

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN - TACNA

Facultad de Ciencias

Escuela Académico Profesional de Biología-Microbiología

“Evaluación de parámetros físico-químicos para una eficiente biodegradación de cianuro en relaves cianurados por *Pseudomonas fluorescens* en un biorreactor aireado”

TESIS

Presentada por:

Bach. Jhon Abel Coaquira Maquera

Para optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO MICROBIÓLOGO

TACNA - PERÚ

2014

**UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROMANN
FACULTA DE CIENCIAS
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE BIOLOGÍA – MICROBIOLOGÍA**

Tesis N° 220

Título profesional de: BIÓLOGO MICROBIÓLOGO

El secretario académico de la facultad de ciencias, certifica que por resolución de Facultad N° 7839-2014-FACI-UNJBG, el consejo de facultad designo como jurado para la sustentación de la tesis: **“Evaluación de parámetros físico-químicos para una eficiente biodegradación de cianuro en relaves cianurados por *Pseudomonas fluorescens* en un biorreactor aireado”**

El mismo estuvo conformado por:

Presidente : Dr. Segundo Manuel Alvarado Contreras
Secretario : Dr. Cesar Augusto Cevallos Columbus
Vocal : MSc. Ángela Verónica Choque Miranda

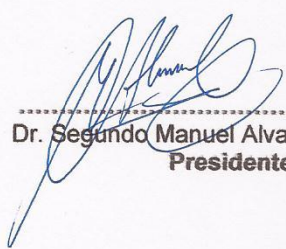
Para examinar y calificar la sustentación del informe de tesis en acto público, en el auditorio de la facultad de ciencias de la UNJBG, el día 06 de agosto del año 2014, a las 10:15 am

Presentado por el bachiller Jhon Abel Coaquira Maquera de la escuela académico profesional de Biología-Microbiología

El jurado calificador en forma secreta e individual se pronuncio acerca de su calificativo sobre el informe expuesto y procedió a emitir el siguiente veredicto:

APROBADO por **UNANIMIDAD** con la nota de 16(dieciséis), con el calificativo de bueno.


Para la ratificación de lo detallado firman



Dr. Segundo Manuel Alvarado Contreras
Presidente



Dr. Cesar Augusto Cevallos Columbus
Secretario



MSc. Ángela Verónica Choque Miranda
Vocal

DEDICATORIA

A mis padres María y Manuel, por su apoyo y confianza constante

AGRADECIMIENTOS

A Dios, a mis asesores MSc. Blgo Mblgo. Daladier Castillo Cotrina de la Facultad de Ciencias y MSc. Ing. Tolomeo Raúl Soto Pérez de la Facultad de Metalurgia, de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, por el asesoramiento para la ejecución del presente trabajo de investigación, además por su aporte científico, sus acertados consejos y su paciencia para conmigo que sirvieron de mucho en la elaboración del presente informe de tesis.

Al maestro Alfredo Quispe, Blga – Mblga. Patricia Lanchipa Sepulveda, Blgo Mblgo. Edwin Obando por el apoyo técnico y favores brindados.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	01
Planteamiento del problema.....	03
Hipótesis.....	04
Objetivos.....	04
CAPITULO I: MARCO TEÓRICO	
1.1. Conceptos generales.....	05
1.2. Antecedentes.....	17
1.3. Biorremediación	21
CAPITULO II: MATERIALES Y MÉTODOS	
2.1. Material en estudio.....	32
2.2. Lugar de experimentación.....	32
2.3. Diseño experimental.....	33
2.4. Variables de experimentación	35
2.5. Aislamiento e identificación de <i>Pseudomonas</i> <i>fluorescens</i>	35
2.6. Obtención del inóculo bacteriano para la	39

fermentación.....	
2.7. Producción del inoculo bacteriano.....	40
2.8 Experimentación en biorreactores de la biodegradación del cianuro.....	41
2.9. Evaluación de la biodegradación del cianuro	42
2.10. Determinación de la eficiencia y tasa de degradación de cianuro por <i>Pseudomonas fluorescens</i>	43

CAPÍTULO III: RESULTADOS

3.1 <i>Pseudomonas fluorescens</i> nativa aislada e identificada de los relaves mineros	47
3.2. Pruebas bioquímicas para <i>Pseudomonas fluorescens</i>	48
3.3. Eficiencia de remoción de cianuro experimental	51
3.4. Eficiencia de remoción de cianuro estadísticamente	54
3.5. Variables óptimas y máximos valores de eficiencia de degradación de cianuro estadístico	60
3.6. Tasa de remoción de cianuro experimental y estadístico	62
3.7. Tasa de remoción de cianuro estadísticamente.....	64
3.8. Variables óptimas y máximos valores de eficiencia de degradación de cianuro estadístico	70
3.9. Análisis de la eficiencia y tasa de degradación en función de las variables.....	72

CAPÍTULO IV DISCUSIÓN

CONCLUSIÓN.....	98
RECOMENDACIONES.....	99
BIBLIOGRAFÍA.....	100
ANEXOS.....	108

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Plantilla de prueba según el diseño experimental Box- Behnken (MINITAB 16) a escala codificada y natural de los ensayos biorremediación en biorreactores con <i>Pseudomonas fluorescens</i> como inóculo microbiano.....	34
Cuadro 2: Características fenotípicas de algunas especies de <i>Pseudomonas</i>	39
Cuadro 3: Pruebas realizadas para la bacteria aislada que se reconoció como <i>Pseudomonas fluorescens</i>	46
Cuadro 4: Valores de concentración inicial, final y de degradación de cianuro en cada uno de los experimentos del diseño de Box Behnken con <i>Pseudomonas fluorescens</i>	52
Cuadro 5: Eficiencia de remoción experimental de cianuro obtenidos para cada uno de los experimentos del diseño de Box-Benhke.....	53
Cuadro 6: Fórmula polinómica cuadrática para la obtención de la eficiencia de remoción de cianuro estadístico en el modelo matemático algebraico de la experimentación.....	54
Cuadro 7: Datos obtenidos por reemplazo de valores de eficiencia de remoción de cianuro experimental, temperatura, pH y concentración de cianuro en la fórmula polinómica cuadrática que se tuvo para cada uno de los experimentos del diseño de Box Behnken	56

Cuadro 8: Coeficientes de regresión del modelo matemático algebraico obtenidos para la eficiencia de degradación de cianuro, obtenido con el paquete estadístico Minitab 16.....	57
Cuadro 9: Formula polinomial cuadrática estadística obtenida del reemplazo de los coeficientes de regresión encontrados para la eficiencia de remoción de cianuro estadístico en el modelo matemático algebraico de la experimentación.....	58
Cuadro 10: Eficiencia de degradación de cianuro estadística obtenida aplicando la ecuación polinómica cuadrática estadística a cada uno de los experimentos del diseño de Box behnken.....	59
Cuadro 11: Valores óptimos de temperatura pH y concentración de cianuro para la máxima eficiencia de degradación de cianuro establecida en la experimentación con <i>Pseudomonas fluorescens</i>	61
Cuadro 12: Tasa de remoción experimental de cianuro obtenidos para cada uno de los experimentos del diseño de Box Behnken.....	63
Cuadro 13: Fórmula polinómica cuadrática para la obtención de la tasa de remoción de cianuro estadístico en el modelo matemático algebraico de la experimentación	64
Cuadro 14: Datos obtenidos por reemplazo de valores de tasa de remoción de cianuro experimental, temperatura, pH y concentración de cianuro en la fórmula polinómica cuadrática que se tuvo para cada uno de los experimentos del diseño de Box-Behnken	66
Cuadro 15: Coeficientes de regresión del modelo matemático algebraico obtenidos para la tasa de degradación de cianuro estadístico con el paquete estadístico Minitap 16	67

Cuadro 16: Fórmula polinomial cuadrática estadística obtenida del reemplazo de los coeficientes de regresión modelo matemático algebraico de la experimentación	68
Cuadro 17: Tasa de degradación de cianuro estadística obtenida aplicando la ecuación polinómica cuadrática estadística a cada uno de los experimentos del diseño de Box- Behnken	69
Cuadro 18: Valores óptimos de temperatura pH y concentración de cianuro para la máxima tasa de degradación de cianuro establecida en la experimentación con <i>Pseudomonas fluorescens</i>	71
Cuadro 19: Comparación de la eficiencia (%) y tasa de degradación (eficiencia/días) estadística de los 15 experimentos del diseño de Box- Behnken	73
Cuadro 20: Comparación de la tasa de degradación de cianuro con la eficiencia de degradación de cianuro en función de la temperatura.....	74
Cuadro 21: Comparación de la tasa de degradación de cianuro con la eficiencia de degradación de cianuro en función del pH	75
Cuadro 22: Comparación de la tasa de degradación de cianuro con la eficiencia de degradación de cianuro en función de la concentración de cianuro	76
Cuadro 23: Interacción entre las variables de pH y temperatura con relación a la eficiencia	78
Cuadro 24: Interacción entre las variables de pH y temperatura con relación a la tasa de degradación	80

Cuadro 25: Interacción entre las variables de pH y CN con relación a la eficiencia	82
Cuadro 26: Interacción entre las variables de pH y la concentración de cianuro con relación a la tasa de gradación.....	84
Cuadro 27: Interacción de las variables temperatura y la concentración de cianuro con relación a la eficiencia	86
Cuadro 28: Interacción de las variables temperatura y la concentración de cianuro con relación a la tasa de degradación	88

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Grafica 01: Porción de la producción mundial de cianuro utilizada en minería.....	8
Grafica 02: Equilibrio de las formas de cianuro libre en solución CN-/HCN en función al pH.....	11
Gráfica 03: Máximos valores de eficiencia de degradación de cianuro según el diseño experimental de Box-Behnken.....	60
Grafico 04: Máximos valores de tasa de degradación de cianuro estadística según el diseño experimental de Box – Behnken	70
Grafica 05: Respuesta en superficie de la interacción de la temperatura y el pH con respecto a la eficiencia.....	78
Grafica 06: Respuesta en superficie de la interacción de la temperatura y el pH con respecto a la tasa de degradación.....	80
Grafica 07: Respuesta en superficie de la interacción del pH y la concentración de cianuro con respecto a la eficiencia.....	82
Grafica 08: Respuesta en superficie de la interacción del pH y la concentración de cianuro con respecto a la tasa de degradación.....	84
Grafica 09: Respuesta en superficie de la interacción de la temperatura y la concentración de cianuro con respecto a la eficiencia.....	86
Grafica 10: Respuesta en superficie de la interacción de la temperatura y la concentración de cianuro con relación a la tasa de degradación.....	88

ÍNDICE DE FOTOS

Foto 01: Vista microscópica de los cristales de cianuro en formación.....	6
Foto 02: Aislamiento de <i>Pseudomonas fluorescens</i> : (1) Suspensión de la muestra de relave minero con agitación a 140 rpm por una hora; (2) Enriquecimiento de la muestra de relave e incubación por 48 horas a 30 °C, (3) Aislamiento de colonias procedentes de la muestra enriquecida	47
Foto 03: Pruebas de identificación realizadas a la bacteria aislada: (6) Colonias aisladas; (7) Prueba de catalasa positiva para identificación de <i>Pseudomonas fluorescens</i> ; (8) prueba de licuefacción de gelatina luego de 24 horas; (9) tubos incubados a 41 y 4 C° con la bacteria; (10) bacterias incubada a 41°C en agar glutamato; (11) bacterias incubada a 4 °C sembrada en agar glutamato.....	49
Foto 04: Aislamiento y pruebas bioquímicas: (1) colonias aisladas; (2) coloración de flagelos por el método de Leifson; (3) vista microscópica de un preparado en fresco de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	50

RESUMEN

Se tuvo como objetivo determinar los valores físicos y químicos óptimos de temperatura, pH y concentración de cianuro, para una eficiente biodegradación de cianuro en relaves cianurados por *Pseudomonas fluorescens*, en un biorreactor aireado. Se empleó la cepa de *Pseudomonas fluorescens* aislada de un relave minero cianurado para evaluar en un biorreactor aireado su capacidad de degradación sobre tres diferentes concentraciones de cianuro de relave (500, 1 000, 1 500 ppm) a las temperaturas de 22, 26 y 30°C con pH de 9,5, 10, y 10,5 hasta que se obtuvo máxima degradación del cianuro en cada experimento. Se realizó 15 experimentos siguiendo el diseño de Box Behnken, que es un diseño factorial fraccionado. Se evaluó la concentración de cianuro en el biorreactor cada 24 horas mediante el método titulométrico. Mediante el Software Excel y el Minitab 16 se analizó los datos obtenidos. Se determinó en *Pseudomonas fluorescens* una máxima eficiencia y tasa de degradación de cianuro respectivamente de 96,67 % y 17,57 % /día; siendo los valores óptimos de las variables temperatura, pH y concentración de cianuro para la máxima eficiencia de degradación de cianuro 26°C, 9,5 de pH y 1500 ppm, y para la tasa de degradación de cianuro 26°C, 9,5 de pH y 500 ppm.

INTRODUCCIÓN

La industria minera, en particular la industria minera del oro, ha estado utilizando el cianuro en sus procesos productivos durante muchas décadas.

Aunque la preocupación pública por el cianuro es válida y sin duda comprensible, gran parte de la reciente atención de la prensa y la reacción pública respecto del uso del cianuro en operaciones mineras ha surgido debido a la falta de comprensión sobre la naturaleza del cianuro y sus efectos sobre la salud y el medio ambiente. Generalmente se piensa que el cianuro es una sustancia mortal, en realidad es una sustancia química ampliamente utilizada, esencial para el mundo moderno (Lonsdon, 2006).

El Perú, es por tradición, un país productor de minerales. La minería ha cobrado un nuevo auge, en especial la gran minería, como políticas del fomento de la inversión extranjera. La mitad de las exportaciones nacionales provienen de la minería y desde 1998 el oro es el principal producto de exportación nacional, habiéndose producido de 22 Tm en 1991 a 128 Tm en 1999 (Hruschka, 1998).

El cianuro es menos dañino que el mercurio, permite incrementar la productividad no obstante las pozas de cianuración está expuesto al medioambiente 2 o 3 días y emiten gases que producen mareos vómitos y dolores de cabeza, luego es drenado y reutilizado. El cianuro se manipula sin guantes ni mascarillas. Concluido el proceso, los relaves son abandonados y por efecto de las lluvias van a los ríos,

contaminando las aguas usadas en los cultivos y crianza de animales. Como consecuencia de la actividad minera, residuos contaminantes de cianuro quedan expuestos al medio ambiente, cuya cantidad se ve peligrosamente incrementada por la comercialización y uso clandestino por mineros ilegales que practican artesanalmente la minería de lixiviación de oro con cianuro, dada la alta toxicidad del cianuro para los seres vivos y ecosistemas constituye un factor de riesgo ambiental en la zonas de actividad minera que obliga evaluar procesos para su depuración de efluentes contaminados.

Varios mecanismos para la eliminación del cianuro del medio ambiente son objeto de investigación, entre ellos el uso de la biodegradación muchos estudios demuestran la susceptibilidad del cianuro para ser metabolizados por mecanismos biológicos, con el fin de satisfacer los criterios ambientales de descarga.

Las condiciones aeróbicas son mucho más favorables para la degradación del cianuro que las condiciones anaeróbicas, aunque los organismos anaeróbicos pueden ser eficaces para tratar el cianuro en concentraciones de hasta varios miligramos por litro. Se han creado tanto sistemas activos como sistemas pasivos de tratamiento biológico; estos sistemas remueven el cianuro empleando microorganismos aeróbicos o anaeróbicos.

Las ventajas del proceso de tratamiento biológico son su diseño simple y el control del proceso operativo, los bajos costos de las sustancias químicas y la capacidad para tratar todas las formas del cianuro y sus subproductos. Las posibles limitaciones de los sistemas

de tratamiento biológico son su reducido rendimiento con temperaturas frías y con concentraciones muy altas de cianuro.

En la industria minera se hace frecuente la búsqueda de métodos menos contaminantes para la eliminación de desechos obtenidos en sus procesos productivos ya que se ha visto que los métodos convencionales generan altos costos en lo económico y ambiental, debido a la utilización de procesos químicos que producen alto índice de contaminación, El valor agregado que genera la utilización de esta alternativa biológica se representa en mejorar la calidad de vida de los mineros y del ecosistema que rodea esta industria.

En presente trabajo se investigación de evalúo los efectos que tiene los diferentes valores de temperatura, pH y concentración de cianuro para la eficiencia de degradación de cianuro producida por la cepa llamada *Pseudomonas fluorescens* en tratamiento de relaves mineros, para lo cual se realizaron 15 experimentos a los cuales se manipularon las variables independientes para así ver el efecto en la degradación de cianuro.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Por lo descrito anteriormente se formuló la siguiente pregunta ¿Cuáles son los valores físico químicos óptimos de temperatura pH y concentración de cianuro para una eficiente degradación de cianuro en relaves cianurados por *Pseudomonas fluorescens* en un biorreactor airado?

HIPOTESIS

- Se obtiene una eficiente biodegradación de cianuro en relaves cianurados por *Pseudomonas fluorescens* a la temperatura de 30 °C pH 9,5 y concentración de cianuro de 500 ppm.

OBJETIVOS

Objetivo General:

- Determinar los valores físicos y químicos óptimos de temperatura, pH, y concentración de cianuro, para una eficiente biodegradación de cianuro en relaves cianurados por *Pseudomonas fluorescens*, en un biorreactor aireado.

Objetivos específicos:

- Aislar *Pseudomonas fluorescens* nativa degradadora de cianuro.
- Determinar la mayor eficiencia y tasa de degradación de cianuro en relave minero por *Pseudomonas fluorescens*.
- Determinar los valores óptimos de temperatura, pH y concentración de cianuro de la máxima eficiencia y máxima tasa de degradación de cianuro.

CAPÍTULO I

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. CONCEPTOS GENERALES

1.1.1. El Cianuro

El carbono y el nitrógeno, los dos elementos que forman el cianuro, se encuentran omnipresentes en nuestro entorno, juntos forman casi el 80 % del aire que respiramos y ambos están presentes en las moléculas orgánicas que son la base de todas las formas de vida. El cianuro de hidrógeno se formó en las primeras etapas del desarrollo de nuestro planeta como precursor de los aminoácidos, a partir de los cuales evolucionó la vida sobre la tierra. El cianuro también se forma naturalmente, en algunas plantas y animales lo producen y utilizan como un mecanismo de protección que los convierte en una fuente alimenticia poco atractiva. Muchos organismos pueden adaptarse, en cierta medida, a la presencia del cianuro y eliminar su toxicidad (Guerrero, 2005 y Lonsdon, 2006).

