruebas de biodegradación.

**Figura 7:** Niveles de concentración de cianuro y agitación a usar en las pruebas de biodegradación.



A fin de obtener una adecuada estimación de la variabilidad, se hacen tres replicas en cada ensayo. Además se consideran 2 tiempos uno a 24 y 48 horas.

### **Procedimiento a seguir para el desarrollo de las pruebas de biodegradación de cianuro con el aislado bacteriano.**

El procedimiento realizado se describe a continuación:

- Inocular 10 mL del el aislado de Pseudomona adaptado con NaCN, en un matraz Erlenmeyer que contiene 125 mL de solución cianurada.
- Colocar otro matraz Erlenmeyer que contiene 125 mL de solución cianurada sin el inculo.
- Realizar mediciones de pH y concentración de cianuro entre las 0, 24 y 48 horas para los dos niveles de agitación (25rpm y 125rpm) a cada matraz.

La tabla 5 muestra las cuatro pruebas experimentales realizadas y en ella se puede comparar los parámetros de concentración de cianuro y agitación para cada una de las pruebas.

**Tabla 5:** Concentración de cianuro y agitación para cada una de las pruebas experimentales realizadas.

PRUEBA 1	PRUEBA 2	PRUEBA 3	PRUEBA 4
[CN <sup>-</sup> ] =250 ppm	[CN <sup>-</sup> ] =250 ppm	[CN <sup>-</sup> ] =500 ppm	[CN <sup>-</sup> ] =500 ppm
25 rpm	120 rpm	25 rpm	120 rpm
pH = 9.5	pH = 9.5	pH = 9.5	pH = 9.5
T = ambiente	T = ambiente	T = ambiente	T = ambiente
Glucosa = 1g/L	Glucosa = 1g/L	Glucosa = 1g/L	Glucosa = 1g/L

*Fuente: Elaboración Propia*

Las condiciones para un bioensayo se describen a continuación mostrando las variaciones para cada montaje:

- Tres Erlenmeyer de vidrio con 125ml de solución cianurada que contiene 250 ppm de NaCN ajustado a pH 10.5 se inocularon con 10 mL del cultivo de Pseudomonas adaptado, estos matraces se agitan a 25 rpm. Como controles se tomaron dos Erlenmeyer de vidrio con las mismas condiciones pero sin inóculo bacteriano.
- Tres Erlenmeyer de vidrio con 125 ml de solución cianurada que contiene 500 ppm de NaCN ajustado a pH 10.5 se inocularon con 10 mL. del cultivo de Pseudomonas adaptado, estos matraces se agitan a 25 rpm. Como controles se tomaron dos Erlenmeyer de vidrio con las mismas condiciones pero sin inóculo bacteriano.
- Tres Erlenmeyer de vidrio con 125 ml de solución cianurada que contiene 250 ppm de NaCN ajustado a pH 10.5 se inocularon con

10 mL. del cultivo de Pseudomonas adaptado, estos matraces se agitan a 120 rpm. Como controles se tomaron dos Erlenmeyer de vidrio con las mismas condiciones pero sin inóculo bacteriano.

- Tres Erlenmeyer de vidrio con 125 ml de solución cianurada que contiene 500 ppm de NaCN ajustado a pH10.5 se inocularon con 10 mL. del cultivo de Pseudomonas adaptado, estos matraces se agitan a 120 rpm. Como controles se tomaron dos Erlenmeyer de vidrio con las mismas condiciones pero sin inóculo bacteriano.

La tabla 6 muestra el registro utilizado durante el desarrollo de las pruebas experimentales y la tabla 7 muestra los valores de las tres replicas obtenido a las 24 y 48 horas después de haber iniciado las pruebas experimentales

**Tabla 6:** Registro usado en la determinación de cianuro presente en el tiempo durante la desarrollo de las pruebas experimentales.

MUESTRA	1	2	3	4	5	6	7	8	9
TIEMPO (Horas)	0	0,5	1	2	4	8	12	24	48
Conc. de Cianuro (ppm)									

*Fuente: Elaboración Propia*

**Tabla 7:** Cantidad de Cianuro (ppm) a las 24 y 48 horas después de haber iniciado las pruebas experimentales

N° de prueba	CN ppm	Agitación rpm	PPM DE CIANURO			PPM DE CIANURO		
			24 horas			48 horas		
			Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
Prueba N° 1	250	Baja 25 rpm						
Prueba N° 2	500	Baja 25 rpm						
Prueba N° 3	500	Alta 120 rpm						
Prueba N° 4	250	Alta 120 rpm						

*Fuente: Elaboración Propia*

### 3.7.- PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO PARA LA EXPERIMENTACIÓN

Se realizaron pruebas químicas preliminares con el fin de seleccionar un medio que ofreciera una retención del 100% de NaCN, en el cual se verificó la precisión del método titulométrico usando una muestra patrón de concentración de cianuro conocida (500 ppm).

## PRUEBA QUÍMICA:

### (Retención de cianuro en el medio de cultivo)

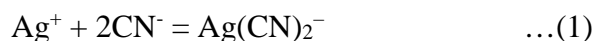
Para asegurar la retención de cianuro en el medio se procedió a alcalinizar el medio de cultivo con buffer carbonato hasta un pH de 10.5 evitando que el cianuro reaccione con el hidrogeno del ambiente no pudiendo formar el gas cianhídrico produciendo la perdida de cianuro del medio de cultivo.

Después de comprobar que en el medio de cultivo no se presenta la perdida de cianuro se realizaron pruebas biológicas con el fin de acondicionar a los microorganismos del Genero *Pseudomonas* exponiendo el microorganismo inicialmente a concentraciones de 250 ppm de NaCN y luego a concentraciones de 500 ppm de NaCN (Dimitry *et al.*, 2001; Betancur *et al.*, 2005)

### 3.8.- DETERMINACION DE CIANURO POR MEDIO DEL MÉTODO TITULOMÉTRICO.

Se utilizó el método título métrico, el cual permite determinar concentraciones de cianuro mayores de 5 mg/l (ppm), además de ser un método rápido y fácilmente desarrollado.

La técnica se fundamenta en la reacción del nitrato de plata con el ión cianuro en solución alcalina para formar el complejo soluble  $Ag(CN)_2^-$ . la reacción química es la siguiente:

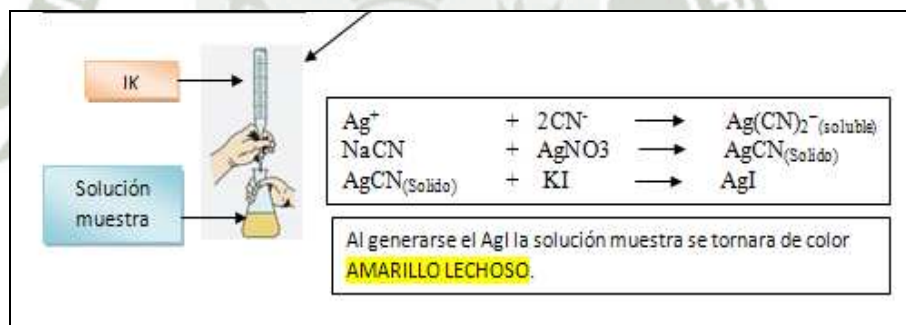


Cuando el ion cianuro en solución se agota, el exceso de ion plata precipita como AgCN o reacciona con el indicador (KI) para formar AgI. la reacción química es la siguiente:



En ambos casos, el punto final de la titulación lo proporciona la aparición de una turbidez permanente, blanca o amarillo opalescente. El proceso anteriormente descrito se puede observar en la figura 8.

**Figura 8:** Método volumétrico para la determinación de cianuro



*Fuente: Elaboración Propia.*

La verificación de la exactitud para el método titulométrico se realizó titulando una alícuota de 3 ml de una muestra patrón con concentración conocida (500 ppm de NaCN), la titulación se realizó por triplicado y se calculó el porcentaje de error tal como se muestra en la tabla 8.

**Tabla 8:** Precisión del método titulométrico para la medición de una solución de NaCN con concentración conocida (500pm).

Muestra patrón (g de NaCN)	(g de NaCN) por Titulación			Valor promedio (g de NaCN)	%error del método	Desviación Estándar	Repetibilidad
	Título 1	Título 2	Título 3				
0.50	0.4312	0.372	0.450	0.4182	16.36	0.04080	0.1754

**Procedimiento para determinar la cantidad de CN por el método Titulométrico.**

Para las titulaciones de la muestra patrón se utilizo nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) 0.01N (titulante) y yoduro de potasio (KI) como indicador, siguiendo el siguiente procedimiento:

- Colocar en un Beaker agua destilada
- Adicionar al Beaker agua destilada 3 mL de la muestra y homogenizar
- Posteriormente adicionar dos gotas de Ioduro de potasio
- Valorar la solución con nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ), hasta la aparición de un color amarillo lechoso
- Reportar el gasto de con nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) y calcular los resultados.
- El resultado se obtienen después de multiplicar la diferencia entre el volumen inicial y final del  $\text{AgNO}_3$  utilizados en cada título, por el

volumen de muestra original y dividirlo por los mililitros de muestra utilizados para titular, este resultado corresponde a los mililitros de  $\text{AgNO}_3$  que reaccionaron con el indicador KI formando complejos con el ion cianuro. Finalmente se multiplican por el factor de conversión  $9.8015 \times 10^{-4} \text{g. de CN}^- / \text{mL de AgNO}_3$  y se obtiene el valor en gramos de cianuro medido. (APHA, 1998).

### 3.9.- METODO DE RECUESTO DIRECTO AL MICROSCOPIO

El recuento directo al microscopio se puede realizar de dos maneras: con muestras teñidas o en fresco. En el caso de las observaciones en fresco se utilizan cámaras de conteo especiales que consisten básicamente en una retícula de superficie conocida grabada sobre una placa de vidrio, similar a un portaobjetos. Este método de conteo en cámara es tedioso pero es una forma rápida de estimar la carga microbiana de una muestra. A pesar de ello el método tiene algunas limitaciones:

- 1) No se distinguen células muertas y vivas.
- 2) Las células pequeñas son difíciles de ver bajo el microscopio.
- 3) Poca precisión.
- 4) Se requiere un microscopio de contraste de fases (muestra sin teñir).
- 5) El método no es adecuado cuando la densidad de células es baja.

El método de conteo en cámara se basa en colocar una gota de la muestra sobre una cámara de conteo celular a la que se cubre con un vidrio similar a

un cubreobjetos convencional; de este modo se puede contar el número de células en la retícula bajo el microscopio. Multiplicando este valor por un factor de conversión, calculado en función del volumen alojado en la cámara, se puede estimar en número de bacterias por mililitro de muestra.

Las cámaras de conteo celular se suelen utilizar en el laboratorio de análisis clínicos para realizar el recuento de glóbulos rojos y blancos. Así tenemos que la cámara más usada es la de Neubauer.

### **PROCEDIMIENTO PARA EL RECuento DE CÉLULAS EN LA CÁMARA DE NEUBAUER**

1. Se procedió a la limpieza de la cámara
2. Se suspende una gota de la solución a analizar sobre el portaobjeto y dejar que se disperse.
3. Se coloca en el cubreobjeto cuidando de no formar burbujas de aire. Caso contrario se deberá repetir la operación lavando y secando el portaobjetos. Al colocar el cubreobjetos sobre el portaobjetos se tiene una profundidad de 0,1 mm. De forma que el volumen contenido en cada uno de los cuadrados grandes sea  $0,1 \text{ mm}^3$  ( $1,0 \text{ mm}^2 \times 0,1 \text{ mm} = 0,1 \text{ mm}^3$ ).
4. Colocar la cámara de Neubauer en la platina del microscopio y enfocar con el objetivo 10x. Se enfoca de manera que en el campo se cubra un cuadrado cuya área corresponda a  $1 \text{ mm}^2$ , generalmente se trabaja con

el cuadro central. El área del cuadro central es de  $1 \text{ mm}^2$  y se encuentra subdividida en 25 cuadrados. Cada uno de estos cuadrados mide  $0,2 \text{ mm}$  de lado, por lo que el área de cada uno será de  $0,04 \text{ mm}^2$ .

