

**AISLAMIENTO DE BACTERIAS DEGRADADORAS DE CIANURO RESIDUAL
DE LAS PLANTAS DE CIANURACIÓN DEL MUNICIPIO DE LOS ANDES-
SOTOMAYOR**

FREDDY WILLIAM BENAVIDES NARVAEZ

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMATICAS
PROGRAMA DE BIOLOGIA CON ENFASIS EN MICROBIOLOGIA
PASTO
2004**

**AISLAMIENTO DE BACTERIAS DEGRADADORAS DE CIANURO RESIDUAL
DE LAS PLANTAS DE CIANURACIÓN DEL MUNICIPIO DE LOS ANDES-
SOTOMAYOR**

FREDDY WILLIAM BENAVIDES NARVAEZ

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de
Biólogo con énfasis en Microbiología**

**Asesor
Magister ALVARO PAZOS MONCAYO**

**Coasesor
Dr. STEFFEN TEBBE**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMATICAS
PROGRAMA DE BIOLOGIA CON ENFASIS EN MICROBIOLOGIA
PASTO
2004**

Nota de aceptación:

Msc Alvaro Pasos
Director

Dr. Benjamin Sañudo
Jurado

Msc. Jaqueline
Jurado

Pasto, 27 Enero 2004

“Las ideas y conclusiones aportadas en la tesis de grado, son responsabilidad exclusiva de los autores”

“Artículo 1 del acuerdo No. 234 de octubre 11 de 1966, emanada por el Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.”

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCION	14
1. OBJETIVOS	16
1.1 OBJETIVO GENERAL	16
1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	16
2. MARCO TEORICO	17
2.1 QUIMICA DEL CIANURO	17
2.1.1 Ion cianuro	17
2.1.2 HCN molecular	17
2.1.3 Cianuro de hidrogeno	17
2.2 GENERALIDADES DEL CIANURO	18
2.3 DEGRADACION MICROBIOLOGICA DEL CIANURO	19
2.3.1 Genero <i>Pseudomonas</i>	21
2.3.2 Genero <i>Klebsiella</i>	23
2.3.3 Genero <i>Chromobacterium</i>	24
2.4 CIANURACION	24
2.4.1 Proceso de percolación	26
2.4.2 Toxicología	28
3 MATERIALES Y METODOS	30
3.1 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS DEGRADADORAS DE CIANURO	30
3.1.1 Muestreo	30
3.1.2 Preparación de los medios de cultivo	30
3.1.3 Aislamiento de bacterias tolerantes al cianuro	31
3.1.4 Aislamiento e identificación de bacterias degradadoras de cianuro	32
3.2 DEGRADACION BIOLOGICA DEL CIANURO	32

3.2.1	Estandarización del inóculo	32
3.2.2	Determinación de los parámetros cinéticos de los aislados	33
3.2.3	Determinación de la cinética de crecimiento de los aislados	34
3.2.4	Determinación de la cinética de degradación del cianuro	34
4	RESULTADOS Y DISCUSION	35
4.1	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS DEGRADADORAS DE CIANURO	35
4.1.1	Muestreo	35
4.1.2	Aislamiento de bacterias tolerantes al cianuro	35
4.2	DEGRADACIÓN BIOLÓGICA DEL CIANURO	37
4.2.1	Estandarización del inóculo	37
4.2.3	Degradación biológica del cianuro por aislado <i>Pseodo Monas Xp5d</i>	50
5	CONCLUSIONES	54
	BIBLIOGRAFIA	55
	ANEXOS	58

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Características del genero Pseudomonas	22
Tabla 2. Composición de los medios de cultivo BS1 y BS2	31
Tabla 3. Soluciones indicadoras de amonio, nitratos y nitritos	32
Tabla 4. Cuantificación del cianuro presente en los tanques de cianuración a tres Diferentes profundidades en minas auríferas del Municipio de los Andes-Sotomayor	35
Tabla 5. Cepas bacterianas aisladas tolerantes al cianuro	36
Tabla 6. Identificación y aislamiento de cepas capaces de degradar el cianuro.	37
Tabla 7. Determinación de los parámetros cinéticos de crecimiento específico	38
Tabla 8. Determinación de los parámetros cinéticos de degradación específica de sustrato	43
Tabla 9. Toxicidad del cianuro. Relación entre actividad biológica (k) y concentración del cianuro	51

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Estandarización de inóculos	39
Figura 2. Crecimiento de la cepa bacteriana <i>Pseudomonas</i> Xp5d	40
Figura 3. Crecimiento de la cepa bacteriana <i>Chromobacterium</i> Xn5k	41
Figura 4. Crecimiento de la cepa bacteriana <i>Klebsiella</i> Xm1m	42
Figura 5. Degradación del cianuro por la cepa bacteriana <i>Pseudomonas</i> Xp5d. Concentración de cianuro 219 mg CN ⁻ -N/L (407 mg CN-/L)	44
Figura 6. Degradación del cianuro por la cepa bacteriana <i>Pseudomonas</i> Xp5d. Concentración de cianuro 188 mg CN ⁻ -N/L (350 mg CN-/L)	45
Figura 7. Degradación del cianuro por la cepa bacteriana <i>Pseudomonas</i> Xp5d. Concentración de cianuro 139 mg CN ⁻ -N/L (257.8 mg CN-/L)	46
Figura 8. Degradación del cianuro por la cepa bacteriana <i>Pseudomonas</i> Xp5d. Concentración de cianuro 80 mg CN ⁻ -N/L (148.5 mg CN-/L)	47
Figura 9. Degradación del cianuro por la cepa bacteriana <i>Chromobacterium</i> Xn5k. Concentración de cianuro ____ mg CN ⁻ -N/L (298.4 mg CN-/L)	48
Figura 10. Degradación del cianuro por la cepa bacteriana <i>Klebsiella</i> Xm1m. Concentración de cianuro ____ mg CN ⁻ -N/L (158.3 mg CN-/L)	49
Figura 11. Toxicidad del cianuro para la cepa <i>Pseudomonas</i> Xp5d. Relación entre actividad biológica (k) y la concentración de cianuro.	51

LISTA DE ANEXOS

	pag.
Anexo A. Esquema planta cianuración.	59
Anexo B. Lugares de muestreo.	60
Anexo C. Sistema BBL cristal.	61
Anexo D. Cuantificación cianuro.	63
Anexo E Registros fotográficos mina.	66
Anexo F. Registros fotográficos laboratorio.	67

RESUMEN

Esta investigación evaluó la capacidad degradativa de cianuro residual por parte de bacterias del genero *Pseudomonas*, *Chromobacterium* y *Klebsiella* aisladas de fluentes líquidas y sólidas de la planta de cianuración de oro de la Quebrada Honda en el Municipio de los Andes – Sotomayor -Nariño – Colombia. La metodología asumida involucro desde el aislamiento de bacterias, la determinación de la cinética de crecimiento, la estandarización del cultivo del inóculo, hasta evaluación de parámetros de degradación de cianuro, producción de amonio, nitratos y nitritos. Solo un aislado del genero *Pseudomonas* presentó diferencias estadísticamente significativas en relación a la capacidad de degradación total de cianuro, en contraste con los dos aislados *Chromobacterium* y *Klebsiella* que lo hicieron en menor proporción. Se pudo concluir que los productos de metabolización de cianuro residual pueden influir en el crecimiento de los aislados de *Chromobacterium* y *Klebsiella* y por ende en su capacidad metabólica relacionada a su capacidad de degradación del tóxico.

SUMMARY

In the present study, it was evaluated cyanide-degradation ability by bacteria belonging to the *Pseudomonas*, *Chromobacterium* and *Klebsiella* genera isolated from liquid and solid samples of gold cyanidation plants. The used methods were bacteria isolation, specific growth and cyanide-degradation kinetics-parameter estimation, inoculum size standardization and recording of cyanide products (ammonia, nitrate and nitrite). Only an isolate identified as *Pseudomonas* XP5d was able to tolerate and to degrade cyanide with concentration of 400 mg CN⁻/L. Besides this isolate exhibited relatively high growth and substrate degrading constants compared to the other isolates. Maximum growth and substrate degrading couldn't be calculated by using linear analysis or the integrated Michaelis-Menten equation, even as the Lineweaver-Burke equation. The relation among cyanide concentration logarithm and specific substrate-degrading constant permitted to establish cyanide inhibition effect about biological activity of isolate *Pseudomonas* XP5d. Hence, this inhibition effect would be caused by that here reported data don't fit to the traditional Michaelis-Menten saturation model.

INTRODUCCION

Debido al mal manejo en el proceso de extracción de oro en el municipio de los Andes-Sotomayor, se presentan escapes de productos y precursores tóxicos como el cianuro y el mercurio que contaminan el suelo y el agua principalmente. Acorde con Curry¹, cuando los seres vivos o el ambiente abiótico los puede asimilar, transformar o eliminar continuamente a estos materiales, se considera que existe equilibrio ecológico. Sin embargo, debido al gran aumento en la cantidad de sustancias que entran al ambiente, se ha rebasado la capacidad de los sistemas para degradar dichas sustancias, por lo tanto se produce desequilibrio ambiental.

El cianuro, aún en mínimas cantidades es un contaminante muy peligroso por su acción venenosa; se encuentra presente en arena y agua desechada en el proceso de extracción minera. Aiba, et al², ha reportado diversos estudios sobre degradación microbiana de cianuro residual, en donde afirman que este elemento es utilizado como fuente de nitrógeno por diferentes géneros de bacterias como *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Moraxella*, *Serratia* y *Klebsiella*.

Los compuestos de cianuro poseen un gran número de propiedades beneficiosas, lo que ha dado lugar a su producción comercial y aplicación industrial como en la minería de oro, producción de acrílicos, polietileno, plateado de metales, gasificación del carbón y quema de carbón. Según Marruecos, Nogue y Nolla³, el cianuro de sodio es el compuesto de cianuro que se utiliza con mayor frecuencia en la industria minera, seguido del cianuro de potasio.

Las concentraciones de los compuestos sintéticos de cianuro que se emplean en los procesos industriales son mucho más elevadas que aquéllas que se encuentran en la naturaleza y son tóxicas para una serie de organismos. En consecuencia, el empleo industrial de los compuestos de cianuro debe ser controlado, con el fin de evitar su descarga en concentraciones que excedan la capacidad de asimilación del medio ambiente.

En el presente trabajo se aisló bacterias degradadoras de cianuro en diferentes caldos de cultivo. Se realizó su respectiva identificación, se determinó la cinética de crecimiento,

¹ CURRY, S. Medical Toxicology. Critical care clinics. Philadelphia: W.B. Saunders, 1997. p.

² AIBA, S. ; HUMPHREY, A. E., and MILLIS, N. F. Biochemical Engineering. 2th. ed. Academic press, London : Academic Press,1996. p.1030.

³MARRUECOS, L.; NOGUÉ, S. , NOLLA J. Toxicología clínica. Barcelona : Springer-Verlag Ibérica, 1993. p.6.

porcentaje y velocidad de degradación de cianuro residual. En un futuro esta investigación podría ser considerada como alternativa de biorremediación para tratamiento de desechos contaminados con cianuro provenientes de efluentes líquidos y sólidos de las plantas de cianuración que se encuentran a orillas de quebrada Honda en el municipio de los Andes-Sotomayor, favoreciendo la preservación de seres vivos, recursos naturales y por ende el equilibrio ambiental.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar *in vitro* la capacidad de degradación de cianuro residual por bacterias aisladas de los residuos del proceso de cianuración en las minas de oro del municipio de Los Andes-Sotomayor, departamento de Nariño.

1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- ? Aislar bacterias con capacidad degradadora de cianuro de sodio.
- ? Identificar géneros de bacterias con capacidad degradadora de cianuro de sodio.
- ? Determinar cualitativa y cuantitativamente la capacidad degradadora de bacterias sobre cianuro de sodio.

2. MARCO TEORICO

2.1 QUIMICA DEL CIANURO

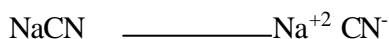
Según Escobar y Echeverry⁴, la familia del cianuro comprende un grupo de compuestos inorgánicos que se caracterizan por la presencia del grupo C≡N. Los compuestos orgánicos que contienen este grupo se denominan nitrilos e isonitrilos. Algunos autores han descrito al cianuro como un pseudo halógeno. Sin embargo y acorde con Escobar y Echeverry⁵, Curry⁶ y Vicellio⁷, esta analogía no es siempre adecuada, especialmente en términos de formación de complejos metálicos.

2.1.1 Ion cianuro. Este término se refiere únicamente al anión libre (CN)⁻ en solución.

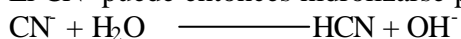
2.1.2 HCN molecular. El HCN molecular es una molécula neutra a la que se denomina ácido cianhídrico o cianuro de hidrógeno.

2.1.3 Cianuro de hidrogeno., el cianuro de hidrógeno o ácido cianhídrico (HCN) es un líquido o gas incoloro con un punto de ebullición de 25.7°C. Escobar y Echeverry⁸, Baud, Barriot y Riou⁹, afirman que se trata de un ácido débil, altamente soluble en agua, con una constante de disociación de 4.365×10^{-10} y $pK_a = 9.31$ a 20°C.

Los cianuros simples son sales formadas por la reacción del cianuro de hidrógeno con una base como NaOH o Ca(OH)₂. Los cianuros simples se disocian en agua formando ion cianuro y cationes metálicos solubles:



El CN⁻ puede entonces hidrolizarse para formar HCN y OH⁻, de la siguiente manera:



⁴ ESCOBAR, J. y ECHEVERRI, A. Notas sobre minería de veta y cianuración. Medellín : Fundación Escobar, 1995. p.895.

⁵ Ibid., p.895.

⁶ CURRY, op. cit., p.206.

⁷ VICCELIO, P. Handbook of medical toxicology. Boston : Little Brown's, 1993. p.46.

⁸ ESCOBAR y ECHEVERRY, op. cit. p.895.

⁹ BAUD, F.; BARRIOT, P. and RIOU, B. Les antidotes. Paris : Masson, 1992. p.158.

Según Vicellio¹⁰ y Dueñas¹¹, la propiedad química por la cual el Ion cianuro es utilizado en aplicaciones industriales, es su capacidad para formar complejos con varios iones metálicos. La formación de complejos se limita casi totalmente a los metales de transición del bloque de la tabla periódica y sus vecinos como son Zn, Cd y Hg. Se sabe que 28 elementos en diferentes estados de oxidación, pueden formar 72 complejos con el cianuro, la mayor aniónicos.

