

**ESTRATEGIA PARA BIORREMEDIACIÓN DE AGUAS RESIDUALES
CONTAMINADAS CON CIANURO, PROVENIENTES DEL PROCESO MINERO
DE LIXIVIACIÓN DE ORO**



KÁTHERYM BAMBAGUE RUÍZ

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
PROGRAMA DE INGENIERÍA FÍSICA
POPAYÁN CAUCA
2017**

**ESTRATEGIA PARA BIORREMEDIACIÓN DE AGUAS RESIDUALES
CONTAMINADAS CON CIANURO, PROVENIENTES DEL PROCESO MINERO
DE LIXIVIACIÓN DE ORO**



KÁTHERYM BAMBAGUE RUÍZ

Trabajo de investigación presentado como requisito para optar al título de Ingeniera Física

Director:

Ph.D. JOSÉ LUIS NARVÁEZ SEMANATE

Codirectora:

M.Sc. SANDRA C. RIVAS ZÚÑIGA

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
PROGRAMA DE INGENIERÍA FÍSICA
POPAYÁN CAUCA
2017**

Nota de Aceptación

El director y jurados han
leído el presente documento,
escucharon la sustentación
del mismo por su autor y
la encuentran satisfactoria.

Director _____
PhD. José Luis Narváez Semanate

Codirector _____
M.Sc. Sandra C. Rivas Zúñiga

Jurado _____
PhD. Jorge E. Rodríguez Páez

Jurado _____
M.Sc. Clara Inés Giraldo Aristizabal

Fecha de sustentación: Popayán, Cauca _____ de _____ del 2017.

“Si puedes mantener la cabeza sobre los hombros, cuando otros la pierden y te cargan su culpa.

Si confías en ti mismo aun cuando todos de ti dudan, pero aun así tomas en cuenta sus dudas.

Si puedes esperar y no cansarte de la espera.

Si puedes soñar y no hacer de tus sueños tu guía.

Si puedes pensar sin hacer de tus pensamientos tu meta.

Si triunfo y derrota se cruzan en tu camino y tratas de igual manera a estos dos impostores.

Si puedes hacer un montón con todas tus victorias, si puedes arrojarlas al capricho del azar y perder...y remontarte de nuevo a tus comienzos sin que salga de tus labios una queja...

Si logras resistir, aunque tus fuerzas se vean menguadas, con la única ayuda de la voluntad que dice ¡Adelante!

Si ante la multitud das a la virtud abrigo.

Si aun marchando con reyes guardas tu sencillez.

Si no pueden herirte ni amigos ni enemigos...

*Si puedes rellenar un implacable minuto con sesenta segundos de combate bravío, tuya es la tierra y sus codiciados frutos, y lo que es más...”
Serás grande, grande en la vida.*

Rudyard Kipling

DEDICATORIA

A mí querida madre Stella

Quien con su incondicional apoyo, cariño, ternura y abnegación profunda, siempre nos acompaña sin desfallecer en cada paso que damos. Mi querida madre, es la pieza fundamental del maravilloso hogar que junto a mi padre nos han brindado. Su persistencia, liderazgo y amor profundo es la fuerza con la que día a día mis hermanas y yo, salimos a conquistar nuestros sueños.

A mí querido padre Edgar

Mi gran ejemplo de vida, de disciplina, fortaleza y perseverancia. Un amigo, un incansable soñador, aventurero, gran educador, poeta y erudito, de aquellas personas que el mundo lamentablemente no ha disfrutado, pero quien con su silencioso y descomunal cariño hacia nosotros, su familia, nos obsequia los cimientos para caminar por este largo sendero de la vida.

A mis maravillosas hermanas

Yolima, Margie, Berna y Cristina, gracias por su cariño, enseñanzas, experiencias compartidas, y por las mil aventuras vividas. Junto a ustedes he disfrutado el amor por el deporte, viajes hacia destinos turbios como lo fue la media maratón de Bogotá con Cris y por ser el más grande ejemplo de amistad verdadera y respaldo en todo momento sin importar las circunstancias.

A mi querido y fiel amigo Lanás.

Gracias porque junto a ti descubrí el más puro, tierno y sincero amor durante los 18 maravillosos años que caminaste incondicionalmente junto a mí. Tus huellitas siempre me seguirán acompañando.

AGRADECIMIENTOS

Después de estos 2 años, me gustaría dar las gracias a todas las personas que de una u otra manera me han brindado su apoyo, colaboración y asesoría durante la realización de este trabajo de grado.

A mis directores, PhD. José Luis Narváez Semanate, PhD. Willfrand Pérez y M.Sc. Sandra Rivas, por brindarme sus conocimientos y respaldo en todo momento. Trabajar bajo su dirección me ha enriquecido día a día.

A la profesora M.Sc. Yamilet Arcos, de la escuela de microbiología de la Universidad de Antioquía, quien muy amablemente nos brindó su ayuda en un momento trascendental del proyecto, cuando mis fuerzas estaban desfalleciendo. Profe, gracias a su valiosa y oportuna colaboración, fue posible iniciar este trabajo de grado.

Al departamento de Biología de la Universidad del Cauca por su gran apoyo. Al personal del Laboratorio de Genómica y Biología Molecular, GeBix-BIMAC, especialmente a la M.Sc. Yenifer Tobar, por su disponibilidad y enorme paciencia con mis desacertadas “primeras preguntas” al inicio de esta investigación. A mi compañera de aventuras en el laboratorio y cosecha de guayabas Ariane, a la profesora Patricia Vélez e Ivon Bolaños por todo su colaboración.

Agradezco enormemente, al profesor Nelson Rojas por su amable acogida durante mi estadía en el laboratorio de Biología Celular y Molecular CELMOLEC, de la Universidad del Cauca, que por algunos instantes se convirtió en mi segundo hogar. También le agradezco a la M.Sc. Fabiola Gonzales de la Facultad de Salud; al PhD. Germán Cuervo, al Profesor del Sena Alto Cauca, Jesús Jhovany Ángel y al personal encargado de los laboratorios de Biología y Química por su valerosa contribución. Gracias a todos, por beneficiar este trabajo de grado, por su paciente explicación durante mi ingreso a los laboratorios de biología y del grupo GEBIX-BIMAC, por facilitarme herramientas para realizar las pruebas de identificación de las cepas y por su colaboración durante la fase final de este proyecto, que fue realizada en los laboratorios del Departamento de Química. A ustedes, mi mayor gratitud, por guiar mis primeros pasos en el mundo de la ciencia.

A Daniel, Jaime, Brandon, Carlos Mario, Alejita y Cristian, gracias por sus asesorías. Con su ayuda siempre las dificultades fueron más llevaderas.

A la Grandiosa Universidad del Cauca y a la Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad del Cauca (VRI), por creer en esta idea y financiar nuestro proyecto.

A los jurados: PhD. Jorge E. Rodríguez Páez y M.Sc. Clara Inés Giraldo Aristizabal, les agradezco inmensamente por sacar un espacio en su tiempo y dedicarlo a leer estas páginas, que son el resultado de una motivación de aquellos sueños infantiles de ser recíprocos con el medio ambiente. Gracias a este trabajo de grado, se cumplió el sueño y se pudo involucrar el conocimiento que se adquirió en la academia al servicio de la naturaleza. Para muchos este proyecto serán solo hojas y gráficas, pero en mi alma siento que este pequeño paso que se ha dado en la descontaminación de recursos hídricos, ha sido bastante gratificante y me deja con la enorme sensación de que los sueños de infancia no deben quedar sepultados en el olvido de los años.

Agradezco a todos mis amigos, locos pero inigualables amigos y compañeros de salidas deportivas, culturales, estudiantiles... y de mil aventuras, como olvidar el atletismo, las tardes de tenis e infinidad de actividades que cumplieron a cabalidad su propósito, desoxidar el esqueleto. Amigos, con regalarme un poco de su tiempo, se convirtieron en parte de mí. Los mejores recuerdos de juventud a su lado. Especialmente a esa unión de aventureros amigos de universidad, que un día nos reunimos como hermanos en aquella excepcional comunidad.

A mis profesores, aquellos educadores que con el mayor amor y comprensión me guiaron durante todas las etapas de mi educación. A todos mis profes, desde la primaria hasta la universidad, les doy las gracias por ser una fuente de inspiración y una grandiosa luz que me acompaña durante el largo proceso de aprendizaje.

Agradezco a mi familia, especialmente a mis tías Rita, Rosa, Irma y a todos mis primos. Las reuniones de fin de año a su lado, me han servido para llenarme de entusiasmo y alegría. Ustedes son la fuente de inspiración, que me motiva día a día a ser tan grande como lo son ustedes.

Finalmente a unas personas muy especiales, que se merecen mucho más que este trabajo de grado, a unas personas que a partir de hoy intentaré recompensar, a mis padres Stella, Edgar, a mis hermanas Yolima, Margie, Berna, Cris, y a la memoria de mi querido y fiel amigo Lanitas. Sin ustedes, éste trabajo no hubiera sido posible.

Resumen

En el suroccidente Colombiano, en la zona norte del Departamento del Cauca, la contaminación por cianuro es un potencial problema como consecuencia de la creciente explotación minera.

Una de las técnicas más comunes en la recuperación de oro es el proceso de lixiviación, donde se usa una solución de cianuro de sodio (NaCN), a 3000 ppm, para recuperar el mineral. Como consecuencia de ello, una vez se obtiene el oro, se generan aguas residuales con alto contenido de cianuro, las cuales deben ser tratadas adecuadamente para reducir y si es posible eliminar su capacidad contaminante, pero a causa del alto costo que implica su tratamiento, en algunas ocasiones, las aguas de residuo no son procesadas de forma idónea y se vierten indiscriminadamente en ríos y suelos, causando graves problemas de contaminación. Por esta razón, en el presente trabajo se indican los resultados de una propuesta biotecnológica que se plantea como estrategia para remediación de aguas residuales producidas en la extracción de oro, para ello se usaron bacterias pertenecientes al género de *Pseudomonas*, debido a que estos microorganismos crecen en medios altamente cianurados, por lo cual se evaluó su potencial uso en la eliminación de dichos compuestos. Trabajos previos han reportado la eficiencia de estos microorganismos en actividades similares.

Para la realización del experimento final, en el cual se determinó el porcentaje de eliminación de cianuro de sodio (NaCN) por tres cepas (*Pseudomonas aeruginosa*, *fluorescens* y un cultivo mixto), se utilizó un diseño experimental mediante el método factorial multinivel, considerando la concentración de bacterias o unidades formadoras de colonia (UFC/mL) que se adicionaron, y el tiempo de degradación, como dos factores relevantes. Después de realizadas las correspondientes pruebas se encontró que el porcentaje de eliminación de NaCN, propiciada por la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* fue del 84%; *Pseudomonas fluorescens* del 40%; y un cultivo mixto de *Pseudomonas* degradó el 30% del NaCN, transcurridos tres días (72horas); todo ello a temperatura ambiente, buffer carbonato y a un pH de 10,20. Con estos resultados se diseñó un modelo de planta biológica para el tratamiento de aguas residuales generadas en el proceso minero de extracción de oro, propuesta de bajo costo y que hace uso de tecnologías amigables con el medio ambiente.

Abstract

Gold mining occupies an important place in the Colombian economy and covers a wide range of beneficiaries. In the southern of Colombia, in the north of the Cauca State, the cyanide contamination increases as a consequence of the intensification of mining. Lixiviation is one of the most common and used processes, where a solution of sodium cyanide (NaCN) at 3000 ppm is used to recover the mineral. Because of the large amounts of water and NaCN used in this process, once gold is obtained, wastewater with high cyanide content is generated which must be correctly treated, however, because of the high cost of this treatment, it is not processed properly and in many mining excavations, in open field and illegal mining, contaminated water is deposited indiscriminately into rivers and soil, polluting the environment. Taking into account the aforementioned, the purpose of this research work is to suggest biotechnological strategies for the remediation of these waters. It is proposed to use a bacterial isolation of *Pseudomonas*, because these microorganisms have very versatile metabolic functions of assimilation and detoxification, allowing them to grow in cyanide, the only source of carbon and nitrogen. Processes like digestion, assimilation and metabolism will be utilized in order to degrade cyanides existing in the wastewater of mining.

After performing the corresponding tests it was found that the percentage of elimination of NaCN, due to a strain of *Pseudomonas aeruginosa* was 84%; *Pseudomonas fluorescens* 40%; and mixed *Pseudomonas* 30%, after three days (72 hours). All this at room temperature, carbonate buffer and pH of 10.20. With these results, a low cost model of Biological Treatment Plant for Wastewater, originated during the mining process of extraction of gold, was designed. Friendly technologies were also taken into consideration for building the treatment plant.

Objetivos

Objetivo General

- Proponer una estrategia biotecnológica para la remediación de aguas residuales contaminadas con cianuro, que se generan durante el proceso de lixiviación de oro, haciendo uso de bacterias pertenecientes al género de *Pseudomonas*.

-

Objetivos Específicos

- Evaluar la tolerancia y la capacidad degradadora de *Pseudomonas*, sobre muestras de agua residual contaminada con cianuro (escala de laboratorio).
- Determinar el porcentaje de eficiencia de remoción de contaminantes cianurados

Contenido

	Pág.
Resumen.....	6
Abstract.....	7
Objetivos.....	8
Objetivo General.....	8
Objetivos Específicos.....	8
Lista de Figuras.....	12
Lista de tablas.....	15
1. INTRODUCCIÓN.....	2
Problema de investigación.....	3
Justificación.....	4
Impacto.....	4
Publicaciones.....	5
2. MARCO TEÓRICO.....	6
2.1. MINERÍA AURÍFERA: RELACIÓN ENTRE HOMBRE Y METALURGIA.....	7
2.2. EXTRACCIÓN DE ORO EN COLOMBIA.....	8
2.2. 1. Aportes Económicos de la Extracción de Oro.....	8
2.2.2. Minería Aurífera y sus consecuencias.....	9
2. 3. EXTRACCIÓN DE ORO EN EL DEPARTAMENTO DEL CAUCA.....	11
2.4. ETAPAS DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE ORO EN UNA PLANTA DE BENEFICIO.....	12
2.4.1. Trituración De Minerales.....	13
2.4.2. Proceso Hidrometalúrgico De Flotación.....	16
2.4.3. Lixiviación Por Cianuración.....	19
2.4.4. Precipitación con Polvo de Zinc (Proceso Merrill Crowe).....	21
2.4.5. Fundición y Refinería.....	22
2.5. USO DEL CIANURO EN MINERÍA.....	24
2.5.1. Generalidades Del Cianuro.....	25
2.6. DEGRADACIÓN BIOLÓGICA DEL CIANURO.....	32
2.6.1. Bacterias y su importancia.....	33

2.6.2. Características de <i>Pseudomonas</i>	35
2.6.3. Potencial Biotecnológico de <i>Pseudomonas</i>	35
2.6.4. Uso de <i>Pseudomonas</i> en Minería.....	36
3. MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1. ACTIVIDADES DE DETERMINACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE <i>Pseudomonas</i> ...	38
3.1.1. Preparación de medios de cultivo y siembra de microorganismos	39
3.1.2. Pruebas para confirmación de la Taxonomía del material biológico	40
3.1.3. Determinación de la curva de crecimiento	41
3.1.4. Curva de Calibración de <i>Pseudomonas</i>	42
3.1.5. Criopreservación	42
3.2. ACTIVIDADES PREVIAS AL ESTUDIO DE DEGRADACIÓN CON NaCN	43
3.2.1. Selección de la Solución Amortiguadora o Buffer.....	44
3.2.2. Curva de calibración para NaCN	45
3.2.3. Preparación de las soluciones cianuradas empleadas en la prueba de degradación ..	45
3.3. DISEÑO EXPERIMENTAL	47
3.4. MONTAJE EXPERIMENTAL	49
4. RESULTADOS.....	53
4.1. ACTIVIDADES PREVIAS CON <i>Pseudomonas</i>	54
4.1.1. Confirmación de la Taxonomía del material biológico.....	54
4.1.2. Curva de Crecimiento	55
4.1.3. Curva de calibración para <i>Pseudomonas</i>	58
4.1.4. Criopreservación	60
4.2. ACTIVIDADES PREVIAS CON NaCN	60
4.2.1. Curva de calibración para NaCN	60
4.3. PRUEBAS DE BIODEGRADACIÓN DE NaCN.....	65
4.3.1. EXPERIMENTO No. 1. DEGRADACIÓN DE NaCN CON <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i>	65
4.3.2. EXPERIMENTO No. 2. DEGRADACIÓN DE NaCN CON <i>Pseudomonas</i> <i>fluorescens</i>	72
4.3.3. EXPERIMENTO No. 3. DEGRADACIÓN DE NaCN CON <i>Pseudomonas mixta</i> (<i>P. aeruginosa</i> + <i>P. fluorescens</i>)	77

4.4. DISCUSION DE RESULTADOS.....	81
5. PROPUESTA PARA BIODEGRADACIÓN DE CIANURO DE SODIO (NaCN)	84
4.1.PLANTA BIOLÓGICA PARA EL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES	85
4.1.1. Tanque de Incubación	86
4.1.2. Biodiscos.....	86
4.1.3. Biorreactor	88
4.1.4. Colector de Gases y Vapores	89
4.1.5. Tanque de Filtrado	89
5. CONCLUSIONES.....	91
ANEXOS	93
Análisis del Error en el Experimento No.1.....	94
Análisis del Error en el Experimento No. 2.....	99
BIBLIOGRAFÍA	102

Lista de Figuras

Pág.

Figura 1. Capa de oro hallada en Mold, Gales. Fabricada entre 1900-1600 a. C.	7
Figura 2. Participación por Departamento en la producción de oro para el I trimestre del 2015. (Fuente: SIMCO; Agencia Nacional de Minería (Base Regalías). Cálculos: Dirección de Minería Empresarial MME) .8	
Figura 3. Legalidad e ilegalidad de la minería en Colombia. (Fuente: censo minero departamental Colombiano MME 2010-2011).....	9
Figura 4. Minas ilegales y grupos armados que controlan esta actividad en Colombia y en el Departamento del Cauca. (Fuente: El Espectador).....	10
Figura 5. a). Potencial minero en el Departamento del Cauca, Colombia. b). Solicitud y títulos mineros otorgados. (Fuente: Centro de Estudios Interculturales de la Universidad Javeriana, Cali; Inocoder)	11
Figura 6. Áreas declaradas protegidas en el departamento del Cauca. Fuente: Centro de Estudios Interculturales de la Universidad Javeriana, Cali; Inocoder).....	12
Figura 7. Imagen de una Trituradora de Mandíbulas tipo Blake. (Fuente: chancadoras.org)	13
Figura 8. Imagen de un triturador giratorio o impactor. (Fuente: Chavez.T.J).....	14
Figura 9. (a) Parte interior de un molino de bolas, con su respectivo medio de molienda (bolas de acero); (b). Parte exterior de un molino de bolas. (Fuente: Mine Machinery co. LTD).....	14
Figura 10. Esquema general correspondiente al principio de funcionamiento de un harnero convencional.	15
Figura 11. Vista lateral y frontal de una Harnero industrial de estratificación. (Fuente: wilde.cl).....	16
Figura 12. (a) Representación del funcionamiento interno de una celda de flotación. (b). Equipo industrial donde se realiza el proceso de flotación en metalurgia. (Fuente: ceyge.cl).....	17
Figura 13. Angulo de contacto formado entre una burbuja de aire y una superficie sólida, inmersas en un medio líquido (agua). (Fuente: Salager.J.L; Forgiarini G. A)	17
Figura 14. (a). Superficie hidrófoba en la que el ángulo de contacto θ es $> 90^\circ$; (b). Las partículas hidrófobadas se adhieren a la burbuja de aire. (Fuente: Salager.J.L; Forgiarini G. A)	18
Figura 15. Las partículas hidrofobadas (con contenidos de oro) se adhieren a las burbujas de aire que las hace ascender hasta la superficie	18
Figura 16. Burbujas y espuma que se forman en la parte superior de la celda de flotación.	18
Figura 17. (a). Superficie hidrófila en la que el ángulo de contacto θ es $< 90^\circ$; (b). Las partículas hidrófilas no se adhieren a la burbuja de aire y caen durante el ascenso de la misma. (Fuente: Salager.J.L; Forgiarini G. A)	19
Figura 18. Proceso de lixiviación por cianuración. (a). El agente lixivante NaCN de color blanco, se agrega a la mezcla de agua y minerales con contenidos de oro (color amarillo). (b). El NaCN actúa como una especie de imán y atrae al oro, formando un complejo que es soluble en agua ($\text{Na}[\text{Au}(\text{CN})_2]$).....	20
Figura 19. Partículas de dicianoaurato de sodio $\text{NaAu}(\text{CN})_2$ con polvo de zinc.....	22
Figura 20. Proceso de fundición de oro.....	23
Figura 21. Mina Crown en Nueva Zelanda. Lugar donde por primera vez se implementó el proceso de cianuración a escala industrial en el año de 1889. (Fuente: Manuscripts & Pictorial. National Library of New Zealand)	25
Figura 22. Iones cianuro y cianuro de hidrógeno	26
Figura 23. Equilibrio entre CN^-/HCN en función del pH. (Fuente: Scott. J. S. y J.C).....	26
Figura 24. Productos naturales que contienen pequeñas cantidades de cianuro.....	29
Figura 25 . Mina Homestake. Dakota del sur, Estados Unidos. (Fuente: AirPhotoNA.com)	33
Figura 26. Secuencia de pasos para realizar actividades previas con <i>P. aeruginosa</i> y <i>P. fluorescen</i>	38
Figura 27. (a). Caldo nutritivo (medio líquido). (b). Agar nutritivo (medio sólido).	39
Figura 28. Metodología para la siembra (por agotamiento) de bacterias en agar nutritivo	39
Figura 29. Crecimiento bacteriano. (a). <i>P. aeruginosa</i> . (b). <i>P. fluorescens</i> en agar nutritivo, usando la técnica de siembra por agotamiento y después de 24 horas de incubación	40
Figura 30. Muestras por triplicado para realizar la curva de crecimiento de <i>Pseudomonas</i> . Cada celda contiene caldo nutritivo e inóculo	41
Figura 31. Diluciones preparadas a partir de una cepa madre de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	42
Figura 32. (a). Suspensión celular distribuida en 6 microtubos eppendorf. (b). Microtubo eppendorf con	43

Figura 33	Secuencia de pasos para realizar actividades previas con NaCN.....	43
Figura 34.	a). Balanzas analíticas en las cuales se pesan las cantidades requeridas de Na ₂ CO ₃ y NaHCO ₃ . b). pH-metro para verificar el valor de pH. C). Balón aforado que contiene Buffer carbonato a pH:10,20	44
Figura 35.	Balones aforados con concentraciones de 100 ppm, 300 ppm, 500 ppm, 700 ppm y 1000 ppm de NaCN.	45
Figura 36.	(a). Campana de extracción, encargada de controlar la exposición a vapores, gases y aerosoles tóxicos. (b). Indumentaria básica requerida para trabajar con NaCN en laboratorio	46
Figura 37.	a). Presentación comercial de NaCN sólido. b). Doble protección. c). Caja debidamente rotulada en la cual debe reposar el tóxico..	46
Figura 38.	Dinámica del diseño factorial multinivel con factores, niveles y variable de respuesta.	47
Figura 39.	Distribución de solución cianurada con su respectiva concentración bacteriana y controles de cianuro para el experimento con <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50
Figura 40.	Distribución de solución cianurada con su respectiva concentración bacteriana y controles de cianuro para el experimento con <i>Pseudomonas fluorescens</i>	51
Figura 41.	Distribución de solución cianurada con su respectiva concentración bacteriana y controles de cianuro para el experimento con <i>Pseudomonas mixta</i>	51
Figura 42.	Muestras en agitación que contienen 25 ml de NaCN disuelto en buffer carbonato a pH 10,20 y con dos concentraciones diferentes de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>P. fluorescens</i>	52
Figura 43.	Equipo de filtración al vacío, para separar las bacterias de la solución cianurada	52
Figura 44.	Fotografía obtenida con Microscopio óptico de alta resolución. En donde se muestra el color característico de las bacterias Gram negativa, para una muestra de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	54
Figura 45.	Tirilla de resultado obtenido en la prueba de oxidasa	54
Figura 46.	Tirilla Api 20E, después de realizar el protocolo indicado por el fabricante y lista para la lectura de colores.	55
Figura 47	Espectro de absorbancia para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , donde se observa que λ_{max} es 600 nm. ...	56
Figura 48.	(a). Curva de crecimiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> con ajuste exponencial.....	56
Figura 49.	a). Curva de crecimiento de un cultivo bacteriano de <i>P. aeruginosa</i> , con sus respectivas fases. ..	57
Figura 50.	(a). Medidas de concentración con cámara de Neubauer para las 6 diluciones de <i>P. aeruginosa</i> . (b). Medidas de absorbancia para <i>P. aeruginosa</i> tomadas con un espectrofotómetro a 600nm.	58
Figura 51.	Curva de calibración para <i>Pseudomonas</i> . (<i>P. aeruginosa</i> y <i>P. fluorescens</i>)	59
Figura 52.	(a). Tubos eppendorf rotulados que contienen medio de cultivo/glicerol, previo a ser almacenados. (b). Ultracongelador donde se almacenan las muestras.....	60
Figura 53	Espectro de absorbancia en muestras por duplicado que contenían NaCN a una concentración de 1000 ppm. Se observó que λ_{max} es 550 nm	61
Figura 54	Muestras por triplicado, correspondientes a la preparación de cinco diferentes concentraciones de NaCN a pH: 10,20.....	62
Figura 55.	Curva de calibración de NaCN, disuelto en buffer carbonato a pH: 10,20, medido a una longitud de onda de 550 nm y preparado a 5 concentraciones distintas (100 ppm, 300 ppm, 500 ppm, 700 ppm, 1000 ppm).	63
Figura 56.	Curva de calibración de NaCN en unidades de ppm.....	64
Figura 57.	Crecimiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en NaCN a temperatura ambiente, y pH 10,20 transcurridas 24 horas.	66
Figura 58.	Montaje experimental y materiales usados para cuantificar el cianuro degradado por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	66
Figura 59.	Convenciones para los resultados experimentales. La muestra 1 corresponde a NaCN con una concentración baja de <i>Pseudomonas</i> y la muestra 2 contiene NaCN con una concentración alta de bacterias.	67
Figura 60.	Concentración media residual de NaCN, para dos concentraciones de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> evaluada.	68
Figura 61.	(a) Comportamiento de la muestra control de NaCN a 1000 ppm. (b). Proceso de biodegradación de NaCN propiciado por las dos concentraciones de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> incorporadas a la disolución Inicial de NaCN, en función del tiempo.	69
	Concentración media residual de NaCN, realizado por $6 \cdot 10^{11}$ UFC/ml de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , partiendo de una concentración inicial de 1000 ppm de NaCN, en buffer carbonato, pH 10,20, durante un periodo de 72 horas.	70

Figura 63. Porcentaje de degradación de NaCN, realizado por una concentración de $6 \cdot 10^{11}$ UFC/ml de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> durante 72 horas.	71
Figura 64. Montaje experimental y materiales para cuantificar el cianuro degradado por	72
Figura 65. Concentración media residual de NaCN para dos concentraciones de <i>Pseudomonas fluorescens</i> , correspondientes a 0,24,48 y 72 horas.	73
Figura 66 . (a) Control de NaCN que permaneció constante a 1000 ppm durante 72 horas. (b). Evidencia del proceso de degradación de NaCN propiciado por las dos concentraciones de <i>Pseudomonas fluorescens</i> , durante un tiempo de 72 horas.	74
Figura 67. Concentración media residual de NaCN propiciado por $6 \cdot 10^{11}$ UFC/ml de <i>Pseudomonas fluorescens</i> , en función del tiempo, tomando una concentración inicial 1000 ppm de NaCN, en buffer carbonato, pH 10,20, para un ensayo que duro 72 horas.	75
Figura 68. (a). Porcentaje de degradación de NaCN, ocasionado por una concentración de $6 \cdot 10^{11}$ UFC/ml de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	76
Figura 69. Montaje experimental y materiales usados para cuantificar el cianuro degradado por <i>Pseudomonas mixta</i>	77
Figura 70 . Concentración media residual de NaCN por <i>Pseudomonas mixta</i> , transcurridas 72 horas.....	78
Figura 71. (a) Comportamiento del control de NaCN que permaneció constante a 1000 ppm durante 72 horas (b). Evidencia del proceso de degradación de NaCN propiciado por <i>Pseudomonas mixta</i> , considerando un tiempo de 72 horas de duración del ensayo.	79
Figura 72. Concentración media residual de NaCN, ocasionada por $6 \cdot 10^{11}$ UFC/ml de <i>Pseudomonas mixta</i> , partiendo de una concentración inicial de 1000 ppm de NaCN, en buffer carbonato y pH 10,20, durante un periodo de 72 horas	79
Figura 73. Porcentaje de degradación de NaCN, realizado por una concentración de $6 \cdot 10^{11}$ UFC/ml de <i>Pseudomonas mixta</i>	80
Figura 74. Diseño de una Planta Biológica Para El Tratamiento de Aguas Residuales, con sus respectivas etapas.....	85
Figura 75. Tanque de incubación de <i>Pseudomonas</i>	86
Figura 76. a). Vista lateral izquierda del diseño un biodisco. b) vista frontal de la dinámica de funcionamiento del biodisco y formación de biopelícula de <i>Pseudomonas</i> (color verde).	87
Figura 77. Diseño de un Biorreactor para eliminar NaCN de aguas residuales que se generan durante el proceso de extracción de oro.	88
Figura 78. Vista frontal y lateral de un cilindro colector de gases y vapores orgánicos.....	89
Figura 79. Tanque de filtrado bacteriano acoplado con una membrana o tamiz.	90
Figura 80. Diagrama de Pareto estandarizado para concentración de cianuro, considerando 4 valores.	95
Figura 81. Diagrama de Pareto estandarizado con las variables vitales en el proceso de biodegradación de cianuro. La variable B representa el tiempo de degradación y A la concentración bacteriana.....	95
Figura 82. Efectos principales para concentración residual de NaCN	96
Figura 83. Diagrama de Pareto estandarizado para concentración de cianuro, con dos variables vitales.	100
Figura 84. Efectos principales para concentración residual de NaCN	100

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1. Clasificación de los tamices de acuerdo al tamaño de abertura lineal o luz del tamiz (mm)	15
Tabla 2. Condiciones óptimas para realizar el proceso de lixiviación de oro mediante cianuración.	21
Tabla 3. Comparativo entre valores límites permisibles de NaCN en aguas, para Colombia y U.S.A	24
Tabla 4. Efectos tóxicos del HCN al ser inhalado por el ser humano (fuente: Manual de Fumigación Contra Insectos By Food and Agriculture Organization of the United Nations)	28
Tabla 5. Compuestos sintetizados y medicamentos que contiene cianuro.....	30
Tabla 6. Factores del diseño experimental multinivel.	48
Tabla 7. Variable de respuesta del diseño experimental	48
Tabla 8. Diseño experimental, estructurado mediante el modelo factorial multinivel, con el cual se determinó la concentración residual de CN ⁻ , degradado por cepas de <i>Pseudomonas</i>	48
Tabla 9. Montaje experimental para determinar el porcentaje de eliminación de CN por cepas de <i>Pseudomonas</i>	49
Tabla 10. Datos para la elaboración de la curva de calibración de NaCN.	61
Tabla 11. Datos de absorbancia en muestras por triplicado de NaCN, preparado a cinco diferentes concentraciones.....	62
Tabla 12. Datos para elaboración de Curva de calibración de NaCN, en unidades de ppm y su equivalente en g/L.....	63
Tabla 13. Concentración media residual de NaCN con buffer carbonato por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> a temperatura ambiente y pH 10,20	67
Tabla 14 . Degradación media acumulada de NaCN con buffer carbonato por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> a temperatura ambiente y pH 10,20	70
Tabla 15. Concentración media residual de NaCN con buffer carbonato por <i>Pseudomonas fluorescens</i> a temperatura ambiente y pH 10,20	73
Tabla 16. Degradación media acumulada de NaCN a pH 10,20, disuelto en buffer carbonato y a temperatura ambiente ocasionada por <i>Pseudomonas fluorescens</i>	75
Tabla 17. Concentración media residual de NaCN con buffer carbonato por <i>Pseudomonas mixta</i> (<i>P. aeruginosa</i> + <i>P. fluorescens</i>) a temperatura ambiente y pH 10,20.....	77
Tabla 18. Degradación media acumulada de NaCN con buffer carbonato propiciada por <i>Pseudomonas mixta</i> (<i>P. aeruginosa</i> + <i>P. fluorescens</i>) a temperatura ambiente y pH 10,20.....	80
Tabla 19. Coeficientes de regresión para concentración de cianuro	94
Tabla 20. Efectos estimados para Concentración residual de NaCN (ppm)	96
Tabla 21. Análisis de Varianza para Concentración residual de NaCN.....	97
Tabla 22. Coeficiente de regresión para concentración de cianuro.....	99
Tabla 23. Efectos estimados para Concentración residual de NaCN (ppm)	100
Tabla 24. Análisis de Varianza para Concentración residual de NaCN.....	101



Introducción

Capítulo I

PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

La minería aurífera ocupa un lugar importante en la economía Colombiana y beneficia a un gran número de personas y comunidades [1,2]. En la actualidad, en el suroccidente Colombiano, específicamente en la zona norte del Departamento del Cauca, comprendida por diez municipios entre los cuáles se encuentran: Santander de Quilichao, Buenos Aires y Suárez, la contaminación por cianuro está aumentando como consecuencia de la creciente explotación minera [3] [4] [5].

Uno de los procesos más comunes, por ser económicamente viables para la recuperación de oro, es el de lixiviación, donde se usa una solución cianurada de hasta 3000 ppm (3000 g de cianuro de sodio en 1000 litros de agua) para recuperar el mineral [6] [7] [8]. Debido a las grandes cantidades de agua y cianuro que se usan en este proceso minero, una vez se obtiene el oro, se generan aguas residuales que tienen alto contenido de cianuro [9] y deben ser tratadas adecuadamente [10]. Sin embargo, por el elevado costo que implica su tratamiento, las aguas residuales de este proceso, no son tratadas de forma idónea y en muchas explotaciones mineras, a campo abierto y minería ilegal [11], estas aguas contaminadas son depositadas indiscriminadamente en ríos y suelos [12–14], causando un gran perjuicio a la salud de sus habitantes y al medio ambiente [15–17].

Teniendo en cuenta las razones anteriormente expuestas, la presente investigación se enfoca en proponer una estrategia biotecnológica para la remediación de las aguas residuales contaminadas con cianuro. Se plantea usar un aislamiento bacteriano de *Pseudomonas*, ya que estos microorganismos tienen una función desintoxicante y asimiladora que les permite crecer en medios donde la única fuente de carbono y nitrógeno es el cianuro [18-19]. Se aprovecharán sus procesos de asimilación y metabolismo para proponer estrategias que contribuyan a eliminar o disminuir la concentración de cianuro en dichas aguas.

JUSTIFICACIÓN

En la zona norte del Departamento del Cauca, la minería aurífera es una de las actividades que dinamiza la economía [3] y como consecuencia de ello, se presenta una gran problemática ambiental debido al inadecuado manejo que se le dan a las aguas que resultan del proceso de extracción de oro y que se encuentran contaminadas por un compuesto altamente tóxico utilizado como agente lixiviante, el cianuro de sodio [15].

A pesar de su alta toxicidad [9], en Colombia se cuenta con poca información y datos oficiales sobre intoxicación derivada del uso de cianuro en minería [20], y las entidades gubernamentales no han hecho énfasis en desarrollar procedimientos encaminados a reducir la contaminación derivada de los procesos de extracción de minerales y metales preciosos, argumentando su elevado costo. Se hace necesario entonces, proponer alternativas y entre ellas biotecnológicas, eficientes, económicas y amigables con el medio ambiente para biorremediar estas aguas residuales, adaptando los procesos biotecnológicos a la zona minera del norte del Cauca.

Existen varios métodos físico-químicos utilizados en el tratamiento de residuos cianurados [21], el inconveniente con estos radica en el elevado costo de los reactivos, infraestructura compleja y los residuos que se generan son peligrosos; en muchos casos no se pueden degradar completamente los complejos de cianuro.

Una novedad que aporta este trabajo de investigación es la adaptación de los procesos biotecnológicos para remediación de aguas residuales contaminadas con cianuro, en ambientes comunes, a temperatura ambiente y sin mayores requerimientos. Estas condiciones facilitan su uso e implementación en una situación geográfica similar a la de la región minera del norte del Cauca u otras regiones que son fuertemente afectadas por esta actividad.

IMPACTO

Se espera que mediante el desarrollo y la aplicación a futuro de los resultados de este trabajo de investigación se beneficien sectores de la sociedad, medio ambiente, protección de flora y fauna, economía y sectores académicos.

A nivel social se beneficiará la población que padece la toxicidad que generan estos complejos cianurados altamente dañinos para la vida humana. En relación al medio ambiente, se disminuirá y controlará el efecto devastador de estos contaminantes sobre el ecosistema, utilizando estrategias de remediación ambiental como herramienta fundamental para recuperar zonas contaminadas con cianuro, especialmente las fuentes hídricas. En el

tema económico, la propuesta es vista como una solución integral de bajo costo, para degradar los complejos cianurados e impulsar el equilibrio entre desarrollo y sostenibilidad. En cuanto a flora y la fauna, se beneficiarán varias especies de animales y plantas que habitan estos lugares de explotación, las cuales se ven amenazadas por la contaminación. Con relación a la academia, específicamente en la Universidad del Cauca, se abrirá una línea hacia la investigación en remediación ambiental (biominería) con el desarrollo de trabajos que busquen minimizar los daños causados por la actividad, la cual en nuestro Departamento tiene un papel fundamental en la dinámica económica y en el sustento de sus habitantes.

PUBLICACIONES

- Presentación en modalidad de Poster en el “V Congreso Nacional de Ingeniería Física”. 26 al 30 de octubre de 2016 en Medellín, Colombia
- Publicado en las memorias del “V Congreso Nacional de Ingeniería Física”. 26 al 30 de octubre de 2016 en Medellín, Colombia, bajo el título: *Methodology for Bioremediation of Wastewater Contaminated with Cyanide, from Leaching Gold Process.*

•

Publicaciones en proceso

- Artículo a ser sometido en revista, bajo el título de: *Criopreservación de Pseudomonas aeruginosa, para su Posterior uso en Actividades Biotecnológicas.*
- Artículo en proceso final de escritura, en el cuál se reportarán los resultados correspondientes al “porcentaje de eliminación de cianuro por cepas de *Pseudomonas*”. Publicación en revista internacional indexada por Colciencias.



