

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE UN AISLADO BACTERIANO NATIVO
DE *Pseudomonas* sp. COMO POTENCIAL DEGRADADOR DE
COMPUESTOS CIANURADOS**

LINA MARCELA HERNÁNDEZ SÁNCHEZ

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS
POSGRADO BIOTECNOLOGÍA
MEDELLÍN
2010**

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE UN AISLADO BACTERIANO NATIVO
DE *Pseudomonas* sp. COMO POTENCIAL DEGRADADOR DE
COMPUESTOS CIANURADOS**

LINA MARCELA HERNÁNDEZ SÁNCHEZ

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO DE
MAGISTER EN BIOTECNOLOGÍA**

**DIRECTORA
MARIA CONSUELO JARAMILLO
GRUPO DE INVESTIGACIONES SUSTANCIAS BIOACTIVAS
SEDE DE INVESTIGACIONES UNIVERSITARIAS
UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA**

**ASESORES
JUDITH BETANCUR URHÁN
ESPECIALISTA EN MICROBIOLOGÍA
COORDINADORA AREA DE MICROBIOLOGIA GRUPO GAIA
SEDE DE INVESTIGACIONES UNIVERSITARIAS
UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA**

**ORLANDO SIMÓN RUIZ VILLADIEGO
PROFESOR FACULTAD DE CIENCIAS MSc.
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA**

MEDELLÍN

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS
POSGRADO EN BIOTECNOLOGÍA
MEDELLÍN
2010**

Nota de aceptación

Presidente del jurado

Jurado

Jurado

Medellín, mayo 5 de 2010

Dedicado a mis padres Ester Sofía e Iván de Jesús, a mi esposo, Wilson Zapata, a mi hermano Jorge Iván y a mis perros Tobías y Piolín.

Todos fueron un gran apoyo en el largo proceso de este trabajo de grado.

AGRADECIMIENTOS

Doy las gracias, a todas las personas que con sus valiosos aportes ayudaron a la ejecución de este trabajo.

Beatriz Betancur, técnica del laboratorio de Microbiología, Judith Betancur Urhán, José David Hernández, Darley Vanegas, Felipe Gómez, Hugo Vargas, Yamilet Arcos, Adriana Gutiérrez. Instituto de Biología de la Universidad de Antioquia.

Profesora Consuelo Jaramillo y profesor Orlando Simón Ruiz, por su acertada y oportuna orientación en el área química.

Doctor Santiago Cardona, Doctor Carlos Peláez y en su momento al Doctor Pablo Gutiérrez; por la evaluación de este trabajo.

Profesor Abel Díaz, orientación en estadística y Cristina Mora, elaboración de gráficos.

Janet Orozco, Iván Meléndez, Isabel cristina Restrepo y personal del laboratorio de Mutagénesis Universidad de Antioquia.

Federico Ramírez, Rosa Elena Jurado, Ana Cecilia Gaviria y al personal del laboratorio CIMEX Universidad Nacional de Colombia Medellín.

Jorge Henao y Fernando Canasteros, laboratorio de genética Universidad de Antioquia.

Doctor Jaime Palacio, Julián Hernández, Lina Juliana y personal del laboratorio GAIA SIU Universidad de Antioquia

Ana Isabel Gutiérrez, laboratorio de Micología, Instituto de Biología de la Universidad de Antioquia.

Miguel Acevedo y personal del laboratorio GIEM de la Universidad de Antioquia.

CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABLAS	11
SIMBOLOGIA NOTACION	12
RESUMEN	14
INTRODUCCIÓN	16
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACION	20
OBJETIVOS.....	20
GENERAL.	20
ESPECÍFICOS	20
HIPÓTESIS.....	21
PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	21
JUSTIFICACIÓN.....	24
VIABILIDAD	25
PUBLICACIONES.....	26
ANTECEDENTES.....	27
2. MARCO TEORICO	30
2.1 GENERALIDADES SOBRE EL CIANURO	30
2.1.1 EFECTOS TÓXICOS DEL CIANURO	30
2.1.2 QUÍMICA DEL CIANURO	32
2.1.3 FOTODESCOMPOSICIÓN DEL CIANURO	35
2.1.4 DEGRADACIÓN QUÍMICA DEL CIANURO.....	36
Cloración alcalina	36
Oxidación con peróxido de hidrógeno	37
Oxidación con ácido de Caro.....	38
2.1.5 DEGRADACIÓN BIOLÓGICA DEL CIANURO	39
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	44

3.1	MATERIAL BIOLÓGICO	44
3.1.1	Identificación bioquímica del aislado.....	45
3.2	DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES DE BIODEGRADACIÓN	47
3.2.1	Activación del aislado bacteriano. proceso de biodegradación.....	48
3.2.2	Pruebas para evaluar la tolerancia al cianuro del aislado <i>Pseudomonas</i> sp.	48
3.2.3	Establecimiento de la población inicial del inculo.....	49
3.2.4	Evaluación del porcentaje de recuperación de cianuro en diferentes medios.....	49
3.2.5	Verificación de la precisión para el método titulométrico, límites de detección y cuantificación para el método del electrodo ión selectivo para amonio y para el espectrofotómetro UV-VIS..	50
3.2.6	Curvas de comportamiento poblacional, producción de amonio y biodegradación de cianuro..	52
3.3	BIODEGRADACION DE CIANURO DE SODIO (NaCN)	52
3.3.1	Eficiencia de la biodegradación de compuestos cianurados.....	53
3.3.2	Diseño experimental.....	54
4.	RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN	57
4.1	IDENTIFICACIÓN BIOQUIMICA DEL AISLADO	57
4.2	DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES DE BIODEGRADACIÓN	66
4.2.1	Pruebas de activación y evaluación de la tolerancia al cianuro de sodio por el aislado <i>Pseudomonas</i> sp.....	67
4.2.2	Establecimiento de la población inicial del inculo.....	75
4.2.3	Evaluación del porcentaje de recuperación de cianuro en medios diferentes.....	76
4.2.4	Curvas de comportamiento poblacional, producción de amonio y biodegradación de cianuro.	77
4.3	BIODEGRADACION DE CIANURO DE SODIO	85
5	CONCLUSIONES	100

6. RECOMENDACIONES	102
BIBLIOGRAFIA.....	103

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Relación entre CN^- --- HCN con el pH	33
Figura 2. Crecimiento en agar blando de <i>Pseudomonas</i> sp.	58
Figura 3. Prueba de la urea	58
Figura 4. Crecimiento en agar Kligler y Citrato de Simmons	59
Figura 5. Prueba del indol	60
Figura 6. Crecimiento en agar MacConkey	61
Figura 7. Crecimiento en agar almidón.	62
Figura 8. Prueba de fermentación de carbohidratos.....	62
Figura 9. Crecimiento del aislado nativo a 37°C en agar P.....	63
Figura 10. Coloración de Gram.....	64
Figura 11. Crecimiento en agar cetrimide del aislado <i>Pseudomonas</i> sp.	65
Figura 12. UFC/mL de muestra en agar cetrimide del aislado <i>Pseudomonas</i> sp., después de medios líquidos con caldo peptonado, 500ppm de NaCN y pH 7.5 (A) y sin caldo peptonado, 500ppm de NaCN y pH 7.5 (B).....	67
Figura 13. UFC/mL de muestra en agar cetrimide del aislado <i>Pseudomonas</i> sp., después de medios líquidos con caldo peptonado, 500ppm de NaCN y pH 8.5 (A) y sin caldo peptonado, 500ppm de NaCN y pH 8.5 (B).....	68
Figura 14. UFC/mL de muestra en agar cetrimide del aislado <i>Pseudomonas</i> sp., después de medios líquidos sin caldo peptonado, a pH 9.5, 500 ppm de NaCN.	69
Figura 15. UFC/mL de muestra en agar cetrimide del aislado <i>Pseudomonas</i> sp., después de medios líquidos con caldo peptonado, pH 10.5, 500ppm de NaCN.	69
Figura 16. UFC/mL de muestra en agar cetrimide del aislado <i>Pseudomonas</i> sp., después de medios líquidos con caldo peptonado, pH 11, 500ppm de NaCN (A) y sin caldo peptonado pH 11, 500ppm de NaCN (B).	70
Figura 17. UFC/mL de muestra en agar cetrimide del aislado <i>Pseudomonas</i> sp., después de buffer carbonato, (A) pH 9,3 y (B) pH 9,6, 500ppm de NaCN...	71

Figura 18. (A) Cultivo con 24 horas de células típicas <i>Pseudomonas</i> sp. en caldo peptonado pH 7. (B) Células <i>Pseudomonas</i> sp. después de 24 horas de inoculación en caldo peptonado con adición de 500 ppm de NaCN pH 9,0. (C) cultivo de 24 horas de <i>Pseudomonas</i> sp. en Buffer carbonato con 500 ppm de NaCN pH 9,6.....	74
Figura 19. Gráfica de UFC/mL de muestra vs Absorbancia a una longitud de onda de 600 nm para el aislado <i>Pseudomonas</i> sp.	75
Figura 20. Comportamiento del aislado <i>Pseudomonas</i> sp. en buffer carbonato, pH 9,6 y 1200 ppm de cianuro de sodio..	79
Figura 21. Biodegradación de cianuro de por parte del aislado <i>Pseudomonas</i> sp. partiendo de 1200 ppm de NaCN a pH 9,6 y un inóculo de $2.7 \cdot 10^9$ UFC/mL de muestra.....	80
Figura 22. Generación de amonio por el aislado <i>Pseudomonas</i> sp.y un inóculo de $2.7 \cdot 10^9$ UFC/mL de muestra durante el proceso de biodegradación de NaCN	80
Figura 23. Degradación de cianuro de sodio y producción de amonio durante ocho días por parte del aislado <i>Pseudomonas</i> sp... ..	81
Figura 24. ppm de NaCN volatilizados durante 48 horas en los controles.....	89
Figura 25. ppm de NaCN Biodegradados por el aislado <i>Pseudomonas</i> sp. en dos medios de cultivo a dos pH y dos temperaturas, durante 48 horas. de incubación.....	89
Figura 26. Comparación de la Biodegradación de NaCN por <i>Pseudomonas</i> sp. frente a los controles, con dos medios, dos pH y dos temperaturas de incubación, durante 48 horas.....	91

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Precisión del método titulométrico para la medición de concentración de NaCN.....	51
Tabla 2. Modelo del diseño experimental	56
Tabla 3 Modelo de registro para los controles	56
Tabla 4. Resultados de las pruebas de activación y tolerancia del aislado nativo <i>Pseudomonas</i> sp. Al compuesto NaCN.....	71
Tabla 5. Movilidad celular evidenciada en placa húmeda para el aislado <i>Pseudomonas</i> sp	74
Tabla 6. Porcentaje promedio de recuperación de cianuro en medios con Buffer Carbonato y agua destilada a diferentes pH.....	76
Tabla 7. Porcentaje de remoción de NaCN, generación de amonio y variación poblacional (UFC/mL de muestra) por parte del aislado <i>Pseudomonas</i> sp. durante ocho días	79
Tabla 8. ANOVA Multifactorial	88
Tabla 9. Valores en ppm de NaCN volatilizados (HCN) en los controles.....	95
Tabla 10. ppm de NaCN biodegradados por el aislado <i>Pseudomonas</i> sp.....	96

SIMBOLOGIA NOTACION

Ácido cianhídrico	HCN
Ácido fórmico	H ₂ CO ₂
Ácido fórmico	H ₂ CO ₂
Ácido sulfocianhídrico	HCNS
Amoniacó	NH ₃
Amonio	NH ₄ ⁺
Análisis de varianza.	ANOVA
Arsenato férrico	FeAsO ₄
Arsénico	AsO ₄ ⁻³
Cianuro de plata	AgCN
Cianuro de sodio	NaCN
Cloruro de cianógeno	CICN
Cloruro de sodio	NaCl.
Cobre	Cu
Dicloro	Cl ₂
Dióxido de carbono	CO ₂
Dióxido de nitrógeno	NO ₂
Dióxido de titanio	TiO ₂
Dosis letal cincuenta	LD50
Especie desconocida.	sp.
Ferrocianuro de cobre	Cu ₂ Fe(CN) ₆
Ferrocianuro	Fe(CN) ₆ ³⁻
Hierro	Fe
Íón cianato	OCN ⁻
Íón cianuro	CN ⁻
Íón de sulfito	SO ₃ ²⁻

Ión sulfato	SO_4^{-2}
Ión tiosulfato	$\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$
Litro.	L
Logaritmo negativo de la constante de disociación de un ácido débil	pK_a
Microgramos.	μg
Mililitros.	mL
Nicotinamida adenín dinucleótido reducido	NADH
Nicotinamida adenín dinucleótido oxidado	NAD^+
Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidado	NADP^+
Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido	NADPH
Nitrato	NO_3^-
Normalidad.	N
Partes por millón.	ppm
Peróxido de hidrógeno	H_2O_2
Potencial de hidrogeniones.	pH
Sulfato de cobre	CuSO_4 .
Sulfato de hierro (III)	$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$.
Sulfato de sodio	Na_2SO_4
Unidades formadoras de colonia.	UFC
Zinc	Zn

RESUMEN

El cianuro es un compuesto altamente tóxico, se produce naturalmente por mecanismos como la cianogénesis y síntesis de etileno, también puede producirse durante procesos industriales y actividades antropogénicas. Los altos niveles de cianuro en el medio ambiente deben ser controlados, ya que éste actúa como un inhibidor irreversible de las enzimas de la cadena respiratoria a nivel mitocondrial (citocromo a_3), por lo cual es tóxico para todos los organismos aerobios.

Existen diferentes métodos físicos, químicos y biológicos para la degradación de cianuro a compuestos menos tóxicos. En este trabajo se evaluó la capacidad biodegradadora de compuestos cianurados, por parte de un aislado bacteriano nativo compatible con el género *Pseudomonas* sp., seleccionado por su capacidad para tolerar ambientes con niveles de 500 ppm de cianuro de sodio a pH de 9.6.

La eficiencia de la capacidad degradadora se valoró mediante estimaciones microbiológicas y bioquímicas del aislado bacteriano, empleando los métodos espectrofotométrico para evidenciar el desarrollo de la población; titulométrico para el análisis de cianuro, y potenciométrico ión electrodo selectivo para amonio, como compuesto generado después de la biodegradación.

Los resultados obtenidos se evaluaron mediante un análisis de varianza multifactorial de efectos fijos, que permitió establecer las condiciones de pH, temperatura, concentración de cianuro, medio de cultivo y tiempo de incubación, para degradación del compuesto cianuro de sodio NaCN, por parte

del aislado nativo *Pseudomonas* sp.. Los efectos de los cambios se monitorearon con base en ppm de NaCN biodegradado y concentración resultante de amonio.

Se demostró un promedio de biodegradación de 515 ppm de NaCN, en un lapso de 48 horas, partiendo de 1000 ppm, pH 9.6 y un inóculo de 4.89×10^{11} UFC/mL de medio, generando concentraciones de amonio hasta de 2.05 ppm como producto del proceso. Se considera un microorganismo promisorio en el área de biotecnología ambiental, particularmente en la biorremediación de ambientes con compuestos cianurados en altas concentraciones y pH alcalinos.

Palabras clave

Biodegradación de cianuro, Biorremediación, *Pseudomonas* sp, volumetría, potenciometría.

VALUATION OF POTENCIAL CYANIDE COMPOUNDS TRANSFORMATION CAPACITY OF A NATIVE ISOLATED *Pseudomonas* sp. CULTURE

ABSTRACT

Cyanide is a high toxic compound, its natural generation by cyanogenesis and ethylene production, almost its production for industrial process and anthropogenic activities. The elevated cyanide levels in the environmental could be controlled, because it is actuate how inhibitor the mitochondrial cadent, for this is a toxic compound by the aerobics organisms.

There are a number of different physical, chemical and biological methods for the conversion of cyanide into least toxic compounds. Here, the biotransformed capacity of cyanide by a native isolated bacterial group was evaluated. This

group, which was compatible with *Pseudomonas* sp., it was selected because its ability to tolerate sodium cyanide concentrations up to 500 ppm in a 9.6 pH. The efficient transforming capacity was valued through microbiological and chemical estimations by means of spectrophotometric methods for population development, titrations for cyanide analysis and selective electrode ammonia measurements as a biotransformation by-product.

The obtained results were assessed through a multiple factors fixed-effects model of analysis of variance, which allowed establishing pH, temperature, cyanide concentration, growth medium and incubation time for the *Pseudomonas* sp. culture. Effects were monitored based on residual cyanide concentration and turn up ammonia concentration.

From an initial inoculum of 4.89×10^{11} UFC/mL with a concentration of 1000 ppm NaCN, the isolated culture degraded on average 515 ppm NaCN in a 48 hour time lapse in a 9.6 pH. This microorganism is then considered as promising in the environmental biotechnology field, particularly in environmental bioremediation for high concentrations of cyanide compounds in alkaline pH.

Keywords: Biodegradation of cyanide, Bioremediation, *Pseudomonas* sp. Volumetry, Potenciometry.

INTRODUCCIÓN

Grandes cantidades de cianuro son descargados a diario en suelos, aguas y aire procedente de diferentes actividades industriales como; la minería, en el proceso de recuperación de oro (González, 2006), actividades de electrólisis de aluminio, que se realizan para recubrir la superficie del metal y protegerlo contra la corrosión (Bourdot *et al.*, 2002; Marder *et al.*, 2003; Electroquímica y medio ambiente, 2007; Pombo y Dutra, 2008), carbonización de madera empleada para cocinar, llamada también pirolisis y gasificación de carbón o gasificación por pirolisis rápida (Gobierno de Aragón, 2007), producciones farmacéuticas y producción de fibras sintéticas como plásticos (Dumestre, *et al.*, 1997; Raybuck, 1992; Akcil y Muddert, 2003).

El cianuro es considerado un contaminante debido a su alta toxicidad para todos los organismos aeróbicos, reacciona con iones metálicos de enzimas tales como Fe, Zn y Cu. Es un inhibidor irreversible de las enzimas que participan en la cadena respiratoria a nivel mitocondrial, específicamente reacciona con la forma oxidada del citocromo objetivo (citocromo a₃) (Mathews *et al.*, 2002; Gülçin *et al.*, 2000; Christison y Rohrer, 2007). La toxicidad y el efecto inhibitorio en la respiración están relacionados con su especiación fisicoquímica. Las especies más tóxicas son las formas HCN y CN⁻, mientras que los complejos con metales Fe(CN)₆³⁻, Fe(CN)₆⁴⁻ son relativamente menos tóxicos. En humanos se ha relacionado con algunas neuropatías luego de largos períodos de exposición (Dakshina *et al.*, 2003).

El cianuro entra al aire, al agua y al suelo desde procesos naturales y actividades industriales. En el aire, el cianuro se encuentra principalmente como cianuro de hidrógeno gaseoso, mientras que una pequeña cantidad se encuentra como finas partículas de polvo. La vida media del cianuro de

hidrógeno en la atmósfera es de aproximadamente 1 a 3 años. El cianuro en el agua no se acumula en el cuerpo de los peces.

Algunos ejemplos de compuestos cianurados son el cianuro de hidrogeno, el cianuro de sodio y el cianuro de potasio, estos se mueven con bastante facilidad en el suelo, una vez que se encuentran allí el ion cianuro puede ser removido a través de varios procesos. Algunos de los compuestos de cianuro pueden formar cianuro de hidrógeno que luego se evapora mientras que otros compuestos de cianuro se transforman a otras formas químicas por la acción de microorganismos en el suelo. En concentraciones altas, el cianuro es tóxico para estos microorganismos por lo que permanece sin ser cambiado a otras formas y atraviesa el suelo llegando hasta el agua subterránea (Dinama, 2009).

Los peces y los invertebrados marinos son especialmente sensibles a la exposición al cianuro. Concentraciones de cianuro libre en el ambiente marino que oscilan entre 5,0 y 7,2 $\mu\text{g/L}$ reducen la capacidad nadadora e inhiben la reproducción de muchas especies de peces. Otros efectos adversos pueden ser mortalidad retardada, patologías, respiración entrecortada, alteraciones osmoregulatorias y alteraciones del crecimiento. En concentraciones de 20 a 76 $\mu\text{g/L}$, el cianuro es mortal para una gran cantidad de especies, y en concentraciones que superen los 200 $\mu\text{g/L}$ el efecto tóxico es rápido para la mayoría de las especies marinas. Los invertebrados experimentan efectos no letales adversos si son expuestos a concentraciones de entre 18 y 43 $\mu\text{g/L}$ de cianuro libre, y efectos letales entre 30 y 100 $\mu\text{g/L}$. En palomas mensajeras y aves de corral, expuestas al cianuro se ha observado síntomas de respiración forzada y profunda, seguida de agitación. Cuando las dosis son altas, 11.1 mg/kg de peso, se da la muerte (Dinama, 2009).

Con el fin de contribuir a minimizar el impacto ambiental causado por el material de desecho cianurado de diferentes fuentes industriales, se pretendió evaluar la capacidad degradadora de cianuro por un aislado nativo de *Pseudomonas* sp., proponiendo un modelo de bioensayo aplicable al tratamiento de residuos cianurados industriales y permitiendo la cuantificación

de la capacidad degradadora del aislado sobre el cianuro, mediante el método titulométrico (4500CN-D) cuya selección fue condicionada por altas concentraciones iniciales de NaCN, cercanas a 1000 ppm.

La determinación de la relación entre el desarrollo poblacional del aislado bacteriano *Pseudomonas* sp. y la transformación de cianuro hasta NH_4^+ a través del tiempo, se realizó por espectrofotometría y por el método del ión electrodo selectivo dada la producción de bajas concentraciones de amonio generado después de la biodegradación.

El proyecto se fundamenta en una revisión bibliográfica que referencia las generalidades del cianuro, sus efectos tóxicos y algunos métodos empleados para su degradación. Adicionalmente se presentan los tratamientos de biodegradación con un aislado nativo de *Pseudomonas* sp.

Se dispusieron tres bioensayos. Los montajes se realizaron con dos días de diferencia, utilizando para cada una de las pruebas soluciones de cianuro de sodio (NaCN), dos valores de pH (9.3 y 9.6), dos medios (buffer carbonato y arena y buffer carbonato), dos temperaturas (27°C y 37°C) y dos tiempos de incubación (24 y 48 horas). Como variable respuesta se consideró las ppm de cianuro biodegradado, al final de cada tiempo de incubación para cada bioensayo.

Se demostró un promedio de biodegradación de 515 ppm de NaCN, en un lapso de 48 horas, partiendo de 1000 ppm, pH 9.6 y un inóculo de $4.89 \cdot 10^{11}$ UFC/mL de medio, generando concentraciones de amonio hasta de 2.05 ppm como producto del proceso. Se considera un microorganismo promisorio en el área de biotecnología ambiental, particularmente en la biorremediación de ambientes con compuestos cianurados en altas concentraciones y pH alcalinos.

El modelo de bioensayo propuesto es aplicable al tratamiento de residuos cianurados industriales, permite la cuantificación de la capacidad degradadora

del aislado sobre el cianuro mediante el método titulométrico, ya que en algunos de estos ambientes se encuentran concentraciones de cianuro superiores a 800 ppm, es económico pues no es necesario el uso de inductores enzimáticos adicionales, se minimizan las pérdidas de cianuro por volatilización y es relativamente rápido. Las mejores condiciones de biodegradación de NaCN por parte del aislado nativo de *Pseudomonas* sp. fueron: medio buffer carbonato, pH 9.6, temperatura 27°C ó 32°C y 48 horas de incubación. La interacción entre medio buffer carbonato y pH 9.6, influyen de forma significativa en la biodegradación de NaCN. En contraste con el factor temperatura donde el efecto no es tan fuerte para los dos niveles evaluados, 27°C y 32°C.

Este trabajo consta de seis capítulos.

El capítulo número uno presenta el planteamiento del problema que llevo a esta investigación, además de los objetivos, hipótesis, justificación, alcances obtenidos y antecedentes.

El capítulo dos contiene el marco teórico del trabajo.

En el capítulo tres se indican los materiales y métodos realizados para alcanzar los objetivos propuestos.

En el capítulo cuatro se revelan los resultados, el análisis y discusión de los mismos.

Los capítulos cinco y seis se refieren a las conclusiones y recomendaciones respectivamente.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

OBJETIVOS

Con el fin de contribuir a minimizar el impacto ambiental causado por el material de desecho cianurado, de diferentes fuentes industriales, en el presente trabajo se proponen los siguientes objetivos.

GENERAL.

Evaluar la capacidad degradadora de cianuro por parte de un aislado nativo compatible con *Pseudomonas* sp..

ESPECÍFICOS

Evaluar la tolerancia y viabilidad del aislado *Pseudomonas* sp., en caldos de cultivo cianurados.

Cuantificar la capacidad degradadora del aislado nativo bacteriano sobre el compuesto cianurado, mediante el método titulométrico (4500CN⁻-D).

Determinar la relación entre el comportamiento poblacional del aislado bacteriano *Pseudomonas* sp. y la transformación de cianuro hasta NH⁺₄ a través del tiempo.

Presentar una alternativa para la biodegradación de compuestos cianurados, usando el aislado bacteriano *Pseudomonas* sp.

Evaluar condiciones de pH, temperatura, tiempo y medio de soporte para el tratamiento de residuos cianurados industriales.

HIPÓTESIS

Si un aislado nativo compatible con *Pseudomonas* sp., emplea cianuro de sodio como fuente de carbono y nitrógeno para su crecimiento, entonces puede degradar este compuesto a otros menos tóxicos como el amonio.

PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

A pesar de que el cianuro es un compuesto altamente nocivo, se produce naturalmente por mecanismos como la cianogénesis y síntesis de etileno (Raybuck, 1992; Siller, 1998; Campbell *et al.*, 2001), pero igualmente es transformado por mecanismos de detoxificación biológica (Knowles, 1988; Kunz *et al.*, 1998), alcanzándose así un equilibrio ambiental relativo. El cianuro también puede producirse durante algunas prácticas industriales, tales como la minería, actividades de electrólisis de aluminio, gasificación de carbón, carbón para cocinar, producciones farmacéuticas, elaboración de fibras sintéticas como lycra y spandex, plásticos (Dumestre *et al.*, 1997; Raybuck, 1992; Akcil, 2003), incineración de residuos con poliuretano, obtención del almidón de yuca, (CIAT, 2001; Helbig *et al.*, 2008). En consecuencia, el cianuro causa un desbalance ambiental en suelos, aguas o aire debido a que los procesos naturales de detoxificación no son suficientes y se sobrepasan los niveles de saturación (Barber *et al.*, 2003; Matsumura and Kojima, 2003).