5. Una vez ubicada la cuadrícula de 25 cuadros de  $0,04 \text{ mm}^2$ , hacer un cambio de lente al objetivo  $40x$  y contar las células que se encuentran en el mismo.
6. Se recomienda tener un conteo entre 200 y 300 células por muestra.
7. Cuando en el cuadro central existen menos de 200 células, es necesario revisar más cuadros para el conteo.
8. Se sugiere continuar el conteo en los cuatro cuadros que forman las esquinas de la cuadrícula. Si aún así no se alcanza las 200 células, se debe contar el total de los 25 cuadrados.
9. En caso de que el número de células sea muy elevado y se dificulte su conteo será necesario diluir la suspensión muestra en una proporción conocida, la que deberá ser tomada en cuenta en la estimación final.

#### **DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD CELULAR**

$\text{N}^\circ$  de células en  $0,1 \text{ mm}^3 = \text{N}^\circ$  total de células contadas /  $\text{N}^\circ$  de cuadrados de  $0,04 \text{ mm}^2$ . El  $\text{N}^\circ$  de células por ml se obtendrá al multiplicar el valor obtenido por 10000.

$$\text{N}^{\circ} \text{ de células} / \text{ml} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ total de células contadas}}{\text{N}^{\circ} \text{ de cuadrados de } 0,04 \text{ mm}^2} \times 10\,000$$

*Fuente: (MANACORDA, 2007)*

Para la observación microscópica; se cuentan todas las células en un cuadrado; por ejemplo 12 células (en la práctica se halla la media de varios cuadrados), cada rejilla de 25 cuadrados grandes y un área total de 1 mm<sup>2</sup> y volumen de 0.02 mm<sup>3</sup>. Para calcular el número por mililitro de muestra.

$$12 \text{ células} \times 25 \text{ cuadrados} \times 50 \times 10^3 = 1.7 \times 10^7$$

número por mm<sup>2</sup>

número /mm<sup>3</sup>

número /cm<sup>3</sup> (ml)

$$12 \text{ células} \times 25 \text{ cuadrados} \times 50 \times 10^3 = 1.7 \times 10^7 \frac{\text{Numero de células}}{[(\text{cm})^3](\text{ml})}$$

- 25 cuadrados => número por mm<sup>2</sup>.
- 50 => numero/ mm<sup>3</sup>.
- 10<sup>3</sup> => numero/ (cm<sup>3</sup> (ml)).

*Fuente: (MANACORDA, 2007)*

## CAPITULO IV

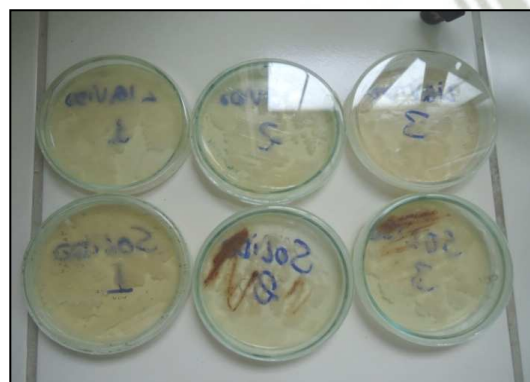
### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los resultados obtenidos se evidencia el comportamiento del aislado bacteriano nativo, frente a su capacidad de crecimiento en presencia de cianuro libre en medios con buffer carbonato a diferentes pH, el procedimiento incluyó un análisis de varianza ANOVA donde se muestran los efectos de cada factor de manera independiente y las interacciones entre ellos sobre la variable dependiente (ppm de cianuro biodegradado). Finalmente se incluyen las tablas correspondientes al diseño experimental donde se muestran las concentraciones en ppm de cianuro de sodio biodegradados en cada condición establecida para el diseño.

#### 4.1. SIEMBRA DEL RELAVE

Después de la incubación a 37°C por 72 horas en las placas de Agar nutritivo y agar Mac ConKey sembradas con la muestra cada zona del relave, se observó la presencia de colonias, tal como se muestran en la foto 1 y 2.

**Foto 1**

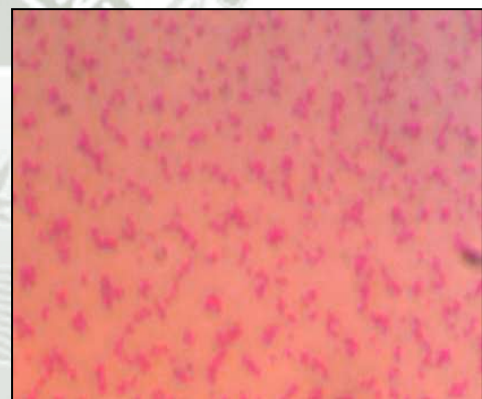


**Foto 2**



La Foto 1 muestra el Crecimiento de colonias en Agar nutritivo de muestras provenientes cada zona del relave y la Foto 2: muestra la presencia de colonias en el Agar nutritivo obtenida de la muestra recogida de la interfase, orillas

A cada colonia obtenida se le realizo La tinción Gram observando la presencia de bacilos Gram negativos tal como se muestra en La foto 3 y 4

**Foto 3****Foto 4**

La Foto 3 muestra la presencia de bacilos Gram negativos de una colonia que creció en Agar Nutritivo y la Foto 4 muestra la presencia de bacilos Gram negativos de una colonia que creció en Agar Mac Conkey

#### 4.2. PRUEBAS DE BIODEGRADACIÓN DE CIANURO DE SODIO

Los bioensayos en los que se valoró la biodegradación de cianuro por parte de bacterias del Genero *Pseudomona* fueron diseñados teniendo en cuenta que el complejo de cianuro a un pH arriba de 9 es estable y que al bajar el pH comienza a reaccionar con el Hidrógeno del ambiente y pasa a formar gas cianhídrico, y es entonces que se pierde el cianuro que existe en el medio, por lo cual se debe hacer los controles para evaluar el pH y la concentración de cianuro en el medio con el fin de evidenciar una posible pérdida de cianuro debido a una disminución del pH en el medio.

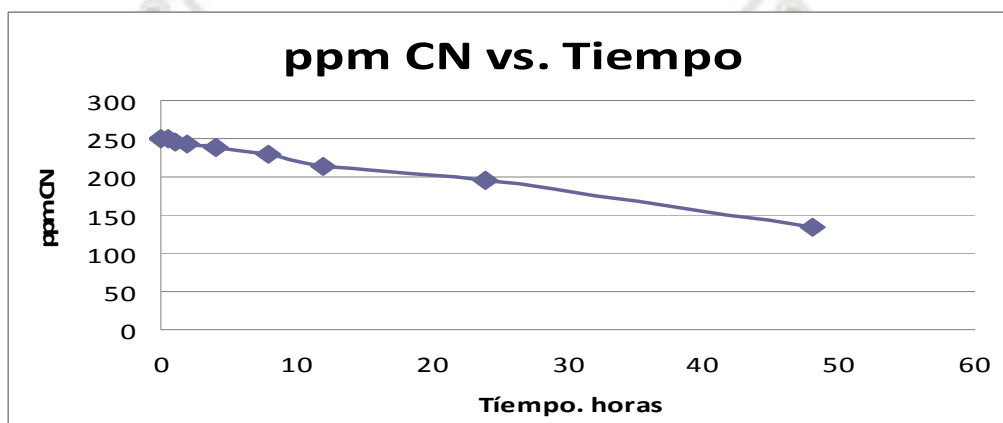
En el proceso de experimentación se observó que en las primeras horas no se observa una disminución significativa de cianuro el cual disminuye a través del tiempo logrando una mayor biodegradación de los complejos de cianuro a las 24 y 48 horas. Las tablas 8, 9 10 y 11 y las figuras 8, 9 10 y 11 se elaboraron con el fin de mostrar el promedio de la concentración de cianuro (de tres replicas) para cada una de las pruebas realizadas.

a) **Primera prueba (250ppm de NaCN inicial y 25rpm de agitación)**

**Tabla 9:** Resultados de la concentración de cianuro en ppm durante las 48 horas para la primera prueba experimental.

MUESTRA	1	2	3	4	5	6	7	8	9
TIEMPO (Horas)	0	0,5	1	2	4	8	12	24	48
CIANURO PROMEDIO (ppm)	250	249,9	244,9	242,67	239,27	228,8	214,5	196,03	134,28

**Figura 9:** Grafica de la concentración de Cianuro ppm vs Tiempo obtenido con los datos de la primera prueba experimental.



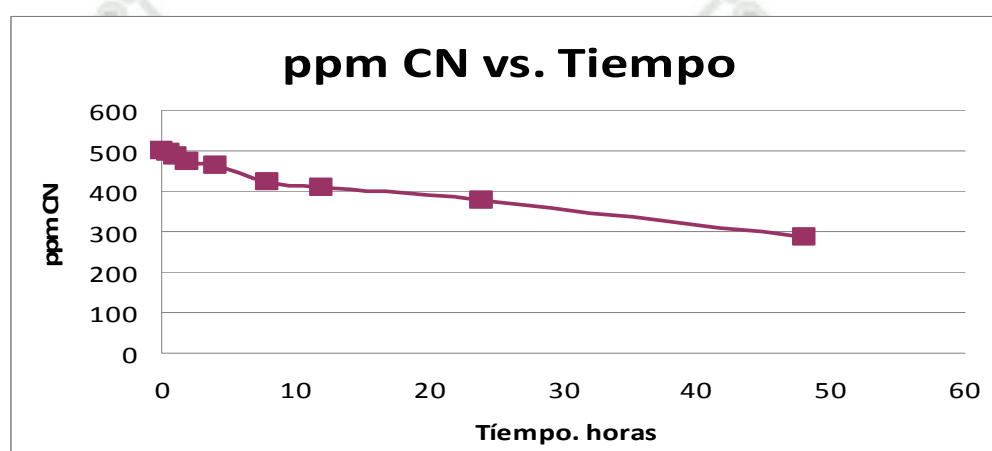
Los resultados que se presentan en la Tabla 9 y Figura 9 corresponden a los niveles de biodegradación para la primera prueba que se realizó con 250 ppm de Cianuro y a 25 rpm de agitación, durante el desarrollo de la prueba, inicialmente se registró un promedio de 250 ppm de Cianuro el cual fue disminuyendo hasta llegar a 134.28 ppm de Cianuro a las 48 horas, esto debido a la acción biodegradadora de los microorganismos evidenciando así la biodegradación del cianuro. . Las pérdidas de cianuro debido a la volatilización son bajas gracias a que el medio de cultivo usado se ajustó inicialmente a pH 10.5 con buffer carbonato y durante el tiempo de experimentación se evaluó constantemente el pH evidenciando que este se encuentra por encima de 10.5.

**b) Segunda prueba (500ppm de NaCN inicial y 25rpm de agitación)**

**Tabla 10:** Resultados la concentración de cianuro en ppm durante las 48 horas para la segunda prueba experimental.

MUESTRA	1	2	3	4	5	6	7	8	9
TIEMPO (Horas)	0	0,5	1	2	4	8	12	24	48
CIANURO PROMEDIO (ppm)	500	495,57	488,4	474,50	464,47	423,92	409,27	379,32	287,67

**Figura 10:** Grafica de la concentración de Cianuro ppm vs Tiempo obtenido con los datos de la segunda prueba experimental.