Una fuente natural de cianuro de hidrógeno (HCN) es un compuesto similar al azúcar llamado amigdalina, que existe en muchas frutas, verduras, semillas y nueces, entre ellos los damascos, brotes de poroto, castañas, judías, lentejas, duraznos, maníes, pecanas, soja y otras nueces. En el corazón de la almendra amarga hay aproximadamente 1 mg de HCN en forma de amigdalina (Lonsdon, 2006).

1.1.2. Química del cianuro

Cianuro es un término general que se aplica a un grupo de sustancias químicas que contienen un átomo de carbono enlazado a un átomo de nitrógeno mediante un enlace triple (CN), que se combina con una gran mayoría de compuestos orgánicos e inorgánicos. Es potencialmente letal (tóxico), porque actúa rápidamente sobre el sistema respiratorio (Mudder, et al. 1991). Los compuestos de cianuro contienen sustancias químicas que se encuentran presentes en la naturaleza o que han sido producidas por el hombre (Guerrero, 2005). Las principales formas de cianuro producidas por el hombre son el cianuro de hidrógeno gaseoso (HCN) y el cianuro sólido de sodio (NaCN) como se observa en la foto 1 y de potasio (KCN) (Lonsdon, 2006).

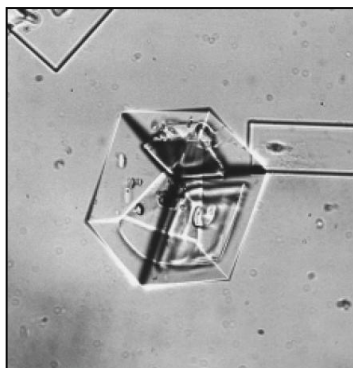


Foto 1: Vista microscópica de los cristales de cianuro en formación

Fuente: LONSDON, 2006

El cianuro es uno de los principales compuestos utilizados por la industria química debido a su composición de carbono y nitrógeno, ambos elementos comunes y a la facilidad con la cual reacciona con otras sustancias (García, 2005).

Debido a sus propiedades únicas, el cianuro se utiliza en la fabricación de partes metálicas y en numerosos productos orgánicos comunes como los plásticos, las telas sintéticas, los fertilizantes, los herbicidas, los tintes y los productos farmacéuticos (García, 2005).

Anualmente alrededor de un millón de toneladas de cianuro son utilizadas y representa el 80 % del cianuro fabricado en el mundo que se emplea en la producción de químicos orgánicos (nitrilo, nylon y plásticos acrílicos); así como en la fotografía y la producción de goma sintética. El cianuro de hidrógeno gaseoso se ha utilizado ampliamente para exterminar a los roedores y depredadores grandes, y en la práctica hortícola, para controlar las plagas de insectos que han desarrollado resistencia a otros pesticidas (García, 2005).

Además, el cianuro se utiliza en productos farmacéuticos como el laetril, una sustancia para combatir el cáncer, y el nitroprusiato, una droga para reducir la presión arterial. Los compuestos de cianuro también se utilizan en vendas quirúrgicas que promueven la cicatrización y reducen las cicatrices. En otros sectores industriales, el cianuro se ha empleado en la producción de papeles, textiles y plásticos. Las

sales de cianuro son utilizadas en la metalurgia para galvanización, limpieza de metales y la recuperación del oro del resto de material removido (García, 2005).

La minería es una actividad industrial que utiliza una cantidad significativa de cianuro, aproximadamente un 20 % de la producción total, ver grafica 1. Desde 1887, las soluciones de cianuro se han utilizado principalmente para extraer oro y plata de material mineral, que de otro modo no podrían extraerse eficazmente. Además, el cianuro se utiliza en concentraciones bajas como un reactivo de flotación para ayudar a recuperar metales base como el plomo, el cobre y el zinc (García, 2005).



Grafica 1: Porción de la producción mundial de cianuro utilizada en minería

Fuente: LONSDON, 2006

a. **Cianuro en soluciones:** Después de haber extraído el oro por medio de procesos hidrometalúrgicos, en los efluentes residuales pueden estar presentes tres tipos principales de compuestos cianurados (Alvares, 2005 y Lonsdon, 2006):

a.1. Cianuro libre: Todo el cianuro libre está presente como HCN cuando hay abundantes iones de hidrógeno presentes, es decir, a un valor de pH menor a 8. Este HCN, entonces, puede volatilizarse en forma de gas y dispersarse en el aire. Cuando el pH es superior a 10,5 hay pocos iones de hidrógeno están presentes y casi todo el cianuro libre está presente en forma en su forma iónica CN^- (Lonsdon, 2006).

En condiciones normales de temperatura y presión, las concentraciones de HCN y CN^- son iguales a un valor de pH de aproximadamente 9,4 como se puede apreciar en la Gráfica 03 (Lonsdon, 2006).

Estas formas de cianuro libre (HCN, CN^-) son importantes porque se consideran como los cianuros más tóxicos. Sin embargo, también son las formas que se eliminan más fácilmente de las soluciones mediante elaborados procesos de tratamiento y mecanismos naturales de atenuación. Los procesos biológicos, químicos y físicos que afectan a las concentraciones de cianuro en el agua, el suelo y el aire han sido extensamente estudiados durante las dos décadas pasadas, de modo que su comportamiento en el ambiente es bien conocido. Una de las reacciones más importantes que

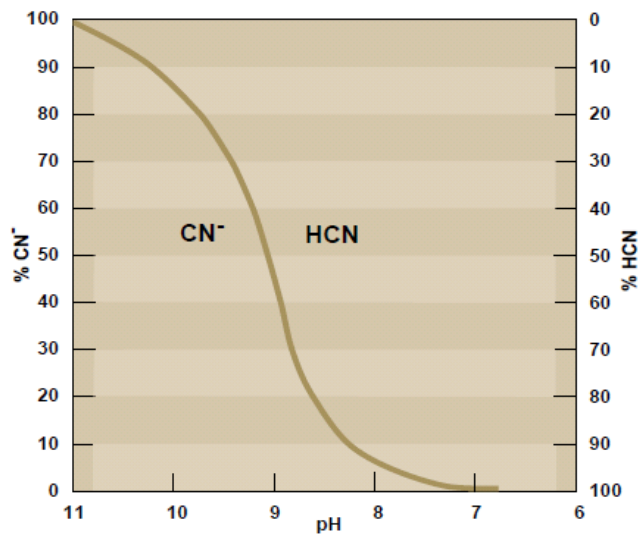
afectan a la concentración de cianuro libre es la volatilización de HCN, que, al igual que la mayoría de los gases, se separa del agua y escapa al aire (Lonsdon, 2006).

El cianuro libre no es persistente en la mayoría de las aguas superficiales porque el pH de dichas aguas generalmente es de 8, de modo que el HCN se volatiliza y dispersa. La volatilidad del cianuro de hidrógeno gaseoso (HCN) y su posterior transformación en compuestos benignos en el aire son importantes porque actúan como un mecanismo natural que controla las concentraciones de cianuro libre en los efluentes residuales y de los procesos en las minas (Lonsdon, 2006).

Los procesos naturales pueden reducir a valores muy bajos la concentración de cianuro libre de las soluciones en lugares al aire libre en las instalaciones de producción de oro, tales como estanques para procesamiento y depósitos de relaves, a menudo a niveles por debajo de lo establecido en los reglamentos o incluso por debajo de los límites de detección (Lonsdon, 2006).

Sin embargo, en la planta de extracción de oro, los operadores mantienen el pH de la solución a valores cercanos a 10,5 con el fin de impedir la volatilización del HCN. Esto preserva el cianuro en el sistema de extracción de oro, donde es necesario y, al mismo tiempo, limita el riesgo de inhalación por parte de los trabajadores de altas

concentraciones de cianuro de hidrogeno gaseoso en un espacio cerrado (Lonsdon, 2006).



Grafica 2: Equilibrio de las formas de cianuro libre en solución CN⁻/HCN en función al pH

Fuente: LONSDON, 2006

a.2. Cianuro débilmente complejo: Denominados cianuros disociables en ácidos débiles, normalmente a pH 4,5; pueden disociarse las formas de cianuro complejadas en solución y producir concentraciones ambientalmente significativas de cianuro libre. Los complejos débiles incluyen complejos de cianuro de cadmio, cobre, níquel, plata y zinc (Lonsdon, 2006).

a.3. Cianuro fuertemente complejo: Cianuro disociable en ácido fuerte, resisten el ataque de un ácido débil, pero se disocian en presencia de un ácido fuerte a pH bajo menor a dos. Los complejos de cianuro con oro, cobalto y hierro son

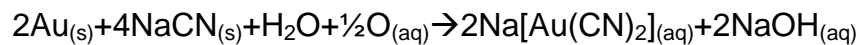
fuerzas y estables en solución. Esta estabilidad del complejo oro-cianuro es un factor clave en el uso del cianuro para la extracción del oro del mineral (Lonsdon, 2006).

Los tres tipos de compuestos juntos constituyen el denominado cianuro total. Conocer sus propiedades físico-químicas es vital para comprender su comportamiento respecto de la seguridad y el ambiente. La velocidad a la cual los complejos se disocian y liberan cianuro libre en la solución depende de factores como la concentración inicial del complejo de cianuro, la temperatura, el pH de la solución y la intensidad de luz en especial la radiación ultravioleta (Lonsdon, 2006).

1.1.3. El cianuro en la minería

Una de las razones para el alto valor adjudicado al oro es su resistencia al ataque de la mayoría de los químicos. Una excepción es el cianuro o más específicamente, una solución que contiene cianuro y que disuelve el metal precioso. El uso de soluciones a base de agua para extraer y recuperar metales como el oro se denomina hidrometalurgia. Las operaciones de minería del oro utilizan soluciones muy diluidas de cianuro de sodio (NaCN), típicamente entre 0,01 % y 0,05 % de cianuro. El proceso de disolución de metales se denomina lixiviación. El cianuro de sodio se disuelve en agua donde, en condiciones ligeramente oxidantes, disuelve el oro contenido en el mineral. La solución resultante que contiene oro se denomina "solución cargada". Luego se agrega zinc o carbón activado a la solución

cargada para recuperar el oro extrayéndolo de la solución oro (Lonsdon, *al et.*, 2006). El cianuro se utiliza en minería para extraer oro y plata del mineral, en particular mineral de baja ley y mineral que no puede tratarse fácilmente mediante procesos físicos simples como la trituración y la separación por gravedad (Smith, *et al.*, 1996). En contacto con el oro, el cianuro forma complejos estables, razón por la cual su importancia en minería aurífera (Guerrero, 2005).



La industria moderna del oro utiliza el cianuro casi exclusivamente como agente lixiviador del oro. Se han utilizado otros agentes complejantes como la tiourea, los cloruros y otros haluros para extraer oro del mineral, pero generalmente no son rentables y presentan problemas particulares para el ambiente y la salud. Los complejos de cianuro son más estables y eficaces y no necesitan otras sustancias químicas agresivas para realizar la recuperación del oro. El cianuro ha sido utilizado en minería desde hace más de un siglo. Una vieja técnica para la recuperación del oro, que ha dejado de utilizarse en las modernas plantas de extracción de oro, es la amalgama con mercurio líquido. En algunos países en desarrollo, los mineros artesanales siguen utilizando el mercurio líquido para complejar el oro proveniente de pequeñas explotaciones mineras. Sin embargo, se ha desalentado esta práctica debido a que el deficiente manejo del mercurio líquido y del vapor que surge al

volatizar el mercurio provoca serios problemas de salud a los mineros artesanales (Smith, *et al.*, 1996).

1.1.4. Toxicidad del cianuro

La toxicidad de las diferentes especies de cianuro depende de su forma química, de su estabilidad y de su biodisponibilidad, siendo la forma más tóxica el cianuro libre cianuro de hidrogeno (HCN) y el cianuro en forma iónica (CN⁻), y las menos, los complejos cianuro metálicos fuertes (Dubey *et al.*, 1995).

El cianuro es potencialmente letal, porque actúa rápidamente sobre el sistema respiratorio al bloquear la actividad de los citocromos oxidasa que es una proteína que contiene el grupo hemo (Fe²⁺ Fe³⁺) y el grupo Cu (cobre), y además actúa como un inhibidor irreversible enzimático, que reacciona con metaloenzimas dependientes de Fe, Zn, Cu; sus dianas primarias son las enzimas de la cadena respiratoria a nivel mitocondrial (citocromo c oxidasa) produciendo hipoxia histotóxica que conduce a la muerte por envenenamiento; la muerte por envenenamiento de cianuro tiene lugar por asfixia tisular, especialmente en el sistema nervioso central (SNC) causando que el metabolismo cambie de aerobia a anaerobia, acumulando lactato en sangre, y el efecto conjunto de hipoxia y acidosis láctica provoca daño al SNC causando paro respiratorio y la muerte (Mathews, *et al.*, 2002). Su alto grado de toxicidad lo convierte en un compuesto de gran peligrosidad

para la vida, pudiendo originar graves problemas ambientales con destrucción de vida silvestre, aves, peces, ecosistemas y otros receptores ecológicos, entre los peligros ecológicos se encuentran la mortalidad (peligro agudo) y la reducción en el crecimiento y la reproducción (peligro crónico) en las especies representativas (Lonsdon, *et al.*, 2006). En consecuencia, el cianuro causa un desbalance ambiental en suelos, aguas o aire, debido a que los procesos naturales de detoxificación no son suficientes y se sobrepasan los niveles de saturación (Barber, *et al.*, 2003 y Matsumura y Kojima, 2003).

La toxicidad depende de la forma de cianuro presente, en forma libre como gas (HCN) o en solución (CN⁻) que son las formas más tóxicas o de forma compleja con algunos metales como hierro que son relativamente menos tóxicos. El efluente de una planta de recuperación de oro típicamente contiene 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 cianuro de hidrogeno (HCN) gaseoso cerca del pozo de tratamiento. Se tiene registrado algunos accidentes que causaron la muerte masiva de peces y vida acuática (Gonzalez, 2004). Los organismos acuáticos son los más sensibles a los efectos tóxicos por la exposición, las principales causas de accidentes con cianuro son las descargas

irresponsables de soluciones con altos niveles de cianuro en aguas superficiales (Luque, 2005).

Los derrames de cianuro destruyen la vegetación, afectan la fotosíntesis y las capacidades reproductivas, puede ser adsorbido por la piel, ingerido o aspirado. En el aire 200 ppm de HCN son letales para animales concentraciones de 0,1 mg/L lo son para especies acuáticas sensibles (Luque, 2005).

Las dosis letales para los seres humanos son de 1 a 3 mg/Kg del peso corporal y de aspiración 100-300 ppm. Significa que una porción más pequeña que un grano de arroz es suficiente para matar a un adulto (Luque, 2005).

Existe una justificable preocupación pública por el uso del cianuro en ambientes industriales. El cianuro es una sustancia tóxica que puede ser letal si se la ingiere o se la inhala en cantidades suficientes. Esto también sucede con muchas otras sustancias químicas como la gasolina y los productos habituales para la limpieza del hogar. Al igual que miles de otras sustancias químicas que se utilizan en nuestros procesos industriales modernos; el conocimiento, los procedimientos adecuados de manipulación y una actitud responsable son fundamentales para el uso seguro y beneficioso del cianuro (Alvares, 2005).

1.2. Antecedentes

1.2.1. Contaminación del cianuro en el Perú

En el Perú, la industria minera aurífera, viene usando el cianuro de sodio en sus procesos productivos durante varias décadas (Díaz, *et al.* 1994) (I p e c m i n e r i a. 2001), en estos últimos años las preocupaciones y reclamos de las población de importantes zonas mineras se han acentuado debido a la contaminación producto de la minería que hay en sus localidades, la escasez de agua que va sufriendo, el deterioro de la salud todo esto junto a la indiferencia de sus autoridades (Medina G, *et al* 2007).

En la región La Libertad, varias provincias atraviesan el problema de contaminación con cianuro. En el caserío El Toro (Huamachuco) se hace evidente la contaminación a que está expuesta la población. Dichas zonas de extracción aurífera, son explotadas por empresas y mineros artesanales con alto de nivel de riesgo, informalidad y tráfico del uso de cianuro que expone a grave riesgo la vida humana, fauna y flora de la región (Medina G, *et al* 2007).

En la región Cajamarca existe la creencia, cada vez más difundida, que la minería contamina el agua de la región y que arrasará sus recursos. No existe estudio técnico, pero para las comunidades es una verdad irrefutable. Se menciona que los

relaves de las minas de Hualgayoc afectaron la vida en los ríos Llaucano y Maygasbamba (Medina G, *et al* 2007).

Asimismo en el valle Chancay-Lambayeque, la principal preocupación de las comunidades es que la extracción del mineral por lixiviación con cianuro, contamina las aguas que nacen alrededor del proyecto La Zanja. Dichas aguas desembocan en el río Cañete, que abastece el reservorio de Tinajones y riega 118 mil hectáreas de cultivos de agroexportación (Medina G, *et al.* 2007).

En región Tacna con el nuevo proyecto Pucamarca de Minsur S.A. en ejecución, está dejando una cierta incertidumbre con respecto a los relaves producidos y los problemas que pudieran originar. siendo necesario adoptar medidas y proponer tecnologías que contribuyan a prevenir, reducir y/o eliminar la contaminación por cianuro (Medina G, *et al.* 2007).

1.2.1. Métodos de atenuación de las concentraciones de cianuro

El proceso que disminuye la concentración de cianuro en solución, ya sea en el ambiente natural o en instalaciones creadas a tal fin, se denomina “atenuación”. La volatilización del cianuro de hidrogeno (HCN), que reduce la concentración de cianuro libre en solución, es el principal proceso de atenuación natural (Lonsdon *et al.* 2006).

a. Degradación natural:

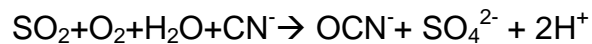
El principal mecanismo de degradación natural es la volatilización con posteriores transformaciones atmosféricas a sustancias químicas menos tóxicas. Otros factores como la oxidación biológica, la precipitación y los efectos de la luz solar también contribuyen a la degradación del cianuro. Las especies de cianuro pueden ser adsorbidas sobre las superficies de los minerales o del desecho de carbono orgánico en los suelos del terraplén de un estanque, en un recubrimiento de arcilla o a lo largo de una vía de agua subterránea (Gil, 2005).

En los suelos, las bacterias asimilan y metabolizan el cianuro mediante diversas reacciones aeróbicas y anaeróbicas. En algunos casos, la combinación de estos procesos de degradación natural son suficientes para satisfacer los requisitos que reglamentan la descarga de soluciones que contienen cianuro (Gil, 2005). Las velocidades reales de degradación deben determinarse mediante ensayos empleando condiciones que imiten, los tipos de soluciones y los procesos naturales que probablemente ocurran en ese lugar (Lonsdon *et al*, 2006).

