

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN - TACNA

Facultad de Ciencias

Escuela Profesional de Biología - Microbiología

“Biodegradación de cianuro por *Klebsiella sp* en condiciones
diferentes de factores fisicoquímicos
a nivel de biorreactor
aireado”

TESIS

Presentada por:

Bach. Ana Beatriz Copari Mamani

Para optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO - MICROBIÓLOGO

TACNA - PERÚ

2019

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS N° 318

En la ciudad de Tacna, en el auditorium de la Facultad de Ciencias, de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann; siendo las 9:14 horas del día 13 de diciembre del 2018, estando presente el jurado calificador nominado por Resolución de Facultad N° 9222-2018-FACI/UNJBG, conformado por los siguientes docentes:

- | | |
|--|------------|
| ➤ Dr. DALADIER MIGUEL CASTILLO COTRINA | Presidente |
| ➤ Mblga. LIDUVINA SULCA QUISPE | Miembro |
| ➤ M.Sc. ANGELA VERONICA CHOQUE MIRANDA | Secretaria |

Acto seguido, se dio lectura a la Resolución correspondiente, y del mismo modo se dio lectura al Artículo 22 del Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad de Ciencias.

A continuación, el Presidente del Jurado instó a la Bachiller: ANA BEATRIZ COPARI MAMANI, a exponer la tesis titulada "**Biodegradación de cianuro por *Klebsiella sp* en condiciones diferentes de factores fisicoquímicos a nivel de biorreactor aireado**".

Siendo las 9:53 horas, la tesista concluye su exposición, luego se procedió a la formulación de las preguntas por parte de los miembros del jurado calificador. Terminado este proceso, se invitó a que los miembros del jurado emitan su calificación de acuerdo a reglamento. El promedio de la calificación dio el siguiente resultado: **APROBADO** por **UNANIMIDAD**, con el calificativo de **SOBRESALIENTE (18)**, de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad de Ciencias.

Siendo las 10:15 horas, se dio por concluido el acto de sustentación de la tesis, firmando los señores miembros del jurado calificador, en señal de conformidad.



Dr. Daladier Miguel Castillo Cotrina
Presidente



Mblga. Liduvina Sulca Quispe
Miembro



M.Sc. Angela Veronica Choque Miranda
Secretaria

DEDICATORIA

En el camino de este trabajo aprendí que la vida y todo cuando en ella se nos brinda: alegrías, penas, triunfos, tropiezos, satisfacciones, decepciones, respuestas y dudas, son un don. Por eso este trabajo se lo dedico al padre, al maestro, al amigo Dios.

A mis padres Jacinto y Rosa, por su amor incondicional, su sacrificio y apoyo en todas las etapas de mi vida, por hacer posible que hoy cumpla uno de mis sueños. A mis hermanos Hadam, Richar y Yoni por ser un motivo de seguir adelante en todo momento.

AGRADECIMIENTO

Mi sincero agradecimiento a:

Mis padres por su paciencia, la confianza y el apoyo incondicional hacia mi persona.

Mis hermanos por incentivarme en seguir progresando en mi carrera profesional.

Mi asesor el Dr. Cesar Julio Cáceda Quiroz por su paciencia e inclusión en el grupo de investigación en el laboratorio de Biorremediación de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, fomentando siempre un trabajo en equipo.

Mi profesor del curso Diseños Experimentales el M. sc. Arístides Choquehuanca Tintaya por su orientación en la estadística con el diseño experimental de Box-Behnken.

Mis grandes amigos Milena Carpio, Gabriela Fora, Mayumi Chachaque, Yohana Centeno y Freddy Linaja, por su apoyo emocional y consejos para la culminación del presente trabajo.

Mis docentes de la Facultad de Ciencias, por todas las enseñanzas que me brindaron.

La Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, por el financiamiento proporcionado por el canon y regalías mineras, sin cual no hubiera sido posible realizar este trabajo.

ÍNDICE

Resumen

Abstract

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	Planteamiento del problema.....	4
1.2	Hipótesis.....	5
1.3	Justificación.....	5
1.4	Objetivos.....	7
1.4.1	Objetivo general.....	7
1.4.2	Objetivos específicos.....	7
1.5	Marco teórico.....	8
1.5.1	Cianuro.....	8
1.5.2	Fuentes de producción de cianuro.....	11
1.5.3	Contaminación por cianuro.....	18
1.5.4	Toxicidad del Cianuro.....	21
1.5.5	Biodegradación.....	25
1.5.6	Degradación del cianuro en el ambiente.....	30
1.5.7	Mecanismos de la biodegradación de cianuro.....	35
1.5.8	<i>Klebsiella sp</i> en la biodegradación de cianuro.....	40
1.5.9	Biorreactores.....	41
II.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	43
2.1	Material de estudio.....	43
2.2	Lugar de experimentación.....	43
2.3	Tipo de investigación.....	44

2.4	Diseño experimental	44
2.5	Variables de experimentación:	46
2.6	Población de estudio.....	46
2.7	Caracterización de la cepa <i>Klebsiella sp ALL-1</i>	46
2.7.1	Caracterización bioquímica de la cepa de <i>Klebsiella sp ALL-1</i>	46
2.7.2	Caracterización microscópica de la cepa de <i>Klebsiella sp ALL-1</i>	47
2.7.3	Caracterización macroscópica de la cepa de <i>Klebsiella sp ALL-1</i> ...	48
2.8	Obtención del inóculo bacteriano para el sistema de biorreactores.....	49
2.8.1	Determinación de crecimiento de la cepa <i>Klebsiella sp ALL-1</i> en condiciones alcalinos.....	49
2.8.2	Adaptación de la cepa de <i>Klebsiella sp ALL-1</i> a diferentes concentraciones de cianuro	50
2.8.3	Producción del inóculo de la cepa <i>Klebsiella sp ALL-1</i>	51
2.9	Construcción de incubadoras programable con Arduino	52
2.10	Evaluación de la biodegradación de cianuro libre, en biorreactor aireado, por <i>Klebsiella sp</i> , a diferentes condiciones de temperaturas, pH y concentración de cianuro.	52
2.10.1	Diseño de los biorreactores.	52
2.10.2	Acondicionamiento de los biorreactores según el diseño de Box-Behnken.	53
2.10.3	Instalación de los biorreactores para la experimentación.....	55
2.10.4	Evaluación de la biodegradación del cianuro por <i>Klebsiella sp ALL-1</i>	56
2.11	Determinación de la tasa y eficiencia de biodegradación de cianuro libre por <i>Klebsiella sp ALL-1</i>	59
2.11.1	Tasa de la biodegradación por la cepa <i>Klebsiella sp ALL-1</i>	59

2.11.2	Determinación de la eficiencia en la degradación de cianuro en relación de horas	60
2.12	Determinación de las condiciones óptimas de temperatura, pH y concentración de cianuro libre, en la biodegradación de cianuro por <i>Klebsiella sp ALL – 1</i> , utilizando el diseño Box-Behnken	60
III.	RESULTADOS	62
3.1	Caracterización de la cepa <i>Klebsiella sp ALL-1</i>	62
3.1.1	Caracterización bioquímica de la cepa <i>Klebsiella sp ALL-1</i>	62
3.1.2	Caracterización microscópica de la cepa <i>Klebsiella sp ALL-1</i>	64
3.1.3	Caracterización macroscópica de la cepa <i>Klebsiella sp ALL-1</i>	65
3.2	Obtención del inóculo bacteriano para el sistema de biorreactores.....	66
3.3	Evaluación de la biodegradación de cianuro libre, en biorreactor aireado, por <i>Klebsiella sp</i> , a diferentes condiciones de temperaturas, pH y concentración de cianuro.	69
3.4	Determinación de la tasa y eficiencia de biodegradación de cianuro libre por <i>Klebsiella sp ALL-1</i>	71
3.5	Evaluación de las condiciones óptimas de temperatura, pH y concentración de cianuro libre, en la biodegradación de cianuro por <i>Klebsiella sp ALL – 1</i> , utilizando el diseño Box-Behnken	76
IV.	DISCUSIÓN	87
V.	CONCLUSIÓN	98
VI.	RECOMENDACIONES.....	99
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100
VIII.	ANEXOS	113

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Formas de cianuro.....	9
Tabla 2. Microorganismos cianogénicos	13
Tabla 3. Incidentes históricos producidos por residuos industriales cianurados	16
Tabla 4. Comparación del potencial de Biorremediación de cianuro en agua....	29
Tabla 5. Rutas de degradación de cianuro.	39
Tabla 6. Plantilla de prueba según el diseño experimental Box-Behnken (Statgraphics centurión XVI) a escala codificada y natural de los ensayos de biodegradación en biorreactores con <i>Klebsiella sp ALL-1</i> como inóculo microbiano.	45
Tabla 7. Resultados de las pruebas bioquímicas realizadas a la cepa <i>Klebsiella sp</i> <i>ALL-1</i>	63
Tabla 8. Resultados de crecimiento de la cepa <i>Klebsiella sp ALL-1</i> en pH alcalinos.	66
Tabla 9. Adaptación de la cepa de <i>Klebsiella sp ALL-1</i> en medio mineral cianurado 9M (con extracto de levadura).....	67
Tabla 10. Adaptación de la cepa de <i>Klebsiella sp ALL-1</i> en medio mineral 9M cianurado (sin extracto de levadura).	68
Tabla 11. Masificación de la cepa de <i>Klebsiella sp ALL-1</i> en medio mineral 9M (sin extracto de levadura) a 400 ppm de cianuro con aireación	69
Tabla 12. Tasa de biodegradación experimental de cianuro obtenidos para cada uno de los experimentos del diseño de Box-Behnken en 108 horas ..	72
Tabla 13. Tasa de biodegradación experimental de cianuro obtenidos para cada uno de los experimentos del diseño de Box-Behnken en 60 horas	74
Tabla 14. La eficiencia y tasa de biodegradación experimental de cianuro obtenidos de cada uno de los experimentos del diseño de Box-Behnken en base al tiempo.	75
Tabla 15. Análisis de varianza de la tasa de biodegradación de cianuro libre por <i>Klebsiella sp ALL-1</i>	76
Tabla 16. Coeficiente de regresión para la tasa de biodegradación de cianuro por <i>Klebsiella sp ALL-1</i>	78

Tabla 17. Análisis de varianza ajustado de la tasa de biodegradación de cianuro por <i>Klebsiella sp ALL-1</i>	79
Tabla 18. Coeficiente de regresión ajustado para la tasa de biodegradación de cianuro por <i>Klebsiella sp ALL-1</i>	80
Tabla 19. Resultados estimados para la tasa de biodegradado de cianuro según el modelo de Regresión Lineal en cada uno de los experimentos del diseño de Box-Behnken.	82

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Relación del cianuro de hidrógeno (HCN) y (CN ⁻) con el pH.	10
Figura 2. Escala colorimétrica de amoniaco.	58
Figura 3. a) Reactivación de la cepa <i>Klebsiella sp ALL-1</i> en caldo nutritivo y b) Cultivo de la cepa <i>Klebsiella sp ALL-1</i> en agar nutritivo.	62
Figura 4. a) Prueba de Agar-hierro-triple azúcar, b) Prueba en el medio LIA, c) Prueba del citrato de Simmon, d) Prueba de indol, e) Prueba de Voges Proskauer, f) Prueba de Rojo de Metilo.	63
Figura 5. Tinción Gram de la cepa de <i>Klebsiella sp ALL-1</i>	64
Figura 6. Tinción de capsula mediante la técnica de Maneval de la cepa <i>Klebsiella sp ALL-1</i>	64
Figura 7. a) Observación de las colonias de <i>Klebsiella sp ALL-1</i> en agar nutritivo y b) Observación de las colonias de <i>Klebsiella sp ALL-1</i> en agar Mac Conkey.	65
Figura 8. Producción de amónico (NH ₄) en la biodegradación de cianuro por <i>Klebsiella sp ALL-1</i>	70
Figura 9. Monitoreo de pH en la biodegradación de cianuro por <i>Klebsiella sp ALL-1</i> cada 12 horas.	71
Figura 10. Tasa de biodegradación experimental de cianuro obtenidos para cada uno de los experimentos del diseño de Box-Benhken en 108 horas. .	73
Figura 11. Diagrama de Pareto según el ANOVA del porcentaje de biodegradación de cianuro libre por <i>Klebsiella sp ALL-1</i>	79

Figura 12. Diagrama de Pareto según el ANOVA ajustado de la tasa de biodegradación de cianuro por <i>Klebsiella sp ALL-1</i>	81
Figura 13. Gráfico de superficie de respuesta pH y concentración de cianuro libre & % de cianuro libre biodegradado.	84
Figura 14. Gráfico de superficie de respuesta temperatura y concentración de cianuro & % de cianuro libre biodegradado.....	84
Figura 15. Gráfico de superficie de respuesta temperatura y pH & % cianuro libre biodegradado.....	85
Figura 16. Gráfico de efectos principales sobre la biodegradación de cianuro libre.	86
Figura 17. Gráfico de efecto de la interacción pH y concentración cianuro libre sobre la biodegradación de cianuro.	86

INDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. Composición del medio mineral (9M)	113
ANEXO 2. Recuento de la cepa en cámara de Petroff Hausser	113
ANEXO 3. Fotografía de la adaptación de la cepa de <i>Klebsiella sp ALL-1</i> en forma ascendente a concentraciones mayores de cianuro libre.....	114
ANEXO 4. Fotografía de diseño de las incubadoras construidas	115
ANEXO 5. Diseño del biorreactor	115
ANEXO 6. Acondicionamiento y instalación de los biorreactores según el diseño de Box Benhken.	116
ANEXO 7. Condiciones de trabajo para la extracción de muestra de los biorreactores acondicionados.	117
ANEXO 8. Titulación volumétrica con nitrato de plata.....	118
ANEXO 9. Detección de amonio mediante el test colorimétrico.....	119
ANEXO 10. Registro de los valores de pH en la biodegradación de cianuro ...	120

RESUMEN

Los compuestos cianurados son sustancias tóxicas ampliamente distribuidas a nivel mundial, que se producen en varios procesos industriales; dentro de las alternativas de tratamiento, el uso de tratamiento biológico es una alternativa prometedora, la cual usa microorganismos como *Klebsiella*, que son capaces de descomponer cianuro a sustancias menos tóxicas. Se utilizó la metodología de superficie de respuesta, diseño Box-Behnken para el estudio y la optimización de factores, utilizando biorreactores tipo batch con aireación. Para determinar la biodegradación de este contaminante se realizó la optimización de parámetros de pH, temperatura y [CN⁻] con la cepa *Klebsiella sp ALL-1*, en condiciones de laboratorio, que fue adaptada, purificada; para la producción de inóculo bacteriano se utilizó 2×10^8 bacterias/mL a 400 ppm de cianuro libre. La evaluación de la capacidad degradadora de cianuro se realizó bajo condiciones alcalinas cada 12 horas y cada 24 horas la producción de amonio durante 108 horas.

Los resultados mostraron que la mayor tasa y eficiencia de biodegradación experimental por cepa *Klebsiella sp ALL-1* fueron 98 % y 98,8 % respectivamente en 60 horas, la temperatura no presentó significancia estadística, mientras que los factores pH y [CN⁻] fueron significativos estadísticamente. En la optimización del diseño se determinó que la cepa *Klebsiella sp ALL-1* bajo condiciones de pH 10,0 a una Temperatura de 30 °C, y [CN⁻] 200 ppm generó una biodegradación de cianuro del 99 %.

Palabras clave: Concentración de cianuro, biodegradación, *Klebsiella sp*.

ABSTRACT

The cyanides compounds are toxic substances widely distributed worldwide, which are produced in several industrial processes; within the alternatives of treatment, the use of biological treatment is a promising alternative, which uses microorganisms such as *Klebsiella*, which are capable of decomposing cyanide to less toxic substances. We used the response surface methodology, Box-Behnken design for the study and the optimization of factors, using aerated bioreactors. To determine the biodegradation of this pollutant, the optimization of pH, temperature and [CN⁻] parameters with the strain *Klebsiella sp ALL-1* was performed, under laboratory conditions, which was adapted, purified, for the production of bacterial inoculum was 2×10^8 bacteria / mL at 400 ppm of free cyanide. The evaluation of the degrading capacity of cyanide was made under alkaline conditions in a batch bioreactor with aeration. Parameter optimization was carried out using the Box-Behnken design, for which analyzed data were analyzed every 12 hours, the pH value was monitored, and every 24 hours the ammonium production for 108 hours.

The results showed that the highest rate and efficiency of experimental biodegradation per strain *Klebsiella sp ALL-1* were 98 % and 98.8 % respectively in 60 hours, the temperature did not present statistical significance, while the pH and [CN⁻] factors were statistically significant. In the optimization of the design it was determined that the *Klebsiella sp ALL-1* strain under conditions of pH 10.0 at a temperature of 30 °C, and [CN⁻] 200 ppm generated a biodegradation of 99 % cyanide.

Keywords: Cyanide concentration, biodegradation, *Klebsiella sp*.

I. INTRODUCCIÓN

La contaminación ambiental por compuestos de cianuro es un problema a nivel mundial, principalmente se da como resultado de actividad antropogénica (Baxter & Cummings, 2006). Para ser más específicos, el cianuro (CN⁻) es una sustancia tóxica que contamina los recursos naturales de agua, suelo y aire a partir de una variedad de fuentes industriales como fibras acrílicas, farmacéuticas, plástico, galvanoplastia, las aplicaciones fotográficas y la minería (Akcil, 2003; Gessner et al., 2005; ICMI, 2002; Sirianuntapiboon et al., 2008). Sin embargo, La industria minera aurífera es una de las mayores fuentes de contaminación por cianuro en aguas y suelos, donde se evidencia los puntos más altos de cianuro (Donato et al., 2004; Simeonova & Fishbein, 2004). Asimismo, hay diversas publicaciones sobre los incidentes de derrames o fugas de aguas residuales cianurados de la minería durante el proceso de lixiviación de oro, generando así la contaminación en diferentes ecosistemas, siendo las más sensibles las comunidades acuáticas (Gurbuz et al., 2009; Moran, 2001; Valera, 2014).

En la actualidad, para el tratamiento de efluentes cianurados se realiza mediante métodos físicos, químicos y biológicos (Griffiths et al., 2014; Kaita et al., 2018; Patil & Paknikar, 2000). Sin embargo, según investigaciones de Dash et al., (2009) y Pal & Kumar (2014) los tratamientos biológicos tienen una mejor eficiencia en la biodegradación de cianuro por ser amigables con la naturaleza y su bajo costo en comparación a los tratamientos físicos y químicos. En cuanto al tratamiento biológico consiste en el uso de microorganismos como *Rhodococcus sp*, *Pseudomonas putida*, *P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Bacillus sp*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella sp* y etc, capaces de metabolizar cianuro en compuestos menos tóxicos como amoníaco, metano, CO₂, entre otros (Baxter & Cummings, 2006; Lottermoser, 2010; Lovasoa et al., 2017). Por otra parte, las reacciones de biodegradación de cianuro son influenciadas por parámetros ambientales como el pH, temperatura y la disponibilidad de sustrato (Dash et al., 2009; Luque et al., 2016).

Por lo tanto, es indispensable comprender cómo los diferentes parámetros fisicoquímicos influyen en la biodegradación de cianuro en aguas residuales industriales, para poder obtener un proceso óptimo y rentable, debido a que cada microorganismo tiene sus

propios parámetros fisicoquímicos para su crecimiento óptimo (Mirizadeh et al., 2014; Razanamahandry et al., 2016). En caso de género *Klebsiella* presenta una excelente biodegradación de cianuro entre 25 a 35° C, en concentraciones iniciales de cianuro a partir de 100 a 500 ppm y a pH neutro a alcalino (Calisaya, 2017; Chen, Kao et al., 2008; Khamar, Makhdoumi et al., 2015; Luque et al., 2016; Razanamahandry et al., 2016). Sin embargo, no hay trabajos respecto a la optimización de parámetros fisicoquímicos en medios alcalinos o la interacción de estos parámetros en el proceso de biodegradación (Kumar et al., 2017; Lovasoa et al., 2017), la cual es requisito indispensable para realizar el escalamiento en aplicaciones a nivel industrial.

El objetivo del presente estudio fue determinar los parámetros de temperatura, pH y concentración inicial de cianuro libre óptimo de la biodegradación de cianuro por *Klebsiella sp*, utilizando biorreactores aireados.

1.1 Planteamiento del problema

Teniendo en consideración que los factores ambientales como la temperatura, pH y concentración inicial de cianuro influyen en la biodegradación de cianuro por la cepa *Klebsiella sp* y, además, considerando que no hay trabajos respecto a la optimización de parámetros fisicoquímicos en medios alcalinos o la interacción de estos parámetros en el proceso de biodegradación por la cepa. Se ve, la necesidad de desarrollar y optimizar la metodología de biodegradación de cianuro por la cepa de *Klebsiella sp*, el cual es un paso necesario para el escalamiento del proceso de biodegradación de cianuro a nivel industrial.

Es así como se plantea la siguiente pregunta:

¿Cuál es la capacidad biodegradativa de cianuro por *Klebsiella sp* a diferentes concentraciones de cianuro, temperatura y pH en condiciones de biorreactor aireado?

1.2 Hipótesis

La capacidad de biodegradación de cianuro por *Klebsiella sp* es del 90 % a una concentración inicial de cianuro entre 200 a 300 ppm, temperatura entre 25 – 30 °C, pH entre 9,5 y 10,5 durante 72 horas.

1.3 Justificación

En la actualidad, los problemas ambientales han ido creciendo en forma desmedida llamando la atención del mundo entero por lo que se vienen desarrollando una serie de programas más estrictos a nivel nacional e internacional con el objetivo de aunar esfuerzos en el diseño de políticas y estrategias que permitan alcanzar un equilibrio entre las actividades realizadas por el hombre con el ambiente. Dentro de este contexto, los compuestos cianurados son subproductos de procesos industriales, los cuales tienen el potencial de influir negativamente en los suelos, aguas y aire. Dada esta situación muchos países se ven obligados a buscar alternativas amigables con la naturaleza y a su vez optimizar los parámetros fisicoquímicos de dichas alternativas para el tratamiento de efluentes cianurados, que permitan revertir los efectos adversos de la contaminación en los ecosistemas y en los individuos que los habitan, promoviendo los procesos naturales de remoción de contaminantes. Dicho lo anterior,

la optimización de parámetros fisicoquímicos en la biodegradación de cianuro por *Klebsiella sp* podría ser una alternativa de disminución de este contaminante a nivel industrial.