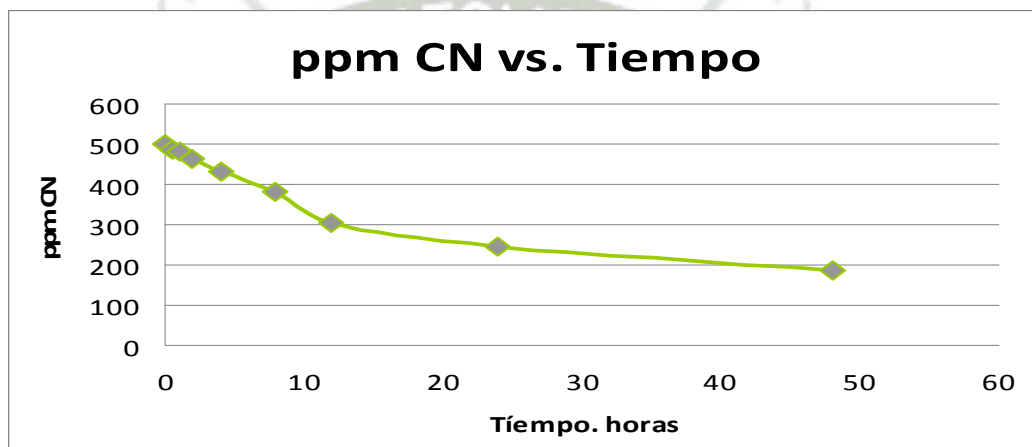
Los resultados que se presentan en la Tabla 10 y Figura 10 corresponden a los niveles de biodegradación para la segunda prueba que se realizó con 500 ppm de Cianuro y a 25 rpm de agitación, durante el desarrollo de la prueba, inicialmente se registró un promedio de 500 ppm de Cianuro el cual fue disminuyendo hasta llegar a 287.67 ppm de Cianuro a las 48 horas, esto debido a la acción biodegradadora de los microorganismos evidenciando así la biodegradación del cianuro. Las pérdidas de cianuro debido a la volatilización son bajas gracias a que el medio de cultivo usado se ajustó inicialmente a pH 10.5 con buffer carbonato y durante el tiempo de experimentación se evaluó constantemente el pH evidenciando que este se encuentra por encima de 10.5.

c) Tercera prueba (500ppm de NaCN inicial y 120rpm de agitación)

**Tabla 11:** Resultados la concentración de cianuro en ppm durante las 48 horas para la tercera prueba experimental.

MUESTRA	1	2	3	4	5	6	7	8	9
TIEMPO (Horas)	0	0,5	1	2	4	8	12	24	48
CIANURO PROMEDIO (ppm)	500	488,40	479,8	463,27	432,40	382,90	305,13	247,00	185,74

**Figura 11:** Grafica de la concentración de Cianuro ppm vs Tiempo obtenido con los datos de la tercera prueba experimental.



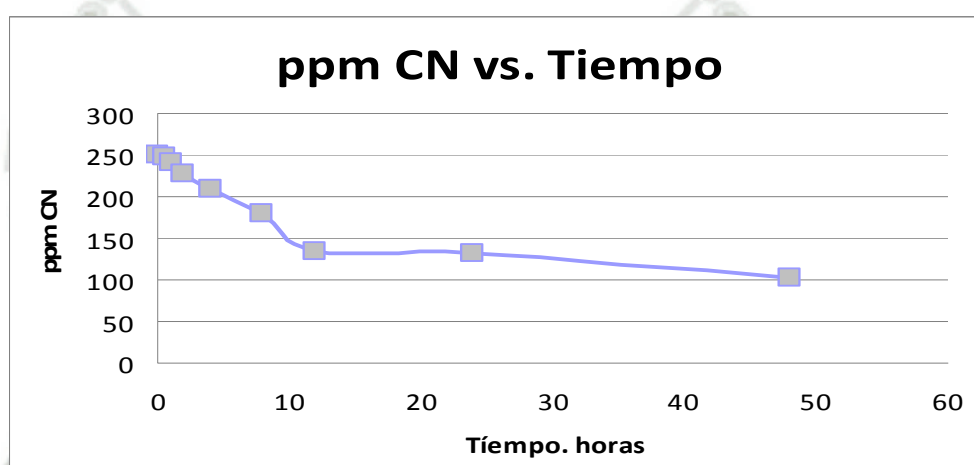
Los resultados que se presentan en la Tabla 11 y Figura 11 corresponden a los niveles de biodegradación para la tercera prueba que se realizó con 500 ppm de Cianuro y a 120 rpm de agitación, durante el desarrollo de la prueba, inicialmente se registró un promedio de 500 ppm de Cianuro el cual fue disminuyendo hasta llegar a 185.74 ppm de Cianuro a las 48 horas, esto debido a la acción biodegradadora de los microorganismos evidenciando así la biodegradación del cianuro. Las pérdidas de cianuro debido a la volatilización son bajas gracias a que el medio de cultivo usado se ajustó inicialmente a pH 10.5 con buffer carbonato y durante el tiempo de experimentación se evaluó constantemente el pH evidenciando que este se encuentra por encima de 10.5.

**d) Cuarta prueba (250ppm de NaCN inicial y120rpm de agitación)**

**Tabla 12:** Resultados la concentración de cianuro en ppm durante las 48 horas para la cuarta prueba experimental.

MUESTRA	1	2	3	4	5	6	7	8	9
TIEMPO (Horas)	0	0,5	1	2	4	8	12	24	48
CIANURO PROMEDIO (ppm)	250	247,07	239,9	227,43	209,23	180,17	134,60	132,32	102,23

**Figura 12:** Grafica de la concentración de Cianuro ppm vs Tiempo obtenido con los datos de la cuarta prueba experimental.



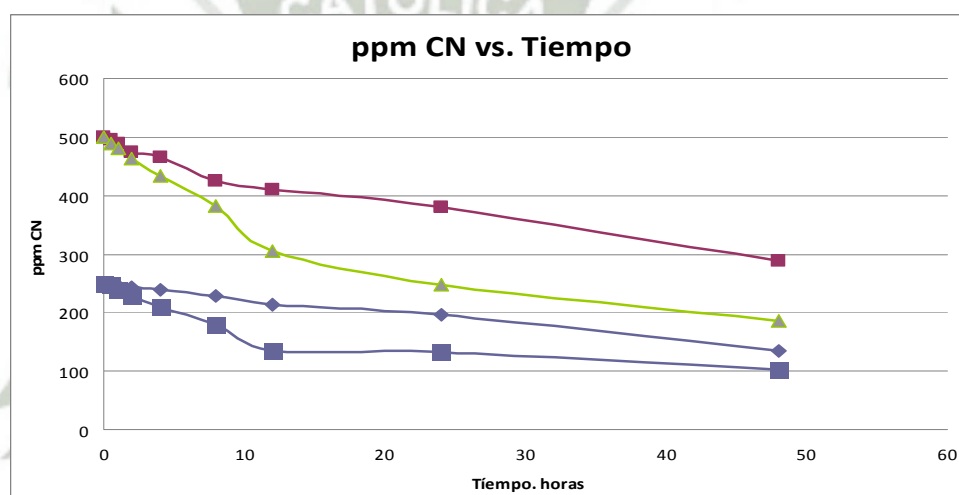
Los resultados que se presentan en la Tabla 12 y Figura 12 corresponden a los niveles de biodegradación para la cuarta prueba que se realizó 250 ppm de Cianuro y a 120 rpm de agitación, durante el desarrollo de la prueba, inicialmente se registró un promedio de 250 ppm de Cianuro el cual fue disminuyendo hasta llegar a 102.23 ppm de Cianuro las 48 horas, esto debido a la acción biodegradadora de los microorganismos evidenciando así la biodegradación del cianuro. Las pérdidas de cianuro debido a la volatilización son bajas gracias a que el medio de cultivo usado se ajustó inicialmente a pH 10.5 con buffer carbonato y durante el tiempo de experimentación se evaluó constantemente el pH evidenciando que este se encuentra por encima de 10.5.

e) **Combinación de Graficas**

**Tabla 13:** Cantidad de Cianuro (ppm) a las 24 y 48 horas después de para cada una de las pruebas experimentales

N de prueba	CN ppm	Agita-ción rpm	PPM DE CIANURO			PPM DE CIANURO		
			24 horas			48 horas		
			Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
Prueba N° 1	250	Baja 25 rpm	220,53	205,83	161,72	132,32	132,32	138,20
Prueba N° 2	500	Baja 25 rpm	396,96	357,26	383,73	304,34	270,52	288,16
Prueba N° 3	500	Alta 120 rpm	235,24	263,17	242,59	176,43	207,30	173,49
Prueba N° 4	250	Alta 120 rpm	123,50	129,38	144,08	101,15	99,68	105,86

**Figura 13:** Grafica de la concentración de Cianuro ppm vs Tiempo obtenido con los datos de las cuatro pruebas experimental.



Los resultados que se presentan en la Figura 13 corresponden a los niveles de biodegradación obtenido en las cuatro pruebas experimentales. En esta graficase corrobora las pérdidas de cianuro respecto del tiempo; el resultado más relevante se observa en la cuarta prueba donde la concentración inicial de cianuro fue de 250 ppm y después de 48 horas se la concentración de cianuro disminuye a 102,23 ppm.

La tabla 13 muestra los valores de las tres replicas obtenido a las 24 y 48 horas después de haber iniciado las pruebas experimentales, esta tabla con los resultados nos sirve para el tratamiento estadístico de los datos.

### 4.3.- TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

El modelo estadístico aplicado correspondió a un Análisis de Varianza factorial de Efectos Fijos, con el cual se probaron los efectos y las interacciones entre los factores evaluados (Concentración de cianuro y grado de agitación) con relación a la variable respuesta (ppm de NaCN biodegradados).

Para el tratamiento estadístico se comenzó calculando los promedios de los resultados de las pruebas a las 24 horas, para obtener al final el gran promedio, tal como se muestra en la tabla 14.

**Tabla 14.** Matriz de valores codificados y promedio de los tres ensayos realizados para cada prueba a las 24 horas.

Prueba	X <sub>1</sub> (conc.)	X <sub>2</sub> (agitación)	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	Promedio
1	-1	-1	+1	196,03
2	-1	+1	-1	379,32
3	+1	-1	-1	247,00
4	+1	+1	+1	132,32
			$\bar{Y}$	<b>238,67</b>

El *gran promedio*  $\bar{Y}$  indica alrededor de qué valor están distribuidas las respuestas. Si ningún factor tuviera efecto. Esta distribución (variación respecto de la gran media) sería debido a la incertidumbre experimental

#### 4.3.1.-EFECTOS PRINCIPALES.

El efecto de cada variable es representa por ( $\Delta$ ), donde:

$$\Delta = (\text{promedio respuesta con nivel (+)}) - (\text{promedio respuestas con nivel (-)})$$

Con la formula anterior se construye la tabla resumen 15:

**Tabla 15. Promedios y Concentración según niveles**

Promedios	X1 (Concentración de	X2 (Agitación)	X1X2
Nivel inferior (-	$(196,03 + 379,32)/2 =$	$(196,03 + 247)/2=221,515$	164,175
Nivel superior	$(247 + 132,32)/2=$	$(379,32+132,32)/2=255,52$	313,16
Efecto ( $\Delta$ )	-98,015	34,305	148,985

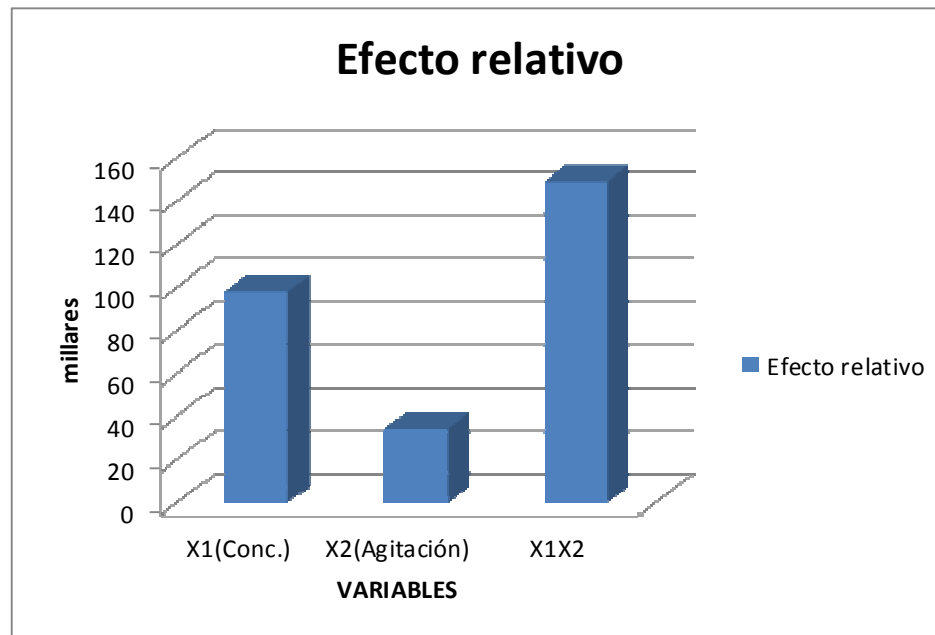
Los efectos totales por cada variable se resumen en la tabla 16:

**Tabla 16. Resumen del efecto de cada variable**

Valores	X1(Conc.)	X2(Agitación)	X1X2
(-)	287,675	221,515	164,175
(+)	189,66	255,52	313,16
$\Delta$	-98,015	34,305	148,985
Efecto medio	-49,0075	17,1525	74,4925
Efecto relativo	98,015	34,305	148,985

Con los datos de las tablas de resumen 15b y 16 se construye el diagrama de barras para efectos relativos que se muestra en la figura 14.