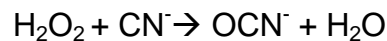
b. Tratamientos químicos

Existen varios procesos químicos para degradar el cianuro en sustancias menos tóxicas estos son (Smith et al, 1991).

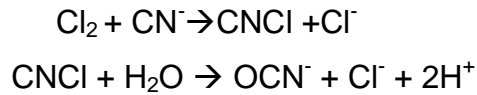
- **Adición de dióxido de azufre:** En este proceso utiliza dióxido de azufre y aire en presencia de un catalizador de cobre, para oxidar cianuro en sustancias menos tóxicas (Cianato) (Smith et al, 1991).



- **Adición de peróxido de hidrógeno:** Se aplica para tratamiento de complejos de zinc y de cadmio. Este tratamiento es similar al descrito anteriormente, su principal ventaja es que no produce lodos (Smith et al, 1991).



- **Adición de cloro:** Es el método usado tradicionalmente en la destrucción de cianuros, consiste en la adición de gas cloro a aguas residuales de elevado pH. Sus principales desventajas son: la formación de cloruro de cianógeno (gas altamente tóxico), formación de lodos y no todas las especies de cianuro son oxidadas (Smith et al, 1991).



• **Tratamientos electroquímicos:** Es conveniente cuando la concentración de cianuro es elevada y consiste en la oxidación del cianuro en el ánodo; el problema de este método es la baja conductividad que presentan algunas aguas residuales que contienen cianuro (Smith et al, 1991).

c. Tratamientos biológicos

Se emplean microorganismos los cuales convierte los cianuros libres y complejos en formas menos tóxicas. Algunas ventajas son: la destrucción de todas las formas de cianuro y no se da inhibición en la degradación por la presencia de metales pesados (Smith et al, 1991) (Akciil, 2003).

1.3. Biorremediación

La biorremediación puede definirse como el uso de organismos vivos, componentes celulares o enzimas libres con el fin de realizar una mineralización, transformación parcial o humificación de residuos o agentes contaminantes. También puede alterar el estado redox de metales (Schroeder, *et al.* 1999). Los factores que determinan la biorremediación son complejos y varían dependiendo de la aplicación, siendo, en

algunos casos, difícil distinguir entre los factores bióticos y abióticos que contribuyen en dicho proceso (Bolívar, 2004).

El tratamiento de biorremediación aplicado en suelos varía de acuerdo con las propiedades físico-químicas del contaminante y el tipo de suelo (Bolívar, 2004).

La biorremediación *in situ* se establece en el lugar donde ocurrió la contaminación y la *ex situ* se lleva a cabo retirando el suelo contaminado y trasladándolo hasta una unidad de tratamiento. En la biorremediación *in situ* existen dos estrategias: la primera es agregar nutrientes para estimular las poblaciones naturales y así aumentar su actividad para que degraden el contaminante. La segunda es introducir microorganismos exógenos para que ellos realicen la degradación (Schmidt, 2004).

Ambas estrategias se basan en la absorción de las sustancias orgánicas por los microorganismos, los cuales las utilizan como fuente de carbono y energía necesaria para sus funciones metabólicas y crecimiento (Schmidt, 2004).

Todo compuesto natural puede ser degradado si se dan las condiciones ambientales adecuadas. Esto es gracias a que los microorganismos tienen una amplia capacidad degradativa característica que les ha permitido coexistir durante mucho tiempo con una inmensa variedad de compuestos y desarrollar enzimas capaces de utilizarlos. También su elevada capacidad

reproductora les posibilita evolucionar de una forma más rápida que los organismos macroscópicos (Luque, 2005).

La estabilidad biológica de aquellos compuestos resistentes a la biodegradación, denominados recalcitrantes, está relacionada con las características estructurales de la molécula, las limitaciones fisiológicas de los microorganismos y las condiciones ambientales (Lonsdon, *et al.* 2006).

Además, la reciente liberación al medio ambiente de estos nuevos compuestos no ha permitido todavía la evolución de nuevas capacidades degradativas. Su resistencia a la degradación biológica es la responsable de que estos compuestos experimenten una rápida y amplia difusión por todo el planeta y de que sufran el fenómeno denominado bioacumulación (Lonsdon, *et al.* 2006).

La degradación biológica de cianuro aprovecha de la capacidad de ciertos grupos de microorganismos, mayormente bacterias, de utilizar compuestos cianurados como fuente de carbono y nitrógeno convirtiendo el compuesto tóxico en sustancias inocuas (Camargo, 2005).

La biodegradación de cianuro, como también se le conoce, resulta en la formación de amonio. Los microorganismos involucrados poseen varios sistemas enzimáticos específicos que les permite desarrollar en ambientes con alta concentración de cianuro. Entre los microorganismos con capacidad

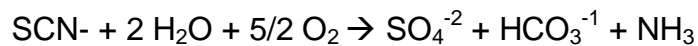
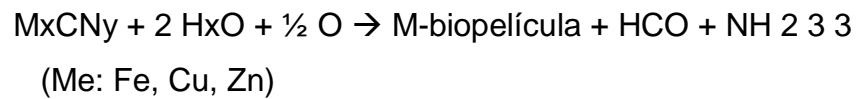
degradadora están hongos (*Fusarium*, *Hasenula*, etc) y bacterias (*E.coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Citrobacter*, *Bacillus subtilis* y otros) quienes asimilan cianuro y lo usan como fuente de nitrógeno y/o carbono, teniendo como intermediario NH_3 (Luque, 2005).

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 CO_2 y 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 NH_3 (Luque, 2005).

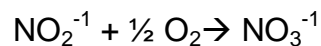
Una tercera ruta involucra la utilización de cianuro monoxigenasa para catalizar la conversión de HCN en cianato (HOCN), lo que lleva a una descomposición catalítica mediada por otra enzima, cianasa, para producir CO y NH_3 . La cianasa es inducible con el cianato mientras que la enzima cianuro monoxigenasa no lo es. Algunas cepas bacterianas transforman directamente cianuro en CO_2 y NH_3 por medio de enzima 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. (Alvares, 2005).

Primera etapa:



Segunda etapa:



Los microorganismos involucrados en el tratamiento biológico de cianuro incluyen una mezcla heterogénea de bacterias indígenas del suelo que se han adaptado a vivir en ambientes de cianuro luego de una constante y continúa exposición. Aunque el cianuro es fácilmente degradado por las bacterias aeróbicas, lo mismo no ocurre con el tiocianato que no puede ser removido fácilmente mediante procesos anaeróbicos (en ausencia de oxígeno). En suma, el tratamiento

biológico anaeróbico es un proceso más lento y más susceptible a la presencia de productos tóxicos resultantes de la exposición a otros constituyentes en el efluente (Alvares, 2005).

Como en todo sistema biológico, los factores ambientales más críticos para una buena eficacia del tratamiento biológico incluyen al pH, temperatura, niveles de oxígeno y la disponibilidad de nutrientes (Alvares, 2005).

1.3.1. Microorganismos en la biodegradación de cianuro

Los procesos químicos y físicos empleados para degradar el cianuro y sus compuestos asociados, a menudo son costosos y complejos de manejar (Lonsdon Mark; *et al.* 2006). El tratamiento biológico puede ser menos costoso que métodos químicos y físicos, pero mucho más rápido que la degradación natural. Dado que el cianuro es un producto natural (compuestos biodegradables), los tratamientos biológicos son más indicados para eliminar de los efluentes industriales. El éxito de la biodegradación depende de la presencia de microorganismos y sus capacidades fisiológicas y metabólicas para degradar los contaminantes (Lonsdon Mark; *et al.* 2006).

El tratamiento biológico se basa en la aclimatación y el mejoramiento de los microorganismos indígenas tales como las bacterias, pero la mayoría de las veces las condiciones

ambientales, principalmente la composición química, deberá ser previamente modificados.

El tratamiento biológico de cianuro es un fenómeno relativamente nuevo en la industria de la minería de oro y ha sido utilizado sólo en algunos casos (Lonsdon Mark; et al. 2006).

El cianuro puede ser metabolizado por organismos tales como, hongos y bacterias, que lo emplean como fuente de carbono y nitrógeno, por ejemplo *Bacillus ipeaeaterium* transforma cianuro de potasio en ácido aspártico, asparagina y el dióxido de carbono libre o unido al cianuro en carbonato y amoníaco, (Adams, et al., 1999). *P. pseudoalcaligenes* CECT534, bajo condiciones alcalinas, consumen el cianuro y lo transforman en amoníaco (Luque, 2005) y *Fusarium solani* IHEM 8026 degrada el cianuro a ácido fórmico (Dumestre, et al. 1997).

Una cepa bacteriana capaz de utilizar el cianuro como la única fuente de nitrógeno bajo condiciones alcalinas y acetato como fuente de carbono. ha sido aislada y clasificada como *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, además, esta bacteria tolera hasta 30 mM de cianuro libre y también pueden usar varios complejos de metal cianurado incluso en presencia de amonio o nitrato. El consumo de cianuro es un proceso de asimilación, ya que el crecimiento de bacterias fue concomitante y proporcional a la degradación del cianuro y la bacteria convierte estequiométricamente cianuro en amonio en

presencia de L-metionina-D, L-sulfoximina, un inhibidor de la sintetasa de glutamina. La bacteria fue capaz de crecer en medios alcalinos, hasta un pH inicial de 11,5; y se tolera de cianuro libre concentraciones de hasta 30 mM, lo que hace un buen candidato para el tratamiento biológico de residuos cianurados. (Luque, 2005)

Las *Pseudomonas* son los microorganismos más comúnmente reportados como degradadores de cianuro pues lo pueden convertir a amoníaco y fumarato bajo condiciones aerobias y anaerobias (kao, *et al.* 2002).

Usualmente crecen en el suelo o en superficies de aguas. Por ejemplo *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas fluorescens* pueden emplear el cianuro como fuente de nitrógeno y metabolizarlo hasta amoníaco (Kao, *et al.* 2002).

1.3.2. *Pseudomonas fluorescens*

Los miembros del género *Pseudomonas* son muy comunes en la naturaleza y se pueden aislar a partir de una gran variedad de materiales naturales. Varias cepas son conocidas por su versatilidad nutricional hacia compuestos orgánicos debajo peso molecular en medios totalmente desprovistos de factores de crecimiento orgánicos; esta capacidad, combinada con una tasa de crecimiento rápido, les permite predominar en la microflora creciente en medios naturales que tienen una

reacción próxima a la neutralidad y algo de materia orgánica en solución (Goldman, *et al.* 2009).

Las características morfológicas básicas comunes a casi todas las especies son la forma de barra recta y la presencia de uno o varios flagelos polares, la reacción de Gram es negativa, el tamaño es generalmente 0,5-1,0 x 1,5-4,0 μm .

Estos atributos morfológicos definen la "*Pseudomonas*" pero la admisión al género *Pseudomonas* requiere de algunas propiedades fisiológicas adicionales, tales como un metabolismo energético puramente respiratorio y nutricional del tipo quimioorganotrofas. Estas propiedades, determinan la importancia de estos organismos como participantes en el ciclo del carbono en la naturaleza y, por lo tanto, en su inclusión en los proyectos de biorremediación (Goldman, *et al.* 2009).

Crecimiento a 4 y 41°C se ha determinado para un gran número de cepas. Especies de *Pseudomonas* son típicamente mesófilos, y algunos, como el *P. fluorescens*, puede crecer a 4°C y puede ser en ocasiones identificados en la flora psicrófilas responsables de deterioro de los alimentos. *Pseudomonas aeruginosa* no crecen a 4 °C, pero puede crecer a 41°C (Goldman, *et al.* 2009).

Pseudomonas fluorescences constituyen un grupo diverso de bacterias que por lo general se puede distinguir de otras

Pseudomonas por su capacidad de producir pigmento verde amarillo soluble en agua (Trivedi, 2009).

Ellos son conocidos por producir un gran número de metabolitos secundarios, que pueden afectar el crecimiento y la salud de las plantas. *Pseudomonas fluorescens* tienen requerimientos nutricionales simples, y esto se refleja en la relación abundancia de estos organismos en la naturaleza (Trivedi, 2009).

1.3.4. Factores que afectan la actividad microbiana en la biorremediación

a. Efecto del pH en el cianuro

Desde el punto de vista químico, el tratamiento biológico de efluentes industriales contaminados con cianuro requiere un pH alcalino con el fin de evitar la formación de cianuro de hidrogeno (HCN) volátil. Trabajos anteriores han demostrado la degradación microbiana de cianuro en condiciones neutras o acidez, Barclay, en 1998 reporta una cepa de *Fusarium solani* capaz de degradar complejos metal-cianuro bajo condiciones de pH neutro y ácido; Richardson. en 2000 reporta que la respiración bacteriana puede ocurrir tanto a pH muy ácidos como a pH muy alcalinos. Las referencias que describen biodegradación de cianuro a pH alcalino son escasas, uno de ellos se refiere al moho *Fusarium solani* que utiliza cianuro como única fuente de nitrógeno (Dumestre, et al. 1997). La

bacteria *Burkholderia cepacia* es capaz de metabolizar y consumir cianuro de manera óptima a un pH de 10, pero necesita glucosa como fuente de carbono y es relativamente sensible a los iones metálicos, tales como el hierro y el cobre (Adjei, et al. 1999).

b. Efecto de la temperatura en el cianuro

Dentro del género *Pseudomonas* hay un rango de crecimiento que va desde los 4°C como *P. fluorescens* hasta los 41°C como *P. aeruginosa*, sin embargo las especies de *Pseudomonas* típicamente mesofilas son las que se encuentran en el medio ambiente en muestras de agua; suelo cuyo óptimo de crecimiento está entre los 25 a 30 °C (Goldman, et al.2009). Mientras que la temperatura tiene un efecto significativo en las especies de cianuros libres las disminuciones de temperatura aumenta la disociación de HCN (Dzombak, et al. (2006).

CAPÍTULO II

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Material en estudio

Solución de relave cianurado, procedente de la empresa minera EMINSOL (EMPRESA MINERA SOLITARIO) ubicada en Santa Cruz, Bolivia; proporcionada por la Facultad de metalurgia; de la cual se tomó un volumen de 2 litros para los procesos de aislamiento de *Pseudomonas fluorescens*.

2.2. Lugar de experimentación

- Laboratorio de Micología y Virología de la E.A.P. de Biología Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann.

- Laboratorio de Mineralurgia, Laboratorio de Análisis Químico y Laboratorio de Biohidrometalurgia de la E.A.P. de Ingeniería Metalurgia de la Facultad de Ingeniería Metalúrgica de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann.

2.3. Diseño experimental

Diseño Box-Behnken

Se usó el diseño Box Behnken formado por la combinación de factoriales 2^k con diseño de bloques incompletos.

Siguiendo una plantilla a escala real (ver cuadro 2) basada en la plantilla a escala codificada del diseño Box-Behnken (ver cuadro 1), este diseño tuvo tres variables y tres niveles en cada variable: nivel mínimo (-), nivel intermedio (0), nivel máximo (+).

Para este diseño se empleó el programa Minitad 16, para estimar las diferencias significativas del efecto de las variables sobre la biodegradación de cianuro (Montgomery, 2005).

Este diseño es usado para medir y compara dos o más variables para determinar el efecto en una variable dependiente. Son ampliamente usados en la investigación industrial, los cuales son generalmente realizados en las etapas iniciales de un proyecto.

Cuadro 1: Plantilla de prueba según el diseño experimental Box-Behnken (MINITAB 16) a escala codificada y natural de los ensayos biorremediación en biorreactores con *Pseudomonas fluorescens* como inóculo microbiano.

Nº de Experimentos	ESCALA CODIFICADA			ESCALA NATURAL			CONCENTRACIÓN DEL INÓCULO MICROBIANO
	VARIABLES			VARIABLES			
	X ₁	X ₂	X ₃	T (°C)	pH	[CN]	
1	1	1	0	30	10,5	1000	2x10 ⁷ bact./mL
2	-1	-1	0	22	9,5	1000	2x10 ⁷ bact./mL
3	1	0	-1	30	10,0	500	2x10 ⁷ bact./mL
4	1	0	1	30	10,0	1500	2x10 ⁷ bact./mL
5	-1	0	-1	22	10,0	500	2x10 ⁷ bact./mL
6	0	0	0	26	10,0	1000	2x10 ⁷ bact./mL
7	0	0	0	26	10,0	1000	2x10 ⁷ bact./mL
8	0	1	1	26	10,5	1500	2x10 ⁷ bact./mL
9	0	-1	1	26	9,5	1500	2x10 ⁷ bact./mL
10	0	1	-1	26	10,5	500	2x10 ⁷ bact./mL
11	0	0	0	26	10,0	1000	2x10 ⁷ bact./mL
12	-1	0	1	22	10,0	1500	2x10 ⁷ bact./mL
13	1	-1	0	30	9,5	1000	2x10 ⁷ bact./mL
14	-1	1	0	22	10,5	1000	2x10 ⁷ bact./mL
15	0	-1	-1	26	9,5	500	2x10 ⁷ bact./mL

Leyenda: X₁, X₂, X₃ = Variables de estudio, -1 = Nivel Mínimo. 0 = Nivel Intermedio, +1 = Nivel Máximo, T (C°) = temperatura, [CN] = concentración de cianuro, Pf= *Pseudomonas fluorescens*.

Fuente: Propia basada en el diseño experimental de Box Behnken

2.4. Variables de experimentación:

- **Variable independiente**

- Temperatura : 22, 26 y 30 °C.
- pH : 9,5; 10 y 10,5
- Concentración de cianuro : 500, 1000 y 1500 ppm.

- **Variable dependiente**

- Eficiencia de degradación de cianuro por *Pseudomonas fluorescens*.

2.4.1. Población de estudio

La población de estudio fueron las soluciones de relaves mineros cianurados procedentes de la minería aurífera.

2.4.2. Muestra de estudio

La muestra de estudio fue la concentración de cianuro, encontrada en la alícuota tomada de los biorreactores aireados por día de tratamiento para la degradación de cianuro.

2.5. Aislamiento e identificación de *Pseudomonas fluorescens*

2.5.1. Suspensión de la muestra de relave

Se incubó 100 mL de relave cianurado en un Erlenmeyer con 200 mL de agua estéril agitándolo a 140 rpm durante una hora en un agitador orbital a temperatura ambiente, luego se dejó reposar por 5 minutos (Rainey, 2006).