Marco Teórico

Capítulo II

2.1. MINERÍA AURÍFERA: RELACIÓN ENTRE HOMBRE Y METALURGIA

La relación entre hombre y metalurgia, siempre ha estado intrínsecamente ligada. En la edad de piedra hace 2,5 millones de años se conocieron los primeros vestigios de herramientas elaboradas por homínidos[22]. Según arqueólogos e historiadores, el primer metal trabajado por el hombre fue el cobre, debido a que se encuentra en la naturaleza en estado puro y se puede transformar a temperatura ambiente con herramientas que eran propias de la época. Posteriormente en la etapa pre-metalúrgica aparecieron, en pequeñas cantidades, metales como el oro, la plata y el hierro [22].

Entre los metales, el oro fue el primero que llamó la atención del hombre primitivo debido a su gran belleza y, contrario a lo que sucede con otros metales, el oro no pierde su brillo en presencia del aire. A esto se le suma el hecho de que es uno de los pocos metales que se encuentra en la naturaleza en un estado relativamente puro y resiste la acción del fuego sin ennegrecerse o experimentar algún tipo de daño. Aunque el oro fue el primer metal que atrajo la atención del hombre, solo se proliferó su uso en la fabricación refinada de ornamentos, en la edad de bronce (1800-1600 a. C), cuando se empezaron a formar talleres locales de fundición, en los cuales se refinaron piezas ornamentales y herramientas, como se observa en la figura 1.



Figura 1. Capa de oro hallada en Mold, Gales. Fabricada entre 1900-1600 a. C.
(Fuente: The Trustees of the British Museum)

Productos elaborados, tales como adornos, brazaletes, anillos y collares fueron hallados, como restos en las tumbas del hombre neolítico. La circulación del oro en forma de moneda aumentó en el siglo IV d.C, en la época de Constantino (272 d.C - 337 d.C), cuando se insistió en que el pago de los impuestos y otras deudas al gobierno se efectuarían en oro.

En la actualidad la industria de la minería mueve millones de dólares al año y sumado a los elementos históricamente conocidos, como lo son el cobre, la plata y oro, se han sumado otros como el estaño, mercurio, plomo, magnesio, zinc, aluminio etc, a la larga lista de elementos esenciales para aleaciones, metalurgia y explotaciones mineras.

2.2. EXTRACCIÓN DE ORO EN COLOMBIA

2.2. 1. Aportes Económicos de la Extracción de Oro

En la actualidad, en Colombia, según datos de la Agencia Nacional de Minería, las empresas dedicadas a las actividades mineras generan aproximadamente 350 mil empleos y cada año invierten en proveedores nacionales (incluido transporte, metalurgia, maquinaria, equipos, uniformes, alimentación, entre otros), cerca de \$5.2 billones de pesos, que benefician a empresas y familias colombianas [23]

De los países sur americanos, Colombia es el sexto en producción de oro, según datos reportados por la Agencia Nacional de Minería. En el año 2014, la producción de oro en Colombia fue de 48 toneladas y en el primer trimestre del 2015 la producción fue de 8,46 toneladas (271.847,91 onzas troy), de las cuales se exportaron 7,16 toneladas, equivalentes a 219,39 millones de dólares FOB (*free on board*), con una producción por departamento de la siguiente forma: El Departamento de Antioquia con el 38,72% de la producción de oro en Colombia, seguido de Chocó con 24,69%, Nariño con 19,13%, Bolívar con 5,18%, **Cauca** con **5,14%**, Caldas con 4,06%, Córdoba el 1,02% y los demás tienen el 1,25% y corresponden a Huila, Santander, Quindío y Tolima [24]. Ver figura 2.

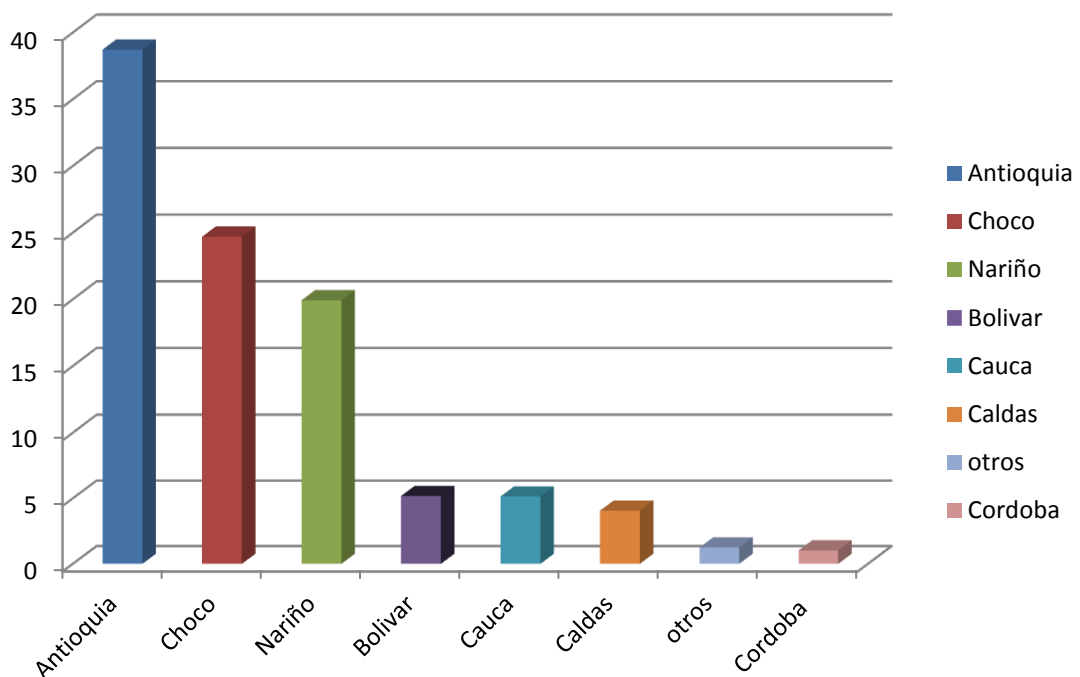


Figura 2. Participación por Departamento en la producción de oro para el I trimestre del 2015. (Fuente: SIMCO; Agencia Nacional de Minería (Base Regalías). Cálculos: Dirección de Minería Empresarial MME)

2.2.2. Minería Aurífera y sus consecuencias

Con el auge en la explotación del oro y la llegada de las mega mineras, también aumentó exponencialmente la inversión extranjera en esta actividad, la cual se triplicó, pasando de US\$3.800 millones en el periodo de 1999-2004 a US\$11.900 millones en el periodo de 2006-2011. El incremento en la minera, llevó al gobierno a otorgar títulos mineros sin respetar páramos, ecosistemas, resguardos indígenas, territorios afrodescendientes y fuentes hídricas.

Desde que se aprobó el Código de Minas en 2001, se ha presentado superposición de títulos mineros en áreas de parques nacionales y páramos, esto junto a la expedición de títulos sin control que representan violación de los derechos a las comunidades próximas a zonas mineras e irreparables daños ambientales. También se presenta acaparamiento de títulos mineros y algunos títulos otorgados de manera sospechosa [25].

Toda esta problemática ha desencadenado el aumento de la minería ilegal, una actividad muy peligrosa, que es promovida en la mayoría de casos por grupos armados al margen de la ley y bandas criminales. Según un informe de la Contraloría, se identifican las actividades de minería ilegal, como una de las locomotoras de crecimiento. En la fig. 3 se identifica la ilegalidad de la minería en cifras, según el Censo Minero Departamental Colombiano 2010–2012, realizado por el Ministerio de Minas y Energía, en el cual se puede observar que le **63%** de la minería en Colombia es **ilegal** [14] [26].



Figura 3. Legalidad e ilegalidad de la minería en Colombia. (Fuente: censo minero departamental Colombiano MME 2010-2011)

La minería ilegal es aprovechada por los grupos armados ilegales, especialmente las guerrillas y las bandas criminales, pues las minas quedan ubicadas en lugares selváticos y de difícil acceso por su geografía o por orden público, lo que dificulta que exista un control por parte de las autoridades. En la fig.4, se observan los sitios de minería ilegal en Colombia y los grupos armados que los controlan.

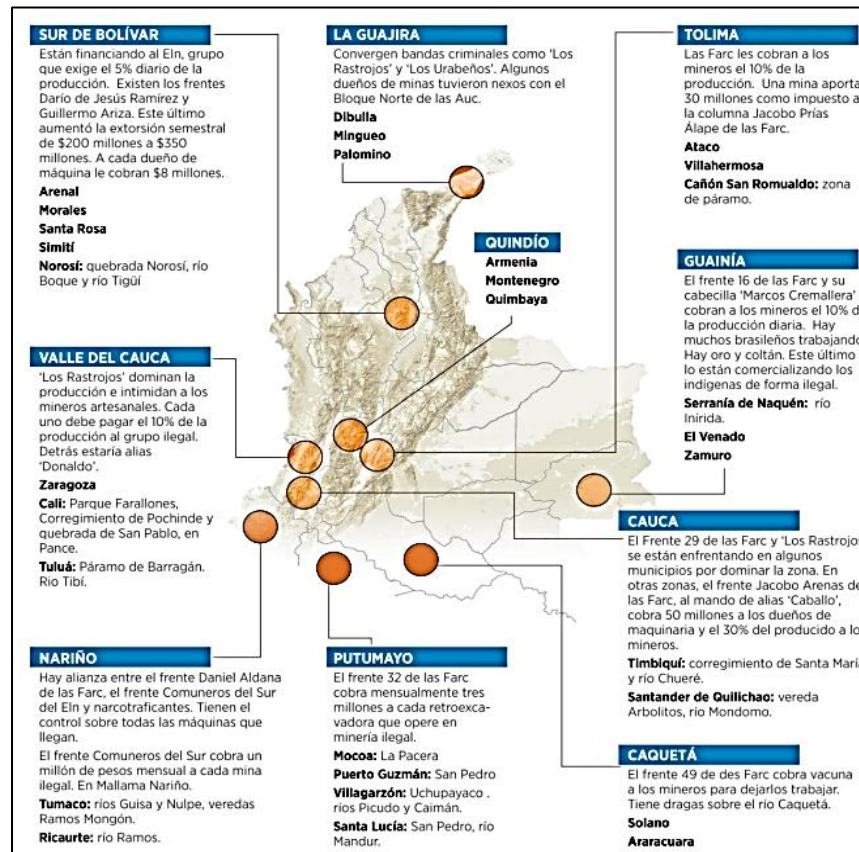


Figura 4. Minas ilegales y grupos armados que controlan esta actividad en Colombia y en el Departamento del Cauca. (Fuente: El Espectador)

Un aspecto que no permite tener claridad en los datos y cifras más concretas acerca de estas actividades ilegales es la ubicación geográfica de dichas zonas mineras. En los lugares apartados, la presencia de minerales explotables de gran interés económico como oro y coltán, hacen que estas zonas sean consideradas áreas con gran predisposición a la ilegalidad minera.

Para los grupos insurgentes la minería ilegal es más rentable que el narcotráfico. Según cifras del Departamento Nacional de Planeación, las ganancias por ese negocio son mucho mayores a las que deja el narcotráfico y se cita la siguiente comparación: “*El potencial de producción anual en toneladas para cultivos ilícitos es de 442 toneladas y en minería ilegal es de 59 toneladas. Las 442 toneladas de cultivos ilícitos dejan ganancias por aproximadamente 2 billones de pesos, mientras que en minería ilegal, esas 59 toneladas, dejan ganancias cercanas a los 7.1 billones de pesos*”, por lo cual “**Es más rentable para los ilegales explotar oro que coca**” [27].

2. 3. EXTRACCIÓN DE ORO EN EL DEPARTAMENTO DEL CAUCA

El caso del Departamento del Cauca no es alentador, dado que el Departamento posee gran potencial en elementos como el oro y cobre (ver figura. 5), las actividades mineras, específicamente la extracción de oro, ocupa un lugar importante en la economía y beneficia un gran número de personas [1,2], específicamente en la zona norte del Cauca [3], en donde debido a la influencia de las actividades mineras artesanales e ilegales, la criminalidad, grupos armados y la contaminación por cianuro y mercurio aumenta exponencialmente sin que las entidades gubernamentales ejerzan control alguno.

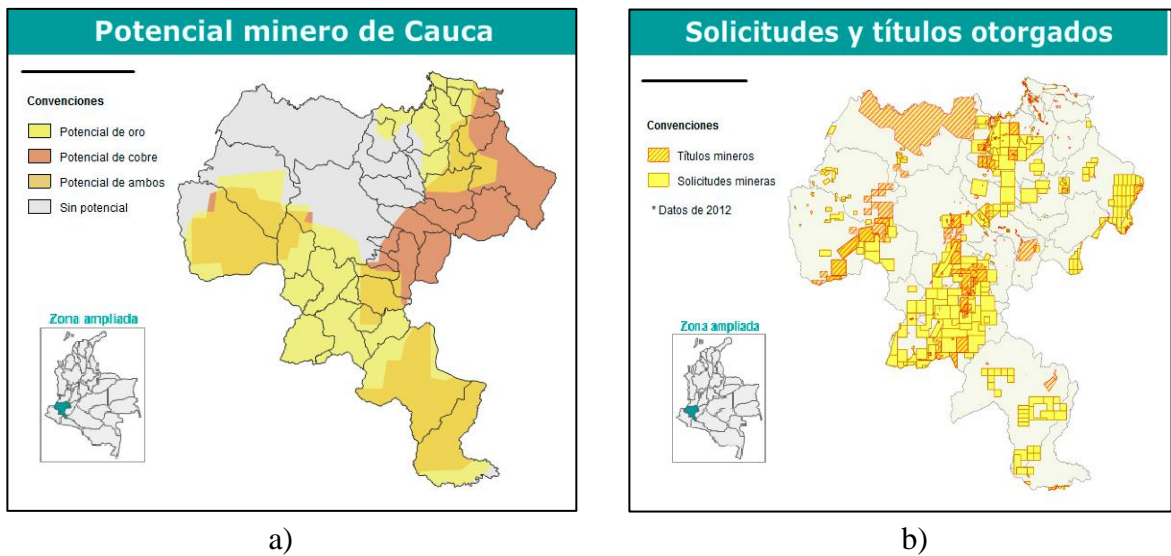


Figura 5. a). Potencial minero en el Departamento del Cauca, Colombia. b). Solicitud y títulos mineros otorgados. (Fuente: Centro de Estudios Interculturales de la Universidad Javeriana, Cali; Inocoder)

En la fig 5, se puede observar el mapa del departamento del Cauca. En la parte a). Se presentan las zonas con potencial minero, específicamente de oro y cobre, las cuales abarcan gran parte del departamento. En la fig 5. b). Se muestran los títulos mineros otorgados y la gran cantidad de solicitudes realizadas en el año 2012, las cuales se concentran en los municipios del macizo Colombiano y el norte del Cauca. El desequilibrio entre la actividad minera y los recursos naturales, radica en que gran parte de las zonas mineras que se encuentran en el departamento, están dentro de territorios declarados reservas naturales, parques nacionales, páramos y ciénagas, entre otros, como se observa en la fig. 6. Lo que ocasiona graves desastres ambientales.

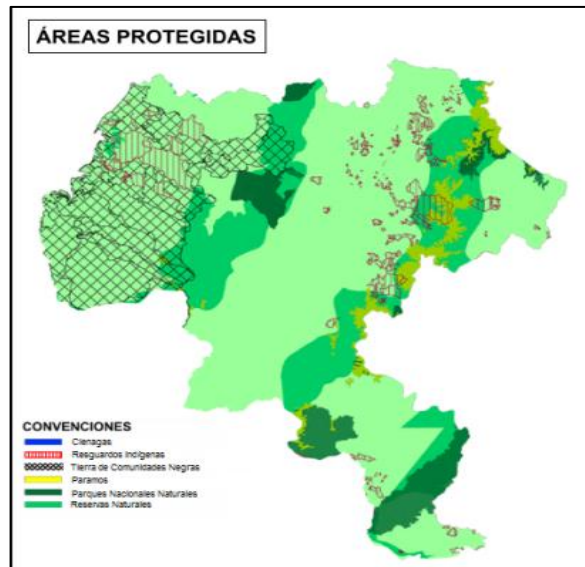


Figura 6. Áreas declaradas protegidas en el departamento del Cauca. Fuente: Centro de Estudios Interculturales de la Universidad Javeriana, Cali; Incoder)

Las actividades mineras junto con sus beneficios económicos, conllevan una gran cantidad de afectaciones, pasando por las sociales, culturales y las medioambientales (infertilidad en suelos, contaminación del agua, generación de aguas residuales altamente tóxicas y malas políticas de tratamiento de residuos) que son las que hacen de esta actividad algo muy contradictorio y polémico. Convendría citar un fragmento que el poeta griego Píndaro (518 a. C) dedicó a este metal precioso, haciendo alusión al oro: *“hijo de Zeus, al que no devoran ni la polilla ni la herrumbre, pero cuya suprema posesión devora la mente del hombre”* [28].

2.4. ETAPAS DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE ORO EN UNA PLANTA DE BENEFICIO.

La recuperación de metales preciosos, como oro y plata, requiere el uso de una planta de beneficio, en la que convergen una serie de procesos sistemáticos que se encuentran estrechamente ligados los unos con los otros y que van de lo general a lo específico. La fragmentación controlada de la roca, mediante el empleo de explosivos es el primer proceso de conminución (conjunto de procesos de reducción de tamaño de minerales), seguido de las etapas de trituración y molienda, que se realizan con el objetivo de liberar especies valiosas y preparar el mineral para procesos metalúrgicos de beneficio posteriores como el proceso de flotación, lixiviación por cianuración, fundición y refinación [29]. Las etapas del proceso de extracción de oro en una planta de beneficio de mediana envergadura se indican continuación.

2.4.1. Trituración De Minerales

i. Trituración primaria

Los minerales que tienen contenidos de oro y plata, son sometidos a un proceso de molienda, para reducir el tamaño de las partículas y facilitar la separación del oro y el material estéril. Generalmente, el proceso de trituración primaria se realiza en una chancadora o trituradora de mandíbulas tipo Blake (ver fig. 7), máquina que trabaja en condiciones extremadamente difíciles dada su construcción robusta. Constan de dos placas (una móvil y otra fija) con un ángulo entre las mandíbulas menor a 26° , lo que permite aprisionar las partículas y no dejar que estas resbalen a la parte inferior. Las dos placas generan presión e impacto sobre los complejos minerales, lo que ocasiona la fractura del mineral. El movimiento de vaivén de la mandíbula móvil es accionado por el movimiento vertical de una biela la cual está articulada a un eje excéntrico. La fractura del mineral permite obtener tamaños de partículas de 60 pulgadas a un tamaño entre 6 y 8 pulgadas.

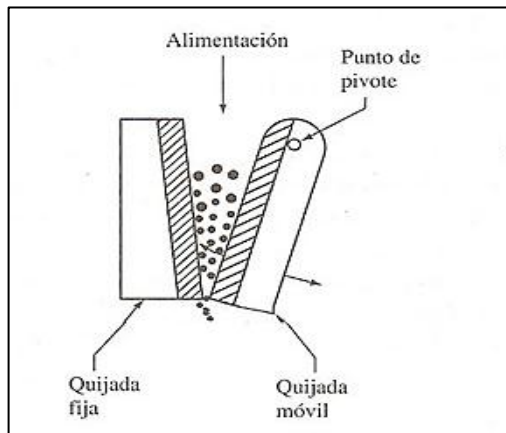


Figura 7. Imagen de una Trituradora de Mandíbulas tipo Blake. (Fuente: chancadoras.org)

ii. Trituración secundaria

Esta etapa se realiza para el tratamiento de aquellos minerales que presentan mayor densidad, es decir, minerales compactos que presentan menor porosidad. El mecanismo con que se realiza este proceso es el impacto. En algunas plantas de beneficio que se encuentran en el norte del Departamento del Cauca, esta actividad se realiza con una trituradora giratoria o impactor, como el presentado en la fig 8, en la cual se procesa un gran flujo másico, dado que la velocidad de operación es alta, llegando incluso a tener una velocidad angular de 6000 rpm.



Figura 8. Imagen de un triturador giratorio o impactor. (Fuente: Chavez.T.J)

El resultado obtenido en la etapa de trituración secundaria es enviado a las etapas de molienda

iii. Molienda de Minerales

El objetivo en esta actividad de molienda, es similar al de trituración, solo que esta reduce aún más el tamaño de la roca y tiene como propósito liberar especies minerales de valor comercial (mena), dispersos en una matriz estéril (ganga). Se utiliza un medio de molienda que está constituido por un conjunto de esferas (bolas) de diversos diámetros, que pueden ser de acero, hierro fundido o aleaciones de diversos materiales.

El proceso de molienda puede ser de dos tipos: seca y húmeda, debido a que una vez triturada la ganga, se agregan reactivos para separar los minerales. Los equipos empleados en el proceso pueden ser molinos de bolas, molinos de barras, etc. En la industria minera y, generalmente, en las plantas de extracción de oro ubicadas en el norte del Cauca, se emplean molinos de bolas, como el observado en la fig 9. Con estos molinos se logra un tamaño de partícula más reducido que el obtenido en las etapas de trituración.

El molino de bolas se utiliza en procesos industriales donde se requiere un producto con granulometría intermedia (tamaño representativo de partícula de 0,5 mm hasta 75µm) o productos finos (tamaño representativo de partícula inferior a 75µm).



Figura 9. (a) Parte interior de un molino de bolas, con su respectivo medio de molienda (bolas de acero); (b). Parte exterior de un molino de bolas. (Fuente: Mine Machinery co. LTD)

2.4.1.1. Tamizaje Industrial

El tamizaje industrial es un método de separación de mezclas que consiste en seleccionar y clasificar los minerales por el índice de finura obtenida durante la molienda. Esta operación separa, por diferencia de tamaño, los materiales útiles de las gangas. Para esta operación es necesario utilizar telas o, generalmente, láminas perforadas conocidas como tamices, los cuales se clasifican por el número de mallas y el tamaño del agujero o luz del tamiz. (Ver tabla 1)

Tabla 1. Clasificación de los tamices de acuerdo al tamaño de abertura lineal o luz del tamiz (mm)

No. del Tamiz	Luz de Tamiz (mm)
10	2,00
14	1,40
16	1,18
20	0,850
25	0,710
30	0,600
40	0,425
80	0,180
100	0,150
200	0,075
325	0,045
400	0,038

La separación granulométrica o clasificación se realiza en harneros, en los cuales se lleva a cabo la separación de fragmentos gruesos de los más finos, que se encuentran contenidos en una mezcla, facilitando la extracción del material que cumple con las especificaciones de producto. En el harnero se produce la separación de fragmentos de acuerdo con su dimensión y forma, siendo el tamaño de partícula la variable más importante en este proceso probabilístico. En la fig.10 se presenta un esquema sobre el principio de funcionamiento general de un harnero.

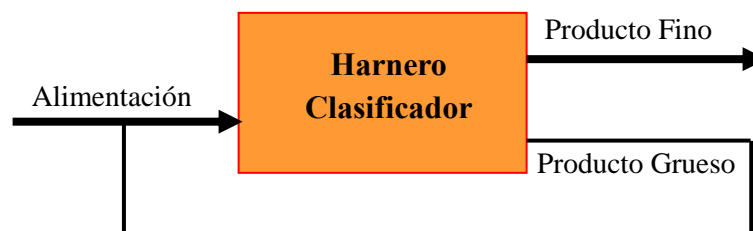


Figura 10. Esquema general correspondiente al principio de funcionamiento de un harnero convencional.

De los harneros, frecuentemente empleados en la industria minera, el 80% son de estratificación (salto de partículas) e inclinación simple. El ángulo de inclinación debe estar alrededor de los 15° y su movimiento se debe a un sistema de movimiento circular y de contrapeso. En la fig 11 se observa un esquema de un harnero industrial de estratificación.



Figura 11. Vista lateral y frontal de una Harnero industrial de estratificación. (Fuente: wilde.cl)

2.4.2. Proceso Hidrometalúrgico De Flotación

El proceso de flotación es una operación muy usada en los procesos metalúrgicos para la separación de partículas sólidas o líquidas de una fase líquida. En el caso de la minería aurífera, este proceso se realiza después de que se tiene el mineral en polvo obtenido previamente en los procesos de trituración y molienda, el cual presenta contenidos de oro y ganga. Para separar estos contenidos se usa un método físico, tal como el proceso de flotación, esto debido a que si se emplea un proceso químico de separación, se requiere una alta inversión económica.

El proceso hidrometalúrgico de flotación se basa en las diferencias que existen entre la superficie de las partículas, que contienen el mineral que se desea recuperar (en este caso oro), y la superficie de las partículas que contienen ganga (material estéril). Considerando este aspecto, el mineral que contiene oro es recubierto con sustancias hidrofóbicas (en este caso xantatos que producen una superficie no mojable al agua), mientras que la ganga permanece mojable al agua [30].

El material proveniente de los procesos previos de molienda y trituración (pulpa mineral), se mezcla con agua que contiene las sustancias hidrofóbicas, llamadas colectores, en esta etapa la dispersión sólido-líquido se mantiene en agitación. Conjuntamente se hace pasar a través de esta dispersión un flujo de burbujas de gas (aire). Las partículas hidrofóbicas presumiblemente sulfuros, se "adhieren" a las burbujas de aire, las cuales las arrastran en su movimiento ascendente, mientras que las partículas de ganga permanecen en la dispersión sólido-líquido. Las burbujas cargadas de partículas de mineral terminan por formar una

espuma que se recoge como un concentrado rico en sulfuros (pirita), tal como se muestra en la fig.12.

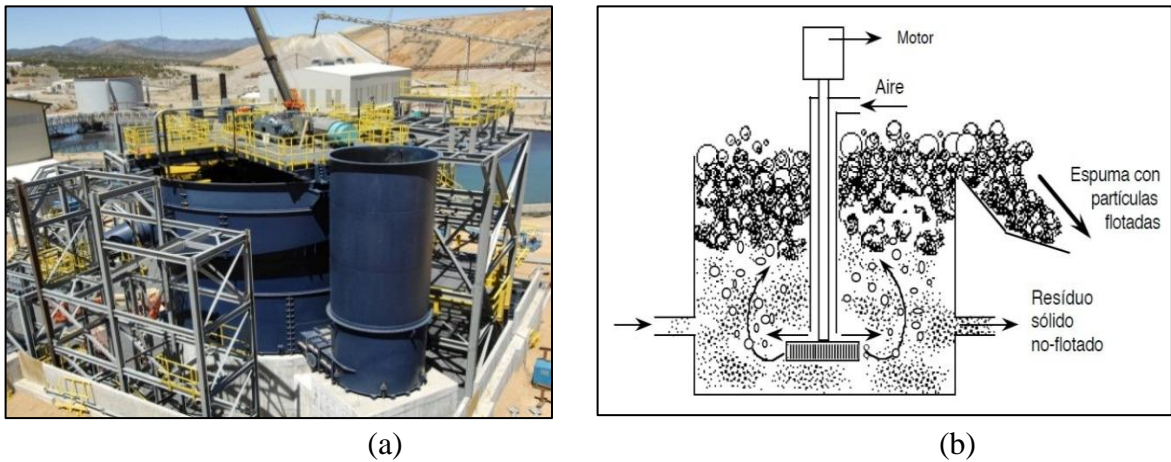


Figura 12. (a) Representación del funcionamiento interno de una celda de flotación. (b). Equipo industrial donde se realiza el proceso de flotación en metalurgia. (Fuente: ceyge.cl)

Cabe resaltar que el proceso de flotación se basa en los fenómenos interfaciales relacionados con la interacción de, por lo menos, el seno de una fase sólida o líquida con otra fase sólida, líquida o gaseosa o con el vacío, en la región estrecha en que sucede la transición de una fase a la otra, estos fenómenos se producen cuando dos fluidos entran en contacto con un sólido definiendo la mojabilidad mediante un ángulo de contacto θ , tal como se observa en la fig.13.

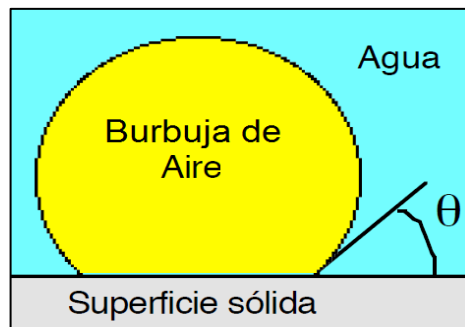


Figura 13. Angulo de contacto formado entre una burbuja de aire y una superficie sólida, inmersas en un medio líquido (agua). (Fuente: Salager.J.L; Forgiarini G. A)

Si el ángulo de contacto es mayor que 90° , como sucede en el proceso de separación de minerales enriquecidos con oro y ganga, la superficie es hidrófoba, por lo tanto las burbujas de aire son más anchas y tienden a "adherirse" con facilidad, a la superficie sólida. En la fig 14, se ilustra lo que sucede cuando el ángulo θ entre la superficie sólida y la burbuja de aire es mayor a 90° .

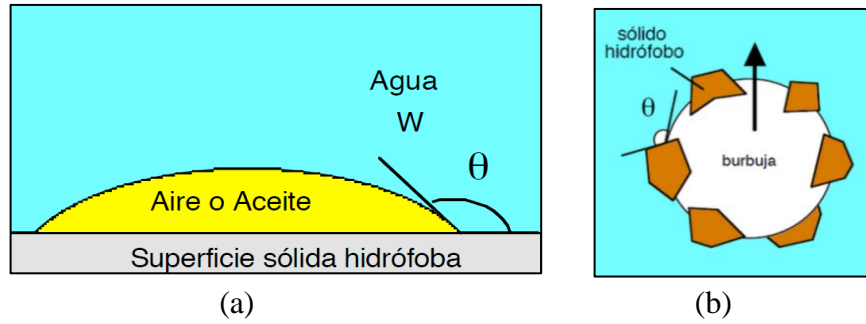


Figura 14. (a). Superficie hidrófoba en la que el ángulo de contacto θ es $> 90^\circ$; (b). Las partículas hidrófobadas se adhieren a la burbuja de aire. (Fuente: Salager.J.L; Forgiarini G. A)

En este caso, como el ángulo de contacto (θ) supera los 90° , las partículas de mineral enriquecido con oro (hidrofobadas) tienden a adherirse con mayor facilidad a las burbujas de aire y, teniendo en cuenta que el medio está en constante agitación, las burbujas ascienden hasta la superficie llevando consigo adheridos minerales enriquecidos con oro, como lo muestra la fig.15.

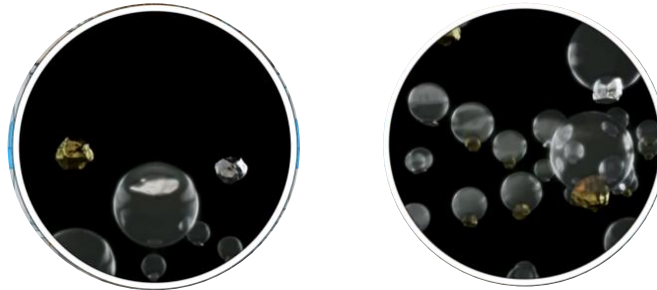


Figura 15. Las partículas hidrofobadas (con contenidos de oro) se adhieren a las burbujas de aire que las hace ascender hasta la superficie

Posteriormente, las burbujas que están cargadas de partículas de mineral forman una espuma (fig.16), la cual se recoge como un concentrado rico en sulfuros (pirita) [29].



Figura 16. Burbujas y espuma que se forman en la parte superior de la celda de flotación.

Caso contrario ocurre cuando el ángulo de contacto es inferior a 90° . Si esto último ocurre, la superficie sería de naturaleza hidrófila o hidrofílica, lo cual ocasionaría que las burbujas no se adhieran a la superficie con facilidad porque hay menor ángulo de contacto entre sólido y burbuja, lo que propicia mayor probabilidad de que el poco mineral, que se adhiriera a la burbuja se desprege inmediatamente la burbuja de aire empieza a ascender a la superficie, tal como lo muestra la fig. 17.

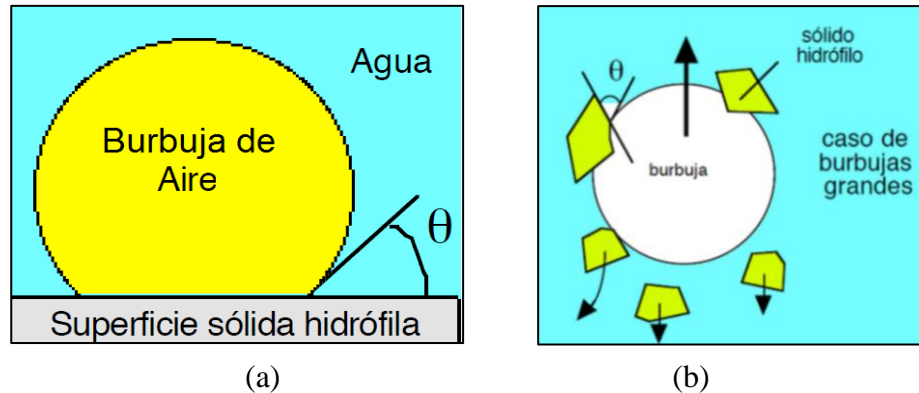


Figura 17. (a). Superficie hidrófila en la que el ángulo de contacto θ es $< 90^\circ$; (b). Las partículas hidrófilas no se adhieren a la burbuja de aire y caen durante el ascenso de la misma. (Fuente: Salager.J.L; Forgiarini G. A)

Las variables principales que se deben considerar en el proceso hidrometalúrgico de flotación son diez: densidad de la pulpa, aireación, tamaño de partícula, densidad de la pulpa, temperatura, pH, dosis de reactivos, agitación, nivel de espumas y nivel de la pulpa.

2.4.3. Lixiviación Por Cianuración

En este método, el lodo enriquecido (espuma) que ha sido obtenido previamente en el proceso de flotación, se combina con un agente lixivante o solución de cianuro de potasio, cianuro de calcio, o el cianuro de sodio (NaCN), siendo éste último el más utilizado en estos procesos metalúrgicos ya que a menudo es más fácil de transportar, almacenar y representa menos costos.

La solución de cianuro de sodio alcalina tiene la capacidad de convertir el oro (insoluble en agua) en aniones metálicos complejos de aurocianida, solubles en agua, mediante un proceso denominado lixiviación, de acuerdo a las siguientes reacciones.

Para lixiviación de oro:



Para lixiviación de plata:



Las reacciones que se indican, representan el mecanismo que se lleva a cabo durante la extracción de metales preciosos tales como oro (ecuación 1) y plata (ecuación 2). Los mecanismos ocurren cuando el cianuro de sodio (agente lixivante) se encuentra en una solución acuosa que contiene mineral enriquecido con oro, que previamente se ha obtenido y oxígeno libre, esencial para la disolución del oro y plata. El oxígeno es introducido en la solución de cianuro mediante la inyección directa de aire al tanque, por irrigación en forma de lluvia y por bombeo de la solución recirculante. El producto final de la ecuación 1, es la formación de dicianoaurato de sodio ($\text{Na}[\text{Au}(\text{CN})_2]$) y un hidróxido alcalino (NaOH).

El proceso de lixiviación de oro, mediante cianuración (ecuación 1), es en un proceso electroquímico en el que el oxígeno captura electrones del oro en una zona catódica, mientras que los iones de oro son rápidamente acomplejados por el cianuro, alrededor de la zona anódica, formando así el complejo *soluble* dicianoaurato de sodio ($\text{Na}[\text{Au}(\text{CN})_2]$). Mediante el uso de la técnica de lixiviación por cianuración, se convierte al oro insoluble en agua en aniones metálicos complejos, solubles en agua [31].

El principio básico, por el que se rige el proceso de cianuración, es aquel por el que las soluciones alcalinas débiles tienen una acción disolvente directa, preferencial, sobre el oro y la plata contenidos en el mineral. Por ello, al agregarle NaCN a la mezcla de agua y minerales con contenidos de oro obtenidos previamente en la molienda, las soluciones de cianuro alcalino atacan preferencialmente a los metales preciosos, por lo que los iones de oro, son rápidamente acomplejados por el cianuro circundante, convirtiéndose este en una especie de imán, como se observa en la fig. 18. Esta propiedad característica de las soluciones de cianuro, se denomina “acción selectiva” porque se forma el complejo *soluble* dicianoaurato de sodio.

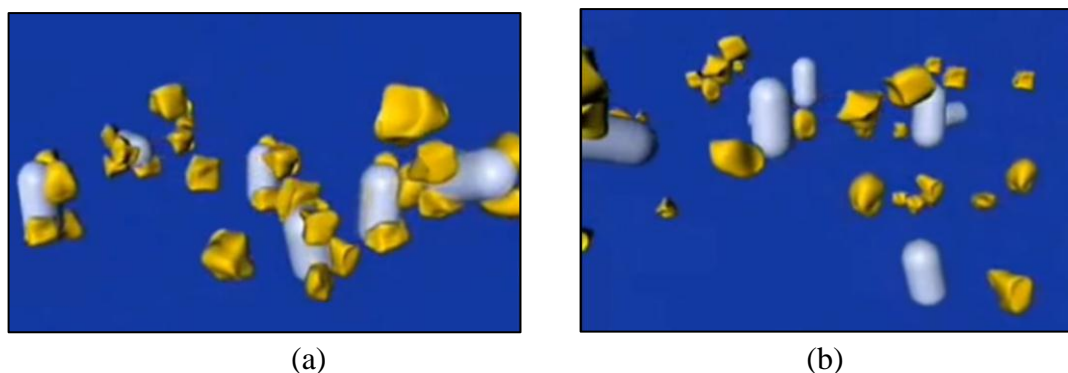


Figura 18. Proceso de lixiviación por cianuración. (a). El agente lixivante NaCN de color blanco, se agrega a la mezcla de agua y minerales con contenidos de oro (color amarillo). (b). El NaCN actúa como una especie de imán y atrae al oro, formando un complejo que es soluble en agua ($\text{Na}[\text{Au}(\text{CN})_2]$)

La acción del agente lixiviante es fundamental para la realización del proceso de lixiviación, el cual se puede entender mediante la siguiente reacción de disociación.



En la ecuación (4), se describe la acción del cianuro de sodio (NaCN), agente lixiviante comúnmente usado en la extracción de oro. El mecanismo consiste en que la sal de cianuro se disuelve y posteriormente se ioniza en el agua, generando su respectivo catión metálico, mientras que los iones de cianuro libre, se encargan de formar el complejo aurocianuro. Durante el proceso de lixiviación de oro, es importante tener en cuenta la información que se indica en la tabla.2.