2.2 GENERALIDADES DEL CIANURO

Klaassen and Eatun¹², Dueñas¹³ y Vicellio¹⁴ aseguran que el término cianuro sirve para designar a una familia de compuestos aniónicos que se caracterizan por la presencia de un átomo de carbono enlazado a un átomo de nitrógeno mediante un enlace triple. La palabra cianuro tiene connotaciones negativas debido a que muchos de sus compuestos presentan propiedades sumamente tóxicas o letales, como lo demuestra su aplicación en venenos.

Generalmente no se tiene conocimiento que los compuestos de cianuro se encuentran en la naturaleza y en un gran número de plantas alimenticias, entre las que figuran las almendras, cerezas, legumbres, alfalfa, rábanos, repollos, col, coliflor, yuca, brócoli y nabos. Klaassen and Eatun¹⁵, Dueñas¹⁶ y Vicellio¹⁷ opinan que las personas suelen entrar en contacto con los compuestos de cianuro a través de alimentos y otros productos, que son eliminados por el hígado, por lo que no llegan a alcanzar concentraciones dañinas para la salud.

Conforme Klaassen and Eatun¹⁸, Marruecos L, Nogué S, Nolla¹⁹ La combustión de un gran número de sustancias naturales y sintéticas como la lana, seda, acrílicos y poliuretanos produce desprendimiento de cianuro de hidrógeno. Se cree que el envenenamiento por

¹⁰ VICELLIO, op. cit., p.48.

¹¹ DUEÑAS, Laita A. Intoxicaciones agudas en medicina de urgencia y cuidados críticos Barcelona: Mason, 1999. p.207.

¹² KLAASSEN, C. D. and EATUN, D. L.. Principles of toxicology casarett and doulls toxicology. 8ª ed. New York : Elmsfors, 1997. p.277.

¹³ DUEÑAS, op. cit., p.209.

¹⁴ VICELLIO, op. cit., p.51.

¹⁵ KLAASSEN and EATUN, op. cit. p.290.

¹⁶ DUEÑAS, op. cit., p.209.

¹⁷ VICELLIO. op. cit., p.51.

¹⁸ KLAASEEN and EATUN, op.cit., p.280.

¹⁹ MARRUECOS, NOGUE Y NOLLA, op. cit., p.41.

cianuro sea una de las principales causas mortales entre las víctimas de los incendios.

2.3 DEGRADACION MICROBIOLOGICA DEL CIANURO

El cianuro y los compuestos de cianuro fueron componentes importantes en la evolución química que se llevó a cabo en los océanos y la atmósfera de la tierra antes de que la vida se formara. La evolución química en la tierra prebiótica parece haber sido necesaria en la aparición de las primeras formas de protovida y de vida primitiva. anotan que el desarrollo de las formas de vida temprana sugiere que estos organismos podrían haber sido capaces de vivir y florecer en presencia de cianuro. Thompson²⁰ y Yadav²¹, anotan que las bacterias primitivas podrían haber usado compuestos de cianuro como una fuente de carbón o nitrógeno para reacciones metabólicas celulares. Investigaciones recientes han demostrado que varios aminoácidos, purinas; adenina, guanina y las pirimidinas; citosina, timina pueden ser sintetizadas en las células bacterianas a partir de cianuro como materia prima.

El-Ghaoui *et al*²² afirman que aunque el cianuro es extremadamente tóxico aún en pequeñas dosis para muchas formas de vida terrestre, algunas bacterias son capaces de tomar compuestos de cianuro para la célula, usando el carbono y el nitrógeno del cianuro como bloques básicos de construcción para la producción de aminoácidos y proteínas en la célula.

Bajo condiciones anaeróbicas y aeróbicas, los compuestos de cianuro en el suelo son degradados a $\text{NH}_3 + \text{CO}_2$. Las comunidades microbianas son capaces de metabolizar cianuro, estando adaptadas a concentraciones de cianuro tan altas como de 450 mg/l. Este proceso se aplicó por primera vez en gran escala en 1984, en la mina "Lead of Homestake" en South Dakota EE.UU. Se usaron 48 contactores biológicos rotatorios para tratar agua de mina, mezclada con arena cianurada. Este proceso requirió de aclimatación gradual de los géneros mutantes de bacteria (*Pseudomonas*, *Azorhizobium*) a la alta concentración de cianuros y tiocianatos. Lien *et al*²³ y Mudder *et al*²⁴ opinan que al proceso también es necesario adherir nutrientes tales como ácido fosfórico y bicarbonato

²⁰ THOMPSON, Leslie. Cyanide biotreatment and metal biomineralization in spent ore and process solutions. www. Cyanide bioremediation.com, 1998. p.890.

²¹YADAV, J. et al. Degradation of Polychlorinated Biphenyl Mixtures (Aroclors 1242-1254 y 1260) by the white Rot Fungus *Phanaerochaete chrysosporium* as Evidenced by congener-Specific Analysis. Applied and Environmental Microbiology vol.61. N°7, 1995. p.2570.

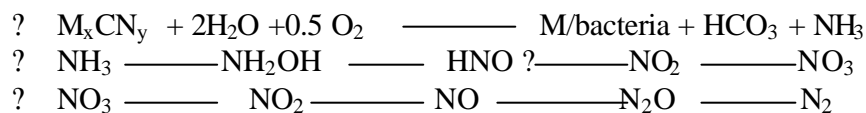
²² EL-GHAOUI, E. A., JANNSON, R. E. W. and MORELAND, C. Application of the Trickle Tower to Problems of Pollution Control. ii. The direct and Indirect Oxidation of Cyanide. *In*: Journal of Applied Electrochemistry, volume 12, 1993. p.71.

²³ LIEN, R. et al. Chemical and biological cyanide destruction and selenium removal from precious metals tailings pond water. Proceedings GOLD '90. Symposium, Salt Lake City Utah 26. Editors :Donald M Hausen, Douglas N Halbe, Erich U Petersen and William J Tafuri. February to 1 March, 1990. p.668.

Lien *et al*²⁵ opinan que el uso de estos microorganismos se realizó con el fin de aprovechar su necesidad de alimentarse para poder procrear; estos pueden dividirse cada 20 a 30 minutos y una vez agotadas las condiciones óptimas se inactivan, mueren o son degradadas por otros organismos. Para la bioremediación del cianuro se utilizan cepas nativas, las cuales eliminan el cianuro de las aguas, arenas, sedimentos y sólidos; ahorrando significativamente los costos en comparación con los tratamientos convencionales o químicos.

No obstante, las bases bioquímicas de estas capacidades de degradación son en gran parte no estudiadas. La mayoría de investigaciones han señalado que los microorganismos degradan el cianuro captando el nitrógeno y asimilan y/o elimina al carbono como CO₂, rompiendo de esta manera la estructura molecular del cianuro. Los subproductos de la degradación son el amoniaco NH₃ y el CO₂. Ajustándose a Muir *et al*²⁶, el microorganismo vuelve a degradar el NH₃ captando al nitrógeno posiblemente luego de llevarlo a amina NH₂ donde le resulta más fácil captar al nitrógeno para su metabolismo, esto por medio de reacciones hidrolíticas y oxidantes en las que intervienen enzimas como dihydratasa de cianuro, hidratasa de cianuro y oxidasa de cianuro, dando a entender que esta última enzima es la más importante en el metabolismo y asimilación del cianuro residual.

Conforme a Thompson²⁷, la secuencia hipotética de la reacción en bacterias para la oxidación de cianuro es resumida en las siguientes ecuaciones.



La remediación biológica de desechos mineros de cianuro está acompañada por la introducción de bacterias metabolizantes del cianuro a una fuente de desechos ó estimulando bacterias nativas por adicción de nutrientes. Las bacterias escogidas para el tratamiento de cianuro en el campo de minerales desgastados en varias minas son aisladas a partir de montones de mineral desgastado y soluciones de proceso.

²⁴ MUDDER, F. et al. Biological treatment of cyanide wastewaters : design, start-up and operation of a full scale facility. Lead, South Dakota : Homestake Mining Comp any, 1998. p.782.

²⁵ LIEN, et al., op. cit., p.678.

²⁶ MUIR, D. M.; AZIZ, M. and HOECKER, W. Cyanide losses under cip conditions and effects of carbon on cyanide oxidation. Canada :International Plubishers, 1995. p.465.

²⁷ THOMPSON, op. cit., p.890.

El concepto de Gentina y Acevedo²⁸; y Thompson²⁹ es que para una destoxificación satisfactoria del cianuro, la habilidad natural degradante de cianuro por los microorganismos debe ser incrementada. Además se debe tener en cuenta que cada mina posee una química específica del sitio y del desecho.

2.3.1 Genero *Pseudomonas*. Bacilos rectos o levemente curvos, no helicoides; diámetro 0.5 – 1.0 µm; de longitud 1.5 – 5.0 µm; no están rodeados por envolturas; Gram negativo, motil por uno o varios flagelos polares; raramente no motil. En algunas especies también puede formarse un flagelo lateral de longitud de onda más corta. Aeróbicas, las cuales poseen un tipo respiratorio de metabolismo con el oxígeno estrictamente como el aceptor terminal de electrones; en algunos casos el nitrato puede ser usado como un aceptor de electrones alterno, permitiéndole crecer anaeróbicamente. Son incapaces de crecer bajo condiciones ácidas, (pH 4.5). La mayoría de las especies no requieren de factores de crecimiento orgánicos. Son oxidasa positivo o negativo, catalasa positivo. Quimiorganotróficos, Según Okoh et al³⁰, Brock y Madigan³¹ consideran que algunas especies son quimiolitotrofos facultativos, capaces de usar H₂ o CO como fuentes de energía. Ampliamente distribuidas en la naturaleza. Algunas especies son patógenas para humanos animales o plantas.

²⁸ GENTINA, J. C. y ACEVEDO, F. C. Lixiviación bacteriana de minerales. En : IV Curso Latinoamericano de Biotecnología. Chile, 1992. p.955.

²⁹ THOMPSON, op. cit., p.890.

³⁰ OKOH, A. M. et al. Potential of *Stenotrophomas maltophilia* (GB1) in the biodegradation of weathered heavy crude oil (Maya).GAZZ.MED.ITAL-ARCH.SCI.MED, 2000. p.1060.

³¹BROCK, Thomas and MADIGAN, Michael. Microbiología. 9 ed. México : Prentice Hall Hispanoamericana, 1998. p.709.

Tabla 1. Características del genero *Pseudomonas*

Características	
1. Diámetro celular, 0.5 – 0.7 µm	
2. Longitud celular 1.5 – 3.0 µm	
3. Número de flagelos 1	
4. Producción de pyocianinas	+
5. Producción de pyoverdinas	+
6. Producción de clororaphin	-
7. Producción de monocarboxilato de phenazina	-
8. Otros pigmentos (no caroteoides)	+
9. Pigmentos celulares (amarillo naranja)	-
10. Oxidosa	+
11. Acumulación Acido Polihidroxitirico	-
12. Formación de levan a partir de sucrosa	-
13. Licuefacción de gelatina	+
14. Hidrólisis del almidón	-
15. Crecimiento autrófico con H ₂	-
16. Lesitinasa (yema de huevo)	-
17. Lipasa (hidrólisis de 80°C)	+
18. Hidról. Extracelular de Acido Polihidroxitirico	-
19. Crecimiento a 4°C	-
20. Crecimiento a 41°C	+
21. Denitrificación	+
22. Dihidrolasa orginina	+
23. Catecol, rompimiento orto	+
24. Protocatecuato, romp orto	+

Citado: MacFadin, J.F., 1997

2.3.2 Genero *Klebsiella*. Bacilos rectos, diámetro 0.3 –1.0 µm y longitud 0.6 – 6.0 µm, dispuestos en forma individual, pares o cadenas cortas. En conformidad con la definición general de la familia enterobacteriacea. Capsulada, Gram negativa, no motil, anaerobia facultativa, teniendo un tipo de metabolismo respiratorio y fermentativo. Crece sobre agar extracto de carne, produciendo colonias brillantes variables de espesor dependiendo de la cepa y de la composición del medio. No hay requerimientos de factores de crecimiento especiales. Oxidasa negativa; La mayoría de las cepas pueden usar como única fuente de carbono, citrato y glucosa, La glucosa es fermentada produciendo ácido y gas (se produce más CO₂ que H₂), pero también existen cepas anaerogénicas. La mayoría de las cepas producen 2.3 butenodiol como producto y el test voger-proskawer es por lo general positivo; los ácidos láctico, acético y fórmico son formados en cantidades más pequeñas y el etanol en cantidades más gandes. La fermentación de inositol, la hidrólisis de urea y la carencia de producción de decarboxilasa ornitina H₂S son caracteres distintivos adicionales. Algunas cepas fijan nitrógeno, se presenta en contenidos intestinales, especímenes clínicos, suelo, granos, agua, etc. Macfadin³², Brock³³ y Bauer³⁴ encontraron que el el contenido % molar del DNA es 53-58.

Cocuan *et al*³⁵, citado por Meyers *et al* reconocieron cinco especies en el grupo *Klebsiella*: *K. aerogenes*, *K. pneumoniae* (Sensu stricto 1984), *K. azaenae*, *K. rhinoscleromatis*, y *K. edwardsii* con dos variedades; *K. edwardsii* var. *Edwardsii* y *K. eedwardsii* var *atlantas*. La clasificación de Coucuan *et al* es usada en el reino unido y en otros lugares, pero no en Estados Unidos . Esto significa que el mismo organismo puede ser clasificado como *K. pneumoniae* o *K. aerogenes* dependiendo del país. Naemura and Woodward³⁶ y Brock³⁷, han sugerido la existencia de dos especies de *Klebsiella* adicionales que contiene cepas de origen ambiental.

³² MACFADIN, J. F. Biochemical Tests for Identification of bacteria. 2th. ed. Baltimore : Williams & Wilkins, 1997. p.228.

³³ BROCK and MADIGAN, op. cit., p.710.

³⁴ BAUER, J. L. Lixiviación Bacteriana: Introducción a la parte microbiológica de la Biohidro-metalurgia con sp. de Thiobacillus. En: Revista de la ANBIOP, 1986. p.55.

³⁵ COCUAN

³⁶ NAEMURA and WOODWARD. Et al microbiology identification of bph genes encoding biphenyl/polychlorinated biphrnyl degradation in soil bacteria. s.l. : s.n.,1979. p.460.