En Colombia, el manejo de los residuos resultantes del proceso de cianuración para la recuperación del oro de veta en las minas, ubicadas en la cordillera occidental del departamento de Nariño, en el sur de Bolívar y el municipio de

Segovia en Antioquia, generan emisiones tóxicas de cianuro en suelo, aire y aguas, también se genera contaminación hídrica, derivada de los vertimientos provenientes de la extracción de almidón agrio de yuca, en el departamento del Cauca (Montoya, 2001; Burbano *et al*, 2006, Garcés *et al*, 2006).

El cianuro actúa como un inhibidor irreversible enzimático, que reacciona con metaloenzimas dependientes de Fe, Zn, Cu; sus dianas primarias son las enzimas de la cadena respiratoria a nivel mitocondrial (citocromo a₃) (Mathews *et al.*, 2002), por lo cual es tóxico para los organismos aerobios; en humanos se ha relacionado con algunas neuropatías luego de largos períodos de exposición (Dakshina *et al.*, 2003).

En el aire, el cianuro se encuentra principalmente como cianuro de hidrógeno gaseoso mientras que una pequeña cantidad se encuentra como finas partículas de polvo. La vida media del cianuro de hidrógeno en la atmósfera es de aproximadamente 1 a 3 años. Los compuestos de cianuro se mueven con bastante facilidad en el suelo, allí se puede formar cianuro de hidrógeno que luego se evapora mientras que otros compuestos de cianuro se transforman a otras formas químicas por la acción de microorganismos en el suelo. En concentraciones altas, el cianuro es tóxico a estos microorganismos por lo que el cianuro permanece sin ser cambiado a otras formas y atraviesa el suelo llegando hasta el agua subterránea (Dinama, 2009). La exposición al cianuro puede ocurrir de diferentes formas: Al respirar aire cerca de sitios de desechos peligrosos que contienen cianuro; beber agua, tocar tierra o comer alimentos que contienen cianuro de manera natural como algunos tipos de frijoles y almendras, el humo de cigarrillos y el humo proveniente de incendios, son fuentes importantes de cianuro (ATSDR, 2006).

Existen métodos de tratamientos químicos para degradar el cianuro, generalmente se basan en la cloración alcalina (Smith y Mudder, 1991; Dakshina *et al* 2003), pero no son muy recomendables, debido a que en ellos se utilizan reactivos que causan otro tipo de contaminación. Es el caso de los tratamientos de cianuro, mediante su oxidación con hipoclorito de calcio,

produciéndose cianato de calcio y finalmente cloruro de cianógeno y organoclorados, liberándose al medio ambiente, cloro residual y cloruros (Burbano *et al*, 2006). Entre los efectos que estos compuestos pueden causar a largo plazo, se pueden mencionar: la carcinogénesis, la mutagénesis, teratogénesis, enfermedades respiratorias y encefalopatías crónicas (Ministerio de salud gobierno de la Nación, 2001).por lo tanto se hace necesario recurrir a otros tratamientos complementarios, que controlen la liberación de los nuevos contaminantes. En conclusión, los métodos químicos pueden resultar muy costosos.

La biotecnología microbiana es una opción que cada vez impacta más el campo de la producción limpia. Es por esto que en la exploración de una alternativa diferente a la que ofrecen los métodos tradicionales, se ha encontrado que algunos microorganismos como *Pseudomonas*, tienen la capacidad de utilizar el cianuro como fuente de carbono (Harris y Knowles, 1983; Babu *et al.*, 1996) y de nitrógeno (Knowless, 1988; Karavaicko *et al.*, 2000), ofreciendo de esta forma otra solución al problema de acumulación de cianuro en el medio ambiente (Dakshina *et al.*, 2003). En cuanto a la disposición o uso de la biomasa celular resultante después del biotratamiento, se puede considerar la alternativa de reciclar este "lodo biológico", mediante el diseño de reactores aireados, el ambiente aerobio en el reactor se consigue mediante el uso de difusores o de aireadores mecánicos, que también sirven para mantener el líquido mezclado completamente. Al cabo de un periodo determinado de tiempo, la mezcla de las nuevas células con las viejas se conduce hasta un tanque de sedimentación (decantador secundario) para su separación del agua residual tratada. Una parte de las células sedimentadas se recicla para mantener en el reactor la concentración de células deseada, mientras que la otra parte se purga del sistema. El fango resultante de la purga puede dirigirse a un digestor en el cual la concentración de oxígeno será mínima, bajo estas condiciones se favorecerá la proliferación de microorganismos anaerobios que generarían biocombustibles (Evaluación tecnológica de los biorreactores de membrana, 2009)

JUSTIFICACIÓN

Debido a la problemática anterior, se propone como método de tratamiento la biodegradación; existe un microorganismo aerobio capaz de soportar altas concentraciones de cianuro, lo que quiere decir que posee las herramientas enzimáticas necesarias para sobrevivir en ambientes altamente contaminados con este compuesto. *Pseudomonas* sp. es un microorganismo que tiene la capacidad de utilizar el cianuro como fuente de carbono (Harris y Knowles, 1983; Babu *et al.*, 1996) y de nitrógeno (Knowless, 1988; Karavaicko *et al.*, 2000), ofreciendo de esta forma otra solución al problema de acumulación de cianuro en el medio ambiente (Dakshina *et al.*, 2003). En cuanto a la disposición o uso de la biomasa celular resultante después del biotratamiento, se puede considerar la alternativa de reciclar este “lodo biológico”, mediante el diseño de reactores aireados; el ambiente aerobio en el reactor se consigue mediante el uso de difusores o de aireadores mecánicos, que también sirven para mantener el líquido mezclado completamente. Al cabo de un periodo determinado de tiempo, la mezcla de las nuevas células con las viejas se conduce hasta un tanque de sedimentación (decantador secundario) para su separación del agua residual tratada. Una parte de las células sedimentadas se recircula para mantener en el reactor la concentración de células deseada, mientras que la otra parte se purga del sistema. El fango resultante de la purga puede dirigirse a un digestor en el cual la concentración de oxígeno será mínima, bajo estas condiciones se favorecerá la proliferación de microorganismos anaerobios que generarían biocombustibles aprovechables en electricidad, funcionamiento de calderas, calefacciones, etc. (Evaluación tecnológica de los biorreactores de membrana, 2009)

La búsqueda de organismos nativos degradadores de cianuro, es una alternativa que se explora dentro de varios grupos de investigación en Colombia, tratando de contribuir, de esta manera al mejoramiento de las condiciones de vida de los ciudadanos. Además hay un compromiso gubernamental (decreto 1594 de 1984) en la conservación, mejoramiento y

restauración del ambiente y de los recursos naturales renovables. Es así como hay un gran trabajo para realizar en innumerables frentes, tales como:

- Control de los tratamientos que generan contaminación hídrica, derivada de los vertimientos provenientes de la extracción de almidón agrio de yuca (departamento del Cauca).

- Manejo inadecuado de los residuos resultantes del proceso de cianuración para la recuperación de oro de veta. Las arenas cianuradas de las minas, se depositan al aire libre sin tratamiento previo, cerca de las fuentes de agua, generando emisiones tóxicas a la atmósfera, al suelo y el agua tal como ocurre en las minas ubicadas en la cordillera occidental del departamento de Nariño, en el sur de Bolívar y en el municipio de Segovia, departamento de Antioquia. (Montoya, 2001; Garcés *et al.*, 2006; Burbano *et al.*, 2006; Mestre *et al.*, 2006).

En este trabajo se propone el aislado bacteriano compatible con *Pseudomonas* sp. como alternativa para degradar el cianuro, ya que muestra una capacidad de degradación de 57% del compuesto cianuro de sodio en NH₃, NH₄, NO₂, CO₂, compuestos de menor toxicidad y menos volátiles que el HCN.

VIABILIDAD

Al realizar un análisis entre el costo beneficio del tratamiento biológico sobre cianuro de sodio, se deben considerar aspectos ambientales y económicos. En este trabajo se comprobó la capacidad de un aislado bacteriano nativo de *Pseudomonas* sp. para transformar el cianuro de sodio en amonio a escala de laboratorio, sin el uso de inductores diferentes al mismo cianuro en los medios de cultivo y obteniéndose después de 48 horas de tratamiento, reducir aproximadamente a la mitad la concentración inicial de cianuro, conservándose población celular activa y viable.

Para el montaje de los experimentos es indispensable contar con los recursos necesarios que aseguren la adquisición de los equipos y el establecimiento de

las condiciones específicas para llevar a cabo los procesos de biotratamiento. Una vez los procesos están estandarizados los costos de inversión son mucho más bajos y se reducen básicamente a gastos de mantenimiento.

En la ejecución de este trabajo en particular, siempre se contó con limitaciones económicas, ya que las fuentes de financiación fueron muy escasas, lo que dificultó en gran medida el montaje y estandarización de los procesos. Algunos desacuerdos en cuanto a la elaboración de informes parciales causaron deserción de algunos participantes, lo que generó retraso en la investigación mientras estas personas eran reemplazadas. Finalmente estos obstáculos fueron superados y se concluyó el trabajo con buenos resultados, se demostró un promedio de biodegradación de 515 ppm de NaCN, en un lapso de 48 horas, partiendo de 1000 ppm, pH 9.6 y un inóculo de $4.89 \cdot 10^{11}$ UFC/mL de medio, generando concentraciones de amonio hasta de 2.05 ppm como producto del proceso

PUBLICACIONES

- Presentación en modalidad de poster en el “Congreso Iberoamericano de Química: 75 años de la Sociedad Química del Perú” y en el “XXIV Congreso peruano de Química”. 13 a 17 de octubre de 2008 en Cusco-Perú.
- Publicado en las memorias del “Congreso Iberoamericano de Química: 75 años de la Sociedad Química del Perú” y “XXIV Congreso peruano de Química”. 13 a 17 de octubre de 2008 en Cusco-Perú. Como Valuation of Potencial Cyanide Compounds Transformation capacity of a native Isolated *Pseudomonas* sp. Culture.
- Artículo sometido a publicación por la “Revista de la Sociedad Química del Perú”, con el nombre de Evaluación de la capacidad de un aislado

bacteriano de *Pseudomonas* sp. como potencial transformador de compuestos cianurados.

- Artículo sometido a publicación por la revista internacional “Información Tecnológica” de Chile, con el nombre de Oxidación de cianuro de sodio y producción de amonio por un aislado bacteriano nativo de *Pseudomonas* sp..

ANTECEDENTES

En 1992 Kunz y colaboradores realizaron ensayos de degradación de cianuro con *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764, el inóculo se obtuvo a partir de un cultivo de 36 horas de incubación, en un medio mínimo adicionado con glucosa (20 mM) y KCN (0.25 mM), las células fueron cosechadas y lavadas 2 veces con una solución buffer fosfato pH 7, se obtuvo un pellet de 200mg ml⁻¹ y este fue resuspendido en el mismo buffer y usado para los ensayos de biodegradación de KCN. Para estos se utilizaron medios líquidos con buffer carbonato a pH 7, adicionado con 50mM de KCN e incubados a 30°C y realizando mediciones desde las 0 hasta las 60 horas de las concentraciones residuales de KCN y amonio, CO₂, formamidas y formatos generados. Con este trabajo se demostró la biodegradación de cianuro a CO₂, amonio, formamidas y formatos siendo la concentración de los dos últimos compuestos dependiente de la concentración inicial de KCN.

Fernández y Kunz en el 2005 prepararon un inóculo de células correspondientes a *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764, con el fin de realizar la extracción y purificación de la enzima cianuro oxigenasa, a partir de un medio mínimo con glucosa y amonio, la inducción enzimática se realizó adicionando al medio 0.1 mM de KCN, para la obtención del inóculo las células fueron lavadas y resuspendidas en una solución de buffer fosfato a pH 7.

Luque Almagro y colaboradores en el 2004, aíslan una cepa de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344, utilizando un medio de cultivo mínimo preparado sin amonio y citrato, a pH 9.5 con 2 mM de NaCN y 50 mM de acetato como únicas fuentes de nitrógeno y carbono respectivamente.

En el proceso de degradación de cianuro, el microorganismo fue capaz de crecer en medios alcalinos, hasta pH de 11.5 siendo 9 el pH óptimo para la degradación de cianuro y tolerar concentraciones de 30 mM de cianuro libre. El crecimiento del microorganismo fue concomitante y proporcional a la degradación de cianuro, el cual fue estequiometricamente convertido en amonio, adicional al cianuro el microorganismo utilizó como fuente de carbono amonio, nitratato y cianato. En este trabajo se observó que todo el cianuro y amonio fueron asimilados, la actividad enzimática de la cianasa se indujo durante el crecimiento del microorganismo en presencia de cianuro o cianato, pero no con amonio o nitrato como fuente de carbono; los resultados sugieren que el cianato puede ser un intermediario en la ruta de degradación del cianuro, pero no se excluyen en este trabajo otras rutas alternas para la degradación del cianuro.

En una investigación posterior realizada en el 2008, por Luque Almagro y colaboradores, se comprueba molecularmente que la cianasa de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 cataliza la descomposición del cianato a CO₂ y amonio, con el carbamato como un intermediario inestable. Esta enzima fue regulada negativamente por el amonio y positivamente regulada por el cianato y el cianuro. Nunca se detecto actividad enzimática en presencia de amonio, aún en presencia de cianato. Sin embargo se detecto una baja actividad enzimática en células con falencias de nitrógeno. La enzima mostró una actividad óptima a temperaturas de 65°C y pH de 8.5. Mediante la generación de un mutante para la enzima cianasa, se comprobó que los cianatos no son un metabolito central en la asimilación del cianuro por parte de la cepa *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344.

Existen estudios realizados por Babu y colaboradores en 1996, que demuestran la capacidad de un extracto celular de *Pseudomonas putida* para utilizar el cianuro como única fuente de carbono y nitrógeno. Para los ensayos las células crecieron en presencia de cianuro de sodio y se midió la habilidad enzimática para convertir el cianuro en amonio a pH 7.5 y pH 9.5.

Montoya en el 2001 realiza una propuesta de detoxificación de ambientes mineros mediante métodos químicos y biológicos, para estos últimos propone condiciones de degradación hasta de 700 ppm de cianuro de sodio, realizando mediciones de la concentración residual de cianuro mediante los métodos titulométrico, colorimétrico y por conductividad iónica, aunque recomienda este último por ser más seguro para el operario, se considera muy útil el método titulométrico cuando las concentraciones de cianuro que se van a medir son tan altas.

Gaviria y Meza en el 2006 proponen el método volumétrico para la medición de cianuro residual después de diferentes procesos químicos de degradación. En este estudio cuentan con muestras líquidas y sólidas procedentes de efluentes de los municipios de Segovia y Marmato Caldas, donde las concentraciones de cianuro superan las 5500 ppm.

2. MARCO TEORICO

2.1 GENERALIDADES SOBRE EL CIANURO

2.1.1 EFECTOS TÓXICOS DEL CIANURO

Warburg y Keilin, citados por Kunz *et al.* (1998), demostraron que el cianuro es un inhibidor de la cadena respiratoria, porque se combina con el hierro trivalente en la citocromo oxidasa, presentando un peligro para todos los organismos aerobios (Seigler, 1975; Kunz, *et al.*, 1998).

Los seres humanos pueden estar expuestos al cianuro mediante inhalación, ingestión o absorción por la piel. El cianuro impide que las células utilicen el oxígeno, lo cual causa hipoxia de los tejidos, acumulándose lactato en la sangre y cianosis. El efecto conjunto de la hipoxia y la acidosis láctica, provoca una depresión en el sistema nervioso central que puede causar paro respiratorio y resultar mortal. En concentraciones más altas, el envenenamiento por cianuro puede afectar otros órganos y sistemas del cuerpo como el corazón (Minera, 2005; Santiago, 2009).

La forma más toxica del cianuro es el HCN gaseoso; en concentraciones de 20 a 40 ppm en el aire y después de varias horas de exposición, causa cierto malestar respiratorio en humanos. Los síntomas pueden revelarse como dolor de cabeza, somnolencia, vértigo, ritmo cardíaco rápido y débil, respiración acelerada, enrojecimiento facial, náusea y vómito. Estos síntomas pueden estar acompañados por convulsiones, dilatación de las pupilas, piel fría y húmeda, ritmo cardíaco aún más rápido y respiración superficial. En el tramo final y más

agudo del envenenamiento, las pulsaciones se vuelven lentas e irregulares, la temperatura corporal comienza a descender; los labios, la cara y las extremidades toman un color azulado, el individuo cae en coma y muere (Minera, 2005).

Para el cianuro libre, la dosis letal en humanos por ingestión o inhalación varía entre 50 y 200 mg (1 a 3 mg de cianuro libre por Kg de masa corporal). La dosis letal por absorción dérmica es considerablemente mayor, alrededor de 100 mg por kg de masa corporal (Logsdon *et al.*, 2006; Bhattacharya *et al.*, 2006).

El cianuro no se acumula ni se biomagnifica, por lo que exposiciones prolongadas a concentraciones subletales de cianuro no necesariamente causarán intoxicación. La exposición prolongada al cianuro provoca lesiones en el nervio óptico, ataxia, hipertensión, desmielinización, neuropatía óptica de Leber, bocio y disminución de las funciones tiroideas (Minera, 2005).

No se reportan casos en el que el cianuro se relacione con cáncer o defectos congénitos, o que pueda tener efectos adversos sobre la reproducción (Logsdon *et al.*, 2006).

Los peces y los invertebrados marinos son especialmente sensibles a la exposición al cianuro. Concentraciones de cianuro libre en el ambiente marino que oscilan entre 5,0 y 7,2 $\mu\text{g/L}$, reducen la capacidad nadadora e inhiben la reproducción de muchas especies de peces. Otros efectos adversos pueden ser mortalidad retardada, patologías, respiración entrecortada, alteraciones osmoregulatorias y alteraciones del crecimiento. En concentraciones de 20 a 76 $\mu\text{g/L}$, el cianuro es mortal para una gran cantidad de especies, y en concentraciones que superen los 200 $\mu\text{g/L}$, el efecto tóxico es rápido para la mayoría de las especies marinas.

El valor LD50 para las aves oscila entre 0,8 mg/kg de peso (palomas mensajeras americanas) y 11,1 mg/kg de peso (pollos de corral) (Dinama, 2009).

El valor LD50 para los mamíferos oscila entre 2,1 mg/kg de peso en el caso de los coyotes y 6,0-10,0 mg/kg de peso en ratones blancos de laboratorio (Dinama, 2009).

En el suelo los compuestos de cianuro se mueven fácilmente, es posible la formación de cianuro de hidrógeno que luego se evapora mientras que otros compuestos de cianuro (cianuro de sodio y cianuro de potasio, entre otros), se transforman a otras formas químicas (NH_3 , NH_4 , NO_2 , CO_2), por la acción microorganismos en el suelo (Dinama, 2009).

2.1.2 QUÍMICA DEL CIANURO

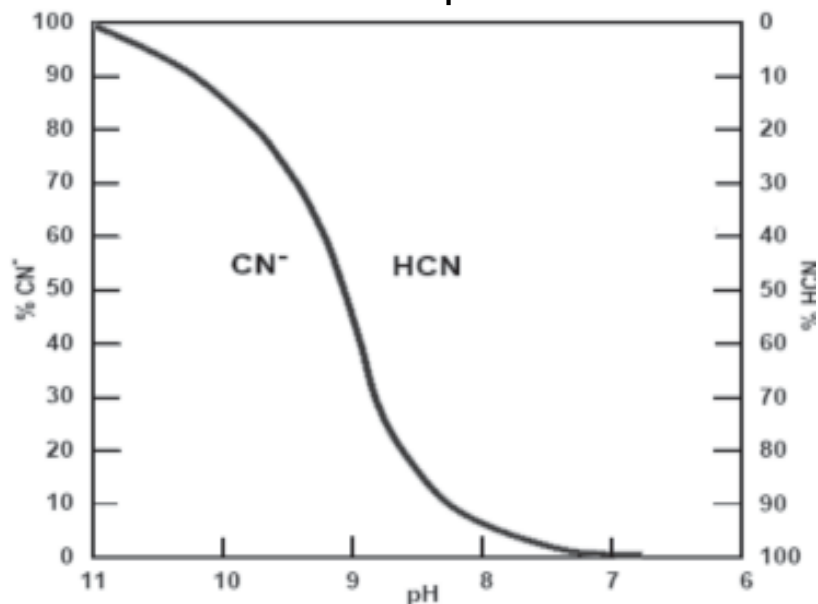
El término cianuro encierra todos los grupos Carbono-Nitrógeno presentes en compuestos cianurados que se puedan determinar como ión cianuro CN^- . Estos compuestos se clasifican en cianuros simples y complejos (APHA, 1998).

Los compuestos cianurados simples $\text{A}(\text{CN})_x$ están formados por un álcali o un metal (A) con su respectiva valencia (x), que corresponde al número de grupos cianuro y por el ión cianuro. Cuando el compuesto cianurado simple es alcalino, el grupo cianuro se encuentra como CN^- y como HCN (ácido cianhídrico) molecular, la relación para estas dos formas en la solución depende del pH y la constante de disociación para el HCN molecular ($\text{pK}_a \approx 9.2$). Las soluciones cianuradas metálicas simples pueden presentar el grupo CN en forma de aniones complejos de cianuro metálico, con estabilidad variable, muchos de estos son poco solubles en agua pero forman variedad de cianuros metálicos complejos que sí son solubles en presencia de cianuros alcalinos, por ejemplo, el cianuro de oro, plata, paladio, zinc, cobre; se disuelven fácilmente en el cianuro de sodio o en el cianuro de potasio (APHA, 1998).

Los compuestos cianurados metálicos alcalinos complejos $A_yM(CN)_x$ están formados por el álcali (A) presente (Y) veces, un metal pesado (M) y el número de grupos del ión CN (X) seguido de la valencia del álcali (X), tomada (Y) veces, mas la del metal pesado. La primera disociación de un compuesto cianurado metálico alcalino complejo produce un anión que es el radical $M(CN)_y^-$, ejemplo $AgCN \rightarrow Ag^+ + CN^-$.

Este puede continuar la disociación en función de varios factores como disminución de la concentración y disminución del pH, con liberación de CN^- y la consecuente formación de HCN. La figura 1, representa el equilibrio del pH entre el ión CN^- y el HCN, a pH 8 o menos casi todo el cianuro libre se encuentra como HCN y se pierde por volatilización, a pH de 10.5 casi todo el cianuro libre está presente como CN^- , en condiciones normales de temperatura y presión, las concentraciones de HCN y CN^- son iguales a un valor de pH de aproximadamente 9.0 (Logsdon *et al.*, 2006).

Figura 1 Relación entre CN^- — HCN con el pH



(González y Pulido, 2004).

La disociación de los diferentes cianuros metálicos complejos en equilibrio, que puede no alcanzarse durante mucho tiempo, está relacionado inversamente con su estabilidad muy variable, que depende del metal con el que este asociado. Los complejos de cianuro de zinc y cadmio se disocian casi totalmente, y por esto pueden causar toxicidad aguda en peces a pH neutro. En soluciones igual de diluidas, existe mucha menor disociación en el complejo níquel cianuro y los complejos, mucho más estables, formados con cobre (I) y plata. La toxicidad aguda para los peces de las soluciones con aniones complejos de cobre cianuro o plata-cianuro pueden deberse principal o totalmente a la toxicidad de los iones sin disociar, aunque los iones complejos son mucho menos tóxicos que HCN (APHA, 1998)

El CN^- es menos tóxico que el HCN, este último se forma en las soluciones de cianuro por reacción hidrolítica de CN^- con el agua. La toxicidad para los peces de la mayoría de las soluciones de cianuros complejos es atribuible principalmente al HCN resultante de la disociación de los complejos.

La pérdida de cianuro hacia la atmósfera en forma de HCN por fotodescomposición, destrucción química y bacteriana, evita la concentración de HCN en niveles tóxicos (APHA, 1998).

El grado de toxicidad del cianuro de hidrógeno (HCN) para los humanos depende del tipo de exposición. La concentración letal de cianuro de hidrógeno gaseoso (LC50) es de 100-300 partes por millón. La inhalación de esos niveles de cianuro causa la muerte en 10 a 60 minutos, teniendo en cuenta que entre más alta es la concentración, más rápido se produce la muerte. El valor LD50 por ingestión del cianuro de hidrógeno es de 50-200 miligramos, o de 1-3 mg/kg de peso. En contacto con la piel normal, el valor LD50 es de 100 mg/kg de peso (Dinama, 2009).

La sensibilidad de los organismos marinos al cianuro es específica de cada especie y se ve afectada por el pH, la temperatura y los niveles de oxígeno en

el agua, así como también por la etapa de vida y la condición del organismo. Los peces y los invertebrados marinos son especialmente sensibles a la exposición al cianuro. Concentraciones de cianuro libre en el ambiente marino que oscilan entre 5,0 y 7,2 $\mu\text{g/L}$ reducen la capacidad nadadora e inhiben la reproducción de muchas especies de peces. Otros efectos adversos pueden ser mortalidad retardada, patologías, respiración entrecortada, alteraciones osmoregulatorias y alteraciones del crecimiento. En concentraciones de 20 a 76 $\mu\text{g/L}$, el cianuro es mortal para una gran cantidad de especies, y en concentraciones que superen los 200 $\mu\text{g/L}$ el efecto tóxico es rápido para la mayoría de las especies marinas. Los invertebrados experimentan efectos letales entre 30 y 100 $\mu\text{g/L}$ (Dinama, 2009).

El valor LD50 para las aves oscila entre 0,8 mg/kg de peso (palomas mensajeras americanas) y 11,1 miligramos por kilo de peso (pollos de corral) (Dinama, 2009).

El valor LD50 para los mamíferos oscila entre 2,1 mg/kg de peso (coyote) y 6,0-10,0 mg/kg de peso (ratones blancos de laboratorio). En general, los efectos del cianuro descienden del ganado vacuno a ganado ovino a caballos y luego a ganado porcino, siendo el ganado vacuno el que más sufre los efectos del cianuro; los ciervos y los alces suelen ser relativamente resistentes a los efectos (Dinama, 2009).

2.1.3 FOTODESCOMPOSICIÓN DEL CIANURO

Depende de la exposición del compuesto cianurado a la luz ultravioleta, esta es lenta en las aguas profundas, turbias o a la sombra. En residuos sólidos se requiere de grandes extensiones para que estos sean extendidos y la luz los traspase. En la oxidación fotocatalítica, se combina la energía radiante de la luz ultravioleta y un oxidante como el aire en presencia de un semiconductor como lo es el dióxido de titanio. La actividad fotocatalítica del dióxido de titanio ha

sido ampliamente estudiada, es un compuesto extremadamente estable en suspensiones acuosas. Su aplicabilidad en los procesos solares fotocatalíticos se debe al hecho de que absorbe los fotones disponibles en un intervalo de longitud de onda de 300 a 400 nm. El mecanismo de oxidación fotocatalítica no ha sido determinado con precisión, pero se ha evidenciado la conversión completa de CN^- a OCN^- y la posterior formación de NO_3^- , CO_2 y H_2O_2 . (Bartosz *et al.*, 2002; González y Pulido, 2004; Kuhn y Thomas, 2005).