Por lo tanto, se justifica el proyecto por las siguientes razones: Costo y tiempo: Disminución del costo y tiempo en la biodegradación y eliminación del efluente cianurado, siendo un paso necesario para el escalamiento del proceso de biodegradación de cianuro a nivel industrial. Relevancia ambiental: Mejor calidad del medio ambiente, siendo así una alternativa para muchas empresas industriales, como por ejemplo la industria minera, para la aplicación de esta tecnología en el tratamiento de sus residuos cianurados, donde sus emisiones y efluentes pasan por tratamientos para mitigar la contaminación ambiental.

Por otra parte, la optimización de la biodegradación de cianuro por *Klebsiella sp* responde al actual desarrollo tecnológico en los diferentes campos de la actividad humana, al avance científico y la dinámica social que demandan de una permanente innovación industrial como respuesta a las necesidades del mundo moderno.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Evaluar la capacidad biodegradativa de cianuro por *Klebsiella sp* a diferentes concentraciones de cianuro libre, temperatura y pH en condiciones de biorreactor aireado.

1.4.2 Objetivos específicos

- Determinar la biodegradación de cianuro libre, en biorreactor aireado, por *Klebsiella sp*, a diferentes condiciones de temperatura, pH y concentración de cianuro.
- Evaluar la eficiencia y tasa de biodegradación de cianuro libre por *Klebsiella sp*.
- Establecer las condiciones óptimas de temperatura, pH y concentración de cianuro libre, en la biodegradación de cianuro por *Klebsiella sp*, utilizando el diseño Box-Behnken.

1.5 Marco teórico

1.5.1 Cianuro

El término cianuro se refiere a todos los compuestos de cianuro que se puede determinar como el ion cianuro (Donato et al., 2017).

Cianuro es un grupo de compuestos que contiene un grupo $C\equiv N$: un átomo de carbono vinculado con un átomo de nitrógeno por triple enlaces moleculares. Los compuestos de cianuro son usualmente categorizados en 3 grupos: el primer grupo llamado cianuro libre está relacionado con el ion de cianuro CN^- (producido por la disolución de cianuro de sodio o potasio en agua) y el gas de cianuro de hidrógeno (HCN); el segundo grupo está relacionado con complejos débiles y moderadamente fuertes formado entre el ion cianuro y algunos metales como Zn, Ni, Ag, Cd, Hg; el tercer grupo está relacionado con fuertes complejos formados entre el ion cianuro y el ion Fe (Mudder & Botz, 2004). Otras formas de cianuro incluyen cianatos y nitrilos. El cianuro es producido por procesos naturales y antropogénicos (ver Tabla 1).

Tabla 1.
Formas de cianuro

Clasificación	Compuestos
Cianuros inorgánicos	
1.1. Cianuro libre	CN ⁻ , HCN
1.2. Cianuros simples	
a) Solubles	NaCN, KCN, Ca(CN) ² , Hg(CN) ²
b) Sales neutras insolubles	Zn(CN) ² , Cd(CN) ² , Ni(CN) ² , CuCN, AgCN
1.3. Complejos de cianuros débiles	Zn(CN) ₄ ²⁻ , Cd(CN) ₃ , Cd(CN) ₄ ²⁻
1.4. Complejos de cianuro moderadamente	Cu(CN) ₂ ⁻ , Cu(CN) ₃ ²⁻ , Ni(CN) ₄ ²⁻ , Ag(CN) ₂ ⁻
1.5. Complejos de cianuros fuertes	Fe(CN) ₆ ⁴⁻ , Fe(CN) ₆ ³⁻ , Fe(CN) ₅ ²⁻ , NO, Co(CN) ₅ ⁴⁻
Cianuros orgánicos (nitrilos)	
2.1. Alifáticos	Propionitrilo, acetonitrilo, acrilonitrilo, etc.
2.2. Aromáticos	Benzonitrilo, cianopiridina, etc.
2.3. Glucósidos cianogénicos	Linamarina , amigdalina, durrin, etc
2.4. Cianolípidos	

Fuente: Luque, 2005

El cianuro como ion cianuro (CN⁻) se hidroliza en el aire húmedo y en soluciones acuosas de acuerdo con la siguiente reacción (1).



La variación de cianuro libre y ácido cianhídrico depende fuertemente del pH (Donato et al., 2008). En condiciones

normales de presión y temperatura, las concentraciones de HCN y CN^- son iguales a un valor de pH de aproximadamente 9,38. En la Figura 1 se muestra la relación del cianuro de hidrogeno (HCN) y ion cianuro CN^- respecto al pH; por ejemplo a un pH 11, el 99 % del cianuro existirá como CN^- , mientras que a pH 7, el 99 % del cianuro existirá como HCN es altamente soluble en agua, su solubilidad disminuye con el aumento de temperatura y bajo condiciones altamente salinas (Raybuck, 1992).

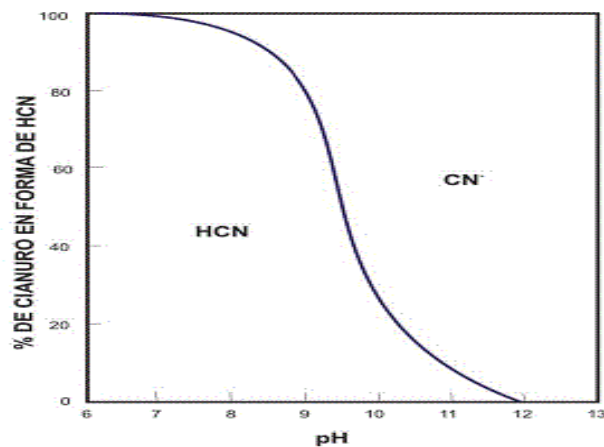


Figura 1. Relación del cianuro de hidrógeno (HCN) y (CN^-) con el pH (Scott & inglés, 1981).

1.5.2 Fuentes de producción de cianuro.

La producción de cianuro puede tener un origen natural o antropogénico.

a. Procesos naturales

El cianuro se produce naturalmente en el medio ambiente por bacterias, algas, hongos y numerosas especies de plantas que incluyen frijoles, frutas, verduras y raíces. La síntesis biológica de cianuro, denominada cianogénesis, se descubrió en plantas en 1 803, mientras que en microorganismos se demostró por primera vez en el hongo *Marasmius oreades* (Harris & Knowles, 1983). En bacterias el cianuro es producido por un número reducido de especies de *Pseudomonas* (Tabla 2), principalmente *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *Chromobacterium violaceum* y algunas cianobacterias. Aproximadamente 300 especies de hongos pertenecientes a 52 géneros son cianogénicos, los cuales incluyen cepas de los géneros *Clitocybe*, *Marasmius*, *Pholiota*, *Polyporus* y *Tricholoma* (Lovasoa et al., 2017). Respecto a las plantas cianogénicas se han contabilizado aproximadamente 2 600 especies con dicha

capacidad, incluyendo helechos, gimnospermas y angiospermas (Lovasoa et al., 2017; Razanamahandry et al., 2016).

Entre estas plantas se incluyen especies con importancia agrícola y alimenticia, tales como la almendra, el durazno, el bambú, la judía, la yuca, el castaño de cajú, el cerezo, la patata, el sorgo y la soja. Muchas plantas comunes contienen formas naturales de cianuro como glucósido cianico (Aazam, 2014). Varias plantas producen cianuros (Figura 3), sin embargo, en la mayoría de los casos; el cianuro está presente en cantidades extremadamente pequeñas. Las plantas producen cianuro como mecanismo de defensa contra herbívoros (Refsgaard et al., 2010; White et al., 1988).

En el reino animal la síntesis biológica de cianuro está restringida a los artrópodos (miriápodos e insectos). Si bien todos los artrópodos cianogénicos son capaces de sintetizar glucósidos cianogénicos de *novo*, muchos lepidópteros poseen la capacidad de secuestrar los producidos por sus plantas hospedadoras (Kumar et al., 2017; Sirianuntapiboon et al., 2008).

La combustión incompleta durante los incendios forestales es una importante fuente ambiental de cianuro, y la combustión incompleta de sustancias que contienen nylon produce cianuro a través de la despolimerización.

Tabla 2.
Microorganismos cianogénicos

REINO	MICROORGANISMOS	
Monera	<i>Chromobacterium violaceum, Burkholderia cenocepacia, Rhizobium leguminosarum, Pseudomonas aeruginosa, P. fluorescens, P. entomophila, P. aureofaciens, Anacystis nidulans, Nostoc muscorum, Plectonema boryanum</i>	
Fungi	<i>Marasmius oreades, Pholiota aurea, Stemphyllus loti, Gloeocercospora sorghii, Pleurotopus sp., Clitocybe sp., Polyporus sp., Tricholoma sp., Leptosphaerium maculans.</i>	
Plantae	Organismo	Glucósido
	<i>Prunus</i> (almendro, cerezo, ciruelo, melocotonero, albaricoquero), <i>Malus</i> (manzano) y <i>Pirus</i> (peral).	Amigdalina
	<i>Eucalyptus</i>	Purasina
	<i>Sambucus</i> (sauco)	Sambunigrina
	<i>Vicia</i> (haba)	Vicianina
	<i>Sorghum</i> (sorgo)	Durrina
	<i>Taxus</i> (tejo)	Taxifilina
	<i>Phaseolus</i> (judía), <i>Linum</i> (lino), <i>Manihot</i> (mandioca), <i>Trifolium</i> (Trébol), <i>Lotus</i> , <i>Dimorphotheca</i>	Linamarina
	<i>Acacia</i> .	Acacipetalina
<i>Triglochin</i> (junco)	Triglocina	
Animalia	<i>Miriápodos</i> (diplopodos y quilópodos)	
	<i>Insectos</i> (lepidópteros, coleópteros y heterópteros)	

Fuente: Pedregosa, 2016

b. Producción antropogénica

Desde sus primeros usos comerciales en Nueva Zelanda hace más de un siglo, en el año 1889, el cianuro ha sido utilizado ampliamente por la industria en todo el mundo. Este compuesto constituye uno de los pilares fundamentales para la industria química, debido tanto a la facilidad con la que reacciona con otras sustancias como a su composición de carbono y nitrógeno. La producción industrial de cianuro a nivel mundial asciende a 2-3 millones de toneladas anuales (Luque, 2005). Las empresas más importantes a nivel mundial en la producción de compuestos cianurados son: Dupont (Estados Unidos), ICI (Inglaterra) y Degussa Corporation (Alemania). El 80 % de cianuro es utilizada en la producción de nitrilos, nylon, plásticos acrílicos, así como en la fabricación de pinturas, adhesivos, cosméticos, colorantes, medicamentos, agentes quelantes, etc. El cianuro se usa también en aplicaciones fotográficas y en la producción de caucho sintético. En algunas ocasiones este tóxico se ha utilizado como fungicida, insecticida y raticida. Además, tanto el humo generado en la combustión de polímeros

que contienen nitrógeno como el procedente de los cigarrillos provoca contaminación por HCN en el aire (Luque, 2005).

Otras aplicaciones industriales incluyen la galvanoplastia, el procesamiento de metales y el endurecimiento de acero, constituyendo estas actividades una fuente muy importante de residuos industriales cianurados enriquecidos en metales donde la forma de cianuro predominante son los complejos cianuro-metálicos (Huertas et al., 2010; Luque, 2005). La minería es uno de los sectores que genera más residuos cianurados, ya que utiliza aproximadamente el 20 % de la producción mundial de cianuro.

Los nitrilos son una forma de cianuro producidos tanto de forma natural como artificial en una gran variedad de industrias. Estos compuestos son utilizados como disolventes, productos farmacéuticos, plaguicidas y como intermediarios en la síntesis orgánica de aminas, amidas, ácidos carboxílicos, aldehídos, cetonas y compuestos heterocíclicos (Kim et al., 2011; Lottermoser, 2010; Park et al., 2017). Entre los nitrilos más ampliamente utilizados como herbicidas se encuentran los

halobenzonitrilos (bromoxinilo, clorotalonilo, diclorobencilo e ioxinilo). Como consecuencia del uso industrial tan extendido del cianuro se han registrado numerosos incidentes y desastres medioambientales, algunos de los cuales se presentan en la Tabla 3. Este tipo de acontecimientos han originado numerosas protestas de grupos ecologistas en contra de la utilización industrial del cianuro.

Tabla 3.
Incidentes históricos producidos por residuos industriales cianurados

Tipo	Año	Localización	Descripción
Derrames y fugas	1984	Bhopal (India)	Escape de isocianato de metilo en una fábrica de pesticidas propiedad de la compañía estadounidense Union Carbide. 30.000 muertos y 500.000 heridos.
	1995	Guyana	Derrame de más de 3,2 billones de litros de cianuro por el derrumbe de una presa en la mina de oro Omai.
	2000	Papúa Nueva Guinea	Derrame al océano de cianuro sódico procedente de la mina Lihir.
		Rumanía	Derrame de cianuro procedente de mina de oro cerca de Baia Mare en el noroeste de Rumanía.
		Guyana	Escape provocado de nuevo por la mina de oro Omai.
	2001	China	Derrame hacia el río Luohe de 11 toneladas de cianuro sódico.
		Ghana	Dos derrames en el mes de octubre, de miles de metros cúbicos de aguas contaminadas con cianuro y metales pesados procedentes de la ruptura de tanques en mina de oro.
	2002	Nevada (USA)	Dos derrames de 24.000 L y 40000 L de cianuro debido a la actividad de dos minas (Rawhide Mine y Twin Creeks).
	2003	Ghana	Derrame de cianuro producido por una mina de oro (Tarkwa).
		Nicaragua	Vertido de cianuro hacia el río Bambana procedente por una compañía minera canadiense (Hemconic).
		Oeste de Honduras	Gran derrame de cianuro hacia el río Lara procedente de la Mina de San Andrés.
		Norteamérica	Derrame procedente de la mina Briggs en Balleratt.

	2004	Ghana	Dos derrames de cianuro procedentes de minas de oro (Compañía canadiense "Bogoso Gold Limited" y "Prestea Sankofa Goldmine").	
		Australia	Dos derrames de cianuro y metales pesados a aguas subterráneas, procedentes "Kalgoorlie Gold".	
		Papua Nueva Guinea	Derrame producido en el desmantelamiento de la mina "Misima", filial de "Placer Dome".	
		China	Siete escapes de ácido cianhídrico procedentes de una mina de oro en Beijing (Huairou). Murieron tres personas y 15 fueron hospitalizadas.	
		Nueva Zelanda	Derrame de 180 litros de cianuro.	
		Rumanía	Derrame de 10 toneladas cianuro hacia el río Siret.	
	2005	Rumanía	Derrame procedente de explotación minera "Bursa" hacia el río Tisza.	
		Filipinas	Dos derrames de cianuro procedentes de la mina "Lafayette".	
		Laos	Derrame de cianuro procedente de la mina de oro "Phu Bia" perteneciente a una compañía australiana.	
		Ghana	Derrame al río Kubekro por una filial de "Bogoso Gold Limited".	
	2006	Ghana	Derrame de tanques de cianuro de "Bogoso Gold Limited".	
	Accidentes en el transporte	1998	Kyrcyzstan	Derrame durante el transporte de cianuro a la mina Kumtor en Kirguistán con casi dos toneladas de cianuro de sodio en las aguas superficiales locales, provocando 4 muertos y cientos de heridos.
		2000	Papúa Nueva Guinea	Derrame durante el transporte de cianuro de sodio, de la compañía minera australiana "Dome Resources" que contaminó un importante sistema acuático en la selva de Papúa Nueva Guinea.
		2002	Australia	Derrame de 400 litros de cianuro.
2003		Taiwán	Derrame durante el transporte, originando la hospitalización de más de 100 personas en el Condado de Taichung por el consumo de agua contaminada.	
Otros	1994	Sudáfrica	Muerte de 10 mineros por la ruptura de una presa en la mina de oro Harmony con la consecuente liberación de barro contaminado con cianuro.	
	2002	México	Secuestro en mina de 8 toneladas de cianuro.	
		Tejas (USA)	Se produjo el secuestro de camiones cargados con cianuro y se comprobó el robo de parte de este.	
	2003	Nueva York (USA)	Potencial ataque terrorista con ácido cianhídrico.	
2015	Tianjin (China)	Dos explosiones en una bodega en el puerto donde se almacenaban productos químicos peligrosos e inflamables como cianuro de sodio. Más de 100 muertos y cientos de heridos.		

Fuente: Estepa, 2016

1.5.3 Contaminación por cianuro

El cianuro es un subproducto industrial o residual como compuestos de hierro cianuro en fase sólida, cuya lixiviación con el tiempo puede dar lugar a la acumulación de cianuro en aguas subterráneas. En algunos sitios, como los de lixiviación galvanoplastia y extracción minera, otros complejos de metal-cianuro pueden ser formado debido a la presencia de otros metales como Cu y Ni. La distribución específica y los puntos críticos de cianuro a nivel industrial se dan por las características de los procesos de producción existentes, y también se determina por las condiciones ambientales que presenta el lugar en el pasado y el presente (Dzombak et al., 2006).

En aguas naturales no contaminadas, los compuestos de cianuro están raramente presentes en concentraciones medibles. Sin embargo, el cianuro se encuentra masivamente en las aguas residuales de las industrias como el plástico, los fertilizantes, herbicidas, colorantes y farmacéutica. En estas aguas las concentraciones de cianuro pueden ser hasta 100

veces mayores que en condiciones naturales (R. Kumar et al., 2017; Lottermoser, 2010).

a. Problemas de contaminación con el cianuro a nivel de Perú.

En el Perú, la industria minera, viene usando el cianuro de sodio en sus procesos productivos durante varias décadas, en estos últimos años las preocupaciones y reclamos de las poblaciones 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 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 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 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 et al., 2007).

En región Tacna con el nuevo proyecto Pucamarca de Minsur S.A. en ejecución, está generando 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 et al., 2007).

1.5.4 Toxicidad del Cianuro

El cianuro es un elemento tóxico cuya química y toxicología han sido bien estudiadas (Akcil, 2003), la evaluación de toxicidad del cianuro en aves acuáticas y estudios epidemiológicos sobre los efectos a la salud humana han sido realizados por Gurbuz et al., (2009); Gupta et al., (2016) y Khamar et al., (2015). El cianuro es altamente tóxico y su toxicidad está relacionada con su especificación fisicoquímica. El cianuro de hidrógeno (HCN) y la forma de cianuro libre (CN⁻), se clasifican como más tóxicos debido a su alto potencial de inhibición metabólica (Lottermoser, 2010; Ram, 2010).

El cianuro en solución a través del consumo de aguas superficiales es la vía de exposición principal para la mayoría de los animales víctimas de envenenamiento por cianuro, la exposición simultánea a través de la inhalación y la absorción por la piel también puede ocurrir. Los ríos, lagos y mares pueden contaminarse por cianuro causando daños en la diversidad acuática; los estudios toxicológicos han indicado que la exposición a corto plazo a altos niveles de cianuro puede dañar el sistema nervioso, respiratorio y cardiovascular de los animales (Dzombak et al., 2006).

Los animales expuestos a dosis letales de cianuro mueren rápidamente, mientras que en dosis no letales, metabolizan el cianuro y lo expulsan a través de sus heces, aunque existen evidencias de acumulación de algunos complejos metal cianuro en el cuerpos de los peces (Donato et al., 2004; Dzombak et al., 2006). Existen evidencias de daño al ganado ovejuno asociado a su alimentación con algunas especies de sorgo y otras plantas cianogénicas (Mudder & Botz, 2004).

El hecho que el cianuro sea un compuesto muy reactivo explica también su alta toxicidad para los seres vivos, en humanos el cianuro de hidrógeno (HCN) ingerido oralmente puede ser mortal a partir de una dosis equivalente a un grano de arroz (0,027 g), en poblaciones en contacto con este compuesto y fauna, pueden estar expuestas al cianuro a través del aire, agua y alimentos (Simeonova & Fishbein, 2004). La concentración letal media de cianuro de hidrógeno gaseoso es de 100-300 ppm.

La exposición al cianuro en forma líquida, sólida o gaseosa, puede causar absorción rápida por la piel y superficies mucosas, siendo más peligroso cuando se inhala, ya que se distribuye rápidamente a través del cuerpo (Moran, 2001). Cuando existe contacto con la piel, el valor de dosis letal media (LD50) es de 100 mg/kg de peso, el valor LD50 por ingestión del cianuro de hidrógeno es de 50-200 mg/kg de peso (Ram, 2010). Su alto grado de toxicidad lo convierte en un compuesto de gran peligrosidad para la vida, pudiendo originar graves problemas ambientales con destrucción de la vida silvestre, aves, peces, ecosistemas y otros receptores ecológicos, entre los peligros

ecológicos se encuentran la mortalidad y la reducción en el crecimiento y la reproducción en las especies representativas (Dzombak et al., 2006; Lottermoser, 2010).

El efluente de una planta de recuperación de oro típicamente contiene entre 0,1 a 100 ppm de CN^- , 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 hidrógeno (HCN) gaseoso cerca del pozo de tratamiento. Se tiene registrado algunos accidentes que causaron la muerte masiva de peces y vida acuática. 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).

1.5.5 Biodegradación

La biodegradación se refiere al resultado de la actividad biológica que altera la estructura molecular del contaminante y es el grado de alteración el que determina si se ha producido biotransformación o mineralización. La biotransformación es la descomposición de un compuesto orgánico en otro similar no contaminante o menos tóxico, mientras que la mineralización es la descomposición a dióxido de carbono, agua y compuestos celulares (Mudder & Botz, 2004).

La biodegradación de un compuesto presente en un determinado ambiente requiere de la presencia de microorganismos capaces de asimilar este compuesto; muchas veces, estos microorganismos son propios del medio en el se realizó el proceso o pueden ser microorganismos aislados que van a ser adaptados posteriormente al sitio de la contaminación o utilizados en biorreactores (Valera, 2014).