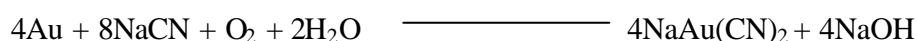
³⁷ BROCK and MADIGAN, op. cit., P.710.

2.3.3 Genero *Chromobacterium*. Según Macfadin³⁸, Brock³⁹ y Bauer⁴⁰, los bacilos de 0.6 – 0.9 x 1.3 – 3.5 μm, con extremos redondeados, algunas veces levemente curvos se presentan de forma individual, ocasionalmente pares, formas elongadas o cadenas cortas, poseen cápsulas no definidas, Gram negativa y con inclusiones lipídicas; motil por medio de un flagelo único polar y usualmente de uno a cuatro flagelos subpolares o laterales, anaerobios facultativos, produce colonias violetas, en caldo nutriente un anillo violeta se forma en la unión de la superficie líquida y la pared del recipiente, El crecimiento se da a 25°C pero las especies difieren en sus temperaturas óptimas, máximas y mínimas. pH óptimo 7-8; no hay crecimiento a pH por de bajo de 5. Quimiorganotrofos, teniendo principalmente un ataque fermentativo sobre los carbohidratos. Produce ácido pero no gas, a partir de glucosa y otros carbohidratos. El lactato es oxidado a CO₂ por lo general son oxidasa positivos, aunque el pigmento violeta puede interferir con la lectura. Catalasa positivo, indol negativo, nitratos y usualmente nitritos son reducidos, forman amonio a partir de peptona, fosfatasa positivo, arilsulfatasa negativo. Crece sobre medios ordinarios, puede utilizar citrato y amonio como las fuentes únicas de carbono y nitrógeno pero el crecimiento se da lentamente. No requiere factores de crecimiento, resistente a la bencilpenicilina (10μg / ml), sensible a la tetraciclina (30μg / ml). El % molar Guanina + Citocina del DNA es 50-68.

2.4 CIANURACION

Conforme Klaassen and Eatun⁴¹, es un proceso hidrometalúrgico, consistente en la disolución de los metales preciosos, en soluciones de cianuros para luego precipitarlos en un proceso electroquímico con zinc

Siguiendo a Escobar y Echeverry⁴², y Semprini⁴³, tanto el oro como la plata metálicos pueden ser recuperados de los minerales por procesos de lixiviación que utilizan cianuro para formar complejos estables. Para ello se requiere un agente oxidante, según la siguiente ecuación general conocida como ecuación de Elsner.



³⁸ MACFADIN, op. cit., p.225.

³⁹ BROCK and MADIGAN, op.cit., p.711.

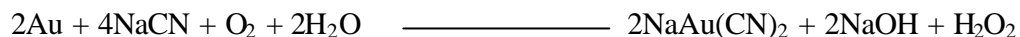
⁴⁰ BAUER, op. cit., p.60.

⁴¹ KLAASSEN and EATUN, op. cit., p.277.

⁴² ESCOBAR Y ECHEVERRY, op. cit., p.897.

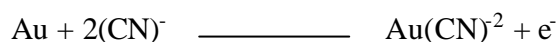
⁴³ SEMPRINI, Lewis. Bioremediation of chlorinated and polycyclic aromatic hydrocarbon compounds. Boca Raton, Florida: Lewis Publishers, 1994. p.861.

Thompson⁴⁴ revisó los estudios efectuados acerca de los mecanismo de cianuración y propuso la ecuación para la reacción de disolución:

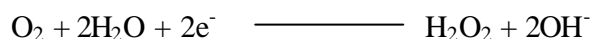


Escobar y Echeverry⁴⁵ informan que la reacción describe un proceso de corrosión en el cual el oxígeno absorbe los electrones en una zona catódica sobre la superficie metálica, mientras que en una zona anódica del metal éste cede electrones e ingresa a la solución como complejo de cianuro. De este modo, se producen dos reacciones electroquímicas de semicelda, que se balancean mutuamente.

Reacción anódica:

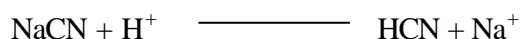


Reacción catódica:



En años recientes se ha considerado que la velocidad de lixiviación está condicionada por la cantidad disponible de oxidante. Por ello se ha introducido en el proceso, oxígeno o aire enriquecido con oxígeno mediante reactivos como el peróxido de hidrógeno. Las pruebas de laboratorio citadas por Wute y Haner⁴⁶, muestran que si este reactivo es añadido en exceso la velocidad de la cianuración disminuye debido a la oxidación del cianuro, con lo cual están de acuerdo Escobar y Echeverri⁴⁷.

Las soluciones de cianuro para la lixiviación de metales preciosos, se preparan por lo general con cianuro de potasio o cianuro de sodio de uso comercial. La estabilidad de estas soluciones depende de su pH; un pH más bajo favorece la pérdida de cianuro por formarse HCN:



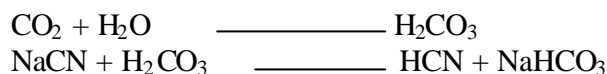
Un ejemplo significativo de esta reacción tiene lugar cuando el ion hidrógeno es generado por la absorción del CO₂ atmosférico por parte de la solución :

⁴⁴ THOMPSON, op. cit., p.900.

⁴⁵ ESCOBAR Y ECHEVERRY, op. cit., p.1100.

⁴⁶ WUTE, David., and HANER, N. B. / and applied approach toxicology for engineers U.S. New York : Department of Health, 1997. p.892.

⁴⁷ ESCOBAR Y ECHEVERRY, op. cit., p.1102.



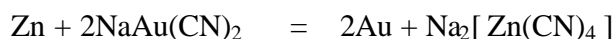
Cortijo y Alvarez⁴⁸, afirman que con el fin de retener el cianuro en la solución y controlar las emisiones de cianuro de hidrógeno en el lugar de trabajo, se agrega cal para que reaccione con los iones de hidrógeno. Las adiciones de cal también contribuyen a subir el pH de la solución de cianuro el cual debe de estar entre 11.5 y 12.5 de pH, para así evitar la evaporación del cianuro en forma de ácido cianhídrico (HCN).

El zinc puede hallarse en las soluciones de cianuro del procesamiento de minerales, como resultado del ataque del ion cianuro a los minerales de zinc o por la adición zinc en polvo para precipitar metales preciosos como una operación unitaria del proceso.

Según Bauer⁴⁹, la descomposición del cianuro de zinc por la adición del exceso de cal puede expresarse de la siguiente manera.1986. 53-60 p.).



La recuperación del oro por precipitación de zinc se expresa en la siguiente reacción.



A diferencia de otros metales, el zinc no compite con el oro en la formación de complejos de cianuro. Bauer⁵⁰ sostiene que una solución de $\text{Na}_2\text{Zn}(\text{CN})_4$ que contiene cal y oxígeno posee casi el mismo poder disolvente para el oro que una de NaCN y fuerza equivalente. Cortijo y Alvarez⁵¹, Escobar y Echeverry⁵²,afirman que el poder disolvente se reduce por una dosificación inadecuada de cal, lo cual sugiere que en condiciones de pH más elevadas el complejo de cianuro de zinc se convertirá en zincato, liberando cianuro, el cual reaccionará con el oro.

2.4.1 El proceso de percolación. La cianuración en las minas Gualconda, Nueva Esparta y La Victoria a lo largo de quebrada Honda, del municipio de los Andes-Sotomayor se lleva a cabo por medio de percolación.

⁴⁸ CORTIJO, Agusberto y ALVAREZ, Hernán. Pre-tratamientos hidrometalurgicos alternativos para disminuir el consumo de cianuro y aumentar la recuperación de oro en plantas de cianuración. Lima : Facultad de Toxicología, 1997. p. 469.

⁴⁹ BAUER, op. cit. p.59.

⁵⁰ Ibid., p. 60

⁵¹ CORTIJO Y ALVAREZ, Op. cit. p.468.

⁵² ESCOBAR Y ECHEVERRY, op. cit., p.1140.

El sistema de percolación es el más popular en la región dado que por parte de los propietarios de las minas no existe interés por información o no tienen la posibilidad económica para tecnificar la extracción de oro. En Colombia se considera que hay en actividad unas 500 plantas, con promedio de 40 toneladas de arenas auríferas. El proceso dura hasta 30 días y consta de 3 unidades: 1) El tanque principal donde se encuentra la arena que será cianurada, 2) El tanque de solución pobre se encuentra la solución de cianuro, 3). En la caja de precipitación se encuentra la viruta de zinc. El tanque principal, tiene 40 toneladas de arena las cuales se lavan, se alcalinizan y se lixivian con solución de cianuro de sodio proveniente del Tanque de Solución Pobre que tiene una capacidad de 5 m³ (Anexo A). Esta solución se filtra y cae a la caja de precipitación, la cual consta de cuatro o cinco compartimentos con viruta de zinc, donde la solución cianurada que ya porta los valores de oro, se ponen en contacto con la viruta de zinc. Este metal desaloja los valores de la solución y ocupa su lugar, por un proceso electroquímico. Según Escobar y Echeverry⁵³, el precipitado que es una masa pastosa de color oscuro, la cual se retiene en el interior de los compartimentos (el 60% de los valores en el primer compartimento, el 40% en los restantes). En el tanque de solución pobre, se recibe la solución que sale por gravedad de la caja de precipitación y a través de una motobomba es recirculada, es decir se dirige al tanque principal para reiniciar el ciclo.

Escobar y Echeverry⁵⁴, Klaassen y Eatun⁵⁵, Wute y Haner⁵⁶, sostienen que para que haya una buena cianuración se debe alcalinizar con cal la solución de cianuro hasta alcanzar un pH = 11. Al lograr la alcalinización, se agrega cianuro de sodio al tanque de solución pobre, de tal modo que su concentración se mantenga entre 1.5 y 2 Kg de cianuro por metro cúbico de solución. La solución alcalina de cianuro se deja reposar y se filtra a través de los espacios que dejan los granos mineralizados de la arena cianurada y baja disolviendo los valores de oro, durante un tiempo mínimo de 24 horas.

⁵³ ESCOBAR Y ECHEVERRY, op. cit., p.1142.

⁵⁴ Ibid., p.1145.

⁵⁵ KLAASSEN y EATUN, op. cit., p.284.

⁵⁶ WUTE and HANER, op. cit.670.

2.4.2 Toxicología del cianuro. Viccelio⁵⁷ y Curry⁵⁸ afirman que los compuestos de cianuro tienen fama de ser altamente tóxicos y peligrosos, en parte debido al uso del cianuro de hidrógeno gaseoso en las cámaras de gas. De ahí que la reacción instintiva de la gente sea mucho mayor en el caso del cianuro que en el del sulfuro de hidrógeno, el cual es igualmente tóxico.

De acuerdo con Marruecos, Nogué y, Nolla⁵⁹; Viccelio⁶⁰ y Curry⁶¹, el contacto externo o interno del ser humano con los compuestos del cianuro puede ser dañino en múltiples formas. Los efectos más graves se producen cuando el cianuro ingresa al cuerpo, porque su fuerte capacidad de formar complejos con el ion Fe^{+3} en estado férrico, hace que interfiera en el transporte del oxígeno por parte de la hemoglobina. Después de absorbido reacciona rápidamente con el Fe^3 de la citocromo P 450 mitocondrial, y de este modo inhibe la respiración celular. Así el cianuro bloquea eficientemente la producción de ATP y entre otras anomalías metabólicas pueden ocurrir acidosis láctica y la disminución en la utilización de O_2 por parte de la célula.

La dosis letal no ha sido establecida con exactitud, ya que varía con el peso y la condición física de la persona, se ha establecido que de 3 a 5 mg de cianuro por kilogramo de peso es mortal, al ser expuesta a inhalación, la ingestión de cianuro en una cantidad de 180 a 200 mg se reporta como mortal. La toxicidad del cianuro se debe a la formación de ácido cianhídrico, esto sucede cuando el cianuro reacciona con los ácidos inorgánicos e incluso con los orgánicos tales como: cítrico, tartárico y oxálico; el cianuro puede ser absorbido por la vía gástrica, vías respiratorias o por la mucosa, produciendo parálisis de los centros nerviosos. Conforme Wute y Haner⁶², se manifiesta por la dificultad para respirar, mareos, convulsiones, asfixia, coma y muerte. El contacto prolongado en algunas personas muy sensibles provoca erupción cutánea, que con el tiempo pueden degenerar en úlceras difíciles de sanar.

En las explotaciones mineras puede presentarse los siguientes casos de intoxicación: Por inhalación de ácido cianhídrico resultante de la descomposición de cianuro, el cual también en altas concentraciones tiene la propiedad de trastornar el olfato humano volviéndose inoloro; Los síntomas de envenenamiento por inhalación con cianuro son: enrojecimiento y dilatación de la pupila de los ojos, dolor de cabeza, irritación de la garganta, debilidad en

⁵⁷ VICCELIO, op. cit., p.79.

⁵⁸ CURRY, op. cit., p.211.

⁵⁹ MARRUECOS, NOGUÉ y NOLLA, op. cit., p.42.

⁶⁰ VICCELIO, op. cit., p.75.

⁶¹ CURRY, op. cit., p.201.

⁶² WUTE y HANER, op. cit., p.583.

brazos y piernas, palpitaciones, vértigos, dificultad para respirar, colapsos y convulsiones, salivación y náuseas, inconsciencia, coma y muerte. Por ingestión de cianuro sólido o de soluciones con cianuro provenientes de las plantas de cianuración, las cuales tienen un sabor amargo y penetrante, los síntomas son: ardencia en la boca, esófago, dolor abdominal. Dosis más grandes pueden producir la pérdida repentina del sentido y muerte instantánea. Viccellio⁶³, Dueñas⁶⁴; y Klaassen y Eatun⁶⁵, afirman que por el contacto directo con la piel humana produce quemaduras y puede ser absorbido a través de esta causando síntomas similares a los anteriormente descritos (cuando el cianuro es ingerido produce escozor en la boca, esófago, dolor abdominal. Dosis más grandes pueden producir la pérdida repentina del sentido y muerte instantánea

⁶³ VICCELIO, op. cit., p.66.

⁶⁴ DUEÑAS, op. cit., p.209.

⁶⁵ KLAASSEN y EATUN, op. cit., p.285.

3. MATERIALES Y METODOS

Se planteó una propuesta de aislamiento de bacterias degradadoras de cianuro en la cual se realizó un control de variables como: Temperatura de incubación, pH, estandarización de inóculo, capacidad de degradación de cianuro, tiempo de incubación y concentración de medios de cultivo empleados para evaluar bacterias con capacidad de degradar cianuro de sodio.