Tabla 2. Condiciones óptimas para realizar el proceso de lixiviación de oro mediante cianuración

Variable/ aspecto. (Notación)	Variable	Valor ideal
pH		10.5 - 11.5
T	Temperatura	T ambiente o 85 °C
W	Velocidad de agitación	150 rpm
Catalizador		Pb o Hg

Es importante también, tener en cuenta los siguientes requerimientos para el proceso de cianuración:

1. El oro y la plata deben encontrarse en forma de partículas discretas y limpias.
2. Debe evitarse que las impurezas puedan inhibir la reacción, estando ausentes o en composición porcentual disminuida.
3. Debe garantizarse una adecuada aireación y difusión de oxígeno en el proceso.

2.4.4. Precipitación con Polvo de Zinc (Proceso Merrill Crowe)

Después de realizar el proceso de lixiviación, es necesario recuperar los complejos de oro que se encuentran inmersos en el compuesto de dicianoaurato de sodio $\text{NaAu}(\text{CN})_2$, producto final del proceso previo de lixiviación por cianuración, para lo cual se requiere de la precipitación mediante la adición de polvo de zinc, como se observa en la fig 20.

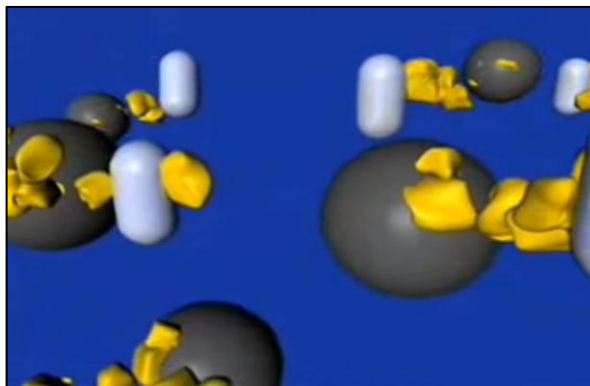
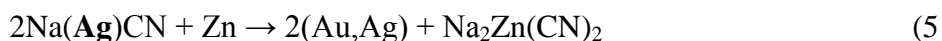
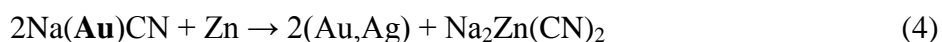


Figura 19. Partículas de dicianoaurato de sodio $\text{NaAu}(\text{CN})_2$ con polvo de zinc

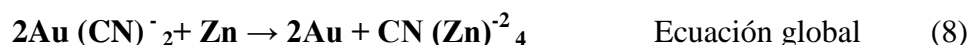
En el proceso de precipitación con zinc se obtiene recuperaciones de hasta el 99% de los metales de interés (Au,Ag), en forma de precipitado de la solución pregnant (solución rica en oro o plata). Esto se puede observar en la ecuación (4) para el oro y en la ecuación (5) para la plata.



La dinámica de la reacción consiste en que el zinc rápidamente se disuelve en los sitios que son anódicos, como se observa en la ecuación (6) y los electrones cedidos sirven para reducir los cationes metálicos en los sitios que son catódicos, como se presenta en la Ecuación (8)



Teniendo en cuenta los anteriores aspectos, la cinética de la reacción global se describe como se muestra en la ecuación 8.



2.4.5. Fundición y Refinería

Finalmente el producto del proceso de Merrill-Crowe, pasa a la etapa de fundición y refinación, en la cual se realiza la conversión del oro en lingotes, para su posterior transporte hacia el lugar requerido. En la fig 20 se observa el proceso de fundición, en el que la solución enriquecida se transforma en lingotes de oro.



Figura 20. Proceso de fundición de oro

Para el proceso de fundición y refinación, el oro es sometido a temperaturas de hasta 650°C.

2. 4.5. Aguas Residuales En Procesos De Minería

Las aguas residuales se define como todo tipo de agua cuya calidad ha sido afectada negativamente por influencia antropogénica. Las aguas residuales provienen de diversas actividades, lo cual permite que se pueda realizar su respectiva clasificación teniendo en cuenta la actividad en la que fueron usadas. Las aguas residuales o aguas negras, como también son denominadas, comprenden aguas domésticas, urbanas, los residuos líquidos industriales, residuos mineros y las aguas potables que se mezclan con las anteriores (aguas pluviales o naturales).

En la minería, especialmente en el proceso hidrometalúrgico de lixiviación de oro, se utilizan grandes volúmenes de agua [46] que al ser mezcladas con cianuro (3000 g de NaCN en 1000 litros de agua), se convierten en aguas portadoras de residuos altamente tóxicos. Si finalmente, son acumuladas, estancadas o no se someten a un tratamiento idóneo, se generan grandes cantidades de gases tóxicos [47] como ácido cianhídrico, amonio, diversos vapores peligrosos y gran cantidad de residuos dañinos. Cuando las aguas residuales del proceso minero, altamente contaminadas con cianuro, son vertidas sin ningún tipo de tratamiento en el medio ambiente, se mezclan con agua potable, a la cual le disminuyen su calidad, convirtiéndola en no apta para el consumo directo, dados los altos niveles de contaminación que posee [43]. Por estas razones, las aguas que surgen como residuo final de actividades mineras, posteriormente requieren sistemas de tratamiento adecuados [44] para evitar problemas de contaminación, riesgo para la vida de los seres vivos o producir daños irreversibles al entrar en contacto con yacimientos auríferos o fuentes hídricas. Existen métodos y normas que pretenden controlar los niveles de contaminación [14,45], pero en muchas ocasiones éstas normas no han sido del todo efectivas.

En la industria minera de extracción de oro y plata, las fuentes principales de cianuro en el agua, son debido al extenso uso de NaCN como agente lixivante, por descargas de algunos procesos de minado de minerales y residuos, o por el uso inadecuado de sustancias químicas, entre otros. En la tabla 3 se pueden observar los valores de NaCN permitidos en Colombia y Estados Unidos para el agua.

Tabla 3. Comparativo entre valores límites permisibles de NaCN en aguas, para Colombia y U.S.A

Condición	Valor Máximo Permissible (ppm)	
	Colombia	U.S.A
Agua para consumo humano y domestico	0,2	0,02
Preservación de flora y fauna	96 CL50=0,05	0,05
Agua potable	0,1	0,01
Residuos Sólidos	1	0,01

Para el caso de contaminación en las aguas residuales y su posterior vertimiento en afluentes hídricos, la institución que regula las emisiones de cianuro es la Agencia de Protección del Medio Ambiente de EE.UU (EPA). Por ejemplo, puede extraerse de la tabla 5 que en Colombia el nivel máximo de cianuro permitido en el agua potable es 0,1 partes de cianuro por millón de partes de agua (0,1 ppm), mientras que en U.S.A esta cantidad se reduce a 0,01 ppm, es decir, las regulaciones Colombianas son menos rígidas.

2.5. USO DEL CIANURO EN MINERÍA

La historia de la minería y su relación con el cianuro data del año de 1704, cuando se descubrió el azul de prusia o ferrocianuro de hierro. Posteriormente, en 1783, Carl Wilhelm Scheele, químico farmacéutico, publicó el primer estudio documentado sobre dilución de oro en soluciones cianuradas, pero sólo hasta 1869 se adjudicaron las primeras patentes en U.S.A, sobre este proceso. La primera planta a escala real del proceso de cianuración se implementó en la mina Crown en Nueva Zelanda (ver fig.21) en el año de 1889 y debido a su éxito, el proceso se extendió a U.S.A, Sudáfrica, Francia...etc. En la actualidad grandes cantidades de cianuro son usadas en los procesos de lixiviación química y metalurgia.

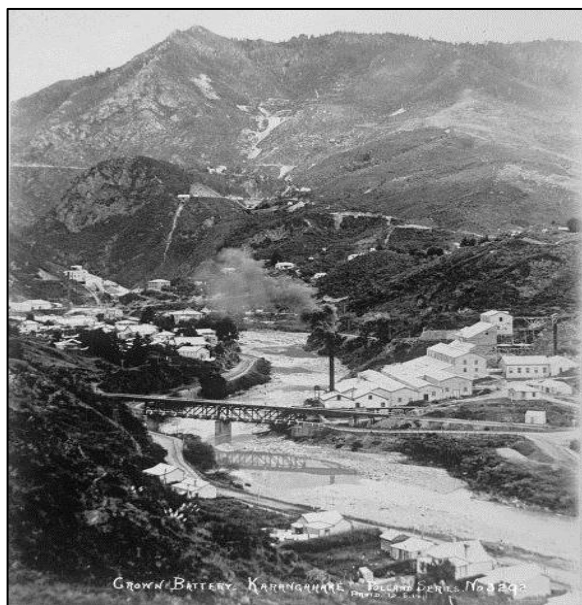


Figura 21. Mina Crown en Nueva Zelanda. Lugar donde por primera vez se implementó el proceso de cianuración a escala industrial en el año de 1889. (Fuente: Manuscripts & Pictorial. National Library of New Zealand)

2.5.2. Generalidades Del Cianuro

Dado que compuestos de cianuro, concretamente NaCN, son utilizados en la extracción de oro, es necesario conocer algunas de sus propiedades y características, con la finalidad de explorar diferentes alternativas encaminadas a eliminar este contaminante presente en el agua residual del proceso de lixiviación de oro.

El cianuro es estrictamente un ión de fórmula CN^- , que se presenta en forma de sales. Se encuentra asociado a un grupo químico que consiste en un átomo de carbono conectado mediante tres enlaces a un átomo de nitrógeno ($C\equiv N$) que posee un electrón en exceso [32], como se observa en la fig.22. Ese triple enlace es, de cierta forma, el que dificulta su disociación y posterior degradación. Puede ser hallado en forma natural o puede ser sintetizado. Se caracteriza por tener un olor penetrante a almendra amarga; su color es blanco, gris o cristalino y tiene un pH ligeramente ácido.

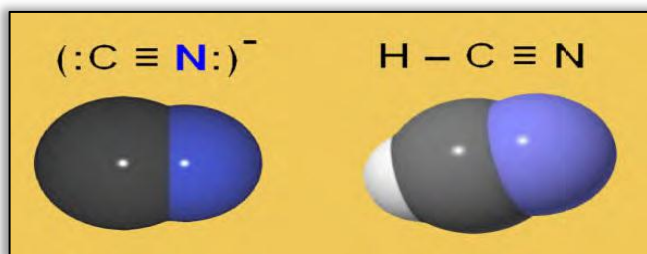


Figura 22. Iones cianuro y cianuro de hidrógeno

El cianuro, comprende una amplia gama de compuestos químicos y se combina con muchos compuestos, orgánicos e inorgánicos [33], que hacen que sus propiedades cambien dependiendo del elemento con el que se enlace. Se puede presentar como *gas* incoloro en forma de cianuro de hidrógeno (HCN) y cloruro de cianógeno (CNCl) o en forma de cristales, como cianuro de sodio (NaCN-sólido) y cianuro de potasio (KCN-sólido).

El NaCN (cianuro de sodio) es el más utilizado por su fácil manejo y transporte. Pero el cianuro, en todas sus presentaciones, es un compuesto altamente tóxico, ya que en dilución acuosa a un pH ácido ≤ 8 , libera cianuro de hidrogeno o ácido cianhídrico (HCN), el cual es un gas incoloro producido por la combinación de gas natural con amoniaco a altas temperaturas [34], este gas tiene un efecto letal sobre la especie humana y animal, por ello su empleo en la industria está muy restringido, ver fig 23.

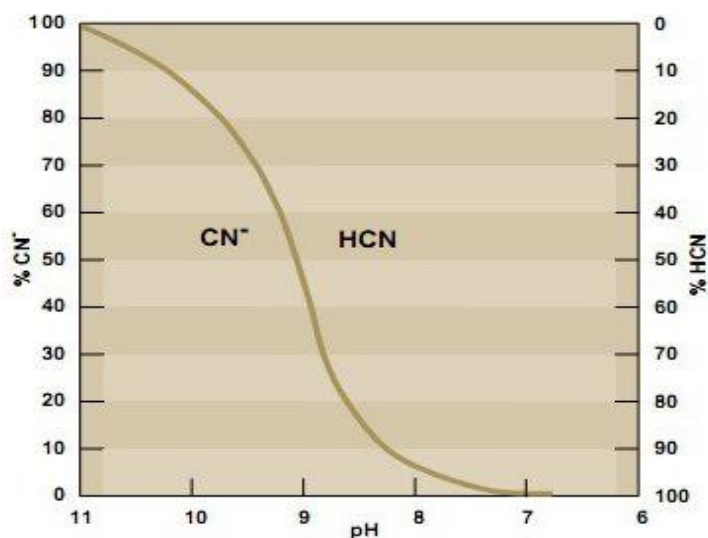


Figura 23. Equilibrio entre CN⁻/HCN en función del pH. (Fuente: Scott. J. S. y J.C)

En la fig.23, se puede observar la relación existente entre el ion CN⁻ y el HCN. A pH 10 la gran mayoría de cianuros libres se encuentran como CN⁻. A pH 9 el CN⁻ y el HCN se encuentran en equilibrio; pero a un pH ≤ 8 más del 90% del cianuro se encuentra como ácido cianhídrico HCN, una de las más peligrosas presentaciones de este compuesto.

La exposición a cianuro ocurre en una gran variedad de ocupaciones, que abarcan desde la metalurgia, pasando por la industria de plásticos hasta llegar a la industria de los cosméticos. La población general se puede exponer al cianuro por inhalación de aire contaminado, ingestión de líquido contaminado o consumo de alimentos como la yuca, espinaca, y almendras, entre otros.

2.5.2.1. Toxicidad del Cianuro

La mayoría de los complejos cianurados son potentes venenos de rápida acción. Se caracterizan por ser inhibidores enzimáticos no específicos, debido a que inhibe varias enzimas, induciendo hipoxia celular [5,34]. Su órgano blanco primario es el sistema nervioso central, pero también la tiroides [34,35] y el riñón. En animales, se ha demostrado que puede producir fetotoxicidad y efectos teratogénicos, como encefalocele, exencefalia y anomalía [34,36].

Alrededor del 80% del cianuro fabricado en el mundo se emplea en la producción de químicos orgánicos (nitrilo, nylon y plásticos acrílicos), así como en la fotografía y la producción de goma sintética. Hay muchos factores que determinan si la exposición al cianuro es perjudicial. Estos factores incluyen la dosis, periodo de exposición y la forma de contacto con esta sustancia, la cual generalmente se puede presentar por inhalación, ingestión, contacto con la piel o contacto con los ojos.

La institución que regula las emisiones de cianuro en EEUU es la Agencia de Protección del Medio Ambiente (EPA) y ésta establece límites para las cantidades admitidas, por ejemplo, el nivel máximo de cianuro permitido en el agua potable es 0,2 partes de cianuro por millón de partes de agua (**0,2 ppm**).

- ***Dosis letal de cianuro en animales administrada por vía oral***

Mediante actividades experimentales se detectó que la dosis letal (LD) de cianuro de potasio (KCN), administrada oralmente en animales como perros o gatos, era de 20, 50 y 100 mg/kg (gramos de analito/kg de mineral) respectivamente, produciendo la muerte de estos animales a los 2 horas y 58 minutos si ingieren los 20 mg/kg de KCN, a los 21 minutos si ingieren 50 mg/kg y a los 8 minutos después de la ingesta de 100 mg/kg de KCN [38]. En ratas, la dosis letal del cianuro de sodio (NaCN) es de 6,4 mg/kg, para cianuro de hidrógeno (HCN) (administrada por vía oral) es de 8,5 mg/kg, para cianuro de potasio (KCN) de 10 mg/kg y para el cianuro de calcio (CaCN₂) la DL es de 39 mg/kg [37].

- ***Dosis letal de cianuro en humanos por ingestión***

Se calcula que en humanos la dosis letal (LD) promedio por ingestión de NaCN o KCN es de aproximadamente 200 mg [39], los cuales una vez ingresan al cuerpo, se distribuyen por todos los órganos y tejidos. En el cerebro se encuentran niveles de 0,06 hasta 1,37 mg/100g y en la mucosa gástrica se pueden encontrar aproximadamente 0,22 a 0,91 mg/100g [38]. También los acetonitrilos, presentes en la gran mayoría de removedores para uñas, son sumamente tóxicos y si se ingieren en grandes cantidades puede causar la muerte, debido a que este compuesto se metaboliza muy lentamente en el organismo, por lo cual hay que actuar con prontitud bajo la supervisión de un profesional de la salud [40].

- ***Dosis letal de HCN en humanos por inhalación***

Diversas investigaciones mencionan múltiples casos de intoxicación aguda por cianuro a través de las vías respiratorias, que es la forma de exposición más común y efectiva. De los compuestos derivados del cianuro, el ácido cianhídrico (HCN) tiene una acción inmediata. La inhalación de una concentración de 200 ppm es mortal y actúa de forma inmediata, mientras que una exposición a concentraciones entre 110 y 135 ppm son fatales en un tiempo de 1 hora, produciendo paro respiratorio y muerte [41] [42]. En la tabla 4, se presentan los efectos causados por la inhalación de una determinada concentración de HCN en el ser humano.

Tabla 4. Efectos tóxicos del HCN al ser inhalado por el ser humano (fuente: Manual de Fumigación Contra Insectos By Food and Agriculture Organization of the United Nations)

Concentración de HCN en el aire		Efectos para el hombre al respirar tales concentraciones
<i>ppm</i>	<i>g/m³</i>	
10	0,011	Límite de seguridad máximo para una exposición diaria continua de ocho horas
25	0,027	Síntomas leves después de varias horas respirando atmósfera con esa concentración. Puede conducir a un envenenamiento crónico
50	0,055	Trastornos graves después de varias horas respirando atmósfera con esta concentración. Puede conducir a un envenenamiento crónico
100	0,11	Peligrosa después de respirar aire con esta concentración durante 30 min a 1 hora con posibles resultados fatales
200	0,22	Mata rápidamente al hombre y a otros mamíferos

Después de inhalar dosis letales de HCN, los niveles en los tejidos humanos son de 0,75; 0,42; 0,41; 0,33; 0,30 y 0,32 mg/100g en pulmón, corazón, sangre, riñón, páncreas y cerebro, respectivamente [39].

2.5.2.2. Fuentes de Producción de Cianuro (CN-)

El cianuro se puede encontrar de forma natural o puede ser producido de forma sintética (antropogénica) como consecuencia de variadas actividades industriales y económicas.

- **Fuentes naturales de producción de cianuro**

En general, los seres humanos diariamente consumimos aproximadamente más de 2.000 productos naturales que contienen pequeñas cantidades de cianuro, como las lentejas, maíz, durazno, cerezas, espinaca, soya, maní, yuca (raíz), coliflor, almendras, brócoli, nuez, semillas de manzana, brotes de bambú, melocotón, entre otros [43]. En estos alimentos, el cianuro se encuentra neutralizado por una serie de enzimas que evitan que esta sustancia sea tóxica al consumirla. Algunas plantas cianógenas contienen cantidades peligrosas de cianuro, las cuales al ser consumidas regularmente, pueden desencadenar desde enfermedades hasta la muerte, como es el caso de la *Manihot esculenta*, una clase de yuca también conocida como Mandioca, en la región ecuatorial. En la fig 24, se observan algunos productos naturales que presentan pequeñas cantidades de cianuro.



Figura 24. Productos naturales que contienen pequeñas cantidades de cianuro

El cianuro no solo está presente en alimentos, también se encuentra en el humo que expulsan automóviles y en general los aparatos que utilizan un motor, en el café se ingieren pequeñas cantidades (6 ppm) de compuestos que contienen CN-, la sal común de mesa contiene hasta 13 ppm, el humo de cigarrillo 70 ppm y las almendras contienen alrededor de 100 ppm.

- **Fuentes antropogénicas de producción de cianuro**

El cianuro artificial es producido por industrias químicas que emplean cianuro bajo diversas formas, siendo el cianuro en presentación sólida el que más se emplea en la

industria, pues se puede usar y transportar con mayor facilidad, reduciendo algunos riesgos. Estos compuestos a base de cianuro se utilizan en productos farmacéuticos como el Laetril, una sustancia para combatir el cáncer, y el Nitroprusiato, un medicamento para reducir la presión arterial. Los compuestos de cianuro también se utilizan en vendas quirúrgicas que ayudan a la cicatrización, se utilizan también en exámenes de laboratorio o pruebas para la determinación de hemoglobina y ácido úrico; así mismo es usado en algunos productos a base de Acetonitrilo, producto empleado como removedor de esmaltes o para quitar uñas postizas, el cual pueden liberar cantidades peligrosas de cianuro si se ingiere [40] [33]. Algunos compuesto sintetizados, que contiene cianuro, se indican en la tabla 5.

Tabla 5. Compuestos sintetizados y medicamentos que contiene cianuro.

Nombre	Fórmula Química
Cocaína	$\text{CuCN} \cdot 9(\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{O}_3\text{N} \cdot \text{HCN}) \cdot 7\text{HCN}$
Novocaína	$\text{CuCN} \cdot 9(\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{O}_2\text{N}_2 \cdot \text{HCN}) \cdot \text{HCN}$
Codeína	$\text{CuCN} \cdot 4(\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{O}_3\text{N} \cdot \text{HCN}) \cdot 3\text{HCN}$
Nicotina	$\text{CuCN} \cdot 2(\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2 \cdot \text{HCN}) \cdot 1.5\text{HCN}$
Morfina	$\text{CuCN} \cdot 9(\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{O}_3\text{N} \cdot \text{HCN}) \cdot 7\text{HCN}$
Cafeína	$4\text{CuCN} \cdot (\text{C}_8\text{H}_{10}\text{O}_2\text{N}_4 \cdot \text{HCN})$

Los compuestos cianurados producidos de forma artificial, también son usados en grandes fábricas y en diversas actividades industriales como en la metalurgia, donde se emplean para fortalecer el acero o aumentar su durabilidad, en el caso de la minería se usan grandes concentraciones de NaCN para extraer metales preciosos como el oro y la plata, entre muchas otras actividades industriales [44].

2.5.2.3. Métodos para la degradación de Cianuro

Debido a la alta toxicidad que presenta el cianuro, los residuos generados en actividades industriales deben ser desactivados y eliminados de una forma adecuada y eficiente, para evitar desastres ambientales y peligros para el ser humano o animales.

En general existen dos formas para degradar compuestos cianurados. En la primera se usan métodos físico-químicos y en la segunda métodos biológicos. A lo largo de la historia el uso de métodos físico-químicos para la degradación de cianuros ha sido frecuente, pero estos procedimientos tienen elevados costos económicos, requiriendo gran infraestructura, maquinaria y, en ocasiones, no son tan eficientes, es por ello que en la actualidad se están priorizando investigaciones que permitan implementar el uso de métodos biológicos, debido a su bajo costo y a la reducción de los problemas de contaminación, sin afectar el

alto porcentaje de remoción de cianuros que presentan estas técnicas; además, los métodos biológicos son amigables con el medio ambiente, por lo cual la biotecnología verde es una muy buena alternativa que puede ser usada con excelentes resultados en la descontaminación de fuentes hídricas.

- **Métodos físico-químicos:**

Dentro de esta denominación se encuentran varios métodos utilizados a menudo en el tratamiento de residuos cianurados, entre ellos los que se mencionarán a continuación.

1. *Adsorción mediante carbón activado:* El cianuro soluble se elimina del agua mediante el contacto de una superficie sólida absorbente, para lo cual se usa carbón activado debido a que es un material que posee una gran cantidad de microporos (los poros se dividen según su tamaño en macro poros, con un radio mayor a 25 nm, meso poros, entre 25 y 1 nm y, micro poros, con radio inferior a 1 nm). Los inconvenientes en este método, radican en su elevado costo.
2. *Precipitación de cianuro libre:* se basa en agregar una cantidad alta de hierro (Fe) a los compuestos cianurados en dilución, para formar un complejo insoluble que posteriormente es retirado. La desventaja que presenta este método es que los residuos generados también presentan alto grado de toxicidad.
3. *Oxidación química:* a los contaminantes cianurados se les agrega un agente oxidante para transformar dichos contaminantes en compuestos menos tóxicos, eliminando el cianuro y dejándolo inactivo. El inconveniente en este procedimiento está en el alto costo que implica adquirir los agentes oxidantes, y además de que los productos finales pueden seguirse oxidando hasta convertirse nuevamente en compuestos de alta peligrosidad.

- **Métodos biológicos**

Los métodos biológicos se han desarrollado como una alternativa para dar soluciones a problemas de contaminación sin generar residuos peligrosos, ya que en ellos se hace uso de las interacciones biológicas que se dan entre los seres vivos, en especial los unicelulares. El aprovechamiento de estos mecanismos ha dado origen a la biotecnología, la cual ha posibilitado el desarrollo de nuevos procesos y conocimientos encaminados a resolver, por ejemplo problemas graves de contaminación. La biotecnología medioambiental está orientada, principalmente en: *medidas de seguimiento de contaminantes y biorremediación de zonas contaminadas*. Uno de los principales logros que se derivan de la biorremediación

de zonas contaminadas es el método biológico de degradación, también conocido como biodegradación.

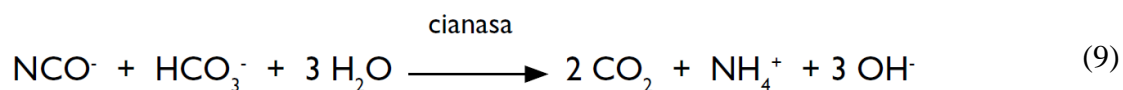
La biodegradación, también conocida como degradación biológica, es un proceso que propicia la ruptura y transformación de materiales peligrosos en sustancias no tóxicas simples a través de un tratamiento biológico usando para ello microorganismos como hongos, bacterias o diferentes organismos vivos [45], lo que les adecua sus procesos biológicos para eliminar compuestos nocivos, de forma natural y sin causar problemas de contaminación por los residuos generados.

2.6. DEGRADACIÓN BIOLÓGICA DEL CIANURO

Mediante el uso de ciertos microorganismos, el cianuro que se encuentra en las aguas residuales, pilas y en el suelo, puede transformarse en sustancias más simples [46]. Existen algunas bacterias, hongos, algas y plantas, que pueden metabolizar estos químicos. La desintoxicación bacteriana es más segura, más rápida y más barata que el tratamiento químico o que otros métodos convencionales para el tratamiento de los desechos de cianuro [47].

En la degradación biológica, el proceso que exige oxígeno se denomina biodegradación aerobia y el que se lleva a cabo en ausencia de oxígeno biodegradación anaerobia. El tratamiento microbiano, por su parte, ha permitido eliminar grandes cantidades de cianuro (superiores al 80%) de una manera eficiente y económica [18,24,41]. Además, los métodos biológicos y particularmente los microbiológicos, se constituyen en alternativas eficientes, porque son específicos en lo que se pretende que actúen y luego de estandarizarse, pueden resultar muy económicos, con relación a los costos de los procesos químicos tradicionales [19].

Dado que el cianuro contiene dos de los elementos más importantes y necesarios para el crecimiento bacteriano; el Carbono y el Nitrógeno, por lo que estos residuos podrían eliminarse mediante métodos biológicos, tal como la biodegradación [49]. Varias especies de bacterias, en condiciones aerobias o anaerobias, utilizan el cianato, un compuesto muy ligado al cianuro, como fuente de nitrógeno a diferentes condiciones de pH y temperatura, provocando la conversión del cianuro a compuestos menos tóxicos (bajas cantidades de amonio y CO₂). En la ecuación 9 se observa la reacción que se produce durante la degradación biológica del cianuro llevada a cabo por algunos microorganismos, para lo cual requiere el ajuste del pH a 10.20.



En la ecuación 1 se puede observar la acción de la enzima cianasa que cataliza la bicarbonatólisis del cianato a amonio y CO₂, provocando la descomposición del cianuro en constituyentes menos tóxicos y posibilitando el uso de este compuesto como fuente de nitrógeno [18].

Una de las bacterias promisorias, para degradar biológicamente los contaminantes cianurados es son las *Pseudomonas*, ya que éstos microorganismos tienen una función desintoxicante y asimiladora que les permite crecer en un medio donde la única fuente de carbono y nitrógeno es cianuro [18,19]. Se han realizado investigaciones en las que se han aprovechado los procesos de digestión y metabolismo de *Pseudomonas* para proponer estrategias que contribuyan a eliminar contaminantes cianurados, haciendo uso de las rutas degradativas de cianuro [18].

El primer lugar donde se implementó un tratamiento biológico in situ, para eliminar compuestos cianurados a escala industrial, fue en Dakota del sur (Estados Unidos), en la mina de oro Homestake, a cargo de Homestake Mining Company, a mediados de 1980 [50], como se observa en la fig 25. El proceso se dividió en varias etapas, en las cuales se eliminó tiocianato, cianuro, amonio y metales [49]. La primera etapa estaba constituida por un proceso de oxidación microbiana, en la cual varias especies de *Pseudomonas* se encargaban de oxidar el cianuro en complejos menos tóxicos, la segunda etapa consideraba la eliminación de metales y residuos mediante adsorción y en la última etapa se oxidaba el amonio formado durante la degradación del cianuro por las bacterias nitrificantes [18].



Figura 25 . Mina Homestake. Dakota del sur, Estados Unidos. (Fuente: AirPhotoNA.com)

2.6.1. Bacterias y su importancia

Para algunas personas lo que llama su atención a primera vista son los objetos de gran tamaño pertenecientes al mundo macroscópico, pero hay algo fundamental que hace parte de nuestra vida y que contribuyó a la formación de la misma en el planeta tierra, los

microorganismos, como lo son las bacterias, pertenecientes al poderoso mundo microscópico. Las bacterias se agrupan en 3 grandes grupos distribuidos de acuerdo a su morfología, los cuales a su vez se subdividen en otros grupos, cada vez más detallados y específicos. Aquellas bacterias que poseen una forma esférica se clasifican como cocos, los microorganismos que tienen forma recta o de bastón se clasifican en bacilos que a su vez se dividen en bacilos Gram negativos y Gram positivos y aquellas bacterias que tienen forma helicoidal se clasifican en vibrio, espirilo y espiroqueta.

Las bacterias representan el mayor número de microorganismos que habita el planeta [51], tan solo en el subsuelo marino la abundancia microbiana es de 2.9×10^{29} células, que corresponde al 0,6% del total de la biomasa viva existente en la tierra [52]. Las bacterias, tienen un tamaño que varía entre los 0,4 μm y 14 μm y se encuentran en variados hábitat, incluso en algunos inimaginables, como lodos, subsuelo y en el espacio exterior. Estos microorganismos son fundamentales para el desarrollo de vida, por lo cual se ha generado una relación simbiótica crucial entre bacterias y ser humano. Esta relación es tan estrecha, que se afirma que en condiciones normales el cuerpo humano alberga 100 billones de microorganismos, los cuales si pudieran ser cuantificados corresponderían a una masa aproximada de 2 kg [53], compuesto en su mayoría por bacterias que pertenecen al Dominio *Bacteria*, que incluye tanto a bacterias Gram negativas como Gram positivas, las cuales participan activamente en varias de las funciones vitales del organismo [53]. Específicamente en el ámbito de la biotecnología, los microorganismos como bacterias y hongos son su estructura fundamental, una especie de protagonistas ocultos [54]. Las bacterias presentan un metabolismo tan diverso que les permite llevar a cabo un sinnúmero de actividades como la fijación de nitrógeno, fijación de una cantidad importante de CO_2 , y la metanogénesis. En actividades industriales, los microorganismos son utilizados para la fermentación de leche en la industria alimentaria [46], en vacunas virales como citomegalovirus, hepatitis B, sarampión, rabia, antitetánica [55] y para degradar muchos contaminantes usados en la industria de la minería e hidrocarburos, siendo las bacterias, las levaduras y los hongos los más utilizados en dichas aplicaciones biotecnológicas [54].

Teniendo en cuentas las diversas características de adaptabilidad y metabolismo que presentan los microorganismos, científicos e investigadores trabajan arduamente en varios campos de la biotecnología con el objetivo de aislar e identificar nuevas especies de microorganismos y también de encontrar nuevas aplicaciones que puedan ser usadas para el bien de la sociedad [56]. Por ello, se hace sumamente indispensable estandarizar un método para realizar una adecuada preservación a largo plazo (no de meses sino de años) de cada tipo de microorganismo previamente aislado y, además, es de gran importancia caracterizar su comportamiento, haciendo uso de curvas de calibración y crecimiento.

2.6.2. Características de *Pseudomonas*

La palabra *Pseudomonas* viene del griego pseudo (falso) y monas (unidad) que significa “unidad falsa”. *Pseudomonas* son un género de bacilos rectos o ligeramente curvados, Gram negativos, oxidasa positiva y aeróbicos que tienen un tamaño aproximado de 1.5 μm a 3.8 μm de largo. Estos microorganismos no producen esporas (células reproductoras que se caracterizan por su resistencia y la facilidad de dispersión en distintos ambientes) y tienen flagelos, gracias a los cuales pueden desplazarse con facilidad. Algunas especies de este género, secretan una capa mucoide cuando se adhieren a una superficie, lo cual les da la capacidad de formar biofilm, debido a que las células forman microcolonias cubiertas por una matriz extracelular que eventualmente llega a constituir una película sobre la superficie en la que se encuentran adheridas.

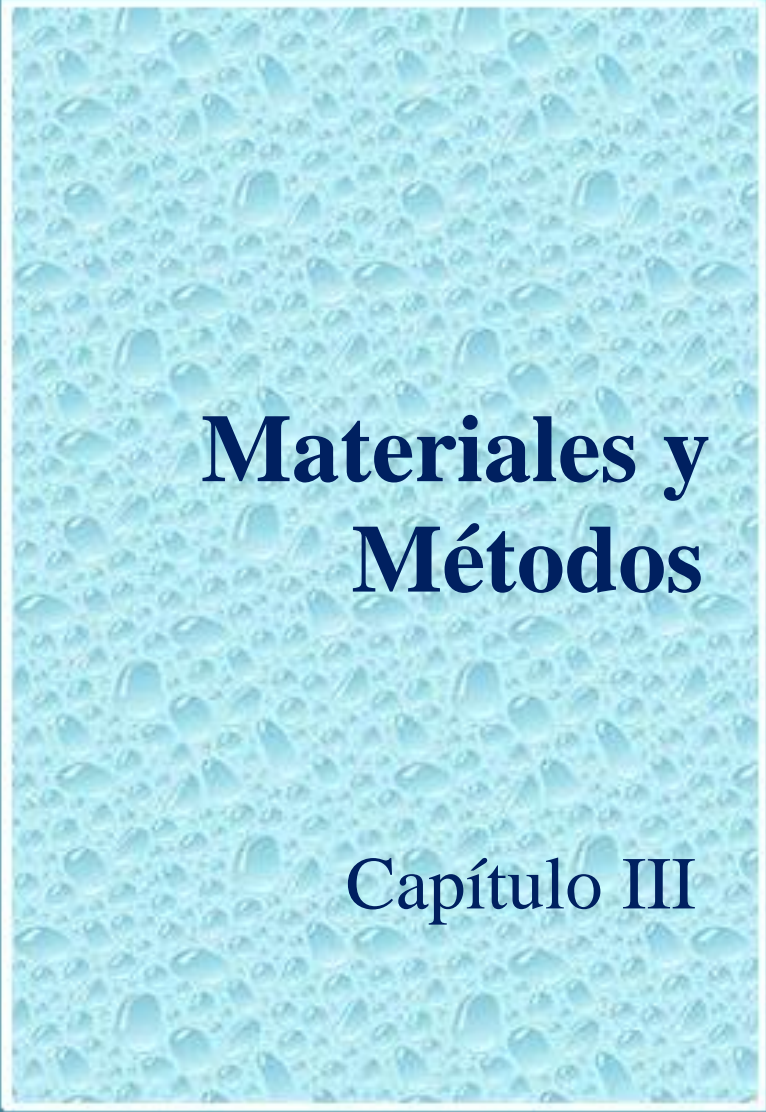
Dentro del género *Pseudomonas* se encuentran también algunas otras especies como *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. syringae*, *P. alcaligenes* y *P. aeruginosa*. Las bacterias pertenecientes a este género, se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, se pueden aislar de muestras de suelo, aguas contaminadas, así como de plantas y animales. El género demuestra una gran diversidad metabólica, por lo cual son capaces de colonizar un amplio rango de nichos. A las características anteriormente mencionadas, se le agrega que son bacterias de fácil cultivo *in vitro* y sus requerimientos nutricionales son mínimos, por lo que ciertas cepas son excelentes para investigaciones científicas, como por ejemplo *P. aeruginosa*; *P. syringae*; *P. putida* y la *P. fluorescens*. Es importante resaltar que el uso inadecuado de estos microorganismos puede provocar riesgos para la salud, debido a que algunas de estas bacterias son patógenos oportunistas

2.6.3. Potencial Biotecnológico de *Pseudomonas*

En múltiples investigaciones, se han empleado cepas (población de células de una sola especie) de *Pseudomonas* para diversos usos en biotecnología, tales como control biológico de plagas o degradación de cianuro, donde se han reportado altos porcentajes de remoción de compuestos cianurados [18] [19][10]. También en algunos estudios se han usado cepas de *Pseudomonas aeruginosa* como fuente para generación de energías [58] y en otras múltiples actividades como en la fabricación de biopolímeros [59], en el tratamiento de aguas residuales y en procesos de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo [60]. Todas estas aplicaciones biotecnológicas, aprovechan las rutas metabólicas de estas bacterias, los diversos hábitat en los que se encuentran, su tolerancia a pH alcalinos y los adversos factores medioambientales en los que viven [61], haciéndolos microorganismos promisorios en el ámbito de la biotecnología.

2.6.4. Uso de *Pseudomonas* en Minería

Una mención especial merece el uso de las *Pseudomonas* en actividades mineras, ya que esta es una de las industrias que más requiere implementación de métodos biológicos para biorremediación. En la actualidad las actividades relacionadas con minería mueve millones de dólares al año, tan solo en Colombia, según datos de la Agencia Nacional de Minería, en el caso específico de la minería aurífera, en el primer trimestre del 2015 se exportaron 7,16 toneladas de oro al exterior, equivalentes a 219,39 millones de dólares [62]; pero junto con sus beneficios económicos, la extracción de oro genera una gran cantidad de afectaciones siendo la contaminación del agua una de las de mayor cuidado. Esta contaminación de recursos hídricos se origina, debido a que las plantas mineras, durante el proceso de lixiviación, usan concentraciones elevadas de cianuro de sodio (NaCN) para extraer el mineral, motivo por el cual, una vez terminada la obtención de oro genera aguas residuales con alto contenido de cianuro, las cuales deben ser tratadas correctamente, pero por su elevado costo, este tratamiento no se realiza de forma idónea, lo cual ocasiona graves problemas de contaminación en ríos, suelos y medio ambiente, por lo tanto, es ahí, donde se han usado cepas de *Pseudomonas*, para darle solución a esta grave problemática de contaminación. Algunas investigaciones han reportado el uso de cepas de *Pseudomonas aeurogonisa*, *P.fluorescens* o un cultivo mixto de *Pseudomonas*, en el tratamiento biológico de contaminantes cianurados [50], aprovechando para ello sus funciones desintoxicantes y asimiladoras para descomponer la molécula de NaCN y llevarlo a su forma menos dañina. El inconveniente con investigaciones anteriores de este tipo, es que han requerido un sinnúmero de estrictas condiciones, así como también mantener controlada la temperatura.