Los procesos de biodegradación pueden ocurrir de forma espontánea, como una respuesta del mismo medio ambiente

ante un impacto determinado, o también pueden ser inducidos propiciando las condiciones adecuadas para el crecimiento de los microorganismos nativos del medio ambiente, esto es controlando los valores de humedad, suministro de nutrientes y oxígeno, pH, parámetros necesarios para desarrollo de los microorganismos, entre otros (Mudder & Botz, 2004).

a. Parámetros que afectan la biodegradación

Generalmente los microorganismos, utilizados en procesos de biodegradación, son los procedentes del lugar de la contaminación (microorganismos autóctonos), pues estos ya están adaptados a la presencia del contaminante. También suelen ser introducidos de cepas aisladas, en este caso el proceso de degradación requiere mayor tiempo en la adaptación de los microorganismos al nuevo medio (Valera, 2014).

Es importante determinar los factores que promueven o que inhiben el crecimiento y metabolismo de los microorganismos seleccionados, esto es fuentes de energía y

sustrato, condiciones de pH, humedad, Temperatura, suministro de aire, inhibición por toxicidad, entre otros factores (Valera, 2014).

La degradación biológica o biodegradación del cianuro aprovecha de la capacidad de ciertos grupos de microorganismos, mayormente bacterias que utilizan compuestos cianurados como fuente de carbono y/o nitrógeno, convirtiendo el compuesto toxico en sustancias inocuas, otras bacterias necesitan glucosa como fuente de carbono para la supervivencia en presencia de cianuro (Lovasoa et al., 2017). Dentro de estos grupos de microorganismos reportados están bacterias como *Klebsiella oxytoca* (Chena & Liu, 1999), *Pseudomonas pseudoalcaligenes* (Luque et al., 2011), *Bacillus sp* (Mekuto et al., 2017); hongos como *Fusarium oxysporum* (Akinpelu et al., 2017) y algas como *Scenedesmus obliquus* (Lovasoa et al., 2017).

Los microorganismos involucrados en degradación de cianuro poseen 5 vías generales de reacciones para la

biodegradación de cianuro como: reacciones hidrolíticas, reacciones oxidativas, reacciones reductivas, reacciones de sustitución/transferencia y reacciones sintetasas (Gupta et al., 2010), que les permite desarrollarse en ambientes con alta concentración de cianuro (Tabla 4). Donde la biodegradación varía según la composición del medio, tipo y concentración inicial de cianuro y materia orgánica, pH y temperatura. Las condiciones óptimas están en rango de pH 5,2 a 10,5 para bacterias, de 6 a 8,5 para hongos y pH 12 para la planta. La temperatura generalmente se mantiene entre 25 y 50 °C, con la mayoría alrededor de 30 °C para bacterias, 43 °C para hongos y 40 °C para plantas. Cianuro hidratasa a menudo es utilizada por microorganismos como enzima para degradación de cianuro (Lovasoa et al., 2017).

Tabla 4.

Comparación del potencial de biorremediación de cianuro en agua

MICROORGANISMOS	ENZIMA	ORIGEN	COMPONENTE A SER REMOVIDO	CONDICIONES OPTIMAS	DEGRADACION EFICIENTE	PRODUCTO FINAL
BACTERIAS						
<i>Thiobacillus intermedius</i> (Singleton and Smith 1988)	Rhodanase	Pantano salado agua salada	CN ⁻ /50 mM	pantano salado : pH 8.1 agua salada: T 25°C	0.021 μmol min ⁻¹ (sin enzima) 0.042 μmol min ⁻¹ (con enzima)	SCN ⁻ sulfito (SO_3^{2-})
<i>a. Klebsiella sp.</i> <i>b. Klebsiella pneumoniae</i> <i>c. Pseudomonas putida</i> (Silva-avalos et al., 1990)	Nitrilo hidratasa	Agua del arroyo	Tetracyanonickelate (II)(K ₂ [Ni(CN) ₄](TC) KCN	0.25 - 16 mM TCN 0.25 mM KCN / T 41 °C		Ni(CN) ₂
<i>Pseudomonas fluorescens</i> NCIMB 11764 (Kunz et al., 1992)			KCN/50 mM	20 - 50 mM pH 7 / T 31°C	85%/6 h (aerobica) 89%/12 h (anaerobica)	Formamida(HCNOH ₂) or formato(HCOO ⁻)
<i>P. fluorescens</i> NCIMB 11764 (Kunzet et al., 1998)	Cianuro		HCN	pH 7 T 30°C	760 μmol min ⁻¹ ml ⁻¹ (72 h) (sin acido)	NH ₃
<i>P. fluorescens</i> NCIMB11764 (Fernandez et al., 2004)	Cianuro oxigenasa		KCN	10 - 50 μmol T 30 °C	90 - 100%	HCOO ⁻
<i>a. Neurospora crassa</i> , <i>b. Gibberella zeae</i> , <i>c. Aspergillus nidulans</i> (Basile 2008)	Cianuro Hidratasa	Agua residual	KCN 20 mM Metal-cianuro complejos	pH: 5.2 - 9 (a) / 6 - 8.5 (b) 7,5 (c) / 6 - 7 (a), (b), (c) T 27- 43 °C	< 80% (a), (b), (c) 48 h	
<i>Thiobacillus thioparus</i> TH115 (Yamasaki et al., 2002)	tiocianato hidrolasa	Agua de lago	SCN ⁻	T 30°C	93% (38 h)	Sulfuro de carbonilo (COS)
<i>Bacillus sp. (Bacillus safensis, Bacillus licheniformis, and Bacillus tequilensis</i> (Mekuto et al., 2013)			Cyanide compounds	T 37°C	65.5% (200 mg CN/L) 44.3% (400 mg CN/L)	
<i>Micromonospora braunna</i> (Shete and Kapdnis, 2012)	Cianuro Hidratasa	Suelo de jardin	10-1000 ppm Dextrose (fuente de C)	T 30°C (aerobica)	98.79% (100 ppm en 18 h)	HCOOH NH ₃
<i>B. safensis + B. licheniformis + Bacillus tequilensis</i> (Mekuto et al., 2013)		Agua residual	KCN: 200 and 400 mg CN/L	T 37°C	65.5% (8 dias) 200 mg CN/L 44.3% (8 dias) 400 mg CN/L	
<i>B. safensis + B. licheniformis + B. tequilensis + Agrowaste (Ananas comosus extract: 1% v/v, Beta vulgaris extract:1% v/v, Ipomea batatas extract: 1% v/v, spent brewer's yeast: 1% v/v, and whey: 0.5% w/v)</i> (Mekuto et al., 2013)		Agua residual	KCN: 200 and 400 mg CN	T 37°C pH = 9.5	89.5 % (8 dias) 200 mg CN/L 59.75 % (8 dias) 400 mg CN/L	
<i>Burkholderia cepacia C-3</i> (Adjei and Ohta, 2000)			CN ⁻ 260 mg/ L fructosa	T 30°C pH =10	80%	
<i>Pseudomonas sp.</i> (Kao et al., 2003)			CN ⁻ 100 mg L Lactosa, Sucrosa	T 28-30°C pH 9-9.2	60%	
<i>Pseudomonas sp.</i> (Akcil et al., 2003)			CN ⁻ 400 mg L suero	T 30°C pH 9-9.2	89%	
<i>Klebsiella oxytoca</i> (Kao et al., 2003)			CN ⁻ 21 mg L glucosa	T 30°C pH 7	99.90%	
<i>Trametes versicolor</i>			CN ⁻ 400 mg L citrato	T 30°C pH 10.5	30% (Cabu et al., 2006) 100 % (42h)(Akinpelu et al., 2015)	amonio- nitrogeno (NH ₄ ⁺ -N)
<i>Klebsiella oxytoca</i> (Chen et al.,2008)			CN ⁻ 157 mg L glucosa	T 30°C pH 7	26%	
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> CECT5344 (Huertas et al., 2010)			CN ⁻ 40 mg/ L Acetato	T 30°C pH 9.5-10	99.90%	
<i>Klebsiella pneumoniae + Ralstonia sp.</i> (Chaudhari and Kodam, 2010)	tiocianato hidrolasa	agua residual (sitios de efluentes industriales)	KSCN (Thiocyanate)	T 37°C pH 6.0	500 - 2500 mg/L* dia	H ₂ S
<i>Bacillus sp.</i> CN-22 (Wu et al., 2014)	Cianuro Hidratasa	agua residual (Efluente galvánico)	HCN 700 mg/ L	T 31°C pH, 10.3	200 - 6.62 mg/L 72 h	HCOOH NH ₃
Bacteria + <i>Cassava peels</i> (Siller and Winter, 1998)		agua residual	KCN	T 25-37°C pH 6-7.5		HCOO (formato) NH ₃
<i>Enterobacter sakazakii (a)</i> <i>Azotobacter sp (b)</i> <i>Rhizobium sp (c)</i> (Ninan et al., 2013)		agua residual	KCN	MIC 5000 ppm (a) MIC 50 ppm (b), (c)	99% (96 h)	
<i>Pseudomonas fluorescens + Chlorella vulgaris.</i> (Kiruthika, 2008)			CN 0.5 mg +glucosa 1 g (a) CN 0.5 mg + glucosa 1 g + NaCl 1 g (b) CN 1 mg + glucosa 1g + NaCl 1 g (c) CN 1 mg + glucosa 1 g + NaCl 1g (d)	T 30°C pH 7.2 (a), (b) T 30°C pH 8.5 (c), (d)	60% (a) 58% (b) 54% (c) 51% (d)	

HONGOS						
<i>Fusarium solani</i> (Barclay et al., 1998)	Cianuro Hidratasa		KCN 80 mM		Km: 4.7 mM Vmax : 1.7 microM min/mg	
<i>Gloeocercospora sorghi</i> (Jandhyala, 2002)	Cianuro Hidratasa		KCN 30 mM		Km: 90 mM Vmax: 4.4 mmol min /mg	
<i>Gloeocercospora sorgh</i> (Basile, 2008)	Cianuro Hidratasa	agua residual	KCN 20 mM Metal-cianuro complejos.	pH: 6 – 8.5 / T: 27- 43°C	< 80% (after 48 h)	
<i>Aspergillus awamori</i> (Santos et al., 2013)	Nitrogenasa	agua residual	KCN 0-475 ppm	Citrus peel , T : 45 -50°C and pH: 4.0 to 5.5	120- 210 mg/L	
<i>Fusarium oxysporum vulgari s</i> (Agrowaste) (Akinpelu et al., 2015)		agua residual de mina de oro	Metal cianuro + KCN 500 mg CN/ L		83 - 263 mg CN/ L	NH ⁴⁺ -N
PLANTAS						
<i>Citrus sinensis</i> (Santos et al., 2013)		<i>Citrus sinensis</i> residuo sólido	(F-CN) 100 mg/ L + 0.1% (w/v) de <i>Citrus sinensis</i> no hidrolizable (a) (F-CN) 100mg/L F + 0.1% (w/v) de <i>Citrus sinensis</i> no hidrolizable (b) F-CN + metales pesados 10 mg/ L(c)	T 50 °C pH 12 (a) et (b) T 40 °C pH12 (c)	17.82 % (a) 62.48 % (b) 26.35 % (c)	

Fuente: Lovasoa, 2017.

1.5.6 Degradación del cianuro en el ambiente

a. Degradación natural de los compuestos cianurados.

Por ser un compuesto natural, el cianuro es biodegradable (Harris & Knowles, 1983). Los procesos de degradación natural pueden reducir, a largo del tiempo, la

concentración de las formas tóxicas del cianuro, en soluciones con valores muy bajos de esta sustancia. El principal mecanismo de degradación natural del cianuro es la volatilización, con posteriores transformaciones atmosféricas a sustancias químicas menos tóxicas. Otros factores como la oxidación biológica, la hidrólisis, la precipitación y los efectos de la luz solar (fotólisis), también contribuyen a la degradación del cianuro. En algunos casos, las combinaciones de estos procesos de degradación natural son suficientes para satisfacer los requisitos que reglamentan la descarga de soluciones que contienen cianuro (Dzombak et al., 2006; Lottermoser, 2010).

A pesar de que estos procesos son efectivos, no siempre tienen una cinética tan rápida como para ser considerados en propósitos industriales (20 mg/L de cianuro total puede degradarse en aproximadamente 100 días), por lo que es necesario trabajar con otros sistemas de detoxificación (Donato et al., 2007; Kumar et al., 2017). Además, los porcentajes de degradación varían según las formas y concentraciones del cianuro, la temperatura, el pH, la

población microbiana presente, la exposición a la luz, etc.; por lo que resulta difícil de medir y controlar (Lottermoser, 2010).

b. Tratamientos fisicoquímicos de los compuestos cianurados

Los efluentes industriales mineros contienen típicamente concentraciones entre 0,1 a 100 ppm de CN^- , mientras que en efluentes de industrias galvanoplásticas pueden encontrarse concentraciones de cianuro entre 0,1 a 1 000 ppm de CN^- (Yoges, 2013). Actualmente existen muchos tratamientos fisicoquímicos para tratar los residuos cianurados, entre ellos están la cloración alcalina, ozonización, precipitación, acidificación, oxidación electrolítica, el proceso desarrollado por la compañía minera canadiense (con SO_2 /aire), peróxido de hidrógeno, ácido de Caro, absorción con carbón activado, ósmosis reversa, hidrolisis térmico, etc (Mudder & Botz, 2004). La selección del tratamiento más apropiado y económico depende de muchos factores tales como: las características fisicoquímicas del efluente, la cantidad del efluente a tratar, la matriz del

efluente, la calidad de tratamiento requerida, el costo y otros factores relacionados al efluente (Dzombak et al., 2006).

Muchos de estos métodos resultan ser muy efectivos para remover el cianuro; sin embargo, algunos son muy caros y/o difíciles de operar. Además, en muchos casos no se llega a eliminar completamente el cianuro y en otros se requieren de tratamientos adicionales. En vista de estas limitaciones, existe una necesidad de desarrollar tratamientos alternativos capaces de producir altos niveles de degradación del cianuro a un bajo costo (Akcil, 2003; Akcil et al., 2015).

c. Tratamientos biológicos de los compuestos cianurados.

En comparación con la degradación natural y los métodos fisicoquímicos, los tratamientos biológicos son más rápidos, económicos y eficientes ya que requieren poco capital, bajos costos operativos y no produce productos intermediarios tóxicos (Akcil, 2003; Dash et al., 2009). La biodegradación hace referencia a las reacciones que convierten el cianuro a moléculas orgánicas o inorgánicas

más simples, las cuales pueden ser fácilmente metabolizadas a amonio y dióxido de carbono o metano. Las vías de biodegradación son utilizadas principalmente por organismos procariotas y probablemente representan una de las primeras respuestas evolutivas a la presencia de cianuro en el ambiente. La asimilación hace referencia a la incorporación del cianuro directamente en compuestos orgánicos. Las vías de asimilación están presentes tanto en procariotas como en eucariotas (Dzombak et al., 2006). Todas las vías degradativas dependen de los mecanismos de tolerancia al cianuro que presenten los microorganismos. Entre estos mecanismos de tolerancia se encuentra: la existencia de rutas de degradación de cianuro (Luque et al., 2005; Luque et al., 2018).

Los microorganismos envueltos en los tratamientos biológicos del cianuro y compuestos cianurados incluyen usualmente una mixtura heterogénea de bacterias y hongos, encontrados comúnmente en el suelo y adaptados por exposición continua a estos compuestos (Mudder & Botz, 2004). Sin embargo, la biodegradación del cianuro es una

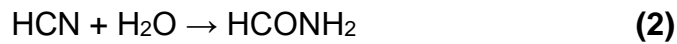
propiedad intrínseca de ciertos microorganismos y no requiere necesariamente de una exposición previa para inducir esta propiedad (Patil & Paknikar, 2000).

1.5.7 Mecanismos de la biodegradación de cianuro

Los microorganismos no se rigen bajo un solo mecanismo de biodegradación (Tabla 5). Diversas investigaciones han determinado que los microorganismos pueden actuar de acuerdo a 5 vías generales de reacción (Blumer & Haas, 2000; Dubey & Holmes, 1995; Gupta et al., 2010b).

Reacciones hidrolíticas: Este tipo de reacciones son predominantes cuando se presentan altas concentraciones de cianuro. Es muy común en hongos (Gupta et al., 2010). Son catalizadas por enzimas como cianuro hidratasa, nitrilo hidratasa, cianidasa y nitrilasa, encargadas de degradar el cianuro a través de las siguientes reacciones (Molina et al., 2006).

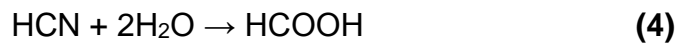
Cianuro hidratasa:



Nitrilo hidratasa:



Cianidasa:

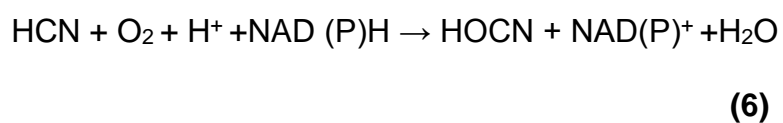


Nitrilasa:

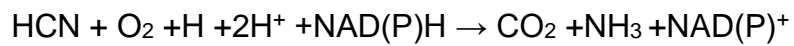


Reacciones oxidativas: Bajo este tipo de mecanismo se generan amoníaco y dióxido de carbono. Estas enzimas requieren una fuente extra de carbono además del cianuro (Gupta et al., 2010). Es predominante a bajas concentraciones de cianuro. Esta ruta, forma amonio y CO_2 , por medio de la enzima cianuro monoxigenasa, la cual convierte el cianuro en cianato. El cianato es catalizado por la cianasa donde se convierte en amonio y CO_2 ; una segunda ruta utiliza cianuro dioxigenasa (Gupta et al., 2010).

Cianuro Monoxigenasa:

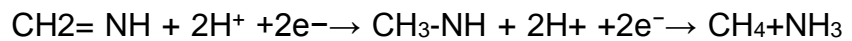
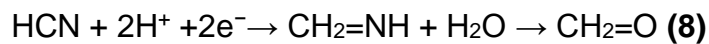


Cianuro Dioxigenasa:



(7)

Reacciones reductivas: Se considera que ocurren en condiciones anaerobias (Gupta et al., 2010). Algunos microorganismos, en condiciones facultativas, pueden degradar el cianuro en ausencia de oxígeno, hasta convertirse en metano, amoníaco y formaldehído (Ebbs, 2004).



(9)

Reacciones de sustitución /transferencia: Implican la asimilación del cianuro para el crecimiento celular, proporcionando una fuente de nitrógeno adicional y evitando la toxicidad del cianuro (Gupta et al., 2010). Se ha reportado la producción in vivo de tiocianatos a partir de cianuro por acción de la enzima cianuro sulfotransferasa, presente en algunos microorganismos. El cianuro puede ser convertido a β -

cianoalanina o α -aminonitrilo, catalizado por β -cianoalanina sintetasa, seguida por hidrólisis, donde se libera NH_3 y un ácido. Otras rutas producen tiocianato, que es menos tóxico. Este compuesto, producido por la enzima sulfurtransferasa, podría entonces ser biodegradado por rutas como carbonilo o la del cianato (Ebbs, 2004; Gupta et al., 2010).

Cianoalanina sintetasa:



Tiosulfato: cianuro sulfurtransferasa:



Reacciones de sintetetas: Esta vía es también una vía de asimilación de cianuro. Se trata de la síntesis de aminoácidos, β -Cianoalanina y ácido γ -Ciano- α -Aminobutírico, mediante el uso de residuos de aminoácidos como precursores, que reaccionan con compuestos de cianuro (Gupta et al., 2010).

Existen microorganismos que pueden utilizar más de un mecanismo, incluso otros que utilizan diferentes a los ya mencionados (Ebbs, 2004). En algunos casos, los consorcios bacterianos utilizados en los procesos de biodegradación de cianuro suelen venir acompañados de bacterias nitrificantes, que se encargan de degradar el amoníaco producido, excedente que no toman las demás bacterias como fuente de nitrógeno (Luque-Almagro et al., 2018; Razanamahandry et al., 2016).

Tabla 5.
Rutas de degradación de cianuro.

Rutas	Microorganismos degradantes de cianuro
Cianuro monoxigenasa	<i>Pseudomonas sp.</i>
Cianasa	<i>Escherichia coli, Rhodococcus rhodochrous</i>
Cianuro dioxigenasa	<i>Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas cereus, Bacillus pumillus</i>
Cianuro hidratasa	Hongos patógenos
Nitrilo hidratasa	<i>Pseudomonas, Corynebacterium, Brevibacterium</i>
Cianidasa	<i>Alcaligenes xylosooxidans</i>
Nitrilasa	<i>Klebsiella, Arthrobacter, Pseudomonas, Nocardia</i>
Rodanasa	<i>Thiobacillus denitrificans, Bacillus subtilis, Bacillus stearothermophilus</i>
Cianoalanina sintetasa	<i>Bacillus magaterium</i>

Fuente: Pedregosa, 2016

1.5.8 *Klebsiella sp* en la biodegradación de cianuro.

Las cepas bacterianas del género *Klebsiella* degradan cianuro y tiocianato. Según estudios de Kao et al. (2003) y Ebbs (2004) se reportó el aislamiento de *Klebsiella oxytoca* en efluentes industriales con altas concentraciones de cianuro, asimismo indica que la bacteria *Klebsiella oxytoca* utilizó el cianuro como fuente de nitrógeno, biodegrádalos en amoníaco, metano y CO₂.

En la investigación de Chaudhari & Kodam (2010) reportaron a las bacterias *Klebsiella pneumonia* y *Ralstonia sp* aislados de una industria de galvanoplastia, las cepas bacterianas fueron capaces de degradar tiocianato en un rango de 500 a 2 500 ppm de concentración de tiocianato a un pH 6,0 y 37 °C, siguiendo una ruta de tiocianato hidrolasa. Por otra parte, Kao et al. (2006), reportó aislamiento y biodegradación de tiocianato por *Klebsiella oxytoca* a 150 ppm en 98% en 16 días.

Según estudios de Kao et al. (2006) se ha caracterizado una cepa de *K. oxytoca* de una muestra altamente contaminada con cianuro. Donde demostraron que este organismo podría crecer en medios que contienen KCN hasta 10 mM equivalente a 650 ppm de KCN.