Debido a que la investigación en este campo es relativamente nueva, existen varios aspectos a mejorar de este proceso tecnológico:

- Modificaciones en el catalizador (TiO_2), mediante dopado o metalizado de este, con el fin de modificar sus propiedades, como ampliar su área superficial (Rojas *et al.*, 2007).
- Inmovilización del catalizador en un soporte que evite la necesidad de separarlo del agua después del tratamiento.
- Uso de oxidantes adicionales que mejoren la velocidad del proceso.
- Diseño de reactores y sistemas industriales que utilicen esta tecnología.
- Aumentar las opciones de catalizadores alternativos al TiO_2 (Burbano *et al.*, 2006).

2.1.4 DEGRADACIÓN QUÍMICA DEL CIANURO

Se conocen variedad de técnicas químicas para la destrucción del cianuro, entre las más usadas se encuentran: la cloración alcalina, la destrucción con peróxido de hidrogeno y la destrucción con ácido de caro.

- **Cloración alcalina.** $\text{NaCN} + \text{Cl}_2 \longrightarrow \text{CICN} + \text{NaCl}$.

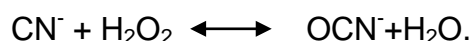
Como primer producto de la reacción se obtiene cloruro de cianógeno, este es un gas altamente toxico, de solubilidad limitada. Su toxicidad puede superar la de concentraciones iguales de cianuro. A pH alcalinos el CICN se hidroliza en

ión cianato (CNO^-), con una toxicidad menor. El CNO^- puede seguir oxidándose con cloro a un pH casi neutro y finalmente producir CO_2 y N_2 . Si hay acidificación el CNO^- se transforma en NH_4^+ . La cloración alcalina es un proceso relativamente rápido, que depende de la constante de disociación, que también determina la toxicidad (APHA, 1998).

Esta técnica se enfoca únicamente en la oxidación de cianuro que es sensible a la cloración. Los complejos de cianuro metálico, como níquel, cobalto, plata y oro, no se disocian fácilmente, por lo que la reacción de cloración necesita más tiempo y un exceso considerable de cloro. Los cianuros de hierro no se oxidan por cloración, porque no disocian en absoluto (APHA, 1998)

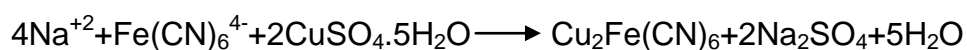
- Oxidación con peróxido de hidrógeno. Se han desarrollado dos procesos para la oxidación de cianuro con peróxido de hidrogeno, uno de ellos se conoce como proceso Kastone propuesto por la corporación Dupont, en 1974. Aquí se utiliza una solución de peróxido de hidrogeno al 41% con pocos mg/L de formaldehído y cobre. El segundo proceso fue desarrollado por la corporación Degusa, en éste se emplea una solución de peróxido de hidrógeno y sulfato de cobre en diferentes concentraciones, demostrando que no es necesario el uso del formaldehído. El proceso tiene tres etapas:

- Primera etapa: destrucción de cianuros libres y disociables en ácido débil por acción oxidante de H_2O_2 , utilizando como catalizador $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

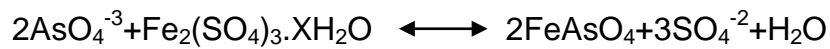


- Segunda etapa: precipitación de los ferrocianuros como los ferrocianuros de cobre usando sulfato de cobre y precipitación de arsénico con FeSO_4 .

- Precipitación de ferrocianuros: con $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$



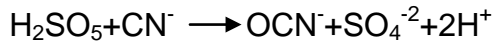
- Precipitación del arsénico con sulfato ferroso



- Tercera etapa: se usa para remover el cobre residual y demás precipitados de la solución. Esta etapa es necesaria si el límite de cobre disuelto se ha fijado por debajo de 1 ppm. (Berastain, 2009)

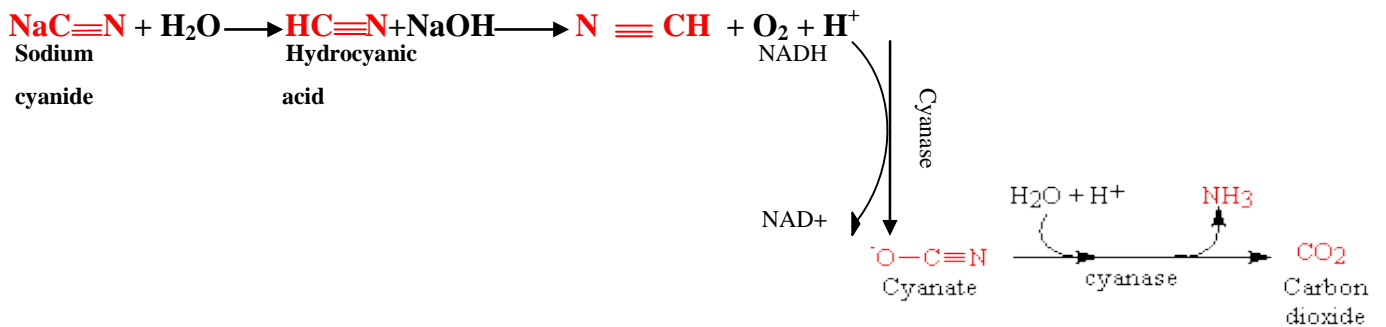
- Oxidación con ácido de Caro. También conocida como oxidación con ácido peroximonosulfúrico (H_2SO_5), preparado por primera vez por su inventor Heinrich Caro en 1898, es muy utilizada en minería, el ácido debe ser preparado en el mismo lugar donde será usado, este degrada el cianuro de los efluentes de cianuración provocando que el cianuro se oxide a cianato, compuesto menos tóxico que el cianuro. Posteriormente el cianato se hidroliza formando NH_3 , CO_2 y OH^- . La degradación del cianuro con el ácido de Caro se da a pH 9, debido a que la adición del ácido a las colas de las plantas en los procesos de extracción de oro en minería, disminuye los valores normales de estas que varían entre pH 10.5 y 11.5. La eficiencia del ácido de Caro en la destrucción del cianuro depende de factores como la composición y la viscosidad de las colas, la viscosidad del ácido de Caro y la eficiencia de la mezcla entre este y las colas (González y Pulido, 2004). En cuanto a la viscosidad del ácido de Caro, se hace necesario disponer de un reactor estático para mezclar el ácido sulfúrico con el peróxido y un control apropiado de los gases que se formen, esto incrementa los costos del proceso, también se debe considerar que el ácido de Caro no es un compuesto estable y se debe tener cuidado en la cantidad a aplicar respecto al volumen de las pulpas a tratar (Gaviria, 2006).

Esta es la reacción química que se da entre el ácido de Caro con el cianuro.



Debido a que la reacción produce ácido sulfúrico es necesario controlar el pH adicionando cal o soda caustica.

2.1.5 DEGRADACIÓN BIOLÓGICA DEL CIANURO



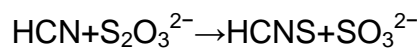
La biodegradación del cianuro es una opción a los procedimientos industriales. Los métodos biológicos y particularmente los microbiológicos, se constituyen en alternativas eficientes, porque son específicos, respecto a los focos en los que se pretende que actúen y luego de estandarizarse, pueden resultar muy económicos, respecto a los procesos químicos. Otra ventaja de estos procesos es su diseño simple y el control que se posee del proceso operativo, los bajos costos de las sustancias químicas y la capacidad de tratar por este método todas las formas de cianuro y sus subproductos (Dumestre *et al.*, 1997; Oudjehani *et al.*, 2002; Akcil y Mudder, 2003; Roshan *et al.*, 2007). Respecto a la disposición o uso de la biomasa celular resultante después del biotratamiento, se puede considerar la alternativa de reciclar este “lodo biológico”, mediante el diseño de reactores aireados, el ambiente aerobio en el reactor se consigue mediante el uso de difusores o de aireadores mecánicos, que también sirven para mantener el líquido mezclado completamente. Al cabo de un periodo determinado de tiempo, la mezcla de las nuevas células con las viejas se conduce hasta un tanque de sedimentación (decantador secundario) para su separación del agua residual tratada. Una parte de las células

sedimentadas se recircula para mantener en el reactor la concentración de células deseada, mientras que la otra parte se purga del sistema. El fango resultante de la purga puede dirigirse a un digestor en el cual la concentración de oxígeno será mínima, bajo estas condiciones se favorecerá la proliferación de microorganismos anaerobios que generarían biocombustibles aprovechables en electricidad, funcionamiento de calderas, calefacciones, etc. (Evaluación tecnológica de los biorreactores de membrana, 2009).

Se han descrito tres tipos de reacciones enzimáticas para el metabolismo del cianuro por parte de microorganismos:

- **Substitución/transferencia.**

Rhodanasa, descrita para *Thiobacillus denitrificans*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus stearothermophilus*

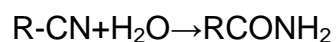


Cianoalanina sintasa, descrita para *Bacillus megaterium*

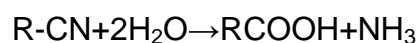


- **Hidrolíticas.**

Nitrilo hidratasa, descrita para *Pseudomonas* sp. *Corynebacterium*, *Brevibacterium*

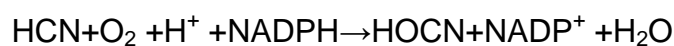


Nitrilasa descrita para *Pseudomonas aeruginosa*

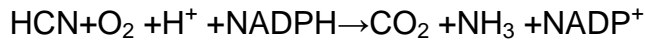


- **Oxidativas.**

Cianuro mono-oxigenasa, descrita para *Pseudomonas* sp.



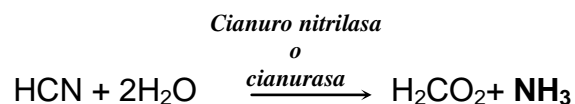
Cianuro dioxigenasa, descrita para *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus cereus*, *Bacillus pumillus*.



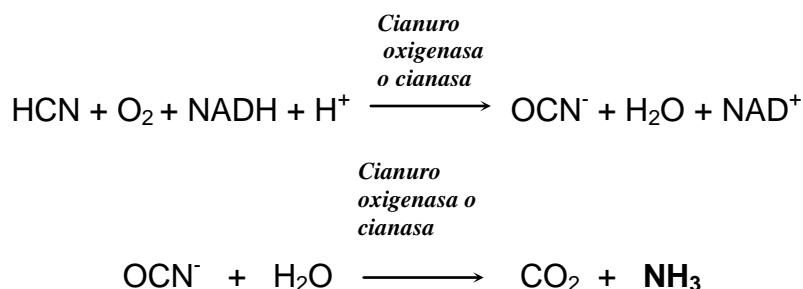
(Ebbs, 2004; M.J. Huertas *et al.*, 2006)

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

- Las cianurasas o cianuro nitrilasas catalizan la hidrólisis del ácido cianhídrico, hasta ácido fórmico y amoníaco. Esta biodegradación se ha reportado para *Pseudomonas stutzeri* (Atsushi *et al.*, 1998), *Pseudomonas fluorescens* (Kunz *et al.*, 1992, 1994, 1998) *Pseudomonas aureoginosa* (Megan *et al.*, 2003) y *Pseudomonas* sp. *Alcaligenes xylosooxidans* subespecie *denitrificans*. También se ha encontrado en otros generos como *Bacillus pumilus* (Meyers, *et al.*, 1991,1993), *Fusarium solani* y en algunas plantas como *Pisum sativum* (Dumestre *et al.*, 1997) y algas como *Scenedesmus obliquus* (Gurbuz *et al.*, 2004; 2009).

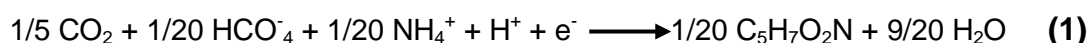


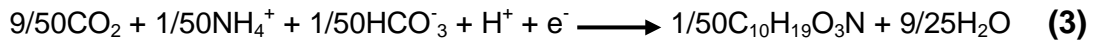
- Las cianuro oxigenasas o cianasas catalizan la oxidación completa hasta dióxido de carbono y amoníaco. Estas enzimas se han reportado para *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764 (Kunz *et al.*, 1992; Kunz *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1996; Dumestre *et al.*,1997; Kunz *et al.*,1998; Dakshina *et al.*,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



Las *Pseudomonas* sp. son organismos heterótrofos, utilizan parte de las sustancias metabolizadas ya sean orgánicas o inorgánicas, para obtener energía, que luego necesitaran para convertir la otra parte de materia orgánica en células. Los procesos de síntesis se dan gracias a los donantes de electrones que son necesarios para obtener energía. En el momento de diseñar un sistema biológico para el tratamiento de ambientes contaminados, se deben conocer todas las transformaciones que tienen lugar en el proceso de oxidación de sustancias inorgánicas y orgánicas por parte del microorganismo con el fin de obtener energía para su desarrollo, lo que hace importante conocer que parte de los donantes de electrones se convierte en energía para determinar la cantidad de oxígeno, nitratos requeridos y producidos, que parte se convierte en células microbianas, asegurando de esta manera la disponibilidad de nutrientes como nitrógeno y carbono para los microorganismos dentro del sistema, esta información se obtiene realizando un balance de masas. (Sawyer *et al.*, 2001)

El balance de masas se realiza planteando una reacción química balanceada global de la conversión biológica. En la reacción estarán los aspectos de producción de energía y síntesis, para la síntesis se usa la formula empírica para células bacterianas $\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2\text{N}$. En el caso de la biorremediación de cianuro por un aislado bacteriano el balance global de la reacción se representa con las siguientes semirreacciones:





Las semirreacciones anteriores se relacionan en la ecuación de balance de masas

$$R = f_s R_c + f_e R_a - R_d$$

Donde:

R_c representa la semirreacción (1) correspondiente a las células bacterianas.

R_a representa la semirreacción (2) para el electrón receptor

R_d representa la semirreacción (3) para el electrón donante

$f_s = 0.1$, representa la parte de electrones donantes usados para procesos de síntesis.

$f_e = 0.9$, representa la parte de electrones donantes usados para obtención de energía.

(Sawyer *et al.*, 2001)

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Para evaluar la capacidad degradadora de cianuro de sodio por parte del aislado bacteriano nativo de *Pseudomonas* sp. se dispusieron tres bioensayos. Los montajes se realizaron con dos días de diferencia entre cada uno, utilizando para cada una de las pruebas, soluciones de cianuro de sodio (NaCN marca Merck) a dos valores de pH, 9.3 y 9.6 (pHmetro Schott Handylab 1), dos medios, buffer carbonato y buffer carbonato con arena (NaHCO_3 y Na_2CO_3 marca Merck), con el fin de evaluar el efecto de interferentes naturales en el proceso de biodegradación, dos temperaturas, 27°C y 37°C (Incubadora 1 Dies Mod. D-53) y dos tiempos de incubación, 24 y 48 horas, debido a que en las pruebas preliminares se observó que en estos tiempos se daba la mayor biodegradación del cianuro de sodio. Como variable de respuesta se consideró las ppm de cianuro de sodio biodegradado (como medida de la biodegradación), al final de cada tiempo de incubación para cada bioensayo.

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Los ensayos se realizaron con un aislamiento nativo compatible con *Pseudomonas* sp., suministrado por el Laboratorio de Microbiología del Instituto de Biología de la Universidad de Antioquia, procedente de una planta de tratamiento de aguas residuales en el municipio de la Ceja, Antioquia (Betancur *et al.*, 2005). Una vez se corroboró su compatibilidad con *Pseudomonas* sp. los microorganismos fueron mantenidos vivos en agar nutritivo, renovando el cultivo cada 8 días a pH 7.0 y 37°C, hasta el momento de su activación o inducción enzimática, exponiéndolo al compuesto cianuro de sodio.

Para todas las pruebas biológicas se emplearon medios de cultivo marca Merck.

3.1.1 Identificación bioquímica del aislado. Se utilizó la serie bioquímica propuesta por Macfaddin, 2003, para confirmar que el aislado bacteriano nativo era compatible con el género *Pseudomonas*.

La identificación bioquímica se apoya en el uso de diferentes medios de cultivos selectivos y diferenciales que ayudan a identificar actividades enzimáticas específicas de cada género bacteriano.

Para el género *Pseudomonas* la identificación bioquímica comprende la determinación de varias características en el aislado bacteriano nativo:

- Determinación de motilidad o movilidad del microorganismo: determinada por el crecimiento difuso del microorganismo en un agar blando alrededor de una línea de inoculación. (Macfaddin, 2003)
- Capacidad del microorganismo de hidrolizar la urea por presencia de la enzima ureasa: la obtención de amoníaco se verifica por el viraje de color del medio con urea, de amarillo a rojizo. (Macfaddin, 2003)
- Facultad del aislado para fermentar carbohidratos, mediante el método de KIA (Agar Hierro de Kligler): esta facultad la evidencia el cambio de color del medio Kligler, de rojo vira a amarillo. (Macfaddin, 2003)
- Capacidad del aislado bacteriano de oxidar el triptófano presente en el medio a compuestos indólicos, mediante la prueba del indol: se determina el indol en el medio adicionándole reactivo de Kovacs (P-Dimetilamino Benzaldeido) al cultivo de 48 horas, formándose un anillo violeta en la superficie. (Macfaddin, 2003)
- Estructura de la pared celular bacteriana, correspondiente a la de una bacteria Gram negativa. Evidenciada en crecimiento positivo en agar selectivo para bacterias Gram negativas, MacConkey, en este medio de cultivo, las

peptonas, aportan los nutrientes necesarios para el desarrollo bacteriano, la lactosa es el hidrato de carbono fermentable y la mezcla de sales biliares y el cristal violeta son los agentes selectivos que inhiben el desarrollo de gran parte de la flora Gram positiva. El viraje del color del indicador de pH (rojo neutro) se produce por fermentación de la lactosa ocasionando la disminución del pH alrededor de la colonia. Esto produce la precipitación de las sales biliares. Los microorganismos no fermentadores de lactosa producen colonias incoloras. (Macfaddin, 2003)

- Diferenciación de especies de *Pseudomonas saccharphila* y *Pseudomonas stutzeri* de otras especies de *Pseudomonas* más comunes, incapaces de metabolizar el almidón: se evidencia la producción de amilasas inoculando el microorganismo en agar almidón y pasadas 48 horas se adicionan unas gotas de lugol (reactivo a base de yodo) que oscurece completamente el medio, un resultado positivo se verifica alrededor de las colonias por presencia de un halo transparente, lo que indica hidrólisis del almidón. (Macfaddin, 2003)
- Capacidad del aislado bacteriano nativo de fermentar la xilosa, por medio de la prueba de fermentación de carbohidratos: al final de una prueba positiva se observa producción de gas y cambio de color del medio, de rojo vira a amarillo, manifestando acidificación. (Macfaddin, 2003)
- Crecimiento en agar P para diferenciar especies de *Pseudomonas*. El agar P, es un medio de cultivo utilizado para el aislamiento, la detección y la diferenciación de especies de *Pseudomonas* spp. con base en la producción del pigmento piocianina. En el medio de cultivo, la peptona de gelatina aporta los nutrientes necesarios para el desarrollo bacteriano, la glicerina favorece la producción de pigmentos, las sales de magnesio y potasio estimulan la producción de los pigmentos piocianina y piorrubina e inhiben la producción de fluoresceína. Un resultado positivo es por observación de los pigmentos piocianina y/o piorrubina. La producción de piocianina se observa como una zona color azul, azul-verdoso que rodea la colonia, o que se extiende en todo el medio de cultivo debido a la difusión del pigmento. La producción de piorrubina se observa como una zona de color rojo alrededor de la colonia o que se

extiende en todo el medio de cultivo debido a la difusión del pigmento. (MacFaddin, 2003; Qinchía, *et al.*, 2006).

- Crecimiento en agar Cetrimide para diferenciar especies de *Pseudomona*: El agar Cetrimide está compuesto de amonio cuaternario que es un inhibidor de gran variedad de especies bacterianas incluyendo muchas especies de *Pseudomonas*. La producción de piocianina se ve estimulada por el magnesio, cloruro de potasio y sulfato presentes en el medio. Las colonias rodeadas de un pigmento azul-verde y que fluye corta longitud de onda (254 nm), expuestas a la luz ultravioleta pueden ser presuntamente identificados como *Pseudomonas aeruginosa*. Sin embargo, hay ciertas cepas de *P.* que no pueden producir. Otras especies de *Pseudomonas* no producen pero fluorescen a la luz ultravioleta. Especies bacterianas diferentes de *Pseudomonas* y otras pertenecientes a este género son inhibidas por este medio. (Merck, 2008; Difco, 2009).

3.2 DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES DE BIODEGRADACIÓN

Se realizaron pruebas biológicas con el fin de estandarizar las condiciones requeridas por el aislado bacteriano nativo para realizar el proceso de biodegradación, se inicia exponiendo el microorganismo a concentraciones medias de cianuro para evaluar su tolerancia y finalmente se duplican las concentraciones del compuesto cianuro de sodio considerando las concentraciones de este en los entables mineros (Dimitry *et al.*, 2001; Betancur *et al.*, 2005):

- Tolerancia a concentración de 500 ppm de NaCN en medios líquidos (agua destilada y caldo peptonado), pH alcalinos (7.5, 8.5, 9.5, 10.5 y 11.5) y Buffer carbonato, pH (9.3 y 9.6), durante 48 horas de exposición a temperatura ambiente (entre 26 y 28°C) (Dimitry *et al.*, 2001; Betancur *et al.*, 2005).
- Comportamiento del aislado frente al compuesto cianurado a 1200 ppm, pH 9.6, en buffer carbonato, durante ocho días a temperatura ambiente (entre 26 y 28°C) (Dimitry *et al.*, 2001; Betancur *et al.*, 2005).

Se realizaron pruebas químicas preliminares con el fin de seleccionar un medio que ofreciera una retención del 100% de NaCN y se verificó la precisión del método titulométrico frente a una muestra patrón de cianuro a 500 ppm.

Para evidenciar la generación de amonio como producto en la biodegradación de NaCN y determinar el tiempo de mayor transformación del compuesto cianurado por parte del aislado nativo *Pseudomonas* sp, se midió cada 24 horas, durante un periodo de ocho días la concentración de cianuro residual (por el método titulométrico 4500-CN D) y de amonio generado (por el método de electrodo ión selectivo 4500-NH₃ F). (APHA 1998)

3.2.1 Activación del aislado bacteriano. El aislado bacteriano fue mantenido en medios líquidos: caldo peptonado, caldo nutritivo y caldo cetrimide. Posteriormente se llevó a medios sólidos generales (agar nutritivo) suplementado con 100 ppm de NaCN a pH 9.0 y medios selectivos para *Pseudomonas* (agar cetrimide y agar P para *Pseudomonas*) para ser activado y mantenido, estimulando la producción de enzimas inductivas determinantes en el proceso de biodegradación. Con el uso de la coloración diferencial, se corroboró la morfología y la clasificación Gram (Microscopio Olympus Modelo CH30RF100)

3.2.2 Pruebas para evaluar la tolerancia al cianuro del aislado *Pseudomonas* sp. Se realizaron pruebas en tres medios a una concentración dada de cianuro, cinco diferentes pH y con tiempo de exposición de 48 horas (Dimitry *et al.*, 2001; Betancur *et al.*, 2005), con el fin de determinar la tolerancia del aislado nativo de *Pseudomonas* sp. en las siguientes condiciones:

- Caldo peptonado al 1%, cianuro de sodio 500 ppm a pH 7.5, 8.5, 9.5, 10.5 y 11.5. a temperatura ambiente. (entre 26 y 28°C)

- Agua destilada, cianuro de sodio 500 ppm a pH 7.5, 8.5, 9.5, 10.5, 11.5 a temperatura ambiente. (entre 26 y 28°C)
- Buffer carbonato, cianuro de sodio 500 ppm, pH (9.3, 9.6). a temperatura ambiente. (entre 26 y 28°C).

Se determinó la viabilidad del aislado a través de la siembra en agar cetrimide (Merck, 2006) y la observación de formación de colonias típicas en este medio de cultivo. Por microscopia electrónica se observó el efecto de la concentración de cianuro en la morfología del aislado. La movilidad de las células se evidenció por observación en placa húmeda.

3.2.3 Establecimiento de la población inicial del inculo. La población celular a inocular en las pruebas siguientes se estableció mediante diluciones seriadas, recuento en placa en agar cetrimide, con medición de absorbancia a 600 nm. (Espectrofotómetro UV-VIS COLE-PARMER modelo 83055-20)

El cultivo celular en caldo nutritivo del aislado *Pseudomonas* sp, se obtuvo después de 24 horas de incubación a 36°C y fue lavado dos veces con solución de buffer carbonato 1M pH 9.3. Se centrifugó a 7155.2 g. (centrifuga con radio del rotor de 4 cm, BECTON DICKINSON) y se resuspendió en la misma solución buffer para establecer una densidad óptica próxima a 1 en 600 nm, midiendo la muestra original y diluciones desde 10^{-1} - 10^{-6} UFC/mL (Atsushi, *et al.*, 1998). El recuento estándar en placa presentó un estimado del número de UFC/mL de inculo con densidad óptica 1 más o menos 0.6. Para determinar las concentraciones óptimas del inculo, se relacionó gráficamente la absorbancia y con el número de UFC/mL de muestra.

3.2.4 Evaluación del porcentaje de recuperación de cianuro en diferentes medios. Para evaluar el efecto del pH y de materiales como arena y carbonatos en la recuperación de cianuro, se probaron ocho medios; cuatro en

buffer carbonato y cuatro sin buffer carbonato, a diferentes pH y con 500 ppm de NaCN.

- a. Dos medios con buffer carbonato, pH 9.3 y 9.6
- b. Dos medios con buffer carbonato y arena, pH 9.3 y 9.6.
- c. Dos medios en agua, pH 9.3 y 9.6.
- d. Dos medios en agua y arena, pH 9.3 y 9.6

Los pH alcalinos fueron definidos considerando que el NaCN se pierde por volatilización a pH menor o igual a 8 y que casi todo el cianuro libre se encuentra como HCN (Logsdon *et al.*, 2006).

El ajuste y mantenimiento del pH en los medios sin buffer carbonato se realizó con solución de NaOH al 1N.

Para cada medio se realizaron tres montajes, obteniéndose tres datos para cada condición.

3.2.5 Verificación de la precisión para el método titulométrico, límites de detección y cuantificación para el método del electrodo ión selectivo para amonio y para el espectrofotómetro UV-VIS. La verificación de la exactitud para el método titulométrico se realizó titulado una alícuota de 3 mL de muestra patrón con concentración conocida de 500 ppm de NaCN, se realizaron tres titulaciones a la muestra patrón y se calculó el porcentaje de error para el mismo, ver tabla 1.