Materiales y Métodos

Capítulo III

3.1. ACTIVIDADES DE DETERMINACION Y CARACTERIZACIÓN DE *Pseudomonas*

Obtención del material biológico usado en la degradación de NaCN

El material biológico (*Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas fluorescens*) fue gentilmente facilitado por la Msc Yamileth Arcos del Departamento de Microbiología de la Universidad de Antioquia.

Cuando se contó con el material biológico en las instalaciones del laboratorio de Genómica y Biología Molecular, GeBix-BIMAC, adscrito al Departamento de Biología de la Universidad del Cauca, se siguió la secuencia de pasos descrita en la fig. 26.

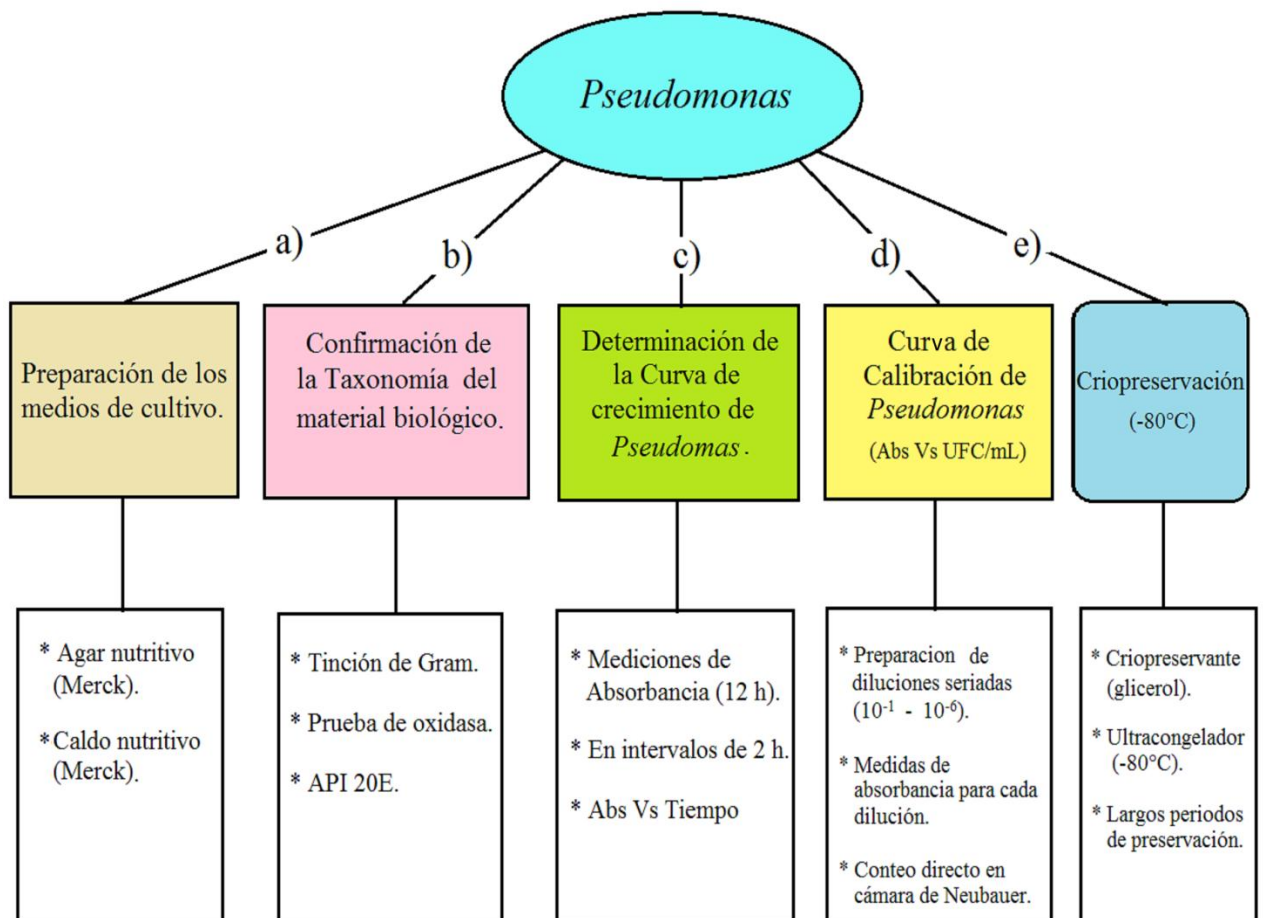


Figura 26. Secuencia de pasos para realizar actividades previas con *P. aeruginosa* y *P. fluorescens*.

3.1.1. Preparación de medios de cultivo y siembra de microorganismos

Las actividades de siembra y preparación de cultivos, se realizaron en el laboratorio de Genómica y Bioinformática de Ambientes Extremos GeBiX-Bimac, perteneciente al Departamento de Biología de la Universidad del Cauca.

En esta actividad se preparó 500mL de agar nutritivo marca OXOID y 500 mL de caldo nutritivo de la misma referencia como se indica en la fig 27. Estos medios de cultivo son aptos para el crecimiento óptimo de *Pseudomonas* (*P.aeruginosa* y *P. fluorescens*).

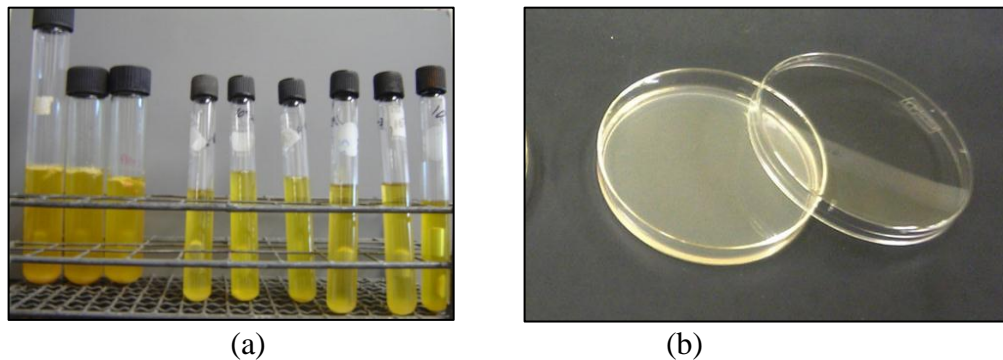


Figura 27. (a). Caldo nutritivo (medio líquido). (b). Agar nutritivo (medio sólido).

Después de preparar de los medios de cultivo, se realizó la siembra de *Pseudomonas*, en el agar nutritivo preparado previamente. Ver figura 28.

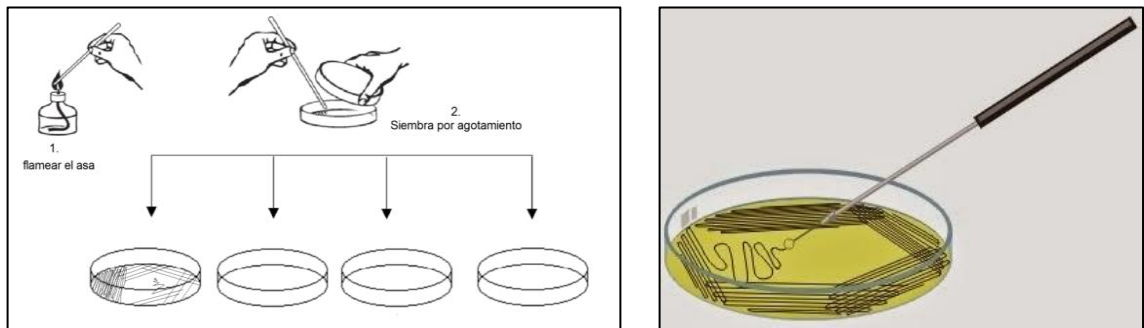


Figura 28. Metodología para la siembra (por agotamiento) de bacterias en agar nutritivo

La técnica seleccionada para realizar la siembra fue estría por agotamiento, debido a que promueve el crecimiento y desarrollo bacteriano presentando, además, una buena separación de colonias, como se puede observar en la fig. 29. Este procedimiento se repitió en las cuatro cajas de Petri que contenían agar nutritivo. Es de resaltar que la siembra y preparación de los medios de cultivo, se realizó en una cabina de flujo laminar debido a

que ésta emplea un ventilador que dirige el aire a través de un filtro de partículas de hasta 0.1 micras, proporcionando así, aire limpio a la zona de trabajo.

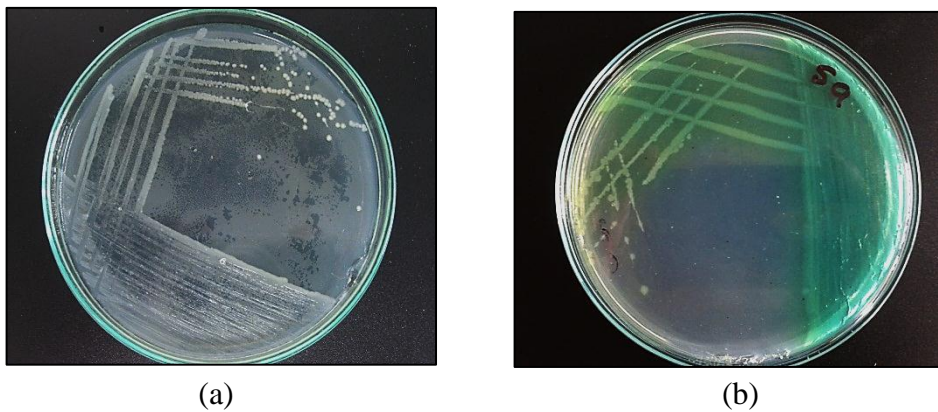


Figura 29. Crecimiento bacteriano. (a). *P. aeruginosa*. (b). *P. fluorescens* en agar nutritivo, usando la técnica de siembra por agotamiento y después de 24 horas de incubación

3.1.2. Pruebas para confirmación de la Taxonomía del material biológico

Como primera medida, se realizaron pruebas bioquímicas para corroborar que las bacterias con que se realizaría el experimento de biodegradación de NaCN pertenezcan al género de *Pseudomonas* (*P. aeruginosa* y *P. fluorescens*).

3.1.2.1. Tinción de Gram

Se preparó muestras de *P.aeruginosa* y *P.fluorescens* esparcidas sobre un portaobjetos, posteriormente se les le adicionó (Cristal violeta, Lugol, Alcohol acetona, safranina), teniendo en cuenta los tiempos y lavados sugeridos (60 seg). Una vez finalizada esta prueba, el portaobjetos se puso en un microscopio óptico de alta resolución (Nikon Eclipse 80i) para observar la coloración de las bacterias. y de esta forma tener una primera aproximación de la morfología y coloración de las bacterias. El color morado indica que las bacterias son Gram positivas, mientras que una coloración color rosa o rojo indicara que las bactreias son Gram negativas.

3.1.2.2. Prueba de Oxidasa

A una tirilla de oxidasa se le adicionó una pequeña porción de colonias de *P.aeruginosa* y *P.fluorescens*, sembradas previamente en agar nutritivo. Una coloración morada o azulada en la tirilla significa que la bacteria analizada posee citocromo oxidasa, es decir que puede usar oxígeno en la producción de energía (oxidasa positiva). Cuando no se presenta ninguna coloración en la tirilla o no hay cambio, en tres minutos la bacteria analizada no puede usar

el oxígeno en la cadena de transferencia de electrones o aplican una citocromo diferente para transferir electrones al oxígeno (oxidasa negativa).

3.1.2.3. API 20E

La prueba Api 20E fue realizada para tener la certeza de que la cepa a preservar tiene un alto grado de discriminación o pureza, con lo cual se garantiza una buena preservación y confiabilidad en posteriores investigaciones que se realicen con dichos microorganismos. Las tiras API 20E constan de 21 test bioquímicos dispuestos en pequeñas galerías.

Para aplicar la prueba se siguió el protocolo indicado por el fabricante (bioMérieux) y después de realizar la lectura de la prueba, se ingresaron los colores observados en la tirilla al software que viene junto con las Galerías API®, comercializadas por la compañía bioMérieux. Finalmente se obtiene un perfil numérico que arroja en términos de porcentajes la taxonomía de las bacterias.

3.1.3. Determinación de la curva de crecimiento

El crecimiento bacteriano, en un sistema cerrado, depende de la velocidad de crecimiento que presentan los microorganismos, lo cual está relacionado con el medio en el que se reproducen, la cantidad de inóculo inicial, los nutrientes que proporciona el medio, los requerimientos y las condiciones climáticas.

Para la realizar la curva de crecimiento, se trabajó en el laboratorio de Biología Celular y Molecular, Celmolec de la Universidad del Cauca, usando muestras por triplicado como se observa en fig 30.

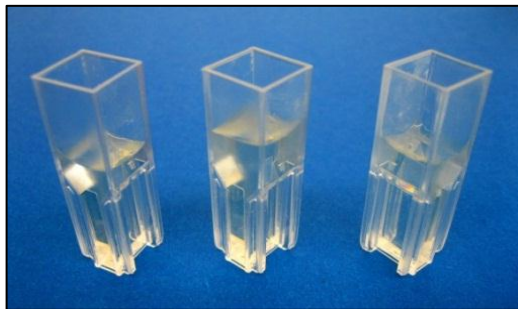


Figura 30. Muestras por triplicado para realizar la curva de crecimiento de *Pseudomonas*. Cada celda contiene caldo nutritivo e inóculo

Se hace uso de celdas de espectrofotometría (celdas de cuarzo), en las cuales se deposita 1,5 ml de caldo nutritivo y una pequeña cantidad de inóculo de *Pseudomonas* (*P. aeruginosa* y *P. fluorescens*), posteriormente se procedió a realizar una medición inicial de absorbancia en un tiempo $t=0$. En este caso, el blanco (target-objetivo) fue el disolvente, es

decir, el caldo nutritivo pero sin inóculo, seguidamente se depositaron las muestras en la incubadora, a una temperatura de 37°C, y cada dos horas se realizó la correspondiente medición de absorbancia, por un periodo de 12 horas. Las mediciones de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro Spectronic Genesys 5.

3.1.4. Curva de Calibración de *Pseudomonas*

Es indispensable elaborar una curva de calibración base para la realización de futuras investigaciones con estas cepas; con la curva de calibración se estandarizarían medidas posteriores. La construcción de la curva de calibración para *Pseudomonas*, permitiría en futuras mediciones, calcular absorbancia de las suspensiones bacterianas en el espectrofotómetro, y obtener, inmediatamente, la concentración de bacterias en unidades de UFC/mL.

Se sembraron las bacterias en agar nutritivo y una vez crecidos estos microorganismos se tomó una pequeña porción de colonia, la cual se resembró en caldo nutritivo. Esto se hizo con el fin de que dichos microorganismos crecieran en un medio líquido, el cual facilitó tomar sus medidas de absorbancia en el espectrofotómetro. De la suspensión bacteriana se realizaron 6 diluciones seriadas (10^{-1} a 10^{-6}) tal como se muestran en la fig 31 y se seleccionó un blanco que suele ser el disolvente, en este caso el caldo nutritivo. Seguidamente se tomaron mediciones de Absorbancia (en espectrofotómetro) Vs concentración de bacterias (realizada por conteo directo en cámara de Neubauer).

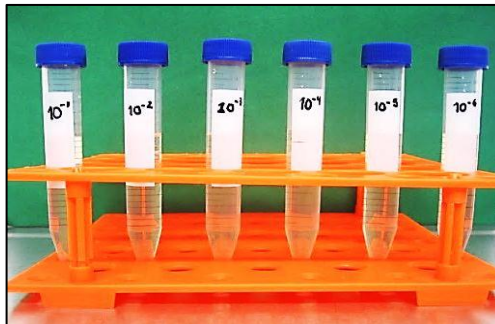


Figura 31. Diluciones preparadas a partir de una cepa madre de *Pseudomonas aeruginosa*

3.1.5. Criopreservación

La Criopreservación es una técnica utilizada para preservar microorganismos durante largos periodos tiempo, manteniendo vivas las células por más de 10 años, para lo cual se utilizan temperaturas que van desde -70°C hasta -195°C .

De una cantidad de 3 mL (3000 μL) de suspensión bacteriana previamente preparada, se distribuyeron 500 μL en 6 microtubos eppendorf, seguidamente con una micropipeta, se

toman 500 µl de criopreservante, que en este caso es glicerol estéril al 50% y se lo deposita en cada uno de los 6 microtubos eppendorf obteniendo una relación medio de cultivo/glicerol de 1:1, para cada uno de estos microtubos., como se muestra en la fig 32.

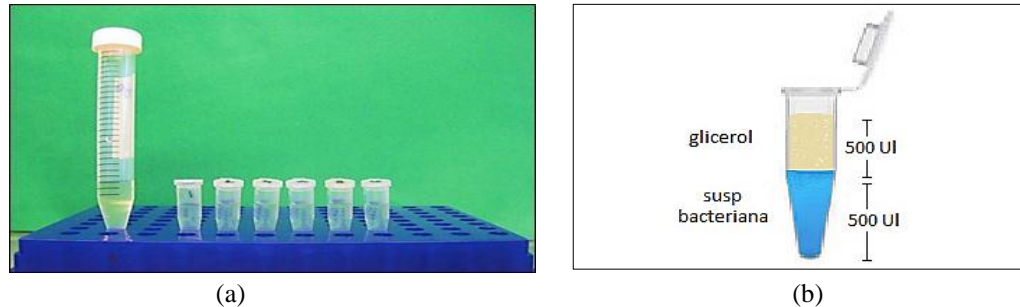


Figura 32. (a). Suspensión celular distribuida en 6 microtubos eppendorf. (b). Microtubo eppendorf con 500 µL de suspensión celular y 500 µl de glicerol en una relación 1:1

3.2. ACTIVIDADES PREVIAS AL ESTUDIO DE BIODEGRADACIÓN DE NaCN CON *P. aeruginosa*; *P. fluorescens* y un cultivo mixto

Antes de realizar las pruebas correspondientes a degradación de cianuro de sodio por *P.aeruginosa* y *P.fluorescens* , fue necesario realizar secuencialmente una serie de pasos que se describen en la fig 33.

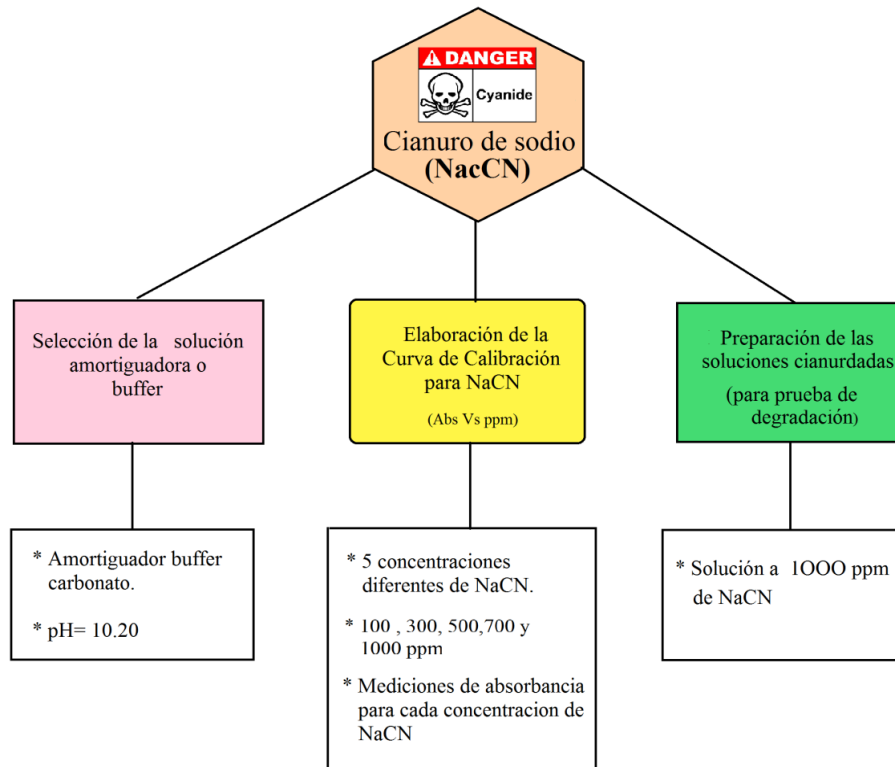


Figura 33 Secuencia de pasos para realizar actividades previas con NaCN.

3.2.1. Selección de la Solución Amortiguadora o Buffer

Para realizar la preparación de las soluciones de cianuro de sodio (NaCN), fué fundamental seleccionar un buffer adecuado debido a que, esta solución amortiguadora, tiene la propiedad de mantener estable el pH frente a la adición de pequeñas cantidades de ácidos o bases fuertes. Este hecho es de vital importancia en nuestro contexto porque, como se describió en la fig 23 (equilibrio entre CN^-/HCN , es necesario mantener el pH de la solución cianurada en un rango alcalino, superior a 8, de lo contrario se libera cianuro de hidrogeno o ácido cianhídrico (HCN), altamente tóxico y letal al ser inhalado. Teniendo en cuenta estos aspectos de seguridad, se preparó una solución de buffer carbonato manteniendo el pH en un umbral estrecho entre 10,15 y 10,20 para evitar todo tipo de riesgo. En el buffer carbonato, el carbonato de sodio (Na_2CO_3) actúa como base, mientras que el bicarbonato de sodio (NaHCO_3) actúa como ácido. Posteriormente, con la ayuda de la ecuación de Henderson-Hasselbalch y a partir del pKa (constante de disociación del ácido) se realizan los cálculos para establecer la cantidad de gramos de ácido y base que se requieren usar en la preparación. Una vez calculada esta cantidad, se disolvieron los reactivos en agua desionizada y se realizó la preparación en un balón aforado. En la fig. 34, se observa el ambiente de trabajo y el producto final, la solución amortiguadora o buffer carbonato, el cual se usó para controlar el pH de la solución de NaCN, que se preparó posteriormente. Estas actividades se realizaron en el laboratorio No.4. del Departamento de Química de la Universidad del Cauca.

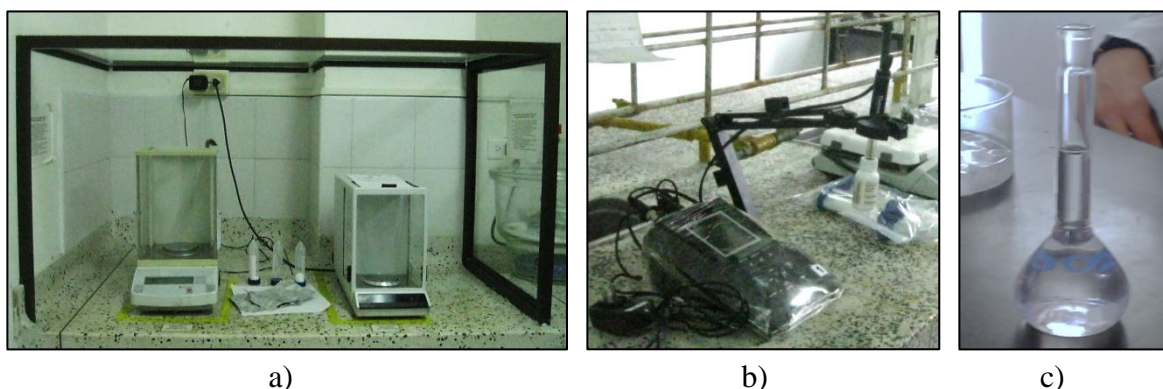


Figura 34. a). Balanzas analíticas en las cuales se pesan las cantidades requeridas de Na_2CO_3 y NaHCO_3 . b). pH-metro para verificar el valor de pH. C). Balón aforado que contiene Buffer carbonato a pH:10,20

En la preparación de la solución amortiguadora de buffer carbonato, fue necesario tener un pH-metro preciso, en este caso se trabajó con un medidor de pH de sobremesa marca Thermo Fisher Scientific, ORION STAR A21, que cuenta con una precisión relativa de $\pm 0,002$ en la medida.

3.2.2. Curva de calibración para NaCN

Para elaborar la curva de calibración de NaCN, fue necesario disolver las cantidades requeridas de NaCN en el amortiguador de buffer carbonato previamente preparado. A continuación, se realizaron los cálculos pertinentes y en 5 balones aforados de 10 mL, se prepararon cantidades de 100 ppm, 300 ppm, 500 ppm, 700 ppm y 1000 ppm de NaCN. Seguidamente se tomaron medidas de absorbancia en cada una de estas concentraciones de cianuro de sodio (Ver fig. 35), por lo cual se procede a construir la curva de calibración, graficando Absorbancia Vs concentración de NaCN en ppm.



Figura 35. Balones aforados con concentraciones de 100 ppm, 300 ppm, 500 ppm, 700 ppm y 1000 ppm de NaCN.

3.2.3. Preparación de las soluciones cianuradas empleadas en la prueba de degradación

Una vez realizada la curva de calibración del NaCN, se preparó el agua residual o las soluciones de cianuro a escala de laboratorio, para lo cual se seleccionó una concentración de 1000 ppm de este compuesto. Se escogió esta concentración debido a que está en el rango (1000-3000 ppm de NaCN) utilizado en actividades de extracción de oro, específicamente durante el proceso de lixiviación por cianuración, ampliamente manejado en plantas de beneficio que operan en el norte del departamento del Cauca.

Las actividades relacionadas con la preparación de cianuro de sodio se deben realizar en una campana de extracción y en un ambiente apto que se encuentre equipado con los elementos de protección necesarios para evitar los riesgos asociados a la manipulación de este tóxico. En la fig. 36(a) se puede observar la campana de extracción que se encuentra en el laboratorio No.4, del Departamento de Química de la Universidad del Cauca, y en la cual se realizó la preparación de la solución. Este equipo es de vital importancia, ya que tiene la función de extraer los humos o vapores peligrosos que se encuentran en el interior del laboratorio. En la fig. 36(b) se muestra la indumentaria básica requerida para trabajar con NaCN en laboratorio.



Figura 36. (a). Campana de extracción, encargada de controlar la exposición a vapores, gases y aerosoles tóxicos. (b). Indumentaria básica requerida para trabajar con NaCN en laboratorio

Una vez culminada la preparación de las soluciones cianuradas, se tomaron las medidas de seguridad correspondientes a su almacenamiento, el cual se hizo en áreas secas, ventiladas y seguras. En la fig 37(a), se muestra la presentación del NaCN sólido, en polvo. En la fig 37(b), se observa la doble protección que debe tener este recipiente y en la figura 53 (c), se muestra el segundo empaque, correspondiente a una caja debidamente rotulada en la cual se debe poner el tóxico.

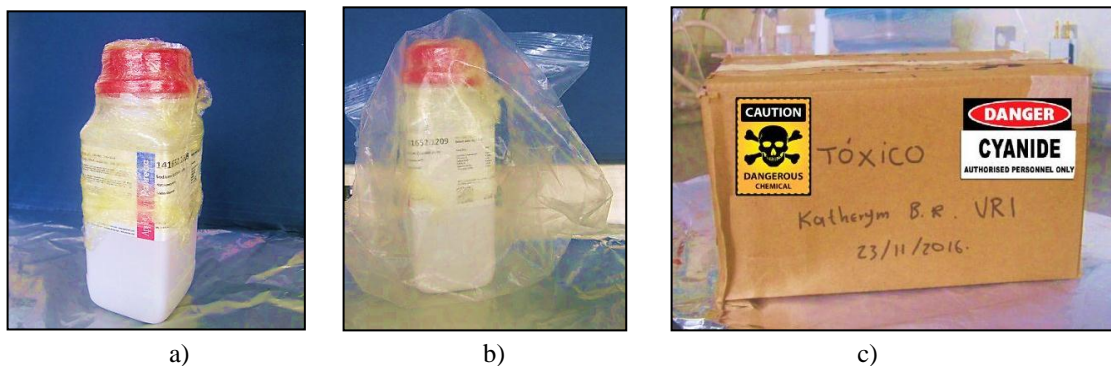


Figura 37. a). Presentación comercial de NaCN sólido. b). Doble protección. c). Caja debidamente rotulada en la cual debe reposar el tóxico..

3.3. DISEÑO EXPERIMENTAL

En este proyecto de investigación, específicamente para realizar las pruebas de bidegradación de Cianuro por cepas de *Pseudomonas*, se seleccionó un diseño experimental usando el método “Factorial Multinivel”, el cual se ejecutó en el programa StatGraphics Centurion 16.1.11 (versión de prueba). Se escogió este paquete estadístico, porque presenta una amplia interfaz gráfica, que facilita la interacción usuario-computador, permitiendo analizar de forma precisa los resultados para cada experimento. Otro criterio para la selección de este diseño experimental, son la ventajas que presenta el método factorial multinivel, como por ejemplo la cobertura de un amplio espectro de necesidades, dado que el programa crea un conjunto de corridas candidatas que permiten optimizar el diseño, arrojando detalladamente datos estadísticos y modelos matemáticos para cada una de las pruebas que se ejecutaron. Para visualizar de una forma clara la dinámica de este modelo experimental, en la fig 38, se esquematizan los factores y niveles que intervienen en este diseño experimental.

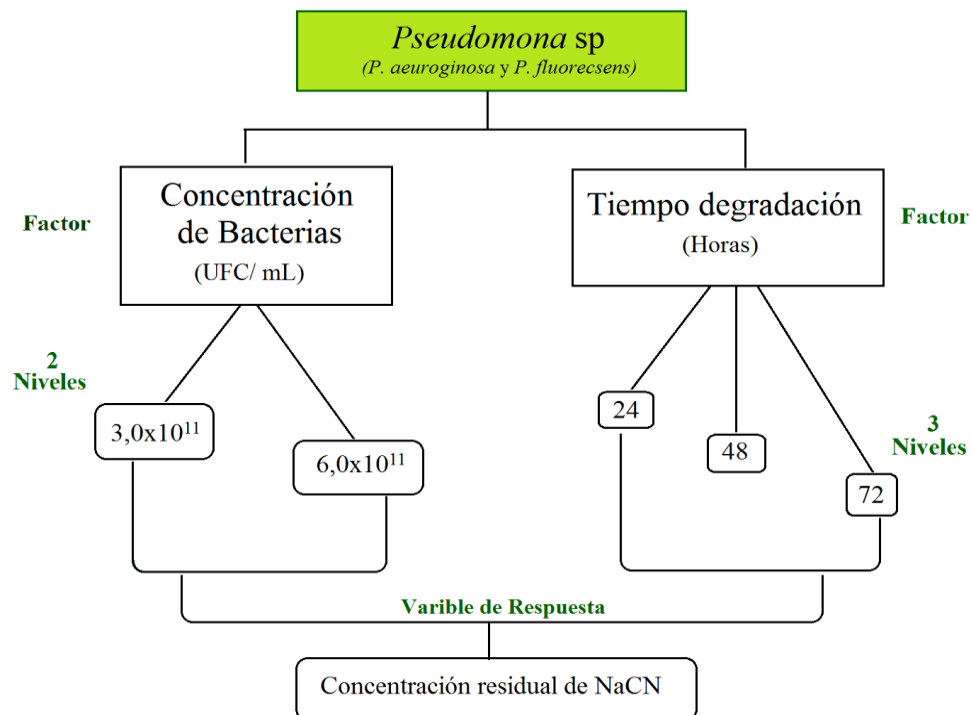


Figura 38. Dinámica del diseño factorial multinivel con factores, niveles y variable de respuesta.

Para el diseño experimental, se usaron factores cuantitativos, el primer factor fue la Concentración de microorganismos en unidades de (UFC/mL) y el segundo factor fue el Tiempo en el que dichos microorganismo realizaron el proceso de degradación de cianuro (Horas). Se seleccionaron estos factores, porque se ha reportado ampliamente en diversas investigaciones [19], que los mencionados factores, son relevantes e inciden en la degradación de cianuro.

Posteriormente se especificó el número de niveles o rango de cobertura que tendrá cada factor, en nuestro caso, para cada factor se establecieron 2 y 3 niveles respectivamente, como se presenta en la tabla 6.

Tabla 6. Factores del diseño experimental multinivel.

<i>Factores</i>	<i>Bajo</i>	<i>Intermedio</i>	<i>Alto</i>	<i>Niveles</i>	<i>Unidades</i>
Concentración de Bacterias	$3,0 \times 10^{11}$	—	$6,0 \times 10^{11}$	2	UFC/ mL
Tiempo degradación	24	48	72	3	Horas

Considerando que uno de los objetivos de la investigación fue determinar la concentración de cianuro degradada por cepas de *Pseudomonas*, tomado como factores incidentes del proceso: la concentración de bacterias y el tiempo de degradación, se generó así una variable de respuesta, denominada “concentración de NaCN”, la cual permitió cuantificar la cantidad de cianuro eliminada por cepas de *Pseudomonas*. (Tabla 7)

Tabla 7. Variable de respuesta del diseño experimental

<i>Respuestas</i>	<i>Unidades</i>
Concentración residual de NaCN	ppm

Una vez se identificaron los factores y sus respectivos niveles, se introdujeron estos datos al paquete estadístico (StatGraphics Centurion), el cual construyó una base de datos que contiene todas las combinaciones de los diferentes niveles, creando un conjunto de corridas candidatas que optimizan la ejecución del experimento, tal como se observa en la tabla 8.

Tabla 8. Diseño experimental, estructurado mediante el modelo factorial multinivel, con el cual se determinó la concentración residual de CN⁻, degradado por cepas de *Pseudomonas*

<i>Ejecución</i>	<i>Bloque</i>	<i>Concentración de Bacterias (UFC/mL)</i>	<i>Tiempo degradación (horas)</i>	<i>Concentración residual de NaCN (ppm)</i>
1	1	$3,0 \times 10^{11}$	24,0	---
2	1	$6,0 \times 10^{11}$	24,0	---
3	1	$3,0 \times 10^{11}$	48,0	---
4	1	$6,0 \times 10^{11}$	48,0	---
5	1	$3,0 \times 10^{11}$	72,0	---
6	1	$6,0 \times 10^{11}$	72,0	---
7	2	$3,0 \times 10^{11}$	48,0	---
8	2	$6,0 \times 10^{11}$	48,0	---

3.4. MONTAJE EXPERIMENTAL

Para la ejecución del experimento se tomó una cepa de *Pseudomonas aeruginosa*, así como una segunda cepa de *Pseudomonas fluorescens* y finalmente un cultivo mixto de *Pseudomonas* (*P. aeruginosa* mezclada con *P. fluorescens*) perfectamente caracterizada. La descripción de las pruebas que se realizaron, se indican en la tabla 9.

Tabla 9. Montaje experimental para determinar el porcentaje de eliminación de CN por cepas de *Pseudomonas*

<i>Actividad</i>	<i>No. Prueba</i>	<i>No. Tubos</i>	<i>Contenido</i>	<i>Tiempo (horas)</i>
<i>P. aeruginosa</i>	1	6	3 tubos con 25 ml de NaCN más una concentración de $3,0 \times 10^{11}$ UFC/mL de <i>P. aeruginosa</i>	24,48,72
	2		3 tubos con 25 ml de NaCN más una concentración de $6,0 \times 10^{11}$ UFC/mL de <i>P. aeruginosa</i>	24,48,72
	3	2	1 réplica de la prueba No.1	72
	4		1 réplica de la prueba No.2	72
<i>P. fluorescens</i>	5	6	3 tubos con 25 ml de NaCN más una concentración de $3,0 \times 10^{11}$ UFC/mL de <i>P. fluorescens</i>	24,48,72
	6		3 tubos con 25 ml de NaCN más una concentración de $6,0 \times 10^{11}$ UFC/mL de <i>P. fluorescens</i>	24,48,72
	7	2	1 réplica de la prueba No.5	72
	8		1 réplica de la prueba No. 6	72
<i>P. mixta</i>	9	3	3 tubos con 25 ml de NaCN más una concentración de $6,0 \times 10^{11}$ UFC/mL de <i>Pseudomonas mixta</i>	24,48,72
	10	3	1 réplica de la prueba No. 9	72
Control	11	3	2 tubos con 25 ml de NaCN sin microorganismos	24,48,72
		Total:22		

En la tabla 9, se indica minuciosamente, las pruebas que se realizaron para determinar el porcentaje de eliminación de CN, teniendo como base el diseño experimental multinivel presentado anteriormente en la fig 38.

Una vez finalizada la estructuración del diseño experimental, se procedió a ejecutarlo. Para ello se preparó, en un balón aforado de 1 litro, 1000 ppm de NaCN (1 g/L) disuelto en un buffer de carbonato y a un valor de pH de 10,20. A continuación, se distribuyeron 25 ml de

la solución cianurada en cada uno de 22 tubos cónicos estériles, tipo falcón de 50 mL, que se habían dispuesto. Según la tabla (como se observa en la fig 39), para la cepa de *P. aeruginosa* se realizaron 8 mediciones, más los dos controles de cianuro. En la columna denominada *Contenido* (No de pruebas 1,2,3,4 de la tabla 9) se indica la concentración que se agregó de estas bacterias a los 8 tubos que contenían cianuro; esto se hizo de la siguiente forma: a 3 tubos con 25 ml de NaCN a 1000 ppm, se le agregó una concentración **baja** de *P. aeruginosa*, ($3,0 \times 10^{11}$ UFC/mL), mientras que a los otros 3 tubos que contenían la solución cianurada, se les agregó una concentración **alta** de estas bacterias ($6,0 \times 10^{11}$ UFC/mL); los 2 tubos restantes fueron réplicas de cada una de las dos concentraciones (alta y baja) de bacterias que se mencionó, completando, así, 8 medidas para esta referencia de bacterias. Los otros dos tubos, que se observan en la fig 39, corresponden a controles establecidos para el NaCN.