2.5.2. Enriquecimiento de la suspensión de la muestra de relave

Se tomó 10 mL de la suspensión de la muestra de relave y se incubó en un matraz con 90 mL de agua peptonada a pH de 9,5 con 75 ppm de cianuro, por 48 horas a 30 °C, luego del cual se procedió al aislamiento de las colonias (Rainey, 2006).

2.5.3. Aislamiento de colonias

Se preparó medio agar glutamato (anexo 1). Este medio se vertió 15 mL en placas Petri, se dejó solidificar, luego se tomó una muestra del cultivo de enriquecimiento y sembrando con ayuda de una aza de Kolle, las placas fueron incubadas a temperatura de 37 °C durante 24 h; luego las colonias obtenidas fueron sembradas en viales y preservadas a 5°C para su conservación y posterior identificación (Restrepo, 2006 y Garcés. et al. 2006).

2.5.4. Identificación de las colonias aisladas

Se procedió a la identificación utilizando la serie bioquímica propuesta por el Manual de Bergey, para confirmar que el aislado bacteriano nativo fue compatible con *Pseudomonas fluorescens*. La identificación bioquímica estuvo comprendida por la determinación de varias características fenotípicas del aislado bacteriano nativo (Cuadro 3). Las pruebas realizadas para la identificación fueron:

a. Observación microscópica del movimiento de la bacteria

Se sembró la colonia aislada en un tubo con caldo nutritivo que se incubó a 37 °C por 24 horas, luego se tomó una gota para la observación microscópica de la muestra en fresco. En la cual con ayuda del microscopio se procedió a determinar si había movimiento o no de la bacteria (Ara, 2009).

b. Coloraciones

Se realizó la coloración de Leifson para la observación de flagelos (anexo 2) (Ara, 2009). En el microscopio de campo claro se procedió a determinar si había o no presencia de flagelos en la bacteria.

c. Prueba de crecimiento a 41 y 4 °C

Para esta prueba se sembró la colonia en dos tubos con caldo nutritivo y se incubó a dos temperaturas diferentes uno a 41 °C, el otro a 4 °C, finalmente se procedió a determinar si había o no diferencia de crecimiento de la bacteria en ambas temperaturas después de una incubación de 24 horas (Brenner, 2005).

d. Prueba de licuefacción de la gelatina

Para la realización de la prueba de licuefacción de la gelatina, se preparó dos tubos con gelatina una se sembró con aza en punta por puntura profunda, y la otra no se sembró luego estas se incubaron por 24 horas a 37 °C, y se procedió a observar si la gelatina se licuó o no, en los dos tubos (Brenner, 2005).

e. Prueba de la catalasa

Se tomó unas gotas de peróxido de hidrógeno y se colocó en un porta objeto, luego se tomó una muestra con el asa de kolle y se mezcló con el peróxido de hidrogeno en el porta objeto, se procedió a ver si se formaba o no burbujas. La producción de burbujas indicaba catalasa positivo para la bacteria (Brenner, 2005).

Cuadro 2: Características fenotípicas de algunas especies de *Pseudomonas*.

Características	P. aeruginosa	P. fluorescens	P. putida	P. pseudoalcaligenes
Número de flagelos	1	>1	>1	1
Licuación de gelatina	+	+	-	D
El crecimiento en 4°C	-	+	+	+
El crecimiento en 41°C	+	-	-	+

Leyenda: +: Positivo, -: Negativo, D: Resultado no confirmado

Fuente: Brenner,D, 2005

2.6. Obtención del inóculo bacteriano para la fermentación

2.6.1. Activación y adaptación de *P. fluorescens* para la tolerancia del cianuro

Se sembró con ayuda de un aza de Kolle la cepa de *P. fluorescens* en 100 mL de caldo peptonado con pH 9,5 y 50 ppm de cianuro de sodio y se incubó durante 48 horas a 37 °C, luego se tomó 5 mL de esta suspensión de *P. fluorescens* y se sembró en 25 mL de medio base sales minerales glucosa pH 9,5 con 75 ppm

de cianuro de sodio incubándose a 37 °C durante 48 horas. Se continuó realizando siembras sucesivas desde el medio de cultivo con 75 ppm de cianuro de sodio, hacia otro medio con cianuro pasando por 100, 500, 1000 hasta 1500 ppm de cianuro de sodio para efecto de conseguir la adaptación de *Pseudomonas* a mayores concentraciones de cianuro.

Para cada resiembra del proceso de adaptación, se verificó el crecimiento realizando observación en fresco en el microscopio y sembrándolos en agar glutamato para observar el crecimiento de las colonias características.

2.7. Producción del inóculo bacteriano

Se sembró *P. fluorescens* activada y adaptada al cianuro en 25 mL de medio base sales minerales glucosa (MBSMG) con 75 ppm de cianuro de sodio e incubó durante 48 horas a 37 °C; luego, el volumen total del medio incubado se mezcló con 50 mL de medio de cultivo nuevo e incubó en las mismas condiciones que la de 25 mL y se continuó haciendo siembras sucesivas posteriormente para con 100 y 250 mL de medio base sales minerales glucosa para efecto de obtener 250 mL de inóculo masificado hasta una concentración de 2×10^7 bacterias/mL. El conteo de bacterias se hizo con ayuda de una cámara de Neubauer (Anexo 7) (Díaz, 2007) (Escalante, 2002) (Carrera, (2009).

2.8. Experimentación en biorreactores de la biodegradación del cianuro

2.8.1. Cargado de los medios de fermentación a los biorreactores

Se acondicionaron 4 biorreactores de forma cilíndrica de un litro de capacidad estos fueron estandarizados y llenados con 700 mL de relave cianurado esterilizado en autoclave y 105 mL (15 % del volumen total del biorreactor) de inóculo masificado con concentraciones de 2×10^7 bacterias/mL.

2.8.2. Inicio de la fermentación en los biorreactores aireados

Se incubó los biorreactores según el nivel de pH, concentración de cianuro y temperatura considerados en el diseño de Box Behnken. El pH fue ajustado en el biorreactor agregando hidróxido de sodio al 35 % y se verificó con un pH metro digital. La concentración del cianuro en el biorreactor fue establecida agregando cianuro de sodio sólido, en la cantidad correspondiente a los ppm (partes por millón) establecido en el diseño de Box Behnken. Estas concentraciones fueron verificadas utilizando el método titulométrico con nitrato de plata. Para el nivel de temperatura de incubación, los biorreactores fueron incubados en la estufa incubadora de acuerdo a la temperatura indicada en el diseño de Box Behnken.

2.9. Evaluación de la biodegradación del cianuro

Se tomó muestras diarias de 5 mL de los biorreactores en condiciones de esterilidad. En estas muestras se evaluó la concentración del cianuro usando el método titulométrico (ver Anexo 06).

2.9.1. Método titulométrico para la cuantificar la concentración de cianuro

Se mezcló 5 mL de la solución muestra contenida en un matraz de 50 mL con dos gotas de indicador Ioduro de potasio (IK) (agente indicador del término de la titulación).

Luego se llenó una bureta con solución de nitrato de plata (AgNO_3) 0,025N; a continuación se añadió lentamente la solución de AgNO_3 en el matraz con la muestra hasta que así todo el nitrato de plata formó complejos con todo el cianuro libre presente en la solución muestra, quedando un mínimo exceso de AgNO_3 para que el indicador de Ioduro de potasio virara a un color amarillo tenue que indicó el término de la titulación.

Finalmente, el gasto de AgNO_3 sirvió para los cálculos de determinación de cianuro que estuvo presente en la muestra titulada (Anexo 6).

2.10. Determinación de la eficiencia y tasa de degradación de cianuro por *Pseudomonas fluorescens*

2.10.1. Eficiencia en la degradación

Se hizo para cada uno de los 15 experimentos del diseño de Box- Behnken. Para esto se usó la siguiente fórmula.

$$E (\%) = [(C_i - C_f) / C_i] \times 100$$

E = eficiencia,

C_i= concentración del cianuro al inicio del experimento,

C_f= concentración final del cianuro al final del experimento

La concentración final del cianuro obtenida experimentalmente al final del experimento es la que se utilizó para encontrar la eficiencia de remoción experimental, esta eficiencia de remoción sirvió para encontrar, usando el programa estadístico Minitap 16, los coeficientes de regresión del medio matemático algebraico (fórmula polinómica cuadrática) que representó al experimento:

Modelo matemático de la ecuación polinomial cuadrática según el diseño de BOX-BEHNKEN:

$$Y = a_0 + a_1 T + a_2 \text{pH} + a_3 [\text{CN}] + a_4 (T) (\text{pH}) + a_5 (T) [\text{CN}] + a_6 (\text{pH}) [\text{CN}] + a_7 T^2 + a_8 \text{pH}^2 + a_9 [\text{CN}]^2$$

Dónde,

Y = Variable dependiente (Tasa de degradación)

T, pH, [CN] = Son las variables independientes (temperatura, pH y concentración de cianuro)

a₀ = Coeficiente de regresión del punto inicial

a₁, a₂, a₃, = Coeficientes lineales

a₄, a₅, a₆, = Coeficientes de interacción de segundo orden

a₇, a₈, a₉, = Coeficientes cuadráticos

Este modelo matemático algebraico a su vez sirvió para que en él se reemplazara los valores de temperatura, pH y concentración de cianuro de cada uno de los experimentos del diseño Box-Behnken para determinar en cada experimento la eficiencia de degradación de cianuro estadístico.

Establecido los valores de eficiencia de degradación de cianuro estadístico, el valor más alto fue considerado la máxima eficiencia de degradación de cianuro estadístico y sus correspondientes valores de temperatura, pH y concentración

de cianuro en el cual se realizó el experimento que arrojó la máxima eficiencia como los valores óptimos de temperatura, pH y concentración de cianuro, para estos experimentos

2.10.2. Tasa de degradación de cianuro

También se consideró la tasa de degradación que determinó la cantidad de cianuro promedio que se degradó en un día de tratamiento. Se aplicó para cada uno de los 15 ensayos, mediante la siguiente fórmula.

$$TD = E / D$$

TD = tasa de degradación, E = eficiencia, D = total de días del tratamiento

2.10.3. Determinación de los valores óptimos

Para la determinación de los valores óptimos se hizo uso de la ecuación polinómica cuadrática del diseño de Box Behnken.

CAPÍTULO III RESULTADOS

3.1. *Pseudomonas fluorescens* nativa aislada e identificada de los relaves mineros

Se aisló e identificó la cepa nativa de *Pseudomonas fluorescens* de un relave minero cianurado realizando pruebas morfológicas, de coloración y bioquímicas (cuadro 3).

Cuadro 3: Pruebas realizadas para la bacteria aislada que se reconoció como *Pseudomonas fluorescens*.

Características	Resultados
Morfología	Bacilo
Tinción Gram	-
Movilidad	+
Crecimiento a 41°C	-
Crecimiento a 4°C	+
Licuefacción de la gelatina	+
Catalasa	+

Fuente: Brenner, D. 2005

En la foto 2 se aprecia los pasos seguidos para el proceso de aislamiento de las colonias nativas de *Pseudomonas fluorescens*

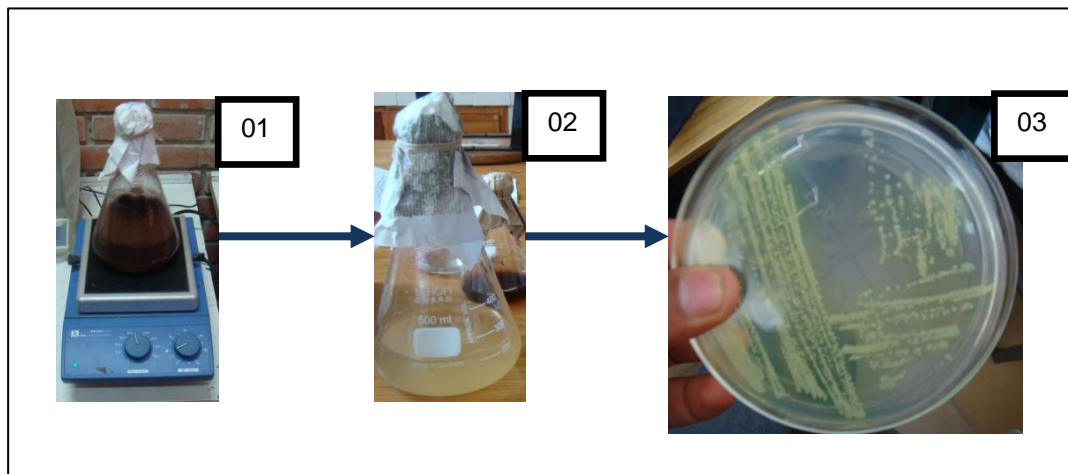


Foto 2 : Aislamiento de *Pseudomonas fluorescens*: (01) Suspensión de la muestra de relave minero con agitación a 140 rpm por una hora; (02) Enriquecimiento de la muestra de relave e incubación por 48 horas a 30 °C en caldo peptona con 75 ppm de cianuro de sodio, (03) Aislamiento de colonias procedentes de la muestra enriquecida en agar glutamato.

Fuente: Propia.

3.2. Pruebas bioquímicas para *Pseudomonas fluorescens*

Luego de obtener las colonias del proceso de aislamiento se procedió a realizar las pruebas bioquímicas respectivas para las colonias teniendo como resultados, para las pruebas de catalasa, licuefacción de gelatina, dieron como resultados positivo; para la prueba de crecimiento a 42 °C resultado negativo (Foto 3); y para pruebas morfológicas muestras del cultivo líquido, observación de formas bacilares con presencia de flagelo mediante la coloración de Leifson (Foto 4).

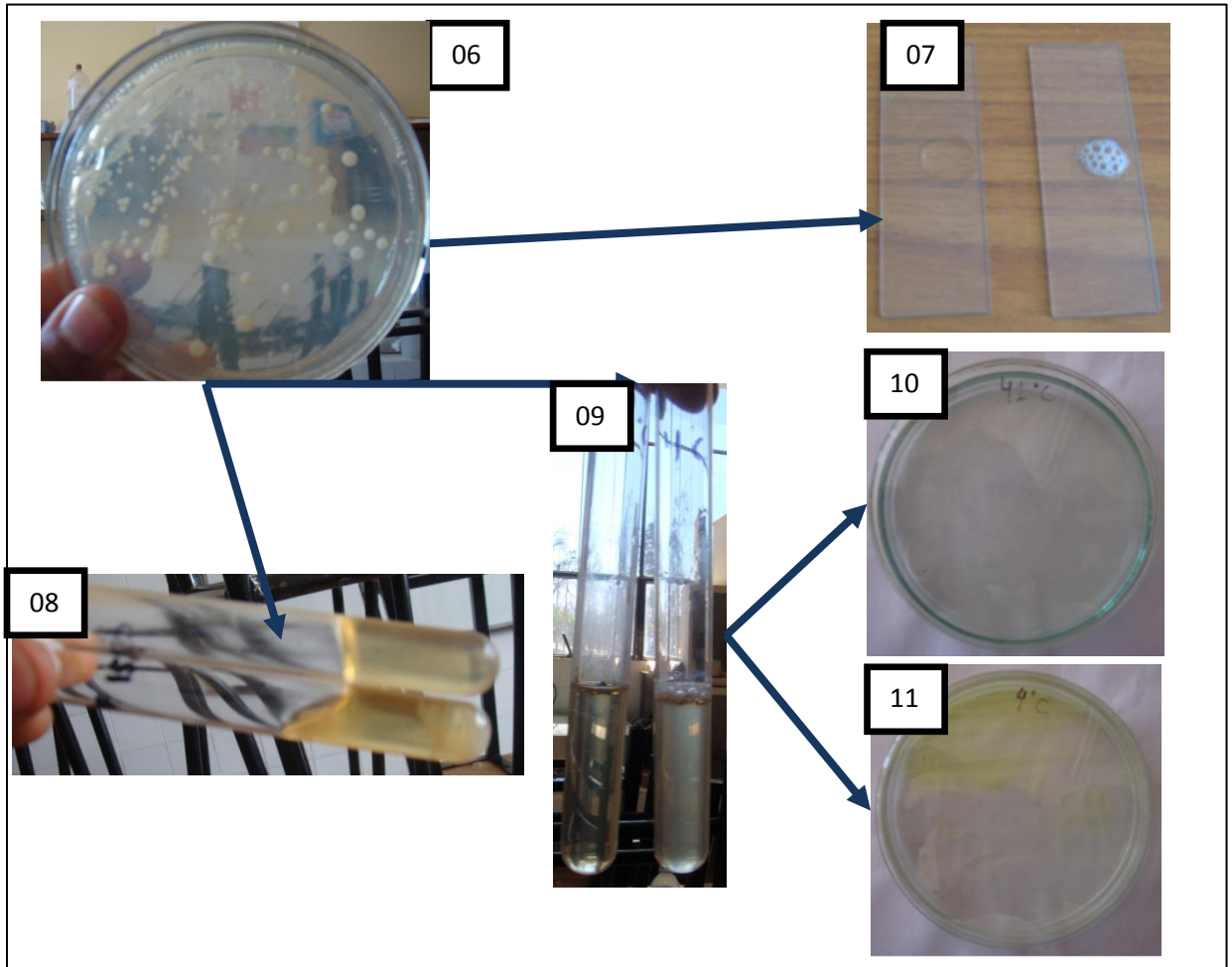


Foto 3: Pruebas de identificación realizadas a la bacteria aislada: (6) Colonias aisladas; (7) Prueba de catalasa positiva para identificación de *Pseudomonas fluorescens*; (8) prueba de licuefacción de gelatina luego de 24 horas; (09) tubos incubados a 42 y 4 C° con la bacteria; (10) bacterias incubada a 42°C en agar glutamato; (11) bacterias incubada a 4 °C sembrada en agar glutamato.