El proyecto en su fase de campo se llevó a cabo en las plantas de cianuración de las minas de oro del municipio de los Andes-Sotomayor departamento de Nariño, “ubicado a 1°29’ de latitud norte y 77°31’ de longitud al oeste de Greenwich con temperatura promedio de 22°C y una pluviosidad de 2.383 mm/anales”⁶⁶. Su fase experimental en los laboratorios del Centro Minero Sotomayor y Microbiología de la Universidad de Nariño.

3.1 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS DEGRADADORAS DE CIANURO

3.1.1 Muestreo. Se seleccionaron 4 plantas de cianuración; para la toma de muestras sólidas, se eligieron tres lugares por cada planta de cianuración los cuales se codificaron como (x2, x4, x5) (Anexo B). Dentro del lugar x2 se seleccionaron 5 sublugares (x2a, x2b, x2c, x2d y x2e), que posteriormente se homogeneizaron para constituir una sola muestra para el lugar x2 (Anexo C). En cada sublugar se tomaron 3 muestras a 3 diferentes profundidades; superficie (0 – 10 cm), medio (40 – 60 cm) y fondo (100 – 120 cm), profundidades que poseen diferente concentración de cianuro (Tabla 4). Cada una de las muestras recogidas en las 3 profundidades nombradas pesaban 100 gramos para un total de 300 gramos por cada sublugar se homogeneizaron las 5 submuestras para obtener 1500 gramos de muestra del lugar x2. Dentro de los lugares x4 y x5 se realiza el mismo procedimiento descrito anteriormente.

Para la muestra líquida se seleccionó dos lugares de muestreo por cada planta de cianuración (x1, x3) (Anexo C). Se colectaron 100 ml por cada muestra líquida en frascos estériles, las dos muestras fueron sometidas a refrigeración para su conservación durante su transporte al laboratorio junto con las muestras sólidas.

3.1.2 Preparación de los medios de cultivo. Se preparó dos medios de cultivo BS1 y BS2 cuya relación de componentes se describe en la tabla 2; la solución de cianuro de sodio se preparó disolviendo 10 gramos de cianuro en agua destilada calibrando pH a 12 con NaOH y aforando a un Lt. Posteriormente dicha solución se pasó por filtro millipore

⁶⁶ GROSSE, E. Croquis geológico del parte sur-oriental del departamento de Nariño. Bogotá : s.n., 1984. v. 3. p.1020.

0.45 ? l. para su esterilización dando como resultado una solución de 10.000ppm con pH 12, para así llevar los medios de cultivo líquidos y sólidos a diferentes concentraciones de cianuro que pueden variar desde 50 ppm hasta 500 ppm, se preparó dos medios de cultivo; BS1 para heterotrofos y BS2 para litotrofos con reactivos predeterminados los cuales son estándares para aislamiento de microorganismos heterotrofos y litotrofos (Tabla 2).

Tabla 2. Composición de los medios de cultivo BS1 y BS2

Medio BS1		Medio BS2	
$C_6H_{12}O_6$	1g/L	$CaCO_3$	1g/L
$MgSO_4$	0.03 g/L	$MgSO_4$	0.03 g/L
$Na_2HPO_4+2H_2O$	1 g/L	$Na_2HPO_4+2H_2O$	1 g/L
KH_2PO_4	0.6 g/L	KH_2PO_4	0.6 g/L
NaCl	0.3 g/L	NaCl	0.3 g/L
Peptona	0,05 g/L	Peptona	0,05 g/L
H ₂ O destilada	1 L	H ₂ O destilada	1 L

Fuente: Lien, R.H., B. E. Dinsdale, K.R. Gardner and P. B. Altringer., 1990

Los caldos se prepararon por separado en matraz aforado de 1L, y se les adicionó 15 g. de agar bacteriológico para medios sólidos a los medios líquidos no se les adiciona agar bacteriológico y tanto medios líquidos como sólidos son llevados a ebullición y esterilización en autoclave; cuando la temperatura descendió aproximadamente a 40 °C se agrego a cada uno de los medios 10 ml de la solución de cianuro de sodio preparada anteriormente para lograr una concentración de 100 ppm de cianuro aproximadamente en cada medio para que finalmente el caldo o medio de cultivo sea servido en cajas de petry y botellas de 200 ml de capacidad.

3.1.3 Aislamiento de bacterias tolerantes al cianuro. De cada muestra sólida se pesó 10 g, se maceró en mortero estéril y se llevó hasta un volumen de 100 ml adicionando solución ringer, la cual esta constituida de sales (anexo C). Posteriormente se realizó diluciones seriadas hasta 10^{-6} con relación 1:10 en tubos con agua destilada y esterilizada.

Por cada muestra líquida se tomo 10 ml y se adicionan a 90 ml de solución ringer e igualmente se realizó diluciones hasta 10^{-6} con relación 1:10 en tubos con agua destilada y esterilizada.

A cada una de las diluciones seriadas de relación 1:10 descritas anteriormente se les extrajo 0.1ml con micro pipeta para ser inoculado a tres cajas petry con medio sólido BS1 y tres cajas petry con medio sólido BS2; posteriormente se esparce las muestras diluidas con perlas de vidrio estériles, se incubo a temperatura ambiente por 48 horas.

Conforme a Brock y Madigan⁶⁷; y MacFadin⁶⁸, transcurridas las 48 horas se observa si existe crecimiento bacteriano en las cajas petri inoculadas, de ser positivo el resultado de crecimiento bacteriano se procede a diferenciar morfológica y microscópicamente para así poder seleccionar y purificar las bacterias aisladas.

3.1.4 Aislamiento e identificación de bacterias degradadoras de cianuro. Según Lien Gardner y altringer⁶⁹, para determinar cualitativamente la oxidación de cianuro, se utilizó soluciones indicadoras; Nesler, Difelamina Sulfurica y Grielss Illobais, las cuales revelarán la presencia de amonio, nitratos y nitritos (tabla 3), siendo estos los productos finales de la metabolización de cianuro por bacterias según Lien, R. H. 1990. Las bacterias fueron identificadas en base al kit BBL Crystal (Merk, Darmstadt, Germany - anexo C).

Tabla 3. Soluciones indicadoras de amonio, nitratos y nitritos

Solución indicadora	Reacción
Nesler (amonio)	+ coloración amarillo anaranjado - sin reacción
Difelamina Sulfurica (nitratos)	+ coloración azul intenso - sin reacción
Grielss Illobais (nitritos)	+ coloración rojo púrpura - sin reacción

Fuente: Ronald L. Crawford and don L. Crawford.,1996

3.2 DEGRADACION BIOLOGICA DEL CIANURO

3.2.1 Estandarización del inóculo. El inóculo adecuado se determino empíricamente para cada cultivo debido a que en la prueba cualitativa se observó que los aislados degradaron a diferente tiempo y velocidad el cianuro residual. Una colonia de cada aislado fue repicada en medio liquido BS1 e incubada por 24 horas a temperatura ambiente. A partir de este cultivo se inoculo 9 recipientes que contenían 100 ml de medio liquido BS1 suplementado con concentraciones de cianuro que variaron según el aislado (*Pseudomonas*; 400 mg CN-/L. – *Chromobacterium*; 200 mg CN-/L. – *Klebsiella*; 100 mg CN-/L.). El numero de células microbianas fue determinado por conteo microscópico directo (cámara de Newbauer) variando desde 25000 hasta 220000 células/mL. La concentración bacteriana adecuada se estimo por análisis gráfico de las curvas de eliminación del sustrato,

⁶⁷ BROCK and MADIGAN, op. cit., p.711.

⁶⁸ MACFADIN, op. cit., p.225.

⁶⁹ LIEN et al., op. cit., p.680.

tomándose como apropiada aquella en la que se alcanzan velocidades de eliminación del sustrato mas altas en el menor tiempo (curva mas interna).

3.2.2 Determinación de los parámetros cinéticos de los aislados. La fase exponencial en la curva de crecimiento y en las curvas de eliminación del sustrato se determino a partir de la evolución de las derivadas respecto al tiempo de las concentraciones de los microorganismos y sustrato. Una vez determinada la fase exponencial, se asumió reacciones de primer orden para la velocidad de crecimiento y para la velocidad de degradación del sustrato, representadas en las ecuaciones I y II. Conforme Mudder et al⁷⁰, la constante de velocidad instantánea (?) y la constante de degradación especifica de sustrato (?) se calcularon por regresión lineal a partir de las formas integradas (III y IV) de las mencionadas ecuaciones.

$$dX/dt = \mu X \quad (\text{ecuación I})$$

que integrada resulta en:

$$\ln X = \ln X_0 + \mu t \quad (\text{ecuación III})$$

donde,

$$\begin{aligned} dX/dt &= \text{velocidad de crecimiento} \\ \mu &= \text{constante de velocidad instantánea} \\ X &= \text{número de células (UFC/ml)} \end{aligned}$$

$$d[S]/dt = -k[S] \quad (\text{ecuación II})$$

que integrada resulta en:

$$\ln[S] = \ln[S_0] - kt \quad (\text{ecuación IV})$$

donde,

$$\begin{aligned} d[S]/dt &= \text{velocidad de degradación del sustrato} \\ -k &= \text{constante de degradación especifica del sustrato} \\ [S] &= \text{concentración del sustrato (mg CN}^{-1}\text{N/L)}^{71, 72} \end{aligned}$$

μ_{max} , k_{max} , y las velocidades máximas y constantes de saturación (K_s) de crecimiento y degradación de sustrato no se pudieron calcular por reemplazo de los datos de eliminación del sustrato y crecimiento en la forma integrada de la ecuación Michaelis-Menten:

⁷⁰ MUDDER, F. et al. Biological treatment of cyanide wastewaters: desig, start-up and operation of a full scale facility. Lead, South Dakota : Homestake Mining Company, p.735.

⁷¹ BROCK y MADIGAN, op. cit., p.708.

⁷² SEGEL, I. H. Enzyme kinetics. Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems. New York : s.n.,1975. p.754.

$$1/t * \ln([S_0]/[S]) = -1/K_s * ([S_0] - [S])/t + V_{max}/K_s$$

Según Schnell y Mendoza⁷³; y Segel⁷⁴, esta ecuación es sensible a los problemas ocasionados por inhibición de sustratos o productos, activación o cualquier otro efecto que modifique el modelo típico de saturación Michaelis-Menten. Existen modelos capaces de obviar estas dificultades pero requieren métodos de cálculo relativamente complejos.

Para el caso de el aislado Xp5d, se intentaron calcular V_{max} y K_s por análisis lineal de la relación existente entre los dobles inversos de las velocidades iniciales o la constante específica de degradación de sustrato, y la concentración de sustrato (ecuación Lineweaver-Burk). Acorde con Aiba et al⁷⁵, los análisis específicos de cada caso se discutirán en resultados y discusión.

3.2.3 Determinación de la cinética de crecimiento de los aislados. La constante de velocidad específica de cada uno de los aislados (?) y los tiempos de generación (tgen) para cada uno de los aislados fueron calculadas a partir de las mediciones de la densidad óptica a 430nm (DO_{430}), en cultivos que crecieron sobre 200ml de medio líquido BS1, inoculados con el tamaño de inóculo antes estandarizado. Siguiendo a Lien⁷⁶ y Mudder et al⁷⁷, los datos de DO_{430} fueron transformados a UFC/ml, empleando curvas de calibración DO_{430} – UFC/ml.

3.2.4 Determinación de la cinética de degradación del cianuro de los aislados. El conjunto experimental incluyó controles de sustrato estériles, y recipientes experimentales con diferentes concentraciones de cianuro que variaron desde 400 hasta 100 mg CN/L. Los recipientes experimentales fueron inoculados con cada uno de los aislados (inóculo estándar). El sustrato y cada uno de los productos de degradación se midieron empleando kits de determinación Spectroquant para cianuro, amonio, nitritos y nitratos.

⁷³ SCHNELL, S. and MENDOZA, C. Closed form solution for time-dependent enzyme kinetics. *In*: Journal of Theoretical Biology, 1997. p.219.

⁷⁴ SEGEL, op. cit., p.754.

⁷⁵ AIBA et. al., op.cit., p.1030.

⁷⁶ LIEN et al, op. cit., p.678.

⁷⁷ MUDDER et al, op. cit., p.738.

4 RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS DEGRADADORAS DE CIANURO

4.1.2 Muestreo. Para la toma de muestras sólidas, se realizó la cuantificación de cianuro a diferentes profundidades en las cuatro plantas de cianuración de donde se obtuvo los siguientes resultados (tabla 4 – anexo D).

Tabla 4. Cuantificación del cianuro presente en los tanques de cianuración a tres diferentes profundidades en minas auríferas del Municipio de los Andes-Sotomayor.

	Profundidad (cm)	Tanque de cianuración Pacho ?? CN ⁻ ppm	Tanque de cianuración Fredy ?? CN ⁻ ppm	Tanque de cianuración Hermes ?? CN ⁻ ppm	Tanque de cianuración Henry ?? CN ⁻ ppm
<i>Superficie</i>	0-10	11	19	28	14
<i>Medio</i>	50-60	240	210	180	270
<i>Fondo</i>	90-100	520	465	430	485

Resultados de aislamiento de bacterias degradadoras de cianuro residual.

4.1.2 Aislamiento de bacterias tolerantes al cianuro. Después de 48 horas de incubación a temperatura ambiente del medio sólido BS1 para microorganismos heterotrofos con concentración de 200ppm inoculado de muestras sólidas y líquidas se obtuvieron 16 aislados bacterianos. En el medio BS2 para microorganismos litotrofos de este estudio no fue posible aislar ninguna bacteria tolerante al cianuro, existen reportes bibliográficos Lén, R. Et al. En donde se afirma que los microorganismos litotrofos degradan cianuro en medios con pH de 9, lo que en comparación con nuestra metodología pudo significar el resultado negativo de crecimiento bacteriano para microorganismos litotrofos ya que utilizamos medios cianurados con pH 12. En la tabla 5 se muestra los aislados bacterianos tolerantes al cianuro del medio BS1.