1.5.9 Biorreactores

Son recipientes en los cuales se llevan a cabo reacciones bioquímicas y/o bioprocesos, ya sea con enzimas, microorganismos o células vegetales o animales, viables y no viables. Las reacciones químicas se aprovechan para la transformación y producción de sustancias biológicas y químicas con parámetros controlados (Guzman et al., 2018).

En los biorreactores se procura elevar el grado de rendimiento de la biomasa a través del control de los parámetros que promuevan una mejor actividad biológica, esto es minimizar el tiempo de retención hidráulica y maximizar la eficiencia biodegradable (Guzman et al., 2018).

El medio de reacción en un biorreactor básicamente está constituido por los microorganismos y el sustrato específico que requieren para su desarrollo, este debe proveer de los nutrientes principales: carbono, nitrógeno, fósforo, etc (Guzman et al., 2018).

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material de estudio

La cepa de *Klebsiella sp ALL-1* fue proporcionada por el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de ciencias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, que fue previamente identificada por la empresa MacroGen (Korea) a nivel molecular de un aislado de la planta de tratamiento de aguas residuales de Magollo, localizada en la Región de Tacna.

2.2 Lugar de experimentación

Los ensayos de experimentación fueron realizados en Laboratorio de Biorremediación del proyecto de investigación “Análisis genómico de los microorganismos degradadores de cianuro para la remediación en fase biorreactor, de pasivos ambientales mineros de la región de Tacna” perteneciente a la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann.

2.3 Tipo de investigación

El tipo de investigación fue experimental y aplicada.

Experimental porque consiste en la manipulación de variables experimentales, en condiciones controladas, con el fin de hallar las condiciones óptimas de biodegradación de cianuro por *Klebsiella sp ALL-1*.

Aplicada porque consiste en un avance científico a través de la investigación básica, pero se caracteriza por su interés en la aplicación, utilización y consecuencias prácticas de los conocimientos. La investigación aplicada busca conocer para hacer, actuar, construir o modificar.

2.4 Diseño experimental

Se utilizó el diseño Box - Behnken formado por la combinación de factoriales con diseño de bloques incompletos, este diseño tiene tres variables y tres niveles en cada variable: nivel mínimo (-), nivel intermedio (0), nivel máximo (+).

Para este diseño se empleó el programa statgraphics centurión XVI, para estimar las diferencias significativas del efecto de las variables sobre la tasa de biodegradación de cianuro. Este diseño es usado para medir y comparar dos o más variables para determinar el efecto en una variable dependiente. Son ampliamente usados en la investigación industrial para la optimización (Gutiérrez & Salazar, 2008; Montgomery, 2004).

Tabla 6.

Plantilla de prueba según el diseño experimental Box-Behnken (Statgraphics centurión XVI) a escala codificada y natural de los ensayos de biodegradación en biorreactores con Klebsiella sp ALL-1 como inóculo microbiano.

N° EXP.	ESCALA CODIFICADA VARIABLES			ESCALA NATURAL VARIABLES			CONCENTRACIÓN DEL INÓCULO BACTERIANO
	X ₁	X ₂	X ₃	T (°C)	pH	[CN] ppm	
1	-1	-1	0	25	10,0	300	2x10 ⁸ bact./ml
2	1	-1	0	35	10,0	300	2x10 ⁸ bact./ml
3	-1	1	0	25	11,0	300	2x10 ⁸ bact./ml
4	1	1	0	35	11,0	300	2x10 ⁸ bact./ml
5	-1	0	-1	25	10,5	200	2x10 ⁸ bact./ml
6	1	0	-1	35	10,5	200	2x10 ⁸ bact./ml
7	-1	0	1	25	10,5	400	2x10 ⁸ bact./ml
8	1	0	1	35	10,5	400	2x10 ⁸ bact./ml
9	0	-1	-1	30	10,0	200	2x10 ⁸ bact./ml
10	0	1	-1	30	11,0	200	2x10 ⁸ bact./ml
11	0	-1	1	30	10,0	400	2x10 ⁸ bact./ml
12	0	1	1	30	11,0	400	2x10 ⁸ bact./ml
13	0	0	0	30	10,5	300	2x10 ⁸ bact./ml
14	0	0	0	30	10,5	300	2x10 ⁸ bact./ml
15	0	0	0	30	10,5	300	2x10 ⁸ bact./ml
16	0	0	0	30	10,5	300	2x10 ⁸ bact./ml

Fuente: propia

2.5 Variables de experimentación:

- **Variable independiente**

- Temperatura : 25, 30 y 35 °C.
- pH : 10; 10,5 y 11,0
- [CN⁻] : 200, 300 y 400 ppm.

- **Variable dependiente**

- La tasa de biodegradación de cianuro por *Klebsiella sp ALL-1*.

2.6 Población de estudio

La población de estudio fue la cepa de *Klebsiella sp ALL-1*.

2.7 Caracterización de la cepa *Klebsiella sp ALL-1*

2.7.1 Caracterización bioquímica de la cepa de *Klebsiella sp ALL-1*

Previamente se realizó una reactivación de la cepa de *Klebsiella sp ALL-1*, para obtener un cultivo joven de la bacteria (Escalante, 2002).

Se procedió a la identificación utilizando pruebas bioquímicas, propuesta en el Manual de Bergey, para confirmarlo a nivel de género. Las pruebas bioquímicas utilizadas fueron: TSI, LIA, Citrato de Simmons, Rojo de Metilo, Voges Proskauer e Indol (Garrity et al., 2010).

2.7.2 Caracterización microscópica de la cepa de *Klebsiella sp* ALL-1

A. Tinción Gram

Para la tinción de Gram se realizó el frotis, fijado con calor, luego se agregó el colorante Cristal Violeta y se dejó actuar por 1 minuto; se lavó con agua de caño. Posteriormente se cubrió con solución yodada durante 1-2 minutos, y se lavó nuevamente con agua de caño. Inmediatamente se decoloró con una mezcla de alcohol etílico – acetona. Se escurrió y cubrió con Safranina (color de contraste) durante 1 – 2 minutos. Se volvió lavar, y luego se realizó se realizó el secado. Se observó a 100X en el microscopio (Garrity et al., 2010).

B. Tinción de la cápsula por el método de maneval modificado

La tinción de la cápsula se realizó según el método descrito por Erick et al. (2012): primero se colocó una gota de Rojo Congo en un porta objeto, luego se tomó con un asa bacteriológica un pequeño fragmento de crecimiento de colonia bacteriana. Posteriormente se suspendió la muestra en la gota de Rojo Congo y se realizó un frotis. Después se dejó secar a temperatura ambiente, luego se cubrió la preparación con Maneval B (Fucsina ácida) y se dejó que actúe durante un minuto, luego se lavó el frotis con agua destilada, dejándolo secar al medio ambiente. Se observó a 100X en el microscopio.

2.7.3 Caracterización macroscópica de la cepa de *Klebsiella sp ALL-1*

La cepa *Klebsiella sp ALL-1* se sembró en agar nutritivo y agar Mac Conkey incubándolos a 35 °C por 24 horas, para la observación de las características macroscópicas del crecimiento de las colonias; luego la cepa obtenida fue

sembrada en viales con agar nutritivo y preservadas a 5 °C (Garrity et al., 2010).

2.8 Obtención del inóculo bacteriano para el sistema de biorreactores

2.8.1 Determinación de crecimiento de la cepa *Klebsiella sp ALL-1* en condiciones alcalinos

De un cultivo joven de *Klebsiella sp ALL-1*, se inoculó en 10 mL de medio mineral (9M) a diferentes pH como 9,0; 9,5; 10,0; 10,5; 11,0; 11,5; y 12,0 respectivamente, incubados a 35 °C por 24 horas. Posteriormente fueron sembrados, por el método de siembra en estría en agar nutritivo con pH 9,5 (Suzuki et al., 2014). El conteo de bacterias se realizó en cámara de Petroff Hausser (ANEXO 1 y 2).

2.8.2 Adaptación de la cepa de *Klebsiella sp ALL-1* a diferentes concentraciones de cianuro

La adaptación de la cepa *Klebsiella sp ALL-1* a diferentes concentraciones de cianuro libre se realizó en dos etapas;

En la primera etapa se cultivó la cepa en un medio mineral cianurado (9M) con extracto de levadura al 0,2 % (w/v), a 50 ppm de $[CN^-]$ y pH 10,5 incubándose a 30 °C en condiciones aeróbicas, posteriormente, se realizó la lectura del cultivo cada 24 horas; luego se incrementó la concentración de cianuro libre a 100, 150, 200, y así sucesivamente hasta 500 ppm, con la finalidad de conseguir la adaptación de la cepa *Klebsiella sp ALL-1* en un medio mineral cianuro (9M) con fuente de nitrógeno (Khamar et al., 2015).

En la segunda etapa se cultivó la cepa en un medio mineral cianurado (9M) sin extracto de levadura, a 50 ppm de $[CN^-]$ y pH 10,5 incubándose a 30°C en condiciones aeróbicas, a continuación se realizó la lectura del cultivo cada 24 horas; luego se incrementó la concentración de cianuro a 100, 150, 200,

hasta 500 ppm, utilizando la cepa de *Klebsiella sp ALL-1* adaptada en la primera etapa (Khamar et al., 2015).

Para cada resiembra del proceso de adaptación en el medio mineral cianurado (9M) tanto en la primera y segunda etapa, se verificó el crecimiento bacteriano con un recuento en forma cualitativa con la cámara de Petroff Hausser y siembra en agar nutritivo pH 9,5 (Khamar et al., 2015).

2.8.3 Producción del inóculo de la cepa *Klebsiella sp ALL-1*

Se masificó la cepa de *Klebsiella sp ALL-1* adaptada en medio mineral (9M) sin extracto de levadura, en dos matraces con 250 mL de medio mineral cianuro (9M) a 400 ppm y pH 10,5, con un control en blanco, incubándose a 30 °C, en condiciones aeróbicas (ANEXO 3) (Khamar et al., 2015).

Este procedimiento se realizó con la finalidad de obtener un crecimiento de 2×10^8 bacterias/mL, el conteo se realizó en una cámara de Petroff Hausser.

2.9 Construcción de incubadoras programable con Arduino

Con la ayuda de un estudiante de la Escuela Profesional de Física de la Facultad de Ciencias, se diseñó dos incubadoras programables con un sistema Arduino, donde se podía configurar las temperaturas deseables de 25 °C y 30 °C según requeridos en el diseño experimental de Box-Behnken en el presente estudio (ANEXO 4).

2.10 Evaluación de la biodegradación de cianuro libre, en biorreactor aireado, por *Klebsiella sp*, a diferentes condiciones de temperaturas, pH y concentración de cianuro.

2.10.1 Diseño de los biorreactores.

Para esta experimentación se diseñó y construyó biorreactores aireados con las siguientes características (Guzman et al., 2018; Coaquira, 2014).

Biorreactor de material de plástico autoclavables, de 1,0 L de capacidad con las siguientes dimensiones: 15 cm altura con

10 cm de diámetro; 11 cm de diámetro en la base con tapa hermética de 11 cm de diámetro con dos agujeros de 0,5 y 0,6 mm de diámetro, por donde se instalaron dos pipetas Pasteur para los soportes de las mangueras, una entrada de manguera que sirvió para ser conectado al filtro *vacushield 0.02 um* siguiendo la conexión hasta el motor de aireación de 1,5 L/min y la otra entrada manguera que sirvió para la salida de aire (ANEXO 5).

Todo el sistema de biorreactores (16) fueron conectados a motores de pecera, que generaron en los biorreactores una aireación de aproximadamente 0,15 VVM (volumen de aire por volumen de líquido por minuto).

2.10.2 Acondicionamiento de los biorreactores según el diseño de Box-Behnken.

La determinación de biodegradación de cianuro se llevó a cabo en medio mineral cianurado (9M).

Primero, se preparó el medio mineral (9M) en un recipiente de plástico con 12 Litros de capacidad, luego se reguló el pH a 10,0 (ANEXO 6). A partir del medio mineral (9M) preparado en el recipiente de 12 Litros, se distribuyó 500 mL a cada uno de los 16 biorreactores. Posteriormente, se reguló el pH según los tratamientos descritos en la Tabla 6. Luego se procedió a esterilizar en autoclave los 16 biorreactores a 121°C x 15 libras de presión en 15 minutos (Khamar et al., 2015).

Segundo, se preparó 300 mL de solución madre de cianuro a 10 000 ppm, a un pH 12,5 en medio mineral (9M), la solución se esterilizó por método de filtración.

Tercero, según la regla de diluciones en la ecuación 13, se tomó cantidades de 10 mL, 15 mL y 20 mL de la solución madre de cianuro estéril, para acondicionar las diferentes concentraciones de cianuro libre a los 16 biorreactores según el diseño de Box – Behnken. A continuación, se selló cada biorreactor con cinta parafilm alrededor de la tapa hermética, todo el proceso se realizó en condiciones asépticas.

$$V1 * C1 = V2 * C2 \quad (13)$$

Donde:

V1= volumen inicial;

C1= concentración inicial;

V2= volumen final y

C2= concentración final.

2.10.3 Instalación de los biorreactores para la experimentación.

Se instalaron 16 biorreactores de plástico con forma cilíndrica de un litro de capacidad, estos fueron llenados con 500 mL de medio mineral cianurado (9M), con diferentes concentraciones de cianuro libre, pH y temperaturas, según el diseño de Box Behnken (Tabla 3), con inóculo masificado de 2×10^8 bacterias/mL.

El biorreactor mantuvo las células uniformemente distribuidas en todo el volumen de cultivo con ayuda del suministro de oxígeno a una velocidad tal que proporcionó a los microorganismos el consumo de oxígeno y nutrientes.

2.10.4 Evaluación de la biodegradación del cianuro por *Klebsiella* sp ALL-1

Se tomaron muestras diarias de 15 mL de cada uno de los biorreactores cada 12 horas en un periodo de evaluación de 7 días, y de estas muestras se evaluó el pH (ANEXO 7). Asimismo, en 10 mL de cada biorreactor se evaluó la concentración del cianuro libre presente usando el método titulométrico y en los 5 mL se evaluó la concentración de amonio mediante el método colorimétrico (Carrillo , 2000; Merk, 2013).

a. Método titulométrico (Standard Methods 4500-CN-D) para la cuantificar la concentración de cianuro (Carrillo, 2000)

La técnica Standard Methods 4500–CN–D se basa en la reacción del nitrato de plata con el ión cianuro en solución alcalina para formar el complejo soluble $Ag(CN)_2$.

Según la reacción:



Se utilizó 10 mL de muestra contenida en un matraz de 50 mL para realizar la titulación, se agregó tres 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 al 6,522 %; a continuación, se añadió lentamente la solución de AgNO_3 en el matraz con la muestra, hasta que vire a un color amarillo tenue que indicará el término de la titulación (ANEXO 8).

Finalmente, el gasto de AgNO_3 sirvió para los cálculos de determinación de cianuro que estuvo presente en la muestra titulada. Fórmula de para obtener la concentración de cianuro libre, según Carrillo (2000), es :

$$1 \text{ mL de gasto de } \text{AgNO}_3 = 20 \text{ ppm de } \text{CN}^- \quad (15)$$

b. Método colorimétrico para la detectar amonio (Merk, 2013)

Se realizó usando una tarjeta colorimétrica que midió cantidad de nitrógeno amónico. El nitrógeno amónico ($\text{NH}_4\text{-N}$) se

presenta en forma de iones amonio y amoniaco. Entre ambas formas de aparición existe un equilibrio dependiente de pH.

La concentración de amonio se determinó cualitativamente por comparación visual del color de la solución de medición con las zonas de color amarillo-verde con la escala colorimétrica de amoniaco (ANEXO 9), según Figura 2.

ESCALA COLORIMETRICA	NH ₄ ⁺ (mg/L)	NH ₄ -N (mg/L)
0	0,0	0,00
1	0,2	0,16
2	0,4	0,31
3	0,6	0,47
4	1,0	0,80
5	2,0	1,60
6	3,0	2,30
7	5,0	3,90

Figura 2. Escala colorimétrica de amoniaco (Merk, 2013)

2.11 Determinación de la tasa y eficiencia de biodegradación de cianuro libre por *Klebsiella sp ALL-1*

2.11.1 Tasa de la biodegradación por la cepa *Klebsiella sp ALL-1*

Se realizó para cada uno de los 16 biorreactores del diseño de Box-Behnken. Para esto se usó la siguiente fórmula (Kandasamy et al., 2015).

$$TD(\%) = \frac{(C_i - C_f)}{C_i} \times 100 \quad (16)$$

TD = tasa de biodegradación de cianuro,

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 tasa de biodegradación experimental.

2.11.2 Determinación de la eficiencia en la degradación de cianuro en relación de horas

Se consideró la eficiencia de degradación, donde se determinó la cantidad porcentual de cianuro promedio que se degradó en una hora de tratamiento (Kandasamy et al., 2015). Se aplicó para cada uno de los 16 ensayos. Mediante la siguiente fórmula:

$$E = \frac{TD}{T} \quad (17)$$

E= Eficiencia, **TD**= Tasa de degradación, **T**= total de horas del tratamiento.

2.12 Determinación de las condiciones óptimas de temperatura, pH y concentración de cianuro libre, en la biodegradación de cianuro por Klebsiella sp ALL – 1, utilizando el diseño Box-Behnken

Para la determinar de los valores óptimos, se utilizaron los valores significativos estadísticamente de la tasa de degradación,

usando el programa estadístico Statgraphics Centurión XVI, en otras palabras, los coeficientes de regresión del medio matemático algebraico (fórmula polinómica cuadrática) representará al experimento para optimizar la biodegradación de cianuro (Gilpavas, 2016).

$$\begin{aligned}
 Y = & a_0 + a_1T + a_2pH + a_3[CN^-] + a_4(T)(pH) + a_5(T)[CN^-] \\
 & + a_7T^2 + a_8pH^2 + a_9[CN^-]^2
 \end{aligned}
 \tag{18}$$

Donde:

Y= tasa de biodegradación;

a₀, a₁, a₂, a₃, a₄, a₅, a₆, a₇, a₈, a₉ = coeficientes de la fórmula algebraica

T= temperatura

[CN⁻]= concentración de cianuro

pH = pH

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 tasa de biodegradación optimizado de cianuro.

III. RESULTADOS

3.1 Caracterización de la cepa *Klebsiella sp ALL-1*

3.1.1 Caracterización bioquímica de la cepa *Klebsiella sp ALL-1*

La reactivación de la cepa *Klebsiella sp ALL-1* se realizó en caldo nutritivo, observándose el crecimiento a las 24 horas; para la caracterización macroscópica de las colonias se utilizó agar nutritivo observándose características morfológicas: color cremosas, con textura mucoides y formas redondeadas (Figura 3).

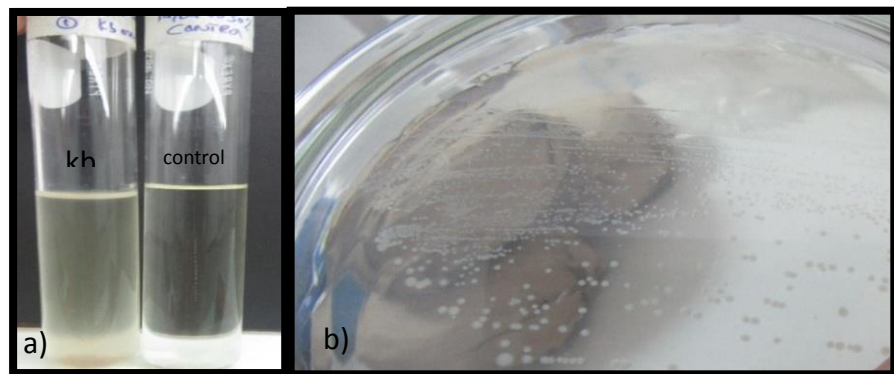


Figura 3. a) Reactivación de la cepa *Klebsiella sp ALL-1* en caldo nutritivo y b) Cultivo de la cepa *Klebsiella sp ALL-1* en agar nutritivo.

Según la Tabla 7 y la Figura 4 se muestran los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas a la cepa *Klebsiella sp ALL-1*, siguiendo la metodología del Manual de Bergey, confirmando que la cepa pertenece al género *Klebsiella*.

Tabla 7.

Resultados de las pruebas bioquímicas realizadas a la cepa Klebsiella sp ALL-1.

PRUEBA BIOQUIMICA	RESULTADOS
TSI	A/A (g), Se observa todo el tubo de color amarillo, fermenta la glucosa, lactosa y sacarosa, con producción de gas (Figura 7 a).
LIA	K/K , Descarbolizaci3n de lisina (+) (Figura 7 b)).
CITRATO	Coloraci3n alcalina, en todo el medio, consumo de citrato como 3nica fuente de carbono, (+) (Figura 7 c).
INDOL	Presencia de anillo de color fucsia en la superficie del medio, indol (+) (Figura 7 d).
VP	La prueba de VP es (+), se observa un anillo de color rojo en la superficie del medio al agregar los reactivos: α -naftol y KOH al 40% (Figura 7 e).
RM	RM (-), no se observa el viraje a rojo (Figura 7 f).

Fuente: Elaboraci3n propia

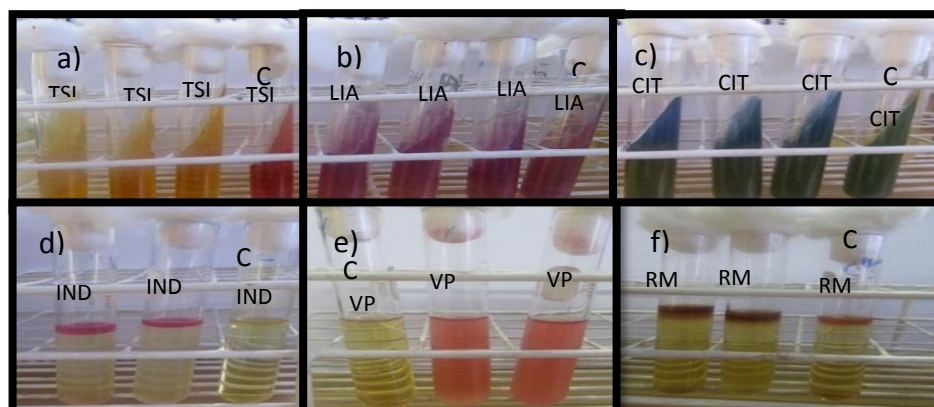


Figura 4. a) Prueba de Agar-hierro-triple azúcar, b) Prueba en el medio LIA, c) Prueba del citrato de Simmon, d) Prueba de indol, e) Prueba de Voges Proskauer, f) Prueba de Rojo de Metilo.