Las titulaciones a la muestra patrón se realizaron con nitrato de plata (AgNO_3) 0.01 N (titulante) y yoduro de potasio (KI) como indicador. En un beaker se agregó agua destilada, 3 mL de muestra y dos gotas de yoduro de potasio. Se valoró el cianuro de la muestra alcalina contenida en el beaker, con AgNO_3 para formar el cianuro complejo soluble $\text{Ag}(\text{CN})_2$, cuando se ha complejado todo el CN^- y exista un pequeño exceso de Ag^+ añadido, este es detectado con el indicador KI sensible a la plata, que vira a un color amarillo muy tenue. El

indicador es sensible a 0.1 mg de Ag/L. El límite de sensibilidad del método titulométrico es de 0.1 mg CN⁻/L.

Los resultados se obtienen después de multiplicar la diferencia entre el volumen inicial y final del AgNO₃ utilizado en cada título, por el volumen de muestra original y dividirlo por los mililitros de muestra utilizados para titular, este resultado corresponde a los mililitros de AgNO₃ que reaccionaron con el indicador KI y se complejaron con el ion cianuro. Finalmente se multiplican por el factor de conversión 0.00098015 g. de CN⁻ /1mL de AgNO₃ y se obtiene el valor en gramos de cianuro medido. (APHA, 1998). Se verificó la repetibilidad del método titulométrico multiplicando la desviación estándar por 4.3, valor recomendado en cuantificación de la incertidumbre en mediciones analíticas (Eurochem/CITAC Guide, 2000).

Tabla 1. Precisión del método titulométrico para la medición de concentración de NaCN.

Muestra patrón (g de NaCN)	(g de NaCN) por Titulación			Valor promedio (g de NaCN)	% error del método Titulométrico	Desviación estándar	Repetibilidad
	Título 1	Título 2	Título 3				
0.50	0.4312	0.3724	0.4508	0.4182	16.36	0.0408000654	0.17544281

Los límites de detección y cuantificación para el método potenciométrico, utilizando un electrodo selectivo para el ión amonio, son 0.024 y 0.220 ppm de amonio respectivamente.

El límite de detección o sensibilidad para los espectrofotómetros UV-VIS es de absorbancia 0.004, lo que corresponde un porcentaje de transmitancia del 99%; es decir, valores de absorbancia cercanos a los que produce un blanco.

3.2.6 Curvas de comportamiento poblacional, producción de amonio y biodegradación de cianuro. El comportamiento poblacional del aislado bacteriano en presencia de cianuro, se determinó utilizando como inóculo una población celular en 4.0 mL de solución buffer carbonato, de densidad óptica 0.030 a 600 nm, correspondiente a 2.7×10^9 UFC/mL y se comparó con un control libre de cianuro, siguiendo el método de Mac-Farland.

Para verificar la transformación del compuesto cianurado, se midió la concentración de amonio inicial y el generado por el método del ión electrodo selectivo para amonio, la concentración de cianuro inicial y residual por el método titulométrico (APHA, 1998), y el comportamiento poblacional por mediciones en el espectrofotómetro a 600 nm, cada 24 horas, durante ocho días.

En el montaje se utilizaron ocho erlenmeyer de vidrio, cada erlenmeyer contenía un volumen de 75 mL de buffer carbonato, pH 9.6, 1200 ppm de NaCN, y un erlenmeyer control con las mismas condiciones, pero libre de cianuro. Las mediciones se realizaron por triplicado para cada variable y el experimento se repitió teniendo en cuenta las condiciones antes mencionadas.

3.3 BIODEGRADACION DE CIANURO DE SODIO (NaCN)

Se dispusieron tres bioensayos. De acuerdo con las pruebas preliminares, el tiempo de duración para cada uno fue de 48 horas y el receso entre uno y otro fue de dos días. Como medios se utilizaron soluciones de cianuro de sodio NaCN a 1000 ppm, con y sin arena (la variable arena y su cantidad, 10 g en el medio son considerativas, al finalizar los bioensayos se definirá la capacidad de las bacterias como degradadoras de compuestos cianurados, teniendo en cuenta interferencias sólidas), en buffer carbonato para mantener estable el pH en 9.6 y 9.3; se consideraron dos temperaturas (27 y 32 °C) y dos tiempos (24

y 48 horas) de incubación. La variable respuesta fue ppm de cianuro biodegradado, al final de cada tiempo de incubación para cada bioensayo, determinada por el método titulométrico (APHA, 1998).

3.3.1 Eficiencia de la biodegradación de compuestos cianurados. Se probó la eficiencia del aislamiento nativo *Pseudomonas* sp. para degradar soluciones cianuradas (Buffer carbonato con arena y Buffer carbonato), con concentración determinada de cianuro de sodio de 1000 ppm a pH 9.3 y pH 9.6. Al final del proceso de biodegradación se midió la concentración de cianuro residual, por el método titulométrico para medir Cianuro, (APHA, 1998). Los resultados se presentaron como ppm de cianuro biodegradado.

Se inocularon 16 erlenmeyer con el aislado de *Pseudomonas* sp., cada uno con un volumen de 50 mL de solución cianurada, como controles, ocho erlenmeyer de vidrio adicionales, con las mismas condiciones pero sin inóculo y se realizaron mediciones de la concentración residual de cianuro a las 24 y 48 horas para dos temperaturas de incubación 27°C y 32°C, tanto a los erlenmeyer inoculados como a los controles.

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

- Cuatro erlenmeyer de vidrio con 50 mL de buffer carbonato, 1000 ppm de cianuro de sodio y pH 9.3 fueron inoculados con el aislado de *Pseudomonas* sp.. Dos erlenmeyer se incubaron a 27°C y otros dos a 32°C. Como controles se tomaron dos erlenmeyer de vidrio con las mismas condiciones pero sin inóculo bacteriano, uno para cada temperatura.
- Cuatro erlenmeyer de vidrio con 50 mL de buffer carbonato, 10 g de arena, 1000 ppm de cianuro de sodio y pH 9.3 fueron inoculados con el aislado de *Pseudomonas* sp. Dos erlenmeyer se incubaron a 27°C y otros dos a 32°C.

Como controles se tomaron dos erlenmeyer de vidrio con las mismas condiciones pero sin inóculo bacteriano, uno para cada temperatura.

- Cuatro erlenmeyer de vidrio con 50 mL de buffer carbonato, 1000 ppm de cianuro de sodio y pH 9.6 fueron inoculados con el aislado de *Pseudomonas* sp. Dos erlenmeyer se incubaron a 27°C y otros dos a 32°C. Como controles se tomaron dos erlenmeyer de vidrio con las mismas condiciones pero sin inóculo bacteriano, uno para cada temperatura.
- Cuatro erlenmeyer de vidrio con 50 mL de buffer carbonato, 10 g de arena, 1000 ppm de cianuro de sodio y pH 9.6 fueron inoculados con el aislado de *Pseudomonas* sp. Dos erlenmeyer se incubaron a 27°C y otros dos a 32°C. Como controles se tomaron dos erlenmeyer de vidrio con las mismas condiciones pero sin inóculo bacteriano, uno para cada temperatura.

Se hicieron mediciones de concentración residual de cianuro de sodio por el método titulométrico (APHA, 1998) cada 24 horas, por dos días, tablas 8 y 9. Los resultados se presentaron como ppm de cianuro biodegradados.

Los ensayos se realizaron en condiciones aeróbicas ya que los erlenmeyer no fueron mantenidos en campanas de anaerobiosis y su boca fue cubierta con tapones de gasa y algodón, pero el oxígeno no fue una variable fisicoquímica medida durante el tiempo de exposición al contaminante. Se cuenta con un aislado bacteriano aerobio, además se ha demostrado que el oxígeno juega un papel importante como intermediario en la transferencia de electrones y actúa como reactivo en el proceso oxidación de liberación de cianuro a especies de cianato (López *et al.*, 2009),

Para cada uno de los tres bioensayos se tomó un mL de población inóculo, con una absorbancia de 0,492 correspondiente a 4.89×10^{10} UFC/mL de muestra. (Cuenta Colonias Darkfiel Quebec Modelo 3330)

3.3.2 Diseño experimental. Las pruebas preliminares se evaluaron mediante regresión lineal simple. Para los bioensayos se realizó un análisis de varianza

multifactorial de efectos fijos, utilizando el GraphPad Software, Inc. Versión 5.00 GPW5041802Ree9025, para establecer un seguimiento de la biodegradación del compuesto cianurado por parte del aislado, frente a unas condiciones determinadas de pH, temperatura, concentración de cianuro, medio y tiempo de incubación, factores que influyen en la degradación de compuestos xenobióticos (Singleton, 2004). Los factores establecidos fueron:

1. medio, con dos niveles (Buffer carbonato mas arena y Buffer carbonato).
2. pH, con dos niveles (9.3 y 9.6).
3. Temperatura de incubación, con dos niveles (27°C y 37°C).
4. Tiempo de incubación, con dos niveles (24 y 48 horas).

Se consideró una variable respuesta: ppm de NaCN biodegradado (Wayne, 1996; Díaz, 1999).

Las tablas 2 y 3, muestran los diferentes factores evaluados durante la cuantificación de cianuro remanente, cuando las unidades experimentales fueron inoculadas con el aislado *Pseudomonas* sp., y en los controles, sin inoculación del aislado bacteriano nativo.

La tabla 2 muestra como se recopilaron los resultados de cianuro biodegradado, después de exponer el aislado bacteriano *Pseudomonas* sp. a 1000 ppm de NaCN en buffer carbonato y buffer carbonato mas arena, a pH 9.3 y 9.6 y temperaturas de 27 y 32°C, por triplicado con valoraciones a las 24 y 48 horas.

Tabla 2. Modelo del diseño experimental.

MEDIO (1000 ppm NaCN)		pH	T°C	PPM DE CIANURO BIODEGRADADOS (TRES BIOENSAYOS)					
				0-24 HORAS			0-48 HORAS		
				1 BIOENSAYO	2 BIOENSAYO	3 BIOENSAYO	1 BIOENSAYO	2 BIOENSAYO	3 BIOENSAYO
CON <i>Pseudomonas</i> sp.	BUFFER	9,3	27						
	ARENA								
	BUFFER	9,6	27						
	ARENA								
	BUFFER	9,6	32						
	ARENA								
	BUFFER	9,3	32						
	ARENA								
BUFFER									

La tabla 3 muestra el modo en que se registraron los controles, a diferencia de la tabla 2 estos van sin inocular con el aislado nativo bacteriano *Pseudomonas* sp. se muestra como cada control se evaluó bajo las mismas condiciones de las unidades experimentales: dos medios con 1000 ppm de NaCN en buffer carbonato y buffer carbonato mas arena, dos pH 9.3 y 9.6, dos temperaturas 27 y 32°C, por triplicado realizando mediciones de la concentración de cianuro cada 24 y 48 horas.

Tabla 3. Modelo de registro para los controles.

MEDIO (1000 ppm NaCN)		pH	T°C	PPM DE CIANURO BIODEGRADADOS (TRES BIOENSAYOS)					
				0-24 HORAS			0-48 HORAS		
				1 BIOENSAYO	2 BIOENSAYO	3 BIOENSAYO	1 BIOENSAYO	2 BIOENSAYO	3 BIOENSAYO
SIN <i>Pseudomonas</i> sp.	BUFFER	9,3	27						
	ARENA								
	BUFFER	9,6	27						
	ARENA								
	BUFFER	9,6	32						
	ARENA								
	BUFFER	9,3	32						
	ARENA								
BUFFER									

4. RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos de las pruebas descritas en el capítulo anterior, se presentan en las figuras 2 a 27, en estas, se evidencia el comportamiento del aislado bacteriano nativo frente a las pruebas bioquímicas realizadas y a las variaciones en el pH (7.5; 8.5; 9.3; 9.5; 9.6; 10.5 y 11), además de su crecimiento en presencia del compuesto cianuro de sodio (NaCN), su biodegradación y generación de amonio como producto del proceso. En las tablas 4 a 7, se presentan los resultados de movilidad celular, porcentaje de recuperación de cianuro en medios con buffer carbonato a diferentes pH y la ANOVA multifactorial donde se muestran los efectos de cada factor de manera independiente (la presencia o no de *Pseudomonas*, temperatura, pH, medio y tiempo de incubación) y las interacciones entre ellos sobre la variable independiente (ppm de cianuro biodegradado). Finalmente se incluye la tabla correspondiente al diseño experimental donde se muestran las ppm de cianuro de sodio biodegradados en cada condición establecida para el diseño.

4.1 IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DEL AISLADO

Para caracterizar el aislado bacteriano nativo se utilizaron nueve pruebas bioquímicas, las cuales se muestran en las figuras 2 a 13.

En la figura 2 se observa el resultado positivo para la prueba de motilidad o movilidad en agar blando prueba positiva (derecha) y negativa (izquierda), este resultado determina la presencia de flagelos posiblemente polares, en las células bacterianas. Para el género *Pseudomonas* la movilidad es variable, por lo general positiva (MacFaddin, 2003; Callicó, *et al.*, 2004).

Figura 2. Crecimiento en agar blando de *Pseudomonas* sp., derecha (motilidad +) izquierda (motilidad-)



La prueba de la urea, figura 3, determina la capacidad del aislado bacteriano para hidrolizar la urea por la acción de la enzima ureasa alcalinizando el medio, esto se verifica por el cambio de color, el medio vira de amarillo a rosado pálido. Para el género *Pseudomonas* este resultado es variable, es decir, algunas especies pueden tener esta capacidad pero otras no, en este caso, para el aislado nativo fue positivo, figura de la derecha. (MacFaddin, 2003; Qinchía, *et al.*, 2006).

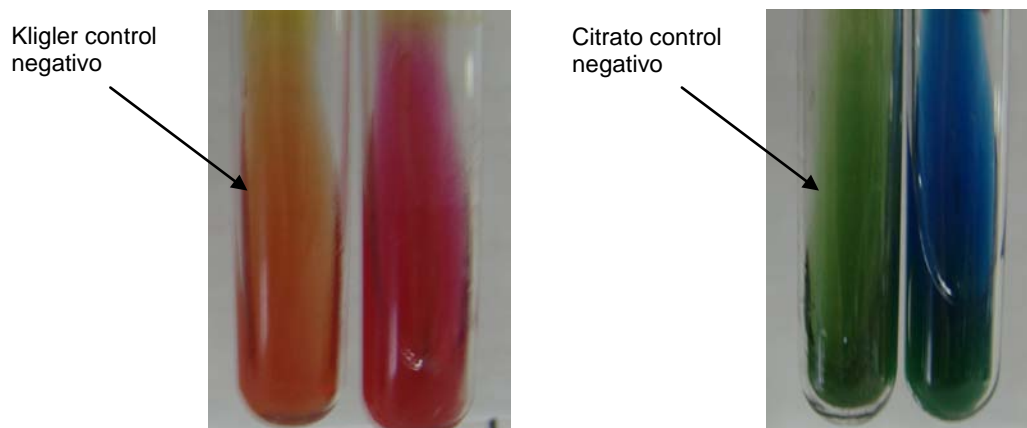
Figura 3. Prueba de la urea. Determina la conversión de urea en $\text{CO}_2 + \text{NH}_3$, por acción de la enzima ureasa. Derecha urea positiva, izquierda urea negativa.



La prueba en agar con hierro de Kligler (KIA), figura 4 izquierda, determina la capacidad de un microorganismo para fermentar o no un carbohidrato específico incorporado en el medio, lactosa y glucosa en este caso, con

producción de gas o sin ella y determinación de la posible producción de ácido sulfhídrico. El aislado bacteriano nativo no puede obtener sus nutrientes a partir de estos carbohidratos, por lo tanto depende de la peptona del medio, cuando la peptona se degrada, el medio es alcalinizado tornándose rojo profundo, por la producción de amoníaco (NH_3). No hay producción de gas ni de ácido sulfhídrico. En la prueba del Citrato, figura 4 derecha, se evidencia la capacidad del aislado bacteriano para utilizar el citrato como única fuente de carbono, el medio para la fermentación del citrato posee sales inorgánicas de amonio. Si el microorganismo posee la capacidad de utilizar el citrato como única fuente de carbono, también utiliza las sales de amonio como única fuente de nitrógeno, del metabolismo de estas se genera amoníaco (NH_3) aumentando la alcalinidad del medio, éste cambia de un color verde a azul. Estos resultados son compatibles con el comportamiento metabólico de algunas especies pertenecientes al género *Pseudomonas* en las mismas condiciones (MacFaddin, 2003; Callicó, *et al.*;2004; Qinchía, *et al.*, 2006).

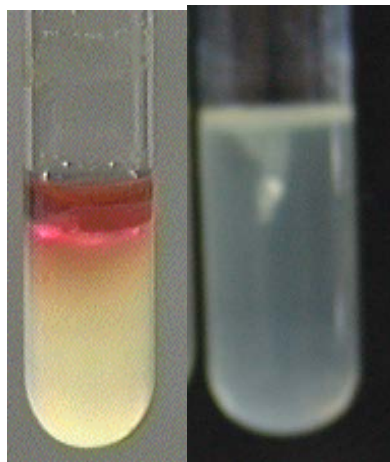
Figura 4. Crecimiento en medio Kligler, izquierda (alcalino) y Citrato de Simmons derecha (+, utilizó el citrato como única fuente de C)



La prueba del indol, figura 5, determina la capacidad del aislado bacteriano para obtener indol a partir de la oxidación del triptófano que se encuentra en el medio, la presencia del indol es evidenciada por la reacción de este con el reactivo de Kovacs, que se adiciona después de 24 o 48 horas de incubación directamente en el tubo de ensayo, formándose un anillo violeta en la superficie

del medio de cultivo, en este caso no se dio la reacción y por tanto no se hayo presencia de indol, no hubo ningún desarrollo de color, este resultado es compatible con algunas especies de *Pseudomonas* (MacFaddin, 2003; Callicó, *et al.*;2004; Qinchía, *et al.*, 2006).

Figura 5. Prueba del indol negativa derecha, el aislado *Pseudomonas* sp. no oxidó triptófano. El tubo de la izquierda muestra una prueba positiva (anillo violeta) para *Escherichia coli*.



El agar McConkey, figura 6, es un medio diferencial para la determinación de bacterias pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae, por la utilización del carbohidrato lactosa con variaciones en el pH, también es selectivo para el crecimiento de bacterias Gram negativas, todas las bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas* manifiestan crecimiento en este medio ya que son bacilos Gram negativos, pero no son fermentadoras de lactosa. (MacFaddin, 2003; Callicó, *et al.*;2004).

La figura 6 muestra crecimiento positivo, el color claro de las colonias, evidencia la incapacidad del microorganismo de fermentar la lactosa suministrada por el medio. (MacFaddin, 2003; Callicó, *et al.*;2004).

Figura 6. Crecimiento en agar McConkey positivo para el aislado *Pseudomonas* sp. , se observan colonias claras lactosa negativas derecha. Aspecto del agar McConkey sin inocular, izquierda.

Control negativo

Colonias claras
lactosa negativas

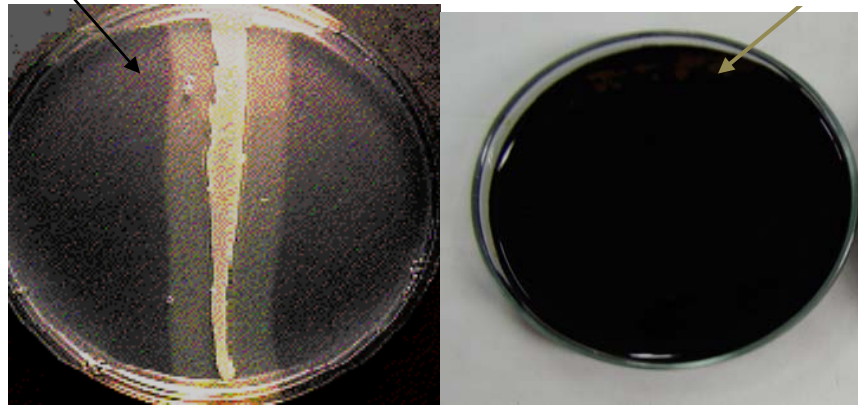


El principio de la prueba de almidón, figura 7, es determinar la capacidad de un microorganismo para hidrolizarlo por medios enzimáticos, para evidenciar la desaparición del almidón se utiliza yodo. El almidón está constituido por amilosa y amilopeptina, la fracción amilosa del almidón se combina con el yodo y produce un complejo azul intenso profundo, el yodo queda atrapado dentro de la hélice no ramificada de unidades de glucosa de la cadena amilosa, si esta red se desintegra, como ocurre durante la hidrólisis del almidón, el color azul se pierde y se obtendría ausencia de color. El cultivo del aislado nativo no manifestó la pérdida del color azul, se concluye que no se dio la hidrólisis del almidón. Esta prueba ayuda a diferenciar especies de *Pseudomonas saccharphila* y *stutzeri* para las cuales la reacción es positiva, de otras especies de *Pseudomonas* aisladas con más frecuencia, con respuesta negativa (MacFaddin, 2003).

Figura 7. Derecha crecimiento en agar almidón. El aislado *Pseudomonas sp.* no hidrolizó el almidón, izquierda control positivo *Bacillus sp* que hidroliza el almidón.

Zona clara que evidencia la producción de amilasas

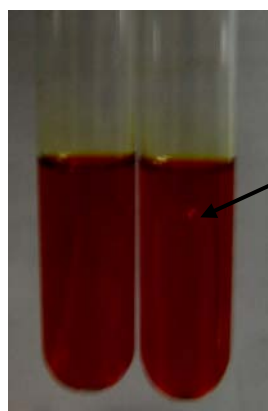
Colonias sin zona clara al rededor



La prueba de carbohidratos se basa en la capacidad de un microorganismo para fermentar un carbohidrato específico, para el caso del aislado nativo se empleo la xilosa, figura 8, el resultado es positivo y es evidenciado en la producción de gas contenido en la campana de Durham, algunas especies de *Pseudomonas* tienen esta capacidad (MacFaddin, 2003; Callicó, *et al.*;2004).

Figura 8. Prueba de fermentación de carbohidratos. El aislado *Pseudomonas sp.* Fermentó la Xilosa (derecha).

Control negativo



Burbuja en campana de Durham

El agar P, figura 9, es un medio de cultivo utilizado para el aislamiento, la detección y la diferenciación de especies de *Pseudomonas* spp. con base en la producción de piocianina.

En el medio de cultivo, la peptona de gelatina aporta los nutrientes necesarios para el desarrollo bacteriano, la glicerina favorece la producción de pigmentos, las sales de magnesio y potasio estimulan la producción de piocianina y piorrubina e inhiben la producción de fluoresceína.

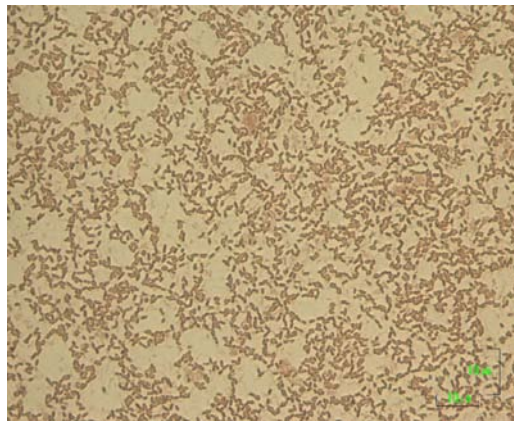
Un resultado positivo es por observación de los pigmentos piocianina y/o piorrubina. La producción de piocianina se observa como una zona color azul, azul-verdoso que rodea la colonia, o que se extiende en todo el medio de cultivo, debido a la difusión del pigmento, cuya producción es regulada por los genes *phzM* y *phzS*, que codifican dos enzimas específicas, la metiltransferasa y flavin-containing monooxigenasa respectivamente (Dmitri *et al.*, 2001). La producción de piorrubina se observa como una zona de color rojo alrededor de la colonia o que se extiende en todo el medio de cultivo, debido a la difusión del pigmento. En este caso, para el aislado bacteriano nativo el resultado fue positivo para la producción de piocianina (MacFaddin, 2003; Qinchía, *et al.*, 2006).

Figura 9. Crecimiento abundante a 37°C en agar P. la parte superior muestra la producción de piocianina evidenciada en la coloración azul verdosa.



La figura 10 es una fotografía al microscopio binocular compuesto del aislado nativo *Pseudomonas* sp., teñido con la técnica diferencial de Gram. Esta técnica permite diferenciar las células Gram positivas (se tiñen de color morado) de las Gram negativas (se tiñen de color rosado) y permite realizar una clasificación de la morfología bacteriana. Se observan bacilos Gram negativos, largos y ligeramente curvos, no helicoidales, no formadores de esporas tal como se describen en MacFaddin, 2003 para las especies de *Pseudomonas*.

Figura 10. Coloración de Gram. Se observan bacilos largos ligeramente curvados Gram negativos.

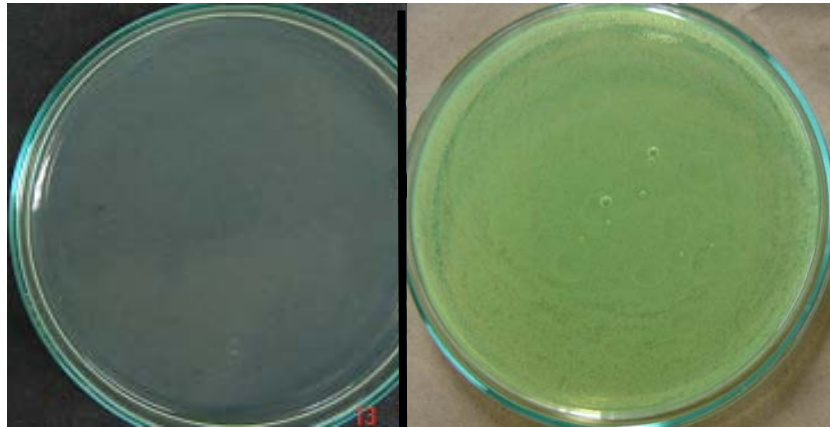


La figura 11 presenta el crecimiento del aislado nativo en agar Cetrimide. El agar Cetrimide está compuesto de amonio cuaternario que es un inhibidor de gran variedad de especies bacterianas incluyendo muchas especies de *Pseudomonas*. Lo que permite obtener un cultivo de este género más selectivo. La producción del pigmento pirocianina esta producción se ve estimulada por el magnesio, cloruro de potasio y sulfato presentes en el medio.