**Figura 14: Histograma de efectos relativos,**



*Fuente: Elaboración Propia*

De los resultados de  $\Delta$  para cada variable en la Tabla 16 se observa que; la variable concentración de cianuro tiene un efecto negativo (-98,015) sobre la biodegradación del mismo, es decir que al aumentar la concentración de Cianuro el % de degradación disminuye notablemente. La variable agitación tiene una incidencia directa (+34,305), es decir que con un aumento de la agitación se logra un aumento de la degradación de Cianuro. Comparativamente la concentración de cianuro resulta ser  $99,015/34,305 = 2,85$  veces más importante que la agitación. Asimismo, para la interacción se observa un valor de  $\Delta = 148,985$ , esto indica que hay un efecto directo importante debido a la interacción.

#### 4.3.2.- DEDUCCIÓN DEL MODELO CODIFICADO ESTIMADO

Según la expresión:

$$(\hat{y}^f(t)) = (\bar{Y}^f) + ((\Delta x_1)/2) x_1 + ((\Delta x_2)/2) x_2 + ((\Delta x_3)/2) x_3 \dots$$

Donde:

$\hat{y}$  = Variable estimada

$\bar{Y}$   
= Gran promedio

$DX/2$  = efecto medio para cada factor = coeficiente.

Con los cálculos hechos el anterior acápite se puede ver que la ecuación de predicción estimada, podría ser:

$$\hat{y} = 238,67 - 98,015/2 X_1 + 34,305/2 X_2 + 148,985/2 X_1X_2$$

$$\hat{y} = 238,67 - 49,0075 X_1 + 17,1525 X_2 + 74,4925 X_1X_2$$

#### 4.3.3.- ANÁLISIS DE VARIANZA.

La evaluación comparativa de los efectos  $\Delta$  para cada variable, calculados de datos muestrales, podría indicar que hay efectos significativos así como para la interacción  $X_1X_2$ . Sin embargo, estas variaciones en la respuesta bien podrían ser causadas por error en las pruebas, es decir podrían ser efecto de la variabilidad en los ensayos más que un efecto real de las variables, por lo que es necesario evaluar comparativamente si la variación de los tratamientos es o no mayor que la variación debida al error, lo cual requiere pruebas de hipótesis.

Las hipótesis de análisis son:

Para la concentración (X<sub>1</sub>)

H<sub>0</sub>:  $\beta_{X1} = 0$  (el efecto no es significativo)

H<sub>0</sub>:  $\beta_{X1} \neq 0$

Para la agitación (X<sub>2</sub>)

H<sub>0</sub>:  $\beta_{X2} = 0$  (el efecto no es significativo)

H<sub>0</sub>:  $\beta_{X2} \neq 0$

Para la interacción (X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>):

H<sub>0</sub>:  $\beta_{X1X2} = 0$  (el efecto no es significativo)

H<sub>0</sub>:  $\beta_{X1X2} \neq 0$

Para probar las hipótesis se debe construir la tabla ANOVA, por lo que previamente se calcula los valores de los cuadrados de las sumatorias, con la ayuda de la siguiente tabla:

**Tabla 17: Respuestas, Concentración y Agitación ppm**

Nº	X1 (Concen- tración)	X2 (Agitación)	X1X2	RESPUESTA (ppm Cianuro)			$\bar{X}$	$\Sigma Y$	$\Sigma(Y^2)$
1	-1	-1	1	220,53	205,83	161,72	1 96,027	588,08	17152,828
2	-1	1	-1	396,96	357,26	383,73	3 79,317	1137,95	32460,662
3	1	-1	-1	235,24	263,17	242,59	2 47,000	741	83446,215
4	1	1	1	123,5	129,38	144,08	1 32,320	396,96	52750,4808
								2863,99	785810,186
								$\Sigma\Sigma Y$	$\Sigma\Sigma(Y^2)$

#### 4.3.4.- CÁLCULO DEL CUADRADO DE LAS SUMATORIAS

**TOTALES:**

$$SST_o = \frac{\Sigma(\Sigma Y^2) - [\Sigma(\Sigma Y)]^2}{N * r}$$

$$SST_o = \frac{785810,186 - (2863,99)^2}{4 * 5}$$

$$SST_o = 102273,6257$$

#### 4.3.5.- CÁLCULO DEL CUADRADO DE LAS SUMATORIAS DE LOS EFECTOS:

$$SS_{efecto}(x_1) = \frac{[\Sigma_{altos x_1} - \Sigma_{bajos x_1}]^2}{N * r}$$

Aplicando la fórmula para cada tratamiento se tiene:

SSto	102273,6257
SSX <sub>1</sub>	3202,096
SSX <sub>2</sub>	392,277675
SSX <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	7398,843408

Luego la sumatoria de los efectos será:

$$SS \text{ efectos} = SSX_1 + SSX_2 + SSX_1X_2$$

$$SS \text{ efectos} = 3202,096 + 392,277675 + 7398,843408$$

$$SS \text{ efectos} = 10993,217$$

#### 4.3.6.- CALCULO DE LA SUMATORIA DEL CUADRADO DE LOS

##### ERRORES:

$$SSE = SST_0 - SS \text{ efectos.}$$

$$SS_E = 102273,6257 - 10993,217$$

$$SS_E = 91280,409$$

Con estos resultados se construye la tabla de ANOVA, que se muestra en la tabla 18.

**Tabla 18: Elaboración de la Tabla ANOVA.**

Fuente de Variación	SS	g.l	MS	Fc	F(0.05,1.8)	P	Ho
<b>A</b>	3.202,10	1	3.202,10	8,16283	5,318		<b>Rechazo</b>
<b>B</b>	392,28	1	392,28	0,05302	5,318		<b>Acepto</b>
<b>AB</b>	7.398,84	1	7.398,84	0,64845	5,318		<b>Acepto</b>
<b>Error</b>	91.280,41	8	11.410,05				
<b>Total</b>	102.273,63	11					

Donde:

a = Niveles del factor A,

b = Niveles del factor B,

N = Número de ensayos.

Se observa que  $X_1$  es el único factor significativo, por tanto el modelo matemático codificado de predicción al 95% de confianza fue:

$$Y_{\text{(estimado)}} = 238,67 - 49,0075X_1$$

#### 4.3.7.- DECODIFICACIÓN DEL MODELO

##### CÁLCULO DEL CENTRO DEL DISEÑO:

$$Z^0X_1 = \frac{250+50}{2} = 375$$

##### CÁLCULO DEL RADIO DEL DISEÑO.

$$\Delta Z^0X_1 = \frac{500-250}{2} = 125$$

##### CÁLCULO DEL FACTOR E.

$$EX_1 = Z^0X_1 / \Delta Z^0X_1 = 375/125 = 3$$

##### CÁLCULO DE $a_0$

$$a_0 = y - \left(\frac{\Delta X_1}{2}\right)EX_1 + \left(\frac{\Delta X_2}{2}\right)EX_2$$

$$a_0 = 238,67 + (49,0075)3 \quad a_0 = 385,69$$

##### CÁLCULO DE $a_1$

$$a_1 = \frac{\left(\frac{\Delta X_1}{2}\right)}{\Delta Z X_1}$$

$$a_1 = -49,0075/3 = -16,33$$

Luego el modelo decodificado con un 95% de confianza fue:

$$Y = 385,69 - 16,33 Z_1$$

Donde:

$Z_1$ : Concentración de Cianuro en ppm

Mediante los cálculos expresados podemos afirmar que a menor concentración de cianuro fue mejor la adaptación y crecimiento de *Pseudomona*, y en lo que corresponde a la agitación para el nivel trabajado no es influyente en el crecimiento, deduciendo que se debe trabajar a unos mayores valores de agitación para pasar a ser una variable influyente.

#### 4.4.- CURVA DE CRECIMIENTO

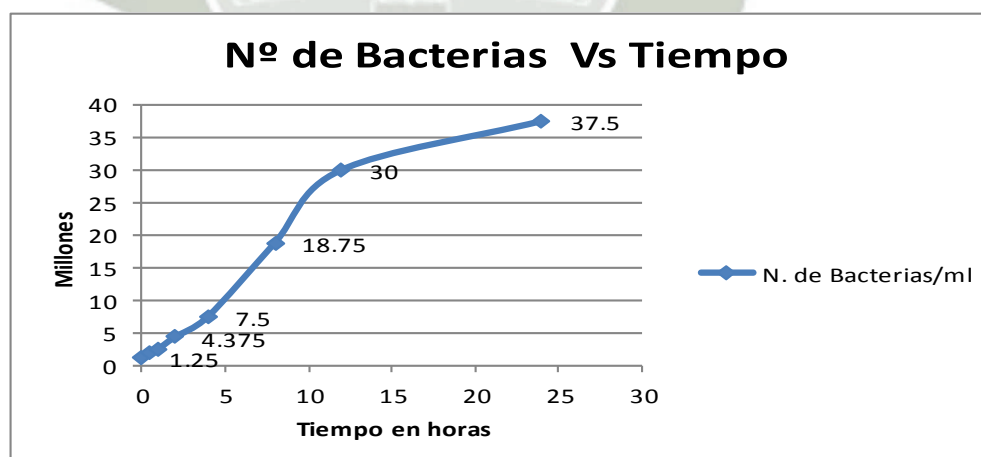
El conteo se realizó mediante la cámara de Neubauer: En la tabla 19, 20 , 21 y 22 y figura 15, 16, 17 y 18; se muestra el crecimiento de las bacterias durante las 24 horas para las cuatro pruebas experimentales.