3.1.2 Caracterización microscópica de la cepa *Klebsiella sp ALL-1*

En la Figura 5 muestra que, al realizar la coloración Gram, de la bacteria en estudio, es un bacilo corto Gram negativo, células individuales no agrupadas. Asimismo, en la Figura 6 se observa a la bacteria de color rojo con capsulas translucidas y el campo color azul.

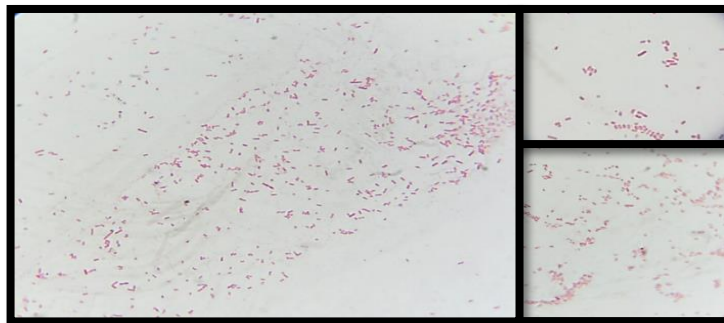


Figura 5. Tinción Gram de la cepa de *Klebsiella sp ALL-1*.

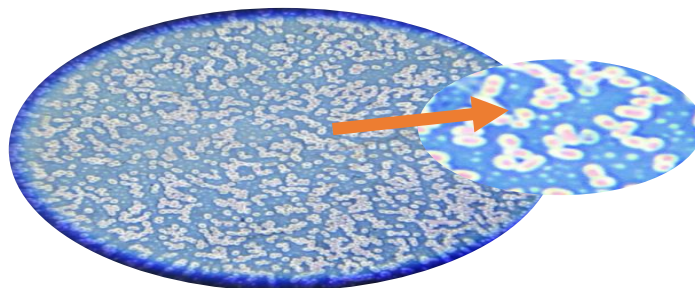


Figura 6. Tinción de cápsula mediante la técnica de Maneval de la cepa *Klebsiella sp ALL-1*.

3.1.3 Caracterización macroscópica de la cepa *Klebsiella sp* ALL-1

En la Figura 7 (a) en Agar nutritivo, se observan colonias de aspecto mucoso, de contorno circular definido y color cremoso. Por otro lado, la Figura 7 (b) en medio Mac Conkey se observan colonias grandes planoconvexas, de aspecto mucoso y brillante, forma redondeada, borde ondulado y lactosa positiva.

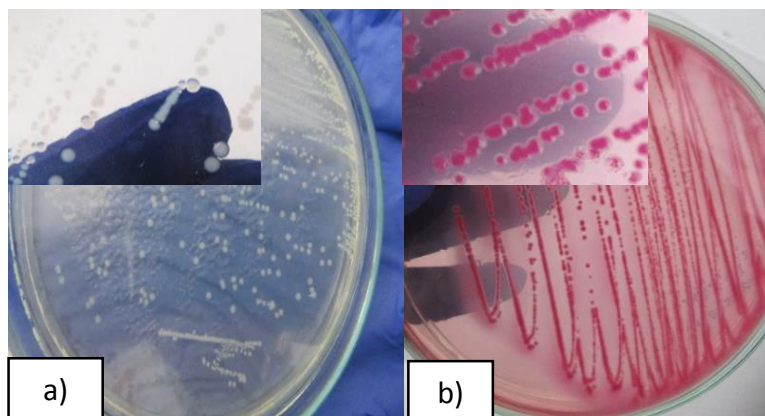


Figura 7. a) Observación de las colonias de *Klebsiella sp* ALL-1 en agar nutritivo y b) Observación de las colonias de *Klebsiella sp* ALL-1 en agar Mac Conkey.

3.2 Obtención del inóculo bacteriano para el sistema de biorreactores

En la Tabla 8 se observa que la cepa de *Klebsiella sp ALL-1* creció hasta $1,1 \times 10^7$ bacterias/mL, a un pH 11 en medio mineral 9M. El conteo de las colonias se llevó a cabo con la cámara de Petroff Hausser.

Tabla 8.
Resultados de crecimiento de la cepa Klebsiella sp ALL-1 en pH alcalinos.

pH	Crecimiento de la cepa <i>Klebsiella sp ALL-1</i> (24h)	
9,0	$1,9 \times 10^8$	bacterias/mL
9,5	$1,1 \times 10^8$	bacterias/mL
10,0	$1,7 \times 10^7$	bacterias/mL
10,5	$1,2 \times 10^7$	bacterias/mL
11,0	$1,1 \times 10^7$	bacterias/mL
11,5	-	bacterias/mL
12,0	-	bacterias/mL

Fuente: Elaboración propia

En la Tabla 9 se evaluó la adaptación y tolerancia de la cepa de *Klebsiella sp ALL-1* en medio mineral 9M cianurado (con extracto de levadura) a un pH 10,5; las concentraciones de cianuro se trabajaron en forma ascendente de 50 a 500 ppm de cianuro libre; mostrando la tolerancia hasta 450 ppm de CN^- en un periodo de evaluación de 48 horas por la cepa de *Klebsiella sp ALL-1*. Para prevenir la contaminación en el transcurso de la adaptación en diferentes

concentraciones de cianuro se verificó las características macroscópicas en agar nutritivo; colonias pequeñas, color cremosas, textura mucoides y microscópicas por la tinción de Gram; Gram negativas.

Tabla 9.

Adaptación de la cepa de Klebsiella sp ALL-1 en medio mineral cianurado 9M (con extracto de levadura)

[CN] ppm	Lec. 24h	Lec. 48h	crecimiento en Agar nutritivo	Tinción Gram
50	++++		<i>colonia pequeña, cremosa y mucoide</i>	<i>bacilo Gram negativo</i>
100	++++		<i>colonia pequeña, cremosa y mucoide</i>	<i>bacilo Gram negativo</i>
150	++++		<i>colonia pequeña, cremosa y mucoide</i>	<i>bacilo Gram negativo</i>
200	++++		<i>colonia pequeña, cremosa y mucoide</i>	<i>bacilo Gram negativo</i>
250	+++	++++	<i>colonia pequeña, cremosa y mucoide</i>	<i>bacilo Gram negativo</i>
300	+++	++++	<i>colonia pequeña, cremosa y mucoide</i>	<i>bacilo Gram negativo</i>
350	++	+++	<i>colonia pequeña, cremosa y mucoide</i>	<i>bacilo Gram negativo</i>
400	++	+++	<i>colonia pequeña, cremosa y mucoide</i>	<i>bacilo Gram negativo</i>
450	+	++	<i>colonia pequeña, cremosa y mucoide</i>	<i>bacilo Gram negativo</i>
500	--	--	---	---

Fuente: Elaboración propia

Nota: ++++= demasiadas células bacterias; +++= muchas células bacterias; ++= pocas células bacterianas; += muy pocas células bacterianas; -= ausencia de células bacterianas.

En la Tabla 10 se evaluó la capacidad de usar el cianuro libre como única fuente de nitrógeno por la cepa *Klebsiella sp ALL-1* en

medio mineral 9M (sin extracto de levadura), a partir de 50 a 450 ppm de cianuro libre, a pH 10,5; resultando el crecimiento de la cepa bacteriana hasta 400 ppm de cianuro libre en un periodo de evaluación de 72 horas.

Tabla 10.

Adaptación de la cepa de Klebsiella sp ALL-1 en medio mineral 9M cianurado (sin extracto de levadura).

[CN ⁻] ppm	Lec. 24h	Lec. 48h	Lec. 72h	crecimiento Agar nutritivo	Tinción Gram
50	+++	++++		colonia pequeña, cremosa y mucoide	bacilo Gram negativo
100	+++	++++		colonia pequeña, cremosa y mucoide	bacilo Gram negativo
150	++	+++	++++	colonia pequeña, cremosa y mucoide	bacilo Gram negativo
200	++	+++	++++	colonia pequeña, cremosa y mucoide	bacilo Gram negativo
250	++	++	++++	colonia pequeña, cremosa y mucoide	bacilo Gram negativo
300	+	++	++++	colonia pequeña, cremosa y mucoide	bacilo Gram negativo
350	+	++	+++	colonia pequeña, cremosa y mucoide	bacilo Gram negativo
400	+	++	+++	colonia pequeña, cremosa y mucoide	bacilo Gram negativo
450	-	-	--	---	---

Fuente: Elaboración propia

Nota: ++++= demasiadas células bacterias; +++= muchas células bacterias; ++= pocas células bacterianas; += muy pocas células bacterianas; -= ausencia de células bacterianas.

En la Tabla 11 se muestra la masificación de la cepa de *Klebsiella sp ALL-1* en 400 ppm de cianuro libre a un pH 10,5 en 48 horas con su respectiva repetición, obteniéndose un recuento mayor de $2,6 \times 10^{10}$ bacterias/mL, el cual se seleccionó como inóculo de la cepa para la instalación de los 16 biorreactores.

Tabla 11.

Masificación de la cepa de Klebsiella sp ALL-1 en medio mineral 9M (sin extracto de levadura) a 400 ppm de cianuro con aireación

[CN-] ppm	inoculo Kb.	Lec. 24h	Lec. 48h	Kb. sp bac./ml	crecimiento en Agar nutritivo	Tinción Gram
400	SI	+++	++++	$2,6 \times 10^{10}$	colonia pequeña, cremosa y mucoide	bacilo Gram negativo
400	SI	++	+++	$1,5 \times 10^{10}$	colonia pequeña, cremosa y mucoide	bacilo Gram negativo
400	NO	--	---		---	---

Fuente: Elaboración propia

Nota: ++++= demasiadas células bacterias; +++= muchas células bacterias; ++= pocas células bacterianas; += muy pocas células bacterianas; - = ausencia de células bacterianas.

3.3 Evaluación de la biodegradación de cianuro libre, en biorreactor aireado, por *Klebsiella sp*, a diferentes condiciones de temperaturas, pH y concentración de cianuro.

En la Figura 8 se observa mediante una comparación visual del color de la solución partiendo del color amarillo a verde oscuro, evidenciando la producción de amonio en la biodegradación de

cianuro por *Klebsiella sp ALL-1* en un periodo de evaluación de 108 horas, en los tratamientos número 1, 2, 5, 6, 8, 9, 13, 15 y 16 llegando hasta 4 en la escala colorimétrica que referencia un color verde intermedio, la cual equivalente aproximadamente a 1mg NH₄⁺/L.

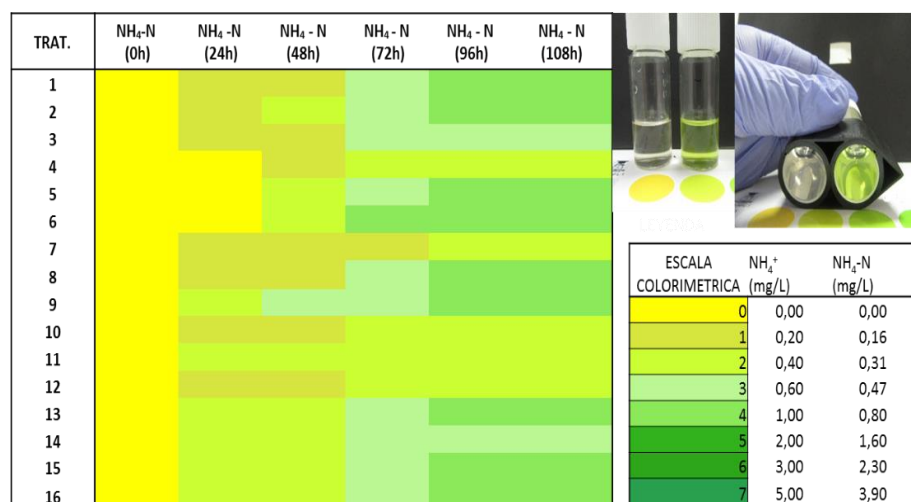


Figura 8. Producción de amónico (NH₄) en la biodegradación de cianuro por *Klebsiella sp ALL-1*.

En la Figura 9 se muestran los valores de pH mediante la diferenciación de colores por cada 12 horas, donde se observa una ligera variación de pH en los tratamientos, pero se mantienen alrededor de los establecidos en los tratamientos, según el diseño de Box –Behnken (ANEXO 10).

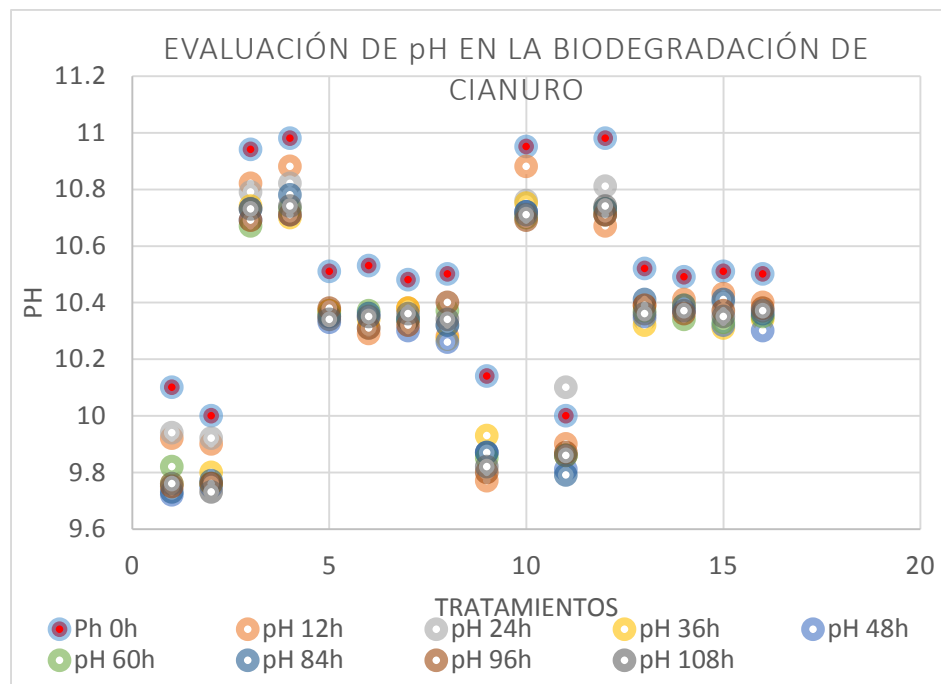


Figura 9. Monitoreo de pH en la biodegradación de cianuro por *Klebsiella sp ALL-1* cada 12 horas.

3.4 Determinación de la tasa y eficiencia de biodegradación de cianuro libre por *Klebsiella sp ALL-1*

En la Tabla 12 y la Figura 10 se observa la tasa de biodegradación de cianuro en los 16 biorreactores instalados según el diseño Box- Behnken en un periodo de evaluación de 108 horas, para comparar la variación de las medias entre los tratamientos se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA), dando como resultado valores significativos a las 60 horas de evaluación, usando estos datos para realizar la optimización del modelo.

En los tratamientos 1, 2, 5, 9, 10, 11, 14 y 16 se obtuvieron una alta tasa de biodegradación de cianuro libre que corresponde a un 83,3 %, 94,7 %, 86 %, 98 %, 86 %, 94 %, 81,3 % y 80,7 % por la bacteria *Klebsiella sp ALL-1* respectivamente, a las 60 horas de evaluación. Se observa que en 108 horas se biodegradado el cianuro libre en un 99 % en todos los biorreactores instalados.

Tabla 12.

Tasa de biodegradación experimental de cianuro obtenidos para cada uno de los experimentos del diseño de Box-Behnken en 108 horas

TRAT.	[CN-]	[CN-]	[CN-]	[CN-]	[CN-]	[CN-]	[CN-]	[CN-]	[CN-]	[CN-]
	biode.	biode.	biode.	biode.	biode.	biode.	biode.	biode.	biode.	biode.
	0h	12h	24h	36h	48h	60h	72h	84h	96h	108h
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
1	0,00	3,33	41,33	70,67	78,67	83,33	88,00	96,00	98,67	99,33
2	0,00	6,67	33,33	42,67	90,67	94,67	98,67	99,33	99,33	99,33
3	0,00	0,67	20,00	28,00	41,33	52,00	60,00	90,00	97,33	98,67
4	0,00	1,33	26,67	33,33	49,33	59,33	78,67	90,00	96,67	98,67
5	0,00	8,00	28,00	68,00	79,00	86,00	94,00	98,00	99,00	99,00
6	0,00	16,00	24,00	40,00	52,00	66,00	91,00	98,00	99,00	99,00
7	0,00	10,00	21,00	34,00	49,00	56,00	69,50	89,50	97,00	99,00
8	0,00	4,00	23,00	24,00	42,50	49,00	59,50	95,50	97,50	99,00
9	0,00	40,00	62,00	90,00	92,00	98,00	99,00	99,00	99,00	99,00
10	0,00	8,00	14,00	22,00	68,00	86,00	90,00	96,00	99,00	99,00
11	0,00	33,50	61,00	82,00	91,00	94,00	97,00	99,00	99,50	99,50
12	0,00	11,00	29,00	32,00	40,00	49,50	56,50	75,00	82,00	98,00
13	0,00	16,00	32,67	49,33	68,00	79,33	88,00	97,33	98,67	99,33
14	0,00	14,67	34,67	52,00	70,67	81,33	89,33	94,00	98,00	99,33
15	0,00	17,33	34,67	50,67	69,33	78,00	86,67	96,00	98,67	99,33
16	0,00	15,33	31,33	53,33	72,67	80,67	90,67	96,67	98,67	99,33

Fuente: Propia

Nota: % evaporación de [CN]= Trat*12,4 %

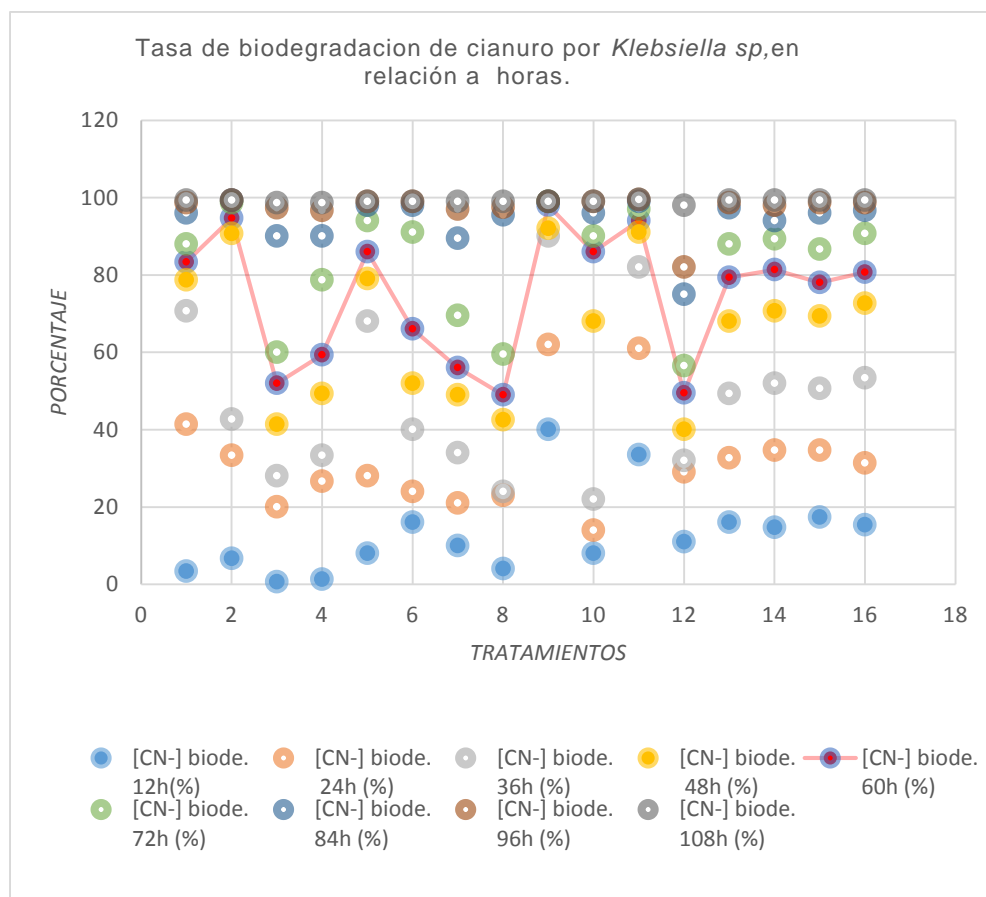


Figura 10. Tasa de biodegradación experimental de cianuro obtenidos para cada uno de los experimentos del diseño de Box-Benhken en 108 horas.

En la Tabla 13 se muestra la tasa de biodegradación de cianuro libre por *Klebsiella sp ALL-1* en 60 horas de evaluación, este tiempo se seleccionó como dato significativo para la optimización. Siendo el tratamiento 9 en que tuvo la mayor tasa de biodegradación (98 %).

Tabla 13.