Se observaron las colonias rodeadas de un pigmento azul-verde y fluo corta longitud de onda (254 nm), a la luz ultravioleta pueden ser presuntamente identificados como *Pseudomonas aeruginosa*. Sin embargo, hay ciertas cepas de *P.* no pueden producir. Otras especies de *Pseudomonas* no producen pero fluorescen a la luz ultravioleta. Especies bacterianas diferentes de *Pseudomonas* y otras pertenecientes a este género son inhibidas por este

medio. La tinción de Gram y pruebas bioquímicas confirman los resultados de que efectivamente el aislado nativo se asume como *Pseudomonas*. (Merck, 2008; Difco, 2009)

Figura 11. Crecimiento en agar cetrimide del aislado *Pseudomonas* sp. derecha. Agar cetrimide sin inocular izquierda.



El aislado bacteriano nativo respondió positivamente a las pruebas de Carbohidratos (medio Kligler), Citrato, Motilidad, Urea, fermentación de la xilosa, crecimiento en agar McConkey y producción de piocianina en agar P y Cetrimide.

Se obtuvo un aislado compatible con el género *Pseudomonas* sp. (Macfaddin, 2003; Quinchía *et al*, 2006). Bacilos Gram negativos, y con crecimiento típico para *Pseudomonas* en medio selectivo agar cetrimide, colonias verde azuladas y fluorescentes a la luz UV (Merck, 2006), como se observan en la figura 11, derecha.

4.2 DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES DE BIODEGRADACIÓN

- **Tolerancia al cianuro por el aislado *Pseudomonas* sp.** En las figuras 12 a 16 se muestra el número de UFC/mL de muestra y producción de pigmento pirocianina del aislado bacteriano *Pseudomonas* sp. en agar Cetrimide, después de estar expuesto a 500 ppm de NaCN y pH desde 7.5 a 11, en medios líquidos, durante 48 horas. En estas condiciones el pH varía con el tiempo ya que para estas pruebas no se usó una solución reguladora del pH y este fue ajustado adicionando a los medios NaOH 1N.

En la figura 17 se presenta el número de UFC/mL de muestra y producción de pirocianina del aislado bacteriano *Pseudomonas* sp. en agar Cetrimide después de estar expuesto a 500 ppm de NaCN y pH de 9.3 y 9.6 en buffer Carbonato, manteniéndose el pH constante durante 48 horas.

- **Comportamiento del aislado *Pseudomonas* sp..** En la tabla 6 se presentan los resultados de las mediciones del porcentaje de recuperación de cianuro realizadas a las 0, 24 y 48 horas en medios sin inocular con el aislado *Pseudomonas* sp:

- Buffer carbonato con y sin arena a pH de 9.3 y 9.6.
- Agua destilada. con y sin arena a pH de 9.3 y 9.6, ajustados con solución de NaOH 1 N.

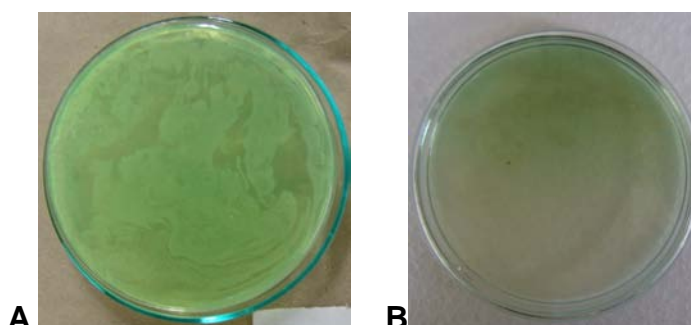
Estas mediciones se realizaron con el fin de seleccionar un medio que ofreciera una retención del 100% de NaCN, garantizando en las pruebas de biodegradación que la disminución de cianuro era por acción del microorganismo.

En las figuras 20 a 23 y en la tabla 6, se muestra el desarrollo poblacional, biodegradación de cianuro y generación de amonio por el aislado *Pseudomonas* sp., en buffer carbonato con 1200 ppm de cianuro de sodio a pH 9.6, durante ocho días.

4.2.1 Pruebas de activación y evaluación de la tolerancia al cianuro de sodio por el aislado *Pseudomonas* sp. En la tabla 4 se resumen todas las condiciones evaluadas en estas pruebas para el aislado nativo *Pseudomonas* sp. y se muestran los números de UFC/mL de muestra, obtenidos en cada caso.

En la figura 12 a, se observan $6.4 \cdot 10^{13}$ UFC/mL de muestra del aislado *Pseudomonas* sp. en el agar Cetrimide después de estar inoculado en caldo peptonado expuesto a 500 ppm de NaCN y pH 7.5, el alto crecimiento y producción de pigmento pirocianina del aislado en el agar Cetrimide demuestran su capacidad para tolerar las condiciones anteriores y conservar su capacidad de división celular. La figura 12 b. muestra $1 \cdot 10^{12}$ UFC/mL de muestra y poca producción del pigmento pirocianina por el microorganismo en agar Cetrimide después de estar inoculado en medio líquido sin peptona, 500 ppm de NaCN y pH 7.5, esto implica que a este pH el microorganismo utiliza preferiblemente la peptona como fuente de carbono y nitrógeno y se le dificulta utilizar el cianuro para este fin.

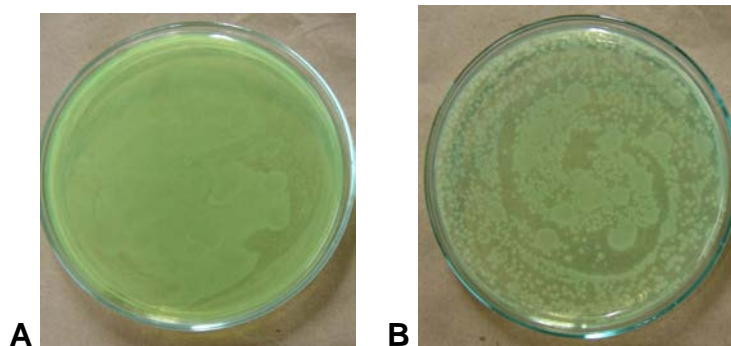
Figura 12. UFC/mL de muestra en agar cetrimide del aislado *Pseudomonas* sp., después de medios líquidos con caldo peptonado, 500ppm de NaCN y pH 7.5 (A) y sin caldo peptonado, 500ppm de NaCN y pH 7.5 (B).



La figura 13 A, muestra $6.4 \cdot 10^{13}$ UFC/mL de muestra del aislado *Pseudomonas* sp. en agar Cetrimide después de pasar por caldo peptonado con 500 ppm de

NaCN y pH 8.5, igualmente en la figura 13 B, se observa un buen número, $6.4 \cdot 10^{14}$ UFC/mL de muestra del aislado *Pseudomonas* sp. en agar Cetrimide después de pasar por medio líquido con 500 ppm de NaCN y pH 8.5. Estos resultados evidencian el efecto que tiene el pH en el uso de la fuente de carbono y nitrógeno por parte del aislado nativo *Pseudomonas* sp.

Figura 13. UFC/mL de muestra en agar cetrimide del aislado *Pseudomonas* sp., después de medios líquidos con caldo peptonado, 500ppm de NaCN y pH 8.5 (A) y sin caldo peptonado, 500ppm de NaCN y pH 8.5 (B).



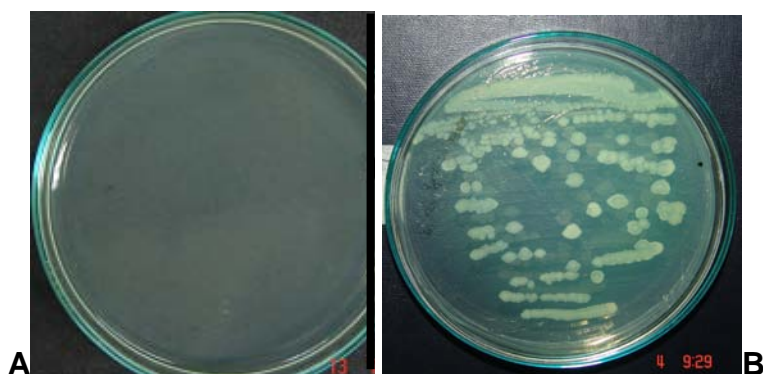
La figura 14 muestra $1.0 \cdot 10^{10}$ UFC/mL de muestra y producción de pigmento pircianina por el aislado nativo *Pseudomonas* sp. en agar Cetrimide después de estar expuesto a 500 ppm de NaCN y pH 9.5 en medio líquido sin caldo peptonado. Después del medio con adición de caldo peptonado a pH 9,5 no se observó crecimiento en agar Cetrimide, lo que muestra la posibilidad de que a pH fuertemente alcalinos y presencia de NaCN, la peptona se convierte en un interferente, por su composición (nitrógeno amínico, cloruros y hierro entre otros) (Zhurbenko *et al.*, 2006) y reaccione con el cianuro dificultando la toma de carbono y nitrógeno por parte del aislado *Pseudomonas* sp. (Luque *et al.*, 2005).

Figura 14. UFC/mL de muestra en agar cetrimide del aislado *Pseudomonas* sp., después de medios líquidos sin adición de caldo peptonado, a pH 9.5, 500 ppm de NaCN.



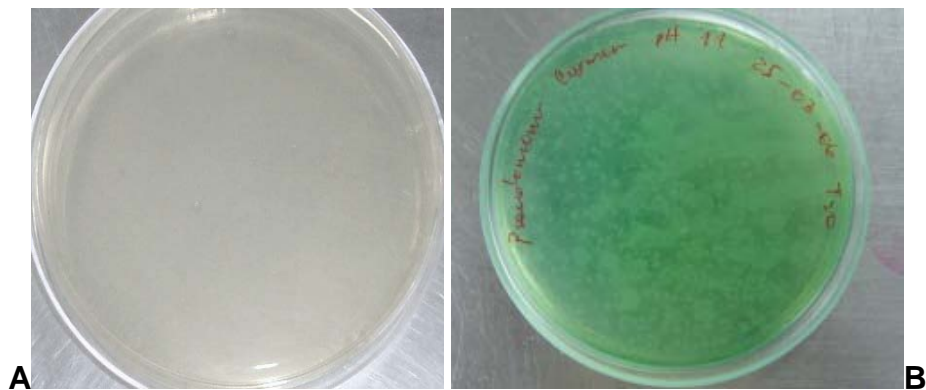
En la figura 15 se observan $46 \cdot 10^6$ UFC/mL de muestra y producción de pigmento del aislado *Pseudomonas* sp. en agar Cetrimide, después de estar expuesto a 500 ppm de NaCN y pH 10.5 en medio líquido sin caldo peptonado, figura 15 B. Después del medio con adición de caldo peptonado a pH 10.5 no se observó crecimiento en el agar cetrimide, figura 15 A, corroborando el efecto del pH alcalino y la interferencia de la peptona, en la toma de carbono y nitrógeno por parte del aislado *Pseudomonas* sp. (Luque et al., 2005).

Figura 15. UFC/mL de muestra en agar cetrimide del aislado *Pseudomonas* sp., después de medios líquidos con caldo peptonado, pH 10.5, 500ppm de NaCN (A) y sin caldo peptonado pH 10.5, 500ppm de NaCN (B).



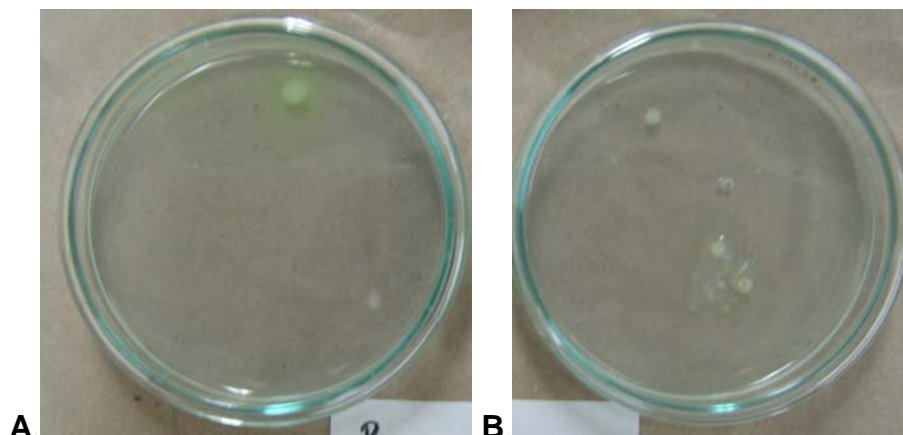
En la figura 16 B, se observan 6.4×10^{11} UFC/mL de muestra y producción de pigmento por el aislado *Pseudomonas* sp. en agar cetrimide, después de estar inoculado en agua destilada sin peptona con 500 ppm de NaCN a pH 11. Después de estar expuesto al medio con adición de caldo peptonado a pH 11 no se observó crecimiento en el agar cetrimide, figura 16 A, corroborando el efecto del pH alcalino y la interferencia de la peptona, en la toma de carbono y nitrógeno por parte del aislado *Pseudomonas* sp. (Luque et al., 2005).

Figura 16. UFC/mL de muestra en agar Cetrimide del aislado *Pseudomonas* sp., después de medios líquidos con caldo peptonado, pH 11, 500ppm de NaCN (A) y sin caldo peptonado pH 11, 500ppm de NaCN (B).



La figura 17 muestra el crecimiento del aislado *Pseudomonas* sp. en medio agar Cetrimide. Después de estar inoculado en medio buffer carbonato, 500 ppm de NaCN a pH 9.3 figura 17 A, y pH 9.6 figura 17 B, en ambos casos se observa escaso crecimiento bacteriano, 200×10^0 UFC/mL de muestra y 1.5×10^3 UFC/mL de muestra respectivamente, pero las colonias conservan su morfología clásica en el medio Cetrimide evidenciada en la producción de pigmento.

Figura 17. UFC/mL de muestra en agar cetrimide del aislado *Pseudomonas* sp., después de buffer carbonato, (A) pH 9,3 y (B) pH 9,6, con 500ppm de NaCN.



En la tabla 4 se resumen todas las condiciones evaluadas en las pruebas de activación y tolerancia realizadas con el aislado nativo *Pseudomonas* sp. y se muestran los números de UFC/mL de muestra, obtenidos en cada caso.

Tabla 4. Resultados de las pruebas de activación y tolerancia del aislado nativo *Pseudomonas* sp. al compuesto NaCN.

MEDIO	PPM NaCN	pH	UFC/mL de muestra (agar cetrimide)	PRODUCCION DE PIOCIANINA
AGUA DESTILADA Y PEPTONA	500	7.5	6.4×10^{13}	SI
AGUA DESTILADA	500	7.5	1×10^{12}	SI
AGUA DESTILADA Y PEPTONA	500	8.5	6.4×10^{13}	SI
AGUA DESTILADA	500	8.5	6.4×10^{14}	SI
AGUA DESTILADA	500	9.5	1.0×10^{10}	SI
AGUA DESTILADA Y PEPTONA	500	9.5	0.0	NO
AGUA DESTILADA	500	10.5	46×10^6	SI
AGUA DESTILADA Y PEPTONA	500	10.5	0.0	NO
AGUA DESTILADA	500	11	6.4×10^{11}	SI
AGUA DESTILADA Y PEPTONA	500	11	0.0	NO
BUFFER CARBONATO	500	9.3	200×10^0	SI
BUFFER CARBONATO	500	9.6	1.5×10^3	SI

Existen en la naturaleza algunos organismos capaces de crecer en presencia de cianuro, es el caso de *Boleophthalmus boddarti*, una especie de pez que tolera ciertas concentraciones de cianuro en el ambiente, esta tolerancia no envuelve la capacidad metabólica de degradarlo, como es el caso de algunas especies de *Pseudomonas* (Chew y I.P., 2005). En esta prueba se evidenció crecimiento en agar Cetrimide del aislado bacteriano evaluado, después de la exposición a 500 ppm de NaCN en agua destilada y en caldo peptonado a pH desde 7.5 a 8.5, observar tabla 4 y figuras 12 y 13. A pH 9.5, 10.5 y 11 no se evidenció crecimiento en agar Cetrimide para las células procedentes de caldo peptonado pero si lo hubo para las células cultivadas en medios líquidos sin adición de caldo peptonado y cianuro como única fuente de carbono y nitrógeno, como se observa en la tabla 4 y las figuras 14, 15 y 16, al igual que en las que fueron cultivadas en buffer carbonato a pH 9.3 y 9.6, presentado en la figura 17. Luque *et al.* en el 2005, encuentran algo similar, estableciendo condiciones fuertemente alcalinas y utilizando el cianuro como única fuente de nitrógeno para la cepa *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344, observando que se producía amonio en el proceso de degradación del cianuro y que ambos compuestos, cianuro y amonio, eran consumidos durante el proceso de biodegradación. Igualmente, al adicionar otro tipo de compuestos como hierro y algunas sustancias orgánicas, el cianuro reaccionaba químicamente con las mismas afectando el crecimiento de los microorganismos, debido a que el cianuro se asocia con estos elementos formando complejos, de los cuales el microorganismo no puede obtener carbono ni nitrógeno fácilmente, por lo tanto, recomiendan eliminar inicialmente cualquier sustancia orgánica o metales que se puedan acomplejar con el cianuro.

En el presente trabajo, particularmente para esta prueba, se utilizó peptona como compuesto adicional y se observó que a pH de 9.5, 10.5 y 11 los microorganismos no crecían en agar Cetrimide después de ser incubados en el caldo peptonado. La peptona es un compuesto que por su composición (nitrógeno amínico, cloruros y hierro entre otros) (Zhurbenko *et al.*, 2006)

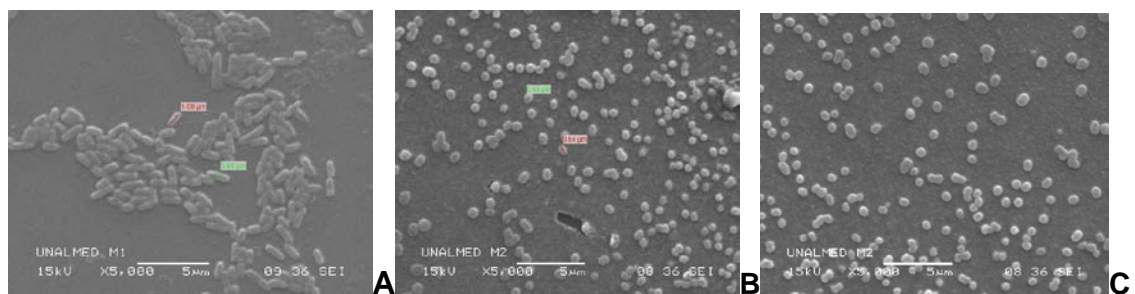
reacciona con el cianuro formando sales que dificultan la utilización de carbono y nitrógeno por parte del aislado *Pseudomonas* sp. Por tanto no se usa la peptona para los ensayos futuros propuestos en este trabajo. Estos resultados se correlacionan con los descritos por Luque *et al.*, 2005.

Por microscopia electrónica se evidenciaron cambios en la forma celular, de formas bacilares a cocobacilares, ver figura 18, como respuesta de la célula al estrés ambiental, ocasionado por la presencia del compuesto cianurado, NaCN y pH 9,6. (Garcés *et al*, 2006; Giraldo, 2007). La limitación de nutrientes como carbono, nitrógeno, hierro y fosforo también causan cambios en la forma celular, se han encontrado reportes de que en ausencia de fosforo se incrementa la toma de carbono por parte de las células, lo que favorece nuestro propósito, pues una fuente de carbono para el aislado *Pseudomonas* es el cianuro (Anders *et al*, 1990). El cambio en la forma celular y la limitación de hierro en el medio de cultivo sugieren la producción de sideróforos por parte del aislado bacteriano, aunque este metabolito no fue medido en el medio residual, es importante considerar esta variable para trabajos futuros ya que estos metabolitos son de gran interés en la agricultura para el control de algunas bacterias y hongos fitopatógenos (Díaz, 2002; Chen y Kunz, 2006).

La figura 18 A, muestra la morfología típica de bacilo para el aislado *Pseudomonas* sp., 24 horas después de inoculado en caldo peptonado a pH 7.0 sin adición de cianuro de sodio. La figura 18 B, muestra el cambio de la forma del aislado *Pseudomonas* sp., 24 horas después de inoculado en caldo peptonado con 500 ppm de NaCN a pH 9.0, las bacterias cambian de forma bacilar a forma cocobacilar; igualmente la figura 18 C. presenta formas cocobacilares del aislado *Pseudomonas* sp. 24 horas después de estar expuesto a buffer carbonato con 500 ppm de NaCN y pH 9.6. Este cambio morfológico se debe al estrés que causa el cianuro y el pH fuertemente alcalino sobre el microorganismo. Por su estado de oxidación la molécula del cianuro (+2 para el C y -3 para el N) es una buena fuente de nitrógeno y deficiente fuente de carbono, el pH afecta directamente los procesos de transporte a través de la membrana celular, por esto el microorganismo reduce su tamaño

celular, aumentando el área de exposición al medio para optimizar la toma de carbono y nitrógeno. (M. J. Huertas, *et al.*, 2006)

Figura 18. (A) Cultivo con 24 horas después de inoculado de células típicas *Pseudomonas* sp. en caldo peptonado pH 7. (B) Células *Pseudomonas* sp. después de 24 horas de inoculación en caldo peptonado con adición de 500 ppm de NaCN pH 9,5. C. cultivo con 24 horas de desarrollo de *Pseudomonas* sp. en Buffer carbonato con 500 ppm de NaCN pH 9,6.



Se observó al microscopio la movilidad del aislado en el medio con buffer carbonato a pH 9.3 y 9.6 para verificar la viabilidad de las células, tabla 5, este resultado es apoyado por las pruebas de motilidad mostradas en la figura 2 y de tolerancia al cianuro figura 17.

Tabla 5. Movilidad celular evidenciada en placa húmeda para el aislado *Pseudomonas* sp.

Aislado	Medio	NaCN ppm	pH	Movilidad 24 horas	Movilidad 48 horas
<i>Pseudomonas</i>	Buffer carbonato con/sin arena	500	9.3	positiva	positiva
	Buffer carbonato con/sin arena	500	9.6	positiva	positiva

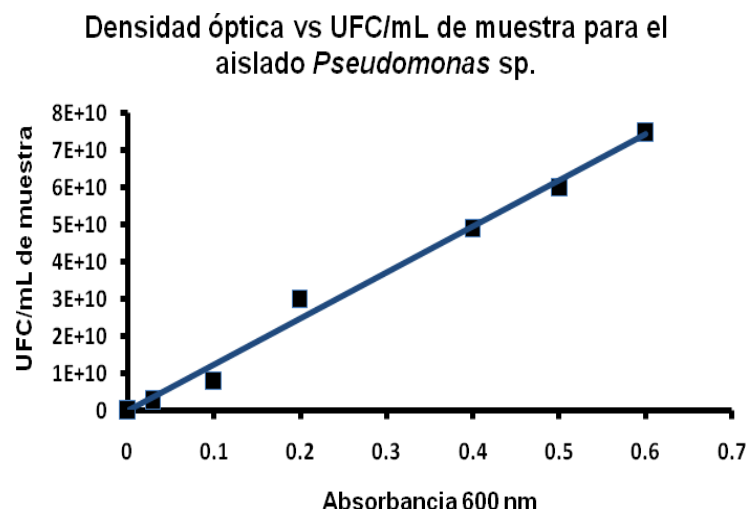
El aislado *Pseudomona* sp. presenta viabilidad positiva, reflejada en su movilidad, después de 48 horas de exposición a 500 ppm en buffer carbonato con o sin arena a pH 9.3 y 9.6.

4.2.2 Establecimiento de la población inicial del inóculo. En la figura 19, el modelo de regresión lineal entre los valores de las absorbancias tomadas a una longitud de onda de 600 nm, equivalentes en UFC/mL de muestra para los inóculos incubados, tiene un valor de $P < 0.0001$ y $r^2 0.9884$, es decir que X (Absorbancia) es útil para predecir a Y (UFC/mL de muestra), la ecuación del modelo lineal para describir la relación entre absorbancia y factor de dilución (UFC/mL de muestra) es:

$$\text{UFC/mL de muestra} = 1.0 \cdot 10^{11} \text{ Absorbancia} - 3.0 \cdot 10^8$$

Los inóculos del aislado *Pseudomonas* sp. evaluados en los preensayos con 500 ppm y 1200 ppm de cianuro de sodio durante dos y ocho días respectivamente, presentaban una absorbancia de 0.030 nm, correspondiente a $2.7 \cdot 10^9$ UFC/mL de muestra, para los bioensayos se utilizaron inóculos con absorbancia de 0.492 nm, lo que corresponde a $4.89 \cdot 10^{10}$ UFC/mL de muestra. La concentración del inóculo fue aumentada en los bioensayos con el fin de mantener o maximizar la remoción del cianuro, respecto a la observada en los preensayos por parte del aislado *Pseudomonas* sp., en un tiempo de 48 horas.

Figura 19. Gráfica de UFC/mL de muestra vs Absorbancia a una longitud de onda de 600 nm para el aislado *Pseudomonas* sp. $P < 0.0001$, $r^2 0.9884$



4.2.3 Evaluación del porcentaje de recuperación de cianuro en medios diferentes. Se realizaron tres mediciones seriadas de la concentración de cianuro a cada uno de los medios (0, 24 y 48 horas), con el método Titulométrico (APHA, 2008), sin ser inoculados con el aislado *Pseudomonas* sp. observar tabla 6.

Se seleccionaron para estas valoraciones pH de 9.3 y 9.6, con la intención de evitar pérdidas del cianuro de sodio por volatilización en forma de HCN, a estos pH, en las pruebas preliminares de tolerancia al NaCN, el aislado *Pseudomonas* sp. conservó su capacidad de división celular y producción de pigmento pirocianina, adaptándose al medio con un cambio en su morfología, (de formas típicas bacilares pH 7.0 a formas cocobacilares pH de 9.3 y 9.6) favoreciendo la toma de C y N. (Anders *et al.*, 1990; M. J. Huertas, *et al.*, 2006). El pH en los medios con agua destilada fue ajustado con solución de NaOH 1N, en este medio el pH variaba a través del tiempo y el cianuro se constituía como la única fuente de carbono para el microorganismo, factor que no favorecería las condiciones para las pruebas de biodegradación.

Tabla 6. Porcentaje promedio de recuperación de cianuro en medios con Buffer Carbonato y agua destilada a diferentes pH.