Fuente: Propia

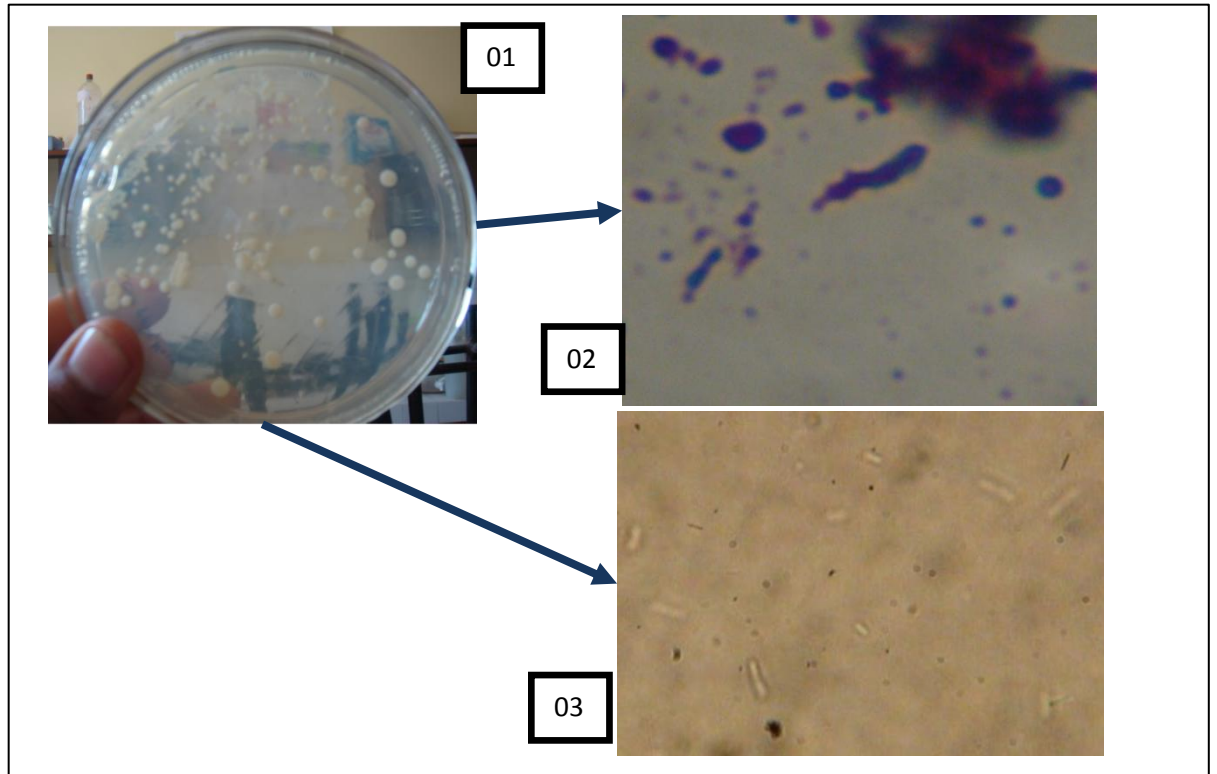


Foto 4: Aislamiento y pruebas bioquímicas: (1) colonias aisladas; (2) coloración de flagelos por el método de Leifson; (3) vista microscópica de un preparado en fresco de *Pseudomonas fluorescens*.

Fuente: Propia

3.3. Eficiencia de remoción de cianuro experimental

La máxima eficiencia obtenida de forma experimental fue de 96.67 % correspondiente al experimento número 09 a 26°C, pH 9,5 y concentración de cianuro de 1500 ppm (Cuadro 4)(Cuadro 5).

Cuadro 4: Valores de concentración inicial, final y de degradación de cianuro en cada uno de los experimentos del diseño de Box Behnken con *Pseudomonas fluorescens*.

Nº de Experimentos	VARIABLE INDEPENDIENTE			VARIABLE. DEPENDIENTE.	
	Temp (°C)	pH	Concentración de cianuro inicial (ppm)	Concentración de cianuro final (ppm)	Concentración de cianuro degradado (ppm)
1	30	10,5	1000	200	800
2	22	9,5	1000	225	775
3	30	10	500	200	300
4	30	10	1500	200	1300
5	22	10	500	150	350
6	26	10	1000	100	900
7	26	10	1000	100	900
8	26	10,5	1500	150	1350
9	26	9,5	1500	50	1450
10	26	10,5	500	50	450
11	26	10	1000	100	900
12	22	10	1500	250	1250
13	30	9,5	1000	50	950
14	22	10,5	1000	350	650
15	26	9,5	500	25	475

Fuente: Propia basada en análisis estadístico

Cuadro 5: Eficiencia de remoción experimental de cianuro obtenidos para cada uno de los experimentos del diseño de Box-Benhken

Nº de Experimentos	VARIABLE INDEPENDIENTE			VARIABLE DEPENDIENTE
	Temperatura (°C)	pH	Concentración de cianuro (ppm)	Eficiencia de remoción experimental de cianuro (%)
1	30	10,5	1000	80,00
2	22	9,5	1000	77,50
3	30	10	500	60,00
4	30	10	1500	86,67
5	22	10	500	70,00
6	26	10	1000	90,00
7	26	10	1000	90,00
8	26	10,5	1500	90,00
9	26	9,5	1500	96,67
10	26	10,5	500	90,00
11	26	10	1000	90,00
12	22	10	1500	83,33
13	30	9,5	1000	95,00
14	22	10,5	1000	65,00
15	26	9,5	500	95,00

Fuente: Propia basada en análisis estadístico

3.4. Eficiencia de remoción de cianuro estadísticamente

La fórmula matemática algebraica que se utilizó para este diseño fue una ecuación polinómica algebraica cuadrática (cuadro 6) de Box-Behnken.

Cuadro 6: Fórmula polinómica cuadrática para la obtención de la eficiencia de remoción de cianuro estadístico en el modelo matemático algebraico de la experimentación

Modelo matemático algebraico
$Y = a_0 + a_1 T + a_2 \text{pH} + a_3 [\text{CN}] + a_4 (T) (\text{pH}) + a_5 (T) [\text{CN}] + a_6 (\text{pH}) [\text{CN}] + a_7 T^2 + a_8 \text{pH}^2 + a_9 [\text{CN}]^2$

Leyenda: Y= eficiencia; $a_0, a_1, a_2, a_3, a_4, a_5, a_6, a_7, a_8, a_9$ = coeficientes de la fórmula algebraica; T= temperatura, [CN]= concentración de cianuro.

En el cuadro 7, Se muestra los datos obtenidos por reemplazo de los valores de temperatura (T°), pH y concentración de cianuro ($[CN]$) de la eficiencia experimental, en los términos del modelo matemático algebraico para cada uno de los experimentos del diseño de Box-Behnken para que posteriormente, con aplicación de la regresión lineal a todos estos datos, pudieran ser determinados los coeficientes de la fórmula polinómica cuadrática.

Cuadro 7: Datos obtenidos por reemplazo de valores de eficiencia de remoción de cianuro experimental, temperatura, pH y concentración de cianuro en la fórmula polinómica cuadrática que se tuvo para cada uno de los experimentos del diseño de Box Behnken

Nº	T	pH	[CN]	pH*T	T*[CN]	pH*[CN]	T ²	pH ²	[CN] ²	Eficiencia experimental
1	30	10,5	1000	315	30000	10500	900	110,25	1000000	80,00
2	22	9,5	1000	209	22000	9500	484	90,25	1000000	77,50
3	30	10	500	300	15000	5000	900	100	250000	60,00
4	30	10	1500	300	45000	15000	900	100	2250000	86,67
5	22	10	500	220	11000	5000	484	100	250000	70,00
6	26	10	1000	260	26000	10000	676	100	1000000	90,00
7	26	10	1000	260	26000	10000	676	100	1000000	90,00
8	26	10,5	1500	273	39000	15750	676	110,25	2250000	90,00
9	26	9,5	1500	247	39000	14250	676	90,25	2250000	96,67
10	26	10,5	500	273	13000	5250	676	110,25	250000	90,00
11	26	10	1000	260	26000	10000	676	100	1000000	90,00
12	22	10	1500	220	33000	15000	484	100	2250000	83,33
13	30	9,5	1000	285	30000	9500	900	90,25	1000000	95,00
14	22	10,5	1000	231	22000	10500	484	110,25	1000000	65,00
15	26	9,5	500	247	13000	4750	676	90,25	250000	95,00

Leyenda: T= temperatura, [CN]= concentración de cianuro, pH= potencial de hidrogeniones.

En el cuadro 8 se muestra los coeficientes obtenidos mediante la regresión lineal.

Cuadro 8: Coeficientes de regresión del modelo matemático algebraico obtenidos para la eficiencia de degradación de cianuro, obtenido con el paquete estadístico Minitab 16

Coeficientes de los términos del modelo matemático algebraico	Términos del modelo matemático algebraico	Coeficientes
a₀	Constante	954,40
a₁	T	48,64
a₂	pH	-291,66
a₃	[CN]	-0,01
a₄	pH*T	-0,31
a₅	T x [CN]	0,0016
a₆	pH x [CN]	-0,0017
a₇	T²	-0,89
a₈	pH²	14,58
a₉	[CN]²	-2,92E-06

Leyenda: T = temperatura, pH = potencial de hidrogeniones, [CN]= concentración de cianuro.

Fuente: Propia basada en análisis estadístico

En el cuadro 9 se muestra la ecuación del modelo matemático algebraico estadístico de la eficiencia de degradación de cianuro obtenido por reemplazo de los valores obtenidos por regresión lineal de los coeficientes de regresión en el modelo matemático algebraico de la experimentación.

Cuadro 9: Fórmula polinomial cuadrática estadística obtenida por reemplazo de los valores de los coeficientes de regresión en el modelo matemático algebraico de la experimentación

Modelo matemático algebraico
$Y = a_0 + a_1 T + a_2 \text{pH} + a_3 [\text{CN}] + a_4 (T) (\text{pH}) + a_5 (T) [\text{CN}] + a_6 (\text{pH}) [\text{CN}] + a_7 T^2 + a_8 \text{pH}^2 + a_9 [\text{CN}]^2$

Modelo matemático algebraico estadístico
$Y = 954.40 + 48.64 T - 291.66 \text{pH} - 0.01 [\text{CN}] - 0.31 (T) (\text{pH}) + 0.0016 (T) [\text{CN}] - 0.0017 (\text{pH}) [\text{CN}] - 0.89 T^2 + 14.58 \text{pH}^2 - 2.92E^{-06} [\text{CN}]^2$

Fuente: Propia Propia basada en análisis estadístico

En el cuadro 10 se observa las eficiencias estadísticas y las variables independientes según la fórmula polinómica cuadrática.

Cuadro 10: Eficiencia de degradación de cianuro estadística obtenida aplicando la ecuación polinómica cuadrática estadística a cada uno de los experimentos del diseño de Box behnken

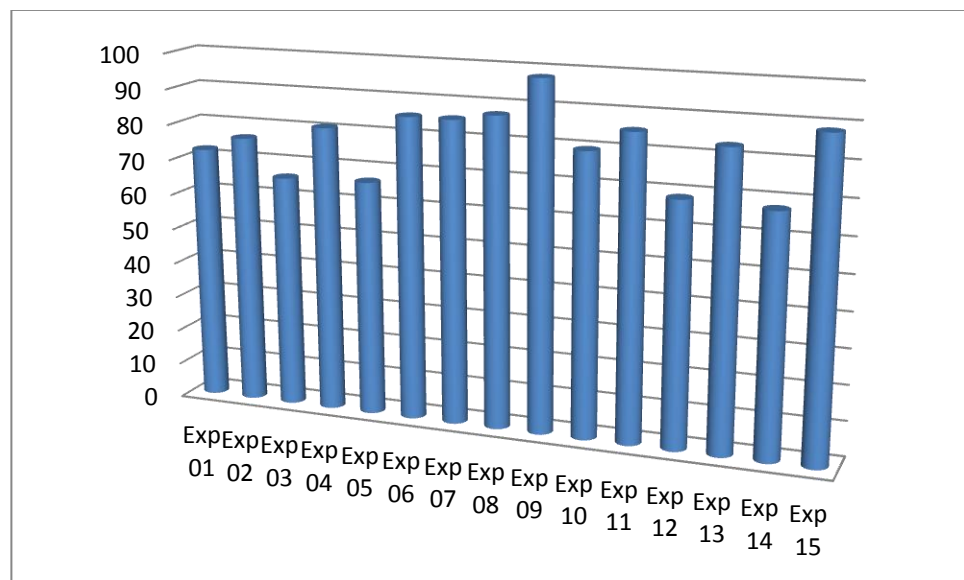
Nº de Experimentos	T °C	pH	[CN] ppm	Eficiencia de degradación de cianuro estadística (%)
1	30	10,5	1000	72,35
2	22	9,5	1000	76,382
3	30	10	500	65,95
4	30	10	1500	80,95
5	22	10	500	66,622
6	26	10	1000	85,608
7	26	10	1000	85,608
8	26	10,5	1500	87,503
9	26	9,5	1500	98,113
10	26	10,5	500	79,753
11	26	10	1000	85,608
12	22	10	1500	68,822
13	30	9,5	1000	83,35
14	22	10,5	1000	67,862
15	26	9,5	500	88,663

Leyenda: T = temperatura, pH = potencial de hidrogeniones, [CN]= concentración de cianuro.

Fuente: Propia basada en análisis estadístico

3.5. Variables óptimas y máximos valores de eficiencia de degradación de cianuro estadístico

En el cuadro 11 se observa que las variables óptimas para la máxima eficiencia de degradación de cianuro fueron, para la temperatura 26 °C, pH 9,5 y concentración de cianuro 1500 ppm de NaCN correspondientes al experimento número 9, como se observa en el cuadro 10 y la figura 3.



Gráfica 3: Máximos valores de eficiencia de degradación de cianuro según el diseño experimental de Box-Behnken

Cuadro 11: Valores óptimos de temperatura pH y concentración de cianuro para la máxima eficiencia de degradación de cianuro establecida en la experimentación con *Pseudomonas fluorescens*

Temperatura	pH	[CN] ppm	Máxima eficiencia de degradación de cianuro estadístico
26	9,5	1500	98,113 %

3.6. Tasa de remoción de cianuro experimental y estadístico

La máxima tasa de remoción de cianuro experimental fue de 13,57 (%/días) encontrado en el experimento 15 a 26°C, pH 9,5 y concentración de cianuro de 500 ppm en un tiempo de 7 días, (Cuadro 12).

Cuadro 12: Tasa de remoción experimental de cianuro obtenidos para cada uno de los experimentos del diseño de Box-Benhken

Nº Experimentos	VARIABLE INDEPENDIENTE			Eficiencia (%)	Días	Tasa de degradación experimental (%/día)
	T (°C)	pH	[CN] (ppm)			
1	30	10,5	1000	80,00	11	7,27
2	22	9,5	1000	77,50	9	8,61
3	30	10	500	60,00	8	7,5
4	30	10	1500	86,67	9	9,62
5	22	10	500	70,00	11	6,36
6	26	10	1000	90,00	9	10
7	26	10	1000	90,00	9	10
8	26	10,5	1500	90,00	8	11,25
9	26	9,5	1500	96,67	12	8,05
10	26	10,5	500	90,00	12	7,5
11	26	10	1000	90,00	9	10
12	22	10	1500	83,33	12	6,94
13	30	9,5	1000	95,00	8	11,87
14	22	10,5	1000	65,00	12	5,42
15	26	9,5	500	95,00	7	13,57

Leyenda: T= temperatura, [CN]=concentración de cianuro

Fuente: Propia basada en análisis estadístico

3.7. Tasa de remoción de cianuro estadísticamente

La fórmula matemática algebraica que se utilizó para este diseño de Box-Behnken fue una ecuación polinómica cuadrática (Cuadro 13)

Cuadro 13: Fórmula polinómica cuadrática para la obtención de la tasa de remoción de cianuro estadístico en el modelo matemático algebraico de la experimentación

Modelo matemático algebraico
$Y = a_0 + a_1 T + a_2 \text{pH} + a_3 [\text{CN}] + a_4 (T) (\text{pH}) + a_5 (T) [\text{CN}] + a_6 (\text{pH}) [\text{CN}] + a_7 T^2 + a_8 \text{pH}^2 + a_9 [\text{CN}]^2$

Leyenda: Y= eficiencia; $a_0, a_1, a_2, a_3, a_4, a_5, a_6, a_7, a_8, a_9$ = coeficientes de la fórmula algebraica; T= temperatura, [CN]= concentración de cianuro.

En el cuadro 14 se muestra los datos obtenidos por reemplazo de los valores de temperatura (T), pH y concentración de cianuro ([CN]) y de tasa experimental en los términos del modelo matemático algebraico para cada uno de los experimentos del diseño de Box-Behnken para que posteriormente con aplicación de la regresión lineal a todos estos datos pudieran ser determinados los coeficientes de la fórmula polinómica cuadrática.

Cuadro 14: Datos obtenidos por reemplazo de valores de tasa de remoción de cianuro experimental, temperatura, pH y concentración de cianuro en la fórmula polinómica cuadrática que se tuvo para cada uno de los experimentos del diseño de Box-Behnken

Nº	T	pH	[CN]	pH*t	T*[CN]	pH*[CN]	T ²	pH ²	[CN] ²	Tasa de experimental (%/día)
1	30	10,5	1000	315	30000	10500	900	110,25	1000000	7,27
2	22	9,5	1000	209	22000	9500	484	90,25	1000000	8,61
3	30	10	500	300	15000	5000	900	100	250000	7,5
4	30	10	1500	300	45000	15000	900	100	2250000	9,62
5	22	10	500	220	11000	5000	484	100	250000	6,36
6	26	10	1000	260	26000	10000	676	100	1000000	10
7	26	10	1000	260	26000	10000	676	100	1000000	10
8	26	10,5	1500	273	39000	15750	676	110,25	2250000	11,25
9	26	9,5	1500	247	39000	14250	676	90,25	2250000	8,05
10	26	10,5	500	273	13000	5250	676	110,25	250000	7,5
11	26	10	1000	260	26000	10000	676	100	1000000	10
12	22	10	1500	220	33000	15000	484	100	2250000	6,94
13	30	9,5	1000	285	30000	9500	900	90,25	1000000	11,87
14	22	10,5	1000	231	22000	10500	484	110,25	1000000	5,42
15	26	9,5	500	247	13000	4750	676	90,25	250000	13,57

Legenda: T= temperatura, [CN]= concentración de cianuro, pH= potencial de hidrogeniones.

En el cuadro 15 se muestran los coeficientes obtenidos mediante regresión lineal.

Cuadro 15: Coeficientes de regresión del modelo matemático algebraico obtenidos para la tasa de degradación de cianuro estadístico con el paquete estadístico Minitap 16

Coeficientes de los términos del modelo matemático algebraico	Términos del modelo matemático algebraico	Coeficientes
a_0	Constante	147,23
a_1	T	8,66
a_2	pH	-38,55
a_3	[CN]	-0,095
a_4	pH*T	-0,17
a_5	T x [CN]	0,00019
a_6	pH x [CN]	0,0092
a_7	T^2	-0,131
a_8	pH^2	1,56
a_9	$[CN]^2$	-1,19E-06

Leyenda: T = temperatura, pH = potencial de hidrogeniones, [CN]= concentración de cianuro.

Fuente: Propia basada en análisis estadístico

Se muestra la ecuación del modelo matemático algebraico estadístico de la tasa de degradación de cianuro obtenido por reemplazo de los valores obtenidos por regresión lineal de los coeficientes de regresión en el modelo matemático algebraico de la experimentación (Cuadro 16).