Tasa de biodegradación experimental de cianuro obtenidos para cada uno de los experimentos del diseño de Box-Behnken en 60 horas

TRAT.	VARIABLE INDEPENDIENTE			VARIABLE. DEPENDIENTE.		
	T (°C)	pH	[CN-] inicial (ppm)	[CN-] res. (ppm) 60h	[CN-] exp. Biode. (ppm)*60h	[CN-] exp. Biode. (%)*60h
1	25	10,0	300	50,00	250,00	83,33
2	35	10,0	300	16,00	284,00	94,67
3	25	11,0	300	144,00	156,00	52,00
4	35	11,0	300	122,00	178,00	59,33
5	25	10,5	200	28,00	172,00	86,00
6	35	10,5	200	68,00	132,00	66,00
7	25	10,5	400	176,00	224,00	56,00
8	35	10,5	400	204,00	196,00	49,00
9	30	10,0	200	4,00	196,00	98,00
10	30	11,0	200	28,00	172,00	86,00
11	30	10,0	400	24,00	376,00	94,00
12	30	11,0	400	202,00	198,00	49,50
13	30	10.5	300	62,00	238,00	79,33
14	30	10.5	300	56,00	244,00	81,33
15	30	10.5	300	66,00	234,00	78,00
16	30	10.5	300	58,00	242,00	80,67

Fuente: Propia basada en los datos evaluadas a horas 60 horas

Nota: % evap de [CN-]= $\text{Trat} \cdot 12,4 \%$

En la Tabla 14 se muestra el promedio total de la eficiencia en el porcentaje de biodegradación por cada hora transcurrido en el biorreactor según la tasa de biodegradación por la cepa *Klebsiella sp ALL-1*. Asimismo, se realizó los cálculos de la eficiencia con los promedios obtenidos para la evaluación en 60 horas ($E = \text{TD}/T \times 60$)

horas), el cual fue comparado con la tasa de biodegradación por la bacteria *Klebsiella sp ALL-1* en 60 horas de evaluación [TD = ((Ci-Cf) /Ci) x 100]. Donde en la comparación de tasa y eficiencia de biodegradación de cianuro por la cepa *Klebsiella sp ALL-1* se observa una ligera variación del porcentaje, sin embargo, el tratamiento 9 sigue siendo el que presenta mayor tasa y eficiencia en la biodegradación de cianuro por *Klebsiella sp ALL-1* con 98 % y 98,81 % en 60 horas respectivamente.

Tabla 14.

La eficiencia y tasa de biodegradación experimental de cianuro obtenido de cada uno de los experimentos del diseño de Box-Benhken en base al tiempo.

TRAT.	T (°C)	pH	[CN-] ppm	PROMEDIO EFECIENCIA DE BIODE. /h (%)	EFICIENCIA DE BIODE. [CN-] /60 h (%)	TASA DE BIODE. [CN-] 60h (%)
1	25	10,0	300	1,13	67,82	83,33
2	35	10,0	300	1,11	66,62	94,67
3	25	11,0	300	0,72	43,36	52,00
4	35	11,0	300	0,82	49,49	59,33
5	25	10,5	200	1,12	67,33	86,00
6	35	10,5	200	1,00	60,04	66,00
7	25	10,5	400	0,86	51,39	56,00
8	35	10,5	400	0,76	45,34	49,00
9	30	10,0	200	1,65	98,81	98,00
10	30	11,0	200	0,91	54,31	86,00
11	30	10,0	400	1,56	93,34	94,00
12	30	11,0	400	0,81	48,67	49,50
13	30	10,5	300	1,11	66,79	79,33
14	30	10,5	300	1,12	67,44	81,33
15	30	10,5	300	1,13	68,01	78,00
16	30	10,5	300	1,13	67,68	80,67

Fuente: Propia

3.5 Evaluación de las condiciones óptimas de temperatura, pH y concentración de cianuro libre, en la biodegradación de cianuro por *Klebsiella sp ALL – 1*, utilizando el diseño Box-Behnken

A partir del diseño de Box- Behnken, se realizó la comparación entre las variables independientes y la tasa de biodegradación de cianuro libre por la cepa de *Klebsiella sp ALL-1* en 60 horas de evaluación.

Tabla 15.

Análisis de varianza de la tasa de biodegradación de cianuro libre por Klebsiella sp ALL-1

Fuente	SC	GI	CM	Razón-F	Valor-P
A:T	8,67	1	8,67	0,18	0,6843
B:pH	1896,36	1	1896,36	39,86	0,0007 *
C:[CN-]	957,03	1	957,03	20,11	0,0042 *
AA	631,27	1	631,27	13,27	0,0108 *
AB	4,02	1	4,02	0,08	0,7811
AC	42,25	1	42,25	0,89	0,3824
BB	102,52	1	102,52	2,15	0,1925
BC	264,06	1	264,06	5,55	0,0566
CC	36,48	1	36,48	0,77	0,4149
Error total	285,48	6	47,58		
Total (corr.)	4228,14	15			

Fuente: Propia

$R^2 = 93,25 \%$; R^2 (ajustada por g.l.) = $83,12 \%$

Nota: p^* ($>0,05$ significativo estadísticamente); A= temperatura, B= pH, C= concentración de cianuro libre [CN], AA= interacción entre las temperaturas, AB= interacción entre la temperatura y pH, AC= interacción entre la temperatura y [CN], BB= interacción entre los pH, BC= interacción entre el pH y la [CN], y CC= interacción entre las [CN] y [CN].

En el análisis de varianza (Tabla 15) muestra que para el factor temperatura no existe diferencias estadísticas por lo tanto tiene promedios estadísticamente similares, sin embargo, para el factor B, C y AA existen diferencias estadísticas altas a nivel de confianza del 95 %, por lo tanto uno de los niveles de cada factor B y C tuvieron diferentes promedios, sin embargo, para las interacciones BC; AB; AC; BB; y CC no existen diferencias estadísticas por lo tanto actuaron independientemente entre sí. El R² encontrado fue de 93,25 %, dicho valor indica que el modelo obtenido es capaz de explicar el 93,25 % de las variaciones en la biodegradación de cianuro por *Klebsiella sp ALL-1*. El valor R² (ajustada por g.l.) = 83,12 % evidencia que el modelo arrojado con los coeficientes de regresión en la Tabla 16, explica de manera adecuada la variabilidad de la biodegradación de cianuro libre por *Klebsiella sp ALL-1* según la ecuación 18 de modelo de regresión lineal.

$$\begin{aligned} \text{\%[CN-] biodegradado} = & 1615,66 + 32,2023*T - 395,262*pH + \\ & 1,58308*[CN-] - 0,5025*T^2 - 0,401*T*pH + 0,0065*T*[CN-] + 20,25*pH^2 - \\ & 0,1625*pH*[CN-] - 0,000302*[CN-]^2 \end{aligned} \quad (19)$$

Tabla 16.

Coefficiente de regresión para la tasa de biodegradación de cianuro por Klebsiella sp ALL-1.

Coefficiente	Estimado
constante	1615,6600
A:T	32,2023
B:pH	-395,2620
C:[CN-]	1,5831
AA	-0,5025
AB	-0,4010
AC	0,0065
BB	20,2500
BC	-0,1625
CC	-0,0003

Fuente: Propia

Mediante el diagrama de Pareto se determinó los que tienen mayor influencia sobre la variable respuesta. Este diagrama representa gráficamente los efectos estandarizados para cada factor, desde el valor más alto hasta el más bajo (Figura 11). En el diagrama de Pareto los factores estadísticamente significativos son aquellos que sobrepasan la línea vertical, el cual representa el *t* valor de la distribución *t-student* con un intervalo de confianza del 95 % para los 16 grados de libertad. En este caso el signo (-) del diagrama indica que, a menor pH, a menor concentración de cianuro libre y la interacción AA se obtienen las mayores tasas de biodegradaciones de cianuro, es inversamente proporcional. En cuanto a las variables temperaturas, interacción AB y CC, estas resultaron ser las de menor efecto sobre la variable respuesta.

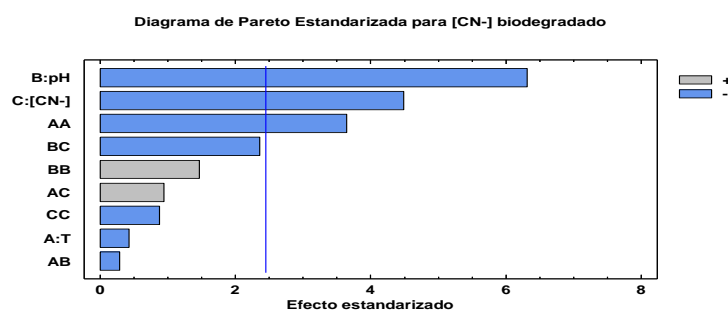


Figura 11. Diagrama de Pareto según el ANOVA del porcentaje de biodegradación de cianuro libre por *Klebsiella sp ALL-1*.

A partir de los resultados del ANOVA de Tabla 15 se realizó la depuración las variables no significativas para la optimización en la biodegradación de cianuro libre por *Klebsiella sp ALL-1*. Por consiguiente, se presenta el nuevo ANOVA ajustado (Tabla 17) y el coeficiente de regresión ajustado Tabla 18. Donde se señala que para el factor B, C, AA y BC existen diferencias estadísticas altas a nivel de confianza del 95 %.

Tabla 17.

Análisis de varianza ajustado de la tasa de biodegradación de cianuro por Klebsiella sp ALL-1.

Fuente	SC	GI	C M	Razón-F	Valor-P
B:pH	1896,36	1	1896,36	43,51	0,0000*
C:[CN-]	957,03	1	957,03	21,96	0,0007*
AA	631,27	1	631,27	14,48	0,0029*
BC	264,06	1	264,06	6,06	0,0316*
Error total	479,42	11	43,58		
Total (corr.)	4 228,14	15			

Fuente: Propia

$R^2 = 88,66 \%$; R^2 (ajustada por g.l.) = 84,53%

Nota: p^* ($>0,05$ significativo estadísticamente); B= pH, C= concentración de cianuro libre [CN⁻], AA= interacción entre las temperaturas y BC= interacción entre el pH.

Tabla 18.

Coefficiente de regresión ajustado para la tasa de biodegradación de cianuro por *Klebsiella sp ALL-1*.

Coeficiente	Estimado
constante	-527,1380
A:T	30,1500
B:pH	17,9575
C:[CN ⁻]	1,5969
AA	-0,5025
BC	-0,1625

Fuente: Propia

El nuevo parámetro R^2 (ajustada por g.l.) fue 84,53 % para la biodegradación de cianuro libre por *Klebsiella sp ALL-1*. Esto implica que la variabilidad obtenida en las variables respuesta puede ser correctamente explicada mediante el modelo de regresión de la ecuación 19 y que ellas pueden ser empleadas para realizar predicciones del proceso y optimizar los parámetros de operación. Además, las interacciones AA y BC de los factores son estadísticamente significativas y afectan el proceso de biodegradación de cianuro por *Klebsiella sp ALL-1* (Figura 12).

El modelo ajustado para la tasa biodegradación de cianuro presentó la siguiente ecuación con T: temperatura, pH: pH, [CN⁻]:

concentración de cianuro, como se observa los coeficientes en la Tabla 18.

$$[\text{CN}^-] \text{ biodegradado} = -527,138 + 30,15 \cdot T + 17,9575 \cdot \text{pH} + 1,59687 \cdot [\text{CN}^-] - 0,5025 \cdot T^2 - 0,1625 \cdot \text{pH} \cdot [\text{CN}^-] \quad (20)$$

Las interacciones AB, AC, BB, BC y CC de la Tabla 15 fueron rechazados debido que su p valor es mayor a 0,05. Por lo tanto, no presentan un efecto significativo. Los resultados obtenidos de todos los experimentos que corresponden al modelo explicado, se procesaron aplicando la metodología de superficie de respuesta con el programa estadístico statgraphics centurión XV.

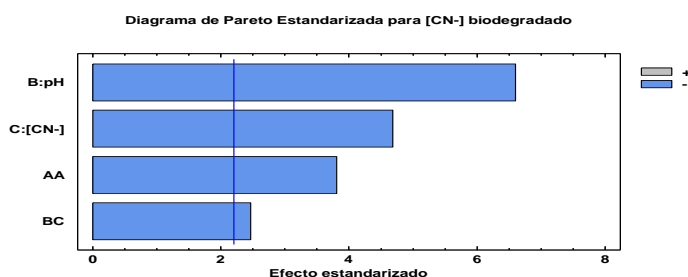


Figura 12. Diagrama de Pareto según el ANOVA ajustado de la tasa de biodegradación de cianuro por *Klebsiella sp ALL-1*.

Según la Tabla 19, el resultado de las condiciones optimizadas usando el modelo ajustado de la ecuación 17 de optimización para la tasa de biodegradación de cianuro libre por *Klebsiella sp ALL-1* fueron: temperatura: 30 °C, pH: 10 y [CN⁻]: 200 ppm con 99,06 % de biodegradación de cianuro libre.

Tabla 19.

Resultados Estimados para la tasa de biodegradado de cianuro según el modelo de Regresión Lineal en cada uno de los experimentos del diseño de Box-Behnken.

TRAT.	VARIABLE INDEPENDIENTE			VARIABLE. DEPENDIENTE.	
	T (°C)	pH	[CN ⁻] inicial (ppm)	Val. Obs. en la biode. [CN ⁻] (%)	Val. Est. en la biode. [CN ⁻] (%)
1	25	10,0	300	83,33	83,69
2	35	10,0	300	94,67	83,69
3	25	11,0	300	52,00	52,90
4	35	11,0	300	59,33	52,90
5	25	10,5	200	86,00	79,23
6	35	10,5	200	66,00	79,23
7	25	10,5	400	56,00	57,35
8	35	10,5	400	49,00	57,35
9	30	10,0	200	98,00	99,06
10	30	11,0	200	86,00	84,52
11	30	10,0	400	94,00	93,44
12	30	11,0	400	49,50	46,40
13	30	10,5	300	79,33	80,85
14	30	10,5	300	81,33	80,85
15	30	10,5	300	78,00	80,85
16	30	10,5	300	80,67	80,85

Fuente: Propia

Interacciones de los factores

Según el programa estadístico Statgraphics Centurium XVIII se obtiene las gráficas de superficie de respuesta que representa una función de dos factores a la vez, manteniendo todos los demás factores en niveles fijos, es más útiles para comprender tanto el efecto principal como el efecto de interacción de ellos. Las curvas de superficie de respuesta para el contenido de cianuro se muestran en las Figuras 13, 14 y 15. Estos gráficos explican el efecto de tres variables independientes; temperatura, pH y concentración de cianuro libre sobre la tasa de biodegradación de cianuro. En la Figura 13, a medida que se incrementó el pH, descendió la biodegradación de cianuro por *Klebsiella sp ALL-1*; a su vez, a medida que se incrementó la concentración de cianuro libre, hay una reducción en la biodegradación de cianuro con un ligero descenso. De igual modo, se observa en la Figura 14 que, a medida que se incrementó la concentración de cianuro libre, descendió la biodegradación de cianuro por *Klebsiella sp ALL-1*; a su vez, a medida que se incrementó la temperatura, hay un incremento en la biodegradación de cianuro con un ligero descenso. En la Figura 15 que, a medida que se incrementó el pH, descendió la biodegradación de cianuro por

Klebsiella sp ALL-1; a su vez, a medida que se incrementó la temperatura, hay un incremento en la biodegradación de cianuro con un ligero descenso.

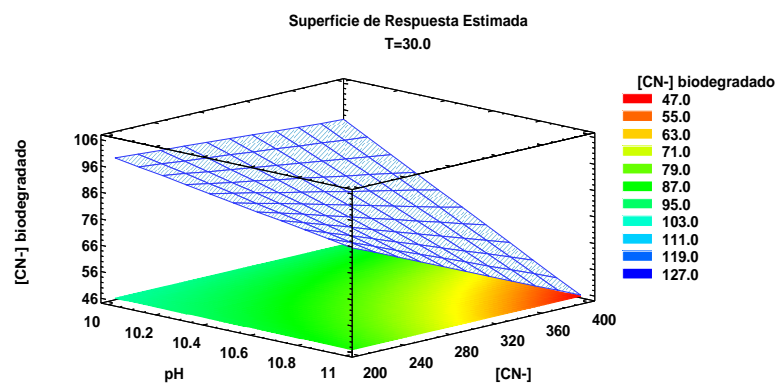


Figura 13. Gráfico de superficie de respuesta pH y concentración de cianuro libre & % de cianuro libre biodegradado.

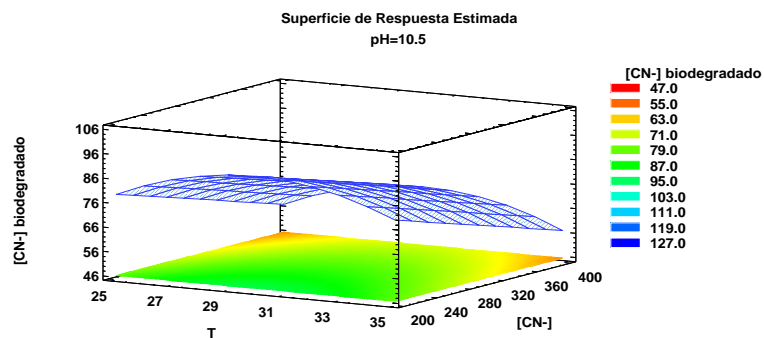


Figura 14. Gráfico de superficie de respuesta temperatura y concentración de cianuro & % de cianuro libre biodegradado.

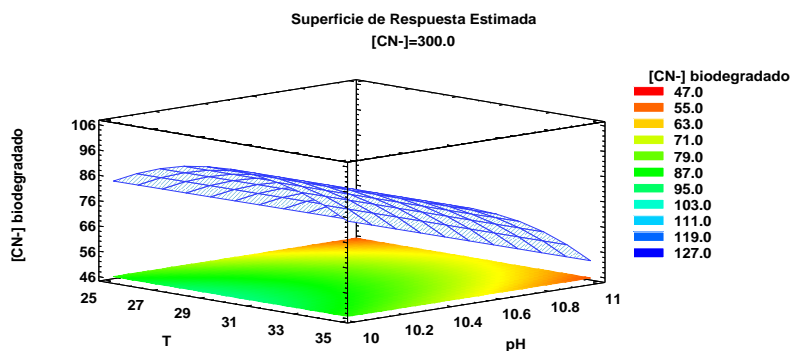


Figura 15. Gráfico de superficie de respuesta temperatura y pH & % cianuro libre biodegradado.

Según el programa estadístico Statgraphics Centurium XVIII se obtuvo el gráfico de efecto de las variables principales y de interacciones es una herramienta, útil para encontrar los niveles de las variables que maximizan el proceso de biodegradación de cianuro. En este caso se analizaron de los factores sobre la tasa de la biodegradación de cianuro libre por *Klebsiella sp ALL-1*, que es la variable respuesta. En la Figura 16, se observa que a pH 10 se obtienen mayores degradaciones que a pH 11. El pH posee gran influencia en el proceso, un aumento de pH genera una disminución de la biodegradación de cianuro libre. Asimismo, a concentración de cianuro libre de 200 ppm de obtiene mayor degradación que a 400 ppm en 60 horas. En la Figura 17, se observa como el efecto de cada variable en la biodegradación de cianuro libre depende de la

concentración del $[CN^-]$. Para una concentración de 200 ppm de cianuro libre, el efecto de mayor biodegradación de cianuro libre incrementa conforme disminuye el valor de pH.

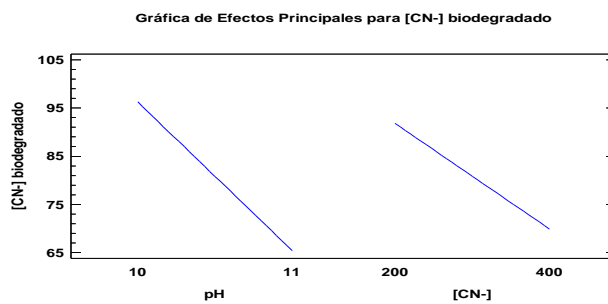


Figura 16. Gráfico de efectos principales sobre la biodegradación de cianuro libre.

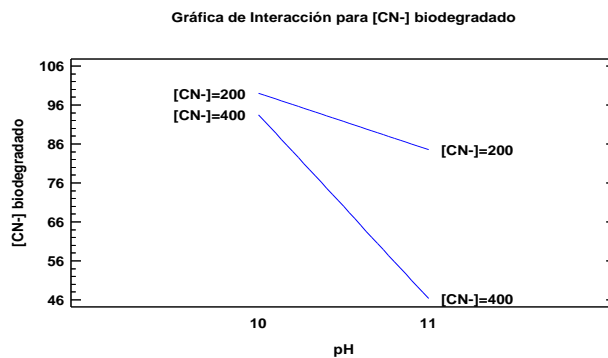


Figura 17. Gráfico de efecto de la interacción pH y concentración cianuro libre sobre la biodegradación de cianuro.

IV. DISCUSIÓN

En el presente estudio la cepa aislada *Klebsiella sp ALL-1* procedía de muestras de aguas residuales, que fue identificada a nivel molecular mediante amplificación del gen 16S (Calisaya, 2017). Para confirmar el género se realizó una identificación bioquímica, además se consideró las características macroscópicas propias del género según el Manual de Bergey (Garrity et al., 2010), obteniéndose como resultado que se presume que corresponda a la especie de *Klebsiella oxytoca*. De acuerdo a las características macroscópicas, se confirma al género de *Klebsiella*. Los microorganismos del género *Klebsiella* son bacilos Gram negativas, que se caracterizan por presentar una capsula de polisacárido (Garrity et al., 2010).

Se ha reportado a esta bacteria en muestras de aguas residuales y en ambientes contaminados, según investigaciones de An et al. (2018); Celińska (2012); Chaudhari & Kodam (2010); Chen et al. (2008); Chena & Liu (1999); Kao et al., (2006); y Suzuki et al. (2014), se ha utilizado al género *Klebsiella* para la degradación de diversos contaminantes como nitrilos, tiocianato, tetracianónico y cianuro contenido en aguas residuales.

La mayoría de trabajos sobre la biodegradación de cianuro por bacterias se realizó en condiciones alcalinas debido a que se volatiliza en forma de ácido cianhídrico en condiciones de pH neutras (Eisler & Wiemeyer, 2004; Kumar & Bhalla, 2018; Luque-Almagro et al., 2016; Razanamahandry et al., 2018), para evitar la volatilización en el presente estudio se desarrolló en condiciones alcalinas. Según investigaciones realizadas por Suzuki et al. (2014), indica que el género *Klebsiella* puede trabajar en condiciones óptimas a pH alcalinos. Considerando las características de la bacteria, condiciones de pH y degradación de cianuro, se procedió a realizar ensayos para escalamiento de pH de la cepa de *Klebsiella sp ALL-1* en caldo nutritivo, y posteriormente en medio mineral (9M), determinando como el valor máximo de pH para el crecimiento de la bacteria a pH 11, para obtener la optimización en pH alcalino para la degradación de cianuro libre, en la mayoría de los casos los cianuros libres en aguas residuales industriales se encuentran en pH alcalinos entre 10 a 13 para evitar la formación de ácido cianhídrico. Sin embargo, en los estudios realizados por Chen et al. (2009); Lovasoa et al., (2017) y Kao et al. (2006) reportaron las condiciones óptimas de biodegradación de cianuro libre por *Klebsiella sp* fueron a pH neutros.