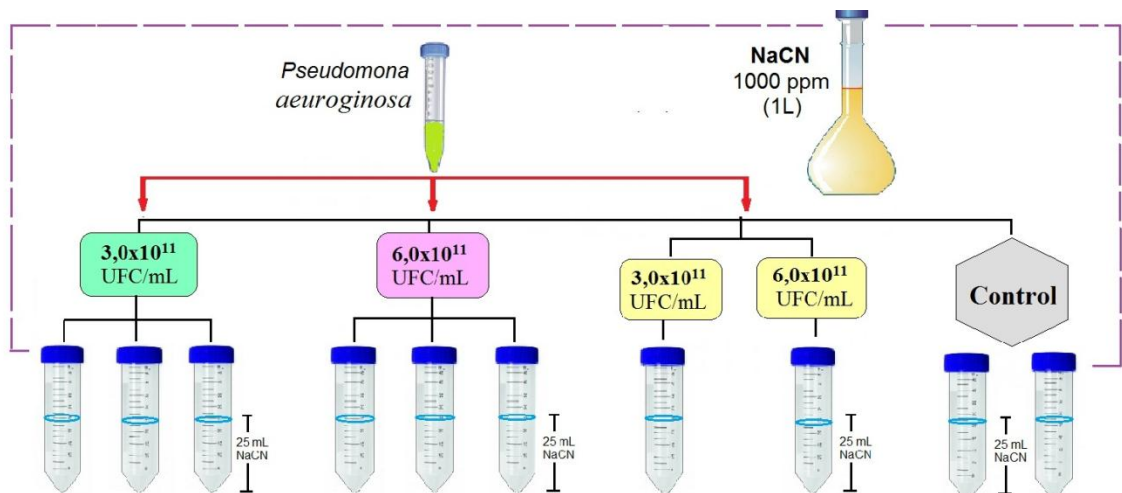


Figura 39. Distribución de solución cianurada con su respectiva concentración bacteriana y controles de cianuro para el experimento con *Pseudomonas aeruginosa*

La dinámica experimental fue similar para *Pseudomonas fluorescens*. En la fig 40 se presenta la distribución de cianuro y concentración de bacterias, para la prueba realizada con esta cepa.

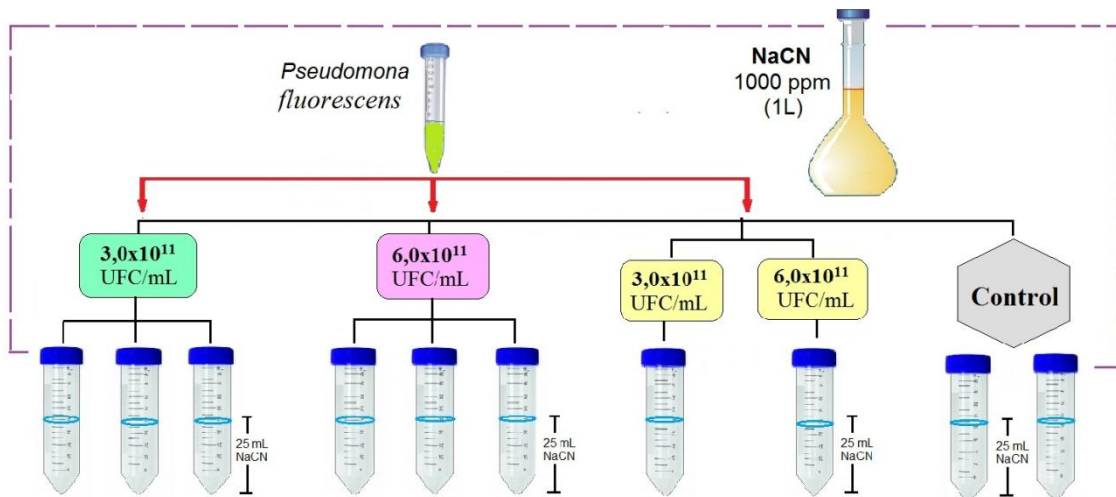


Figura 40. Distribución de solución cianurada con su respectiva concentración bacteriana y controles de cianuro para el experimento con *Pseudomonas fluorescens*

Para el cultivo de *Pseudomonas mixta*, se redujo el procedimiento, con la finalidad de evitar una prolongada exposición al cianuro y a las bacterias, considerando su peligrosidad. En esta prueba adicional, se usaron tres tubos con una concentración alta de $6,0 \times 10^{11}$ UFC/mL, una réplica y los dos controles de cianuro. En la fig 41 se esquematiza esta distribución.

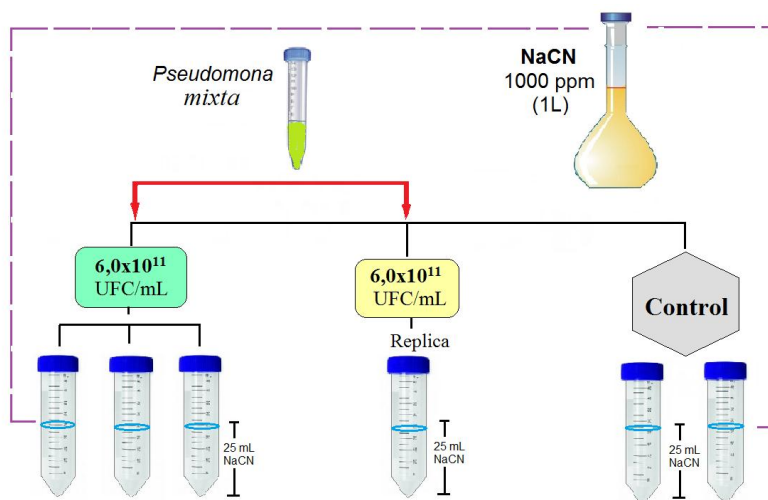


Figura 41. Distribución de solución cianurada con su respectiva concentración bacteriana y controles de cianuro para el experimento con *Pseudomonas mixta*

Cuando finalmente se tuvo preparadas la totalidad de las 22 muestras, según las especificaciones de la tabla 9, las muestras fueron colocadas en un agitador orbital, a 200 rpm, y a temperatura ambiente, tal como muestra en la fig 42. Este agitador se colocó dentro de una campana de extracción para evitar exposiciones a HCN, compuesto altamente tóxico.



Figura 42. Muestras en agitación que contienen 25 ml de NaCN disuelto en buffer carbonato a pH 10,20 y con dos concentraciones diferentes de *Pseudomonas aeruginosa* y *P. fluorescens*.

Después de transcurridas 24 horas, de estar las muestras en agitación, se procedió a filtrar los microorganismos con membranas que tenían un tamaño de poro de $0,45 \mu\text{m}$ y se realizaron las primeras medidas de concentración residual de cianuro (las muestras filtradas son desechadas, debido no se encuentran los microorganismos efectuando el proceso de degradación). Posteriormente, a las 48 y 72 horas, se realizaron las otras medidas en las muestras restantes. El proceso de filtrado se realizó con una bomba de vacío, tal como se indica en la fig 43.



Figura 43. Equipo de filtración al vacío, para separar las bacterias de la solución cianurada

Este proceso es de vital importancia debido a que, si los microorganismos no son separados de la solución cianurada, se presentarían inconvenientes al medir la absorbancia en el espectrofotómetro e interpretar estos resultados en la curva de calibración de cianuro (pág 64), realizada con el objetivo de determinar la concentración residual, en ppm, de cianuro en los periodo de 24 ,48 y 72. Si no son filtradas las bacterias, ocasionarían dispersión del haz de luz, al realizar el análisis óptico.

Cabe resaltar que para tener mayor certeza en las mediciones, se establecieron 2 controles que contienen NaCN, sin bacterias, en los cuales se monitoreo si la concentración de cianuro permaneció constante a 1000 ppm, durante las 72 horas establecidas para la realización del experimento.



Resultados

Capítulo IV

4.1. ACTIVIDADES PREVIAS CON *Pseudomonas*

Los resultados obtenidos en las actividades previas con *Pseudomonas aeruginosa* y *P. fluorescens* descritas en el capítulo anterior, se presentan a continuación.

4.1.1. Confirmación de la Taxonomía del material biológico

Después de realizar las tres pruebas establecidas para corroborar la taxonomía de los aislados bacterianos, se obtuvieron los siguientes resultados.

4.1.1.1. Tinción de Gram

En esta tinción se observó que las bacteria (de ambas especies), presentaron una coloración roja-rosada, y una morfología de bacilo (aspecto de bastón), tal como se observa en la fig 44

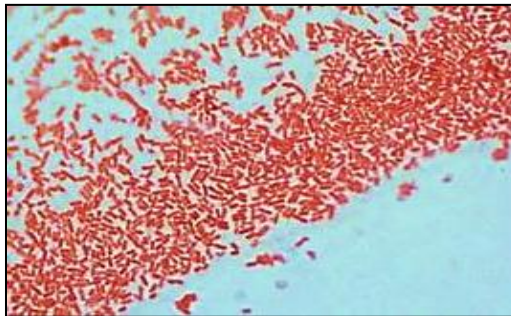


Figura 44. Fotografía obtenida con Microscopio óptico de alta resolución. En donde se muestra el color característico de las bacterias Gram negativa, para una muestra de *Pseudomonas aeruginosa*.

Estas características indicaron que las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *P. fluorescens* pertenecen al tipo de bacterias Gram negativas, como está ampliamente reportado [63].

4.1.1.2. Prueba de oxidasa

Con esta prueba se corroboró que los microorganismos presentaron una coloración morada azulada (ver fig 45), lo que indicó oxidasa positiva.

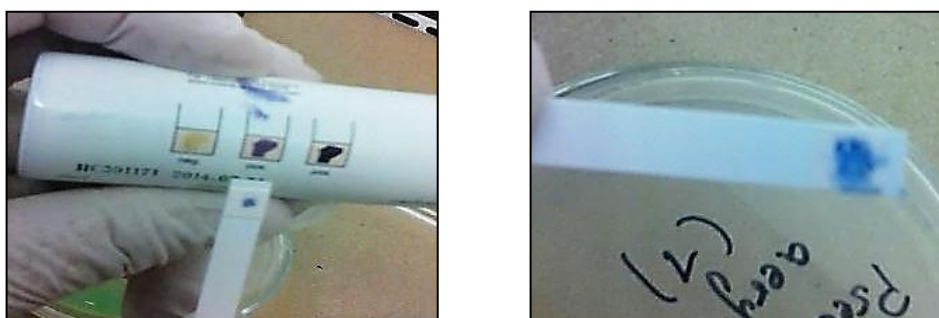


Figura 45. Tirilla de resultado obtenido en la prueba de oxidasa

Este resultado constató que las *Pseudomonas* son organismos aerobios, de acuerdo a la bibliografía reportada [19].

4.1.1.3. API 20E

Después de realizar la lectura de colores en la tirilla (fig 46), se procedió a introducir los colores observados en el software API®, donde se obtuvo un perfil numérico superior al 70%. Lo que indico que el material biológico corresponde a un taxón significativo de *P. aeruginosa* y *P. fluorescens*.



Figura 46. Tirilla Api 20E, después de realizar el protocolo indicado por el fabricante y lista para la lectura de colores.

Con el resultado positivo obtenido en la prueba Api20E y en las 2 pruebas anteriores (tinción de Gram y oxidasa), se dan por finalizadas las pruebas de identificación, ya que se corrobora que los microorganismo pertenecen a la especie *Pseudomonas* y a los dos géneros mencionado anteriormente.

4.1.2. Curva de Crecimiento

Previo a realizar la curva de crecimiento para *Pseudomonas*, se hizo un barrido o un espectro de absorción a las muestras que contenían el inculo, con la finalidad de poder determinar la longitud de onda máxima absorbida por estas. Una vez obtenido el espectro se observó que la suspensión bacteriana absorbe a $\lambda_{\max}= 600 \text{ nm}$, tal como se muestra en la fig 47.

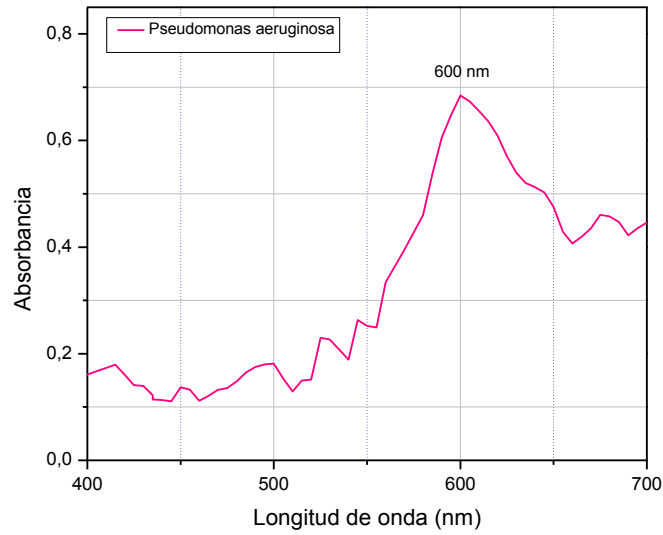


Figura 47 Espectro de absorbancia para *Pseudomonas aeruginosa*, donde se observa que λ_{\max} es 600 nm.

Una vez se definió la longitud de onda, se tomaron medidas de absorbancia en muestras por triplicado cada dos horas, durante un periodo de 12 horas, como se describió en el capítulo anterior. Las mediciones se realizaron para el cultivo de *P. aeruginosa* y *P. fluorescens*. Una vez se realizaron las mediciones de la absorbancia, se elaboraron las curvas de crecimiento para cada una de estas cepas, como se presenta en la En la fig 48.

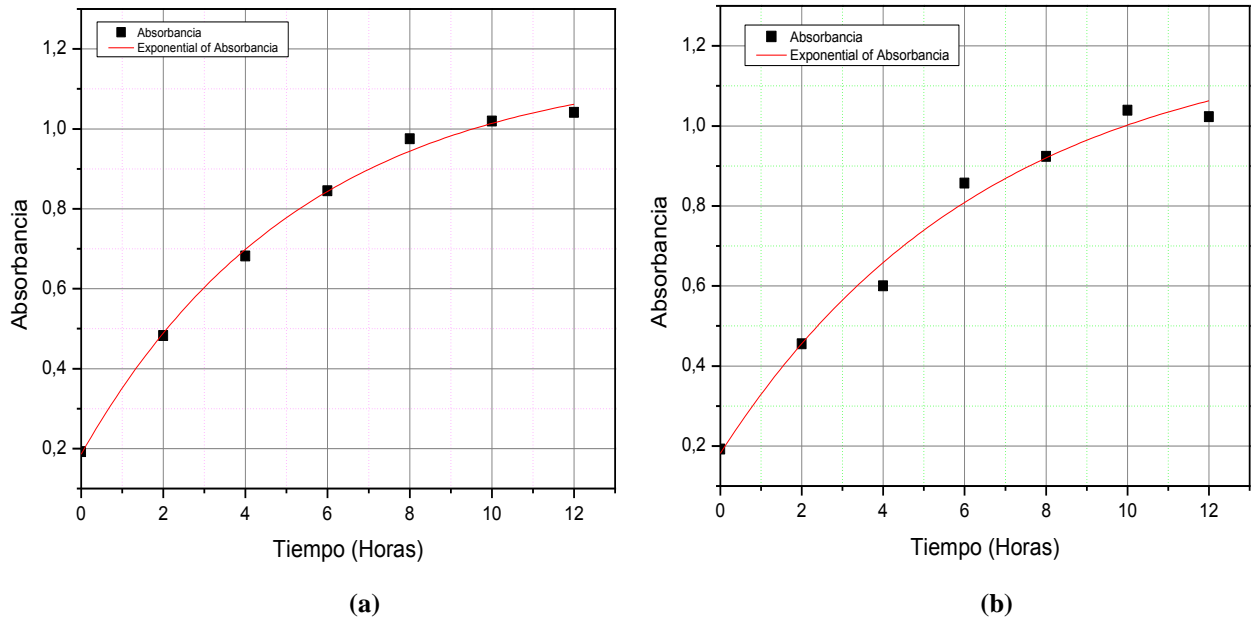


Figura 48. (a). Curva de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* con ajuste exponencial
 (b) Curva de crecimiento de *Pseudomonas fluorescens* con ajuste exponencial

A las gráficas se les realizó un ajuste exponencial. En la fig 48(a), que corresponde a la curva de crecimiento para un cultivo de *P. aeruginosa* se obtuvo una ecuación de la forma $y = y_0 + A * e^{(R_0 * X)}$, con un $R^2 = 0,9956$. El modelo general del crecimiento para esta cepa, es expresado en la ecuación 10.

$$Y = 1,17012 - (0,98412)e^{(-0,18394)X} \quad (10)$$

La ecuación del modelo exponencial para el crecimiento de una cepa de *Pseudomonas fluorescens* como se observa en la fig 48(b), a la cual se les realizó un ajuste exponencial con $R^2 = 0,9784$, se indica en la ecuación 11

$$Y = (1,23585) - (1,05428)e^{(-0,15065)X} \quad \dots\dots\dots (11)$$

Al analizar las curvas presentadas, se pueden destacar tres fases propias del proceso de crecimiento bacteriano, tal como se ilustra en la fig 49. Durante la primera hora se presenta un período de adaptación al medio de cultivo (etapa I), seguidamente de las 2 a las 8 horas se evidencia una fase de crecimiento acelerado o exponencial (etapa II), a continuación de las 8 a las 10 horas se observa una desaceleración en el crecimiento que posteriormente de las 10 a las 12 horas conlleva a establecer una condición estacionaria (etapa III) que continua hasta llegar a la etapa de declinación y posteriormente, la muerte de los microorganismos. Las etapas anteriormente mencionadas se ven de forma más clara en las fig 49 (a) y (b) que corresponden a una definición detallada de cada una de estas fases de crecimiento, en intervalos de tiempo de 0-2, 2-8, 8-10 y 10-12 horas.

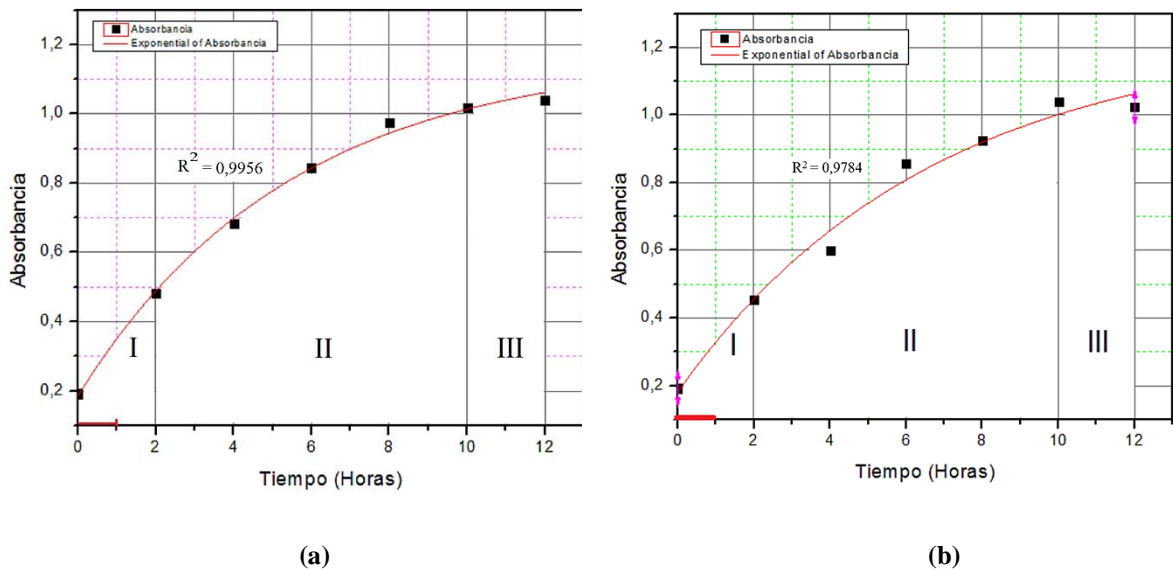


Figura 49. a). Curva de crecimiento de un cultivo bacteriano de *P. aeruginosa*, con sus respectivas fases. **b).** Curva de crecimiento para *P. fluorescens* con sus respectivas etapas.

4.1.3. Curva de calibración para *Pseudomonas*

Los resultados de Absorbancia y concentración celular, para las 6 diluciones que contenían suspensión bacteriana se representan en la fig 50.

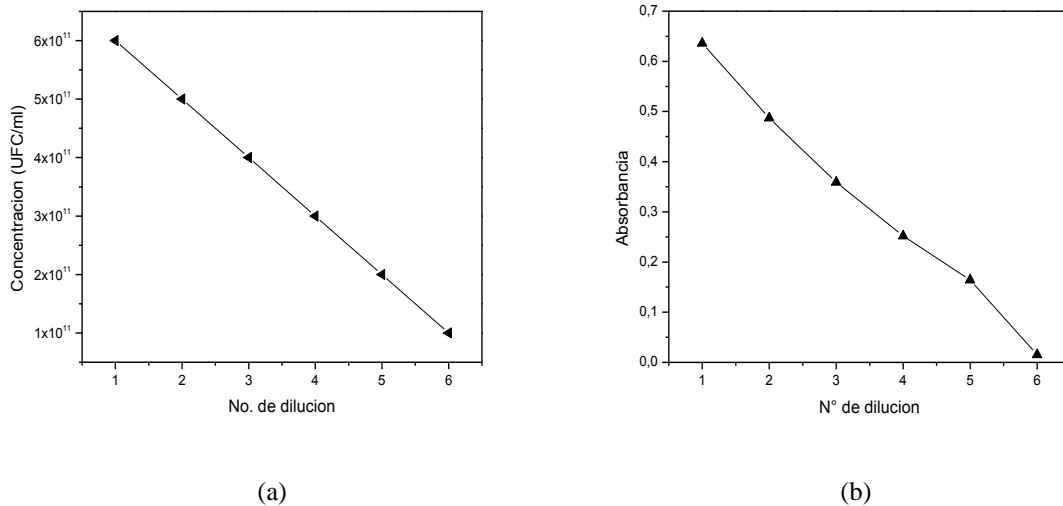


Figura 50. (a). Medidas de concentración con cámara de Neubauer para las 6 diluciones de *P. aeruginosa*.
(b). Medidas de absorbancia para *P. aeruginosa* tomadas con un espectrofotómetro a 600nm.

En la fig 50 (a), se puede observar que cuando la concentración bacteriana era alta, como en el caso de la dilución 1, aumento la absorbancia, y en el caso contrario, cuando disminuyó la concentración bacteriana, disminuyó también su absorbancia.

Con las mediciones obtenidas de absorbancia a cada una de las 6 diluciones seriadas que contenían suspensión bacteriana (en espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm y concentración de bacterias (realizada por conteo directo en cámara de Neubauer), se construyó la curva de calibración estandarizada para el género de *Pseudomonas* (esto considerando que en la curva de crecimiento que previamente se elaboró para *P. aeruginosa* y *P. fluorescens* no se observó un cambio significativo en sus medidas de absorbancia, motivo por el cual se decidió realizar la curva de calibración para *P. aeruginosa*, ya que el R^2 en su curva de crecimiento es 0,9956 y estandarizar esta curva para la especie *P. fluorescens*, reduciendo así el riesgo biológico, derivada de la prolongada exposición a estos microorganismos) . Fig 51

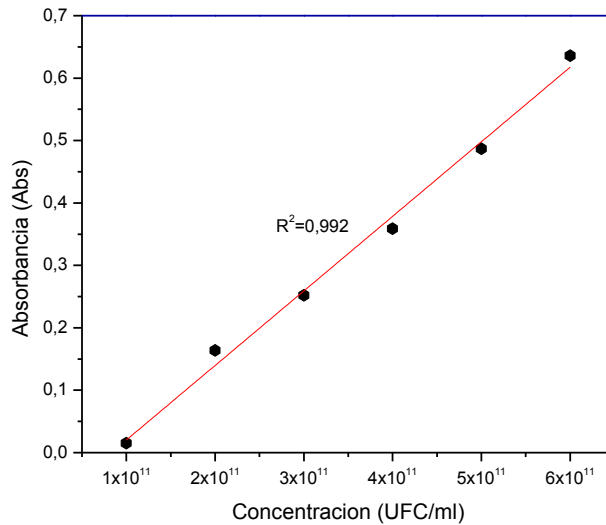


Figura 51. Curva de calibración para *Pseudomonas*. (*P. aeruginosa* y *P. fluorescens*)

Con los datos mostrados en la fig. 51 y sus correspondiente análisis lineal que incluye valores de pendiente e intercepto se obtiene la ecuación de la recta que presenta el mejor ajuste, como se observa en la ecuación 11.

$$Y_{abs} = (1,19457 * 10^{-12}) X_{\frac{ufc}{ml}} - 0,09927_{Abs} \quad (11)$$

La construcción de la curva de calibración para *Pseudomonas* (*P. aeruginosa* y *P. fluorescens*), permitirá que con solo medir absorbancia en las suspensiones bacterianas, inmediatamente, se obtenga la concentración de bacterias en unidades de UFC/mL.. Por ejemplo, en una medida de absorbancia correspondiente a 0,2 hay una concentración de 2×10^{11} UFC/mL de *Pseudomonas* (*P. aeruginosa* y *P. fluorescens*).

Se debe tener en cuenta que esta curva de calibración se realizó en la ciudad de Popayán - Cauca, en el mes de abril, donde se tuvo una temperatura mínima de 13,8 °C, promedio de 18,9 °C y una temperatura máxima de 24,4 °C, con una humedad relativa del 80% a una altura de 1.737 msnm, según los datos reportados por el IDEAM (Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales de Colombia).

4.1.4. Criopreservación

Después de preparar las suspensiones bacterias, con su respectivo criopreservante (glicerol), y rotularlas adecuadamente, se procedió a almacenar dichas muestras en un ultracongelador a -80°C , como se observa en la fig 52.

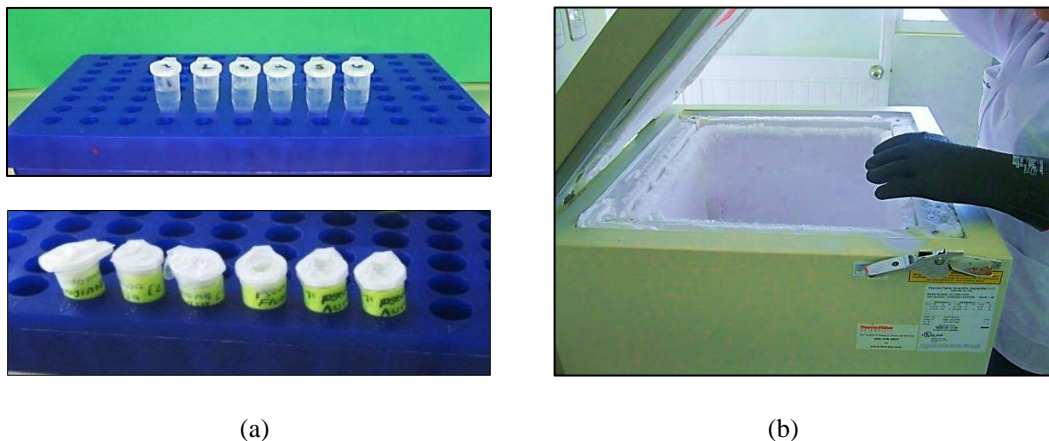


Figura 52. (a). Tubos eppendorf rotulados que contienen medio de cultivo/glicerol, previo a ser almacenados. (b). Ultracongelador donde se almacenan las muestras

La actividad de Criopreservación de los microorganismos, fue de vital importancia, debido a que permitió almacenar estas cepas por largos periodos de tiempo sin que se contaminen o pierdan su potencial biotecnológico.

4.2. ACTIVIDADES PREVIAS CON NaCN

En este aspecto, la actividad más relevante fue la elaboración de la curva de calibración para el NaCN, como se indica a continuación.

4.2.1. Curva de calibración para NaCN

En 5 balones aforados de 10 mL, se prepararon cantidades de 100 ppm, 300 ppm, 500 ppm, 700 ppm y 1000 ppm de NaCN disuelto en buffer carbonato, como se describió en el anterior capítulo.

Previo a realizar la curva de calibración para NaCN, se hizo un barrido o un espectro de absorción a muestras por duplicado que contenía un concentración de 1000 ppm de NaCN, con la finalidad de determinar la longitud de onda máxima absorbida por este compuesto.

Una vez obtenido el espectro se observó que la solución cianurada absorbe a $\lambda_{\max} = 550 \text{ nm}$, tal como se muestra en la fig 53

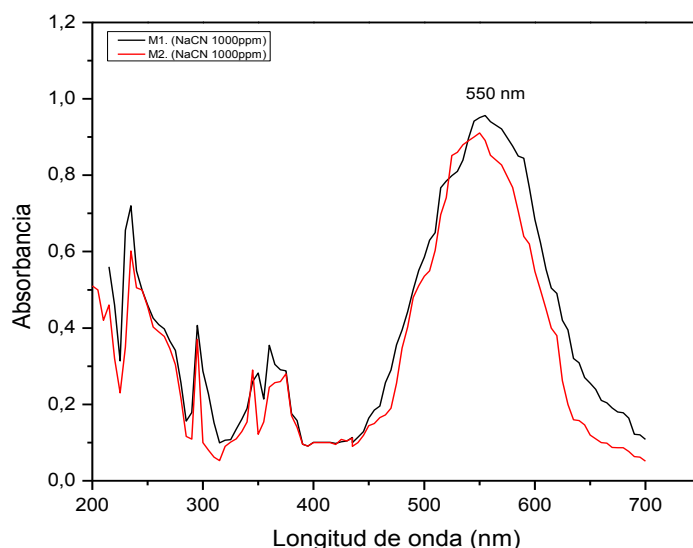


Figura 53 Espectro de absorbancia en muestras por duplicado que contenían NaCN a una concentración de 1000 ppm. Se observó que λ_{\max} es 550 nm

Una vez se identificó que e λ_{\max} para una solución de cianuro de sodio fue de 550 nm, se procedió a tomar medidas de absorbancia en cada una de las 5 concentraciones de NaCN que previamente se prepararon, como se mencionó en el capítulo anterior

En la tabla 10, se presentan los parámetros para la elaboración de una curva de calibración de cianuro de sodio.

Tabla 10. Datos para la elaboración de la curva de calibración de NaCN.

1	Amortiguador:	Buffer carbonato
2	Blanco:	Buffer carbonato
3	Medición:	Celdas de cuarzo
4	Longitud de onda:	550 nm
5	Equipo:	Espectrofotómetro UV-VIS

Con los datos mencionados la tabla.10 se procedió a realizar las mediciones de absorbancia de las 5 concentraciones diferentes de NaCN que se prepararon, considerando la longitud de onda de 550 nm.

Tabla 11. Datos de absorbancia en muestras por triplicado de NaCN, preparado a cinco diferentes concentraciones.

Concentración NaCN (ppm)	Absorbancia		
	Medición 1	Medición 2	Medición 3
100	0,048	0,048	0,023
300	0,266	0,2	0,048
500	0,4	0,4	0,266
700	0,6	0,6	0,657
1000	0,912	1,151	1,151

Con los datos indicados en la tabla 11 se graficó Absorbancia Vs. Concentración, para cada una de las 5 concentraciones de NaCN. En la fig 54 Se muestran estos resultados en muestras por triplicado.

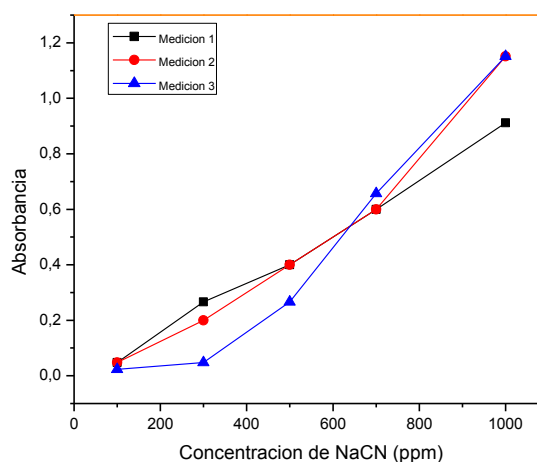


Figura 54 . Muestras por triplicado, correspondientes a la preparación de cinco diferentes concentraciones de NaCN a pH: 10,20.

Con los datos estadísticos que arrojó cada una de las tres gráficas, y con el objetivo de minimizar el error, se utilizó como factor discriminador de selección, el coeficiente de correlación de Pearson (R), con base en este parámetro fueron seleccionados los datos de absorbancia correspondientes a la medición No. 1 dado que su $R = 0,99441$, muy próximo a la unidad, lo que indica la existencia de una correlación positiva y una dependencia total (relación directa), entre las dos variables de interés (absorbancia y concentración).

En la tabla.12 se reescriben los datos de interés correspondientes a la medición número 1 (ver fig. 54), con los cuales se realizaron la curva de calibración.

Tabla 12. Datos para elaboración de Curva de calibración de NaCN, en unidades de ppm y su equivalente en g/L

Concentración de NaCN ppm	Concentración de NaCN g/L	Absorbancia
100	0,1	0,048
300	0,3	0,266
500	0,5	0,4
700	0,7	0,6
1000	1	0,912

La representación gráfica de los datos presentados en la tabla 12, y el análisis lineal de los mismos se muestra en la fig.55.

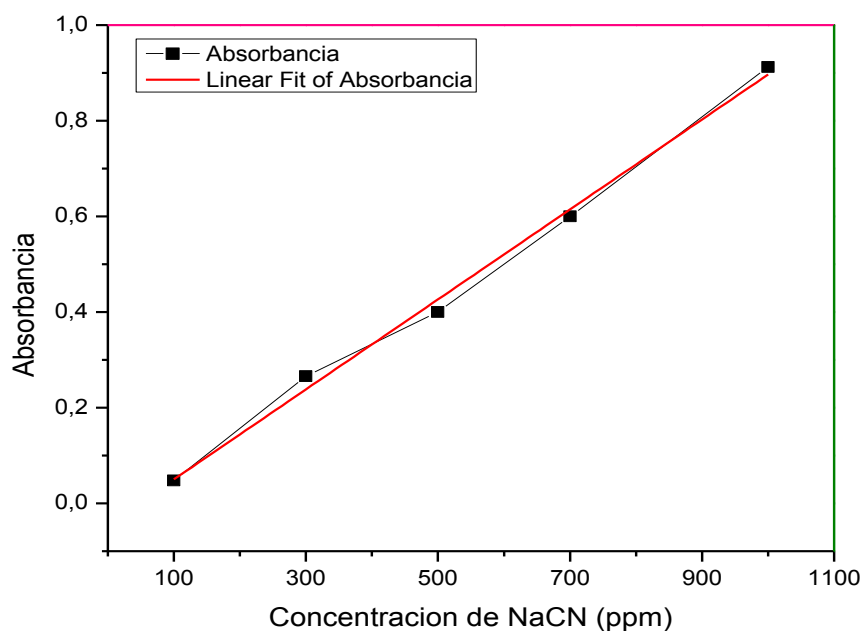


Figura 55. Curva de calibración de NaCN, disuelto en buffer carbonato a pH: 10,20, medido a una longitud de onda de 550 nm y preparado a 5 concentraciones distintas (100 ppm, 300 ppm, 500 ppm, 700 ppm, 1000 ppm).

El análisis lineal aplicado a la curva de calibración de NaCN (en unidades de ppm), presentado en la fig. 58, esta modelado por la ecuación 12.

$$Y_{\text{abs}} = (9,4073 \cdot 10^{-4}) X_{\text{con}} - 0,04398 \quad (12)$$

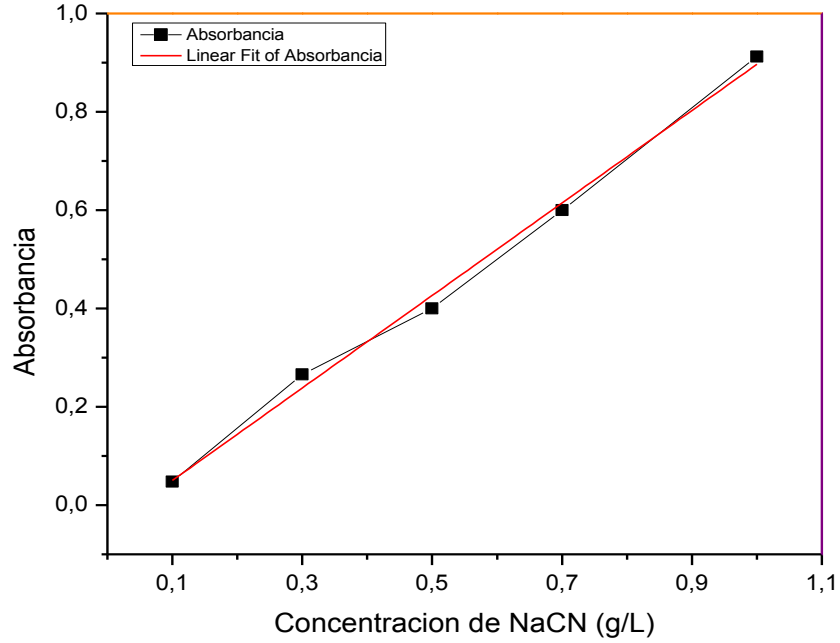


Figura 56. Curva de calibración de NaCN en unidades de g/L.

Con su representativa ecuación característica en unidades de g/L. La ecuación que rige el comportamiento de la figura.56, se presenta a continuación.

$$Y_{\text{abs}} = (0,94074)X_{\text{con}} - 0,04398 \quad (13)$$

Con la de construcción de la curva de calibración para el NaCN, en unidades de ppm, se procedió a realizar el montaje experimental y las pruebas para degradación de NaCN por *P. aeruginosa*, *P.fluorescens* y un cultivo mixto.

4.3. PRUEBAS DE BIODEGRADACIÓN DE NaCN

Después de ejecutar el diseño experimental expuesto en el capítulo 3, se procedió a realizar las primeras mediciones de concentración residual de NaCN, para con ello determinar el porcentaje de eliminación de cianuro, transcurridas 24 horas.

Es necesario tener en cuenta, que la concentración inicial, a la que se prepararon las muestras es 1000 ppm, de NaCN (que es equivalente a 1 g/L o 1000 mg/L), concentración ampliamente utilizada en actividades de extracción de oro, específicamente durante el proceso de lixiviación por cianuración, que comúnmente es empleado en plantas de beneficio ubicadas en el norte del departamento del Cauca

Para una adecuada realización de las pruebas, se tuvieron en cuenta los siguientes aspectos:

- Para calcular la concentración bacteriana en UFC/mL, que se adiciono a la solución cianurada, se hizo uso de la curva de calibración para *Pseudomonas* (*P. aeruginosa* y *P. fluorescens*), como se presentó en la fig 51.
- Para calcular la concentración de NaCN en ppm, se hace uso de la curva de calibración para NaCN (fig 56). Antes de realizar estas mediciones fue necesario filtrar los microorganismos de las muestras cianuradas, ya que esta curva fue obtenida, para NaCN disuelto en buffer carbonato a pH 10.20 sin microorganismos (si no se filtran las bacterias, se afectarían los resultados de absorbancia , por la dispersión de la luz q estas ocasionarían)

4.3.1. EXPERIMENTO No. 1. DEGRADACIÓN DE NaCN CON *Pseudomonas aeruginosa*

Para la realización de esta prueba se usaron 8 tubos, más dos controles, que contenían cada uno 25 mL de NaCN a pH 10,20, en una concentración de 1000ppm de NaCN, y a dos concentraciones diferentes de *Pseudomonas aeruginosa*, tal como se ilustró en las figuras 40 y14. Tres tubos, más una réplica (4 tubos en total), contenían una concentración de $3,0 \times 10^{11}$ UFC/mL de estos microorganismos (absorbancia en la curva de calibración para *Pseudomonas* 0.3) y los otros 3 tubos más una réplica (4 tubos en total), contenían una concentración, de $6,0 \times 10^{11}$ UFC/mL (absorbancia en la curva de calibración para *Pseudomonas* 0.6).