Tabla 5. Aislados bacterianos aisladas tolerantes al cianuro

	<i>GRAM</i>	<i>Morfología Celular</i>
Xp1a	-	Bacilos cortos
Xp3b	-	Cocos racimo
Xp4c	+	Streptococos
Xp5d	-	Bacilos
Xp5e	-	Cocos
Xf3f	+	Diplococos
Xf5g	-	Cocos en cadena
Xf6h	-	Bacilos largos
Xn2i	-	Cocos
Xn3j	+	Diplococos
Xn5k	-	Bacilos
Xn6ll	-	Bacilos cadena
Xm1m	-	Bacilos
Xm3n	-	Bacilos curvos
Xm5o	-	Bastones en cadena
Xm5p	-	Bastones

Xp: (plta cianu/ pacho)
Xf: (plta cianu/ fredy)
Xn: (plta cianu/ henrry)
Xm:(plantacianu/ hermes)

Resultados de aislamiento de bacterias degradadoras de cianuro residual.

Aislamiento e identificación de bacterias degradadoras de cianuro. A partir de los ensayos cualitativos de degradación de cianuro por medio de las soluciones indicadoras, Nesler, Difelamina Sulfurica y Grielss Illobais (tabla 3) en el medio líquido BS1 suplementado con 100 mg CN⁻/L fue posible recuperar 3 aislados capaces de degradar el cianuro, los 13 aislados restantes solo fueron capaces de crecer con cianuro mas no metabolizarlo (tabla 6). Bauer⁷⁸ demostró que al utilizar CN- libre en los medios de cultivo, pueden activar en mayor proporción la cantidad de aislados degradantes de cianuro, en comparación con medios de cultivo que poseían cianuro compuesto como en nuestro caso cianuro de sodio.

Los aislados capaces de degradar el cianuro fueron rotulados como Xp5d, Xn5k, y Xm1m, y fueron identificados como los aislados *Pseudomonas*, *Chromobacterium* y *Klebsiella* por medio del kit BBL crystal (Anexo C). La cepa Xp5d y Xn5k fueron capaces de transformar el cianuro a amonio, nitrato y nitrito, sin embargo el aislado Xp5d fué el que presento la mayor velocidad en la generación de los mencionados productos. El aislado Xm1m solo produjo amonio, 60 horas después de que el aislado Xp5d lo había producido (Tabla 6).

⁷⁸ BAUER, op. cit., p.60.

Tabla 6. Identificación de aislados capaces de degradar el cianuro

<u>Metodos</u>	<u>Amonio</u>	<u>Nitratos</u>	<u>Nitritos</u>
<i>Colonia bacteriana</i>	<i>Nesler</i>	<i>Difelamina sulfurica</i>	<i>Griellss Losvay</i>
Xp1a	-	-	-
Xp3b	-	-	-
Xp4c	-	-	-
Xp5d	+ 6h	+ 12h	+ 24h
Xp5e	-	-	-
Xf3f	-	-	-
Xf5g	-	-	-
Xf6h	-	-	-
Xn2i	-	-	-
Xn3j	-	-	-
Xn5k	+ 42h	+ 48h	+ 54h
Xn6l	-	-	-
Xm1m	+ 66h	-	-
Xm3n	-	-	-
Xm5o	-	-	-
Xm5p	-	-	-
Testigo1	-	-	-
Testio2	-	-	-
Testigo3	-	-	-

Rresultados de aislamiento de bacterias degradadoras de cianuro residual.

4.2 DEGRADACION BIOLOGICA DEL CIANURO

4.2.1 Estandarización del inóculo. Se estableció el tamaño del inóculo estándar para cada uno de los aislados capaces de degradar el cianuro a diferentes concentraciones de sustrato, dado que cada aislado presenta una tolerancia específica frente al cianuro. La figura 1 muestran las curvas de degradación del cianuro para cada uno de los aislados a diferentes tamaños de inóculo.

A una concentración de cianuro de 400 mg CN-/L el aislado del genero pseudomona codificado como Xp5d degradó la totalidad de cianuro antes de las 50 horas del ensayo de mejor manera, a una densidad celular de $1.25 \cdot 10^5$ bacterias /ml. El aislado del genero Chromobacterium codificado como Xn5k, inoculado a una concentración de 200 mg CN-/L degradó la totalidad de cianuro antes de las 40 horas de ensayo de mejor manera, a una densidad celular similar a la del aislado Xp5d. Finalmente el aislado del genero Klebsiella codificado como Xm1m e inoculado a una concentración de 100mg CN-/L degradó la totalidad de cianuro antes de las 50 horas del ensayo de mejor manera, a densidad celular similar que los aislados Xp5d y Xn5k. Las variaciones en las concentraciones corresponden

a un estimativo de las tolerables por cada microorganismo, las densidades celulares obtenidas fueron utilizadas en bs ensayos subsiguientes. Mudder et al⁷⁹, afirman que el inoculo para aislados que degradan cianuro depende de la concentración de cianuro que se este degradando; en este estudio se realizaron pruebas de estandarización de inoculo que oscilaron entre 100 mg CN-/L hasta 400 mg CN-/L y no se obtuvieron diferencias significativas de inoculo.

4.2.2 Cuantificación del crecimiento microbiano dependiente de cianuro. Las figuras 2, 3 y 4 muestras las curvas de crecimiento y la variación de la velocidad de crecimiento a través del tiempo. Se considero como fase logarítmica la comprendida entre el inicio de la reacción y el momento en que se alcanzo la máxima velocidad de crecimiento. Se descartaron los datos iniciales que no se ajustaron a la regresión lineal en el ploteo de tiempo contra el logaritmo de la concentración de UFC/ml. Los parámetros cinéticos μ y t_{gen} para cada cepa se reúnen en la tabla 7.

Tabla 7. Determinación de los parámetros cinéticos de crecimiento especifico

Cepa	μ (1/hora)	t_{gen} (hora)	Coefficiente de correlación
<i>Pseudomonas</i> Xp5d	0,0624	16,0	0,981
<i>Chromobacterium</i> Xn5k	0,0410	24,4	0,990
<i>Klebsiella</i> Xm1m	0,0255	39,2	0,997

Resultados de aislamiento de bacterias degradadoras de cianuro residual

⁷⁹ MUDDER et al, op. cit., p.725.

Figura 1. Estandarización de inóculos

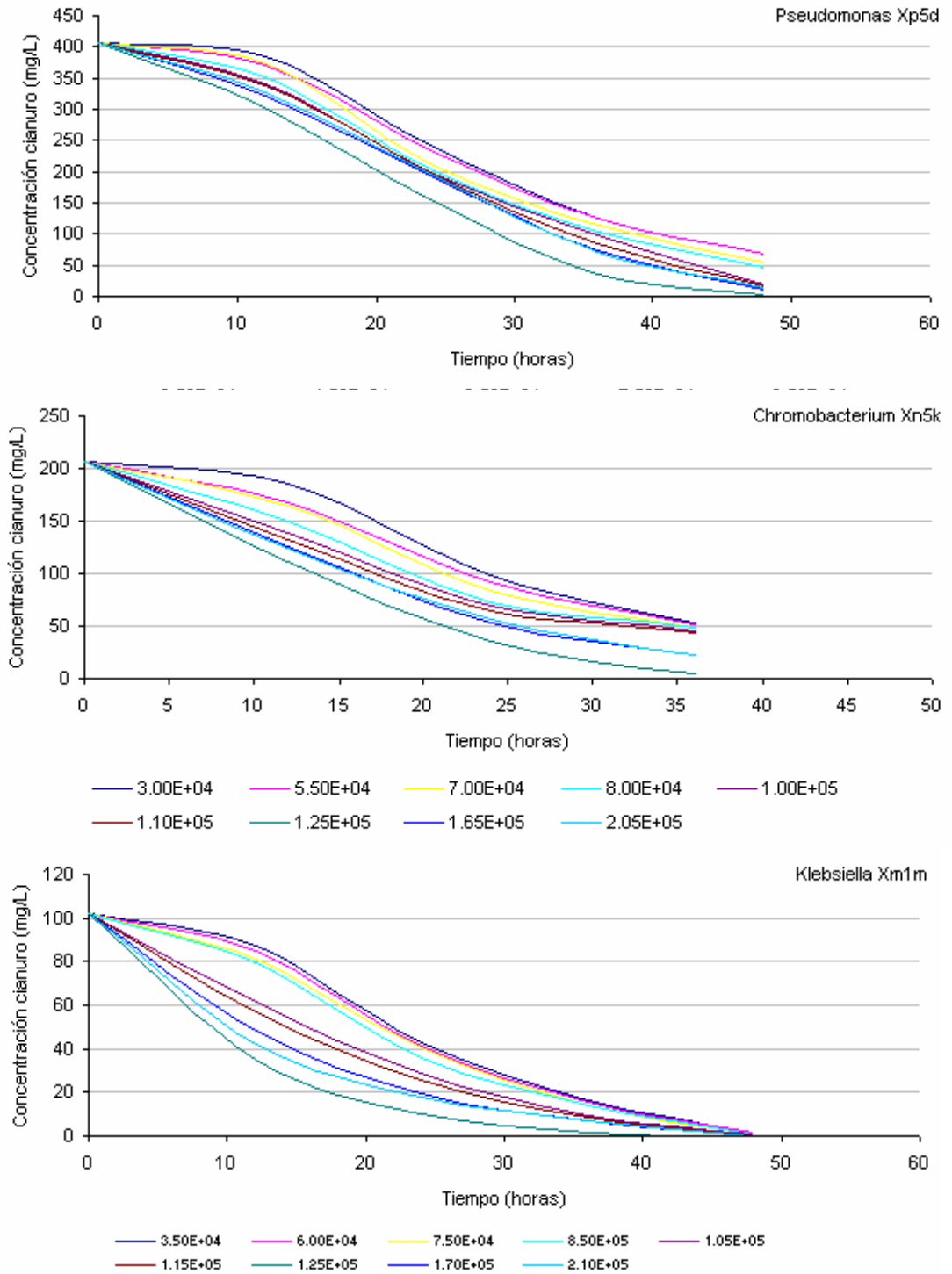


Figura 2. Crecimiento de el aislado *Pseudomonas* Xp5d. Concentración del cianuro 54 mg CN⁻-N/L (100 mg CN/L). Panel superior: Curva de crecimiento. Panel inferior: Variación de la velocidad de crecimiento a través del tiempo (UFC/mL/hora).

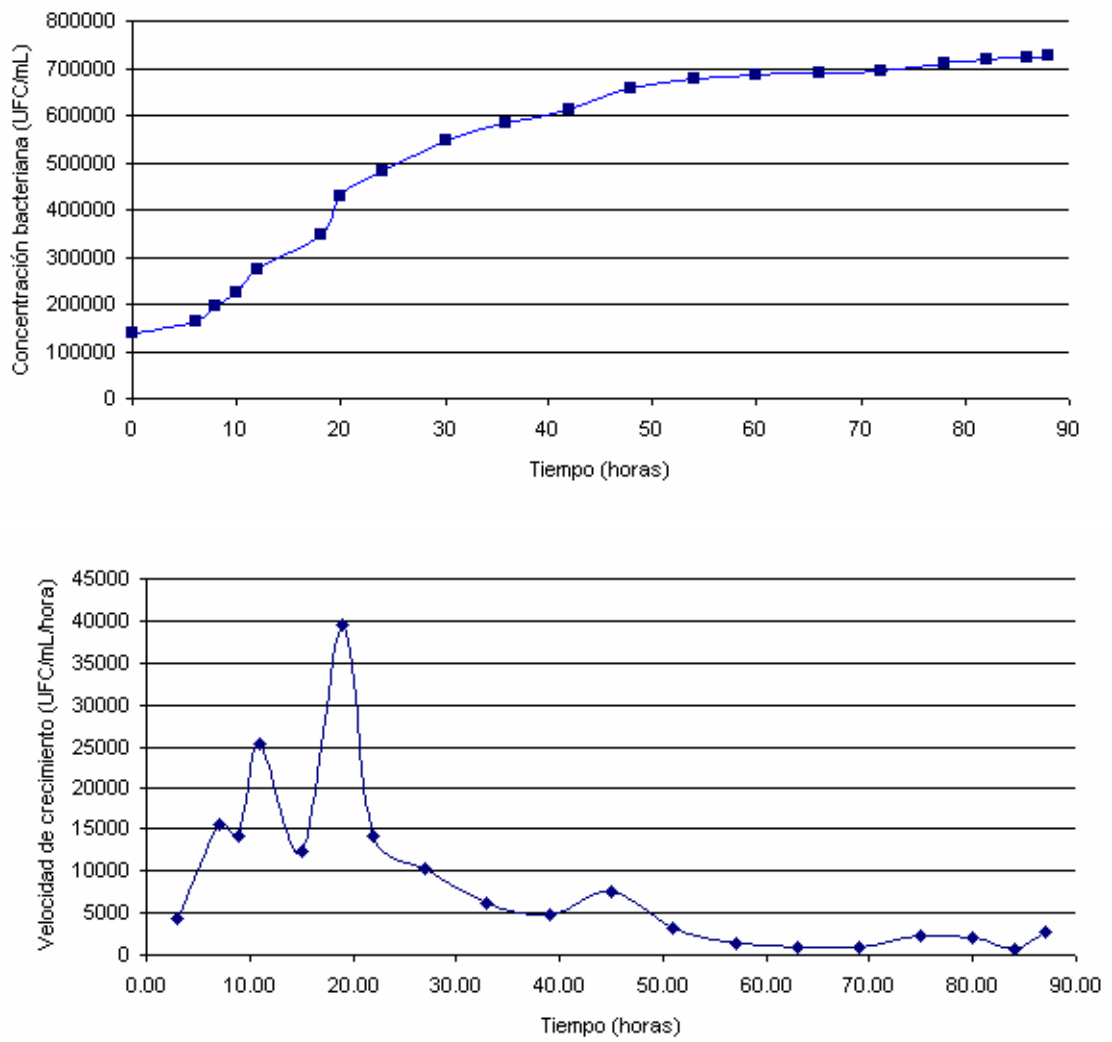


Figura 3. Crecimiento de el aislado *Chromobacterium* Xn5k. Concentración del cianuro 54 mg CN⁻-N/L (100 mg CN⁻/L). Panel superior: Curva de crecimiento. Panel inferior: Variación de la velocidad de crecimiento a través del tiempo (UFC/mL/hora).