##### a) Primera prueba (250ppm de NaCN inicial y 25rpm de agitación)

**Tabla 19:** Resultados del conteo de bacterias /mL durante las 24 horas en la primera prueba experimental.

Muestra	Tiempo (horas)	Conteo en la cámara de NB	Resultado Bacterias/ml
1	0	1	1250000
2	0.5	1,5	1875000
3	1	2	2500000
4	2	3,5	4375000
5	4	6	7500000
6	8	15	18750000
7	12	24	30000000
8	24	30	37500000

**Figura 15:** Curva de crecimiento de las bacteria durante las 24 horas en la primera prueba experimental.



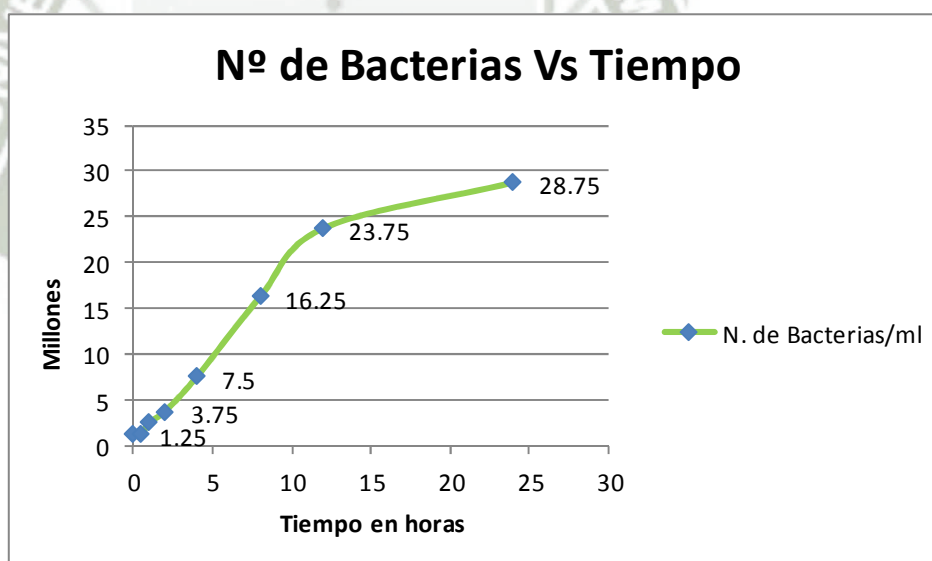
En la tabla 19 y figura 15 se muestra que la prueba inicio con. 1250000 Bacterias/ mL. y luego de 24 horas la cantidad de bacterias alcanzó los 37500000 Bacterias / ml.

**b) Segunda prueba (500ppm de NaCN inicial y 25rpm de agitación)**

**Tabla 20:** Resultados del conteo de bacterias /mL durante las 24 horas en la segunda prueba experimental.

Muestra	Tiempo (horas)	Conteo en la cámara de NB	Resultado Bacterias/ml
1	0	1	1250000
2	0.5	1	1250000
3	1	2	2500000
4	2	3	3750000
5	4	6	7500000
6	8	13	16250000
7	12	19	23750000
8	24	23	28750000

**Figura 16:** Curva de crecimiento de las bacteria durante las 24 horas en la primera prueba experimental.



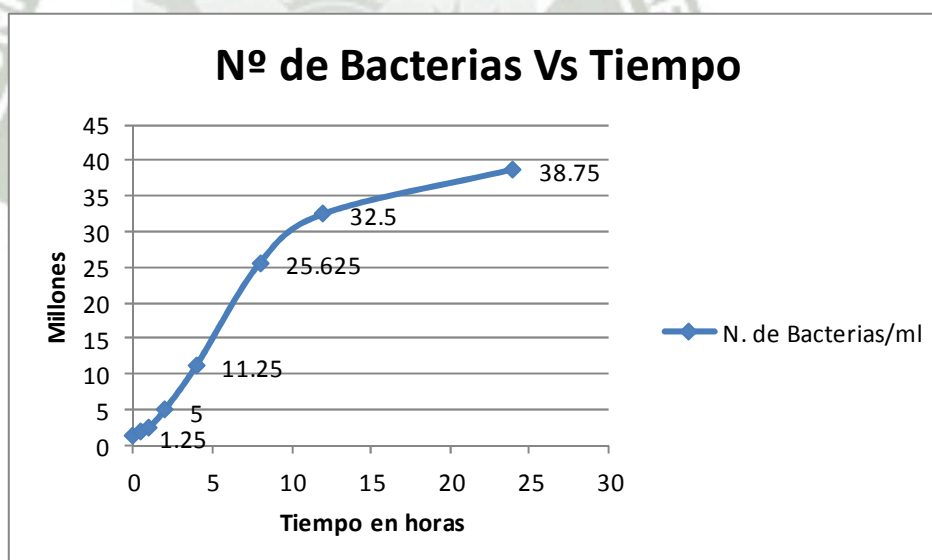
En la tabla 20 y figura 16 se muestra que la prueba inicio con. 1250000 Bacterias/ mL. y luego de 24 horas la cantidad de bacterias alcanzó los 28750000 Bacterias / ml.

c) Tercera prueba (500ppm de NaCN inicial y 120rpm de agitación)

**Tabla 21:** Resultados del conteo de bacterias /mL durante las 24 horas en la tercera prueba experimental.

Muestra	Tiempo (horas)	Conteo en la cámara de NB	Resultado Bacterias/ml
1	0	1	1250000
2	0.5	1,5	1875000
3	1	2	2500000
4	2	3,5	5000000
5	4	6	11250000
6	8	15	25625000
7	12	24	32500000
8	24	30	38750000

**Figura 17:** Curva de crecimiento de las bacteria durante las 24 horas en la tercera prueba experimental



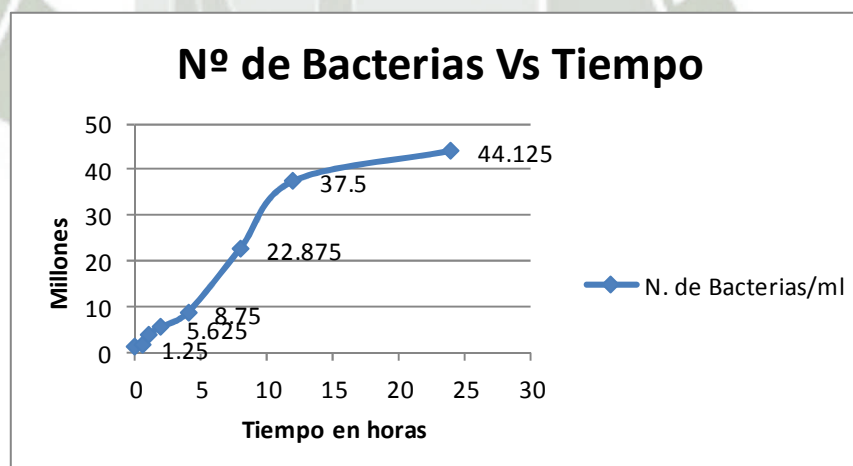
En la tabla 21 y figura 17 se muestra que la prueba inicio con 1250000 Bacterias/ mL. y luego de 24 horas la cantidad de bacterias alcanzó los 38750000 Bacterias/ml.

d) Cuarta prueba (250ppm de NaCN inicial y 120rpm de agitación)

**Tabla 22:** Resultados del conteo de bacterias /mL durante las 24 horas en la tercera prueba experimental.

Muestra	Tiempo (horas)	Conteo en la cámara de NB	Resultado Bacterias/ml
1	0	1	1250000
2	0.5	1,5	1875000
3	1	3,2	4000000
4	2	4,5	5625000
5	4	7	8750000
6	8	18,3	22875000
7	12	30	37500000
8	24	35,3	44125000

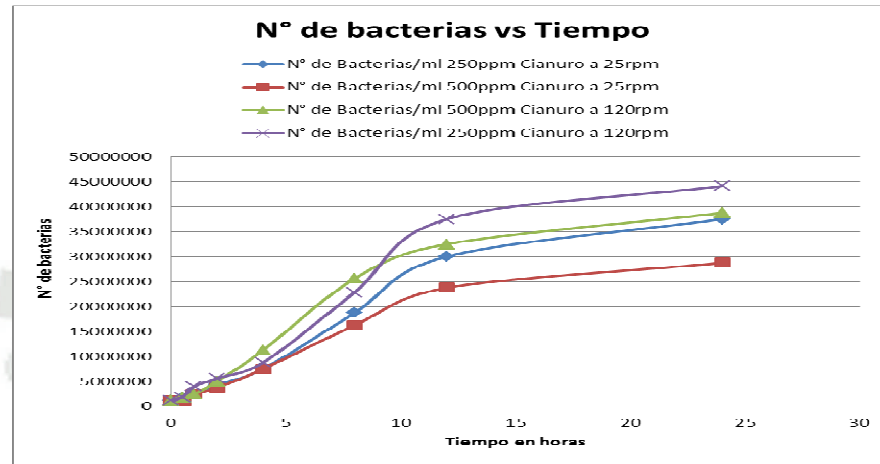
**Figura 18:** Curva de crecimiento de las bacteria durante las 24 horas en la tercera prueba experimental



En la tabla 21 y figura 17 se muestra que la prueba inicio con. 1250000 Bacterias/ mL. y luego de 24 horas la cantidad de bacterias alcanzó los 44125000 Bacterias/ml.

**E) Combinación de Graficas**

**Figura 19:** Grafica de la concentración de Cianuro ppm vs Tiempo obtenido con los datos de las cuatro pruebas experimental.



Como podemos observar en la figura 19 se muestra en resumen el crecimiento de las bacterias durante las 24 horas para las cuatro pruebas experimentales.

**4.5.- DISCUSIÓN**

El cianuro es ampliamente conocido y difundido por su toxicidad por lo cual se han planteado muchos procesos para biodegradarlo usando plantas y microorganismos, debido a que estos utilizan el cianuro como fuente de nitrógeno en su metabolismo celular.

El cianuro pese a su toxicidad, según (Ebbs, 2004; Dubey y Holmes, 1995; Raibuck 1992; Knowles, 1976), es un compuesto natural frecuentemente utilizado como fuente de Nitrógeno por muchos microorganismos, por el origen prebiótico de esta molécula que permitió su coexistencia con los

seres vivos desde el origen de la vida, posibilitando el desarrollo de mecanismos de resistencia y rutas asimiladoras

El cianuro también es un compuesto de una gran importancia social, ya que su uso en variedad de procesos industriales lo ha hecho un compuesto crucial en la sociedad actual, pero la frecuente utilización de cianuro provoca graves problemas de contaminación más aun en la actividad industrial minera que es la genera residuos altamente contaminados con cianuro y para este problema ambiental se han estudiado varios tratamientos fisicoquímicos de eliminación de cianuro pero ninguno de ellos está libre de graves inconvenientes.

Aprovechando la capacidad de asimilación de cianuro por parte de algunos microorganismos, la biodegradación de cianuro se presenta como una atractiva alternativa a los métodos tradicionales empleados frecuentemente; por lo que el presente estudio empieza con el aislamiento y caracterización de una bacteria del genero *Pseudomona* capaz de degradar cianuro en condiciones alcalinas, estudiándose entre otros aspectos la tolerancia del microorganismo al cianuro y su proceso de biodegradación.

Como referencia se ha encontrado trabajos sobre degradación biológica de cianuro que se realizaron a pH neutro usando glucosa como fuente carbonada, lo que puede limitar el rendimiento del proceso debido a la relación Acido cianhídrico - Cianuro que depende principalmente del pH. ya que a pH neutro o ácido el cianuro se volatiliza como ácido cianhídrico

(HCN), lo cual provoca contaminación hídrica, atmosférica y restringiendo la biodegradación.