Medio de cultivo 50 mL	pH	CN ⁻ titulado (g) inicial	CN ⁻ titulado (g) 24 horas	CN ⁻ titulado (g) 48 horas	% CN ⁻ recuperado
Buffer Carbonato	9.3	0.0392	0.0392	0.0382	97.0
Buffer Carbonato	9.6	0.0392	0.0392	0.0392	100.0
Buffer Carbonato y arena	9,6	0.0594	0.0594	0.0594	100.0
Buffer Carbonato y arena	9,3	0.0519	0.0516	0.0503	96.0
Água destilada	9,3	0.0519	0.0395	0.0261	50.0
Agua destilada	9,6	0.0519	0.0490	0.0274	53.0
Água destilada y arena	9,3	0.0519	0.0490	0.0274	53.0
Agua destilada y arena	9,6	0.0519	0.0490	0.0274	53.0

La recuperación total del cianuro (100%), se dio en los medios con pH mayor o igual a 9.6 y con buffer carbonato o buffer carbonato con adición de arena. En

buffer carbonato a pH de 9.3 se observa una recuperación de 97% de cianuro después de 48 horas, observar tabla 6. Se eligieron los medios con Buffer carbonato para realizar los bioensayos, pues el porcentaje de recuperación de cianuro es aceptable y se garantiza la estabilidad del pH durante el tiempo de los bioensayos, en trabajos con células neuronales de gatos se ha verificado que el buffer carbonato es un medio eficiente en conservar el pH estable a través del tiempo y mantener las concentraciones de cianuro constante (Soto *et al.*, 2002). El aislado *Pseudomonas* sp. presenta movilidad positiva después de 48 horas de exposición, observar tabla 5. Por el contrario, en agua la retención del cianuro es mucho menor 50% a 53%, el pH no se mantiene constante a través del tiempo y las células bacterianas no presentan movilidad después de 48 horas de exposición. La recuperación de cianuro en los medios seleccionados fue más evidente, en el equilibrio entre el ión CN^- y HCN; a pH de 9.6 se encuentra que la especie predominante es el ión CN^- teniendo en cuenta que las concentraciones de CN^- y HCN se mantienen en igual proporción en la solución a un valor de pH aproximadamente de 9.4, figura 1 (Logsdon *et al.*, 2006; Gurbuz *et al.*, 2004). Es importante resaltar que el aislado de *Pseudomonas* sp., se ajusta a las condiciones de pH requeridas para la biorremediación de compuestos cianurados, pues toleró los medios con pH 9.6, sobrepasando la tolerancia de aislados pertenecientes a la misma especie evaluados en otros estudios, a pH de 7.0, 7.5 y 9.5 (Kunz *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1996).

No se observaron diferencias entre la retención de NaCN en los medios buffer carbonato y Buffer carbonato con arena, al parecer la arena no tiene efecto en la retención del compuesto cianurado, como si lo tiene el pH.

4.2.4 Curvas de comportamiento poblacional, producción de amonio y biodegradación de cianuro. En las figuras 20 a 23 se presentan los resultados de las pruebas donde se evaluó el comportamiento poblacional, la biodegradación de cianuro y la producción de amonio por parte del aislado *Pseudomonas* sp en buffer carbonato. Debido a que en las pruebas de

tolerancia, el aislado *Pseudomonas* sp soportó concentraciones de 500 ppm de NaCN, a pH 9.6, durante dos días, para las pruebas de comportamiento poblacional, biodegradación de cianuro y producción de amonio, se evaluaron concentraciones iniciales de 1200 ppm de NaCN al mismo pH, durante ocho días, con el fin de observar el comportamiento del microorganismo expuesto a concentraciones más altas de cianuro de sodio por periodos más largos y definir las mejores condiciones para aplicar en los bioensayos. En la tabla 7, se muestran los datos numéricos del porcentaje de remoción o biodegradación del compuesto NaCN por parte del aislado *Pseudomonas* sp, la generación de amonio y la variación poblacional.

La concentración de microorganismos fluctúa durante el tiempo en el que transcurre el ensayo y estas fluctuaciones tienen una relación directa con la biotransformación del cianuro y con la concentración de amonio en el medio, es decir la población bacteriana disminuye a medida que disminuye la concentración de cianuro pero se recupera cuando la concentración de amonio en el medio aumenta. El cianuro es la fuente del nitrógeno amoniacal y este a su vez es utilizado por el aislado *Pseudomonas* sp para realizar procesos de síntesis, generando nuevas células bacterianas (Raybuck, 1992; Kunz *et al.*, 1998; Akcil, 2003; Luque *et al.*, 2008).

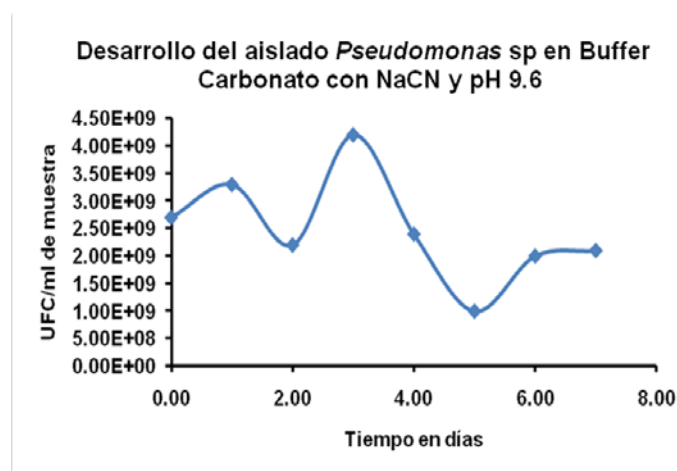
A los siete días se ha removido el 76% de CN^- presente en el medio y la concentración de microorganismos (UFC/mL) es casi igual a la inicial.

Tabla 7. Porcentaje de remoción de NaCN, generación de amonio y variación poblacional (UFC/mL de muestra) por parte del aislado *Pseudomonas* sp. durante ocho días.

Tiempo (días)	ppm de NaCN	Tasa de remoción diaria (%)	Tasa de Remoción acumulada (%)	ppm de amonio generadas	Variación en la concentración de aislado <i>Pseudomonas</i> sp. (UFC/mL)
0	1200	0	0	0	2.7×10^9
1	882	27	27	1,66	3.3×10^9
2	637	28	47	0,35	2.2×10^9
3	637	0	47	2,05	4.2×10^9
4	550	14	54	1,63	2.4×10^9
5	534	3	56	1,52	1.0×10^9
6	417	21	65	1,44	2.0×10^9
7	294	29	76	0,42	2.1×10^9

La figura 20 muestra el crecimiento del aislado *Pseudomonas* sp. en medio buffer carbonato con 1200 ppm de cianuro de sodio y pH 9.6, el seguimiento del crecimiento al aislado se realizó por ocho días, durante este tiempo se observan cambios en el número de UFC/mL de muestra, pero si se traza una línea de tendencia central sobre la curva se evidenciaría que la población tiende a mantener la concentración inicial de células para el final del ensayo.

Figura 20. Comportamiento del aislado *Pseudomonas* sp. en buffer carbonato, pH 9,6 y 1200 ppm de cianuro de sodio.



Después de someter el aislado *Pseudomonas* sp. a 1200 ppm de NaCN en solución buffer carbonato a pH 9.6, durante ocho días; se observa en la figura 21 una disminución en la concentración de CN⁻, al pasar el tiempo el inculo a una concentración de 2.7*10⁹ UFC/mL, degradaba el cianuro a la forma de NH₄⁺ siguiendo la siguiente ecuación:

Determinación de la producción de NH₄⁺ por biodegradación de cianuro

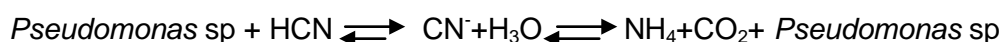


Figura 21. Biodegradación de cianuro por parte del aislado *Pseudomonas* sp. partiendo de 1200 ppm de NaCN a pH 9,6 y un inculo de 2.7*10⁹ UFC/mL de muestra.

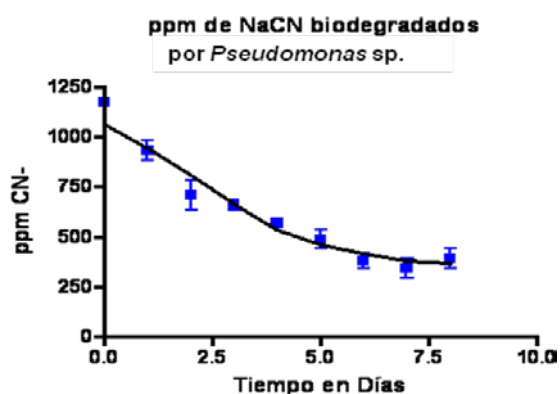
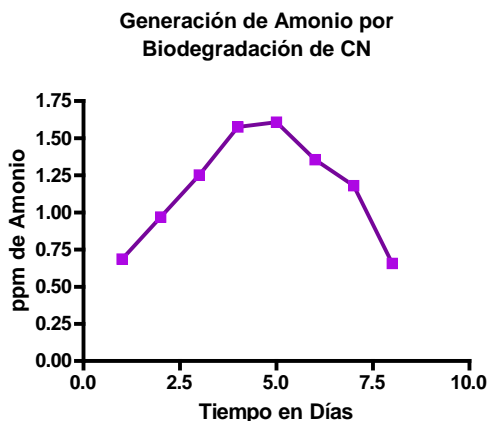


Figura 22. Generación de amonio por el aislado *Pseudomonas* sp. y un inculo de 2.7*10⁹ UFC/mL de muestra, durante el proceso de biodegradación de NaCN.

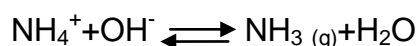


Para la determinación de amonio producido por el aislado se siguió el método potenciométrico, utilizando un electrodo selectivo para el ión amonio cuyos límites de detección y cuantificación son 0.024 y 0.220 ppm de amonio respectivamente.

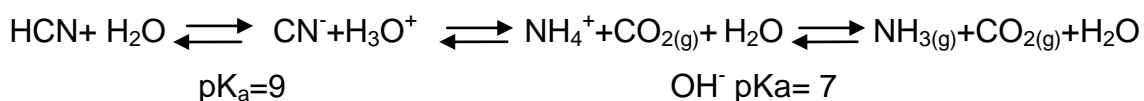
El tope de detección o sensibilidad para los espectrofotómetros UV-VIS es de absorbancia 0.004, lo que corresponde un porcentaje de transmitancia del 99%.

Los resultados se ilustran en la figura 22, lo que se observa es la tendencia del amonio generado durante las mediciones que va en aumento hasta el día cinco y luego baja la concentración de este en el medio, al final de los ocho días la cantidad de amonio generado tiende a ser igual al producido en el día uno.

La concentración de NH_4^+ aumenta en forma proporcional al consumo de cianuro hasta aproximadamente el día cinco, ver figura 23, después la concentración de CN^- parece permanecer constante pero la concentración de NH_4^+ disminuye drásticamente, posiblemente siguiendo la siguiente ecuación:

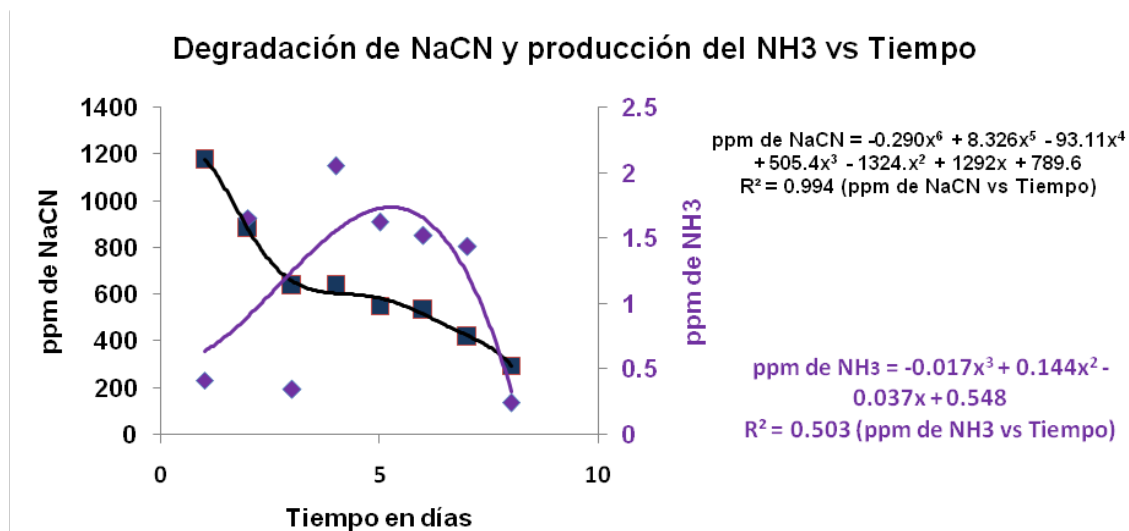


El OH^- es aportado por el medio buffer carbonato. La reacción general que ocurre en la degradación del CN^- se puede representar de la siguiente forma:



La proporción HCN/CN^- depende fundamentalmente del pH. El elevado pKa del cianuro (9), implica que a pH neutro o ácido, este compuesto se volatiliza en forma de HCN, este pH en la ecuación lo condiciona la presencia de H_3O^+ . Desde el punto de vista químico la eliminación biológica del cianuro requiere condiciones alcalinas y una fuente de carbono incapaz de reaccionar químicamente con el cianuro como lo es el buffer carbonato a pH de 9.6. (Luque, 2007)

Figura 23. Degradación de cianuro de sodio ■ y producción de amonio ◆ durante ocho días por parte del aislado *Pseudomonas* sp.



La figura 23 relaciona la biodegradación del compuesto cianurado por parte del aislado *Pseudomonas* sp. con la generación de amonio como producto del proceso. Se parte de una concentración alta de NaCN, 1200 ppm y la concentración del amonio en el medio es nula, observar tabla 6, pero esta aumenta a medida que el NaCN es removido, aproximadamente para el día cinco la biodegradación del NaCN tiende a estabilizarse, pero ocurre un aumento en la concentración de amonio en el medio, y luego desciende nuevamente, al parecer, cuando la concentración de amonio aumenta, el microorganismo lo toma como fuente de nitrógeno dejando la toma del NaCN para cuando la concentración de amonio vuelva a descender.

Kunz *et al* (1998) encontraron que *P. fluorescens* NCIMB11764 fue eficaz en la remoción de formas simples de CN^- (KCN) en las primeras 72 horas, utilizando el compuesto cianurado como único inductor enzimático. En este caso el cianuro induce la producción de cianuro oxigenasa y se obtiene como productos de conversión enzimática CO_2 , NH_3 y α -cetoácidos como coproductos. Un comportamiento similar se observó en los resultados obtenidos en el presente estudio, al relacionar el desarrollo de la población con

la biodegradación de cianuro y la producción de NH_3 , (figuras 20 a 23 y tabla 6). El aislado utilizó el NaCN como fuente de nitrógeno y carbono en las primeras 72 horas, después de las cuales la producción de amonio aumentó en el medio, la población bacteriana disminuyó en número, debido a que se les agotaba la fuente principal de nitrógeno, es decir el NaCN y se hacía necesario que desarrollaron otra ruta metabólica para aprovechar el amonio en aumento como fuente alternativa de nitrógeno, en este momento la biodegradación de cianuro tendió a estabilizarse. Posteriormente, a partir del día cinco la población inicio una etapa de recuperación y en este momento la concentración de amonio en el medio fue mayor, pero empezó a disminuir de forma inmediata, hasta el día siete. Se sugiere que este compuesto es el que el microorganismo toma como fuente de nitrógeno, se recupera un poco la biomasa celular y se reanuda la biodegradación del compuesto cianurado.

La medición en días posteriores para este comportamiento no podría realizarse con el método titulométrico, debido a que en estas concentraciones, este método para medir la concentración de cianuro no es muy confiable, aunque el límite de sensibilidad es aproximadamente de 1.0 mg de CN^- /L de muestra en el caso de que esta haya sido destilada (APHA, 1998), los resultados obtenidos en las pruebas para determinar la precisión del método, observar tabla 1, muestran un alto porcentaje de error para este método (16.36%).

Es posible que la ruta de biodegradación no haya sido totalmente completa y en el medio permanezcan compuestos intermedios entre cianuro y amonio, como cianatos, tiocianatos y formatos (Figueira *et al.*, 1996; Knowles, 1988). Por el contrario, todo el cianuro pudo ser convertido a amonio (Raybuck, 1992; Kunz *et al.*, 1998; Akcil, 2003; Luque *et al.*, 2008) y éste, por procesos de nitrificación pasar a nitritos y nitratos o por procesos de regeneración a -cetoácidos, en presencia de CO_2 (Kunz *et al.*, 1998; Akcil, 2003; Fernández, 2005). Con el método del electrodo ión selectivo para amonio, solo se detecta nitrógeno amoniacal (APHA, 1998).

Según los resultados de crecimiento en el medio agar cetrimide, figura 17, hay tolerancia del aislado nativo *Pseudomonas* sp. a concentraciones de 500 ppm de NaCN y pH de 9.6 constante por 48 horas en buffer carbonato, adicionalmente se evidencia por el crecimiento del aislado y por la reducción de la concentración de cianuro en el medio, que fue este la fuente de nitrógeno utilizable por el aislado bacteriano mientras estuvo en el medio buffer carbonato y, por lo tanto, ingresó el compuesto cianurado a su metabolismo, generando amonio como producto, aún con estas evidencias no es posible afirmar a ciencia cierta la ruta metabólica que el aislado bacteriano siguió para la biodegradación del cianuro, es posible que se haya obtenido formato además de amonio, pero para probarlo se hace necesaria su detección, lo cual no se realizó en este trabajo y se recomienda para trabajos posteriores a este. En el caso de que este compuesto se detecte, se hace necesario determinar en el medio la presencia de la enzima formato deshidrogenasa ya que es posible que el microorganismo la produzca, inducido por la presencia en el medio de formato, si la enzima no está presente es posible adicionarla, esta oxidará el formato y solo se tendrá como productos finales amonio y CO₂, Fernández *et al.*, 2005, reportan casos en los que algunas especies de *Pseudomonas* pueden generar esta enzima por sí mismas al ser inducidas por el cianuro.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores y la precisión del método titulométrico para la medición de la concentración de cianuro en solución, se definieron las condiciones para los bioensayos en los que se evaluó la eficiencia en la biodegradación del compuesto cianurado NaCN, por el aislado nativo *Pseudomonas* sp.

4.3 BIODEGRADACION DE CIANURO DE SODIO

En los Bioensayos se verificaron las consideraciones del modelo para cada uno de los factores evaluados.

- Normalidad e Independencia de los errores, graficando los residuos.
- Homogeneidad de varianzas, mediante la prueba de Cochran ($p > 0.05$)

El modelo estadístico aplicado correspondió a un Análisis de Varianza Multifactorial de Efectos Fijos, con el cual se probaron los efectos y las interacciones entre los factores evaluados (medio de cultivo, pH, temperatura y tiempo) con relación a la variable respuesta (ppm de NaCN biodegradados).

Los bioensayos en los que se valoró la biodegradación de cianuro por parte del aislado *Pseudomonas* sp. fueron diseñados teniendo en cuenta los resultados de las pruebas preliminares:

1. Tiempos de 24 y 48 horas, ya que en estos fue donde se presentó mayor biodegradación del compuesto cianurado. Estos resultados coinciden con otros trabajos donde se demuestra que las formas de cianuro libre, CN^- provenientes de las formas NaCN, KCN, etc., se biodegradan más rápidamente que las formas de cianuro asociadas a complejos metálicos tales como $(\text{K}_2\text{Ni}(\text{CN})_4)$ y $(\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6)$ (Park *et al*, 2007). También se observó que en tiempos posteriores cuando la concentración de cianuro inicial disminuía hasta 300 ppm o menos, los resultados eran demasiado variables, cuestionando la precisión del método titulométrico para concentraciones bajas de cianuro (APHA, 1998).
2. Medios buffer carbonato y buffer carbonato con arena a pH de 9.3 y 9.6, que garantizaban una retención del cianuro mayor al 80% durante el tiempo del bioensayo (Logsdon *et al.*, 2006) y una viabilidad considerable de las células bacterianas.

La tabla 8 muestra la relación estadística entre la variable dependiente, concentración de CN^- biodegradado y las variables independientes, tiempo, medio buffer carbonato y buffer carbonato arena, pH y temperatura. La relación entre los valores muestran un $r^2=0.98$, lo que se traduce en una relación lineal, directamente proporcional entre la concentración de CN^- biodegradado y los diferentes factores. Esta tabla contiene en las filas los componentes del modelo que contribuyen a la variación de la variable dependiente, CN^- biodegradado. Las filas denominadas Modelo corregido e intersección contienen los valores para el modelo de regresión. Las filas Pseudomona, Medio, pH, Temperatura y Tiempo, corresponden a los efectos principales del modelo y las filas donde nuevamente se encuentran los efectos principales relacionados con * corresponden a las interacciones entre los factores. El error hace referencia al término error del ANOVA. En las columnas se observa la suma de cuadrados, los grados de libertad (df), la media cuadrática, el valor del estadístico de contraste (F) y la significación del contraste (Sig).

En la Interacción pH y medio con un valor de significancia $p < 0.004$, se observa que a pH de 9.6 se da mayor biodegradación del compuesto cianurado por parte del aislado *Pseudomonas* sp. en el medio buffer carbonato, el valor de p indica entonces que existen grandes diferencias en la biodegradación cuando varía el pH.

No se dio ningún tipo de interacción entre la temperatura y el medio, es decir un factor no influye en el otro respecto a la biodegradación de NaCN , cada factor tiene su efecto de forma independiente, ninguno depende del otro, no hay diferencia en la biodegradación de cianuro si se alteran las variables temperatura y medio. Esto se evidencia en el valor de significancia de 0.465, en la tabla 8. Entre los factores medio y tiempo, en el tiempo cero no se da biodegradación, pero a las 48 horas se obtuvieron los valores más altos en biodegradación de cianuro, en cuanto al medio la mayor biodegradación se dio en el medio buffer carbonato la significancia para esta relación es de 0.001.

La significancia para la interacción pH y temperatura es de 0.000, observar tabla 8, a pH 9,3 y 32°C, se presenta mayor remoción del compuesto cianurado, pero en este caso es importante resaltar, que gran parte de esta remoción es debida al pH y no a la acción del aislado *Pseudomonas* sp..

La interacción pH, medio y temperatura es significativa de 0.002, observar tabla 8, para el caso del pH 9.6, 32°C y medio buffer carbonato con y sin arena, en donde se dio alta remoción del compuesto cianurado por parte del aislado *Pseudomonas* sp. observar figura 26 D.

Tabla 8. ANOVA Multifactorial. Variable dependiente: ppm de NaCN biodegradado. Factores: *Pseudomonas* (presente, ausente), medio (buffer carbonato, buffer), pH (9.3, 9.6), temperatura (27°C, 32°C) y tiempo (0, 24, 48 horas).

Tests of Between-Subjects Effects

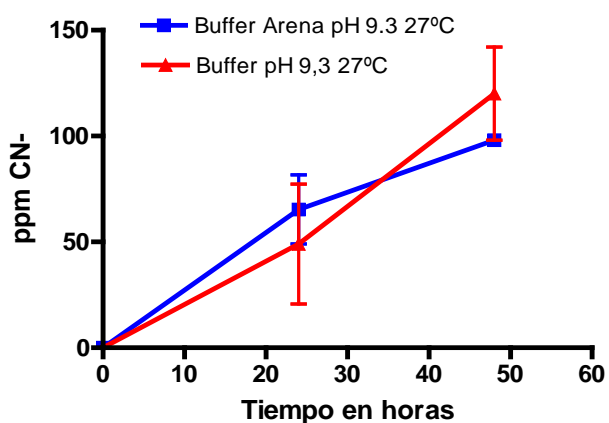
Dependent Variable: ppm biodegradados

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	4569413,993 ^a	47	97221,574	112,364	,000
Intercept	2749240,340	1	2749240,340	3177,445	,000
<i>Pseudomonas</i>	1788683,340	1	1788683,340	2067,278	,000
Medio	12562,674	1	12562,674	14,519	,000
pH	50,174	1	50,174	,058	,810
Temperatura	9522,507	1	9522,507	11,006	,001
Tiempo	1451630,181	2	725815,090	838,864	,000
<i>Pseudomonas</i> * Medio	11538,340	1	11538,340	13,335	,000
<i>Pseudomonas</i> * pH	102880,563	1	102880,563	118,905	,000
Medio * pH	7525,563	1	7525,563	8,698	,004
<i>Pseudomonas</i> * Medio * pH	7126,174	1	7126,174	8,236	,005
<i>Pseudomonas</i> * Temperatura	8633,507	1	8633,507	9,978	,002
Medio * Temperatura	465,840	1	465,840	,538	,465
<i>Pseudomonas</i> * Medio * Temperatura	50,174	1	50,174	,058	,810
pH * Temperatura	13630,563	1	13630,563	15,754	,000
<i>Pseudomonas</i> * pH * Temperatura	11042,507	1	11042,507	12,762	,001
Medio * pH * Temperatura	8757,840	1	8757,840	10,122	,002
<i>Pseudomonas</i> * Medio * pH * Temperatura	16705,562	1	16705,562	19,308	,000
<i>Pseudomonas</i> * Tiempo	951525,514	2	475762,757	549,865	,000
Medio * Tiempo	12505,597	2	6252,799	7,227	,001
<i>Pseudomonas</i> * Medio * Tiempo	8908,764	2	4454,382	5,148	,008
pH * Tiempo	2940,097	2	1470,049	1,699	,188
<i>Pseudomonas</i> * pH * Tiempo	52025,375	2	26012,688	30,064	,000
Medio * pH * Tiempo	13342,792	2	6671,396	7,710	,001
<i>Pseudomonas</i> * Medio * pH * Tiempo	7977,681	2	3988,840	4,610	,012
Temperatura * Tiempo	10450,014	2	5225,007	6,039	,003
<i>Pseudomonas</i> * Temperatura * Tiempo	5298,514	2	2649,257	3,062	,051
Medio * Temperatura * Tiempo	10135,264	2	5067,632	5,857	,004
<i>Pseudomonas</i> * Medio * Temperatura * Tiempo	3373,931	2	1686,965	1,950	,148
pH * Temperatura * Tiempo	6828,042	2	3414,021	3,946	,023
<i>Pseudomonas</i> * pH * Temperatura * Tiempo	7049,264	2	3524,632	4,074	,020
Medio * pH * Temperatura * Tiempo	8474,014	2	4237,007	4,897	,009
<i>Pseudomonas</i> * Medio * pH * Temperatura * Tiempo	17773,625	2	8886,813	10,271	,000
Error	83062,667	96	865,236		
Total	7401717,000	144			
Corrected Total	4652476,660	143			

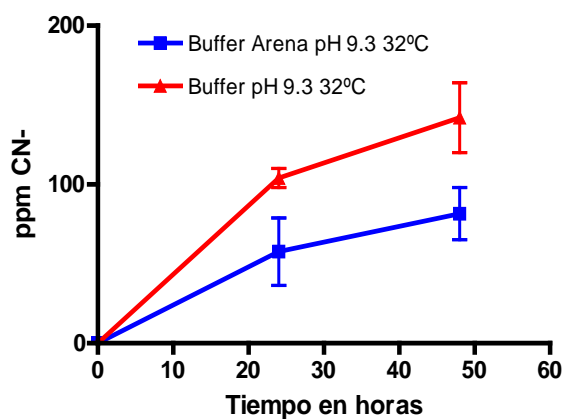
a. R Squared = ,982 (Adjusted R Squared = ,973)

Figura 24. ppm de NaCN volatilizados durante 48 horas en los controles (sin inocular con *Pseudomonas* sp. en buffer carbonato mas arena y buffer carbonato a pH 9.3, 27°C (A), pH 9.3, 32°C (B), pH 9.6, 27°C (C) y pH 9.6, 32°C (D).