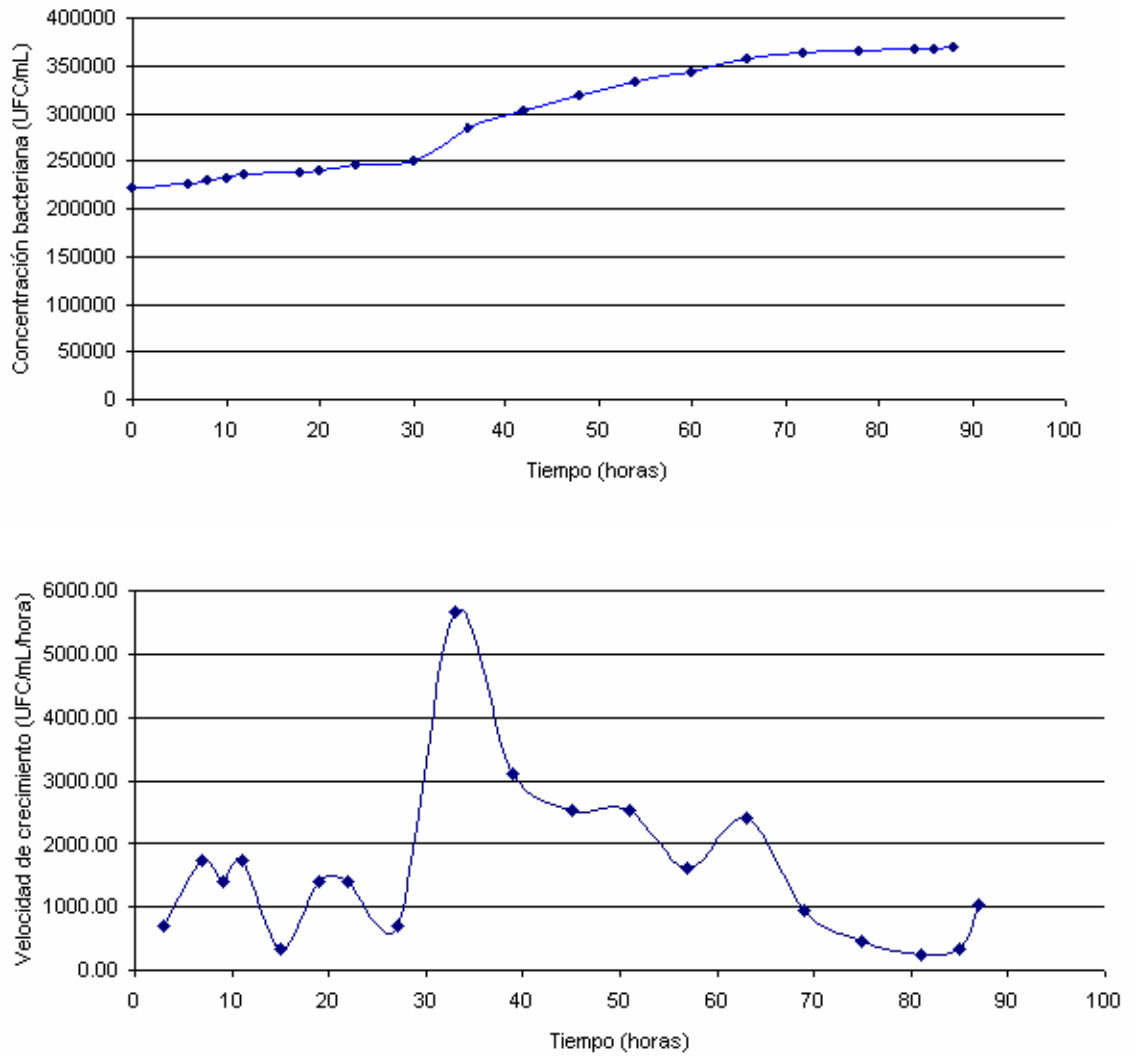
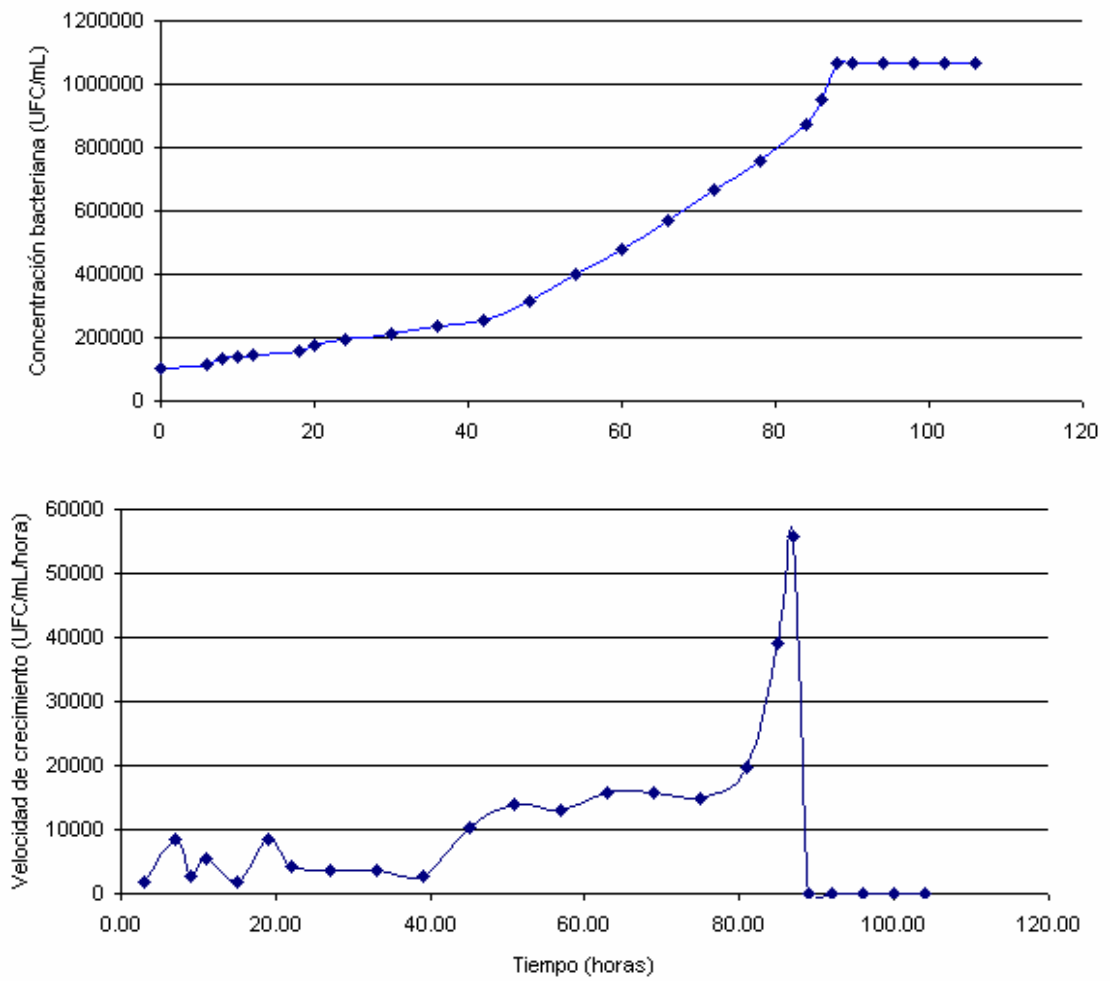


Figura 4. Crecimiento de el aislado *Klebsiella* Xm1m. Concentración del cianuro 54 mg CN⁻/L (100 mg CN⁻/L). Panel superior: Curva de crecimiento. Panel inferior: Variación de la velocidad de crecimiento a través del tiempo (UFC/mL/hora).



4.2.2 Cuantificación de la degradación del cianuro. Las figuras 5 – 10 muestran las curvas de eliminación del sustrato y la aparición de los diferentes productos para cada una de los aislados, así como la evolución de las velocidades de degradación del sustrato y aparición de los productos. Se incluyó además para cada uno de los aislados las curvas correspondientes al testigo sin inocular y la suma total del nitrógeno (N total) presente en las formas solubles analizadas. Los datos se presentan en mg de N/L en cualquier especie molecular y en consecuencia los valores son estequiometricamente equivalentes.

En el caso del aislado *Pseudomonas* Xp5d se obtuvieron datos de eliminación del sustrato a cuatro diferentes concentraciones. Los dos aislados restantes solo se evaluaron a una sola concentración. El aislado *Pseudomonas* Xp5d es la mas tolerante y en consecuencia permitió llevar a cabo ensayos de degradación de cianuro desde 400 hasta 100 mg CN⁻/L.

La tabla 8 reúne las constantes de degradación específica de sustrato, y los tiempos de vida media para el cianuro ($t_{1/2}$) para cada una de los aislados, a diferentes concentraciones (aproximadas).

Tabla 8. Determinación de los parámetros cinéticos de degradación específica de sustrato

Concentración		<i>Pseudomonas</i> Xp5d		<i>Chromobacterium</i> Xn5k		<i>Klebsiella</i> Xm1m	
Mg CN ⁻ /L	mgCN ⁻ -N/L	K	$t_{1/2}$ (hora)	K	$t_{1/2}$ (hora)	k	$t_{1/2}$ (hora)
		(1/hora)		(1/hora)		(1/hora)	
410	219	-0,0139	71,9	-	-	-	-
350	188	-0,0185	54,1	-	-	-	-
300		ND	ND	-0,0083	120	-	-
260	139	-0,0272	36,8	ND	ND	-	-
150	80	-0,0624	16,0	ND	ND	-0,0088	114

Resultados de aislamiento de bacterias degradadoras de cianuro residual

Los aislados menos tolerantes al cianuro fueron *Chromobacterium* Xn5k y *Klebsiella* Xm1m, siendo igualmente las que poseen las constantes μ y k mas bajas. *Klebsiella* Xm1m es el aislado más sensible al cianuro y la que posee las mas bajas constantes específicas de crecimiento y degradación de sustrato.

Figura 5. Degradación del cianuro por el aislado *Pseudomonas* Xp5d. Concentración de cianuro 219 mg CN-N/L (407 mg CN/L) Panel superior: Curvas de eliminación del sustrato y aparición de los productos. Panel inferior: Velocidad de desaparición del sustrato (mg CN-N/L/hora) y velocidades de generación de los productos (mg NH₃-N/L/hora, mg NO₃-N/L/hora, mg NO₂-N/L/hora).

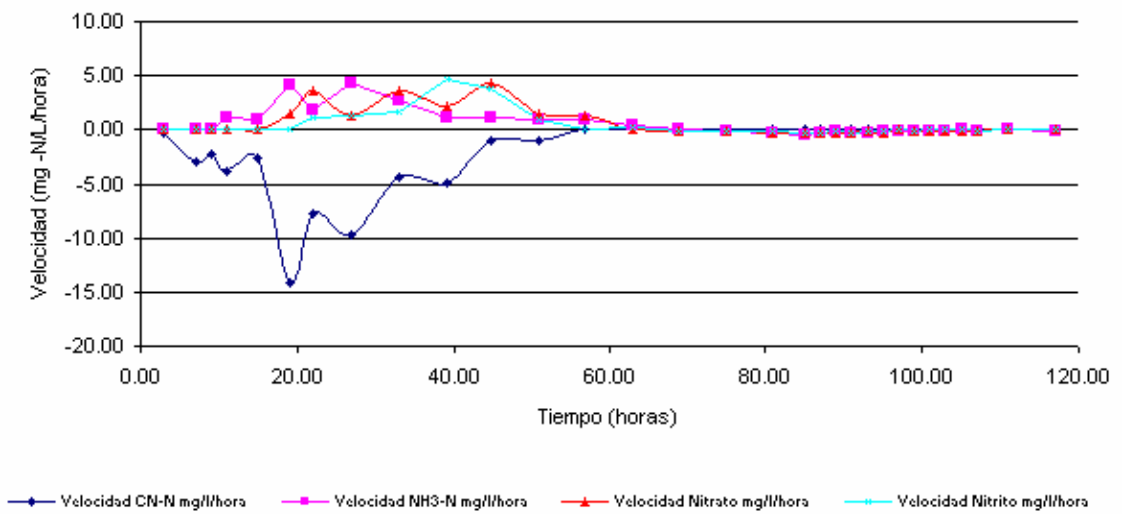
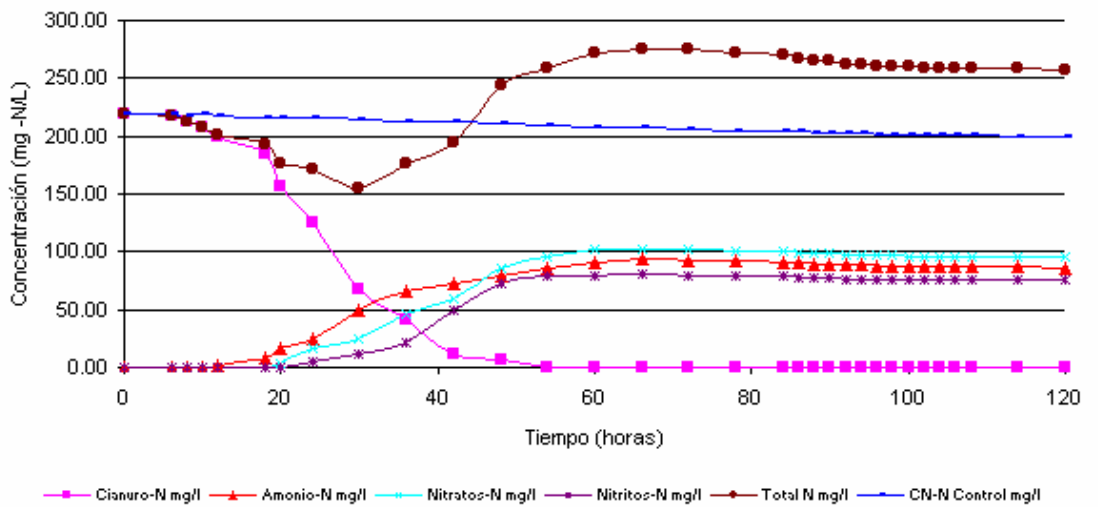


Figura 6. Degradación del cianuro por el aislado *Pseudomonas* Xp5d. Concentración de cianuro 188 mg CN⁻-N/L (350 mg CN⁻/L). Panel superior: Curvas de eliminación del sustrato y aparición de los productos. Panel inferior: Velocidad de desaparición del sustrato (mg CN⁻-N/L/hora) y velocidades de generación de los productos (mg NH₃-N/L/hora, mg NO₃-N/L/hora, mg NO₂-N/L/hora).