Para determinar la biodegradación de cianuro por la cepa de *Klebsiella sp ALL-1*, se utilizó el medio mineral cianurado (9M) (Khamar et al., 2015), en este proceso la bacteria utiliza como fuente de carbono al acetato de sodio y el cianuro como fuente de nitrógeno, en esta etapa no se utilizó ninguna fuente adicional de nitrogenada, por consiguiente, esto induce a la bacteria a tomar como fuente de nitrógeno de la molécula de cianuro. Sin embargo, en la investigación de Khamar et al. (2015) utilizó extracto de levadura como fuente adicional de nitrógeno para aislar microorganismos tolerantes al cianuro. Se usó como fuente de carbono el acetato de sodio, debido a que se ha reportado para microorganismos biodegradaciones superiores de cianuro como fuente de carbono, con respecto a otras fuentes carbonadas como lactato, y ácido fosfórico (Hurtado & Berastain, 2012). El crecimiento de los microorganismos se observa en la Tabla 5, 6, 7, donde se visualiza que las adaptaciones a concentraciones de cianuro libre se realizó en forma ascendente, de menor a mayor concentración, en este proceso *Klebsiella* creció hasta 400 ppm de cianuro en medio mineral (9M), pero se detectó bajo crecimiento del microorganismo las primeras 24 horas, posiblemente puede atribuirse a una fase lag, de adaptación al nuevo medio con

cianuro, sin embargo, después del bajo crecimiento de *Klebsiella sp ALL-1* entre las horas 24 y 72, ocurre un incremento de la biomasa. Después de las 72 horas, se alcanzó una óptima biomasa de *Klebsiella sp ALL-1*. A partir de la cepa adaptada se realizó una masificación de biomasa hasta 2×10^8 bacterias/mL en medio mineral cianurado en 400 ppm de CN^- , como inóculo inicial para los 16 biorreactores que se instalaron según el diseño de Box-Behnken. Esta fase inicial de adaptación puede ser corta (horas) o larga (hasta varios días), dependiendo del grado de adaptación de las cepas al cianuro y a la puesta en marcha de enzimas que faciliten la asimilación del cianuro (Luque-Almagro et al., 2011; 2018; Luque, 2005). Para *Klebsiella sp* se ha determinado que la ruta más probable para la degradación de cianuro es la ruta hidrolítica la cual, puede variar de la enzima nitrilo hidratasa o nitrilasas (Gupta et al., 2010b; Luque-Almagro et al., 2018). La enzima nitrilo hidratasa puede ser inducida por cofactores como cobalto generando como residuo amonio, metano, ácido carboxilo y CO_2 (N. Gupta et al., 2010a; Luque-Almagro et al., 2018).

En la evaluación de biodegradación de cianuro por la cepa *Klebsiella sp ALL -1*, se detectó ligeras variaciones de pH, por la

posible ruta metabólica de la cepa bacteriana y la oxidación natural por la O_2 , que tiende a disminuir el pH; para mantener el pH en condiciones alcalinas, según el diseño Box – Behnken, se agregó gotas de hidróxido de sodio cada 12 horas. El pH es un factor clave para la degradación de compuestos cianurados, en soluciones con $pH < 9,2$ el cianuro tiende a volatilizarse y perderse como ácido cianhídrico (HCN) tóxico (Khamar et al., 2015; Lottermoser, 2010; Razanamahandry et al., 2016; Singh & Balomajumder, 2016). Aunque en las investigaciones de Kao et al. (2003); Chaudhari & Kodam (2010); Chen et al. (2008, 2009) orientadas a la biorremediación de cianuro se han realizado estudios en pH cercanos a la neutralidad, donde resulta poco claro establecer si la disminución ocurre por acción de los microorganismos o por pérdida a través de volatilización. Sin embargo, existen muchos reportes de degradación de cianuro por diferentes microorganismos a pH alcalinos, como por ejemplo los trabajos citados por Akcil et al. (2015); Huertas et al. (2010); Luque-Almagro et al. (2011); Momo & Falco (2015); Razanamahandry et al., (2016); y Tuya, (2014).

La producción amonio se analizó para la confirmación indirecta de la biodegradación de cianuro por *Klebsiella sp ALL-1*, el cual se

realizó por la medición cualitativa. Por lo tanto, es probable que la cepa de *Klebsiella sp ALL-1* utilizó la ruta hidrolítica, mediante la enzima nitrilo hidratasa o nitrilasas. Según Gupta et al. (2010b) describió que varios organismos usan diferentes vías para la degradación de cianuro, algunas veces más de una vía puede ser usada para degradar cianuro por el mismo microorganismo. Generalmente cinco vías han sido enlistadas para la biodegradación de cianuro, de las cuales la ruta hidrolítica, puede variar de la enzima nitrilo hidratasa o nitrilasas para *Klebsiella sp* en la biodegradación, donde las enzimas catalizan la conversión de cianuro a moléculas orgánicas e inorgánicas simples, las que posteriormente se convierten a amonio, metano, CO₂, ácido fórmico y ácido carboxílico (Gupta et al., 2010b;Luque-Almagro et al., 2018).

La tasa de biodegradación de cianuro por *Kebsiella sp ALL-1* se realizó mediante diseño Box- Behnken, que indicó que el porcentaje más alto de biodegradación fue de 98 % a una temperatura de 30 °C, pH 10 y a 200 ppm de cianuro libre en 60 horas. Según Akcil (2003) considera también a *Pseudomonas sp* como una bacteria capaz de biodegradar el CN⁻ en condiciones alcalinas, en su investigación determinó que, a una concentración inicial de 400 ppm, a pH 9,2 y a

una temperatura de 30 °C se tuvo una tasa de degradación del 99 %. En otras investigaciones realizadas por Mekuto et al. (2017), se utilizó el género *Bacillus*, reportando una tasa de biodegradación de 65,5 %, para una concentración inicial de 200 ppm de [CN⁻] y 44,3 % para 400 ppm de [CN⁻] en 8 días. Sin embargo, acorde a diversas investigaciones sobre las bacterias *Klebsiella sp* resulta poco claro establecer si la degradación de cianuro ocurre por acción de los microorganismos o por la posible volatilización de cianuro en condiciones de pH neutro (Brüger et al., 2018; Luque, 2005). Pero se puede indicar, según la tasa de biodegradación por la cepa *Klebsiella sp ALL-1* en el presente estudio, hay un buen porcentaje de degradación en condiciones alcalinas. Según las condiciones de biodegradación por la cepa de *Klebsiella sp ALL-1* en condiciones alcalinas, se obtuvo una eficiencia de degradación de 98,81 % en 60 horas.

Diversos factores ambientales afectan el crecimiento y metabolismo de los microorganismos, aunque su gran capacidad de adaptación les permite una tolerancia a estos cambios. Se debe considerar que cuando superan los rangos óptimos de crecimiento o tolerancia, puede alterar la degradación de cianuro, pudiendo ser

significativamente menos eficientes y a veces pueden alterar la supervivencia de los microorganismos en el ambiente (Kaksonen et al., 2014; Razanamahandry et al., 2016). Entre los factores que intervienen en el proceso de biorremediación de cianuro, los más importantes son el pH, la temperatura y la concentración del cianuro (Akcil, 2003; Akcil et al., 2015; Baxter & Cummings, 2006; N. Gupta et al., 2010a; Mart, 2012). Sin embargo, en la presente investigación solo los factores pH y [CN⁻] resultaron significativo estadísticamente a un nivel de confianza de 95 %. Los métodos de superficie de respuesta (RSM) se usaron en la evaluación de la optimización de la biodegradación de cianuro. Se partió con los datos significativos para optimización del proceso de biodegradación de cianuro libre.

El método de superficie de respuesta (diseño Box-Benhken) permite obtener los valores óptimos de las variables independientes para determinar los coeficientes del modelo matemático de Regresión lineal. En los rendimientos óptimos son los datos de importancia el valor que permite estimar el porcentaje la degradación de cianuro libre. Por ejemplo, para el acondicionamiento de T 25 °C, pH 10 y [CN⁻] 300 ppm (Tabla 14), el rendimiento óptimo es 83,69 % de biodegradación de cianuro libre en 60 horas, mientras que en T 35 °C,

pH 10,5 y [CN⁻] 400 ppm es 57,35 % de biodegradación de cianuro libre en 60 horas (Tabla 14).

El pH es un factor importante que se debe considerar en la biodegradación de cianuro, porque a valores altos de pH (alcalinos) se minimiza la formación de ácido cianhídrico, por lo tanto, incrementa la eficiencia y disminuye el riesgo en la generación de volatilización del cianuro en los procesos biológicos (Gupta et al., 2016). En el proceso de biodegradación de cianuro se trató de mantener el pH alrededor de los establecidos al inicio de la fermentación, para poder confirmar que la bacteria utiliza al cianuro como parte de su metabolismo y para evitar la pérdida en forma de HCN, el mismo principio químico se utiliza al momento de realizar el tratamiento biológico de efluentes industriales contaminados con cianuro, que hace indispensable la que las condiciones de pH sean alcalinas (Chen et al., 2008). Según los resultados de ANOVA, el factor pH resultó significativo para la optimización en programa estadístico *statgraphiscs*, mediante el diseño Box - Behnken para hallar un modelo de regresión lineal. Sin embargo, en el diagrama de superficie de respuesta muestran que a un valor de pH 10 existe una mayor degradación de cianuro, a medida que va incrementándose el valor

de pH hay una disminución en el porcentaje de degradación de cianuro libre. Asimismo, ocurre con la concentración cianuro inicial a menor concentración de cianuro mayor degradación de cianuro libre generando una gráfica inclinada. Esto posiblemente se debe a la adaptación de la *Klebsiella sp ALL-1* en condiciones muy alcalinas y concentraciones demasiado altas. Por otro lado, la capacidad de la cepa *Klebsiella sp ALL-1* de asimilar cianuro en condiciones alcalinas, es una propiedad que le confiere un gran potencial para su utilización en procesos de biorremediación de residuos industriales cianurados.

La temperatura es otro de los factores claves para la degradación de cianuro, ya que la mayoría de bacterias mesófilas productoras de enzimas degradadoras/asimiladoras de cianuro tienen una temperatura óptima de crecimiento entre 20 – 40 °C (Akcil, 2003; Luque, 2005; Tuya, 2014). Según otros estudios reportan que mejores tasas de crecimiento y degradación de cianuro están en el rango de 25 °C a 30 °C (Khamar et al., 2015). Pero en el presente trabajo según el ANOVA no tiene una significación estadística para la optimización, por lo cual se realizó una depuración del factor temperatura para la optimización. En el diagrama de superficie de respuesta se muestra temperaturas cercanas a 30 °C genera mayor porcentaje de

biodegradación en 60 horas, por otro lado, el incremento de la concentración de cianuro disminuye el porcentaje de biodegradación de cianuro libre por *Klebsiella sp ALL-1*.

Es importante considerar que la toxicidad de cianuro en altas concentraciones puede limitar la capacidad de los microorganismos, y pueda ser menos probable que lo pueda utilizarlo como sustrato para su crecimiento (Patil & Paknikar, 1999). Los compuestos de cianuro (NaCN, KCN, entre otros), se transforman a otras formas químicas (NH_3 , NH_4 , NO_2 , CO_2), por la acción microorganismos. En el presente estudio se partió a partir de concentraciones de 200 ppm a 400 ppm de cianuro libre, pero según los diagramas de superficie de respuesta se muestra que el incremento de concentraciones de cianuro genera disminución de la tasa de biodegradación por la cepa *Klebsiella sp ALL-1*.

V. CONCLUSIONES

- En la evaluación de biodegradación de cianuro libre por la cepa de *Klebsiella sp ALL-1*, generó como producto final amonio hasta 1,0 mg/L según la escala colorimétrica de amonio.
- La máxima tasa y eficiencia de degradación experimental de cianuro por *Klebsiella sp ALL-1* fue de 98 % y 98,8 % en 60 horas respectivamente.
- Los valores óptimos de temperatura, pH y concentración de cianuro fueron 30 °C; 10 de pH y 200 ppm respectivamente, para la máxima tasa de biodegradación de cianuro, estimada según el diseño de Box- Behnken con un 99 %.

VI. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar ensayos aplicando las variables óptimas encontradas variando la fuente de carbono para un mejor proceso de biorremediación.
- Realizar ensayos en forma consorcio bacteriano incluyendo la cepa *Klebsiella sp ALL-1* con otras bacterias degradadoras para aplicarlos para la biorremediación.
- Realizar pruebas de biodegradación in-situ para determinar los niveles reales de biodegradación del cianuro y compuestos derivados de los relaves con la cepa *Klebsiella sp ALL-1* con las condiciones óptimas encontradas en el presente estudio.
- Realizar estudios de optimización con más de 3 variables para la biodegradación de cianuro libre con la cepa *Klebsiella sp ALL-1*

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aazam, E. S. (2014). Environmental remediation of cyanide solutions by photocatalytic oxidation using Au/CdS nanoparticles. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 20(5), 2870–2875. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2013.11.020>
- Akcil, A. (2003). Destruction of cyanide in gold mill effluents: Biological versus chemical treatments. *Biotechnology Advances*, 21(6), 501–511. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(03\)00099-5](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(03)00099-5)
- Akcil, A., Erust, C., Gahan, C. S., Ozgun, M., Sahin, M., & Tuncuk, A. (2015). Precious metal recovery from waste printed circuit boards using cyanide and non-cyanide lixivants - A review. *Waste Management*, 45, 258–271. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2015.01.017>
- Akinpelu, E. A., Adetunji, A. T., Ntwampe, S. K. O., Nchu, F., & Mekuto, L. (2017). Biochemical characteristics of a free cyanide and total nitrogen assimilating *Fusarium oxysporum* EKT01/02 isolate from cyanide contaminated soil. *Data in Brief*, 14, 84–87. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2017.07.023>
- An, X., Cheng, Y., Huang, M., Sun, Y., Wang, H., Chen, X., ... Li, C. (2018). Treating organic cyanide-containing groundwater by immobilization of a nitrile-degrading bacterium with a biofilm-forming bacterium using fluidized bed reactors. *Environmental Pollution*, 237, 908–916. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.01.087>
- Baxter, J., & Cummings, S. P. (2006). The current and future

- applications of microorganism in the bioremediation of cyanide contamination. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 90(1), 1–17. <https://doi.org/10.1007/s10482-006-9057-y>
- Blumer, C., & Haas, D. (2000). Mechanism, regulation, and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis. *Archives of Microbiology*, 173(3), 170–177. <https://doi.org/10.1007/s002039900127>
- Brüger, A., Fafilek, G., Restrepo B., O. J., & Rojas-Mendoza, L. (2018). On the volatilisation and decomposition of cyanide contaminations from gold mining. *Science of the Total Environment*, 627, 1167–1173. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01.320>
- Calisaya Calderón, J. M. (2017). *Aislamiento y caracterización molecular del ARNr 16S de una cepa bacteriana degradadora de cianuro de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Magollo, Tacna - Perú*. Universidad Nacional Jorge Basadre Grohman.
- Carrillo P., F. (2000). “*Estudio cinético de la oxidación de cianuro y tiocianato con ozono.*” Centro de investigación y de estudios avanzados del INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL UNIDAD SALTILLO.
- Celińska, E. (2012). Klebsiella spp as a 1,3-propanediol producer the metabolic engineering approach. *Critical Reviews in Biotechnology*, 32(3), 274–288. <https://doi.org/10.3109/07388551.2011.616859>
- Chaudhari, A. U., & Kodam, K. M. (2010). Biodegradation of thiocyanate using co-culture of Klebsiella pneumoniae and Ralstonia sp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(4),

- 1167–1174. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2299-7>
- Chen, C. Y., Kao, C. M., & Chen, S. C. (2008). Application of *Klebsiella oxytoca* immobilized cells on the treatment of cyanide wastewater. *Chemosphere*, *71*(1), 133–139. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.10.058>
- Chen, C. Y., Kao, C. M., Chen, S. C., & Chen, T. Y. (2009). Biodegradation of tetracyanonickelate by *Klebsiella oxytoca* under anaerobic conditions. *Desalination*, *249*(3), 1212–1216. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2009.06.036>
- Chen, S. C., & Liu, J. K. (1999). The respiratory responses to cyanide of a cyanide-resistant *Klebsiella oxytoca* bacterial strain. *FEMS Microbiology Letters*, *175*(1), 37–43. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(99\)00173-1](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(99)00173-1)
- Dash, R. R., Gaur, A., & Balomajumder, C. (2009). Cyanide in industrial wastewaters and its removal: A review on biotreatment. *Journal of Hazardous Materials*, *163*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.06.051>
- Donato, D. B., Madden-Hallett, D. M., Smith, G. B., & Gursansky, W. (2017). Heap leach cyanide irrigation and risk to wildlife: Ramifications for the international cyanide management code. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *140*(September 2016), 271–278. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.02.033>
- Donato, D. B., Nichols, O., Possingham, H., Moore, M., Ricci, P. F., & Noller, B. N. (2007). A critical review of the effects of gold cyanide-bearing tailings solutions on wildlife. *Environment International*, *33*(7), 974–984. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2007.04.007>
- Donato, D. B., Noller, B. N., Moore, M., Possingham, H., Ricci, P. F.,

- Bell, C., & Nichols, O. (2004). Cyanide use, wildlife protection and the International Cyanide Management Code: an industry brokered partnership approach. *Sustainable Development Conference 25-29 October 2004*, (January 2011), 8.
- Donato, D., Smith, G., Griffiths, S., & Madden-Hallett, D. (2008). Wildlife Cyanide Risks and Compliance with the International Cyanide Management Code: Newmont Waihi Gold Mine, (September).
- Dubey, S. K., & Holmes, D. S. (1995). Biological cyanide destruction mediated by microorganisms. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 11(3), 257–265.
<https://doi.org/10.1007/BF00367095>
- Dzombak, D., Ghosh, R., & Wong-Chong, G. (2006). *Cyanide in water and soil chemistry, risk , and management* (Taylor & F). United States: CRC press.
- Ebbs, S. (2004). Biological degradation of cyanide compounds. *Current Opinion in Biotechnology*, 15(3), 231–236.
<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2004.03.006>
- Eisler, R., & Wiemeyer, S. N. (2004). Cyanide hazards to plants and animals from gold mining and related water issues. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 183(1), 21–54.
<https://doi.org/doi:10.1201/9781420037982-15>
- Erick, M. V. Z., Fernandez, C., Gerardo, M. C. C., & Sosa, C. (2012). *Bacteriologia Y Micologia Veterinaria* (Vol. I).
- Escalante, M. (2002). “*biodegradacion de crudo de petroleo en terrarios.*” *Universidad nacional mayor de san marcos*.
 universidad nacional mayor de san marcos.
<https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

- Garrity, G., Bell, J., & Lilburn, T. (2010). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol 2B*. (D. Brenner, N. Krieg, & J. Staley, Eds.), editorial board (second edi). USA: Editorial board. <https://doi.org/10.1245/s10434-010-1229-3>
- Gessner, T. P., Kadlec, R. H., & Reaves, R. P. (2005). Wetland remediation of cyanide and hydrocarbons. *Ecological Engineering*, 25(4), 457–469. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2005.07.015>
- Gilpavas, E., Medina, J., Dobrosz-Gómez, I., & Gómez, M. (2016). Degradación de Colorante Amarillo 12 de Aguas Residuales Industriales utilizando Hierro Cero Valente, Peróxido de Hidrógeno y Radiación Ultravioleta. *Informacion Tecnologica*, 27(3), 23–34. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642016000300004>
- Griffiths, S. R., Donato, D. B., Coulson, G., & Lumsden, L. F. (2014). High levels of activity of bats at gold mining water bodies: Implications for compliance with the International Cyanide Management Code. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(12), 7263–7275. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-2651-z>
- Gupta, N., Balomajumder, C., & Agarwal, V. K. (2010a). Enzymatic mechanism and biochemistry for cyanide degradation: A review. *Journal of Hazardous Materials*. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.11.038>
- Gupta, N., Balomajumder, C., & Agarwal, V. K. (2010b). Enzymatic mechanism and biochemistry for cyanide degradation: A review. *Journal of Hazardous Materials*, 176(1–3), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.11.038>

- Gupta, P., Ahammad, S. Z., & Sreerishnan, T. R. (2016). Improving the cyanide toxicity tolerance of anaerobic reactor: Microbial interactions and toxin reduction. *Journal of Hazardous Materials*, 315, 52–60. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.04.028>
- Gurbuz, F., Ciftci, H., & Akcil, A. (2009). Biodegradation of cyanide containing effluents by *Scenedesmus obliquus*. *Journal of Hazardous Materials*, 162(1), 74–79. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.05.008>
- Gutiérrez Pulido, H., & De la Vara Salazar, R. (2008). *Análisis y diseño de experimentos. Análisis y diseño de experimentos*. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Guzman-Rodriguez, M., McDonald, J. A. K., Hyde, R., Allen-Vercoe, E., Claud, E. C., Sheth, P. M., & Petrof, E. O. (2018). Using Bioreactors to Study the Effects of Drugs on the Human Microbiota. *Methods*. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2018.08.003>
- Harris, R., & Knowles, C. J. (1983). Isolation and growth of a *Pseudomonas* species that utilizes cyanide as a source of nitrogen. *Journal of General Microbiology*, 129(4), 1005–1011. <https://doi.org/10.1099/00221287-129-4-1005>
- Huertas, M. J., Sáez, L. P., Roldán, M. D., Luque-Almagro, V. M., Martínez-Luque, M., Blasco, R., ... García-García, I. (2010). Alkaline cyanide degradation by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 in a batch reactor. Influence of pH. *Journal of Hazardous Materials*, 179(1–3), 72–78. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.02.059>
- Hurtado, J., & Berastain, A. (2012). Optimización de la biorremediación en relaves de cianuración adicionando