Es de resaltar que las *Pseudomonas aeruginosa*, fue la cepa que presentó el mayor crecimiento en la solución de cianuro de sodio, como se observa en la fig 57.

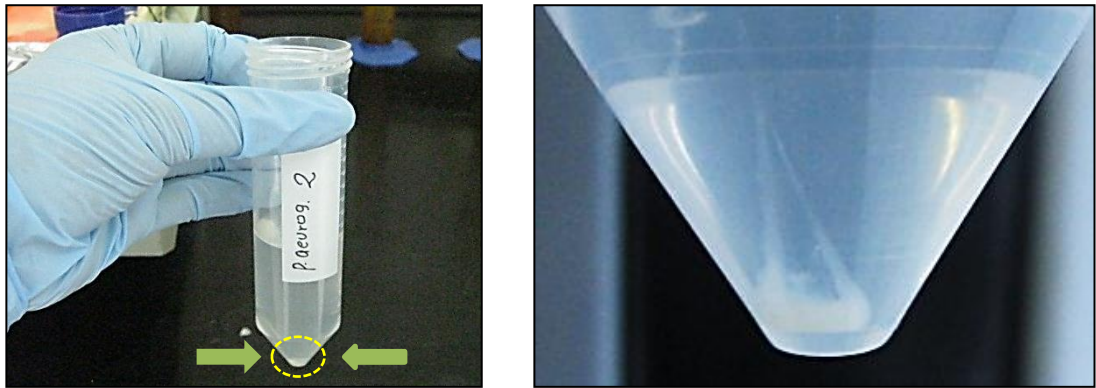


Figura 57. Crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* en NaCN a temperatura ambiente, y pH 10,20 transcurridas 24 horas.

A temperatura ambiente y transcurridas 24, 48 y 72 horas,, se filtraron los microorganismos en los tiempos establecidos como se observa en la fig 58..

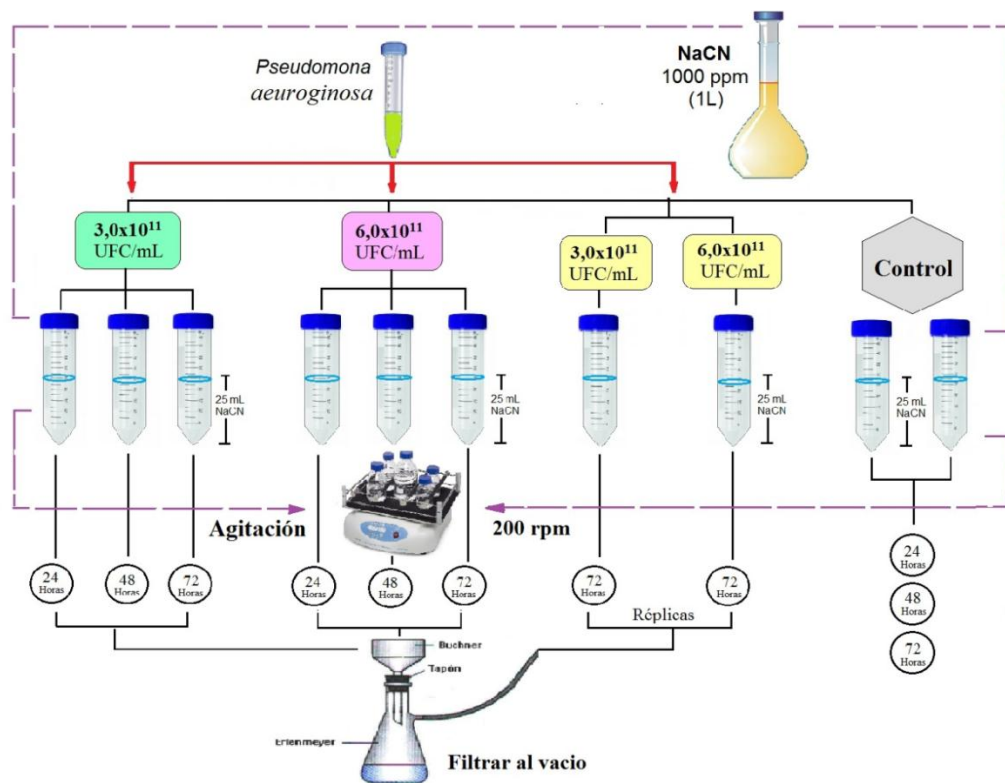


Figura 58. Montaje experimental y materiales usados para cuantificar el cianuro degradado por *Pseudomonas aeruginosa*

Una vez se filtraron los microorganismos, se midió absorbancia a en las muestras de NaCN, para determinar la cantidad de cianuro residual. Los resultados obtenidos se indican en la tabla 13.

Tabla 13. Concentración media residual de NaCN con buffer carbonato por *Pseudomonas aeruginosa* a temperatura ambiente y pH 10,20

Ejecución	Concentración Bacterias (UFC/mL)	Tiempo degradación (horas)	Absorbancia de solución cianurada sin bacterias	Concentración residual de NaCN (ppm)	Control (ppm)
Día 0	$3,0 \times 10^{11}$	0	0.9	1000	1000
Día 0	$6,0 \times 10^{11}$	0	0.9	1000	1000
Día 1	$3,0 \times 10^{11}$	24,0	0.77	860	1000
Día 1	$6,0 \times 10^{11}$	24,0	0.64	730	1000
Día 2	$3,0 \times 10^{11}$	48,0	0,55	631	1000
Día 2	$6,0 \times 10^{11}$	48,0	0.43	504	1000
Día 3	$3,0 \times 10^{11}$	72,0	0,26	318	1000
Día 3	$6,0 \times 10^{11}$	72,0	0,11	165	1000
Día 3/replica	$3,0 \times 10^{11}$	72,0	0,26	320	1000
Día 3/replica	$6,0 \times 10^{11}$	72,0	0,11	162	1000

Usando los datos que se indican en la tabla. 13, se graficaron las concentraciones residuales de NaCN para los tiempos 0, 24,48 y 72 horas. Para ello se establecieron las siguientes convenciones: a la muestra de NaCN que contenían una concentración *baja* de microorganismos (3×10^{11} UFC/mL) se le denominó “**muestra 1**”, y a la muestra de NaCN que contenía una concentración *alta* de bacterias se le denominó “**muestra 2**”, tal como se presenta en el siguiente esquema. Ver fig 59.

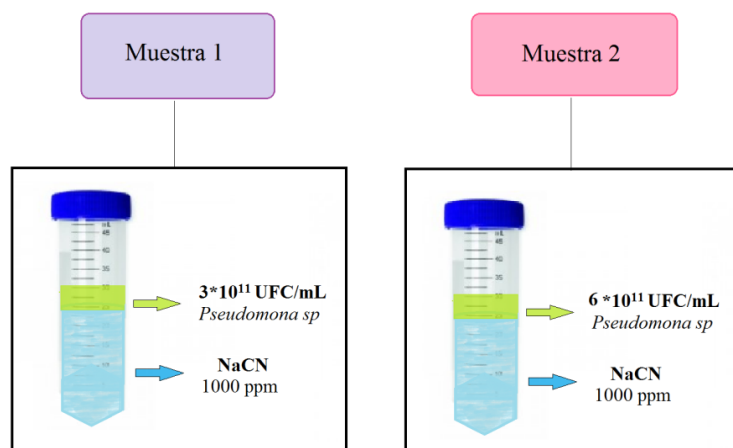


Figura 59. Convenciones para los resultados experimentales. La muestra 1 corresponde a NaCN con una concentración baja de *Pseudomonas* y la muestra 2 contiene NaCN con una concentración alta de bacterias

Con base en esta convención, se procedió a representar gráficamente la concentración media residual de NaCN, para dos concentraciones de *Pseudomonas aeruginosa* (muestras 1 y 2), transcurridas 72 horas (fig 60).

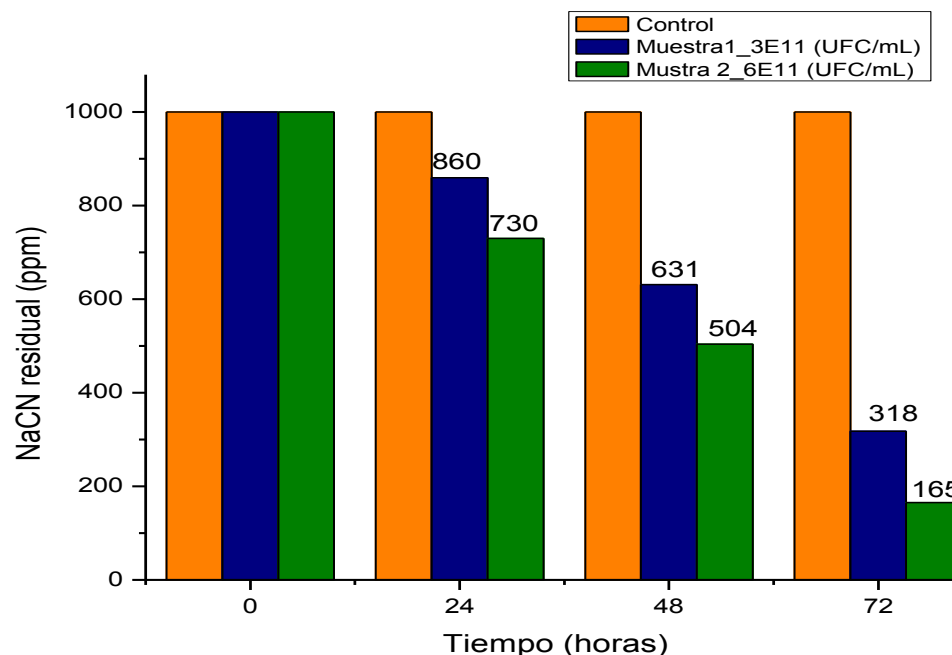


Figura 60. Concentración media residual de NaCN, para dos concentraciones de *Pseudomonas aeruginosa* evaluada.

En la figura 60 se observa que en el tiempo 0, tanto el control de NaCN, como la muestra 1 y muestra 2 contenían una concentración inicial: 1000 ppm de NaCN. Transcurridas 24 horas de tratamiento el control continuo a una concentración de 1000 ppm de NaCN, mientras que la muestra 1 presento una concentración residual de 860 ppm de NaCN y la muestra 2 de 730 ppm. Las muestras tratadas con *Pseudomonas aeruginosa* presentaron una reducción significativa en la concentración de NaCN. A las 48 horas, la muestra 1 tenía una concentración residual de 631 ppm de NaCN y la muestra 2 de 504 ppm de NaCN, mientras que el control mantuvo la concentración de 1000 ppm.

Finalmente, transcurridas las 72 horas, el control mantuvo las 1000 ppm de NaCN iniciales, mientras que en la muestra 1 se registraron 318 ppm de NaCN y en la muestra 2 sólo 165 ppm de NaCN residual.

Este comportamiento se puede apreciar más claramente, en las curvas de la fig 61, donde en la parte (a), se muestra el comportamiento del control durante el transcurso de las 72 horas, mostrando que la concentración de NaCN permanece constante en 1000 ppm, que es la concentración inicial. Por otro lado, las muestra 1 y 2 que contenían las dos concentraciones de *Pseudomonas aeruginosa*, $3 \cdot 10^{11}$ UFC/mL y $6 \cdot 10^{11}$ UFC/mL respectivamente, mostraron biodegradación de cianuro, tal como se observa en la parte (b) de la fig 61.

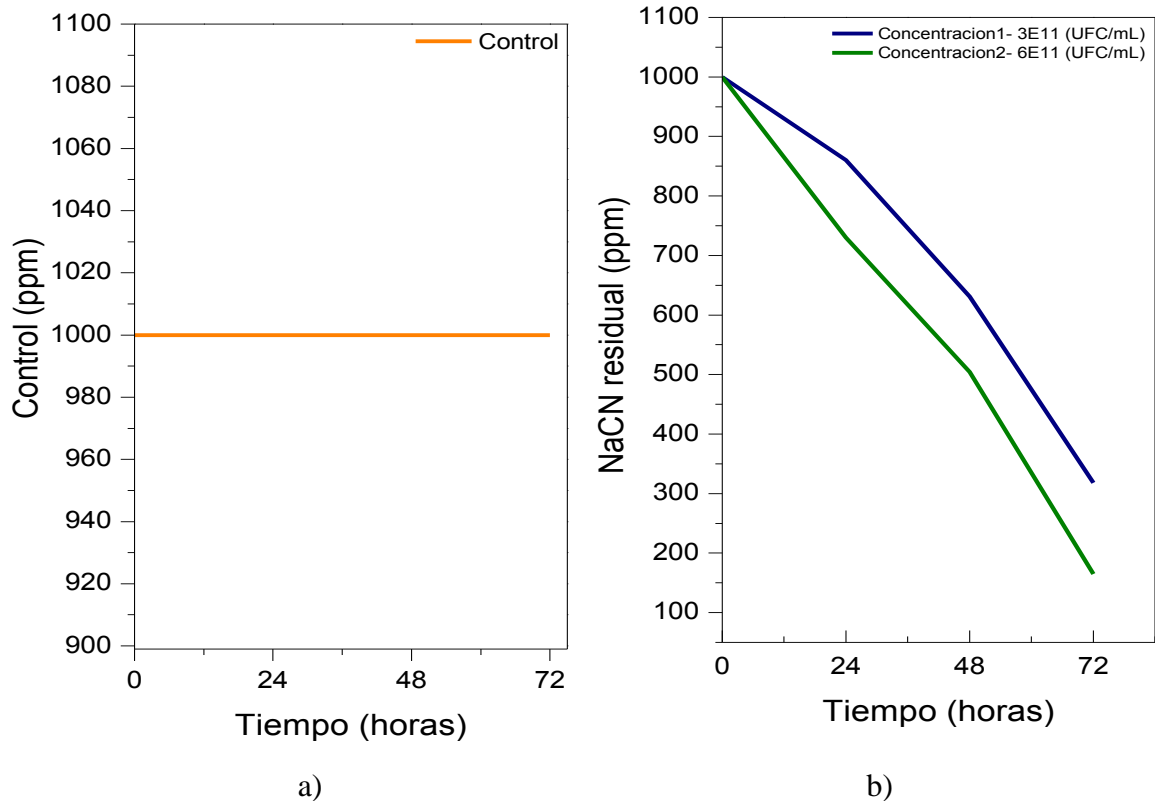


Figura 61. (a) Comportamiento de la muestra control de NaCN a 1000 ppm. (b). Proceso de biodegradación de NaCN propiciado por las dos concentraciones de *Pseudomonas aeruginosa* incorporadas a la disolución Inicial de NaCN, en función del tiempo.

Analizando los datos anteriores (fig 61), se concluye que de las dos muestras que contenían los microorganismos ocasionaron degradación del NaCN, pero la que presentó mayor degradación fue **la muestra 2**, que contenía $6 \cdot 10^{11}$ UFC/ml de *P. aeruginosa*: a las 72 horas estas bacterias habían reducido a 165 ppm la concentración de NaCN en el sistema. Estos resultados se indican en la fig 62.

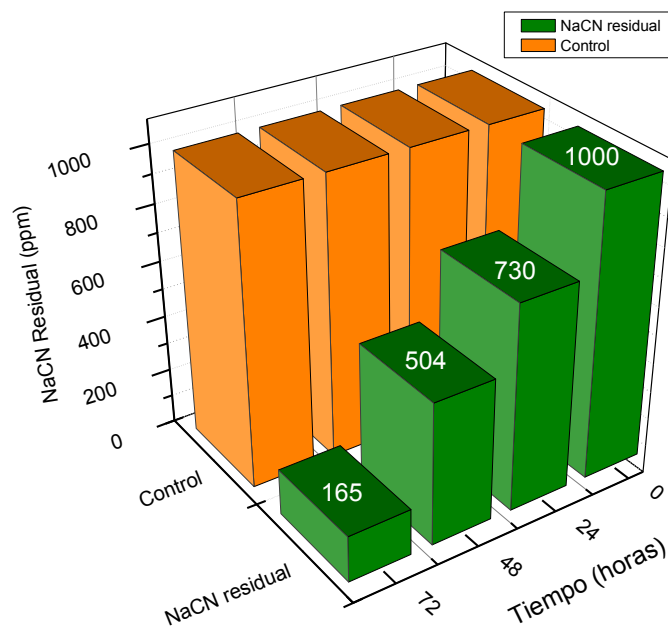


Figura 62. Concentración media residual de NaCN, realizado por 6×10^{11} UFC/ml de *Pseudomonas aeruginosa*, partiendo de una concentración inicial de 1000 ppm de NaCN, en buffer carbonato, pH 10,20, durante un periodo de 72 horas.

Con base en los datos de concentración residual, se calculó el porcentaje de degradación de cianuro; para realizar estos cálculos fue necesario determinar la degradación media acumulada. Estos resultados se obtuvieron restándole a la concentración inicial de NaCN (1000ppm) el NaCN residual presentado en la tabla anterior. Los resultados correspondientes a degradación media acumulada de NaCN, se presentan en la tabla 14.

Tabla 14 . Degradación media acumulada de NaCN con buffer carbonato por *Pseudomonas aeruginosa* a temperatura ambiente y pH 10,20

Ejecución	Concentración de Bacterias (UFC/mL)	Tiempo degradación (horas)	Absorbancia de solución cianurada sin bacterias	Degradación media acumulada de NaCN (ppm)	Control (ppm)	Porcentaje de degradación de NaCN
Día 0	$3,0 \times 10^{11}$	0	0.90	1000	1000	0
Día 0	$6,0 \times 10^{11}$	0	0.90	1000	1000	0
Día 1	$3,0 \times 10^{11}$	24,0	0.77	140	1000	14%
Día 1	$6,0 \times 10^{11}$	24,0	0.64	270	1000	27%
Día 2	$3,0 \times 10^{11}$	48,0	0.55	369	1000	37%
Día 2	$6,0 \times 10^{11}$	48,0	0.43	496	1000	50%
Día 3	$3,0 \times 10^{11}$	72,0	0.26	682	1000	68%
Día 3	$6,0 \times 10^{11}$	72,0	0,11	835	1000	84%
Día 3/replica	$3,0 \times 10^{11}$	72,0	0,26	680	1000	68%
Día 3/replica	$6,0 \times 10^{11}$	72,0	0,11	838	1000	84%

Analizando la tabla anterior, se evidencia que el mayor porcentaje de biodegradación de cianuro, se presentó para las muestras que contienen una concentración alta de microorganismos (muestra 2). Por esta razón, en la fig 63, solo se presenta la cantidad de cianuro eliminada (en términos de porcentaje) al usar esta concentración **alta** de *Pseudomonas aeruginosa* ($6,0 \times 10^{11}$ UFC/mL) ya que fue la cantidad de bacterias que propició la mayor eliminación de cianuro presente en las muestras.

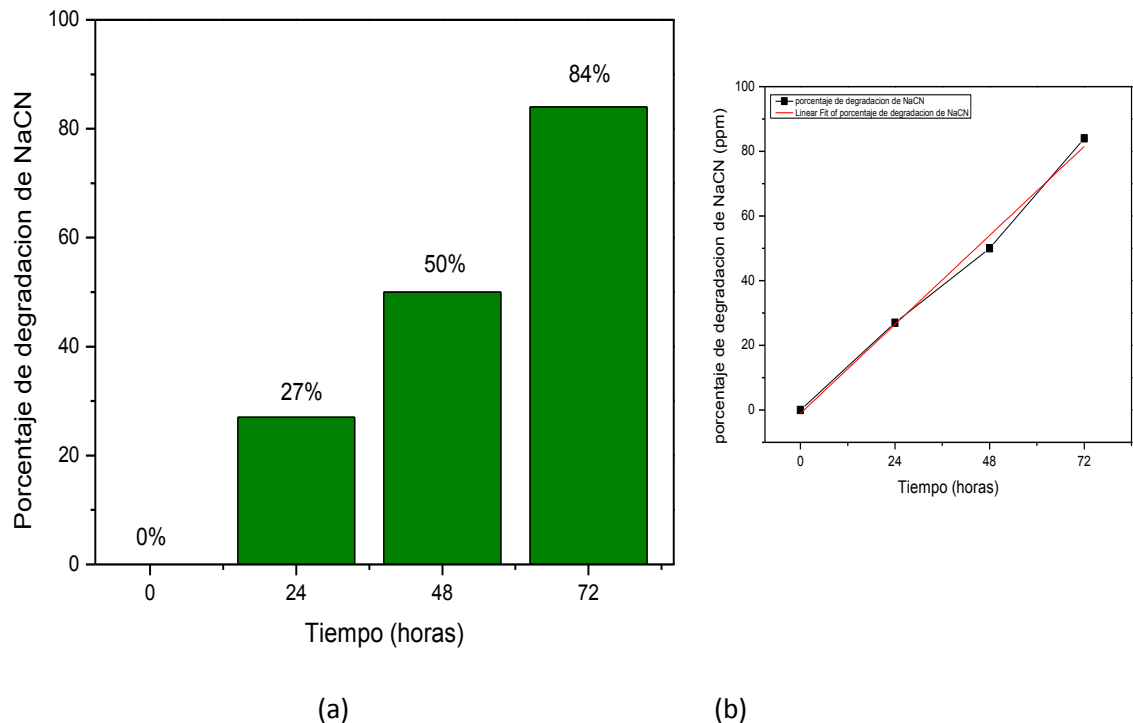


Figura 63. Porcentaje de degradación de NaCN, realizado por una concentración de 6×10^{11} UFC/ml de *Pseudomonas aeruginosa* durante 72 horas.

En la fig 63(a) se observa el porcentaje de NaCN, degradado por una concentración de 6×10^{11} UFC/ml de *Pseudomonas aeruginosa*, en intervalos de 24, 48 y 72 horas y en la parte (b) se aprecia la tendencia lineal que presentan los datos.

NOTA. Los cálculos estadísticos y de error de este experimento se encuentran en los anexos (análisis de error en el experimento No.1). También se comparte un contra análisis para corroborar los datos que se obtienen en este experimento 1, el cual fue aplicado a la muestra de cianuro residual que mayor porcentaje de eliminación presenta (84% de eliminación o 165 ppm de NaCN residual). Cabe señalar que esta muestra fue llevada al laboratorio de análisis ambiental de la CRC, donde expertos en el tema realizaron la correspondiente medición certificada (ver anexo).

4.3.2. EXPERIMENTO No. 2. DEGRADACIÓN DE NaCN CON *Pseudomonas fluorescens*

En este experimento se usaron 2 controles y 8 tubos que contenían 25 mL de NaCN a pH 10,20 con una concentración de 1000ppm de NaCN, y con dos cantidades distintas de *Pseudomonas fluorescens*: 3 tubos más una réplica (4 tubos en total) con una concentración de $3,0 \times 10^{11}$ UFC/mL (absorbancia en la curva de calibración para *Pseudomonas* de 0,3 (fig.51)) y otros 3 tubos más una réplica (4 tubos en total) con $6,0 \times 10^{11}$ UFC/mL (absorbancia en la curva de calibración para *Pseudomonas* 0,6 (fig.56)). En la fig 64, se muestra el montaje experimental y se ilustra la metodología que se desarrolló para esta prueba.

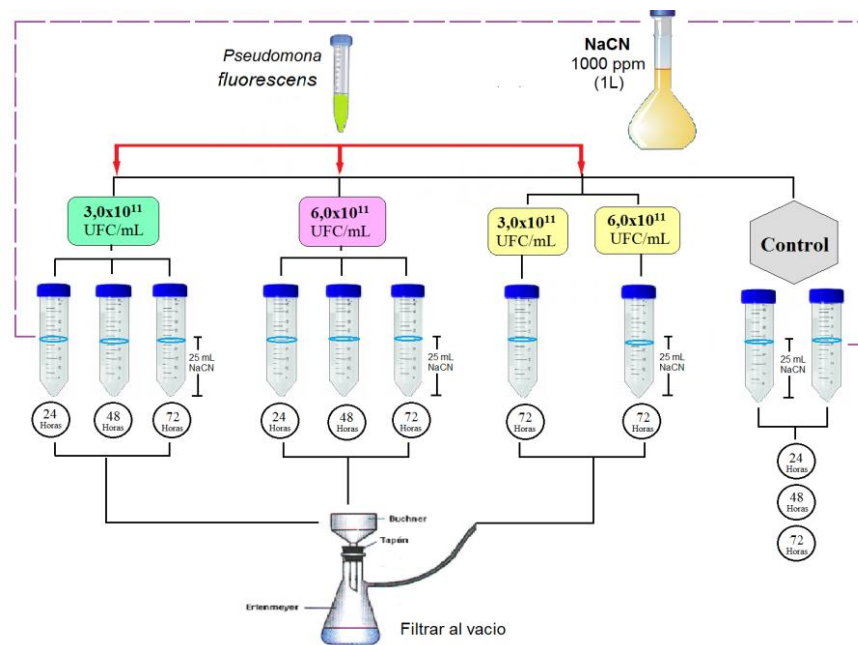


Figura 64. Montaje experimental y materiales para cuantificar el cianuro degradado por *Pseudomonas fluorescens*

Después de transcurrido un periodo de 24, 48 y 72 horas, respectivamente, y a una temperatura ambiente, de 22°C, se obtuvieron los resultados que se indican en la tabla 15.

Tabla 15. Concentración media residual de NaCN con buffer carbonato por *Pseudomonas fluorescens* a temperatura ambiente y pH 10,20

Ejecución	Concentración de Bacterias (UFC/mL)	Tiempo degradación (horas)	Absorbancia de solución cianurada sin bacterias	Concentración media residual de NaCN (ppm)	Control (ppm)
Día 0	3,0x10 ¹¹	0	0.90	1000	1000
Día 0	6,0 x10 ¹¹	0	0.90	1000	1000
Día 1	3,0x10 ¹¹	24,0	0.81	908	1000
Día 1	6,0 x10 ¹¹	24,0	0.80	902	1000
Día 2	3,0 x10 ¹¹	48,0	0.72	817	1000
Día 2	6,0 x10 ¹¹	48,0	0.70	793	1000
Día 3	3,0 x10 ¹¹	72,0	0.54	624	1000
Día 3	6,0 x10 ¹¹	72,0	0.52	601	1000
Día 3/replica	3,0 x10 ¹¹	72,0	0.53	611	1000
Día 3/replica	6,0 x10 ¹¹	72,0	0.53	613	1000

Con los datos de la Tabla. 15, se obtuvo la gráfica de la concentración media residual de NaCN a los tiempos de : 0, 24, 48 y 72 horas.

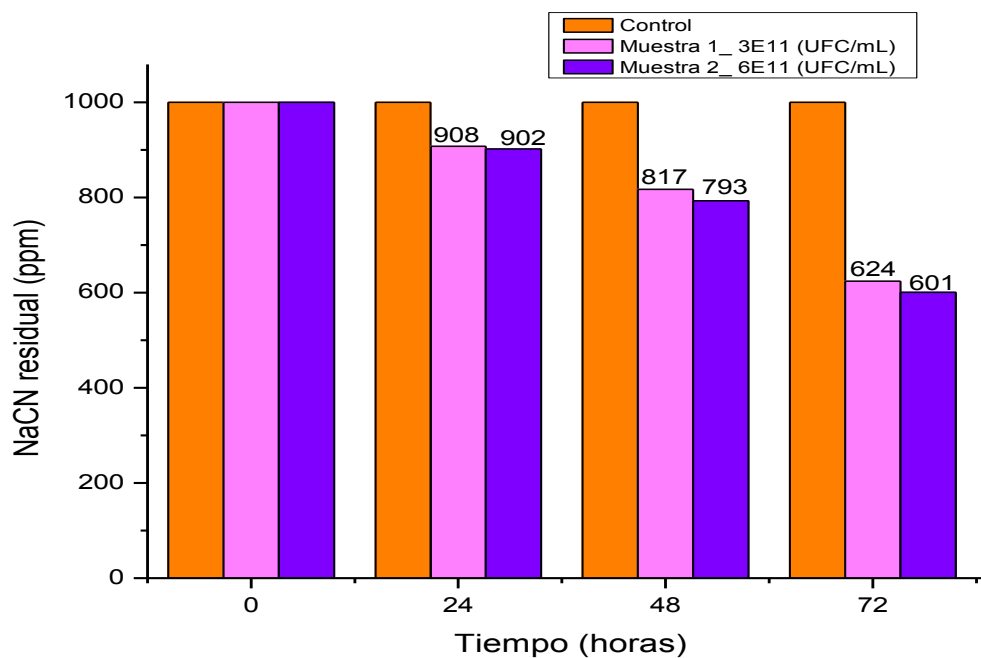


Figura 65. Concentración media residual de NaCN para dos concentraciones de *Pseudomonas fluorescens*, correspondientes a 0, 24, 48 y 72 horas.

En la fig 65 se aprecia que en el tiempo inicial “0”, tanto el control de NaCN como las dos muestras cianuradas que contenían cantidades diferentes de microorganismo (**muestra 1**= 3*10¹¹ UFC/mL, y **muestra 2**= 6*10¹¹ UFC/mL), contenían una concentración inicial de 1000 ppm de NaCN. Transcurridas 24 horas, el control continuo a una concentración de

1000 ppm de NaCN, mientras que la muestra 1 presento 908 ppm de NaCN y la muestra 2 tuvo 902 ppm de NaCN. A las 48 horas, la muestra 1 presento una concentración residual de 817 ppm de NaCN y la muestra 2 de 793 ppm de NaCN, mientras el control permaneció constante a 1000 ppm.

Finalmente y transcurridas 72 horas, el control continua en los 1000 ppm iniciales de NaCN, mientras que en la muestra 1 había 624 ppm y en la muestra 2 sólo 601 ppm de NaCN residual. Este comportamiento se representó en la fig 66. En la fig 66(a) se observa que el control, durante las 72 horas del experimento, siempre permaneció constante en 1000 ppm de NaCN, concentración inicial. Por otro lado, las muestras 1 y ,2 que contenían dos concentraciones distintas de *Pseudomonas fluorescens*, mostraron su proceso de gradación de cianuro, tal como se observa en la parte (b) de la fig 66.

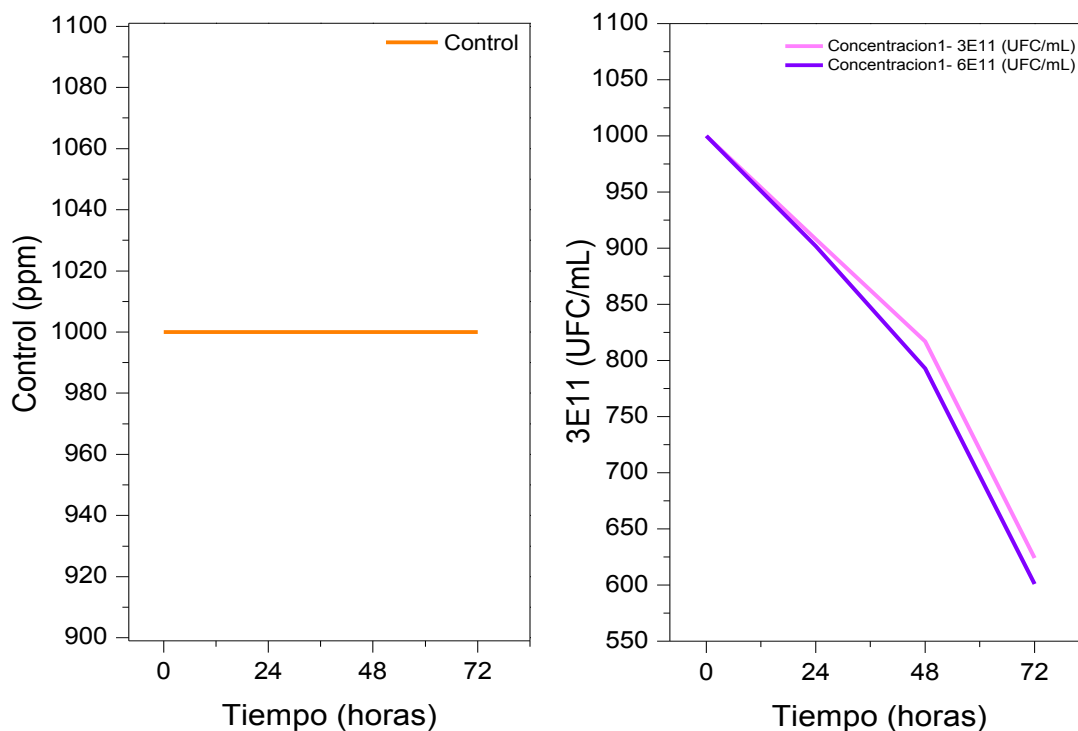


Figura 66 . (a) Control de NaCN que permaneció constante a 1000 ppm durante 72 horas. (b). Evidencia del proceso de degradación de NaCN propiciado por las dos concentraciones de *Pseudomonas fluorescens*, durante un tiempo de 72 horas.

Observando el comportamiento de los anteriores datos, se puede afirmar que, de las dos muestras que contenían los microorganismos, la que presento mayor cantidad de degradación de NaCN fue la muestra 2, que contenía $6 \cdot 10^{11}$ UFC/ml de *P. fluorescens*: partiendo con una concentración inicial de 1000 ppm de NaCN y transcurrido un periodo de 72 horas, estas bacterias redujeron la concentración a 601 ppm de NaCN. Esta información es representa en la fig 67.

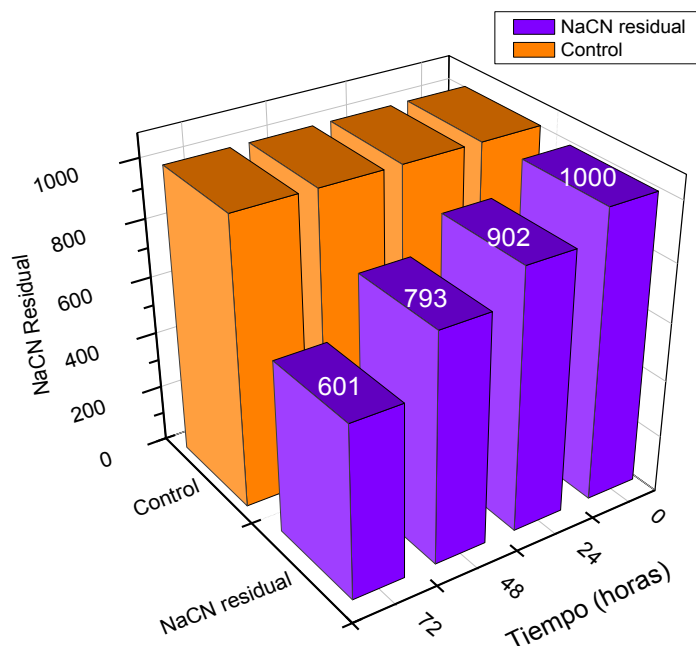


Figura 67. Concentración media residual de NaCN propiciado por $6 \cdot 10^{11}$ UFC/ml de *Pseudomonas fluorescens*, en función del tiempo, tomando una concentración inicial 1000 ppm de NaCN, en buffer carbonato, pH 10,20, para un ensayo que duro 72 horas.

Con los valores conocidos correspondientes a la concentración residual, se calculó el porcentaje de degradación de cianuro, restándole a la concentración inicial de NaCN (1000 ppm) la cantidad de NaCN residual. Los resultados correspondientes a los valores de degradación media acumulada de cianuro, se presentan en la tabla 16.

Tabla 16. Degradación media acumulada de NaCN a pH 10,20, disuelto en buffer carbonato y a temperatura ambiente ocasionada por *Pseudomonas fluorescens*

Ejecución	Concentración de Bacterias (UFC/mL)	Tiempo degradación (horas)	Absorbancia de solución cianurada sin bacterias	Concentración media acumulada de NaCN (ppm)	Control (ppm)	Porcentaje de degradación de NaCN
Día 0	$3,0 \times 10^{11}$	0	0.90	1000	1000	0%
Día 0	$6,0 \times 10^{11}$	0	0.90	1000	1000	0%
Día 1	$3,0 \times 10^{11}$	24,0	0.81	92	1000	9%
Día 1	$6,0 \times 10^{11}$	24,0	0.80	98	1000	10%
Día 2	$3,0 \times 10^{11}$	48,0	0.72	183	1000	18%
Día 2	$6,0 \times 10^{11}$	48,0	0.70	207	1000	21%
Día 3	$3,0 \times 10^{11}$	72,0	0.54	376	1000	38%
Día 3	$6,0 \times 10^{11}$	72,0	0.52	399	1000	40%
Día 3/replica	$3,0 \times 10^{11}$	72,0	0.53	389	1000	39%
Día 3/replica	$6,0 \times 10^{11}$	72,0	0.53	387	1000	38%

Analizando la tabla 16 se encuentra que el mayor porcentaje de biodegradación de cianuro se presentó en las muestras que contenían una concentración alta de microorganismos (muestra 2 = $6,0 \times 10^{11}$ UFC/mL). Por esta razón, en la fig 68, sólo se muestran los porcentajes correspondientes a la eliminación de contaminantes cianurados por *Pseudomonas fluorescens*.

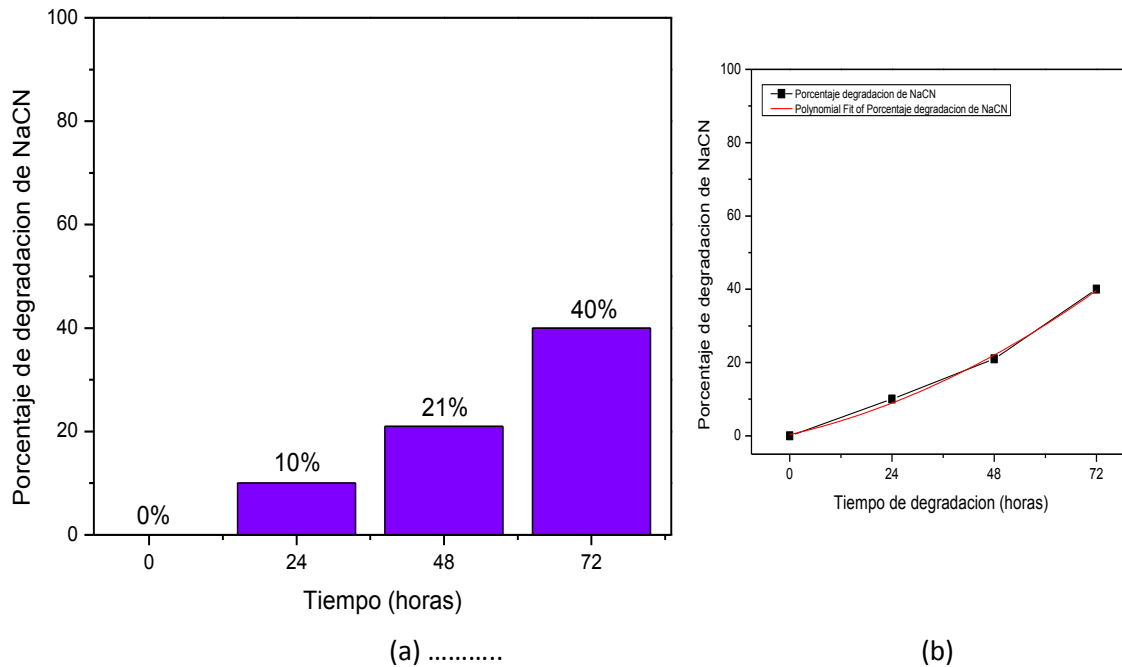


Figura 68. (a). Porcentaje de degradación de NaCN, ocasionado por una concentración de 6×10^{11} UFC/ml de *Pseudomonas fluorescens*.