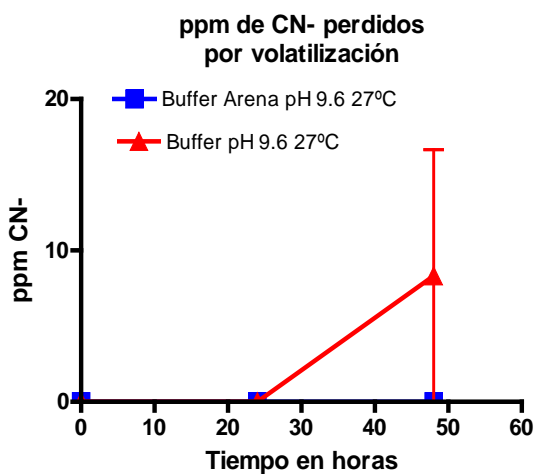
ppm de NaCN volatilizados en los controles



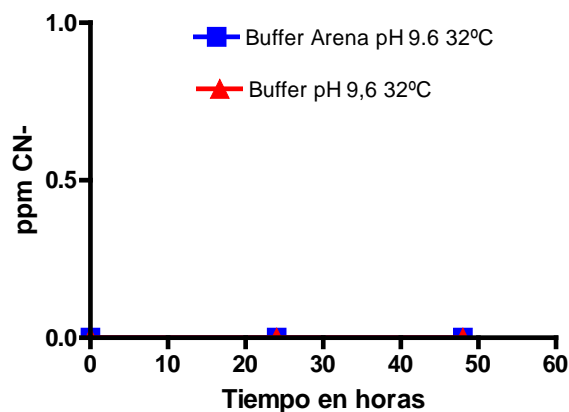
A



B



C



D

En la figura 24 se muestra el cianuro volatilizado (HCN) en ppm, durante 48 horas para los controles en cada medio, a dos pH y dos temperaturas. La figura 24 A y B, muestran la mayor cantidad de cianuro volatilizado en los dos medios, a las dos temperaturas evaluadas en pH 9.3. Por el contrario en la figura 24 D, no se observa cianuro volatilizado en ninguno de los dos medios a 32°C, pH 9.6, igualmente en el medio buffer arena, ver figura 24 C, a 27°C y pH 9.6. El cianuro volatilizado (HCN) en el medio buffer a 27°C y pH 9.6 es mínimo, observar figura 24 C, lo que sugiere que es el pH el factor determinante para mantener al cianuro en una forma estable no volátil y que las pérdidas de HCN por causa de la temperatura a un pH de 9.6 son muy pocas, conclusión a la que se ha llegado en otros trabajos donde se ha demostrado que el pH es factor clave en estos procesos (Bartosz *et al.*, 2002; Marder *et al.*, 2003; Riani *et al.*, 2007). En los bioensayos a pH 9.3 se considera la pérdida de cianuro por el control y se resta al valor final del cianuro biodegradado. En consecuencia, los mejores controles fueron los evaluados a pH 9.6. Este resultado va en contra vía de lo que afirman algunos autores (Molina *et al.*, 2006) de que a pH ácidos la biodegradación del cianuro sea mayor y se ajusta a otros modelos de biodegradación eficiente en los cuales se utilizan tecnologías limpias para la remoción de compuestos cianurados a pH fuertemente alcalinos (Costa *et al.*, 2007).

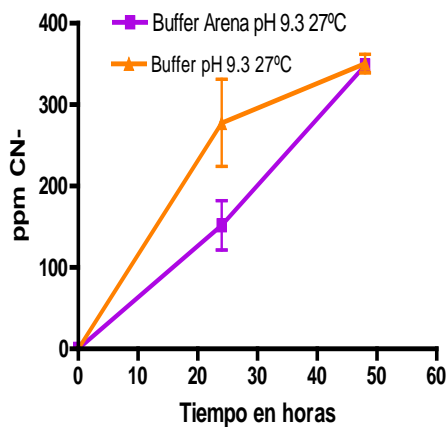
La presencia de arena, observar figura 24 A y B, ayuda a la retención del cianuro en el medio a temperaturas de 27°C y 32°C con pH 9.3, la arena ayuda a la retención de sustancias, en este caso del cianuro, debido a su capacidad adsorbente y su estructura porosa (Lebron *et al.*, 2004).

La pérdida de cianuro por volatilización se da en forma de HCN, dado el comportamiento de las pruebas de retención de NaCN en diferentes medios y pH, donde las mejores retenciones de compuesto cianurado se dieron a pH de 9.6. Lo anterior se explica basándose en que las formas de cianuro libre CN^- y HCN están en una proporción aproximadamente igual en solución, a un pH

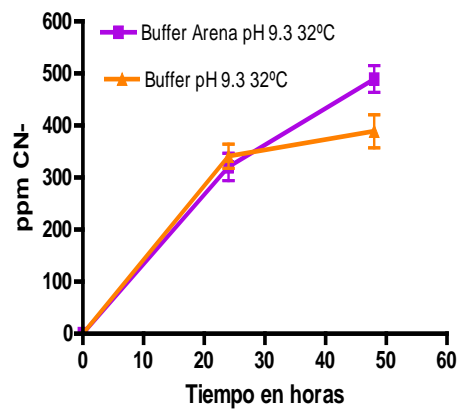
igual o superior de 9.4, a pH inferiores la tendencia será formar HCN gaseoso, que se volatiliza fácilmente, observar figura 1 (APHA, 1998; González y Pulido, 2004; Logsdon *et al*, 2006; F. Nava *et al*, 2007).

Figura 25. ppm de NaCN Biodegradados por el aislado *Pseudomonas* sp. en dos medios de cultivo a dos pH y dos temperaturas, durante 48 horas de incubación. Buffer carbonato mas arena y buffer carbonato pH 9.3, 32°C (A), pH 9.3, 32°C (B), pH9.6, 27°C (C) y pH 9.6, 32°C (D)

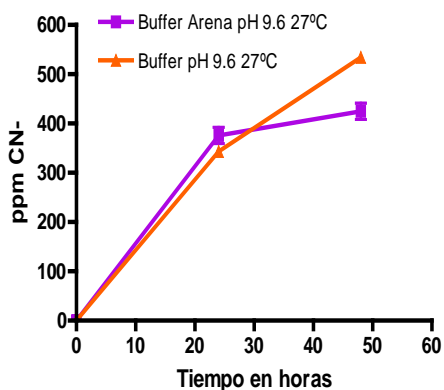
ppm de NaCN Biodegradados por *Pseudomonas* sp.



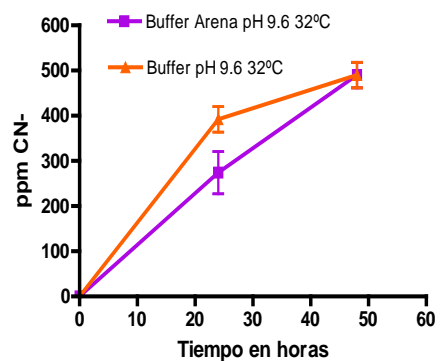
A



B



C

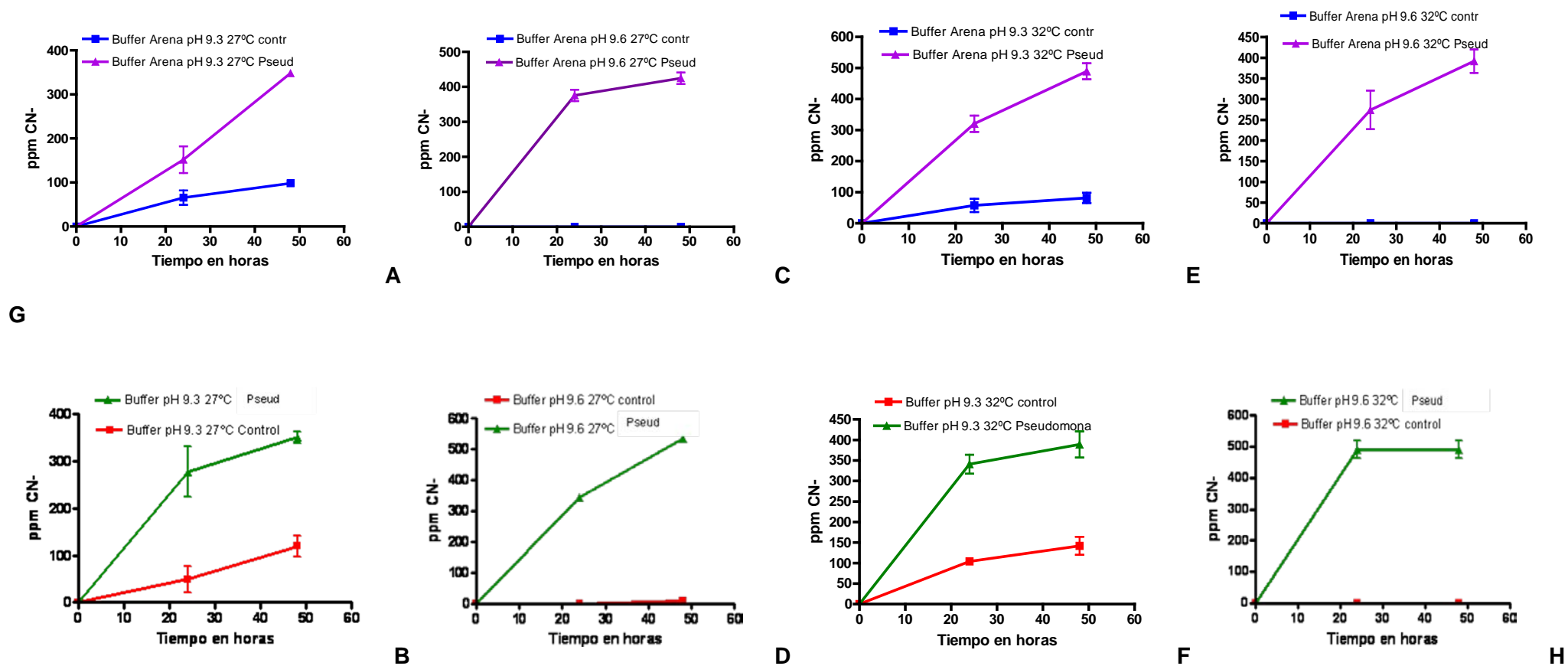


D

La figura 25 muestra la concentración de CN^- biodegradado por el aislado *Pseudomonas* sp., variando el medio, el pH y la temperatura. A los diferentes pH, temperatura y medios, no se encuentra una diferencia significativa con respecto a la concentración de CN^- biodegradado por el microorganismo, estos resultados también se evidencian en la tabla 7, con significancias entre 0.005 y 0.148.

En cada una de las gráficas de la figura 25, se observa que la concentración en ppm de NaCN biodegradado por el aislado no varía demasiado para cada condición, el valor más alto de cianuro removido por el aislado *Pseudomonas* sp, aproximadamente 500 ppm, se dio en medio buffer carbonato a pH 9.6, 27°C y 32 °C, figuras 25 C y D, los valores más bajos de cianuro removido, están entre aproximadamente 350 y 400 ppm, se presentan en las graficas 25 A, B y C, en medio buffer carbonato, pH 9.3, en las dos temperaturas evaluadas, 27 y 32°C y en medio buffer carbonato-arena, pH 9.6, 27°C. Para el medio buffer carbonato-arena se observan valores de remoción de cianuro desde aproximadamente 350 ppm, en la figura 25 A, hasta casi 500 ppm, figura 25 B. La degradación de cianuro se da en ambos medios (buffer carbonato-arena y buffer carbonato) al ser inoculados con el microorganismo, observar figuras 25 (A, B, C, D). Las pequeñas variaciones en los valores de cianuro removido por el aislado, están determinadas por el tipo de medio y el pH, como se menciona antes las mejores condiciones para la biodegradación se dan en el medio buffer carbonato a pH de 9.6, la causa de que el medio buffer carbonato-arena, no sea el medio ideal se debe a que la arena funciona como adsorbente y retiene el cianuro, lo que dificulta la toma de este por parte del aislado *Pseudomonas* sp. dificultando la biodegradación (Lebron *et al.*,2004). En el caso del pH se sabe que entre más alcalino sea, menos pérdida de cianuro se tendrá por volatilización en forma de HCN (González y Pulido, 2004; Logsdon *et al*, 2006); a pH 9.3 se observaron pérdidas hasta del 11% contrario a lo que se observó a pH de 9.6, donde las pérdidas de cianuro por volatilización fueron prácticamente nulas, ver tabla 9.

Figura 26. Comparación de la Biodegradación de NaCN por *Pseudomonas* sp. frente a los controles, con dos medios, dos pH y dos temperaturas de incubación; durante 48 horas. Medio buffer carbonato mas arena pH 9.3, 27°C (A); pH 9.6, 27°C (C); pH 9.3, 32°C (E); pH 9.6, 32°C (G) y medio buffer carbonato pH 9.3, 27°C (B); pH 9.6, 27°C (D); pH 9.3, 32°C (F); pH 9.6, 32°C (H).



La figura 26 presenta la concentración expresada en ppm de CN^- biodegradados por el aislado *Pseudomonas* sp. frente a sus controles donde el aislado *Pseudomonas* sp. no está presente y las ppm de CN^- equivalen a la remoción provocada por la poca volatilización de HCN, debida a la temperatura 27°C y el pH 9.3, pero no se muestra diferencia en la concentración de CN^- biodegradado debido al medio, con o sin arena.

La volatilización se observa claramente en la figura 26 E y H a pH 9.3 y 32°C, en la figura 26 C, D, F y G no se observa volatilización a pH 9.6 , 32°C y 27°C, lo que corrobora que a pH 9.6 se retiene mas el CN^- en el medio, independientemente de si este posee o no arena, a pesar de la alta temperatura, esta condición impidió la posible volatilización ó pérdida del CN^- , garantizándose que el amonio medido se originó en el medio por conversión enzimática producida por el aislado *Pseudomonas* sp..

La tabla 9 muestra que para el día dos el porcentaje de retención de cianuro es menor en el pH 9.3, a mayor tiempo mayor volatilización de HCN en estos controles, lo que aumenta el riesgo de intoxicación por inhalación de estos gases, por lo tanto los ensayos se realizan desde las cero hasta las 48 horas.

Tabla 9. Valores en ppm de cianuro volatilizados en la forma HCN, en los controles.

CARACTERISTICAS DEL MEDIO				ppm DE NaCN VOLATILIZADOS DURANTE 24 Y 48 HORAS									% DE RETENCION DE CIANURO	
				BIOENSAYO 1			BIOENSAYO 2			BIOENSAYO 3				
CONTROLES	pH	T°C	0 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	0 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	0 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	24 H	48 H	
SIN <i>Pseudomonas</i> sp.	BUFFER ARENA	9,3	27	0	49	98	0	98	98	0	49	98	93.0	89.0
	BUFFER			0	0	98	0	49	98	0	98	164	94.0	86.0
	BUFFER ARENA	9,6	27	0	0	0	0	0	0	0	0	100.0	100.0	
	BUFFER			0	0	25	0	0	0	0	0	0	100.0	99.0
	BUFFER ARENA	9,6	32	0	0	0	0	0	0	0	0	100.0	100.0	
	BUFFER			0	0	0	0	0	0	0	0	0	100.0	100.0
	BUFFER ARENA	9,3	32	0	49	98	0	98	98	0	26	49	93.0	91.0
	BUFFER			0	98	98	0	98	164	0	116	164	88.0	84.0

Tabla 10. ppm de Cianuro biodegradados por el aislado *Pseudomonas* sp.

MEDIO	pH	T°C	PPM DE CIANURO BIODEGRADADOS (TRES BIOENSAYOS)						% PERDIDA DE CIANURO POR EL MEDIO		
			0-24 HORAS			0-48 HORAS			24 H	48 H	
			1 BIOENSAYO	2 BIOENSAYO	3 BIOENSAYO	1 BIOENSAYO	2 BIOENSAYO	3 BIOENSAYO			
CON <i>Pseudomonas</i> sp.	BUFFER ARENA	9,3	27	91	182	182	348	348	348	7.0	110.
	BUFFER			370	185	278	373	339	339	6.0	14.0
	BUFFER ARENA	9,6	27	343	392	392	441	441	392	0.0	0.0
	BUFFER			343	343	343	534	534	534	0.0	1.0
	BUFFER ARENA	9,6	32	343	185	294	441	343	392	0.0	0.0
	BUFFER			441	539	490	441	539	490	0.0	0.0
	BUFFER ARENA	9,3	32	366	275	321	534	445	489	7.0	9.0
	BUFFER			301	381	341	329	400	438	12.0	16.0

La tabla 10 muestra que el aislado *Pseudomonas* sp. degrada más CN^- en medio libre de arena, ya que es el medio que carece de adsorbente que retenga el CN^- para que el aislado lo utilice como fuente de carbono y nitrógeno (Lebron *et al.*,2004).

En resumen la degradación de cianuro se da en ambos medios (buffer carbonato-arena y buffer carbonato) al ser inoculados con el microorganismo, observar la tabla 10 y figuras 25 (A, B, C, D), siendo mayor en el medio con buffer carbonato, pH 9.6, a las dos temperaturas, observar figura 26 (D, H). Lo anterior se explica si se tiene en cuenta que la arena, además de ser buen adsorbente, aporta componentes adicionales al medio como calcita (CaCO_3) y estos se constituyen en otra oferta para suplir las necesidades de carbono por parte del microorganismo (Lebron *et al.*,2004), implicando probablemente menos esfuerzo metabólico y por lo tanto el microorganismo tomaría el cianuro solo cuando se le agote el carbono inmediatamente disponible, figura 26 (A, C, E, G). La forma cóncava de las curvas podría suponer la utilización posterior del cianuro.

La actividad metabólica del microorganismo determina un proceso de remoción del compuesto cianurado en todos los factores evaluados. Otras variables incidentes son la temperatura y el pH, dado que el mejor efecto de remoción se presenta en 32°C y 27°C a pH 9,6. Sin embargo, temperaturas más altas y valores de pH menores de 9.4 favorecen la pérdida del compuesto cianurado por volatilización, se observa en las figuras 24 A y B. que la pérdida de CN^- en forma de HCN gaseoso se da porque el equilibrio en solución de estas formas tiende al aumento de HCN a pH menores de 9,4, ver figura 1 (González y Pulido, 2004; Logsdon *et al.*, 2006).

En medio buffer carbonato, con NaCN como único inductor enzimático (Kunz *et al.*, 1998) a pH 9.6, se observó mayor biodegradación del compuesto cianurado por parte del aislado *Pseudomonas* sp. (figura 26 D y H). Este resultado contrasta con los de otros autores que referencian en el proceso de

biorremediación de ambientes cianurados con bacterias *Pseudomonas*, un pH alcalino cuyos valores no sobrepasan 8.5 y donde se emplean algunas sustancias inductoras que optimizan el proceso de remediación por parte del microorganismo como glucosa, sacarosa y en algunos casos, fósforo (Luque *et al.*, 2002; Dakshina *et al.*, 2003; Fernández *et al.*, 2004; Fernández *et al.*, 2005; Garcés *et al.*, 2006; Cipollone *et al.*, 2007; Giraldo, 2007; Quesada *et al.*, 2007). Los resultados no demuestran una relación directa entre el medio y las variables temperatura y tiempo, en el proceso de biodegradación del NaCN y es claro que cada factor tiene su efecto de forma independiente. En esta investigación se consideraron factores determinantes en la biodegradación de NaCN; el medio, el pH y el tiempo, tablas 8 a 10.

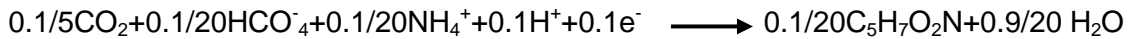
Las mejores condiciones determinadas en los bioensayos para la biodegradación del compuesto cianurado NaCN fueron: medio buffer carbonato, pH 9.6, temperatura 27°C o 32°C y una población inculo de 4.89×10^{10} UFC/mL, en promedio se biodegradaron 515 ppm de NaCN en 48 horas, figura 26 D y H, partiendo de una concentración inicial de 1000 ppm de NaCN, correspondiente a una biodegradación del 55.0% a las 48 horas de evaluación, ya que después de este tiempo, la volatilización contribuye a la pérdida de cianuro, la concentración del inculo alta y la inducción previa del aislado para producir las cianuro oxigenasas y oxidar el cianuro, favorecieron el porcentaje de remoción durante solo dos días.

Los resultados anteriores se relacionan en la siguiente ecuación de balance de masas (Sawyer *et al.*, 2001):

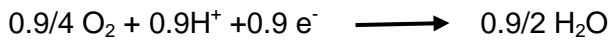
$$R = f_s R_c + f_e R_a - R_d$$

Donde:

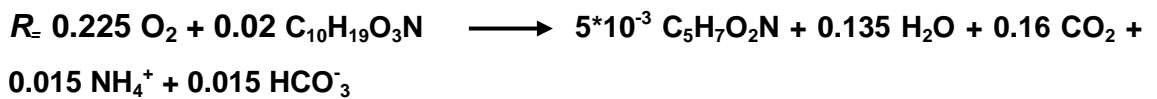
$f_s R_c$:



$f_e R_a$:



$-R_d$:



La reacción **R** indica que el metabolismo de 1000 ppm o 0.99 g de NaCN por parte del aislado *Pseudomonas* sp. requiere: 0.225 moles o 0.036 g de O₂, 0.02 moles o 4.02 g de carbono y nitrógeno (C₁₀H₁₉O₃N) y produce 5*10⁻³ moles o 0.565 g de masa celular (C₅H₇O₂N), 0.135 moles o 2.43 g de H₂O, 0.16 moles o 7.04 g de CO₂, 0.015 moles o 0.27 g de NH₄ y 0.015 moles o 0.915 g de HCO₃⁻.

5 CONCLUSIONES

El aislado de *Pseudomonas* sp., se ajusta a las condiciones de pH requeridas para la biorremediación de compuestos cianurados, pues toleró medios con NaCN a concentraciones de 1000 ppm y pH 9.6, sobrepasando la tolerancia de aislados pertenecientes a la misma especie evaluados en otros estudios, a pH de 7.0, 7.5 y 9.5.

El método titulométrico permitió detectar de manera confiable concentraciones de cianuro residual hasta de 294 ppm a los siete días de medición, concentraciones más bajas de cianuro debilitan la confiabilidad del método lo que conlleva a obtener datos erróneos. Este método es útil cuando se miden concentraciones altas de cianuro y cuantificó la capacidad del aislado bacteriano nativo para biodegradar cianuro partiendo de concentraciones altas, 1000 ppm.

El aislado nativo de *Pseudomonas* sp., degradó un promedio máximo de 515 ppm de NaCN, en 48 horas y generó concentraciones de amonio hasta de 2.05 ppm como producto del proceso. Inició la biodegradación en la etapa de los bioensayos con 1000 ppm, pH 9.6 y un inóculo de $4.89 \cdot 10^{11}$ UFC/mL de medio buffer carbonato. Lo que implica que este es un microorganismo promisorio en el área de biotecnología ambiental, particularmente en la biorremediación de ambientes con compuesto cianurados, por degradar NaCN partiendo de altas concentraciones y tolerando pH alcalinos.

El aislado nativo de *Pseudomonas* sp., es un microorganismo promisorio en el área de biotecnología ambiental, particularmente en la biorremediación de ambientes con compuestos cianurados, por degradar NaCN partiendo de altas concentraciones, 1200 ppm y tolerar pH de 9.6

El bioensayo propuesto es aplicable al tratamiento de residuos cianurados industriales, permite la cuantificación de la capacidad degradadora del aislado sobre el cianuro mediante el método titulométrico, ya que en algunos de estos ambientes se encuentran concentraciones de cianuro superiores a 800 ppm, es económico pues no es necesario el uso de inductores enzimáticos adicionales, se minimizan las pérdidas de cianuro por volatilización y es relativamente rápido.

Las mejores condiciones de biodegradación de NaCN por parte del aislado nativo de *Pseudomonas* sp. fueron: medio buffer carbonato, pH 9.6, temperatura 27°C ó 32°C y 48 horas de incubación. La interacción entre medio buffer carbonato y pH 9.6, influyen de forma significativa en la biodegradación de NaCN. En contraste con el factor temperatura donde el efecto no es tan fuerte para los dos niveles evaluados, 27°C y 32°C.

Se acepta la hipótesis, el aislado nativo compatible con *Pseudomonas* sp., emplea cianuro de sodio como fuente de carbono y nitrógeno para su crecimiento, y puede degradar este compuesto a otros menos tóxicos como el amonio.

6. RECOMENDACIONES

Para próximos investigaciones en una línea de biodegradación de compuestos cianurados se propone:

- Utilizar pH por encima de 9.4 para ensayos de biodegradación de NaCN con el aislado nativo de *Pseudomonas* sp. Así se evita la pérdida del compuesto por volatilización y se asegura que la remoción de NaCN se da por biodegradación.
- Evaluar diferentes medios de cultivo en los que se prueben sustancias que induzcan la biodegradación del CN⁻ desde sus formas simples NaCN, KCN y asociadas a complejos metálicos (K₂Ni(CN)₄) y (K₃Fe(CN)₆) por parte del aislado nativo *Pseudomonas* sp..
- Determinar si se generan sustancias como ácido fórmico y sideróforos en la solución resultante de la biodegradación del compuesto cianurado por parte del aislado *Pseudomonas* sp.
- Realizar ensayos en los que se evalúen tiempos más largos de biodegradación del NaCN (mas de 8 días), utilizando métodos químicos más sensibles para medir el cianuro.
- Medir la concentración de amonio en intervalos de tiempo más cortos (cada 2 horas) e incluir en el estudio, mediciones de nitritos y nitratos u otros compuestos intermedios generados después de la biodegradación del cianuro, en una ruta aeróbica.
- Evaluar la acción de microbiota acompañante en muestras reales que contengan NaCN, para verificar si existe coometabolismo o no con el aislado nativo de *Pseudomonas* sp., en el proceso de biodegradación de cianuro.
- Hacer escalamiento del bioensayo presentado con el aislado *Pseudomonas* sp. a biorreactor para poderlo proponer a nivel industrial.