Respecto al empleo de glucosa, según la reacción de Killiani todo azúcar reductor puede producir amonio en presencia de cianuro, entonces, en presencia de glucosa la degradación de cianuro es independiente de la presencia de la bacteria en estudio, es decir, químicamente la eliminación biológica de cianuro requiere pH alcalino y una fuente de carbono que no sea capaz de reaccionar químicamente con el cianuro, por lo que fue indispensable como requisito inicial el aislamiento de una cepa bacteriana alcalófila capaz de degradar cianuro con una fuente de carbono adicional para el cual se utilizó el medio Agar nutritivo a pH 9,5 en el cual se sembró por agotamiento un inóculo de cada una de las muestras tomadas en diferentes zonas (A, B y C) del relave minero con la finalidad de aislar una cepa del género *Pseudomona* capaz de degradar complejos de Cianuro. La modificación del pH hasta valores de 10.5 en el medio de cultivo fue una ventaja y uno de los factores más importantes durante el tratamiento por biodegradación, ya que la literatura menciona que valores alcalinos de pH mejoran la degradación del cianuro (Logsdon, M. J; Kagelstein, K. & Mudder, T. I. 2001). En base a lo mencionado anteriormente, el tratamiento de biodegradación del cianuro, se trabajó manteniendo el pH a valores de entre 9,16 a 10,4; siendo este un punto de vital importancia para que el cianuro permanezca disuelto y no pase al medio ambiente como HCN gaseoso.

Durante el proceso de experimentación se extrajo el cianuro sólido mediante la agitación usando como disolvente el agua haciendo que el cianuro entre en contacto con el agua y al ser agitado se difunda a la fase líquida, con lo que se logra que el cianuro sólido pase a la fase líquida, este proceso preliminar en el tratamiento por biodegradación del cianuro también se conoce como *lixiviación* del cianuro.

Según (Horikoshi, 1999). En varias especies alcalófilas se ha descrito que el pH intracelular es aproximadamente 8 (Horikoshi, 1999). Aunque existen técnicas específicas de determinación del pH intracelular, este valor puede ser estimado a partir del pH óptimo de las enzimas intracelulares (Horikoshi, 1999). Algunas bacterias del género *Pseudomonas* emplean el cianuro como única fuente de nitrógeno, pero no como única fuente de carbono. Este dato, recogido en la bibliografía (Adjei y Ohta, 1999; Harris y Knowles, 1983), menciona que el número de oxidación del C y del N en la molécula de cianuro es C(+II) y N(-III), el equivalente al CO y al NH<sub>3</sub>, respectivamente. Entonces el Cianuro puede ser una buena fuente de nitrógeno, pero pobre de carbono para un organismo aeróbico. De hecho, tan sólo se ha descrito la utilización de cianuro como fuente de carbono y nitrógeno en condiciones anaeróbicas por bacterias fijadoras de Nitrógeno y Metanotrofas que hacen uso de la enzima Nitrogenasa utiliza el Cianuro como un aceptor de electrones alternativo al N<sub>2</sub>, produciendo Amonio y Metano (Liu *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1982). La relación carbono/nitrógeno (C/N) igual a 1 de la molécula de Cianuro es otro factor que puede impedir la utilización de este compuesto como fuente de carbono mientras que en

otros microorganismos la razón C/N de los compuestos intracelulares es 10. En este caso la cantidad de Cianuro necesaria para tener una concentración de Carbono que permitiese el crecimiento sería tan elevada que resultaría tóxica.

Se ha encontrado, durante la fase de observación al microscopio electrónico de los cultivos con NaCN la existencia de unos cuerpos electrodensos con la apariencia típica de gránulos de reserva del tipo de los poli- $\beta$ -hidroxialcanoatos. La acumulación de este tipo de material en las células es producida por una limitación de nitrógeno u otro nutriente esencial (Reddy *et al.*, 2003), este resultado parece indicar que la elevada toxicidad del cianuro causa condiciones de hambre de nitrógeno y, por tanto, produciría la acumulación de poli- $\beta$ -hidroxialcanoatos.

El aislado del genero *Pseudomona* fue capaz de degradar NaCN a pH alcalino (pH 9,5) y con Pluripeptona como fuente de carbono, bajo estas condiciones la pérdida abiótica de cianuro por volatilización o por reacción con otros compuestos del medio ha sido nula (Luque *et al.*, 2004).

De muchos organismos cianotróficos, solo el hongo *Fusarium solani* y la bacteria *Burkholderia cepacia* han podido de degradar cianuro en condiciones alcalinas (Adjei y Ohta, 1999; Dumestre *et al.*, 1997). Pero, en el caso de *B. cepacia*, requiere la presencia de glucosa como fuente de carbono, un azúcar reductor susceptible de producir amonio en presencia de cianuro en condiciones alcalinas (reacción de Killiani, Andrade *et al.*, 1995; Militzer 1949). La ausencia de un control no inoculado con glucosa y

cianuro en el trabajo donde se describe la degradación de cianuro por esta bacteria sugiere que gran parte del proceso se debe a un fenómeno abiótico (Adjei y Ohta, 1999 y 2000).

El género *Pseudomonas* también es capaz de utilizar como fuente de nitrógeno el Cianuro libre presente en complejos cianurometálicos, como los formados por el hierro y el cobre (Luque *et al.* 2004). El complejo  $K_2Cu(CN)_4$ . Estos resultados pueden explicarse por la estabilidad de los complejos cianurados, el complejo formado por el hierro es mucho más estable que el formado por el cobre. La estabilidad de estos complejos depende del pH, siendo en general más estables a pH alcalino. Probablemente el pH óptimo de degradación de los complejos Cianuro-metálicos compromete la estabilidad del complejo y el pH óptimo de crecimiento de la bacteria.

La aparición de hidróxido férrico en cultivos que contienen residuo, así como el mayor crecimiento alcanzado por la bacteria con esta fuente de nitrógeno que con cantidades equivalentes de amonio o NaCN demostraron que *Pseudomonas* también es capaz de degradar los complejos presentes en el residuo, principalmente los formados por el hierro.

La capacidad *Pseudomonas* de utilizar estos complejos de cianuro como fuente de nitrógeno y hierro puede ser debida a la producción de sideróforos, compuestos de pequeña masa molecular (<1000 Da) que poseen una gran afinidad por estos y otros metales (Faraldo-Gómez y Sansom,

2003; Andrews *et al.*, 2003; Neilands, 1995; Visca *et al.*, 1992; Neilands, 1981).

Se ha confirmado que a pesar de los numerosos trabajos acerca de la degradación biológica de cianuro, nunca se ha tenido en cuenta este importante requerimiento, la producción de sideróforos. La producción de estos compuestos es un hecho muy frecuente entre miembros del género *Pseudomonas*, donde se ha llegado incluso a utilizar su diversidad como una herramienta de identificación (Bultreys *et al.*, 2003; Meyer *et al.*, 2002; Bultreys *et al.*, 2001; Meyer 2000).

La relación entre el metabolismo del cianuro y otras fuentes de nitrógeno ha sido poco estudiada hasta ahora, pese a la importancia que este aspecto supone tanto a la regulación como de la aplicación del proceso. El amonio es la fuente de nitrógeno de la mayoría de bacterias. Esto es debido tanto a su inmediata incorporación en aminoácidos a través de la glutamina sintetasa, como al efecto inhibitorio que este compuesto ejerce sobre la asimilación de otras fuentes de nitrógeno. Este efecto se da como consecuencia de que el amonio constituye la convergencia de las diferentes rutas de asimilación de nitrógeno (Magasanik, 1996; Merrick y Edwards, 1995). La inhibición de la asimilación de cianuro por amonio se ha descrito ampliamente en la literatura (Silva-Avalos *et al.*, 1990; Harris y Knowles, 1983a y b). En *Pseudomonas* el amonio no inhibe la asimilación de cianuro, aunque, al igual que en *Klebsiella oxytoca* y *Alcaligenes xylosoxidans*, concentraciones elevadas (10 mM) reprimen ligeramente dicho proceso

(Kao *et al.*, 2003; Ingvorsen *et al.*, 1991). Se ha descrito que el efecto inhibitor del amonio sobre otras rutas de asimilación de compuestos nitrogenados se ejerce a través de la glutamina. En *Pseudomona*, a pesar de que la glutamina reprime la asimilación de cianuro, concentraciones de amonio inferiores a 10 mm no afectan al consumo de cianuro. Tal efecto puede deberse a que las células utilizadas para estudiar la influencia del amonio sobre la degradación de cianuro se encontraban en falta de nitrógeno, condiciones en las que el amonio sólo tiene un efecto regulador a elevadas concentraciones.

Resulta muy frecuente el fracaso de la aplicación de los microorganismos estudiados en laboratorio a la descontaminación de muestras reales, por la presencia de otros contaminantes que inhiben el proceso de degradación u ocasionan la muerte de la bacteria, lo cual responde a que haya muchos trabajos donde hay microorganismos capaces de degradar Cianuro y pocos que describan procesos de descontaminación biológica de efluentes cianurados. *Pseudomona* es capaz de degradar Cianuro de los residuos de la industria minera en medio mínimo pero no en medio rico, el residuo tiene un mayor efecto inductor que el NaCN sobre el metabolismo de la cepa, probablemente debido a la necesidad de mecanismos de resistencia a metales, que son muy abundantes en el residuo de los relaves como los de la planta minera “D-CRAIN”. Las bacterias del genero *Pseudomona* crecen en presencia de grandes volúmenes de residuo por lo que poseen un alto grado de resistencia tanto a cianuro como a otros metales; lo que supone una ventaja respecto a otras bacterias alcalófilas y cianotróficas,

extremadamente sensibles a la presencia de hierro y cobre (Adjei y Ohta, 2000). La marcada resistencia de *Pseudomona* respecto al residuo, mayor que la experimentada por otros microorganismos demuestra la idoneidad de éste para su aplicación en procesos de biorremediación.

La experimentación llevada a cabo en el laboratorio ha revelado que las cepas del género *Pseudomona* son capaces de degradar cianuro en condiciones alcalinas (pH 10) sólo en ausencia de un control de pH. Cuando el pH se mantiene de forma constante en un valor de 10, ésta se mantiene viable en estado de latencia durante al menos 7 días, lo que demuestra su elevado grado de resistencia a ambientes desfavorables.

La optimización del método se ha llevado a cabo analizando todas las variables que potencialmente pueden influir en el proceso, agrupadas en variables físicas, químicas e hidrodinámicas. La temperatura afecta tanto a la reacción de derivación como a la reacción enzimática, permitiendo el carácter termoestable de la enzima cianasa mantener el sistema a la temperatura óptima de la reacción de derivación (50 °C), temperatura a la cual la enzima inmovilizada también trabaja de forma óptima. En cuanto a las variables dinámicas mientras un flujo alto en el sistema disminuye drásticamente la señal, flujos pequeños proporcionan buenas respuestas como consecuencia de un mayor tiempo de contacto existente tanto como en la reacción de derivación. Sin embargo en estas condiciones la frecuencia de muestreo disminuye, por lo que finalmente se ha elegido un flujo intermedio (0,5 ml·min<sup>-1</sup>) como compromiso entre ambas variables.

## CAPITULO V

### CONCLUSIONES

1. En las muestras de las zonas A, B, C, se encontró pseudomonas por causa de emisión de relevés de la planta procesadora.
2. Además de las muestras de las zonas A, B, C, se efectuaron otras 2 pruebas experimentales en diferentes lugares de ejecución, comprobándose que la agitación no tiene efecto considerable, en las respectivas tablas de ANAVA.
3. A mayor concentración de cianuro la capacidad de degradación por las bacterias desciende.
4. A menor concentración de cianuro será mejor la adaptación y crecimiento de la pseudomona.
5. En los experimentos de 250 ppm de cianuro y 120 rpm de agitación se observó una mayor degradación de cianuro.