Cuadro 16: Fórmula polinomial cuadrática estadística obtenida del reemplazo de los coeficientes de regresión modelo matemático algebraico de la experimentación

Modelo matemático algebraico
$Y = a_0 + a_1 T + a_2 \text{pH} + a_3 [\text{CN}] + a_4 (T) (\text{pH}) + a_5 (T) [\text{CN}] + a_6 (\text{pH}) [\text{CN}] + a_7 T^2 + a_8 \text{pH}^2 + a_9 [\text{CN}]^2$

Modelo matemático algebraico estadístico
$Y = 147,35 + 8,66 T - 38,571 \text{pH} - 0,095 [\text{CN}] - 0,177 (T) (\text{pH}) + 0,00019 (T) [\text{CN}] - 0,0093 (\text{pH}) [\text{CN}] - 0,13 T^2 + 1,56 \text{pH}^2 - 1,18\text{E}-06 [\text{CN}]^2$

Leyenda: Y= eficiencia; $a_0, a_1, a_2, a_3, a_4, a_5, a_6, a_7, a_8, a_9$ = coeficientes de la fórmula algebraica; T= temperatura, [CN]= concentración de cianuro.

Fuente: Propia basada en análisis estadístico

En el cuadro 17 se observa las tasas estadísticas y sus variables independientes según la fórmula polinómica cuadrática.

Cuadro 17: Tasa de degradación de cianuro estadística obtenida aplicando la ecuación polinómica cuadrática estadística a cada uno de los experimentos del diseño de Box-Behnken

Nº Experimentos	T (°C)	pH	[CN] (ppm)	Tasa de degradación de cianuro estadística (%/días)
1	30	10,5	1000	7,72
2	22	9,5	1000	8,15
3	30	10	500	8,22
4	30	10	1500	9,22
5	22	10	500	6,75
6	26	10	1000	10
7	26	10	1000	10
8	26	10,5	1500	11,19
9	26	9,5	1500	9,22
10	26	10,5	500	6,32
11	26	10	1000	10
12	22	10	1500	6,22
13	30	9,5	1000	11,09
14	22	10,5	1000	6,19
15	26	9,5	500	13,62

Leyenda: T= temperatura, pH= potencial de hidrogeniones, [CN]= concentración de cianuro

Fuente: Propia basada en análisis estadístico

3.8. Variables óptimas y máximos valores de tasa de degradación de cianuro estadístico

En el Cuadro 18 se observa que las variables óptimas para la máxima tasa de remoción de cianuro fueron, temperatura 26 ° C, pH 9,5 y concentración de cianuro 1500 ppm de NaCN correspondientes al experimento número 15, como se observa en el cuadro 17 y en la Gráfica 4.

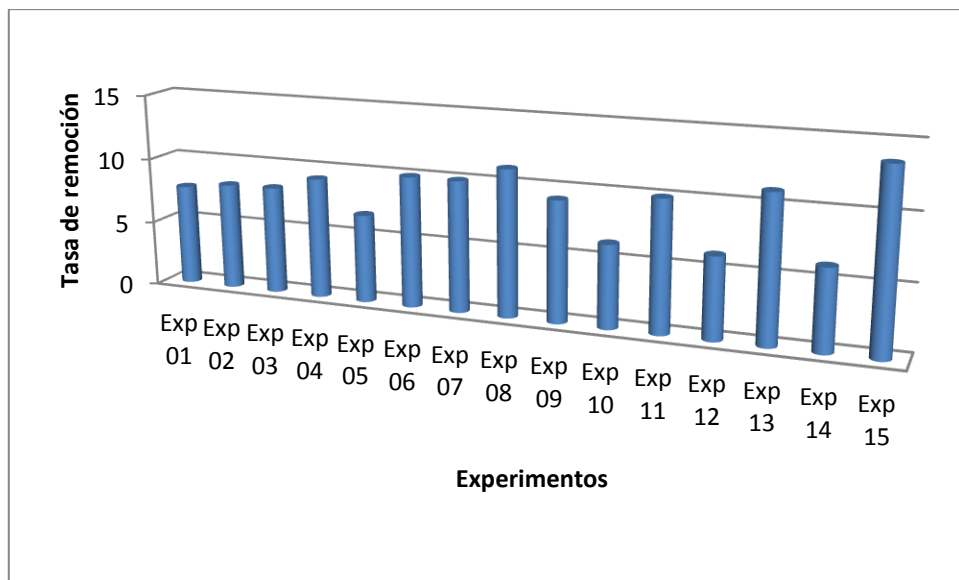


Gráfico 4: Máximos valores de tasa de degradación de cianuro estadística según el diseño experimental de Box-Behnken

Cuadro 18: Valores óptimos de temperatura pH y concentración de cianuro para la máxima tasa de degradación de cianuro establecida en la experimentación con *Pseudomonas fluorescens*

Temperatura	pH	[CN] ppm	Máxima tasa de remoción de cianuro estadístico (%/días)
26	9,5	500	13,62

3.9. Análisis de la eficiencia y tasa de degradación en función de las variables.

Se muestra en el cuadro 19 la comparación de los valores de eficiencia de remoción y tasa de degradación en cada uno de los 15 experimentos del diseño de Box-Behnken a partir del cual se hizo el análisis de la influencia de cada una de las variables y de la interacción entre ellas tanto para la eficiencia de remoción y la tasa de degradación de cianuro

Cuadro 19: Comparación de la eficiencia (%) y tasa de degradación (eficiencia/días) estadística de los 15 experimentos del diseño de Box-Behnken

Nº de Experimentos	T (°C)	pH	[CN] (ppm)	Eficiencia de remoción (%)	Tasa de degradación (eficiencia/días)
1	30	10,5	1000	72,35	7,72375
2	22	9,5	1000	76,382	8,15625
3	30	10	500	65,95	8,22
4	30	10	1500	80,95	9,2225
5	22	10	500	66,622	6,7575
6	26	10	1000	85,608	10
7	26	10	1000	85,608	10
8	26	10,5	1500	87,503	11,19375
9	26	9,5	1500	98,113	9,22375
10	26	10,5	500	79,753	6,32625
11	26	10	1000	85,608	10
12	22	10	1500	68,822	6,22
13	30	9,5	1000	83,35	11,09375
14	22	10,5	1000	67,862	6,19625
15	26	9,5	500	88,663	13,62625

Como se puede apreciar en el cuadro 20, hay influencia de la temperatura en el proceso de biorremediación de cianuro, a la temperatura de 26°C se obtiene la mayor tasa de degradación de cianuro con 13,62 (%/días) y la mayor eficiencia con 98,11 %. Esto demuestra que la temperatura de 26 °C es apropiada para los procesos de biorremediación.

Cuadro 20: Comparación de la tasa de degradación de cianuro con la eficiencia de degradación de cianuro en función de la temperatura

Temperatura	Tasa de degradación	Eficiencia
22	8,15	76,382
26	13,62	98,113
30	11,09	83,35

Fuente: Propia basada en análisis estadístico

Como se puede apreciar en el cuadro 21 hay influencia del pH en el proceso de biorremediación de cianuro a un pH de 9.5 se obtiene la mayor tasa de degradación; 13,62 (%/días); y la mayor eficiencia con 98.11 %. Esto demuestra que para la cepa *P. fluorescens*, elevados niveles de pH resultan poco apropiado para una buena biorremediación

Cuadro 21: Comparación de la tasa de degradación de cianuro con la eficiencia de degradación de cianuro en función del pH

pH	Tasa de degradación	Eficiencia
9,5	13,62	98,11
10	10	85,60
10,5	11,19	87,50

Fuente: Propia basada en análisis estadístico

Como se puede apreciar en el cuadro 22 hay influencia de la concentración de cianuro en el proceso de biorremediación; a una concentración de 500 ppm se obtiene una tasa de degradación de 13,62 (%/días) y para la concentración de 1500 ppm se obtiene una eficiencia de 98,11 %.

Cuadro 22: Comparación de la tasa de degradación de cianuro con la eficiencia de degradación de cianuro en función de la concentración de cianuro

CN	Tasa de degradación	Eficiencia
500	13,62	88,66
1000	11,09	85,60
1500	11,19	98,11

Fuente: Propia basada en análisis estadístico

3.9.1. Análisis de interacción entre las variables para la eficiencia y tasa de degradación

a. Interacción entre las variables pH y temperatura con relación a la eficiencia

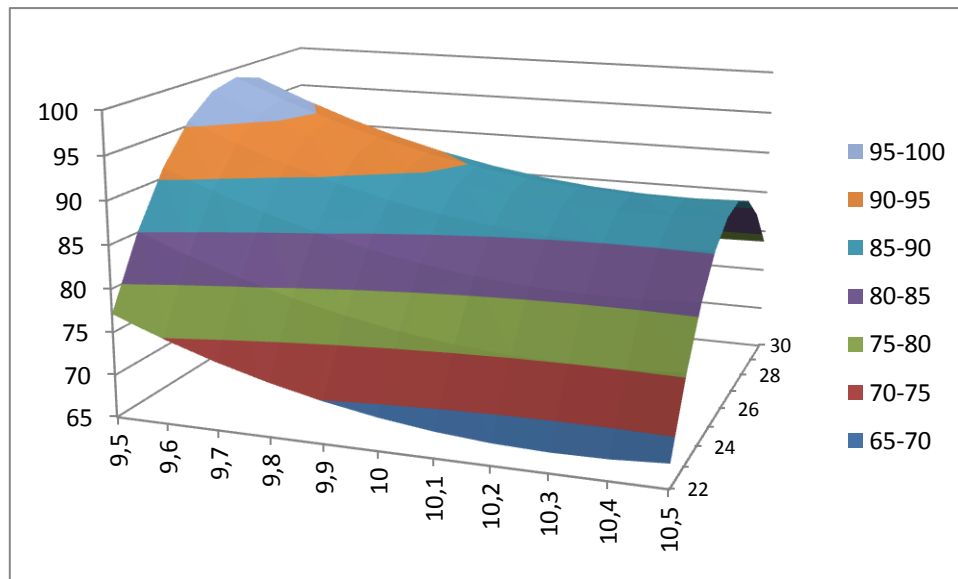
Como se aprecia en el cuadro 23 hay la interacción entre las variables de pH y temperatura con relación a la eficiencia; se obtiene una máxima eficiencia de 98,11 %, en las variables 9,5 de pH y 26°C de temperatura.

En el gráfico 5 de respuesta en superficie sobre la interacción de las variables de pH y temperatura se aprecia una disminución de la eficiencia cuando el pH del medio es incrementado y una mayor eficiencia a la temperatura de 26 °C.

Cuadro 23: Interacción entre las variables de pH y temperatura con relación a la eficiencia

T/pH	9,5	10	10,5
22	77,15	68,82	67,78
26	98,11	89,15	87,50
30	90,52	80,95	78,67

Fuente: Propia.



Gráfica 5: Respuesta en superficie de la interacción de la temperatura y el pH con respecto a la eficiencia.

Fuente: Propia basada en análisis estadístico

b. Interacción entre las variables de pH y temperatura con relación a la tasa de degradación.

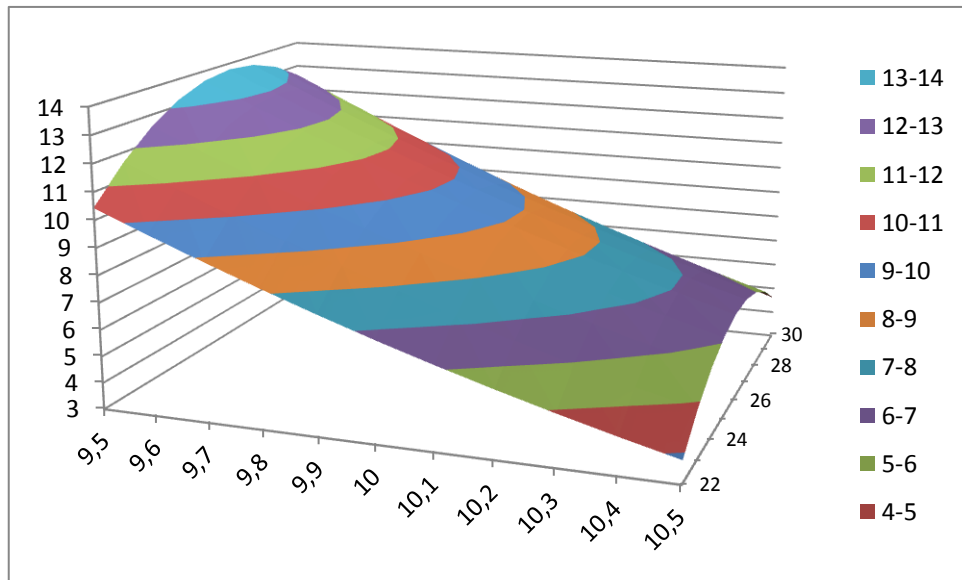
En el cuadro 24 el mayor valor de tasa de degradación es de 13,62 (%/días), se obtuvo a 26 °C de temperatura y 9,5 de pH.

En la gráfica 06 se observa mientras aumenta el pH disminuye la tasa de degradación, así mismo a la temperatura de 26 °C se obtiene una máxima tasa de degradación, siendo las temperaturas extremas no tan favorables para la tasa de degradación.

Cuadro 24: Interacción entre las variables de pH y temperatura con relación a la tasa de degradación

T/pH	9,5	10	10,5
22	10,44	6,75	3,85
26	13,62	9,58	6,32
30	12,61	8,22	4,60

Fuente: Propia basada en análisis estadístico



Gráfica 6: Respuesta en superficie de la interacción de la temperatura y el pH con respecto a la tasa de degradación.

c. Interacción entre las variables de pH y CN con relación a la eficiencia.

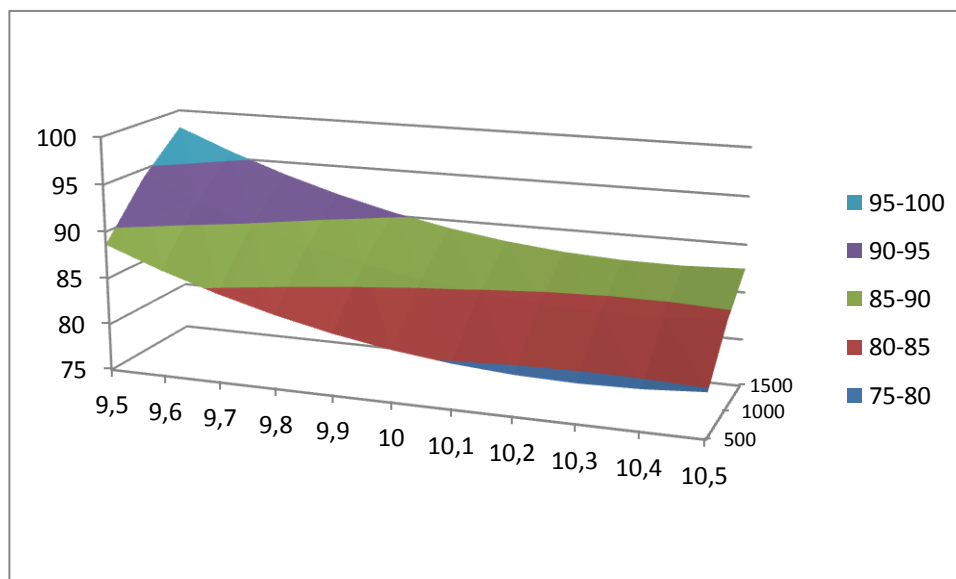
Como se aprecia en el cuadro 25 en la interacción del pH y cianuro la mayor eficiencia obtenida fue de 98,11 a un pH de 9,5 y una concentración de cianuro de 1500.

En el grafico 7 un aumento del pH disminuye la eficiencia; un incremento de la concentración aumenta la eficiencia.

Cuadro 25: Interacción entre las variables de pH y CN con relación a la eficiencia

pH/CN	500	1000	1500
9,5	88,66	94,13	98,11
10	80,55	85,60	89,15
10,5	79,75	84,37	87,50

Fuente: Propia basada en análisis estadístico



Gráfica 7: Respuesta en superficie de la interacción del pH y la concentración de cianuro con respecto a la eficiencia

Fuente: Propia basada en análisis estadístico

d. Interacción entre las variables de pH y la concentración de cianuro con relación a la tasa de gradación

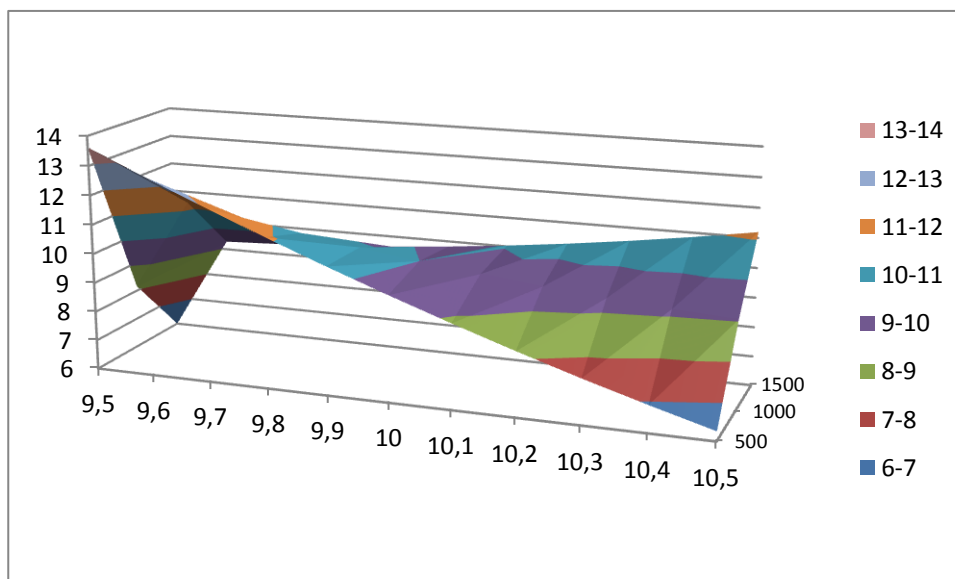
En el cuadro 26 se observa la máxima tasa de degradación encontrada 13,62 (%/día) en la interacción de pH 9.5 y concentración de cianuro de 500.

En la gráfica 8 de respuesta en superficie, un incremento de pH produce una disminución de la tasa de degradación y un aumento de la concentración una ligera disminución de la tasa a una concentración de 500 ppm y un aumento ligero de la tasa a 1500 ppm de cianuro.