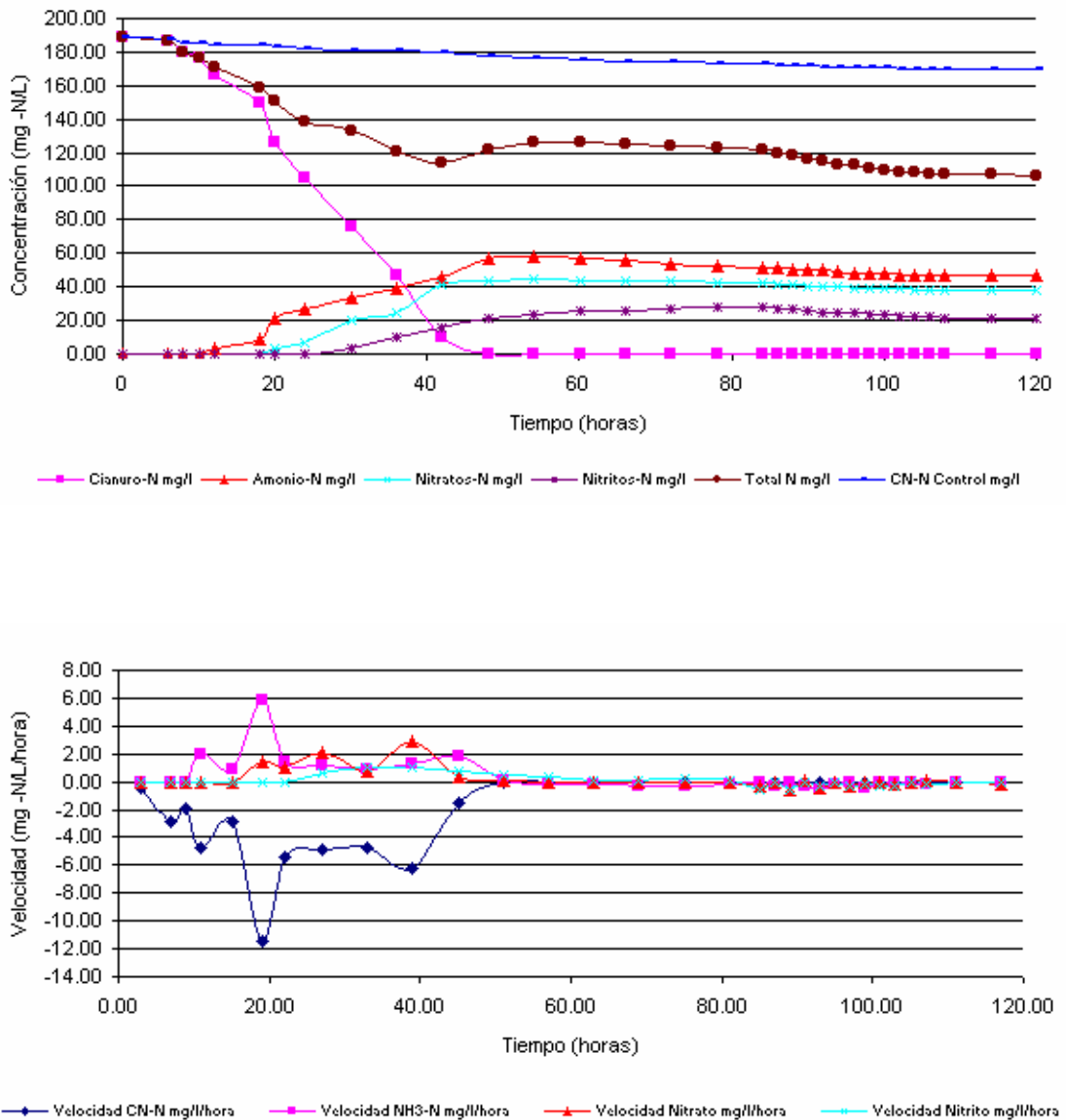


Figura 7. Degradación del cianuro por el aislado *Pseudomonas* Xp5d. Concentración de cianuro 139 mg CN⁻-N/L (257.8 mg CN/L) Panel superior: Curvas de eliminación del sustrato y aparición de los productos. Panel inferior: Velocidad de desaparición del sustrato (mg CN⁻-N/L/hora) y velocidades de generación de los productos (mg NH₃-N/L/hora, mg NO₃⁻-N/L/hora, mg NO₂⁻-N/L/hora).

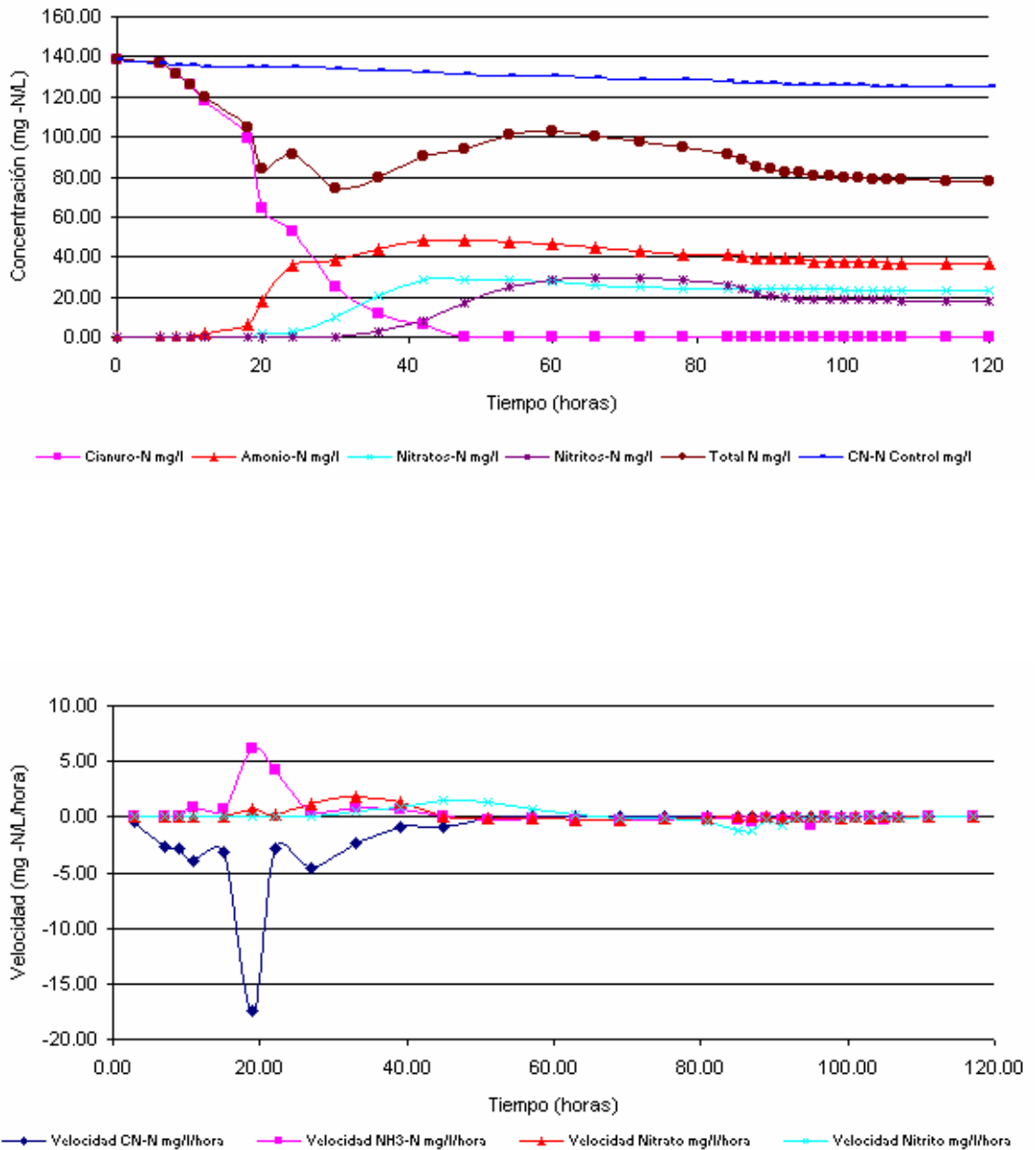


Figura 8. Degradación del cianuro por el aislado *Pseudomonas* Xp5d. Concentración de cianuro 80 mg CN⁻-N/L (148.5 mg CN/L) Panel superior: Curvas de eliminación del sustrato y aparición de los productos. Panel inferior: Velocidad de desaparición del sustrato (mg CN⁻-N/L/hora) y velocidades de generación de los productos (mg NH₃-N/L/hora, mg NO₃-N/L/hora, mg NO₂-N/L/hora).

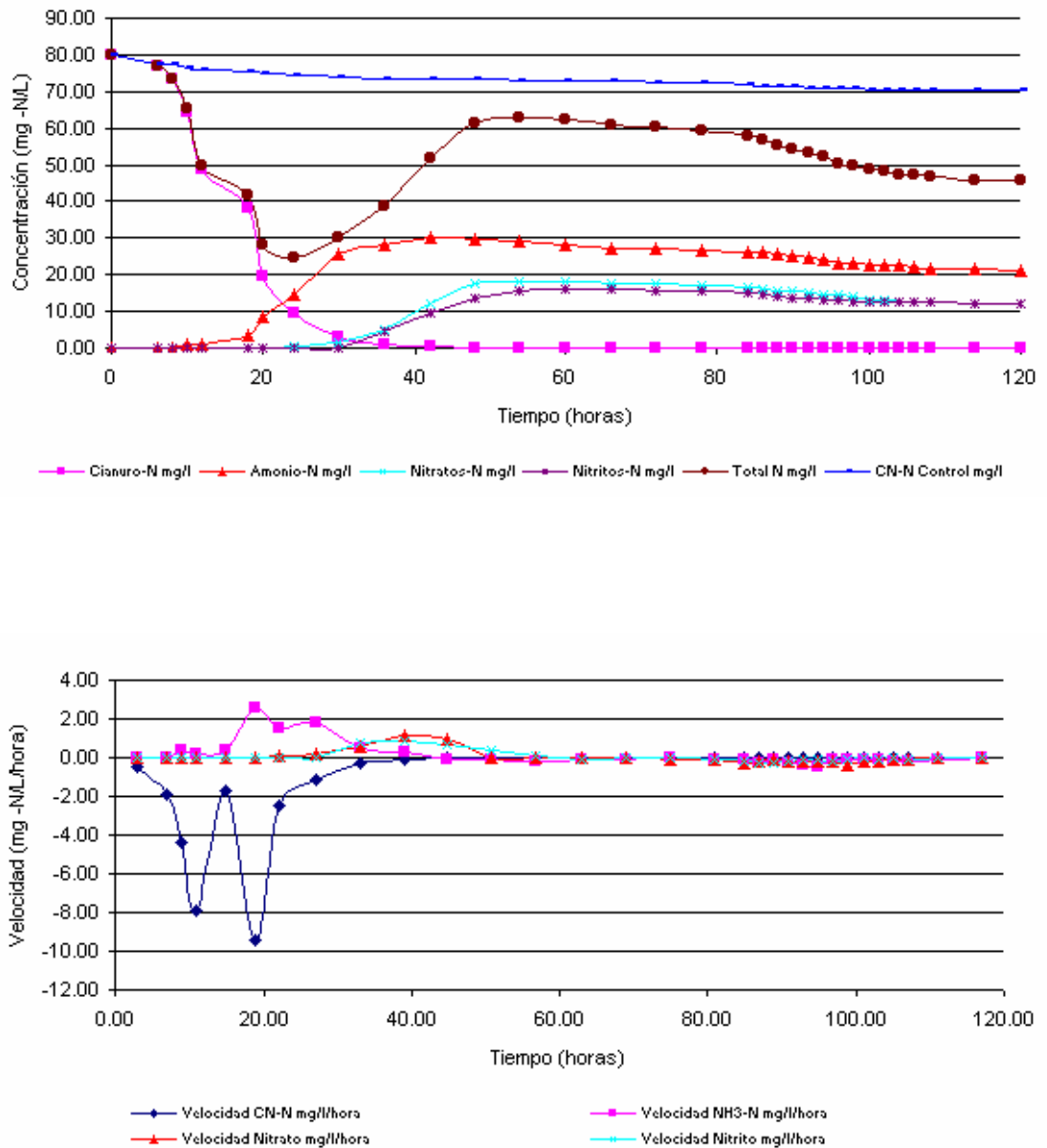


Figura 9. Degradación del cianuro por el aislado *Chromobacterium* Xn5k. Concentración de cianuro 160,67 mg CN-N/L (298,4 mg CN/L) Panel superior: Curvas de eliminación del sustrato y aparición de los productos. Panel inferior: Velocidad de desaparición del sustrato (mg CN-N/L/hora) y velocidades de generación de los productos (mg NH₃-N/L/hora, mg NO₃-N/L/hora, mg NO₂-N/L/hora).