## CAPITULO VI

### SUGERENCIAS

1. Se recomienda realizar las pruebas directamente sobre el relave de los efluentes mineros, para observar el comportamiento de las bacterias frente a otros componentes diferentes al cianuro que se encuentran presentes en los efluentes o relaves.
2. Se recomienda construir un modelo de equipo a escala para experimentar el crecimiento de las bacterias de tal modo que la agitación sea una variable influyente y poder calcular el óptimo de éste valor para la investigación.
3. Elaborar un sistema de tratamiento que use a las bacterias nativas encontradas en los relaves de la planta D-CRAIN, frente a la cantidad de efluente diario que emiten, de esta manera diseñar y realizar los cálculos correspondientes de los equipos que requerirían consumo de energía de tal modo que se acople a su producción.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADJEI MD, OHTA Y (2000) Factors affecting the biodegradation of cyanide by Burkholderia cepacia strain C-3. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 89:274-277. Eurochem/CITACGuide,2000.
2. ANDRADE MC, FIGUEIRA MM, Utilization of ammonia, generated from abiotic Linardi VR (1995) cyanide degradation, by *Rhodotorula rubra*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 11:343-344.
3. ANDREWS SC, ROBINSON AK, Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiology* Rodríguez-Quñones F *Reviews* 27:215-237. (2003)
4. BACHILLER BLANCO D.; RENDUELES DE LA VEGA M., 2001. Reducción del impacto ambiental en el desarrollo de nuevos proyectos de minería de oro. Áreas Técnicas.  
<http://www.unizar.es/aeipro/finder/MEDIO%20AMBIENTE>.
5. BRODERIUS, S.J. and L.L. Smith, Jr. 1980. Direct Photolysis of hexacyanoferrate complexes. Proposed applications to the aquatic environment. U.S. Environmental Protection Agency. EPA-600/3-80-003. 50 pp. En: CCME (Canadian Council of Ministers of the Environment). December 1996. Canadian Water Quality Guidelines.

6. BULTREYS A, Gheysen I, High-performance liquid chromatography analyses Wathelet B, Maraite H, of pyoverdin siderophores differentiate among de Hoffman E (2003) phytopathogenic fluorescent *Pseudomonas* species. *Appl Environ Microbiol* 69:1143-1153.
7. DELOYA, A. Tratamiento de desechos del cianuro por biorremediación. Centro de investigación y Protección ambiental. Costa Rica. Vol 25.Nº 2 abril-Junio. 2012.
8. DESCHENES G., Goo H. “Cyanidation of gold courses notes. Mining and Mineral Sciences Laboratories ” CANMET, Ontario 2005.
9. DUBEY SK, HOLMES DS Biological cyanide destruction mediated by micro- (1995) organisms. *World J Microbiol Biotech* 11:257-265.
10. DUMESTRE A, CHONE T, Cyanide degradation under alkaline conditions Portal J-M, Gerard M, by a strain of *Fusarium solani* isolated from contaminated soils. Berthelin J (1997) *Appl Environ Microbiol* 63:2729-2734.
11. EBBS. S (2004) Biological degradation of cyanide compounds. *Current Opinion in Biotechnology* 15:231-236.
12. FARALDO-GÓMEZ JD, Acquisition of siderophores in gram-negative bacteria. Sansom MSP (2003) *Nature Reviews* 4:105-116.
13. GARCIA, VICTOR; 2004. “Para despejar dudas Uso de cianuro en la minería del oro”, Diario El Zonda – victorgarcia@diarioelzonda.com.ar

14. GONZÁLEZ, SILVIA.; 2004. “El Cianuro es Tóxico y Letal”. Por La Séptima Digital Tuesday July 27, 2004 at 01:09 AM. Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. Consultado en:  
<http://argentina.indymedia.org/news/2004/07/212476.php>.
15. GIPAB. Grupo de Investigación Procesos Ambientales y Biotecnológicos – Línea de Investigación: Procesos Avanzados de Oxidación y Fermentaciones.
16. GIL PAVAS, E y GIRALDO ESTRADA, C. método acoplado fisicoquímico y biológico para la degradación de cianuro *en galvanoplastia* (Universidad EAFIT, Medellín, Colombia) (Publicado en la Revista Ingeniería Química N° 463 Año XL Octubre 2008 Páginas 156-163)1.
17. GUILLOTON M, LAMBLIN AF, A physiological role for cyanate-induced carbonic Kozliak EI, Gerami-Nejad M, anhydrase in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* Tu C, Silverman D, 175:1443-1451. Anderson PM, Fuchs JA (1993).
18. HORIKOSHI K (1999) Alkaliphiles: some applications of their products for biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63:735-750.
19. ISILDAK I, ASAN A (1999) Simultaneous detection of monovalent anions and cations using all solid-state contact PVC membrane anion and cation-selective electrodes as detectors in single column ion chromatography. *Talanta* 48:967-978.

20. KAO CM, LIU JK, Lou HR, Biotransformation of cyanide to methane and Lin CS, Chen SC (2003) ammonia by *Klebsiella oxytoca*. *Chemosphere* 50:1055-1061.
21. KINA M. Hernández Sánchez-2010 Scott, J. S. y J. C. ingles 1981. Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial – República de Colombia
22. KUNZ D.A, CHEN J.L., PAN G. Accumulation of keto acids as essential components in cyanide assimilation by *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764, *Applied and Environmental Microbiology*, vol 64, pp 4452-4459. 1998.
23. KNOWLES CJ, Dorr PK Cyanide oxygenase and cyanase activities of (1989) *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764. *FEMS Microbiology Letters* 60:289-294.
24. LIU J-K, Liu C-H, Lin C-S The role of nitrogenase in a cyanide-degrading (1997) *Klebsiella oxytoca* strain. *Proc Nat Sci Coun*, part B 21:37-42.
25. Logsdon, M. J; Kagelstein, K. & Mudder, T. I. (2001). *El Manejo del Cianuro en la Extracción de Oro. Consejo Nacional de Metales y Medio Ambiente*. USA. Consultado el: 24 de marzo del 2009. Obtenido desde: <http://www.aage.org.ar/manejodelcianuro.pdf>.
26. LU, J., Dreisinger, D.B., Cooper, W.C. 2002. Thermodynamics of the aqueous coppercyanide system. *Hydrometallurgy*.66: 23–36.

27. LUQUE-ALMAGRO VM, Flow-injection spectrophotometric determination of cyanate in bioremediation processes by use of immobilised inducible cyanase. *Anal Bioanal Chem* Castro MD (2003) 377:1071-1078.
28. MADIGAN MT, MARTINKO JM, Brock. *Biología de los microorganismos*. 10ª Edición, Pearson Education, S.A., Madrid.
29. MANACORDA, Ana María CUADROS, Daniela Patricia ALVAREZ, Anahí – 2007.
30. MAGASANIK. B (1996) Regulation of nitrogen utilization. En: *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology* (Neidhardt, FC et al. eds). pp. 1344-1356. American Society for Microbiology Press, Washington, DC.
31. NEILANDS. JB (1981) Microbial iron compounds. *Ann Rev Biochem* 50:715-731.
32. OUDJEHANI, K. et al. Natural attenuation potential of cyanide is microbial activity in mine tailings. *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol 58, pp 409-415. 2002.
33. REDDY CS, Ghai R, Rashmi, Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresour Kalia VC* (2003) *Technol* 87:137-146.

34. RAYBUCK SA (1992) Microbes and microbial enzymes for cyanide degradation. *Biodegradation* 3:3-18.
35. SCOTT, J. S. and J. C. Ingles, 1981. "Removal of Cyanide from Gold Mill Effluents," *Canadian Mineral Processors, Thirteenth Annual Meeting*, Ottawa, Ontario, Canada, January 20-22, pp. 380-418.
36. SILVA-AVALOS J, Richmond Degradation of the metal cyano-complex of MG, Nagappan O, Kunz DA tetracyano-nickelate(II) by cyanide-utilizing (1990). bacterial isolates. *Appl Environ Microbiol* 56:3664-3670.
37. VISCA P, Colotti G, Serino L, Metal regulation of siderophore synthesis in Verzili D, Orsi N, *Pseudomonas aeruginosa* and functional effects Chiancone E (1992) of siderophore-metal complexes. *Appl Environ Microbiol* 58:2886-2893.
38. [http://spij.minjus.gob.pe/CLP/contenidos.dll/CLPleggobreg/coleccion00000.htm/a%C3%B1o10826.htm/mes12029.htm/dia12050.htm/sector12051.htm/sumilla12052.htm?f=templates\\$fn=document-frame.htm\\$3.0#JD\\_RGGR-089-2009-GRA-PR-GGR-05SET2009](http://spij.minjus.gob.pe/CLP/contenidos.dll/CLPleggobreg/coleccion00000.htm/a%C3%B1o10826.htm/mes12029.htm/dia12050.htm/sector12051.htm/sumilla12052.htm?f=templates$fn=document-frame.htm$3.0#JD_RGGR-089-2009-GRA-PR-GGR-05SET2009)
39. <http://www.bt.cdc.gov/agent/cyanide/basics/espanol/facts.asp>. Consultado en Agosto 25 de 2004.
40. <http://www.cepis.org.pe/bvsaidis/resisoli/iii-131.pdf>
41. <http://www.scribd.com/doc/.../Diseño-de-Experimentos>.

## ANEXOS

### ANEXO I

En el Anexo I se muestran las fotos obtenidas durante el desarrollo del presente trabajo

**Foto 5**



**Foto 6**



La Foto 5 y 6 muestra la recolección y envasado de las muestras para su envío a l laboratorio de la UCSM

**Foto 7**



La Foto 7 muestra la esterilización de los medios de cultivo usando un autoclave

**Foto 8**



**Foto 9**



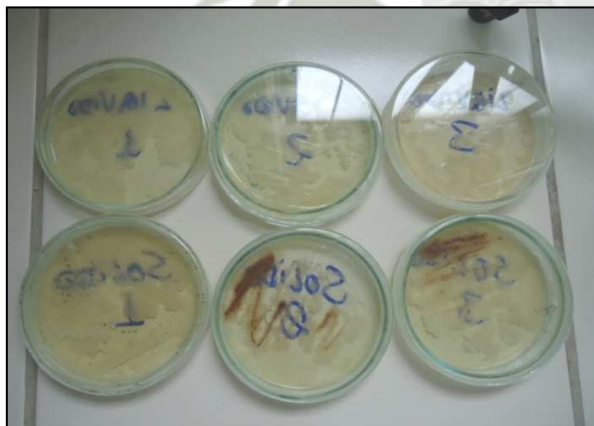
La Foto 8 y 9 muestran el proceso de siembra por agotamiento para cada muestra usando agar nutritivo (placas de color amarillo) y Agar Mac conkey (8placas de color rojo)

**Foto 10**

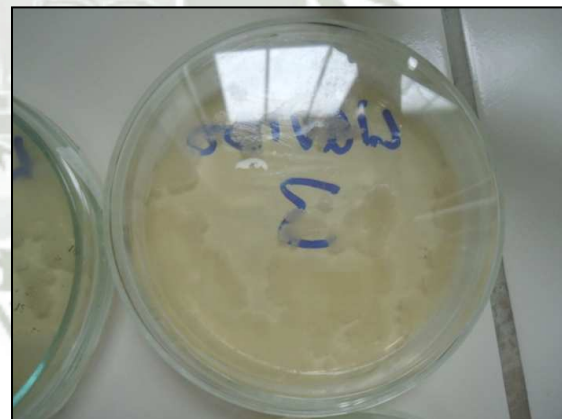


La Foto 10 muestra la incubación de las placas sembradas

**Foto 11**

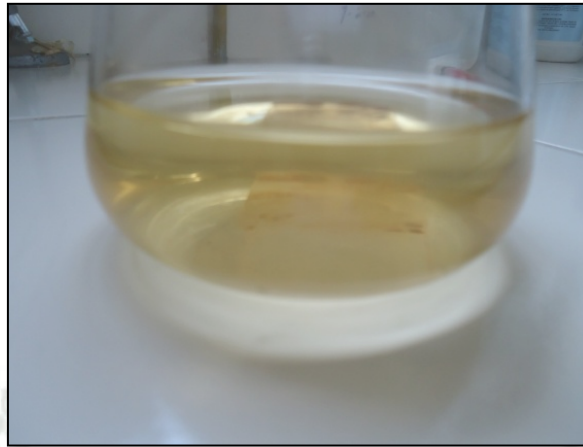


**Foto 12**



La Foto 11 y 12 muestran la presencia de colonias en las placas de Agar nutritivo de cada una de las muestras sembradas

**Foto 13**



**Foto 14**



La Foto 13 muestra el medio de cultivo donde se realiza la adaptación del microorganismo aislado (el medio de cultivo usado es caldo nutritivo más 250 ppm de NaCN)

La Foto 14 muestra el crecimiento del microorganismo en el caldo nutritivo más 250 ppm de NaCN después de las 48 horas de incubación

**Foto 15**

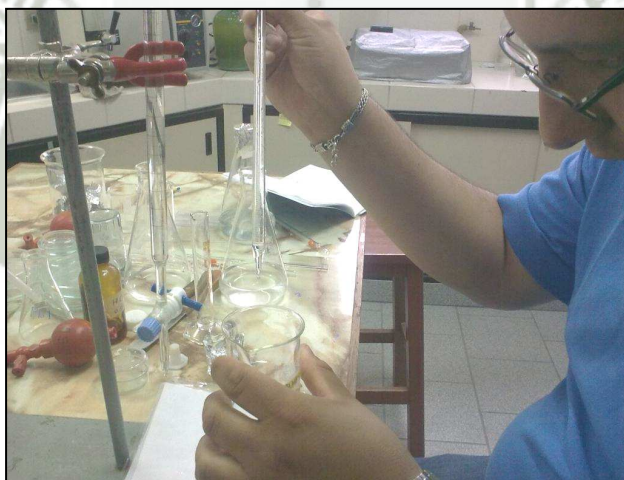


La Foto 15 muestra la realización del experimento en el Shaker con tres repeticiones para cada ensayo.