BIBLIOGRAFÍA

ANDERS, Persson; GORAN, Molin y CLAES, Weibull. Physiological and Morphological Changes Induced by Nutrient Limitation of *Pseudomonas fluorescens* 378 in Continuous Culture. En: Applied and Environmental Microbiology, Vol. 56, No. 3 Mar. 1990, P. 686-692

AKCIL A. y MUDDER T. Microbial destruction of cyanide wastes in gold mining: process review. En: Biotechnology Letters., March; 25(6): 2003, p. 445-50.

APHA American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, Standard Methods SM-4500-CN-A, Cyanide, Introduction, Washington, DC, 1998.

APHA American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, Standard Methods SM-4500-CN-D, Cyanide, Titrimetric Method, Washington, DC, 1998.

APHA American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, Standard Methods SM-4500-NH₃-F, Amonio, Electrode Ion Selective Method, Washington, DC, 1998.

ATSDR Agency for toxic substances and disease registry. Cianyde. División de toxicología y medicina ambiental. Julio 2006.

http://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfags/es_tfacts8.pdf

Consulta febrero 25 de 2009.

ATSUSHI Watanabe, KAZUYOSHI Yano, KAZUNORI Ikebukuro y ISAO Karube. Cyanide hydrolysis in a Cyanide-degrading bacterium, *Pseudomonas stutzeri* AK61, by cyanidase. En: Microbiology, 144, 1998, p. 1677-11682.

BABU GR, Vijaya OK, Ross VL, Wolfran JH, Chapatuala KD. Cell-free extract(s) of *Pseudomonas putida* catalyzes the conversion of cyanides, cyanatos, thiocyanates, formamide, and cyanide containing mine waters into ammonia. En: Applied Microbiology Biotechnology, 45 (1-2), March, 1996, p. 273-277.

BARBER Timothy R., LUTES Christopher C., D00RN Michiel R. J., FUCHSMAN Phyllis C., TIMMENGA Hubert J. and CROUCH Robert L. Aquatic ecological risks due to cyanide releases from biomass burning. En: Chemosphere, Vol. 50, January 2003, p. 343-348

BARTOSZ D. browski, Zaleska Adriana, Janczarek Marcin, Hupka Jan and Miller Jan D. Photo-oxidation of dissolved cyanide using TiO₂ catalyst. En: Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, Vol. 151, Issues 1-3, 23 August 2002, p. 201-205.

BERASTAIN Arturo. Destrucción del cianuro en efluentes mineros. Consorcio minero Horizonte S.A. UNI.

<http://www.scribd.com/doc/231223/destruccion-de-cianuro-en-efluentes-mineros>

Consulta febrero 28 de 2009.

BETANCUR, Judith; VALENCIA, Sandra y ECHEVERRY, Lina. Evaluación de las poblaciones dominantes y persistentes en el proceso de depuración de aguas residuales mediante lagunas de estabilización en una planta de tratamiento del municipio de la Ceja Antioquia. Medellín, 2005. 190 p. Trabajo de grado (Biólogo) Universidad de Antioquia, Facultad de ciencias Exactas y Naturales, Instituto de Biología.

BHATTACHARYA R, PANT S. C., KUMAR Deo, DUBE S. N. Toxicity evaluation of two treatment regimens for cyanide poisoning. En: Journal of Applied Toxicology, Vol. 15, Jan 2006, p. 439-441.

BOURDOT Dutra, ACHILLES Junqueira, LUIZ Gonzaga Santos Sobral, FLÁVIO de Almeida Lemos, FÁBIO Henrique Silva dos Santos. O proceso electroquímico como alternativa para o tratamento de efluentes cianhídricos. En: REM: R. Esc. Minas, Ouro Preto, 55(4):, out. dez. 2002, p. 267-272.

BURBANO Diana, BURBANO Edith y FAJARDO Jonny. Estudio de métodos químicos de remoción de cianuro presente en residuos de cianuración provenientes del proceso de extracción del oro veta en el departamento de Nariño. En: Memorias VII Simposio Latinoamericano de Química Analítica y Ambiental. Universidad de Nariño, Departamento de Química. Ciudad

Universitaria – Torobajo. San Juan de Pasto – Colombia. Universidad de Antioquia Medellín Colombia 2 al 7 de octubre 2006.

CALLICÓ Adriana, CEDRÉ Bárbara, SIFONTES Sergio, TORRES Vismar, PINO Yadira, CALLÍS Ana, ESNARD C. Sara. Caracterización fenotípica y serológica de aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. *VacciMonitor* 1 Año 13 No. 3 Julio-Septiembre del 2004.

<http://www.finlay.sld.cu/publicaciones/vaccimonitor/Vm2004/a7.pdf>

Consulta 8 de enero 2009.

CIPOLLONE, Rita; FRANGIPANI, Emanuela; TIBURZI, Federica; IMPERI, Francesco; ASCENZI, Paolo and VISCA, Paolo. Involvement of *Pseudomonas aeruginosa* Rhodanese in Protection from Cyanide Toxicity. En: *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 73, No. 2 January, 2007, p. 390–398

CHEN Jui-Lin, KUNZ Daniel A. Cyanide utilization in *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764 involves a putative siderophore. En: *FEMS Microbiology Letters* Vol. 156, Jan 2006, p.61-67.

CHEW S. F., IP Y. K. Comparative Physiology and Biochemistry Cyanide detoxification in the mudskipper, *Boleophthalmus boddarti*. En: *Journal of Experimental Zoology*. Vol. 261, Apr. 2005, p.1-8

CHRISTISON Terri T., ROHRER Jeffrey S. Direct determination of free cyanide in drinking water by ion chromatography with pulsed amperometric detection. En: *Journal of Chromatography A*, 1155. 2007; p. 31–39.

COSTA Riani Josiani, DOS SANTOS Pina Pablo, ALBIS Leão Versiane Tecnologia limpa para redução de impacto ambiental do cianeto na mineração de ouro. En: *REM: R. Esc. Minas, Ouro Preto*, 60(1): jan. mar. 2007, p. 21-28.

DAKSHINA Jandhyala, BERMAN Mark, MEYERS Paul R. SEWELL Trevor B., WILLSON Richard C y BENEDIK Michael J.. CynD, the Cyanide Dihydratase from *Bacillus pumilus*: Gene Cloning and Structural Studies. En: *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 69, No. 8 August, 2003, p. 4794–4805.

DAY Robert A. Cómo escribir y publicar trabajos científicos. Segunda edición en español. Washington, D.C. Organización Panamericana de la Salud, 1996. p. 217 ISBN 92 75 31558 2.

DÍAZ Abel. Diseño estadístico de experimentos. Primera edición. Medellín: Universidad de Antioquia, 1999. p. 347 ISBN 958-655-081-8.

DÍAZ María Elena, VILLA Pilar; FRÍAS Alina. Evaluation of the siderophores production by *Pseudomonas aeruginosa* PSS. En: Revista Latinoamericana de Microbiología Volumen 44, Número 3-4 Julio-Diciembre 2002, p.112-117.

DIFCO, Ceftrimide agar base

http://www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/Ceftrimide_Agar_Base.pdf

Consulta 20 de enero de 2009.

DIMITRY Y. Sorokin, TATYANA P. Tourova, ANATOLY M. Lysenko y J. GIJS Kuenen. Microbial Thiocyanate Utilization under Highly Alkaline Conditions. En: Applied And Environmental Microbiology, Vol. 67, No. 2 February, 2001, p. 528–538

DINAMA, Ministerio Nacional del Medio Ambiente. Cianuro.

http://www.mvotma.gub.uy/dinama/index.php?option=com_glossary&func=view&Itemid=120&catid=53&term=Cianuro+.-

Consulta 19 de febrero de 2009.

DMITRI V. Mavrodi, ROBERT F. Bonsall, SHANNON M. Delaney, MARILYN J. Soule, GREG Phillips y LINDA S. Thomashow. Functional Analysis of Genes for Biosynthesis of Pyocyanin and Phenazine-1-Carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. En: Journal of Bacteriology, Vol. 183, No. 21, November 2001, p. 6454–6465.

DEPARTMENT OF PLANT PATHOLOGY y USDA-ARS. Root Disease and Biological Control Research Unit, Agricultural. En: Molecular Biosciences, July 18, 2001.

DUMESTRE Alain, CHONE Therese, PORTAL Jean-Marie, MYLENE Gerard, y JACQUES Berthelin. Cyanide Degradation under Alkaline Conditions by a Strain of *Fusarium solani* Isolated from Contaminated Soils. En: Applied and Environmental Microbiology, Vol. 63, No. 7 July, 1997, p. 2729–2734.

EBBS Stephen. Biological degradation of cyanide compounds. En: Current Opinion in Biotechnology No.15, 2004, p.231–236

www.sciencedirect.com

Consulta 29 agosto del 2009

ELECTROQUÍMICA Y MEDIO AMBIENTE

http://docencia.udea.edu.co/cen/electroquimica/tratamiento/tratamiento_contaminantes.pdf

Consulta 10 de marzo del 2007, actualizada 18 de noviembre del 2009.

EUROCHEM/CITAC Guide. Quantifying uncertainty in analytical measurement. Segunda edición. 2000.

<http://www.measurementuncertainty.org/mu/QUAM2000-1.pdf>

Consulta 10 de febrero del 2009.

EVALUACIÓN TECNOLÓGICA DE LOS BIORREACTORES DE MEMBRANA. Sumarios Anejos. p. 81.

<https://upcommons.upc.edu/pfc/bitstream/2099.1/2738/2/37258-2.pdf>

Consulta febrero 25 de 2009.

FERNANDEZ Ruby y KUNZ Daniel A. Bacterial Cyanide Oxygenase Is a Suite of Enzymes Catalyzing the Scavenging and Adventitious Utilization of Cyanide as a Nitrogenous Growth of Substrate. En: Journal of Bacteriology, Vol. 187, No. 18 September, 2005, p. 6396-6402.

FERNANDEZ Ruby, DOLGHIH Elena F, y KUNZ Daniel A. Enzymatic Assimilation of Cyanide via Pterin-Dependent Oxygenolytic Cleavage to Ammonia and Formate in *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764. En: Applied and Environmental Microbiology, Vol. 70, No. 1 January, 2004, p. 121-128.

FIGUEIRA MM, CIMINELLI VS, DE ANDRADE MC, LINARDI VR. Cyanide degradation by an *Escherichia coli* strain. En: Canadian Journal of Microbiology. May; 42(5): 1996; p. 519-23.

F. MERCHAN, M.I. Igeño, R. Blasco. Papel de la fumarasa, la aconitasa y la MOQ en el metabolismo del cianuro en *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. En: XXXI Congreso de la sociedad de Bioquímica y Biología Molecular. Bilbao, 10 – 13 septiembre 2008 (R2-12).

F. NAVA Alonso, E. ELORZA, A. URIBE Salas y R. PEREZ Garibay. Análisis químico de cianuro en el proceso de cianuración: revisión de los principales métodos. En: Revista de Metalurgia, Enero-Febrero, 43(1): 2007; p. 20-28.

GARCÉS Adelaida, AGUDELO Lina, MACIAS Karin, SALINAS Natalia. Aislamiento de Consorcio de Microorganismos Degradadores de Cianuro. En: Revista Lasallista de Investigación, Enero-Junio Vol. 3, No.1. 2006, p. 7-12.

GARCÉS Paula, GALLEGO Lilibian y ESPINOSA Paulo. Adaptación del método colorimétrico de Picrato para la determinación de cianuro en las aguas residuales provenientes del proceso de extracción de almidón agrio de yuca. Universidad del Cauca. En: Memorias VII Simposio Latinoamericano de Química Analítica y Ambiental, Universidad de Antioquia Medellín Colombia octubre 2 al 7 2006.

GAVIRIA Ana C., MEZA Luis. Análisis de alternativas para la degradación del cianuro en efluentes líquidos y sólidos del municipio de Segovia, Antioquia y en la planta de beneficio de la empresa mineros nacionales, municipio de Marmato, Caldas. En: Dyna, No. 149 Medellín, Julio de 2006, p. 31-44. ISSN 0012-7353.

GIRALDO ESTRADA, Catalina, Biodegradación de cianuro por medio de un aislado nativo de *Pseudomonas* sp., Medellín, 2007, 86 p., Tesis de Maestría (Biotecnología), Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Posgrado en Biotecnología.

GOBIERNO DE ARAGON. Residuos Convertidos en Fuentes de Energía.

http://www.aragoninvestiga.org/investigacion/temas_todo.asp?id_tema=28&intPagActual=1&categoria=Ciencias+Experimentales&id_categoria=290

Consulta abril 11 del 2007, actualizada 18 noviembre del 2009.

GONZALEZ ALVEREZ, Leonardo y PULIDO HENAO Jorge Horacio. Análisis de alternativas para la degradación del cianuro en la planta de beneficio de la empresa Mineros Nacionales. Medellín, 2004, 77p. Trabajo de grado (Ingeniero de Minas y Metalurgia). Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Minas, Escuela de Materiales.

GONZÁLEZ, Silvia. Impactos ambientales y en la salud humana de la minería a cielo abierto para la extracción de oro utilizando lixiviación con soluciones de cianuro. PARTE I: Efectos en el ambiente.

<http://www.caem.com.ar/novedades/Efectos%20del%20Cianuro.html>

Consulta 22 de mayo del 2006.

GÜLCİN Gümüş, BIRSEN Demirata y RESAT Apak Simultaneous spectrophotometric determination of cyanide and thiocyanate after separation on a melamine-formaldehyde resin en: *Talanta* 53. 2000, p. 305–315

GURBUZ Fatma, CIFTCI Hasan, AKCIL Ata and KARAHAN Aynur Gul. Microbial detoxification of cyanide solutions: a new biotechnological approach using algae. En: *Hydrometallurgy*, Vol. 72, February 2004, p. 167-176.

GURBUZ Fatma, CFTCI Hasan, AKCIL Ata. Biodegradation of cyanide containing effluents by *Scenedesmus obliquus*. En: *Journal of Hazardous Materials*, Vol. 162, February 2009, p. 74-79.

HELBIG Elizabete, BUCHWEITZ Márcia, GIGANTE Denise. Análise dos teores de ácidos cianídrico e fítico em suplemento alimentar: multimistura. En: *Rev. Nutr.*, Campinas, 21(3): maio-jun., 2008, p. 323-328.

ICONTEC Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación Compendio, Tesis y Otros Trabajos de Grado. Bogota, D.C. Colombia edición actualizada 2006-2007.

KNOWLES CJ. Cyanide utilization and degradation by microorganisms. En: *Ciba Foundation Symposium*. 140: 1988, p. 3-15.

KUHN David D., YOUNG Thomas C. Photolytic degradation of hexacyanoferrate (II) in aqueous media: The determination of the degradation kinetics. En: *Chemosphere*, Vol. 60, September 2005, p. 1222-1230.

KUNZ DA, NAGAPPAN O, SILVA-AVALOS J. y DELONG GT. Utilization of cyanide as nitrogenous substrate by *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764: evidence for multiple pathways of metabolic conversion. En: *Applied and Environmental Microbiology*., Vol 58, No. 6 1992, p. 2022-2029.

KUNZ DA, WANG CS y CHEN JL. Alternative routes of enzymic cyanide metabolism in *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764. En: *Microbiology*, Vol 140, 1994, p.1705-1712.

KUNZ Daniel A., CHEN Jui-Lin, y GUANGLIANG Pan. Accumulation of a-Keto Acids as Essential Components in Cyanide Assimilation by *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764. En: *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 64, No. 11 November. 1998; p. 4452–4459

LEBRON I., ROBINSON D., GOLDBERG S. y LESCH S. The Dielectric Permittivity of Calcite and Arid Zone Soils with Carbonate Minerals. En: Soils Science Society of America Journal, Vol 68, september-october, 2004, p. 1549-1559.

LOGSDON Mark; KAGELSTEIN Karen y MUDDER, Ferry. El Manejo del Cianuro en la extracción del Oro, CONCEJO INTERNACIONAL DE METALES Y MEDIO AMBIENTE. S./.. 2006, p. 42

<http://www.aage.org.ar/manejodelcianuro.pdf>

Consulta 11 de abril del 2006. Actualizada 18 noviembre del 2009.

LÓPEZ María José, AGUADO José, GRIEKEN Rafael van and MARUGÁN Javier. Simultaneous photocatalytic reduction of silver and oxidation of cyanide from dicyanoargentate solutions. En: Applied Catalysis B: Environmental. Vol. 86, February 2007, p. 53-62.

LUQUE ALMAGRO Victor Manuel. Metabolismo del cianuro y del cianato en *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. Aplicaciones biotecnológicas. Andalucía: Analistas económicos, 2007. P 187-189. ISBN: 978-84-95191-81-6

LUQUE ALMAGRO Victor, HUERTAS María, SÁENZ Lara, LUQUE ROMERO Manuel, CONRADO MORENO Vivián, CASTILLO Francisco, M. ROLDÁN Dolores and BLASCO Rafael. Characterization of the cyanase from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344, an enzyme that is not essential for cyanide assimilation. En: Applied Environmental Microbiology, published online ahead of print on 15 August 2008

LUQUE ALMAGRO Victor, HUERTAS María, MARTÍNEZ LUQUE Manuel, CONRADO MORENO Vivián, M. ROLDÁN Dolores, GARCIA Jesús, CASTILLO Francisco and BLASCO Rafael. Bacterial Degradation of Cyanide and Its Metal Complexes under Alkaline Conditions. En: Applied Environmental Microbiology. Feb. vol 71, No.2, 2005, p. 940-947.

LUQUE ALMAGRO V., MARTÍNEZ L., BLASCO R., CASTILLO F., ROLDAN M., MORENO V., GARCIA J., HUERTAS M.. Biodegradación de Cianuro y Cianato por la bacteria Alcalófila *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. En: Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. 2002 SEBBM. <http://sebbm.bq.ub.es/sebbm/XXVCongreso/libabs/webserv@bq.ub.es>

Consulta 13 de Julio del 2007.

MACFADDIN, Jean F. Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica. Tercera edición. Madrid: Panamericana, 2003. P.632-634.

MADIGAN, Michael; MARTINKO, John y PARKER, Jack. Biología de los microorganismos: Brock. Octava edición. Madrid: Prentice Hall Iberia, 1999. p. 1064. ISBN: 84-89660-36-0.

MARDER Luciano, GUILHERME O. Sulzbach, BERNARDES Andréa M. and FERREIRA Jane Zoppas. Removal of Cadmium and Cyanide from Aqueous Solutions through Electrodialysis. En: J. Braz. Chem. Soc., Vol. 14, No. 4, , 2003. P. 610-615.

MATHEWS, C. K., VAN HOLDE, K.E., AHERN, K. G. Bioquímica. Tercera edición. Madrid: Editorial Pearson Educación, S.A., 2002. P. 1386 ISBN 84-7829-053-2

MATSUMURA Mitsuo and KOJIMA Toshinori. Elution and decomposition of cyanide in soil contaminated with various cyanocompounds. En: Journal of Hazardous Materials. Vol. 97, February 2003, p. 99-110.

MEGAN Cooper, GHOLAM Reza and HUW D. Williams. Regulation of expression of the cyanide-insensitive terminal oxidase in *Pseudomonas aeruginosa*. En: Microbiology 149, 2003, p.1275-1284.

MERCK, *Pseudomonas* selective agar, Base (cetrimide agar)

http://service.merck.de/microbiology/tedisdata/prods/4984-1_05284_0500.html

Consulta 17 de diciembre de 2008.

MERCK MICROBIOLOGY MANUAL 12 th edition. 2006.

MESTRE Ruby, MENDOZA Jorge, DE LA ROSA Orlando, BARBOSA Aida, Degradación de Cianuro en Aguas Residuales del Sur de Bolívar por Método de Fotocatálisis Heterogénea Utilizando Electrodo Ión Selectivo para la Determinación Analítica. Laboratorio de Investigaciones en Catálisis y Nuevos Materiales Licatuc– Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas Campus Zaragocilla – Programa de Química - Universidad de Cartagena. En: Memorias VII Simposio Latinoamericano de Química Analítica y Ambiental, Universidad de Antioquia Medellín Colombia octubre 2 al 7 2006.

MEYERS P. R., D. E. RAWLINGS, D. R. WOODS, y G. G. LINDSEY. Isolation and Characterization of a cyanide dihydratase from *Bacillus pumilus* C1. En: Journal. Bacteriology. 175, 1993; p. 6105 – 6112.

MEYERS P.R., GOKOOL P, RAWLINGS D. E., WOODS D.R. An efficient cyanide-degrading *Bacillus pumilus* strain. En: Journal Genetics Microbiology. June;137 (Pt 6): 1991; p. 1397-400.

MINERA. Efectos del cianuro en la salud humana y en el medio ambiente (Traducción del artículo "Human Health & Environmental Effects of Cyanide" publicado en el sitio del Código Internacional para el Manejo del Cianuro en la Minería del Oro), 2005.

<http://www.oikosredambiental.org.ar/usocianuro.doc>

Consulta 23 abril 2007.

MINISTERIO DE LA SALUD GOBIERNO DE LA NACIÓN. Boletín Especial Emergencias Químicas Parte I 12 de octubre del 2001.

<http://msal.gov.ar/redartox/documentos/quimicos.pdf>

Consulta 12 de abril de 2007. Actualizada 18 de noviembre del 2009

M.J. Huertas, V.M. Luque-Almagro, M. Martínez-Luque, R. Blasco, C. Moreno-Vivián, F. Castillo and M.-D. Roldán. Cyanide metabolism of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344: role of siderophores. En: Biochemical society transactions, Vol. 34, part 1. 2006.

MONTOYA Carlos. Cianuro, oro y medio ambiente en la minería del nordeste antioqueño. En: Revista Facultad de Ingeniería. junio No. 22: 2001, p. 43-49.

OUJJEHANI K, Zagury GJ and DESCHENES L. Natural attenuation potential of cyanide via microbial activity in mine tailings. En: Applied Microbiology and Biotechnology, March; 58(3): 2002, p.409-15.

PARK Donghee, LEE Dae, KIM Young, PARK Jong. Bioaugmentation of Cyanide-degrading Microorganisms in a full-scale cokes wastewater treatment facility. En: Bioresource. Technology. 2007, doi:10.1016/j.biortech.2007.03.027

POMBO, F.R.; DUTRA, A.J.B. Eletrorrecuperação de cobre e oxidação de cianeto de efluentes cianídricos diluídos gerados por unidade de galvanoplastia. En:

Revista Matéria, vol. 13, n. 3, jul. 2008 p. 418 – 428.

<http://www.materia.coppe.ufrj.br/sarra/artigos/artigo11032>

Consulta enero 30 del 2009

QUINCHÍA Adriana María, GÓMEZ Felipe Andrés, PALENCIA Karol, GIRALDO Lopera Clara Eugenia. Evaluación de la resistencia de un aislado bacteriano nativo compatible con *Pseudomonas* sp. al insecticida LORSBAN 4 EC. En: Revista EIA, Número 5. Junio 2006, p. 101-108.

<http://revista.eia.edu.co/articulos5/art85.pdf>

Consulta enero 29 2009.

QUESADA Alberto, Guijom. Isabel, Merch`an Faustino, Bla`zquez Blas, Ingenom. Isabel and Blasco Rafael. Essential Role of Cytochrome *bd*-Related Oxidase in Cyanide Resistance of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. En: Applied and Environmental Microbiology. Vol. 73, No. 16, August, 2007; p. 5118-5124.

RAYBUCK SA. Microbes and microbial enzymes for cyanide degradation. En: Biodegradation, 3(1): 1992; p. 3-18.

RIANI J. C., LEO V. A., SILVA C. A., SILVA A. M., BERTOLINO S. M. and LUKEY G. C. The elution of metal cyanocomplexes from polyacrylic – and polystyrene – based ion exchange resins using nitrate and thiocyanate eluants. En: Brazilian Journal of Chemical Engineering. Vol. 24, No. 03, July - September, 2007, p. 421 – 431.

ROJAS Hugo, BORDA Gloria del Carmen, REYES Patricio *et al.* Hydrogenation of citronellal over Ir/TiO₂/SiO₂ CATALYSTS. En: Rev.Colomb.Quim., vol.36, no.2, July-December, 2007, p.183-198. ISSN 0120-2804.

ROSHAN Rajesh, GAUR Abhinav, BALOMAJUMDER Chandrajit. Cyanide in industrial wastewaters and its removal: A review on biotreatment. En: Journal of Hazardous Materials, Volume 163, 15 April 2007, p.1-11.

SANTIAGO, I. Intoxicación por gases. *Anales Sis San Navarra*. [online]. [citado 2009-02-02], ISSN 1137-6627. p. 173-180. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1137-66272003000200010&lng=es&nrm=iso.

Consulta 2 febrero 2009.

SAWYER Clair N, MAcCARTY Perryl, PARKIN Gene. Química para ingeniería ambiental. Cuarta edición. Bogotá: Editorial McGraw-Hill, 2001. P. 330-335. ISBN: 9584101641.

SEIGLER, D. S. Isolation and characterization of naturally occurring cyanogenic compounds. *Phytochemistry*. Vol. 40, 1975; p. 9 -29.

SINGLETON Ian. Review Microbial metabolism of xenobiotics: Fundamental and applied research. En: *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* Vol. 59, Feb 2004, p. 9-23.

SOTO, Carolina R; Arroyo, Jorge y Alcayaga, Julio. Effects of bicarbonate buffer on acetylcholine-, adenosine 5'triphosphate-, and cyanide-induced responses in the cat petrosal ganglion in vitro. *Biol. Res.* [online]. 2002, vol. 35, no. 3-4 [citado 2009-02-02], pp. 359-364. Disponible en: <http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-97602002000300010&lng=es&nrm=iso>. ISSN 0716-9760.

SMITH, Adrian y Mudder, Ferry. The chemistry and treatment of cyanidation wastes. London. En: Mining journal books limited, 1991. 560p.

WANG Chien-Sao, Kunz Daniel A., y Venables Barney J.. Incorporation of Molecular Oxygen and Water during Enzymatic Oxidation of Cyanide by *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764. En: *Applied Environmental and Microbiology*, Vol. 62, No. 6 June, 1996, p. 2195–2197.

WAYNE, Daniel. Bioestadística: Base para el análisis de las ciencias de la salud. Tercera edición. México: Editorial Limusa, 1996. p. 875 ISBN 968-18-5196-X.

ZHURBENKO, Raisa; Rodríguez M., Claudio; Diaz P., Marilyn; Duran V. Anabel; López H. Orestes; Viera O. Diana. Caracterización de la peptona de soya para el cultivo de microorganismos. *Revista Cubana Medicina Tropical* [online]. 2006, vol. 58, no. 2 Disponible en:http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602006000200003&lng=es&nrm=iso . ISSN 0375-0760. Consulta 3 de marzo 2008.