Cuadro 26: Interacción entre las variables de pH y la concentración de cianuro con relación a la tasa de gradación

pH/CN	500	1000	1500
9,5	13,62	11,72	9,22
10	9,58	10	9,82
10,5	6,32	9,05	11,19

Fuente: Propia basada en análisis estadístico



Gráfica 8: Respuesta en superficie de la interacción del pH y la concentración de cianuro con respecto a la tasa de degradación

e. Interacción de las variables temperatura y la concentración de cianuro con relación a la eficiencia

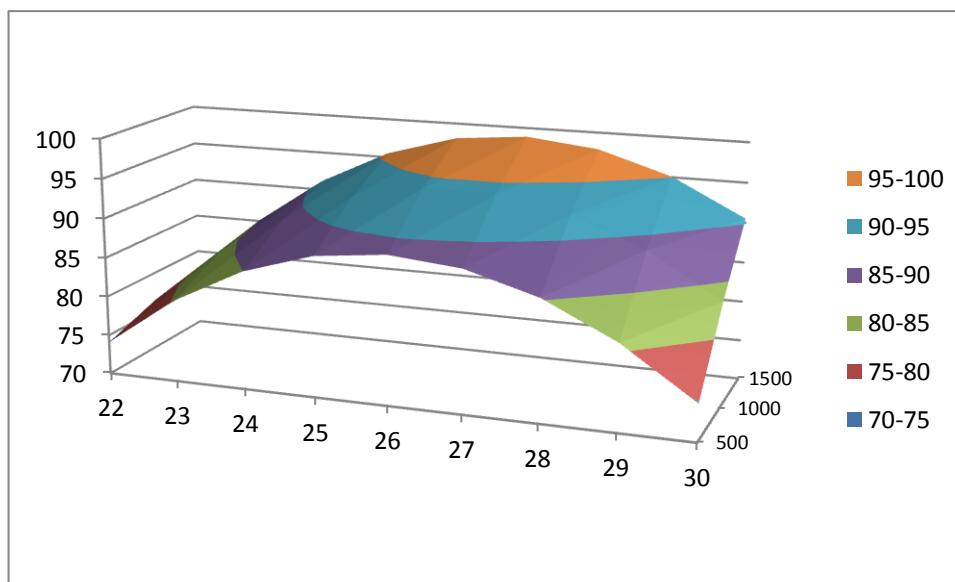
En el cuadro 27 en la interacción de la temperatura con la concentración de cianuro se observa que la máxima eficiencia de degradación 98,11 % y se obtuvo con las variables de temperatura de 26°C y la concentración de cianuro de 1500 ppm.

En la gráfica 9 se observa que la temperatura de 26°C obtiene la mayor eficiencia así mismo ante un aumento de la concentración de cianuro se produce un aumento de en la eficiencia.

Cuadro 27: Interacción de las variables temperatura y la concentración de cianuro con relación a la eficiencia

T/CN	500	1000	1500
22	74,11	76,38	77,15
26	88,66	94,14	98,11
30	74,67	83,35	90,52

Fuente: Propia basada en análisis estadístico



Gráfica 9: Respuesta en superficie de la interacción de la temperatura y la concentración de cianuro con respecto a la eficiencia

Fuente: Propia basada en análisis estadístico

f. Interacción de las variables temperatura y la concentración de cianuro con relación a la tasa de degradación

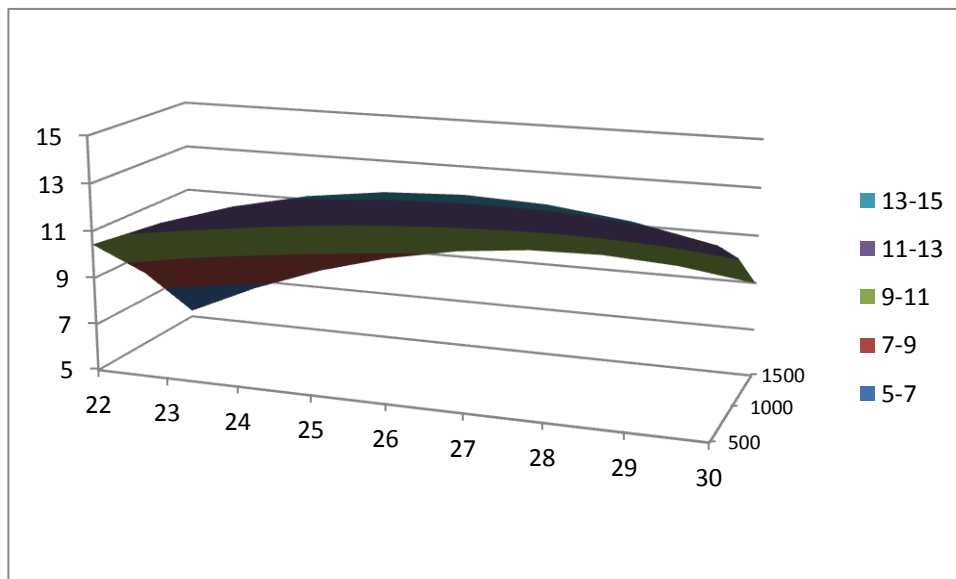
En el cuadro 28 se observa el máximo valor de la tasa de degradación 13,62 (%/días) se corresponde a la interacción de 26 °C y 500 ppm de CN.

En el grafico 10 se observa que cuando aumenta la concentración de cianuro, disminuye la tasa de degradación y cuando aumenta la temperatura hasta 26 °C llega a su máximo valor la tasa de degradación.

Cuadro 28: Interacción de las variables temperatura y la concentración de cianuro con relación a la tasa de degradación

T/CN	500	1000	1500
22	10,44	8,15	5,27
26	13,62	11,72	9,22
30	12,61	11,09	8,98

Fuente: Propia basada en análisis estadístico



Gráfica 10: Respuesta en superficie de la interacción de la temperatura y la concentración de cianuro con relación a la tasa de degradación

Fuente: Propia basada en análisis estadístico

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN

En el presente trabajo de investigación se demostró la influencia de las tres variables seleccionadas las cuales son la concentración de cianuro, el pH y temperatura. Estas variables se utilizaron para observar su influencia sobre la eficiencia biodegradativa del cianuro, y también sobre la tasa de degradación de cianuro, usando la cepa nativa *Pseudomonas fluorescens* aislada del mismo relave minero, al cual se le ha aplicado el tratamiento de biodegradación de cianuro.

En este trabajo se ha utilizado un biorreactor de columna de burbuja, este ayuda a un mejor control de los relaves con cianuro.

Las *Pseudomonas* son los microorganismos más comúnmente reportados como degradadores de cianuro, pues al cianuro lo pueden convertir a amoníaco y fumarato bajo condiciones aerobias y anaerobias. Usualmente crecen en el suelo o en superficies de aguas. Por ejemplo, *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas fluorescens* pueden emplear el cianuro como fuente de nitrógeno y metabolizarlo hasta amoníaco (Kao CM, et al. 2002).

Se ha utilizado concentraciones usadas comúnmente en minería para la lixiviación de oro como son las de 500 ppm, 1000 ppm, 1500 ppm, Guerrero y Olivera (2003); considerando que a su vez la concentración de cianuro es un parámetro que afecta significativamente la tasa de biodegradación de un contaminante, debido a su toxicidad.

Una elevada concentración de cianuro puede ser inhibitoria para la microflora autóctona del suelo, generando una disminución en la actividad de degradación y hasta ocasionar la muerte de los microorganismos autóctonos. Por el contrario, concentraciones por debajo de la concentración límite, necesaria para soportar el crecimiento de la población microbiana degradadora, pueden detener el proceso y el contaminante podría persistir en el ambiente, esto tiene su explicación debido a que muy bajas concentraciones, los compuestos no generan suficiente energía para el crecimiento de los microorganismos, no inducen el sistema enzimático necesario para su metabolismo (Sepulveda, 2002).

Para la fase de aislamiento se incrementó gradualmente la concentración de cianuro (75ppm, 100ppm, 500ppm, 1000ppm, 1500ppm), una vez alcanzada la máxima concentración se procedió al aislamiento de la cepa, este proceso fue muy adecuado para la selección, adaptación y purificación de las especies nativas con alto potencial de degradación del contaminante, puesto que se lograron obtener cepas puras con las cuales se inició el proceso de degradación de cianuro.

El mantener el pH entre 9,5 y 10,5 garantizó que la reducción de la concentración de cianuro en el medio sea debido a la degradación de los microorganismos y no a la volatilización de este, y dando la seguridad en el ambiente de trabajo para no producir una intoxicación por inhalación de cianuro de hidrogeno.

Según Restrepo (2006), se aisló una cepa de *Pseudomonas fluorescens* capaz de degradar el contaminante con una eficiencia superior al 98 % cuando se trabajó a concentraciones de 100-500 ppm NaCN. Este autor reporta que las concentraciones de 800 y 900 ppm de cianuro fueron degradadas en muy bajo porcentaje, mientras que en la de 1000 ppm, no hubo respuesta de la especie bacteriana. Concluye que el método biológico para la degradación directa del cianuro, es muy útil y eficaz para residuos que contengan hasta 200 ppm NaCN en el momento de las descargas de los tanques de cianuración.

En el presente trabajo se obtuvo una eficiencia del 96,67% menor a los encontrados por Restrepo, sin embargo, esta eficiencia se obtuvo a una máxima concentración de cianuro de 1500 ppm de NaCN, además que se halló actividad biodegradadora en concentraciones de 500, 1000 y 1500 ppm de NaCN. Con esto se logra corroborar que la degradación de cianuro con la cepa aislada fue eficiente. Knowles (1976) generaliza que el tratamiento biológico es particularmente adecuado para la depuración regular de grandes cantidades de desechos con moderada concentración de cianuro (hasta 1000 ppm).

Guerrero (2005) y Olivera (1999) indican que se ha demostrado que los procesos biológicos son efectivos en el tratamiento de concentraciones de cianuro libre mayor a 500 mg/l.

Camargo (2005), en trabajos realizados en la industria del recubrimiento metálico, comprobó la efectividad del tratamiento de aguas contaminadas

con cianuro, utilizando la capacidad degradativa de la cepa nativa *P fluorescens* la cual fue aislada de los residuos generados por dicha industria. Los resultados concluyen en la viabilidad para la utilización de sistemas biológicos en la eliminación de compuestos persistentes bajo condiciones apropiadas. En este proceso de biodegradación, la variable más significativa fue la agitación y la concentración inicial de cianuro no fue tan relevante; así mismo, las condiciones óptimas de biodegradación de cianuro fueron pH 9,5; temperatura 28 °C, agitación 200 rpm, y concentración inicial de cianuro 15 mg/L.

Mediante el tratamiento biológico del efluente se obtuvo un porcentaje de degradación de 96,1 % con el cual fue posible alcanzar concentraciones de cianuro por debajo de 1 ppm. Esto demuestra que esta es una especie bacteriana que puede utilizarse en procesos de degradación.

En el presente trabajo se optó por una agitación mediante la aireación generada por en la base del biorreactor

Analizando los resultados obtenidos en el presente trabajo realizado, para el biorreactor número 15 con variables de 500 ppm de NaCN, pH 9,5 y temperatura de 26° C se obtuvo un 95 % de eficiencia de degradación de NaCN en un tiempo total de 7 días y una tasa de degradación máxima de 13,57 (%/días).

Para el biorreactor número 13 con variables de 1000 ppm de NaCN, pH 9,5 y temperatura de 26 °C se obtuvo un 95 % de eficiencia de degradación

de NaCN en un tiempo total de 12 días y una tasa de degradación máxima de 11,87 (%/días).

Para el biorreactor número 9 con variables de 1500 ppm de NaCN, pH 9,5 y temperatura de 26 °C se obtuvo un 96,67 % de eficiencia de degradación de NaCN en un tiempo total de 12 días y una tasa de degradación máxima de 8,05 (%/días)

Analizando los resultados del estudio, se concluye que el biorreactor 15, cuyas variables de 500 ppm, pH de 9,5 y 26 °C de temperatura, obtuvo la mayor tasa de degradación de 13,571 y una eficiencia de 95 % en un tiempo de 7 días, en comparación con el biorreactor número 09 cuyas variables de 1500 ppm de NaCN, pH= 9,5 y temperatura de 26 °C obtuvieron una tasa de degradación de 8,05 y una eficiencia de 96,67 % en un tiempo de 12 días.

Esto indica que la tasa de degradación es un buen resultado para estimar el potencial de remoción del cianuro de los microorganismos y poder clasificarlos de acuerdo a la cantidad de cianuro degradada en el tiempo. Sin embargo, una mayor tasa de degradación no implica una mayor eficiencia de remoción como se aprecia en los resultados obtenidos.

La tasa de degradación depende tanto del microorganismo, como de la concentración inicial de cianuro en el medio. A mayor concentración de cianuro, mayor es el tiempo de degradación y por ende la tasa de degradación es menor.

Garcés, (2006) muestra que el proceso de biorremediación con microorganismos autóctonos del suelo contaminado, es un tratamiento eficaz y eficiente, y es un paso a la ejecución de alternativas más limpias y económicas para la descontaminación de los suelos. Los microorganismos emplean el CN como fuente de carbono y de nitrógeno. Según los resultados de Garcés los microorganismos aerobios presentan un porcentaje mayor de remoción; el pH del suelo afecta significativamente la actividad microbiana, así mismo considerando las siembras microbianas de organismos y posteriormente su adaptación a concentraciones de KCN entre 2×10^4 en 2000 ppm de KCN se observó que existe crecimiento microbiano en todas las fases del proceso de adaptación, lo cual es buen indicio que este consorcio microbiano sea muy resistente al cianuro; la eficiencia del proceso aerobio es mejor que el del anaerobio. En el proceso de aerobiosis se obtuvo un porcentaje de remoción máximo de 53,15 % mientras que en el de anaerobiosis 35,25 %.

En el presente trabajo, el pH del medio es una variable que influye en el desarrollo del microorganismo biodegradador e influye en la disponibilidad del cianuro, manteniendo al cianuro en forma iónica a pH mayor o igual a 9,5 y no en forma gaseosa (HCN) a pH menor de 9,5.

Con respecto a los incrementos de pH (9,5; 10,0; 10,5) en los tratamientos con *P. fluorescens* se obtuvo a un pH de 9,5 una máxima eficiencia de degradación 96,67 % y una máxima tasa de degradación 13,57 (%/días), siendo estos valores los más altos obtenidos de todos los ensayos. Mientras que a pH de 10 obtuvo una eficiencia de degradación 90 % y una tasa de

degradación de 10 (%/días), siendo a un pH de 10,5 una eficiencia de degradación de 90 % y una tasa de degradación de 11,25 (%/días).

Por lo tanto, el incremento del pH no fue determinante para el aumento de la degradación, mostrándose que pH de 9,5 es apropiado para una buena degradación.

Gil y Giraldo (2005) sostienen que *Pseudomonas fluorescens* utiliza sustancias oxidables a pH neutro o básico y que la acidez del medio limita su capacidad de desarrollo. Recomiendan elegir pH entre 8,5 y 10 debido a que los relaves de cianuro presentan valores altos de pH.

En las soluciones cianuradas a pH menores a 9,3 existe más iones H^+ ; casi todo el CN^- está como HCN gaseoso y puede volatilizarse incrementando el nivel de eliminación en adición al logrado por el proceso biodegradativo.

En cambio, a pH mayor a 10,5 hay pocos iones H^+ , casi todo el cianuro libre está disponible en la forma de CN^- si bien, su disponibilidad es más favorable a la degradación microbiana, el pH no sería el óptimo para el crecimiento de *P. fluorescens* limitando su eficiencia biodegradativa.

En el presente trabajo, respecto a los valores de temperatura empleados en este trabajo 22 °C, 26 °C y 30 °C, se obtuvo como resultado a 22 °C una eficiencia de degradación de 83,33 % y una tasa de degradación de 6,94 (%/día), a la temperatura de 26 °C una eficiencia de degradación 96,67 % y

una tasa de de gradación de 13,57 (%/día) y a la temperatura de 30 ° una eficiencia de degradación de 95 % con una tasa de degradación de 11,87 (eficiencia /días).

Siendo la temperatura de 26 °C donde se obtuvo los máximos valores para la degradación de cianuro, se concluye que esta temperatura es la adecuada para la realización de la biodegradación de cianuro utilizando como cepa la bacteria *P. fluorescens*; por lo tanto, la temperatura de 30 °C indicada en la hipótesis no fue la más adecuada para el proceso de biorremediación.

Bajo condiciones normales de temperatura y presión, las concentraciones de HCN y CN⁻ son iguales a un valor de pH de aproximadamente 9,4. Los compuestos cianurados existen a temperatura estándar (25°C) en fase sólida, líquida y/o gaseosa, y bajo diferentes formas moleculares y iónicas (Alvares, 2005).

Los cianuros alcalinos son estables, incluso a temperaturas moderadamente elevadas, siempre en ausencia de aire, CO₂ y/o humedad. Cabe destacar que, en aire húmedo, incluso a temperatura ambiente, los cianuros alcalinos son lentamente descompuestos, según la reacción, para producir ácido cianhídrico, lo que puede dar lugar a posibles envenenamientos durante la manipulación del cianuro alcalino (Alvares, 2005).

La velocidad a la cual los complejos se disocian y liberan cianuro libre en la solución depende de varios factores, entre ellos, la concentración inicial del complejo de cianuro, la temperatura, el pH y la intensidad de la luz, especialmente de la radiación ultravioleta (Alvares, 2005).

Todos estos resultados aseveran que el tratamiento biológico con *Pseudomonas* sp puede ser más competitivo que por tratamientos químicos (Gil *et al*, 2005)

CONCLUSIONES

PRIMERA

Los valores físico químicos óptimos de temperatura, pH y concentración de cianuro respectivamente fue para la máxima eficiencia de degradación de cianuro 26°C; 9,5 de pH y 1500 ppm, por lo tanto se rechaza la Hipótesis ya que los valores planteados no corresponden a los valores máximos encontrados en la parte experimental.

SEGUNDA

Se aisló *Pseudomonas fluorescens* nativo degradador de cianuro.

TERCERA

La máxima eficiencia y tasa de degradación de cianuro por *Pseudomonas fluorescens* fue de 96,67 % y 13,57 (%/días) respectivamente.

CUARTA

Los valores óptimos de temperatura, pH y concentración de cianuro respectivamente fue para la máxima eficiencia de degradación de cianuro 26°C; 9,5 de pH y 1500 ppm, y para la máxima tasa de degradación de cianuro fue de 26°C; 9,5 de pH y 500 ppm.

VII. RECOMENDACIONES

PRIMERA

Se recomienda realizar ensayos aplicando las variables óptimas encontradas variando los sustratos para un mejor proceso de biorremediación.

SEGUNDA

Realizar el proceso de biorremediación de relaves cianurados con nuevas especies de *Pseudomonas* para así aplicarlos en forma de consorcio para la biorremediación.