En la figura 68.(a), se muestra el porcentaje de NaCN degradado por una cantidad de 6×10^{11} UFC/ml de *Pseudomonas fluorescens*, durante un periodo de 0 hasta 72 horas. Figura 68 (b).se observa la tendencia que arrojan los datos y la línea que mejor representa dicha tendencia.

NOTA. Los cálculos estadísticos y el error de este experimento se encuentran en los anexos (análisis de error en el experimento No.2).

4.3.3. EXPERIMENTO No. 3. DEGRADACIÓN DE NaCN CON *Pseudomonas mixta* (*P. aeruginosa* + *P. fluorescens*)

En el experimento No. 3 se usaron 4 tubos que contenían 25 mL de NaCN, a pH 10,20 con una concentración de 1000ppm de NaCN, y una cantidad determinada de *Pseudomonas mixta* (*P. aeruginosa* + *P. fluorescens*), dispuestos de la siguiente forma: 3 tubos más una réplica (4 tubos en total), que contenían una concentración bacteriana de $6,0 \times 10^{11}$ UFC/mL (absorbancia en la curva de calibración para *Pseudomonas* 0.6 (fig 51). El montaje para esta prueba se esquematiza en la fig 69.

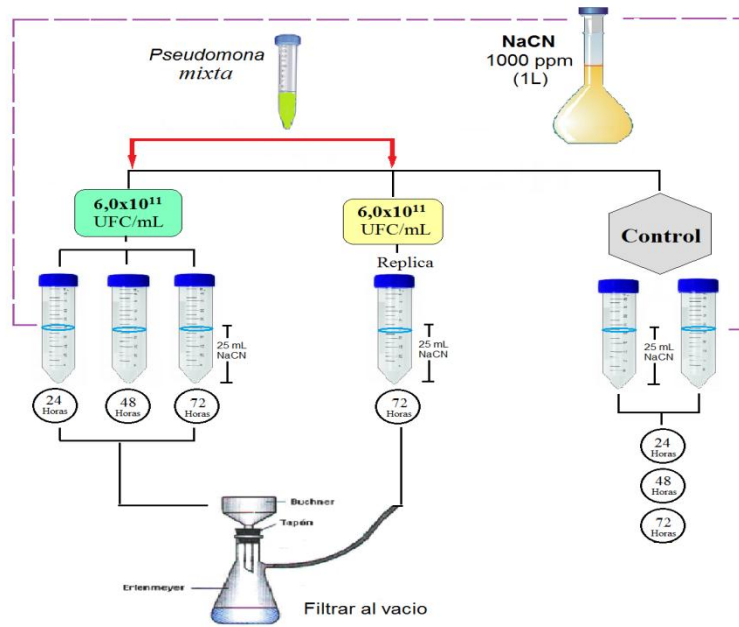


Figura 69. Montaje experimental y materiales usados para cuantificar el cianuro degradado por *Pseudomonas mixta*

Partiendo de un tiempo inicial 0, y durante el transcurso de 24, 48 y 72 horas a temperatura ambiente, (22°C), se obtuvieron los resultados que se muestran en la tabla 17.

Tabla 17. Concentración media residual de NaCN con buffer carbonato por *Pseudomonas mixta* (*P. aeruginosa*+*P. fluorescens*) a temperatura ambiente y pH 10,20.

Ejecución	Concentración de Bacterias (UFC/mL)	Tiempo degradación (horas)	Absorbancia de solución cianurada sin bacterias	Concentración residual de NaCN (ppm)	Control ppm
Día 0	$6,0 \times 10^{11}$	0	0.90	10000	1000
Día 1	$6,0 \times 10^{11}$	24,0	0,82	921	1000
Día 2	$6,0 \times 10^{11}$	48,0	0.75	849	1000
Día 3	$6,0 \times 10^{11}$	72,0	0.61	703	1000
Día 3/replica	$6,0 \times 10^{11}$	72,0	0.62	710	1000

Con los datos de la tabla.17, se graficaron los valores correspondientes a la concentración residual de NaCN en función del tiempo durante el cual se efectuó dicho proceso de biodegradación, es decir 0, 24,48 y 72 horas.

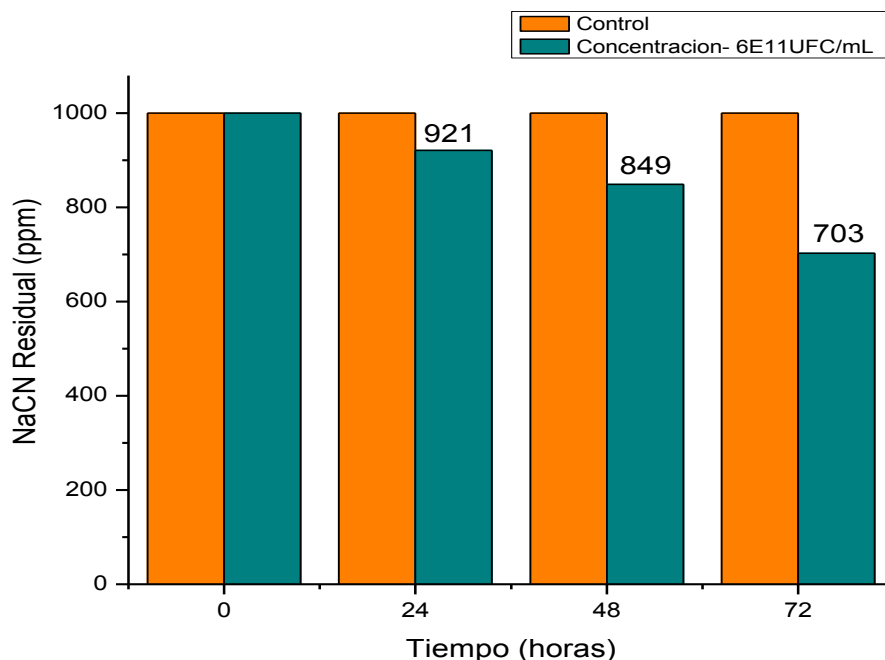


Figura 70 . Concentración media residual de NaCN por *Pseudomonas mixta*, transcurridas 72 horas.

En la fig 70, se observa que en el tiempo inicial “0”, tanto el control de NaCN como las muestras cianuradas que contenían una concentración bacteriana de $6 \cdot 10^{11}$ UFC/mL de *Pseudomonas mixta*, estaban a una concentración inicial de 1000 ppm de NaCN. Transcurridas 24 horas, el control continuo en 1000 ppm de NaCN mientras que la muestra con microorganismos presentó 921 ppm de NaCN residual. Pasadas las 48 horas, el control permaneció constante en 1000 ppm, mientras que la muestra presentó una concentración residual de 849 ppm de NaCN..

Finalmente y transcurridas 72 horas, el control continuó estable en las 1000 ppm de NaCN, concentración inicial, mientras que la muestras donde actuaron los microorganismos sólo contenían 703 ppm de NaCN residual. Este comportamiento se representa en fig 71.

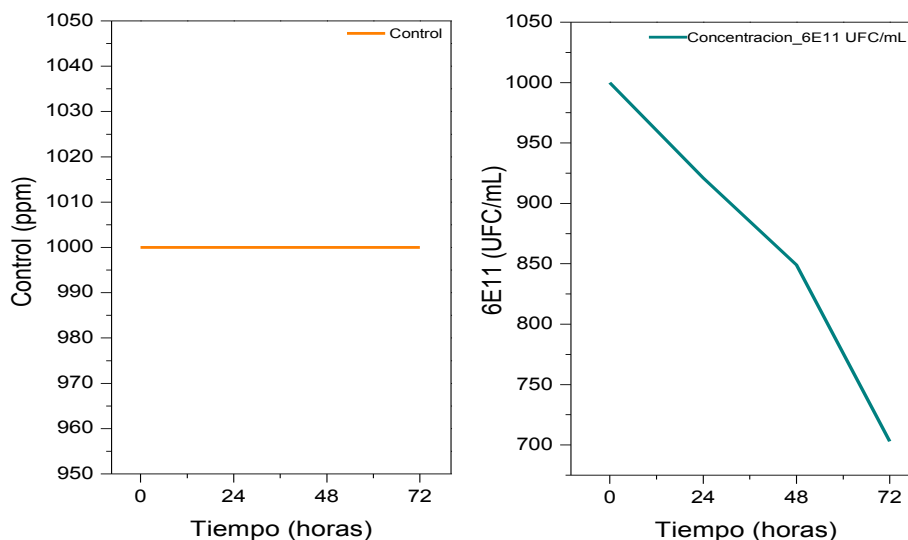


Figura 71. (a) Comportamiento del control de NaCN que permaneció constante a 1000 ppm durante 72 horas (b). Evidencia del proceso de degradación de NaCN propiciado por *Pseudomonas mixta*, considerando un tiempo de 72 horas de duración del ensayo.

En la fig 71 (a) se observa que el control permaneció constante, a 1000 ppm de NaCN, durante las 72 horas que duró el experimento. En la fig 71 (b) se observa el proceso de biodegradación de cianuro propiciado por *Pseudomonas mixta*. Transcurrido un periodo de 72 horas, estas bacterias reducen la concentración de cianuro de 1000 ppm a 601 pp. Esta información se representa en la fig 72.

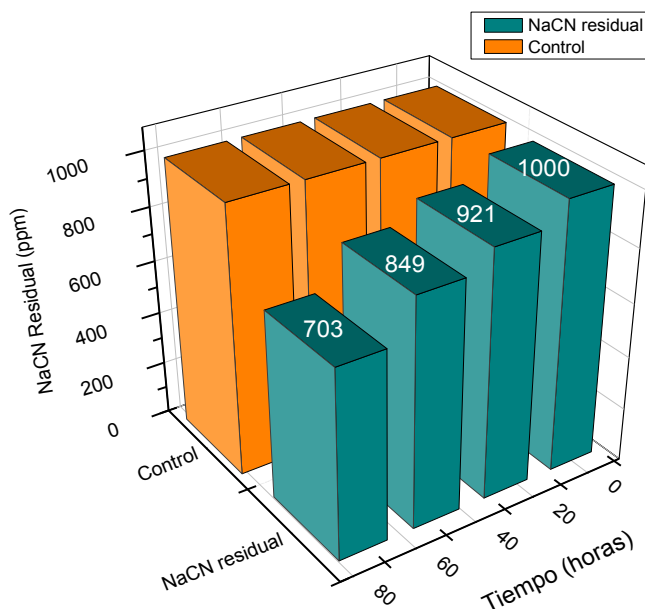


Figura 72. Concentración media residual de NaCN, ocasionada por $6 \cdot 10^{11}$ UFC/ml de *Pseudomonas mixta*, partiendo de una concentración inicial de 1000 ppm de NaCN, en buffer carbonato y pH 10,20, durante un periodo de 72 horas

Con los valores correspondientes a la concentración residual (tabla 17), se calculó el porcentaje de degradación de contaminantes cianurados, para lo cual se le restó a la concentración inicial de NaCN (1000ppm) el valor del NaCN residual. Los resultados se presentan en la tabla 18.

Tabla 18. Degradación media acumulada de NaCN con buffer carbonato propiciada por *Pseudomonas mixta* (*P. aeruginosa*+*P. fluorescens*) a temperatura ambiente y pH 10,20

Ejecución	Concentración de Bacterias (UFC/mL)	Tiempo degradación (horas)	Absorbancia de solución cianurada sin bacterias	Concentración media acumulada de NaCN (ppm)	Control ppm	Porcentaje de degradación de NaCN
Día 0	$6,0 \times 10^{11}$	0	0.90	1000	1000	0%
Día 1	$6,0 \times 10^{11}$	24,0	0,82	79	1000	8%
Día 2	$6,0 \times 10^{11}$	48,0	0.75	151	1000	15%
Día 3	$6,0 \times 10^{11}$	72,0	0.61	297	1000	30%
Día 3/replica	$6,0 \times 10^{11}$	72,0	0.62	290	1000	29%

Tomando como referencia los datos expuestos en la tabla 18, se elabora la fig 73, en la cual se determinó en porcentaje de biodegradación de NaCN propiciado por una concentración de 6×10^{11} UFC/mL de un cultivo mixto de *Pseudomonas*

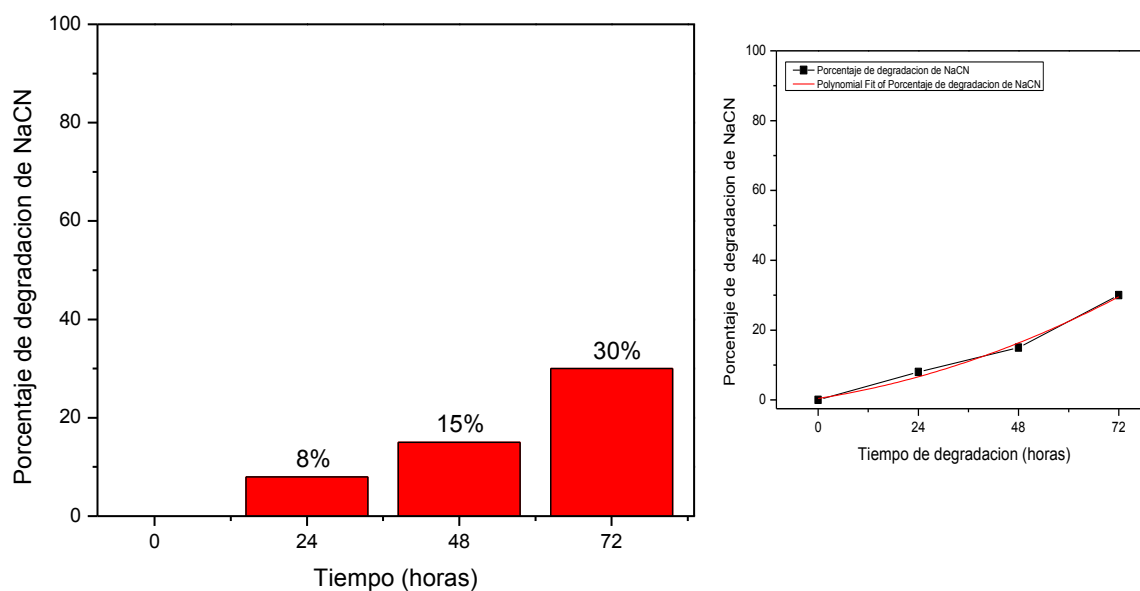


Figura 73. Porcentaje de degradación de NaCN, realizado por una concentración de 6×10^{11} UFC/ml de *Pseudomonas mixta*.

En la fig. 73(a) se presenta el porcentaje de NaCN que se eliminó usando una cantidad de 6×10^{11} UFC/ml de *Pseudomonas mixta*, durante un periodo de 72 horas. fig.73(b) se

observa la tendencia que arrojan los datos de porcentaje de degradación de cianuro en función del tiempo y la línea que mejor representa dicho comportamiento.

NOTA. Los cálculos estadísticos y el error de este experimento se encuentran en los anexos (análisis de error en el experimento No.3).

4.4. DISCUSION DE RESULTADOS

En la etapa de crecimiento de *Pseudomonas*, se usó caldo nutritivo y agar nutritivo, medios poco exigentes en requerimientos nutricionales, con el fin de observar si los microorganismos crecían adecuadamente y conservaban sus características primordiales en ambientes no selectivos, con pluripeptona como la única fuente de carbono y nitrógeno para el desarrollo bacteriano. El agar nutritivo, también, es idóneo para los requerimientos experimentales, debido a que no ocasiona coloración en los cultivos, especialmente en el de *Pseudomonas fluorescens*, lo que favoreció el desarrollo de las pruebas de identificación sin arrojar falsos positivos.

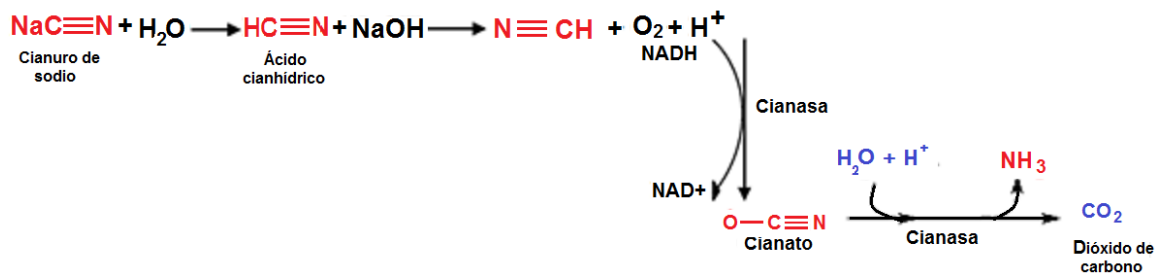
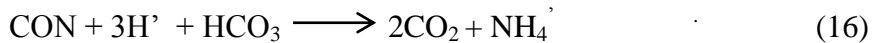
La tinción de Gram, la prueba de oxidasa y el API 20E, confirmaron que las cepas que se utilizaron en este experimento, pertenecieron al género de *Pseudomonas aeruginosa* y *fluorescens*. Bajo el diseño factorial multinivel, se realizaron las mediciones mostradas en el Experimento No. 1, donde se observa que la mayor cantidad de NaCN fue biodegradado agregándole una concentración de $6,0 \times 10^{11}$ UFC/mL de *Pseudomonas aeruginosa*, pH10.20, temperatura ambiente y durante un periodo de 72 horas (3 días) (ver tabla 13). Partiendo de una concentración inicial de 1000 ppm de NaCN y transcurridas 72 horas, se encontró que la cantidad de cianuro residual era de 165 ppm, lo que indicaba que estas bacterias habían biodegradado 835 ppm de NaCN, equivalente al 84% representativo (ver tabla 14.). Este porcentaje de remoción de contaminantes cianurados es bastante representativo, considerando que el tiempo que actuaron las bacterias, para degradar más de la mitad del cianuro de sodio, fue de tres días; además, los requerimientos nutricionales fueron mínimos y se trabajó a una temperatura ambiente. Por otro lado con una concentración menor de $3,0 \times 10^{11}$ UFC/mL de la misma cepa, se obtuvo una remoción menor, de 682 ppm de NaCN equivalente al 68%, transcurridos los tres días y partiendo de la misma concentración inicial de NaCN.

En el Experimento No. 2, realizado con cepas de *Pseudomonas fluorescens*, se observó que la mayor eliminación de NaCN se presentó cuando se usó una concentración mayor de estos microorganismos ($6,0 \times 10^{11}$ UFC/mL), durante 72 horas y bajo las mismas condiciones de pH y temperatura que se emplearon anteriormente. En la tabla 15 se aprecia que, partiendo de 1000 ppm de NaCN y transcurridos tres días, esa cantidad inicial de

cianuro se redujo a 601 ppm, indicando que se eliminaron 399 ppm de NaCN, equivalente al 40 % de remoción. Esta cantidad es casi dos veces menor si se compara con el porcentaje de remoción de cianuro realizado bajo condiciones similares con la cepa de *P. aeruginosa*, expuesto en el experimento No.1. Con una concentración baja de los mismos microorganismos ($3,0 \times 10^{11}$ UFC/mL) se obtuvo un porcentaje de eliminación de NaCN del 38%.

Por otro lado el Experimento No.3, se utilizó un cultivo mixto de *Pseudomonas* (*Pseudomonas aeruginosa* y *fluorescens*) tal que con la concentración más alta de bacterias, $6,0 \times 10^{11}$ UFC/mL, se observó que transcurridos tres días se presentó un porcentaje de remoción de NaCN del 30%, inferior a los porcentajes que se obtuvieron con cada una de las cepas por separado.

Las *Pseudomonas* son microorganismos capaces de tolerar cianato (compuesto que resulta de la oxidación del cianuro producido como consecuencia de actividades industriales) [18] y usarlo como fuente de nitrógeno debido a la capacidad que tienen estos microorganismos de inducir la enzima cianasa, la cual cataliza la relación entre el cianato y bicarbonato para producir pequeñas cantidades de amonio y dióxido de carbono, como se observa en la ecuación 16 descrita a continuación [19]. Esta actividad enzimática inducible la presentan diferentes especies de cianobacterias y algunas plantas [64].




Para realizar su proceso de crecimiento, las *Pseudomonas* necesitan macronutrientes principales, como C,N,P,H,O,S, K y Mg y teniendo en cuenta que el caldo nutritivo , medio en el que crecieron las bacterias, tiene pluripeptona, que es la fuente de carbono y nitrógeno, pero en una muy pequeña cantidad. Al agregar 1 mL de la suspensión bacteriana, a la solución de 25 mL de NaCN, las *Pseudomonas* tomarían una gran cantidad de C y N del sistema, que provendrían del cianuro (CN⁻), por lo que tolerarían y resistirían la existencia de una gran cantidad de este compuesto. Teniendo en cuenta que el compuesto NaCN contiene 2 de los elementos esenciales para el crecimiento bacteriano, C y N, es posible que las bacterias tomaron estos elementos del cianuro, para lo cual partirían la molécula en 2, con el fin de utilizarlos como fuente de alimentación. El C y N actúan como macronutrientes principales, el Carbono es usado por la célula como fuente de energía y el

Nitrógeno es empleado por estos microorganismos en síntesis de aminoácidos, proteínas, hidratos de carbono y otras sustancias.

En los días 1, 2, 3 del ensayo, se presentó un gran porcentaje de biodegradación de NaCN por las tres cepas, debido a que el cianuro que proviene de las formas NaCN, KCN se degrada en un periodo de tiempo más corto que los compuestos cianurados, los cuales contienen complejos metálicos como el ferrocianuro de potasio ($C_6N_6FeK_3$), que presenta una estructura y apilamiento simétrico de los átomos que conforman los complejos metálicos.

Otro motivo por el cual la biodegradación de cianuro de sodio fue más rápida dentro de los 3 primeros días, tendiendo posteriormente a estabilizarse un poco, fue debido al aumento de la concentración de amonio que sería tomado por el microorganismo como fuente de nitrógeno, dejando de lado el cianuro de sodio para cuando la concentración de amonio se reduzca.

La *Pseudomonas* presentó una versatilidad metabólica muy grande, la cual se viró reflejada en su capacidad de utilizar como fuente de carbono substratos muy variados. Existen especies, como *Pseudomonas cepacia*, que pueden utilizar como nutrientes más de 100 compuestos químicos diferentes, como lo reporta Joan M. Richards. Estas características hacen de estas bacterias organismos promisorios en el ámbito de la biotecnología. La versatilidad metabólica del grupo se debe a la presencia de un gran número de plásmidos que contienen operones inducibles para la síntesis de enzimas específicas que catabolizan los compuestos presentes en el medio cianurado. Esto confiere una importancia grande a las bacterias del género *Pseudomonas* como digestores aerobios de materiales animales y vegetales, lo que contribuye al reciclaje biológico de materia orgánica.



**Propuesta Para
Biodegradación de
Cianuro de sodio
(NaCN)**

Capítulo IV

Con el objetivo de desarrollar a escala industrial un proceso para biorremediación de aguas residuales cianuradas, provenientes del proceso minero de lixiviación de oro, se llevaron a cabo tres experimentos para determinar el porcentaje de eliminación de NaCN en muestras de agua que contenían 1000 ppm de NaCN a pH alcalino. Transcurridos tres días del ensayo se obtuvieron porcentajes de eliminación del 84% ,40% y 30% usando cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, *fluorescesn* y un cultivo mixto (*P. aeruginosa* + *P. fluorescens*) respectivamente, los resultados, más específicos, de estos ensayos se indicaron en los capítulos anteriores de este documento.

4.1. PLANTA BIOLÓGICA PARA EL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES

Considerando los resultados expuestos anteriormente y teniendo en cuenta que el porcentaje de eliminación de NaCN de las aguas contaminadas fue altamente eficiente, especialmente cuando se usaron bacterias pertenecientes al género de *Pseudomonas aeruginosa* (84% de eliminación de NaCN en tres días), se propone incorporar estos microorganismos en el diseño de un birreactor y una planta de tratamiento de aguas residuales provenientes de la industria del oro y que se encuentran altamente contaminadas con cianuro. En el diseño del birreactor (fig 74) se plantea usar tecnologías verdes y energías renovables para descontaminar el agua residual, sin que ello implique generación de contaminantes peligrosos, sobrecostos o efectos negativos en el medio ambiente y fuentes hídricas.

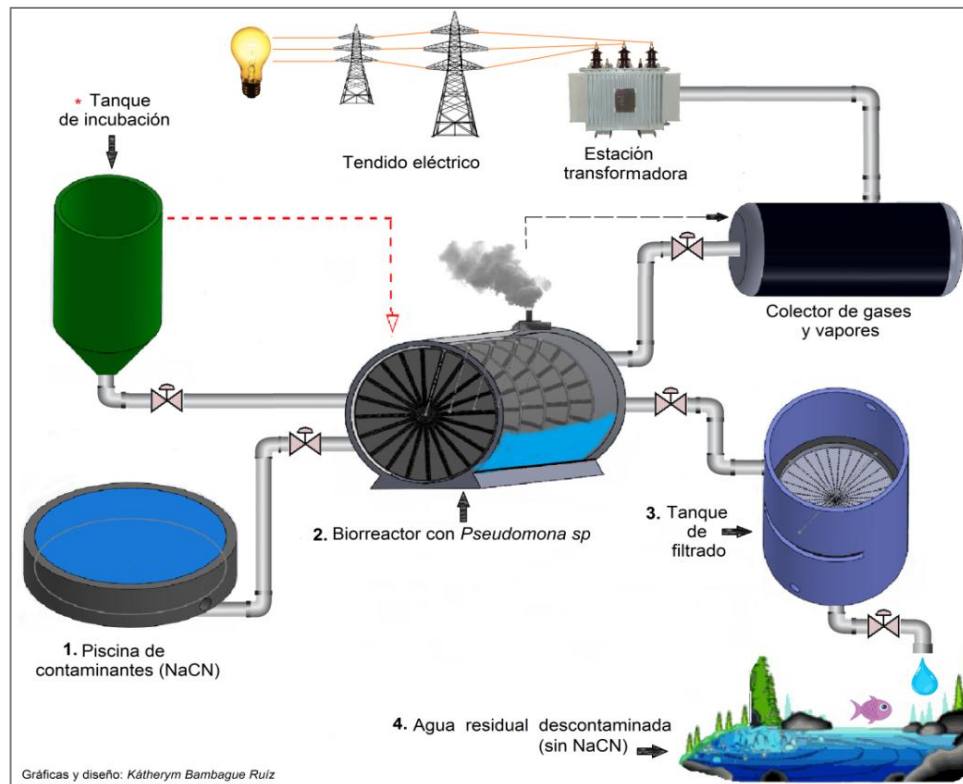


Figura 74. Diseño de una Planta Biológica Para El Tratamiento de Aguas Residuales, con sus respectivas etapas.

La Planta Biológica para el tratamiento de aguas residuales indicada en la fig 74, consta de 5 elementos primordiales, además de un colector de gases y vapores. Posteriormente se ensamblarían cada uno de los componentes para estructurar una planta biológica para el tratamiento de aguas residuales. La operación y diseño de esta plata de tratamiento se considera como una estrategia biotecnológica que cumpliría con requerimientos de eficiencia, economía y amigable con el medio ambiente, tal como se planteó al inicio de este proyecto investigativo.

A continuación se realiza una descripción de las diferentes partes de la planta de tratamiento de aguas residuales de proceso aurífero.

4.1.1. Tanque de Incubación

La primera etapa del diseño, consta de un tanque de incubación en el cual se encuentran las cepas de *Pseudomonas* (se sugiere *P. aeruginosa*) que van a estar a una agitación constante de ω : 200 rpm/min y a una temperatura ambiente o máximo 37 °C. En el tanque se incubaran los microorganismos que posteriormente y en una descarga inicial, mediante una tubería, pasarían al birreactor. En la fig 75 se observa el diseño del tanque de incubación realizada en el software SolidWorks. Por requerimientos de operación, se propone que el tanque tenga un modelo cilíndrico con terminación cónica, considerando que se asienta gran cantidad de flora microbiana en el vértice del cono. Las condiciones mencionadas serían óptimas para el crecimiento bacteriano.

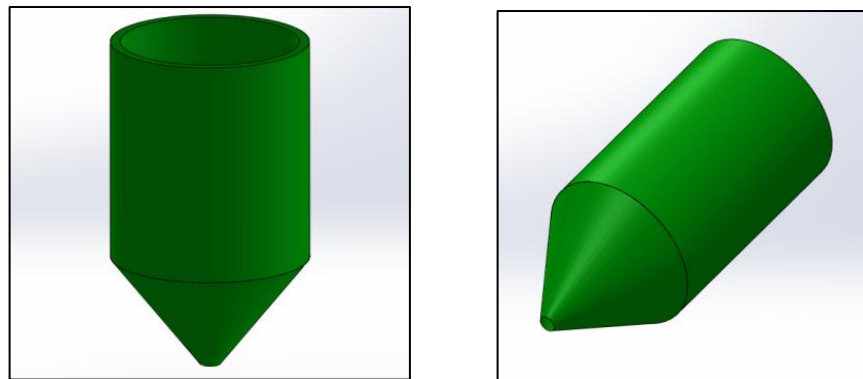


Figura 75. Tanque de incubación de *Pseudomonas*

4.1.2. Biodiscos

Los contactores biológicos rotatorios (Rotating Biological Contactors, con siglas RBCs) o también llamados biodiscos, son la base en el diseño del biorreactor, ya que este estaría constituido por 5 de ellos. Los biodiscos consisten en un disco, o una serie de discos, montados sobre un eje horizontal, espaciados entre sí que giran a una velocidad angular

constante. Su principio de funcionamiento se basa en aprovechar la adhesión bacteriana y en este caso específico, la adhesión de las *Pseudomonas* al plástico de los biodiscos. Por debajo de 50 nm no es posible que exista interacción ente la superficie sólida (plástico) y el microorganismo pero cuando la bacteria se acerca y se disminuye esta distancia, inmediatamente se presenta una atracción debido a las fuerzas de Van der Waals (F_a). Teniendo en cuenta estos aspectos, las bacterias se adherían a los discos de plástico y seguidamente se generaría un crecimiento biológico, conformándose una especie de biopelícula en la superficie de los discos. También se aprovechan los propulsores del movimiento o flagelos, que presentan los microorganismos, los cuales permiten desplazarse con mayor facilidad sobre el fluido a descontaminar. A medida que el disco rota, las bacterias se van alternando entre el agua cianurada y el aire. Con este diseño, los discos proverían de un soporte para el crecimiento microbiano y un contacto alternado de las *Pseudomonas* con los contaminantes cianurados del agua y con el aire. Este contacto alternado depende de la velocidad de rotación del disco, la cual controla la intensidad de contacto entre las bacterias degradadoras y el agua residual contaminada con NaCN. En la fig 76, parte (a) se expone el modelo de un biodisco, que presenta hendiduras y alto relieve para mayor adherencia de las bacterias. En la fig 76 (b) se ejemplifica el contacto del biodisco con el agua cianurada y el crecimiento bacteriano, o biopelícula, que se forma en la superficie del mismo, debido a la propiedad que presentan estas bacterias de producir una capa mucoide.

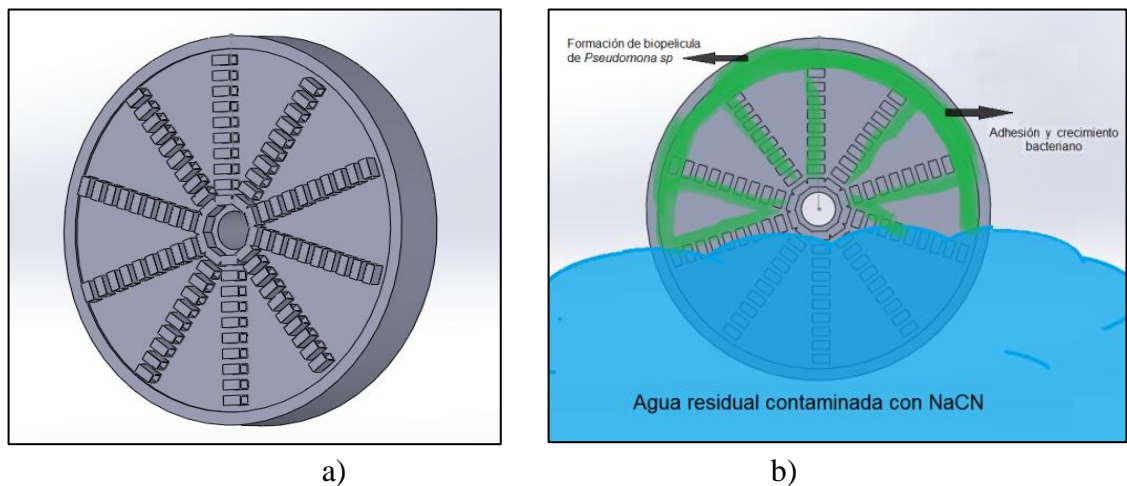


Figura 76. a). Vista lateral izquierda del diseño un biodisco. b) vista frontal de la dinámica de funcionamiento del biodisco y formación de biopelícula de *Pseudomonas* (color verde).

Los biodisco que se muestran en la fig.76, deben estar dispuestos perpendicularmente a la dirección de flujo, ser fabricados con material de plástico (polietileno de alta densidad) y estar unidos por un eje perpendicular a la dirección de flujo, de aproximadamente 8,30 m

de longitud. Su movimiento debe estar acoplado, tal que cada uno gire a una velocidad angular constante de $\omega = 0,5 \text{ rpm/min}$.

4.1.3. Biorreactor

En el biorreactor se realizaría el proceso de descontaminación del agua residual que contiene cianuro ya que dentro de él, se encuentran los biodiscos que al entrar en contacto con el agua contaminada generarían un ambiente biológicamente activo de *Pseudomonas* y daría comienzo al proceso de degradación del NaCN presente en el agua residual.

Al fluido cianurado que ingresa, se debe someter previamente al proceso de separación de sólidos y sedimentos. En la fig 77 se presenta el modelo completo del biorreactor, con los cinco discos acoplados y su cubierta protectora, para evitar problemas derivados de contaminación.

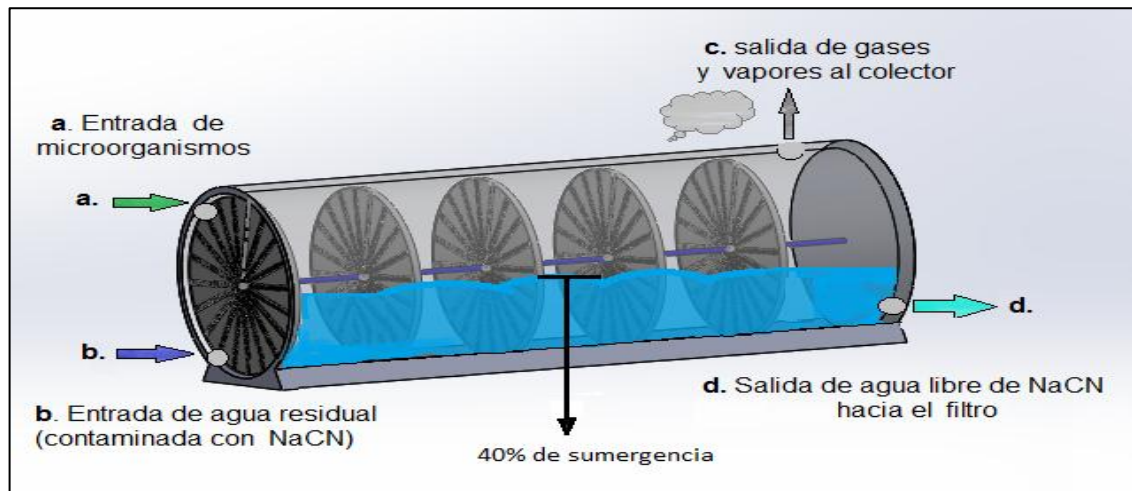


Figura 77. Diseño de un Biorreactor para eliminar NaCN de aguas residuales que se generan durante el proceso de extracción de oro.

En el diseño del biorreactor que se presenta en la fig.77, se consideran, como elementos fundamentales, los 5 biodiscos acoplados, 2 entradas de fluido y 2 salidas. La primera entrada comunica al biorreactor con el tanque de incubación de donde se transporta una descarga inicial de microorganismos hacia los biodiscos para formar la biopelícula. La segunda entrada de fluido estaría en contacto con la piscina de contaminantes cianurados, desde la cual y mediante tubería se transportaría el agua a descontaminar. El caudal de entrada Q dependerá del área de la sección transversal de la tubería (A), y la velocidad (V) con la que el fluido se desplaza por la misma $Q = AV$. El flujo de agua debe ser constante, sin exceder el 40% de sumergencia (altura de líquido, necesaria), tal que para que los discos puedan efectuar, sin contratiempo, su movimiento circular uniforme. Para efectos de la

operación del biorreactor, se hace necesario considerar una inyección de aire dentro del biorreactor, teniendo en cuenta que los microorganismos empleados en este proceso son aerobios, y otra consideración importante es el tiempo de retención hidráulica (TRH) o tiempo de permanencia del agua cianurada dentro del reactor biológico, ya que después de este tiempo, se abriría una válvula y el agua descontaminada, junto con los microorganismos, pasarían a un tercer tanque, denominado Tanque de filtrado.

4.1.4. Colector de Gases y Vapores

A este dispositivo llegarían los gases que se generan en el biorreactor, durante el proceso de biodegradación del NaCN, llevado a cabo por *Pseudomonas* (*P. aeruginosa*, *P. fluorescens* y un cultivo mixto de ellas). Se aprovecharían nitritos, sulfatos y el biogás que se generaría por digestión microbiana durante el proceso.

Los gases y vapores colectados pasan a una estación transformadora donde estos se utilizan para la obtención de energía eléctrica. En la fig. 78, se observa el diseño en SolidWorks de un cilindro colector de gases y vapores (CCGV).