**Foto 16**



**Foto 17**



La Foto 16 muestra la medición del pH que se realizó durante las 48 horas que duro la experimentación

La Foto 17 muestra la realización de la prueba titulométrica para determinar la concentración de Cianuro.

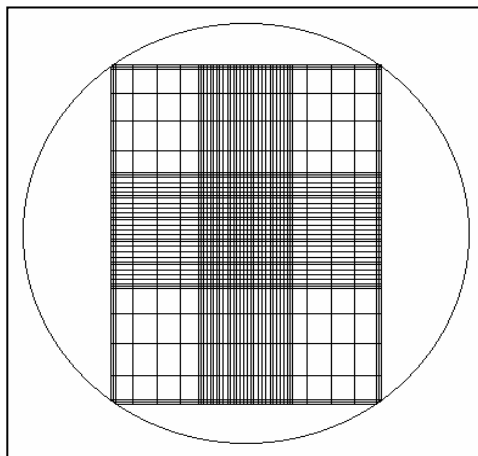
## ANEXO II

En el Anexo II muestran con más detalle el procedimiento de conteo en la cámara de NEUBAUER

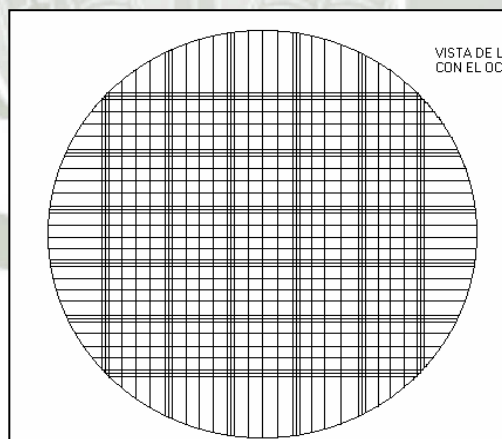
### **PROCEDIMIENTO PARA EL CONTEO EN CÁMARA DE NEUBAUER.**

- Limpie la cámara y la laminilla de cuarzo suavemente con alcohol.
- Revise la laminilla de cuarzo que no debe estar desbordada o quebrada.
- Coloque la laminilla de cuarzo sobre la cámara en forma vertical, esta debe quedar centrada.
- Proceda a llenar la cámara. Este paso es muy importante y definitivo en la distribución de las células. Es recomendable llenarla con micropipeta pequeña o con una jeringa ya que la cámara se llena con una gota. El llenado debe ser continuo en un solo intento.
- La cámara no puede quedarse se detecta porque en las esquinas del recuadro de llenado se ven porciones secas. Tampoco se debe inundar, la apariencia en la cámara es de líquido abundante en las terminaciones del recuadro.

**Conteo:** Lleve la cámara al microscopio y enfoque el cuadro de conteo con el ocular de 4X. Observará lo siguiente.

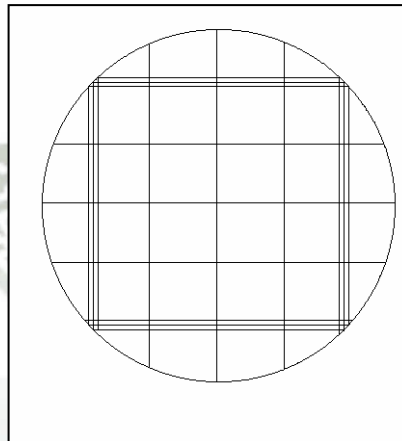


- Si las células que se va a contar son pequeñas como son las levaduras, bacterias, etc., ubicarse en la cuadrícula central y se pasa al ocular de 10X se visualizarán de la siguiente manera:

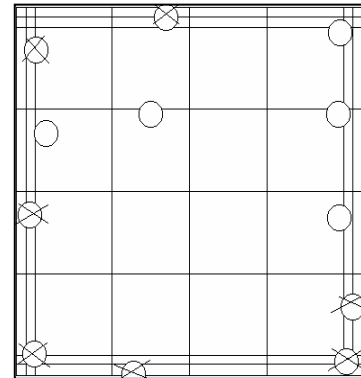
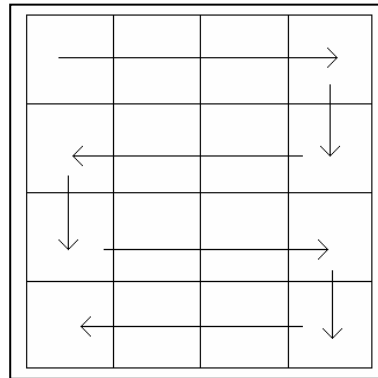


- En esta cuadrícula se visualizan 25 cuadros, de los cuales se cuentan las células presentes en 5 campos, generalmente se cuentan los cuadros de las esquinas y el central, lo que garantiza un conteo aleatorio.

- Para realizar el conteo se pasa al ocular de 40X, donde se visualiza cada uno de los campos y con ayuda del carro del microscopio se desplaza la cuadrícula hasta contar en todos los cuadros. El conteo en estos campos de la cámara se conoce como AP (alto poder). Con el lente de 40X cada cuadro se ve de la siguiente manera:



- Las células se cuentan cuadro por cuadro y se hace un total. Se recomienda realizar el conteo siguiendo las flechas para evitar que se cuenten las células dos veces o que no se cuenten. Alrededor de cada cuadrícula se observa que hay tres líneas que delimitan el cuadro, que son fundamentales en el momento del conteo ya que definen cuales células son contables o cuales están fuera del campo de conteo. Las células que no tocan la segunda línea son contables, si la toca no están encima de ella no se incluyen. Gráficamente se puede apreciar la forma correcta de conteo. Las células que tiene una X son las que no se deben contar.



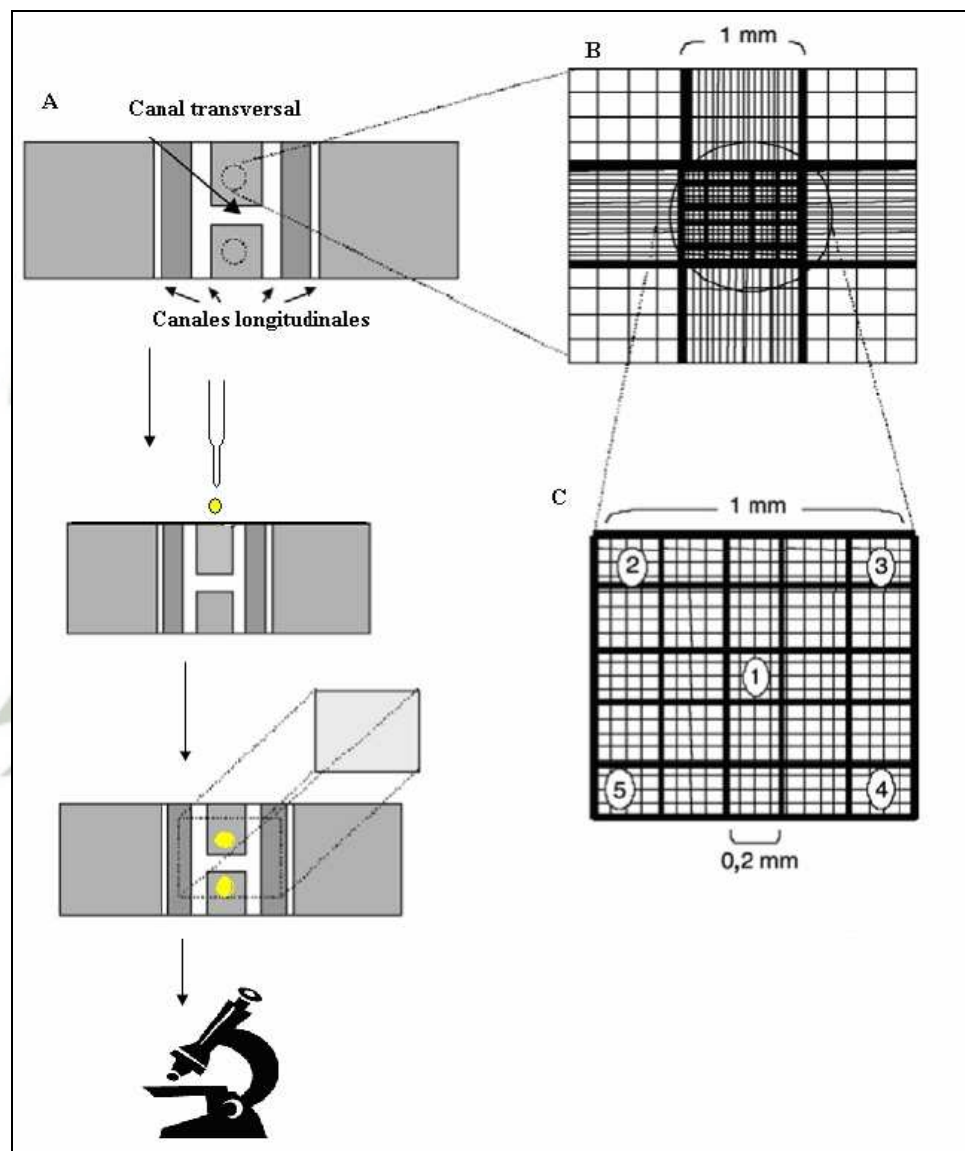
- Después de contar las células se procede a calcular el número de células por unidad de volumen. Para esto se utiliza el área de cada cuadro, el espacio ocupado por el líquido en el que están las células que es el mismo espacio que hay entre la cuadrícula de la cámara y la laminilla de cuarzo.
- Se promedia el número de esporas de la cámara de arriba con la de abajo, se multiplica por el factor de dilución y por un factor Figura, si se contó el cuadro central o 104 si se contaron los cuadros de los extremos, obteniendo el valor **X**.

1 ml del preinoculo \_\_\_\_\_ **X** esporas

? \_\_\_\_\_ 1961 Esporas a inocular ( $1 \cdot 10^8$  esporas)

Luego, éste valor se multiplica por la cantidad de mililitros del medio en el que va a desarrollarse el microorganismo, esta cantidad es aproximada

### Diagrama del pProcedimiento de conteo bacteriano en la cámara de NEUBAUER



Fuente: (MANACORDA, Ana María- 2007)