TERCERA

Experimentar con concentraciones más elevadas y determinar su eficiencia y tiempo en los proceso de biorremediación.

CUARTA

Realizar ensayos para la biorremediación en suelos contaminados con cianuro utilizando los valores encontrados para la máxima eficiencia y tasa de degradación.

BIBLIOGRAFÍA

1. ALVARES, R. (2005). Aplicación sistemas pasivos para el tratamiento de soluciones residuales de procesos de cianuración en minería de oro. Universidad de Oviedo, 27-137.
2. ARA, S. (2009). Bacteriología, Guía de prácticas, 14-17.
3. ASDA (1981). Vorquímica, medios de cultivo para microbiología. 134-140
4. BARBER, T., R., LUTES, M. DOORN, P. FUCHSMAN, H. TIMMENGA (2003). Aquatic ecological risks due to cyanide releases from biomass burning. *Chemosphere*, 50, 343-348.
5. BOLÍVAR Z., FRANCISCO G. (2004). Fundamentos y casos exitosos de la biotecnología moderna México, 270 – 280
6. BRENNER, D. (2005), *Bergey manual of sistematic bacteriology* Vol. Two, part. C, 2^a ed., 323-374.
7. DUBEY, S., D. HOLMES. (1995). Biological cyanide destruction mediated by micro-organisms. *World J Microbiol Biotech* 11:257-265.
8. DZOMBAK, D., R. GHOSH, G. WONG-CHONG. (2006). Cyanide in water and soil. 108-144.

9. GOLDMAN, E., L. GREEN. (2009) Practical Handbook of microbiology 231 – 241.
10. LONSDON M., K. KAGELSTEIN Y F. MUDDER. (2006). El manejo del cianuro en la extracción del oro, Concejo Internacional De Metales Y Medio Ambiente. (ICME), 42-125.
11. MONTENEGRO, R. (2003). Estudio sobre el impacto ambiental y sanitario de las minas de oro. fundación para la defensa del ambiente (funam).
12. MONTGOMERY, D. (2005). Diseño y análisis de experimentos Editorial Jhon Wiley & Sons, INC. Sexta Edición. Estados Unidos de América, 6^{ta} ed., 643.
13. RAINEY, F (2006). Extremophiles, Methods in microbiology, 23.
14. SOTO, T. (2001) Análisis metalúrgico de minerales y metales. 34-42.
15. SOTO, T. (2001). Manual de Procedimientos e instrucciones - minera Yanacocha, 2-34.
16. TRIVEDI P. (2009). Microbes applications and effects department of botany University of Rajasthan, 158-176

17. ADJEI, M., Y. OHTA. (1999). Isolation and characterization of a cyanide utilizing *Burkholderia cepacia* strain. *Microbiol Biotechnol*, 699–704.
18. CAMARGO, P., OSSA C., (2005). Tratamiento de aguas contaminadas con cianuro. Universidad EAFIT. Escuela de Ingeniería departamento de ingeniería de procesos Medellín.
19. CARRERA, M (2009) Producción de *Bacillus thuringiensis*, a nivel de laboratorio, tesis de doctoral en bioquímica farmacia, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Ecuador, 54-70
20. COLEY T., D. ZAPATA. (2006). Aislamiento y purificación de microorganismos degradadores de cianuro. Universidad EAFIT, Escuela de Ingeniería, Medellín.
21. DÍAZ, P. (2007) Estudio de la actividad oxidativa y crecimiento de *Acidithiobacillus ferrooxidans* en la oxidación de ión ferroso en presencia de carbón activado. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Física y Matemáticas, Departamento de Ingeniería Química y Biotecnología, 15-18.
22. EBBS, S. (2004). Biological degradation of cyanide compounds, department of plant biology, 231- 236.

23. ESCALANTE, R. (2002) Biodegradación de crudo de petróleo en terrarios, tesis para optar el grado de magister en biotecnología UNMSA Facultad De Farmacia Y Bioquímica, 20-22.
24. FERREIRA, S., R. BRUNS, H. FERREIRA, G. MATOS, G. BRANDAO, A. SOUZA, W. DOS SANTOS. (2007). Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods, 597:179–186.
25. FRANCO, C. (2007), Optimización de la producción de fitasa por *Aspergillus niger* en fermentación en estado sólido utilizando métodos estadísticos. Instituto Politécnico Nacional.
26. GIL, E., C. GIRALDO. (2005). Proceso “acoplado” físico-químico y biotecnológico para el tratamiento de aguas residuales contaminadas con cianuro. Grupo de Investigación Procesos Ambientales y Biotecnológicos –GIPAB UNIVERSIDAD EAFIT, 2-5.
27. HERNÁNDEZ, L. (2010). Valuación de la capacidad de un aislado bacteriano nativo de *Pseudomonas* sp. Como potencial degradador de compuestos cianurados, Universidad Nacional De Colombia, Medellín, 48 – 94.
28. IGEÑO, I., E. OROVENGUA, I. GUIJ. (2007). Biodegradación de los desechos que contienen cianuro por *P. pseudoalcaligenes*. Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Genética, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, 100-107.

29. KAO, C, J. LIU, H. LOU, C. LIN, S. CHEN (2002). Biotransformation of cyanide to methane and ammonia by *Klebsiella oxytoca*. Chemosphere, 1055-1061.
30. MATHEWS, C. K., VAN HOLDE, K.E., AHERN, K. G., 2002, Bioquímica. 3^{ra} ed. Madrid: Editorial Pearson Educación, 1386.
31. SCHMIDT, W. (2004), Suelos contaminados con hidrocarburos: la biorremediación como una solución ecológicamente compatible.
32. SEPULVEDA V, (2002) Tecnologías de remediación para suelos contaminados. Mexico: INE sernarnat., 14-37.
33. SMITH, A., T. MUDDER, (1996), Tratamiento de Residuos de Cianuración, 6-239.
34. DUMESTRE, A., T. CHONE, J. PORTAL, M. GERARD, and J. BERTHELIN. (1997). Cyanide degradation under alkaline conditions by a strain of *Fusarium solani* isolated from contaminated soils. Applied and Environmental Microbiology, 2729–2734.
35. GARCÉS A., L. AGUDELO, (2006). Aislamiento de consorcio de microorganismos degradadores de cianuro, Revista la Sallista de Investigación, 3, 7-12.

36. GONZALEZ, S. (2004). "El Cianuro es Tóxico y Letal". Por La Septima, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco
37. GUERRERO, J. (2005). Toxicidad y destrucción biológica del cianuro. Rev. El Ingeniero de Minas, 35, 22-25.
38. HRUSCHKA F. (1998). Manejo ambiental en la pequeña minería. Agencia Suiza para el desarrollo y la cooperación. Bolivia. 12.
39. KNOWLES C. 1988. Cyanide utilization and degradation by microorganisms. 3-15.
40. LUQUE, V. (2005). Alkaline cyanide biodegradation by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 In: Biochemical Society Transactions. 33, 168-169.
41. MATSUMURA, M., K., TOSHINORI., 2003, Elution and decomposition of cyanide in soil contaminated with various cyano compounds, 97, 99-110.
42. RESTREPO O. (2006). Degradación microbiana de cianuro procedentes de plantas de beneficio de oro mediante una cepa nativa de *Pseudomonas fluorescens*. Dyna revista de la Facultad de Minas N° 149. Instituto de minerales cimex. 45-51.

43. SCHROEDER, A., H. RANDY, V. DOMÍNGUEZ, y L. GARCÍA, (1999),
Potencial de la biorremediación de suelo y agua impactados por
petróleo. 17, 159.

44. SMITH, A., T. MUDDER. (1991). The chemistry and treatment of
cyanidation wastes, Química y tratamiento de residuos de la
cianuración, Mining Journal Books, Londres, Reino Unido.

45. VARGAS J. (2011). Estudio ambiental y optimización en la extracción
del oro utilizando el cianuro. Revista Ciencia y Desarrollo 75-80

46. MEDINA G, ARÉVALO J, QUEA F (2007) Minería Ilegal en el Perú, 3-
33

ANEXO

ANEXO 1

COMPUESTOS PARA LA PREPARACIÓN DE AGAR GLUTAMATO

COMPONENTES	g/L
Glutamato monosódico	10
KH_2PO_4	2
MgSO_4	0,5
Agar	15

Fuente: ASDA (1981).

Esterilizado por autoclave a 121 °C por 15 minutos, luego enfriar hasta 50 °C y añadir 1 uL de penicilina g sódica, y plaquear.

ANEXO 2

COLORACIÓN DE FLAGELOS POR EL MÉTODO DE LEIFSON

- Tomar una azada abundante del cultivo líquido o de una suspensión bacteriana incubada por 30 minutos y colocada en un extremo de la lámina porta objeto.
- Inclinar la lámina hasta que el líquido se desplace al centro de la lámina. Dejar secar en esta posición a temperatura ambiente
- Cubrir con colorante de Leifson por 15 minutos enjuagar suavemente con agua destilada y cubrir con azul de metileno por 5-10 minutos. Decantar suavemente el exceso de colorante, secar a temperatura ambiente y observar a inmersión

ANEXO 3

PREPARACIÓN DEL MEDIO BASE SALES MINERALES GLUCOSA

Para la preparación del medio base sales minerales glucosa se necesitan los siguientes componentes, los cuales fueron pesados en balanzas analíticas para la obtención de pesos exactos.

COMPONENTES	g/L
MgSO ₄	0,2
K ₂ HPO ₄	4,0
KH ₂ PO ₄	1,0
CaSO ₄	0,1
FeSO ₄	0,05
Glucosa	30

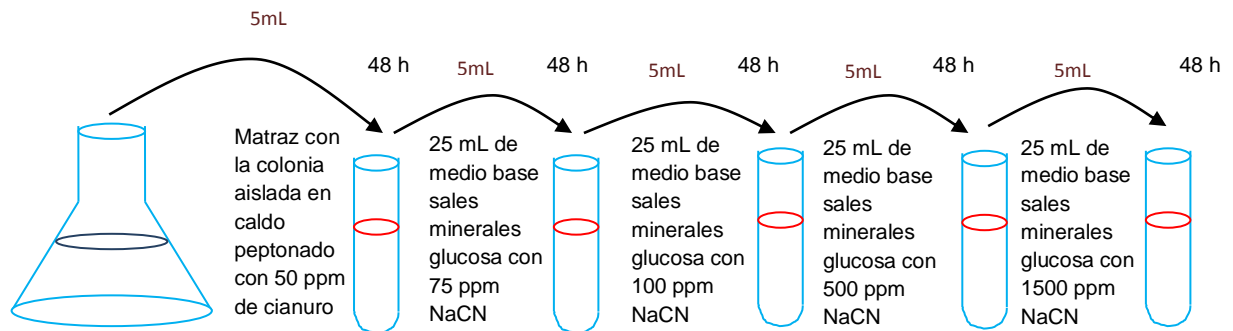
Fuente: ASDA (1981).

Los componentes se mezclan con mucho cuidado en un matraz conteniendo agua destilada, luego es llevado a esterilización por autoclave a 121 °C por 15 minutos, al final se obtiene un medio hialino, de pH 7.5,

ANEXO 4

ADAPTACIÓN DE LA CEPA A MAYORES CONCENTRACIONES DE CIANURO DE SODIO (NACN)

Para el proceso de adaptación de las cepas aisladas se realizó sembrando en medio base sales minerales glucosa de las cepas.



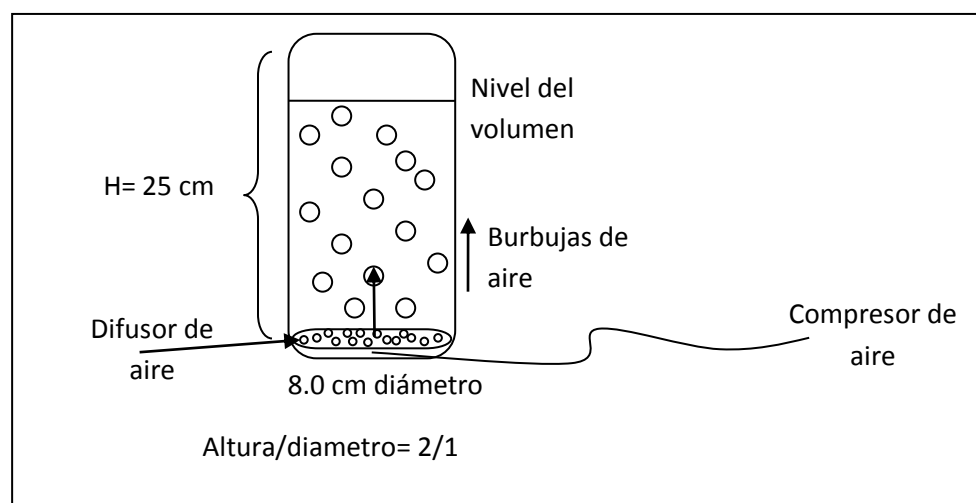
Fuente: Propia.

Cada 48 horas se procedió a la verificación de las cepas con observaciones en fresco y sembrando cada una de las adaptaciones en placas con agar glutamato y observando el crecimiento característico de las cepas.

ANEXO 5

DISEÑO DE LOS BIORREACTORES

Los biorreactores utilizados en el presente trabajo tiene las siguientes características son de material de plástico de 1000 mL de capacidad con las siguientes proporciones, 25 cm altura, 8.0 del diámetro de la base.



Fuente: Propia basada en el diseño de biorreactores.

El biorreactor por su parte inferior fue insuflado con aire con un motor de pecera de 2,5 L/min, que aireo el medio en la parte inferior del biorreactor a través de un difusor de aire.

ANEXO 6

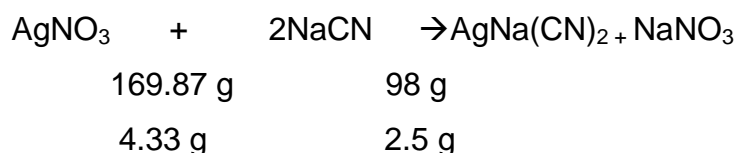
Fotos de los biorreactores de columna de burbuja usados en la parte experimental.



ANEXO 7

MÉTODO TÍTULO MÉTRICO PARA CUANTIFICACIÓN DE CIANURO LIBRE EN SOLUCIÓN

Para la cuantificación de cianuro se usa usamos la siguiente fórmula.



La estequiometría de la reacción anterior, indica que 169.87 g de nitrato de plata (AgNO_3) consume 98 g de NaCN. Entonces al preparar 1000 mL de solución de AgNO_3 donde existe 4.33 g de AgNO_3 este volumen de solución de AgNO_3 reaccionara con 2.5 g de NaCN. Por lo tanto se tiene que: 1 mL de solución titulante consumirá 0.0025 g de NaCN, cada mililitro de solución de nitrato de plata (AgNO_3) consumido equivale a una concentración de 0.1 g de NaCN/L. Si se toma distintos volúmenes de muestra cuya concentración de cianuro libre se quiere determinar, se debería dividir para un factor diferente, en cada caso, el gasto de nitrato de plata (AgNO_3) para obtener directamente el valor de concentración de cianuro libre (Soto, T. 2001).

Factores de división para obtención del título con nitrato de plata

Cantidad de muestra tomada (mL)	Factor de división
100	40
25	10
10	4
5	2

Fuente: Soto, T. 2001

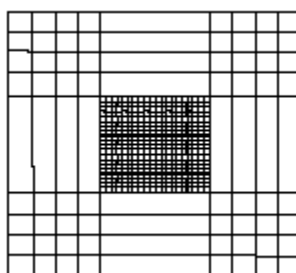
En los ensayos de cianuración que se realiza a nivel de laboratorio generalmente se toma una alícuota de 5 mL de muestra por lo tanto el factor de división será igual a 2. (Soto, T. 2001)

ANEXO 8

RECuento EN CÁMARA DE NEUBAUER

El recuento se hará en 25 cuadrados o 5 (la de los extremos y la central), y con las fórmulas correspondientes.

Esquema de la cámara de Neubauer



$$N = (X_{25})(25)(10^4)$$

ANEXO 9

ESTADÍSTICA DE REGRESIÓN PARA LA EFICIENCIA

Análisis estadístico de la regresión en función de la eficiencia de degradación de cianuro experimental.

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coeficiente de correlación múltiple	0,878425575
Coeficiente de determinación R ²	0,771631491
R ² ajustado	0,360568176
Error típico	9,019654464
Observaciones	15

Fuente: Cuadro obtenido mediante programa estadístico.

En el cuadro 14 se observa que el valor del coeficiente de correlación es de 0,878 lo que indica que hay una buena correlación entre la variable dependiente y la variable independiente y el coeficiente R² cuyo valor es de 0,771 también indica una buena relación de variable respuesta y predictoria, lo que indica que el test realizado es confiable.

ANEXO 10

ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA EFICIENCIA

Análisis de varianza de la regresión en función de la eficiencia de degradación de cianuro experimental.

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Fuente	F	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de		Valor crítico de F
				los cuadrados	F	
Regresión		9	1374,432871	152,7147634	1,877159704	0,252656654
Residuos		5	406,7708332	81,35416664		
Total		14	1781,203704			

Fuente: Cuadro obtenido mediante programa estadístico.

ANEXO 11

ESTADÍSTICA DE REGRESIÓN PARA LA TASA DE DEGRADACIÓN

Análisis estadístico de la regresión en función a de la tasa de degradación de cianuro.

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coeficiente de correlación múltiple	0,95824881
Coeficiente de determinación R ²	0,91824079
R ² ajustado	0,77107421
Error típico	1,07007958
Observaciones	15

Fuente: Cuadro obtenido mediante programa estadístico.

En el cuadro 24 se observa que el valor del coeficiente de correlación es de 0.958 lo que indica que hay una muy buena correlación entre la variable dependiente y la variable independiente y el coeficiente R² cuyo valor es de 0.918 también indica una muy buena relación de variable respuesta y predictoria, lo que indica que el test realizado es confiable.

ANEXO 12
ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA TASA DE
DEGRADACIÓN

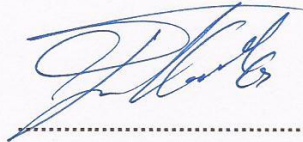
Análisis de varianza de la regresión en función a de la tasa de degradación de cianuro.

ANÁLISIS DE VARIANZA					
	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	9	64,3016401	7,14462668	6,23946553	0,0288829
Residuos	5	5,72535151	1,1450703		
Total	14	70,0269916			

Fuente: Cuadro obtenido mediante programa estadístico.



.....
MSc. DALADIER CASTILLO COTRINA
(ASESOR)



.....
BACH. JHON ABEL COAQUIRA MAQUERA
(TESISTA)