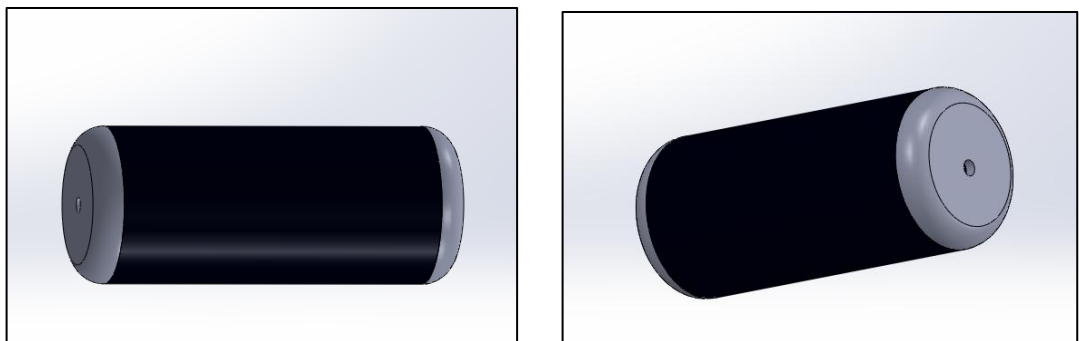


Figura 78. Vista frontal y lateral de un cilindro colector de gases y vapores orgánicos.

Una vez los gases son transformados en energía eléctrica, ésta se distribuye a través de un tendido eléctrico, y quedaría lista para ser empleada; se sugiere que se utilice para el alumbrado de la planta biológica dispuesta para el tratamiento de aguas residuales.

4.1.5. Tanque de Filtrado

Al tanque de filtrado llegaría el agua con un porcentaje bajo de NaCN, junto con los microorganismos que se emplearon en su degradación. Teniendo en cuenta esta condición, al tanque de filtrado se le debe incorporar un tamiz, o una membrana de filtrado, que presente un poro de $0,45 \mu\text{m}$, para que filtre las *Pseudomonas*, considerando que estas bacterias tienen un tamaño mínimo de $0,58 \mu\text{m}$. En la fig 79 se muestra el diseño realizado,

en SolidWorks, que se propone para el tanque de filtrado de los microorganismos, incluyendo un tamiz.

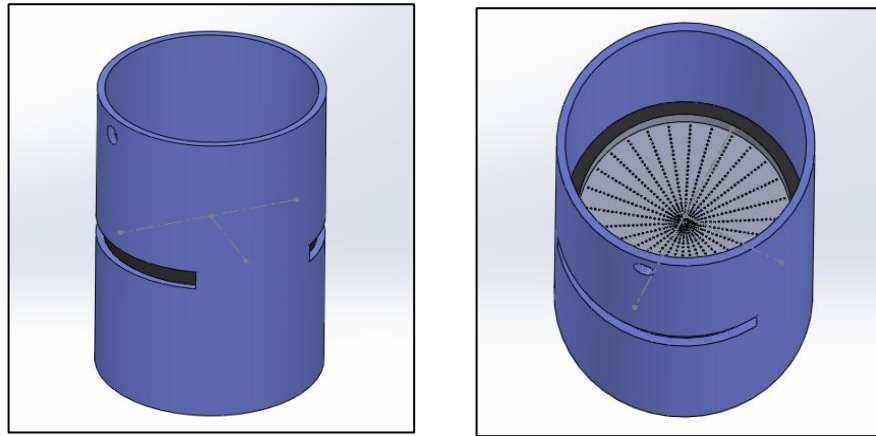


Figura 79. Tanque de filtrado bacteriano acoplado con una membrana o tamiz.

Una vez separados los microorganismos del agua que tiene bajos niveles de NaCN, se realizarían controles y pruebas químicas, para verificar que, antes de verterla al medio ambiente, esta agua residual presente una concentración menor al límite permitido por entidades ambientales reguladoras, que actualmente es de 0.2 ppm de NaCN.



Conclusiones

Capítulo V

- 1) Las pruebas de identificación realizadas a las *Pseudomonas* mostraron bacilos Gram negativos, se constató que los microorganismos son aerobios y el perfil analítico presentó un porcentaje del 70% y 72% de compatibilidad con una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* y *P. fluorescens*, respectivamente.
- 2) Para realizar una adecuada preservación (criopreservación) bacteriana se utilizaron las siguientes condiciones: mantener vivos los microorganismos durante largos periodos de tiempo, alta pureza en el cultivo a preservar; bajos factores de contaminación, estabilidad genética y garantizar que más del 70% de los microorganismos sobrevivan. Estas condiciones certificaron la posibilidad de contar con las cepas (no contaminadas) durante la ejecución de las pruebas donde se cuantificó la degradación de NaCN.
- 3) La degradación óptima de cianuro por $6,0 \times 10^{11}$ UFC/mL de *P. aeruginosa* y *P. fluorescens*, se dio bajo condiciones de pH 10.20; temperatura ambiente y amortiguador de buffer carbonato. Todo ello a una concentración inicial de 1000 ppm de NaCN, lo que indica que estas bacterias se ajustan a las condiciones requeridas para ser empleadas en biorremediación de aguas residuales contaminadas con cianuro.
- 4) Los resultados indican que el mayor porcentaje de eficiencia de remoción de contaminantes cianurados se obtuvo con un cepa de *Pseudomonas aeruginosa*, con un porcentaje de eliminación del 84% de cianuro (165 ppm de cianuro residual), seguido de la cepa de *Pseudomonas fluorescens* con un 40% (609 ppm de cianuro residual), y finalmente una cepa mixta (*P. aeruginosa* y *P. fluorescens*) con el 30% (703 ppm de cianuro residual), todo esto empleando un tiempo de 72 horas (3 días) y partiendo de una concentración inicial de 1000 ppm (concentración comúnmente usada en actividades mineras de extracción de oro).
- 5) Considerando los resultados que indican que las *Pseudomonas aeruginosa* (84% de eliminación de NaCN en tres días) tiene alta eficiencia en degradación de contaminantes cianurados, usando condiciones similares a las empleadas en extracción de oro, se podría considerar su uso en el diseño de un birreactor con el fin de estructurar una planta biológica. Esta estrategia biotecnológica buscaría descontaminar aguas residuales producidas en actividades de la industria del oro y que están altamente contaminadas con cianuro.



Anexos

Análisis del Error en el Experimento No.1.

Este análisis se realiza con el programa computacional STATGRAPHICS, versión de prueba, y se realiza para las 2 concentraciones de *Pseudomonas aeruginosa* ($3,0 \times 10^{11}$ UFC/mL y $6,0 \times 10^{11}$ UFC/mL). A continuación se muestra la ficha estadística correspondiente al experimento No.1.

Nombre del archivo: DISEÑO EXPERIMENTAL 1.sfx

Tabla 19. Coeficientes de regresión para concentración de cianuro

<i>Coficiente</i>	<i>Estimado</i>
constante	1094,5
A:concentracion de bacterias	-37,8889
B:tiempo degradación	-2,60417
AB	-0,159722
BB	-0,0855035

En la tabla 19, se muestran los coeficientes de regresión que acompañan a las variables que hacen parte de la ecuación de regresión que se ha ajustado a los datos registrados en el experimento No.1 (tablas 13 y 14). La ecuación del modelo ajustado es de orden 2 y está compuesta por las siguientes variables:

(13)

Concentración de cianuro

$$\begin{aligned}
 &= 1094,5 - (37,8889)(\text{concentración de bacterias}) \\
 &\quad - (2,60417)(\text{tiempo degradación}) \\
 &\quad - (0,159722)(\text{concentración de bacterias})(\text{tiempo degradación}) \\
 &\quad - (0,0855035)(\text{tiempo degradacion}^2)
 \end{aligned}$$

En donde los valores de las variables: Concentración de cianuro, Concentración de bacterias y Tiempo degradación, están en unidades de ppm, UFC/ml y horas, respectivamente.

En la gráfica de Pareto (fig.80), se ratifican los valores presentados en la tabla 19, identificando con mayor claridad las variables que intervienen en el proceso y la interacción y dependencia entre ellas. Teniendo en cuenta principio de Pareto que nos da información de los "pocos vitales y muchos triviales", se puede apreciar que las variables vitales que tienen mayor incidencia en el proceso de biodegradación de cianuro son el

Tiempo de degradación, seguido de la Concentración de bacterias, mientras que los efectos entre las dos se consideran triviales no significantes.

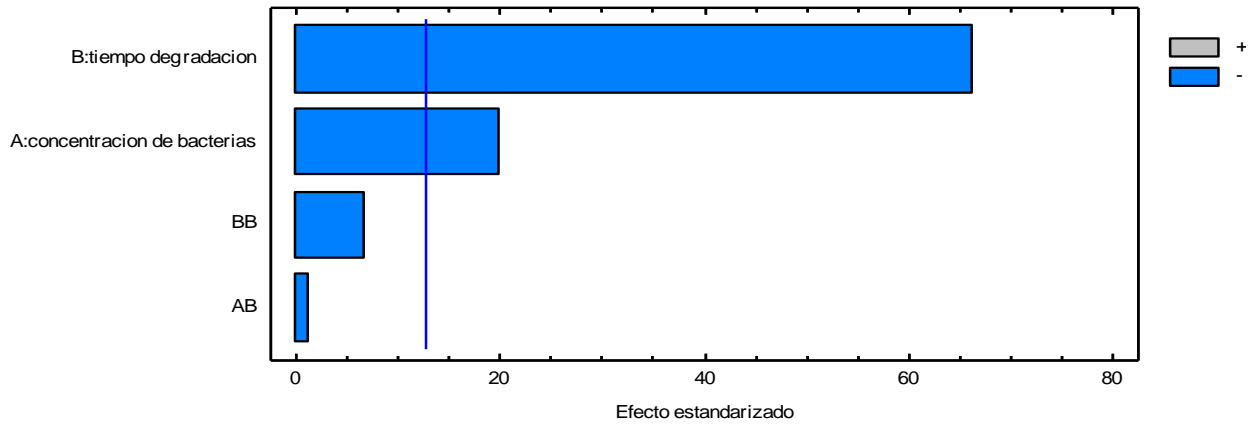


Figura 80. Diagrama de Pareto estandarizado para concentración de cianuro, considerando 4 valores.

Si se suprime la interacción entre las variables BB y AB que no presentan dependencia entre sí, como se observa en la gráfica. 101, la ecuación del modelo ajustado se reduce a la siguiente ecuación:

Concentración de cianuro

$$= 1293,17 - (45,5556)(concentración\ de\ bacterias) - (11,5312)(tiempo\ de\ degradación)$$

(14)

El Nuevo gráfico de Pareto es presentado en la fig.81, donde se observan claramente las dos variables vitales que intervienen en el proceso de degradación (tiempo de degradación y concentración de bacterias), que a su vez son independientes entre sí. Los efectos de interacción entre ellas son insignificantes, por lo cual se suprimen y el modelo pasa de ser un modelo de segundo orden a ser uno lineal, basado en la ecuación 14.

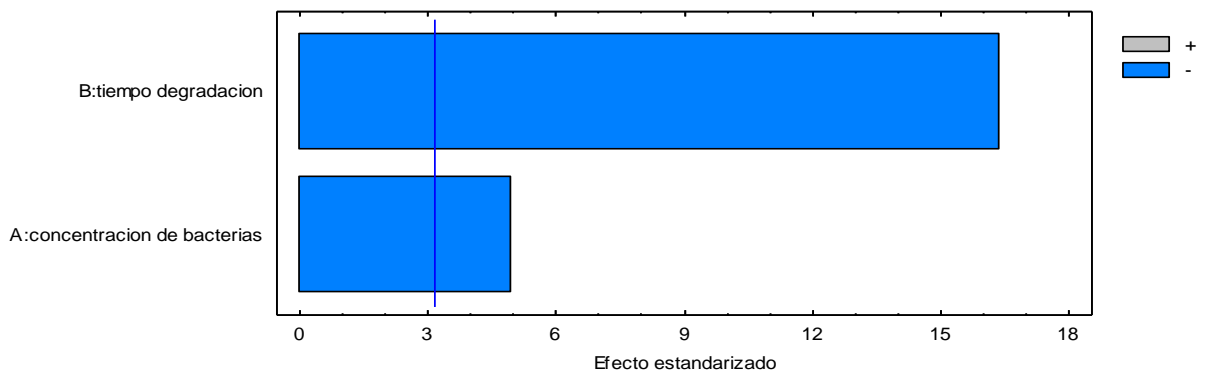


Figura 81. Diagrama de Pareto estandarizado con las variables vitales en el proceso de biodegradación de cianuro. La variable B representa el tiempo de degradación y A la concentración bacteriana.

Como se aprecia en la ecuación 18, este modelo representa un modelo lineal lo que indica que en el proceso de biodegradación del cianuro, estimado por la variable de salida la cual es la Concentración de cianuro, solo intervienen dos variables vitales que son Concentración de bacterias y tiempo degradación. Lo anterior se puede reafirmar en la fig. 82, que representa los efectos principales que intervienen en la degradación de cianuro.

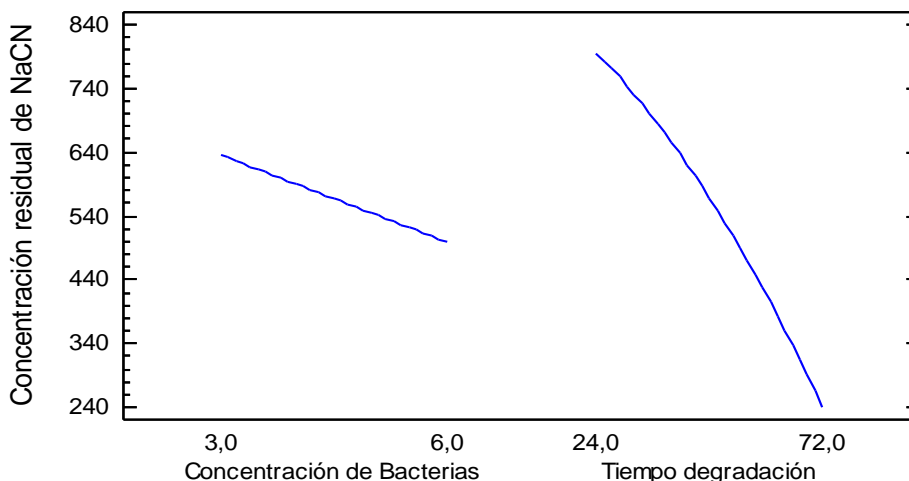


Figura 82. Efectos principales para concentración residual de NaCN

Tabla 20. Efectos estimados para Concentración residual de NaCN (ppm)

<i>Efecto</i>	<i>Estimado</i>	<i>Error Estd.</i>	<i>V.I.F.</i>
promedio	567,5	5,9196	
A:Concentración de Bacterias	-136,667	6,83537	1,0
B:Tiempo degradación	-553,5	8,37158	1,0
AB	-11,5	8,37158	1,0
BB	-98,5	14,5	1,0

Errores estándar basados en el error total.

La tabla 20, muestra las estimaciones para cada uno de los efectos estimados y las interacciones. También se muestra el error estándar de cada uno de estos efectos, el cual mide su error de muestreo. Note también que el factor de inflación de varianza (V.I.F.) más grande, es igual a 1,0. Para un diseño perfectamente ortogonal, todos los factores serían igual a 1. Factores de 10 o más normalmente se interpretan como indicativos de confusión seria entre los efectos.

Tabla 21. Análisis de Varianza para Concentración residual de NaCN

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Concentración de Bacterias	28016,7	1	28016,7	399,76	0,0318
B:Tiempo degradación	306362,	1	306362,	4371,40	0,0096
AB	132,25	1	132,25	1,89	0,4006
BB	3234,08	1	3234,08	46,15	0,0930
Error total	70,0833	1	70,0833		
Total (corr.)	337815,	5			

R-cuadrada = 99,9793 por ciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 99,8963 por ciento

Error estándar del est. = 8,37158

Error absoluto medio = 3,22222

Estadístico Durbin-Watson = 2,16667

La tabla ANOVA particiona la variabilidad de Concentración residual de NaCN en piezas separadas para cada uno de los efectos. Entonces prueba la significancia estadística de cada efecto comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental. En este caso, 2 efectos tienen un valor-P menor que 0,05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95,0%.

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo, así ajustado, explica 99,9793% de la variabilidad en Concentración residual de NaCN. El estadístico R-cuadrada ajustada, que es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes, es 99,8963%. El error estándar del estimado muestra que la desviación estándar de los residuos es 8,37158. El error medio absoluto (MAE) de 3,22222 es el valor promedio de los residuos.

1.1. Contramuestra y Análisis Realizado en el Laboratorio de Ambiental de la CRC a la Prueba que Presenta Mayor Porcentaje de Degradación de NaCN.

Se comparte un contra análisis para corroborar los datos que se obtienen en el experimento 1, el cual fue aplicado a la muestra de cianuro residual que mayor porcentaje de eliminación presenta (84% de eliminación, es decir 165 ppm de NaCN residual). Cabe señalar que esta muestra fue llevada al laboratorio de análisis ambiental de la CRC, donde expertos en el tema realizaron la correspondiente medición certificada.

Reporte N° 537



CORPORACION AUTONOMA REGIONAL DEL CAUCA
LABORATORIO AMBIENTAL

REPORTE DE RESULTADOS – MUESTRA DE AGUA

Código: FT-PDPA-LA027

Fecha: 13/02/2013

Versión: 3

Página 1 de 1

Fecha: Diciembre 23 de 2016.

Cliente: Katherym Bambague Ruiz

Solicitud N°: 366

Dirección: Moscopan apto 105, Popayán

Teléfono: 3147689608

Municipio de muestreo: Popayán

Fecha de Recepción: Diciembre 14 de 2016.

Fecha de Análisis: Diciembre 14 a diciembre 15.

Muestreo:

Plan de Muestreo N°	N/A
Fecha de Muestreo	N/A
Lugar de muestreo	N/A
Procedimiento de muestreo	N/A
Condiciones ambientales	N/A

Identificación de la muestra

Código Muestra	Sitio de Muestreo
1201	Muestra de cianuro de sodio


Resultados laboratorio:

Variable	Método	Unidad	Resultados
Cianuro	SM4500-CN ⁻ E, modificado	mg/L	116

Nota: Longitud de onda de medición: 585 nm

Observaciones:

-Los resultados que se relacionan en este informe hacen referencia únicamente a las muestras analizadas.
-Este documento no puede ser reproducido parcial o totalmente sin la debida autorización del Laboratorio Ambiental.


DIEGO ZULUAGA VERA
Responsable Laboratorio Ambiental

Camera 7 # 1N - 28 Edificio Edgar Negret Dueñas
Pbx: 8203232 fax: 092 - 8203251
Línea verde: 018000832855
www.crc.gov.co

Laboratorio Ambiental: Vivero CRC, Vereda González, Popayán Telefax: 8245602



En la cual se certifica que el contenido de CN residual de la muestra es 116 ppm, y nuestro resultado fue 165 ppm de cianuro residual, lo que teniendo en cuenta la diferencia de equipos o insumos, refleja que nuestras mediciones son bastante acertadas.

Análisis del Error en el Experimento No. 2

Este análisis se realiza con el programa computacional STATGRAPHICS, versión de prueba, y se realiza para las 2 concentraciones de *Pseudomonas fluorescens* ($3,0 \times 10^{11}$ UFC/mL y $6,0 \times 10^{11}$ UFC/mL). A continuación se muestra la ficha estadística correspondiente al experimento No.2.

Nombre del archivo: DISEÑO EXPERIMENTAL 2.sfx

Tabla 22. Coeficiente de regresión para concentración de cianuro

<i>Coficiente</i>	<i>Estimado</i>
constante	1293,17
A:concentracion de bacterias	-45,5556
B:tiempo degradación	-11,5312

En la tabla 22. Se muestran los coeficientes de regresión que acompañan a las variables que hacen parte de la ecuación de regresión que se ha ajustado a los datos registrados en el experimento No.2 (tablas 15,16). La ecuación del modelo ajustado está compuesta por los siguientes valores:

$$\begin{aligned} & \text{Concentracion de cianuro} \\ & = 1293,17 - (45,5556)(\text{concentracion de bacterias}) \\ & \quad - (11,5312)(\text{tiempo degradacion}) \end{aligned}$$

(15)

En la gráfica de Pareto (fig. 83), se ratifican los valores presentados en la tabla 22, identificando con mayor claridad las variables que intervienen en el proceso y la interacción y dependencia entre ellas. Teniendo en cuenta principio de Pareto que nos da información de los "pocos vitales y muchos triviales", se puede apreciar que las variables vitales que tienen mayor incidencia en el proceso de biodegradación de cianuro son el Tiempo de degradación, seguido de la Concentración de bacterias, mientras que los efectos entre las dos se consideran triviales no significantes, por lo cual han sido omitidos

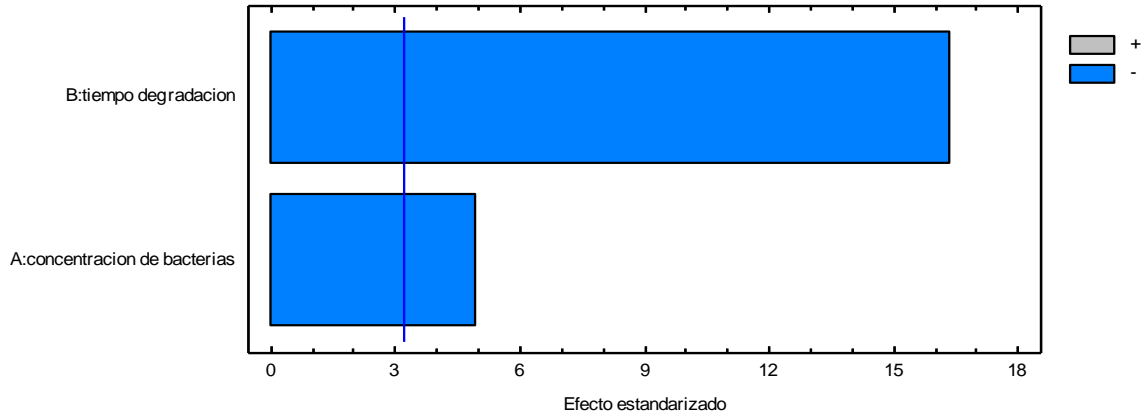


Figura 83. Diagrama de Pareto estandarizado para concentración de cianuro, con dos variables vitales.

Como se aprecia en la ecuación 15, este modelo representa un modelo lineal, lo que indica que en el proceso de biodegradación del cianuro, estimado por la variable de salida Concentración de cianuro, solo intervienen dos variables vitales que son Concentración de bacterias y tiempo degradación. Lo anterior se puede reafirmar en la fig. 84, que representa los efectos principales que intervienen en la degradación de cianuro.

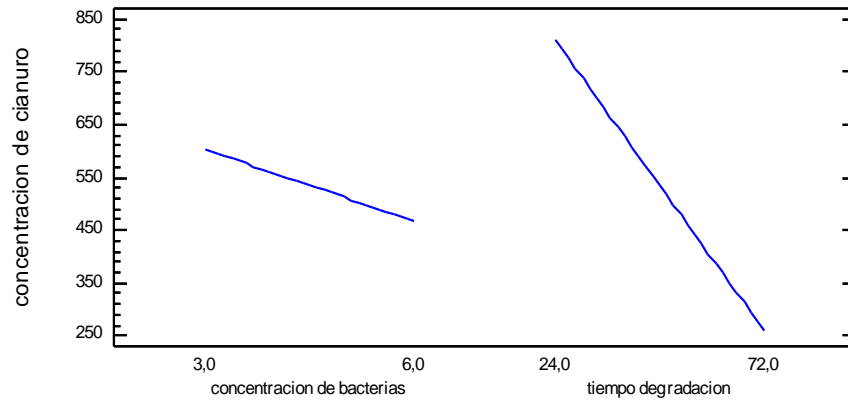


Figura 84. Efectos principales para concentración residual de NaCN

Tabla 23. Efectos estimados para Concentración residual de NaCN (ppm)

<i>Efecto</i>	<i>Estimado</i>	<i>Error Estd.</i>	<i>V.I.F.</i>
promedio	805,0	3,87836	
A:Concentración de Bacterias	-17,6667	4,47834	1,0
B:Tiempo degradación	-292,5	5,48483	1,0
AB	-8,5	5,48483	1,0
BB	-92,5	9,5	1,0

En la tabla 23, se muestran las estimaciones para cada uno de los efectos estimados y las interacciones. También se muestra el error estándar de cada uno de estos efectos, el cual mide su error de muestreo. Note también que el factor de inflación de varianza (V.I.F.) más grande, es igual a 1,0. Para un diseño perfectamente ortogonal, todos los factores serían igual a 1. Factores de 10 o más normalmente se interpretan como indicativos de confusión seria entre los efectos.

Tabla 24. Análisis de Varianza para Concentración residual de NaCN

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Concentración de Bacterias	468,167	1	468,167	15,56	0,1580
B:Tiempo degradación	85556,3	1	85556,3	2843,98	0,0119
AB	72,25	1	72,25	2,40	0,3648
BB	2852,08	1	2852,08	94,81	0,0652
Error total	30,0833	1	30,0833		
Total (corr.)	88978,8	5			

R-cuadrada = 99,9662 por ciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 99,831 por ciento

Error estándar del est. = 5,48483

Error absoluto medio = 2,11111

Estadístico Durbin-Watson = 2,16667

La tabla ANOVA particiona la variabilidad de Concentración residual de NaCN en piezas separadas para cada uno de los efectos. Entonces prueba la significancia estadística de cada efecto comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental. En este caso, 1 efectos tienen una valor-P menor que 0,05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95,0%.

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo, así ajustado, explica 99,9662% de la variabilidad en Concentración residual de NaCN. El estadístico R-cuadrada ajustada, que es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes, es 99,831%. El error estándar del estimado muestra que la desviación estándar de los residuos es 5,48483. El error medio absoluto (MAE) de 2,11111 es el valor promedio de los residuos. El estadístico de Durbin-Watson (DW) prueba los residuos para determinar si haya alguna correlación significativa basada en el orden en que se presentan los datos en el archivo



Bibliografía

- [1] M. Cabrera, J. Espitia, G. Rudas, L. Pardo, J. Fierro, F. Vargas, and N. Rodrigo, “Minería en Colombia. Fundamentos para superar el modelo extractivista,” *Contraloría General de la República*. p. 211, 2013.
- [2] C. Espitia, P. J. Munar, A. de la H. Ruiz, and L. F. Sánchez, “Impacto de la minería de hecho en Colombia. Estudios de caso: Quibdó, Isrnina, Timbiquí, López de Micay, Guapi, El Charco y Santa Bárbara,” *Instituto De Estudios para el Desarrollo y la Paz - INDEPAZ*. 2013.
- [3] A. C. Buanaventura and D. Trujillo, ““ historia doble del cauca ,”” Universidad Icesi, Cali, 2011.
- [4] D. Departamento Administrativo Nacional De Estadística, “Norte del cauca,” in *Censo general ,Republica de Colombia*, 2005.
- [5] Mark J. Logsdon, K. Hagelstein, and T. I. Mudder, *The Management of Cyanide in Gold Extraction*. International Council on Metals and the Environment — ICME, 2001.
- [6] E. Enriquez, “Manual de Minería.” Estudios Mineros Del Perú S.A.C., 2013.
- [7] G. Industry, *Use of Cyanide in the Gold Industry*. Código Internacional para el Manejo del Cianuro en la Minería del Oro.
- [8] L. A. Producción and D. E. L. Oro, “La producción del oro.” Centro de Información Mina de Yanacocha, Cajamarca, Perú, 2006.
- [9] P. Processes, *Cyanide Waste*. Biotreatment of Industrial Effluents, 2003.
- [10] L. A. Pacheco and M. del C. Durán, *Uso del agua en la industria minera. Parte 2: Estudio de opciones para reciclar el agua de proceso*, vol. 22. Monterrey, México.: Instituto Mexicano de Ingenieros Químicos A.C, 2007.
- [11] C. Heck, J. Tranca, and C. Ipenza, *La realidad de la minería ilegal en países amazónicos*. Lima,Perú: Skoll Foundation, Sociedad Peruana de Derecho Ambiental, 2014.
- [12] F. N. Polo, V. S. Ariño, and D. D. L. Juvinao, “Impactos Ambientales De La Minería En Colombia,” Universidad De La Guajira, 2011.
- [13] Á. G. García, “Evaluación de la contaminación por vertimiento de mercurio en la zona minera, Pacarní - San Luis departamento del Huila,” vol. 12, pp. 91–98, 2013.
- [14] Contraloría General de la República, “Informe del Estado de los Recursos Naturales,” pp. 33– 54–62, 2012.
- [15] T. Mudder and M. Botz, “Cyanide and society: a critical review,” *Eur. J. Miner. Process. Environ. Prot. Environ. Prot.*, vol. 4, no. 1, pp. 62–74, 2004.
- [16] Ministerio De Minas Y Energía, *Producción más limpia en la minería del oro en colombia*, no. 57. Bogotá: Scripto Impresores S.A, 2007.

- [17] M. G. Macklin, P. a. Brewer, D. Balteanu, and Y. Otros, “The long term fate and environmental significance of contaminant metals released by the January and March 2000 mining tailings dam failures in Maramures County, upper Tisa Basin, Romania,” *Appl. Geochemistry*, vol. 18, no. 2, pp. 241–257, 2003.
- [18] M. Luque, *Metabolismo del cianuro y del cianato en Pseudomonas pseudoalcaligenes CECT5344 . Aplicaciones biotecnológicas*. Analistas Económicos de Andalucía, 2005.
- [19] L. M. Hernandez, “Evaluación de la capacidad de un aislado bacteriano nativo de de Pseudomonas sp. Como Potencial Degradador de Compuestos cianurados,” 2010.
- [20] J. O. Restrepo and B. J. Restrepo, *El Lado Gris De La Minería de Oro*. 2008.
- [21] P. C. Tragua, *Tecnologías de Tratamiento de Aguas para su Reutilización*. Madrid: Programa Consolider Tragua, 2010.
- [22] J. Armengot, J. A. Espí, and F. Vázquez, “Orígenes y desarrollo de la minería,” *Ind. y Minería*, no. 365, pp. 17–28, 2006.
- [23] E. Sector, G. Escala, and G. Escala, “Minería Expone su Aporte al País,” *Rev. Dinero*, pp. 18–19, 2014.
- [24] Unidad de Planeacion Minero Energetica, “Indicadores de la minería en Colombia,” *Unidad Planeac. Min. Energ.*, no. 69, pp. 1–120, 2014.
- [25] M. T. Ronderos, “La Fiebre Minera se Apoderó de Colombia,” *Artículo Periodístico*, p. 1, 2011.
- [26] M. Esquivia Zapata, A. Parra Pizarro, J. I. Torres Gutiérrez, E. H. Espitia Jimenez, and M. Pinzón Salcedo, “La Explotacion Ilicita de los Recursos Minerales en Colombia,” *Inf. Contral. Gen. la República*, pp. 0–137, 2012.
- [27] J. Zapata, ““Es más rentable para los ilegales explotar oro que coca,”” *Rev. Sem.*, p. 2014, 2014.
- [28] I. M. de Oca, “Odas De Pindaro,” *Biblioteca Clásica*, no. Madrid, 1883.
- [29] J. C. Tobar, “Diagnóstico de los procesos metalúrgicos de beneficio de minerales complejos de oro y plata, realizados en el programa minero de la empresa sociedad minera del sur s.a.s. en el municipio de buenos aires, en el departamento del cauca, república de colombia,” *Universidad del Cauca*. Popayán, 2015.
- [30] J. Salager and A. Forgiarini de G., “Fundamentos de la flotación,” in *Cuadernos FIRP*, vol. 3, Mérida-Venezuela: Universidad de los Andes, 2007, p. 1,2.5.
- [31] Á. Azañero Ortíz, “Recuperación de Oro y Plata de minerales por Heap Leaching,” *Rev. Inst. investig. Fac. minas Met. cienc. geogr*, vol. 4, no. 7, pp. 63–70, 2001.

- [32] C. de Sanidad, *Riesgo Químico - Accidentes Graves Cianuro de Sodio*. Región de Murcia: Dirección General de Salud Pública, 2008, pp. 1–4.
- [33] J. J. Guerrero, “Cianuro: Toxicidad y destrucción biológica,” *Rev. El Ing. Minas*, vol. 10, no. 35, pp. 22–25, 2005.
- [34] M. Á. Blesa, “Una mirada al cianuro,” pp. 77–78.
- [35] ATSDR, “Resumen de Salud Pública Cianuro.” Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EE.UU, p. 23, 2006.
- [36] “División de Toxicología y Medicina Ambiental ToxFAQs™,” Agency for Toxic Substances and Disease Registry, pp. 8–9, 2006.
- [37] A. V Ram, “Toxicidad del cianuro. Investigación bibliográfica de sus efectos en animales y en el hombre,” *Rev. Med. del Perú*, vol. 71, no. 1, pp. 54–61, 2010.
- [38] Alexander Oscar Gettler, “The Toxicology of Cyanide,” *Am. J. Med. Sci.*, vol. 195, no. 2, 1938.
- [39] M. Ansell and F. A. Lewis, “A review of cyanide concentrations found in human organs. A survey of literature concerning cyanide metabolism, ‘normal’, non-fatal, and fatal body cyanide levels,” *J. Forensic Med.*, p. 4924688, 1970.
- [40] J. D. Losek, A. L. Rock, and R. R. Boldt, “Cyanide poisoning from a cosmetic nail remover,” *Am. Acad. Pediatr.*, vol. 88, no. 2, pp. 337–340, 1991.
- [41] J. W. E. W. and W. Ellenhorn, M.J., S. Schonwald, G. Ordog, “National Toxicology Program,” *National Library of Medicine’s*. p. 722, 2015.
- [42] H. Services, “TOXICOLOGICAL PROFILE FOR CYANIDE,” no. July, 2006.
- [43] M. Rezaul Haque and J. Howard Bradbury, “Total cyanide determination of plants and foods using the picrate and acid hydrolysis methods,” *Food Chem.*, vol. 77, no. 1, pp. 107–114, 2002.
- [44] Cámara Argentina de Empresarios Mineros, “Cianuro : mito realidad.” RN.
- [45] O. Restrepo, A. Montoya, and N. Muñoz, “Microbial Degradation of Cyanide From Gold Metallurgical Plants Utilizing *P. fluorescens*,” *Rev. Dyna*, pp. 45–51, 2006.
- [46] D. M. White, T. a. Pilon, and C. Woolard, “Biological treatment of cyanide containing wastewater,” *Water Res.*, vol. 34, no. 7, pp. 2105–2109, 2000.
- [47] A. D. Mart, “Tratamiento de desechos del cianuro por biorremediación,” vol. 25, pp. 61–72, 2012.
- [48] T. C. Benjumea, D. Paulina, Z. Zuluaga, and C. G. Estrada, “Aislamiento y purificación de microorganismos degradadores de cianuro,” 2006.

- [49] P. C. V. López, “Visión de ecosistema del cultivo del camarón para la sostenibilidad de la acuicultura de la provincia de el Oro,” 2011.
- [50] A. Akcil and T. Mudder, “Microbial destruction of cyanide wastes in gold mining: Process review,” *Biotechnol. Lett.*, vol. 25, no. 6, pp. 445–450, 2003.
- [51] C. Rinke, P. Schwientek, A. Sczyrba, N. N. Ivanova, I. J. Anderson, J.-F. Cheng, A. E. Darling, S. Malfatti, B. K. Swan, E. a Gies, J. a Dodsworth, B. P. Hedlund, G. Tsiamis, S. M. Sievert, W.-T. Liu, J. a Eisen, S. J. Hallam, N. C. Kyrpides, R. Stepanauskas, E. M. Rubin, P. Hugenholtz, and T. Woyke, “Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter.,” *Nature*, vol. 499, no. 7459, pp. 431–437, 2013.
- [52] J. Kallmeyer, R. Pockalny, R. R. Adhikari, D. C. Smith, and S. D’Hondt, “From the Cover: Global distribution of microbial abundance and biomass in subseafloor sediment,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 109, no. 40, pp. 16213–16216, 2012.
- [53] F. Balzola, C. Bernstein, G. T. Ho, and C. Lees, “A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing: Commentary,” *Inflamm. Bowel Dis. Monit.*, vol. 11, no. 1, p. 28, 2010.
- [54] a. . Fallis, *Un mundo de bacterias*, vol. 53, no. 9. 2013.
- [55] E. Iglesias, N. Marrero, T. Moreira, T. Martínez, B. García, A. Alfaro, and L. Izquierdo, “Evaluación de distintas metodologías para la preservación de *Clostridium tetani* , empleado en la producción de vacunas para uso humano,” *Vaccimonitor*, no. 1, pp. 1–5, 2000.
- [56] E. Duque, O. Rodríguez-andrade, J. De Torre, R. P. Jesús, J. Edificio, C. Universitaria, S. Manuel, M. C. P. E-mail, I. Científicas, P. Albareda, C. P. España, and C. P. México, “Bacterias Preservadas , una Fuente Importante de Recursos Biotecnológicos,” *Bio Tecnol.*, vol. 14, no. 2, 2010.
- [57] F. Javier, N. Valencia, M. Andrés, and S. María, “Evaluación de la inmovilización de *Pseudomonas fluorescens* para la biodegradación de cianuro en solución acuosa,” 2006.
- [58] K. Rabaey and W. Verstraete, “Microbial fuel cells: Novel biotechnology for energy generation,” *Trends Biotechnol.*, vol. 23, no. 6, pp. 291–298, 2005.
- [59] E. Alanís and I. Guerrero, “*Pseudomonas* en Biotecnología,” *Revista Biotecnología*, vol. 09, no. 1. pp. 26–37, 2004.
- [60] J. Benavides, L. De Mesa, G. Quintero, A. Liliana, G. Vizcaíno, and D. C. Jaimes, “Bioremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo,” *Nova*, vol. 4, no. 5, pp. 82–90, 2006.
- [61] D. Berríos, Z. Rodríguez, A. Cádiz, and S. C. Esnard, “Preparado contra *Pseudomonas aeruginosa* serotipo O11 de,” no. 1, pp. 11–17, 2002.
- [62] Ministerio De Minas Y Energía, “Comportamiento de la Producción Minera y Exportaciones en Colombia Primer Trimestre de 2015,” *Análisis minero, Dir. Minería Empres.*, vol. 62, no. 3, pp. 435–455, 2015.

- [63] S. T. Cowan and K. J. Steel, "MANUAL FOR THE IDENTIFICATION OF MEDICAL BACTERIA. By S. T. Cowan and K. J. Steel," 3rd ed., G. I. Barrow and R. K. A. Feltham, Eds. Cambridge University Press, 2009, p. 68,86,94.
- [64] F. C. Rodríguez, *BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL*, TEBAR S. L. 2005.