- nutrientes y microorganismos. *Revista Peruana de Biología*, 19(2), 187–192.
- International Cyanide Management Institute. (2002). Additional Information on Cyanide, 1–28.
- Kaita, Y., Tarui, T., Shoji, T., Miyauchi, H., & Yamaguchi, Y. (2018). Cyanide poisoning is a possible cause of cardiac arrest among fire victims, and empiric antidote treatment may improve outcomes. *American Journal of Emergency Medicine*, (June 2017), 2017–2019. <https://doi.org/10.1016/j.ajem.2018.01.054>
- Kaksonen, A. H., Mudunuru, B. M., & Hackl, R. (2014). The role of microorganisms in gold processing and recovery - A review. *Hydrometallurgy*, 142, 70–83. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2013.11.008>
- Kandasamy, S., Dananjeyan, B., Krishnamurthy, K., & Benckiser, G. (2015). Aerobic cyanide degradation by bacterial isolates from cassava factory wastewater. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(3), 659–666. <https://doi.org/10.1590/S1517-838246320130516>
- Kao, C. M., Chen, K. F., Liu, J. K., Chou, S. M., & Chen, S. C. (2006). Enzymatic degradation of nitriles by *Klebsiella oxytoca*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71(2), 228–233. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0129-0>
- Kao, C. M., Liu, J. K., Lou, H. R., Lin, C. S., & Chen, S. C. (2003). Biotransformation of cyanide to methane and ammonia by *Klebsiella oxytoca*. *Chemosphere*, 50(8), 1055–1061. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(02\)00624-0](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00624-0)
- Khamar, Z., Makhdoumi-Kakhki, A., & Mahmudy Gharai, M. H. (2015). Remediation of cyanide from the gold mine tailing pond

- by a novel bacterial co-culture. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 99, 123–128.
<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.01.009>
- Kim, Y. M., Cho, H. U., Lee, D. S., Park, D., & Park, J. M. (2011). Comparative study of free cyanide inhibition on nitrification and denitrification in batch and continuous flow systems. *Desalination*, 279(1–3), 439–444.
<https://doi.org/10.1016/j.desal.2011.06.026>
- Kumar, R., Saha, S., Dhaka, S., Kurade, M. B., Kang, C. U., Baek, S. H., & Jeon, B. H. (2017). Remediation of cyanide-contaminated environments through microbes and plants: a review of current knowledge and future perspectives. *Geosystem Engineering*, 20(1), 28–40. <https://doi.org/10.1080/12269328.2016.1218303>
- Kumar, V., Kumar, V., & Bhalla, T. C. (2018). Alkaline active cyanide dihydratase of *Flavobacterium indicum* MTCC 6936: Growth optimization, purification, characterization and in silico analysis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 116(2017), 591–598. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.075>
- Lottermoser, B. (2010). *Mine Wastes*. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-12419-8>
- Lovaso, C. R., Hela, K., Harinaivo, A. A., & Hamma, Y. (2017). Bioremediation of soil and water polluted by cyanide: A review. *African Journal of Environmental Science and Technology*, 11(6), 272–291. <https://doi.org/10.5897/AJEST2016.2264>
- Luque-Almagro, V. M., Blasco, R., Martínez-Luque, M., Moreno-Vivián, C., Castillo, F., & Roldán, M. D. (2011). Bacterial cyanide degradation is under review: *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344, a case of an alkaliphilic cyanotroph. *Biochemical*

- Society Transactions*, 39(1), 269–274.
<https://doi.org/10.1042/BST0390269>
- Luque-Almagro, V. M., Cabello, P., Sáez, L. P., Olaya-Abril, A., Moreno-Vivián, C., & Roldán, M. D. (2018). Exploring anaerobic environments for cyanide and cyano-derivatives microbial degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(3), 1067–1074. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8678-6>
- Luque-Almagro, V. M., de la Paz Escribano, M., Cabello, P., Manso, I., Sáez, L. P., Moreno-Vivián, C., & Roldán, M. D. (2016). Iron homeostasis and oxidative stress in bacterial cyanide assimilation. *New Biotechnology*, 33(3), 411. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2015.10.069>
- Luque-almagro, V. M., Huertas, M., Moreno-vivián, C., Dolores, M., García-gil, L. J., Castillo, F., ... Blasco, R. (2005). Bacterial Degradation of Cyanide and Its Metal Complexes under Alkaline Conditions Bacterial Degradation of Cyanide and Its Metal Complexes under Alkaline Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(2), 940–947. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.2.940>
- Luque-Almagro, V. M., Moreno-Vivián, C., & Roldán, M. D. (2016). Biodegradation of cyanide wastes from mining and jewellery industries. *Current Opinion in Biotechnology*, 38, 9–13. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.12.004>
- Luque, M. (2005). *Metabolismo del cianuro y del cianato en Pseudomonas pseudoalcaligenes CECT5344 . Aplicaciones biotecnológicas.*
- María Garcés Molina, A., Betancur, L. M. A., Mazo, K. I. M., & Alzate, N. A. S. (2006). Aislamiento de consorcio de microorganismos

- degradadores de cianuro. (Spanish). *Revista Lasallista de Investigación*, 3(1), 7–12. Retrieved from <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=23151806&lang=es&site=ehost-live>
- Mart, A. D. (2012). Tratamiento de desechos del cianuro por biorremediación. *Tecnología En Marcha*, 25, 61–72.
- Medina C. Jorge – Quea J., Felipe, G.; Arévalo A. (2007). Minería Ilegal en el Perú. Repercusiones para el sector minero y el país. *Encuentro Empresarial: XXVIII Convención Minera*, 108.
- Mekuto, L., Ntwampe, S. K. O., Utomi, C. E., Mobo, M., Mudumbi, J. B., Ngongang, M. M., & Akinpelu, E. A. (2017). Performance of a continuously stirred tank bioreactor system connected in series for the biodegradation of thiocyanate and free cyanide. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 5(2), 1936–1945. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2017.03.038>
- Merk. (2013). *Test Amonio* (Vol. 49). <https://doi.org/1.08024.0001>
- Mirizadeh, S., Yaghmaei, S., & Ghobadi Nejad, Z. (2014). Biodegradation of cyanide by a new isolated strain under alkaline conditions and optimization by response surface methodology (RSM). *Journal of Environmental Health Science & Engineering*, 12(1), 85. <https://doi.org/10.1186/2052-336X-12-85>
- Momo, F., & Falco, L. (2015). La Mesofauna del Suelo, *Biología y Ecología*, 8. Retrieved from http://www.ungs.edu.ar/ms_ici/wp-content/uploads/2015/11/mesofauna-del-suelo-Momo-Falco.pdf
- Mongomery, D. (2004). *Diseño y Análisis de Experimentos*. (L. Wiley, Ed.) (segunda ed). New York: universidad estatal de Arizona.
- Moran, R., & Moran, R. E. (2001). El Cianuro en la Minería: Algunas Observaciones sobre la Química, Toxicidad y Análisis de las

- Aguas Asociadas con la Minería. *Colección Científico Técnica: Ediciones Del Tribunal Latinoamericano Del Agua*, (303), 6.
- Mudder, T., & Botz, M. (2004). Cyanide and society: a critical review. *Ejmp & Ep (European Journal of Mineral Processing and Environmental Protection)*, 4(1), 62–74. <https://doi.org/1303-0868>
- Pal, P., & Kumar, R. (2014). Treatment of coke wastewater: A critical review for developing sustainable management strategies. *Separation and Purification Reviews*, 43(2), 89–123. <https://doi.org/10.1080/15422119.2012.717161>
- Park, J. M., Trevor Sewell, B., & Benedik, M. J. (2017). Cyanide bioremediation: the potential of engineered nitrilases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(8), 3029–3042. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8204-x>
- Patil, Y. B. (2013). Development of a Bioremediation Technology for the Removal of Thiocyanate from Aqueous Industrial Wastes Using Metabolically Active Microorganisms. *Applied Bioremediation-Active and Passive Approaches (Edited by: Patil, Yogesh and Rao, Prakash) InTech Open Science, Croatia*, 33–52.
- Patil, Y. B., & Paknikar, K. M. (1999). Removal and recovery of metal cyanides using a combination of biosorption and biodegradation processes. *Biotechnology Letters*, 21(10), 913–919. <https://doi.org/10.1023/A:1005550707798>
- Patil, Y. B., & Paknikar, K. M. (2000). Development of a process for biodegradation of metal cyanides from waste waters. *Process Biochemistry*, 35(10), 1139–1151. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(00\)00150-3](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00150-3)
- Pedregosa, J. (2016). *Degradacion bacteriana de cianuro y*

compuestos nitrogenados tóxicos. Universidad de Córdoba.

- Ram, A. V. (2010). Toxicidad del cianuro. Investigación bibliográfica de sus efectos en animales y en el hombre. *Revista de Medicina Del Perú*, 71(1), 54–61. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(96\)00815-6](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(96)00815-6)
- Raybuck, S. A. (1992). Microbes and microbial enzymes for cyanide degradation. *Biodegradation*, 3(1), 3–18. <https://doi.org/10.1007/BF00189632>
- Razanamahandry, L. C., Andrianisa, H. A., Karoui, H., Kouakou, K. M., & Yacouba, H. (2016). Biodegradation of free cyanide by bacterial species isolated from cyanide-contaminated artisanal gold mining catchment area in Burkina Faso. *Chemosphere*, 157, 71–78. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.05.020>
- Razanamahandry, L. C., Andrianisa, H. A., Karoui, H., Podgorski, J., & Yacouba, H. (2018). Prediction model for cyanide soil pollution in artisanal gold mining area by using logistic regression. *Catena*, 162(February 2017), 40–50. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2017.11.018>
- Refsgaard, K., Bjarnholt, N., Møller, B. L., Saddik, M. M., & Bruun Hansen, H. C. (2010). Dissipation of cyanogenic glucosides and cyanide in soil amended with white clover (*Trifolium repens* L.). *Soil Biology and Biochemistry*, 42(7), 1108–1113. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.03.008>
- Simeonova, F., & Fishbein, L. (2004). Hydrogen Cyanide and Cyanides: Human Health Aspects. *World Health Organization Geneva*, 0(0), 0. Retrieved from <http://www.who.int/ipcs/publications/cicad/en/cicad61.pdf>
- Singh, N., & Balomajumder, C. (2016). Batch growth kinetic studies for

- elimination of phenol and cyanide using mixed microbial culture. *Journal of Water Process Engineering*, 11, 130–137. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2016.04.006>
- Sirianuntapiboon, S., Chairattanawan, K., & Rarunroeng, M. (2008). Biological removal of cyanide compounds from electroplating wastewater (EPWW) by sequencing batch reactor (SBR) system. *Journal of Hazardous Materials*, 154(1–3), 526–534. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.10.056>
- Suzuki, T., Nishikawa, C., Seta, K., Shigeno, T., & Nakajima-Kambe, T. (2014). Ethanol production from glycerol-containing biodiesel waste by *Klebsiella variicola* shows maximum productivity under alkaline conditions. *New Biotechnology*, 31(3), 246–253. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2014.03.005>
- Tuya Salas, J. D. (2014). *Evaluación De La Capacidad Degradativa De Cianuro Por Bacterias Alcalófilas Aisladas De Los Relaves De La Planta Concentradora De Metales Mesapata Cátac - Ancash*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Retrieved from http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/3641/1/Tuya_sj.pdf
- Valera, M. (2014). *Inmovilización de microorganismos degradadores de cianuro para la preparación de biofiltros*. Escuela Politécnica Nacional.
- White, J. M., Jones, D. D., Huang, D., & Gauthier, J. J. (1988). Conversion of cyanide to formate and ammonia by a pseudomonad obtained from industrial wastewater. *Journal of Industrial Microbiology*, 3(5), 263–272. <https://doi.org/10.1007/BF01569526>

VIII. ANEXOS

ANEXO 1. Composición del medio mineral (9M)

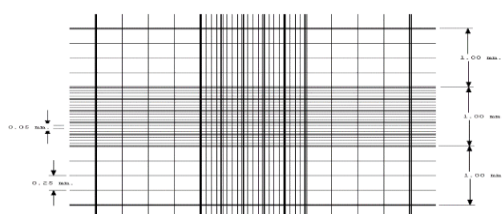
componente	g/L
NaHPO ₄ .7H ₂ O	6,4
KH ₂ PO ₄	3,0
NaCl ₂	0,5
Acetato de sodio	0,2%(w/v)
Extracto de levadura *	0,2%(w/v)
SALES MINERALES	1,0%(v/v)

componente	g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,050
CaCl ₂	0,010
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,050
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,050
CuCl ₂ .2H ₂ O	0,005
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,005
Na ₂ B ₄ O ₇ .10H ₂ O	0,002
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,003

Fuente: Khamar et al.(2015)

Nota: * fuente de nitrógeno

ANEXO 2. Recuento de la cepa en cámara de Petroff Hausser



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

$$N = (X_5) (25) (50) (10^3) \text{ bacterias/MI}$$

Dónde: X_5 = promedio del recuento

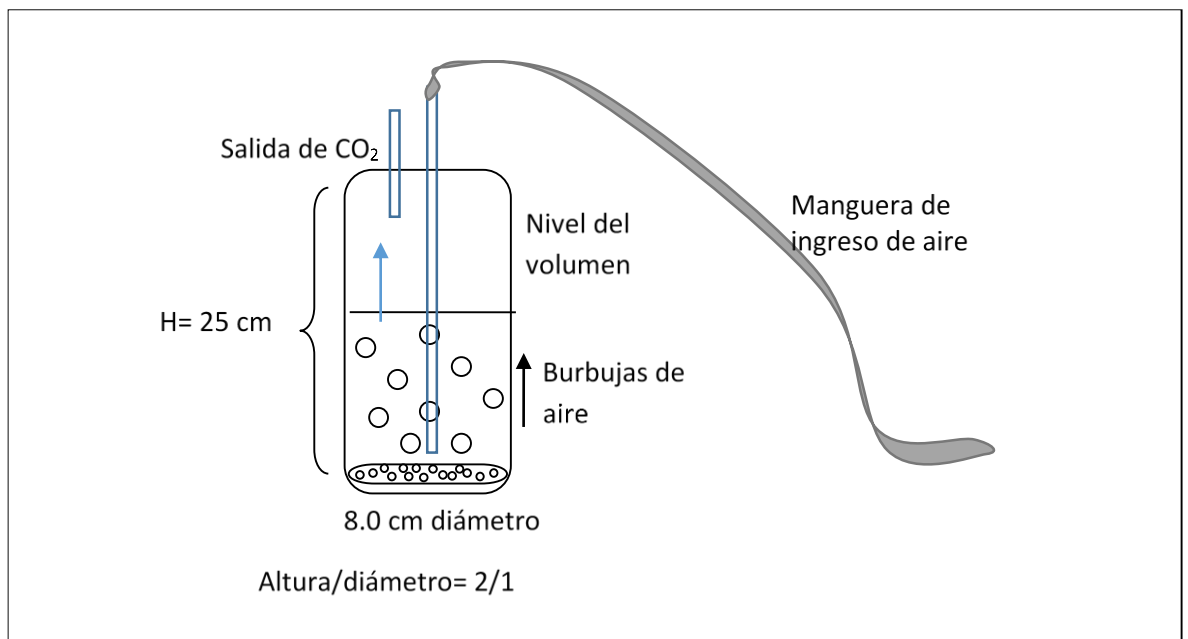
ANEXO 3. Fotografía de la adaptación de la cepa de *Klebsiella sp ALL-1* en forma ascendente a concentraciones mayores de cianuro libre.



ANEXO 4. Fotografía de diseño de las incubadoras construidas



ANEXO 5. Diseño del biorreactor



ANEXO 6. Acondicionamiento y instalación de los biorreactores según el diseño de Box Benhken.



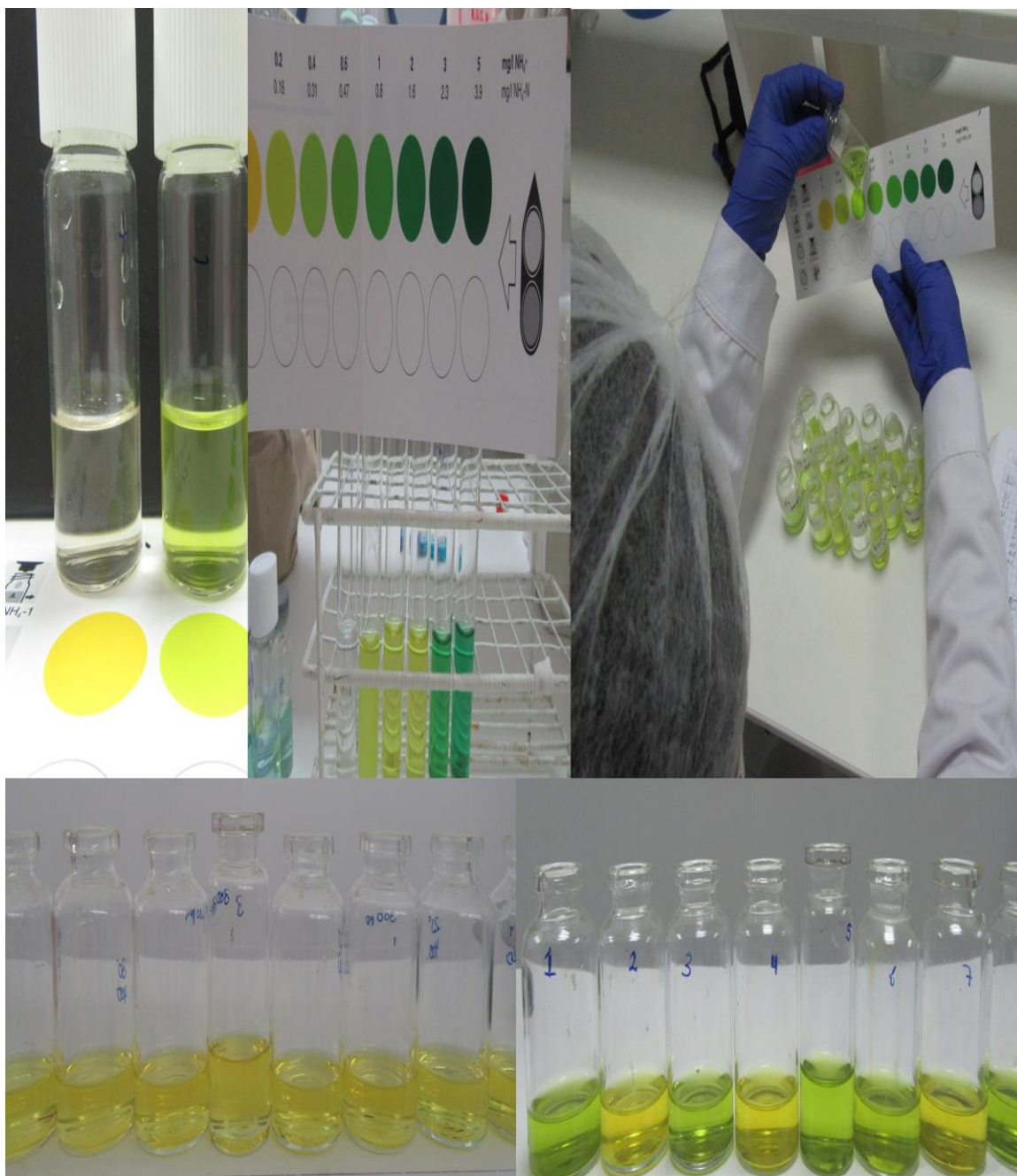
ANEXO 7. Condiciones de trabajo para la extracción de muestra de los biorreactores acondicionados.



ANEXO 8. Titulación volumétrica con nitrato de plata.

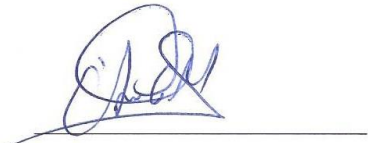


ANEXO 9. Detección de amonio mediante el test colorimétrico



ANEXO 10. Registro de los valores de pH en la biodegradación de cianuro

TRAT.	T (°C)	pH	[CN] ppm	pH 0h	pH 12h	pH 24h	pH 36h	pH 48h	pH 60h	pH 72h	pH 84h	pH 96h	pH 108h
1	25	10,0	300	10,10	9,92	9,94	9,76	9,72	9,82	9,78	9,73	9,75	9,76
2	35	10,0	300	10,00	9,90	9,92	9,80	9,75	9,76	9,80	9,77	9,76	9,73
3	25	11,0	300	10,94	10,82	10,79	10,74	10,69	10,67	10,72	10,73	10,69	10,73
4	35	11,0	300	10,98	10,88	10,82	10,70	10,71	10,73	10,75	10,78	10,71	10,74
5	25	10,5	200	10,51	10,35	10,37	10,37	10,33	10,36	10,33	10,35	10,38	10,34
6	35	10,5	200	10,53	10,29	10,31	10,34	10,35	10,37	10,34	10,36	10,31	10,35
7	25	10,5	400	10,48	10,38	10,34	10,38	10,30	10,34	10,32	10,34	10,32	10,36
8	35	10,5	400	10,50	10,28	10,32	10,27	10,26	10,37	10,35	10,32	10,40	10,34
9	30	10,0	200	10,14	9,77	9,87	9,93	9,87	9,85	9,83	9,87	9,80	9,82
10	30	11,0	200	10,95	10,88	10,76	10,75	10,72	10,70	10,73	10,72	10,69	10,71
11	30	10,0	400	10,00	9,90	10,10	9,86	9,81	9,86	9,81	9,79	9,87	9,86
12	30	11,0	400	10,98	10,67	10,81	10,71	10,71	10,73	10,76	10,73	10,71	10,74
13	30	10,5	300	10,52	10,39	10,34	10,32	10,35	10,37	10,35	10,41	10,39	10,36
14	30	10,5	300	10,49	10,41	10,38	10,39	10,37	10,34	10,41	10,39	10,36	10,37
15	30	10,5	300	10,51	10,43	10,40	10,31	10,32	10,33	10,36	10,41	10,37	10,35
16	30	10,5	300	10,50	10,40	10,35	10,34	10,30	10,35	10,31	10,36	10,38	10,37



Bach. Ana Beatriz Copari Mamani
Tesista



Dr. César Julio Cáceda Quiroz
Asesor de tesis