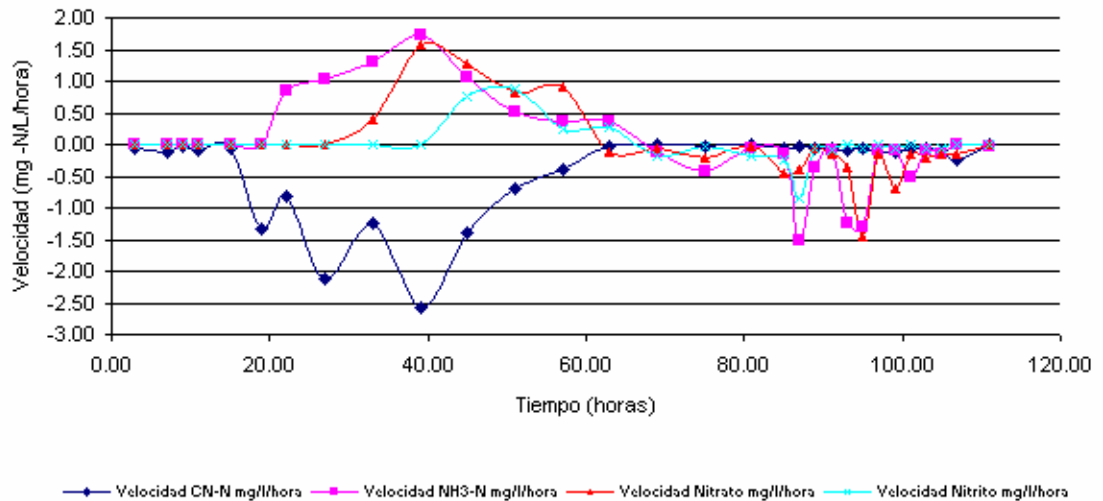
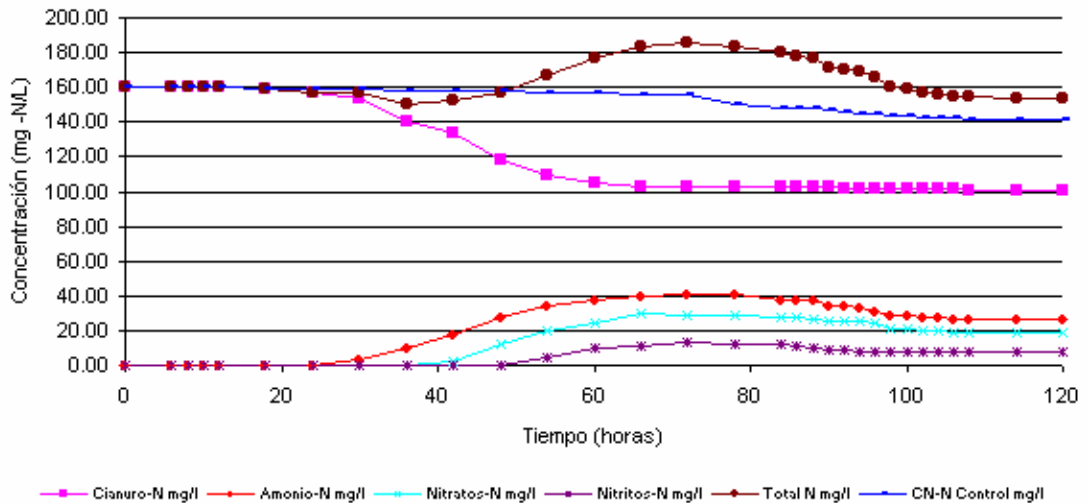
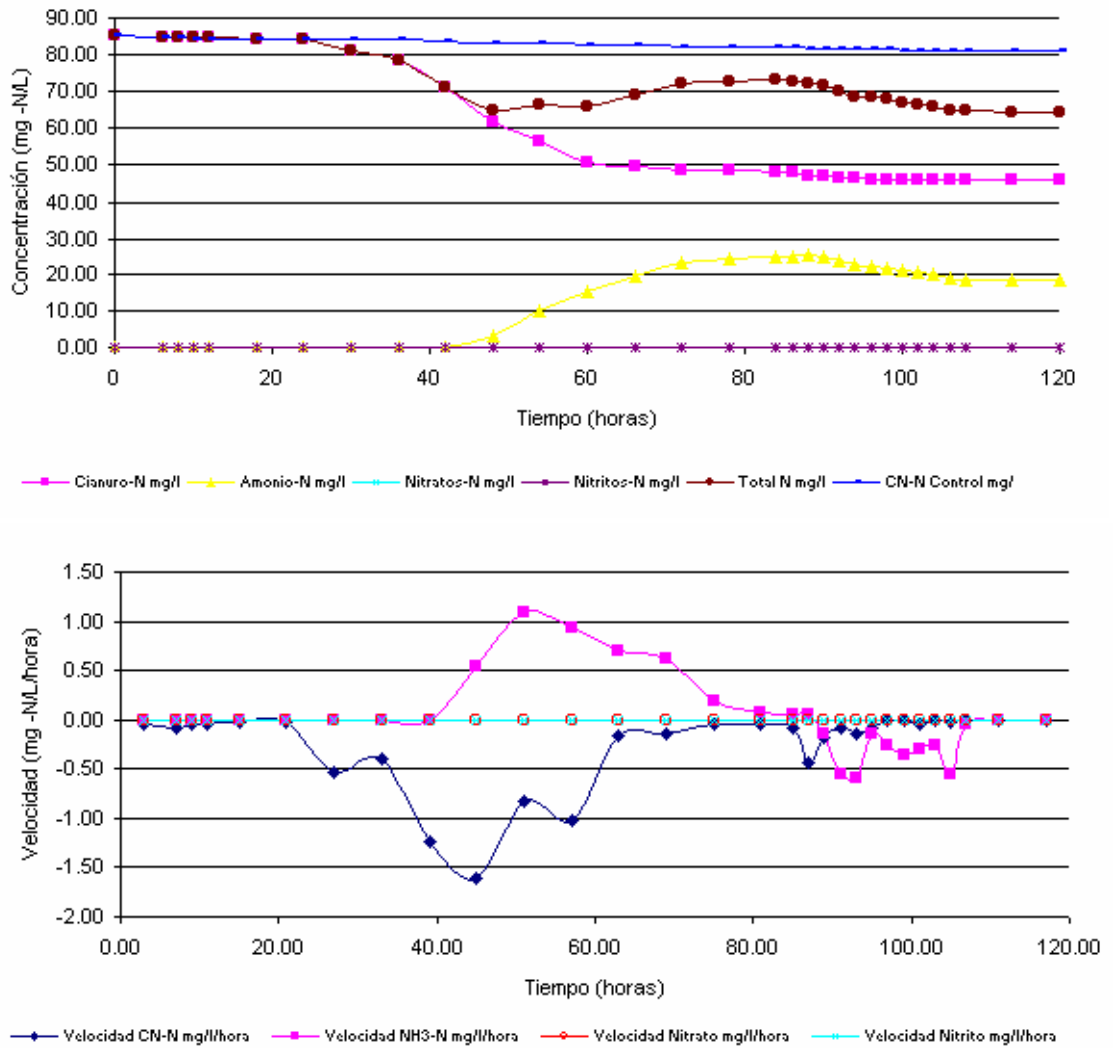


Figura 10. Degradación del cianuro por el aislado *Klebsiella* Xm1m. Concentración de cianuro ____ mg CN-N/L (158.3 mg CN/L) Panel superior: Curvas de eliminación del sustrato y aparición de los productos. Panel inferior: Velocidad de desaparición del sustrato (mg CN-N/L/hora) y velocidades de generación de los productos (mg NH₃-N/L/hora, mg NO₃-N/L/hora, mg NO₂-N/L/hora).



El aislado *Pseudomonas* Xp5d es capaz de disminuir a la mitad la concentración de cianuro en un periodo máximo de aproximadamente 72 horas a una concentración inicial de 400 mg CN/L, y a una concentración inicial de 100 mg CN/L tal periodo es de tan solo 16 horas. En contraste los aislados *Chromobacterium* Xn5k y *Klebsiella* Xm1m a concentraciones de cianuro mucho menores les tardara mas de 100 horas disminuir la concentración a la mitad. En consecuencia el aislado mas prometedor es el de *Pseudomonas* Xp5d y sobre el que a continuación se discutirán algunos aspectos.

Los parámetros cinéticos de cada aislado son intrínsecos a cada uno de ellos y un reflejo de su capacidad metabólica. Obsérvese que el aislado Xm1m es incapaz de metabolizar el amonio a nitrato y nitrito, y ni siquiera es capaz de consumir por completo el cianuro, talvez como resultado de la inhibición por acumulación del amonio. El aislado Xn5k es capaz de metabolizar el cianuro a amonio, nitritos y nitratos, aunque sus constantes cinéticas son bajas, y es incapaz de eliminar el cianuro por completo.

4.2.3 Degradación biológica del cianuro por el aislado *Pseudomonas* Xp5d. En la figura 11 se muestra la relación entre las constantes de actividad de degradación específica de sustrato de el aislado *Pseudomonas* Xp5d y la concentración de cianuro. A medida que la concentración de cianuro aumenta, k disminuye en contradicción con el modelo típico de saturación Michaelis-Menten, en el que un aumento en la concentración del sustrato debe generar k más altas hasta alcanzar un valor k máximo.

Sin embargo si se tiene en cuenta la toxicidad del cianuro o se podría considerar la inhibición ocasionada por este sobre la actividad biológica. El modelo tradicional de toxicidad considera que “existe una relación lineal entre la actividad biológica y el logaritmo de la concentración del tóxico”⁸⁰. Si se consideran las constantes de degradación específica de sustrato como un estimativo de la actividad biológica del microorganismo en cuestión podemos emplearla junto con la concentración del cianuro para estimar el efecto inhibitorio de este sobre el microorganismo. La tabla 9 muestra los datos a partir del cual se estableció tal relación.

⁸⁰ APHA, AWWA Y WPCF. Standard methods for the examination of water and wastewater. 16th ed. New York : R. Harris, 1998. p.1005.

Figura 11. Toxicidad del cianuro para el aislado *Pseudomonas* Xp5d. Relación entre actividad biológica (k) y la concentración de cianuro.

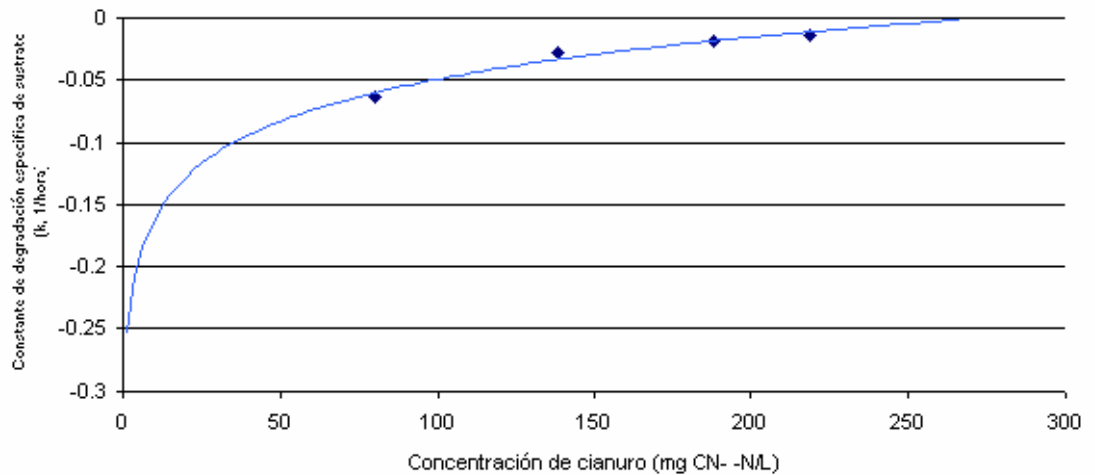


Tabla 9. Toxicidad del cianuro. Relación entre actividad biológica (k) y concentración del cianuro

Concentración CN ⁻ N (mg/L)	Ln [CN ⁻ N]	k (1/hora)
219	5,39	-0,0139
188	5,24	-0,0185
139	4,93	-0,0272
80	4,38	-0,0624

Resultados de aislamiento de bacterias degradadoras de cianuro residual

$$k = 0,0453 \cdot \ln[\text{CN}^- \text{N}] - 0,27138$$

donde,

k = constante de degradación específica de sustrato, considerándose estimativo de la actividad biológica (1/hora)

[CN⁻ N] = Concentración del cianuro en mg CN⁻-N/L

Coefficiente de correlación (r) = 0,992

En base a esta ecuación se puede establecer el límite de actividad biológica determinado por la máxima concentración de cianuro que el aislado *Pseudomonas* Xp5d sería capaz de tolerar. Este límite es de 275 mg CN⁻-N/L o su equivalente 514 mg CN⁻/L, en donde la

actividad biológica sería anulada por completo. Cortijo y Alvarez⁸¹ aseguran que el límite práctico es menor, si se considera que no es técnicamente adecuado mantener k bajas dado que esto corresponde a tiempos de vida media más largos y en consecuencia si se ha de utilizar a escala real tiempos de retención hidráulicos más largos.

La inhibición por toxicidad del sustrato puede considerarse como el factor alternante del modelo Michaelis-Menten y que no permitió el cálculo de los parámetros cinéticos V_{max} , k_{max} y K_s empleando la forma integrada de la ecuación Michaelis-Menten, ni el de los parámetros k_{max} y K_s empleando la ecuación Lineweaver-Burk.

En la definición de la fase logarítmica se empleó la evolución de las velocidades de crecimiento y degradación específica de sustrato a través del tiempo. Este método empleado en el desarrollo de soluciones cerradas de cinética enzimática arrojó resultados interesantes en el análisis del crecimiento bacteriano y en el de degradación del cianuro de el aislado *Pseudomonas* Xp5d.

En cualquiera de las cuatro concentraciones el aislado *Pseudomonas* Xp5d alcanzó la máxima velocidad de degradación en el lapso de 18 a 20 horas. Si se observa cuidadosamente las curvas de eliminación del cianuro y la curva de nitrógeno total en las gráficas 5-8, nótese que en el periodo previo al momento en el que se alcanza la velocidad máxima la totalidad del cianuro es consumido por las bacterias sin ser liberado como amonio.

Posterior a la velocidad máxima de degradación del sustrato la curva de eliminación del cianuro discrepa de la curva de nitrógeno total. El total de los productos no corresponde a la conversión del cianuro degradado, llegando a producirse una cantidad de productos mayor de la que esteoquímicamente sería posible a partir del cianuro. Si el cianuro se transformara solo a amonio o a cualquiera de los productos la curva de nitrógeno total se mantendría constante, y si el cianuro se consumiera en el crecimiento celular, la mencionada curva experimentaría un descenso. Según Muir, Azis y Hoecker⁸², el aumento en las concentraciones de nitrógeno total podría aducirse a una fuente de nitrógeno adicional, que en este caso podría ser la peptona adicionada al medio.

Si se considera que investigaciones previas Thompson⁸³, han demostrado que el amonio producido a partir del cianuro por *Pseudomonas* es rápidamente asimilado, y que existen más productos de los que esteoquímicamente serían posibles a partir del cianuro existente, podríamos considerar que gran parte de los supuestos productos finales (amonio,

⁸¹ CORTIJO, Agusberto y ALVAREZ, Hernán. Pre-tratamientos hidrometalúrgicos alternativos para disminuir el consumo de cianuro y aumentar la recuperación de oro en plantas de cianuración. Lima : Facultad de Toxicología, 1997. p.470.

⁸² MUIR, AZIZ y HOECKER, op. cit., p.469.

⁸³ THOMPSON, op. cit., p.898.

nitratos, nitritos) no son el resultado de la conversión del cianuro, sino de la degradación de la peptona adicionada al medio de cultivo como fuente suplementaria de nitrógeno.

En resumen durante el periodo previo a la velocidad máxima el cianuro es totalmente asimilado y en consecuencia no existe aparición alguna de productos, mientras que en periodo posterior a la velocidad máxima la asimilación o degradación de cianuro va acompañada de la producción de amonio, nitritos y nitratos provenientes de una fuente alterna de nitrógeno. Es probable que durante el periodo previo a la velocidad máxima la peptona sea degradada pero los productos finales son rápidamente asimilados y en consecuencia no detectados. Debe considerarse también la competencia por sustratos, téngase en cuenta que la caída en la velocidad de degradación del cianuro es concomitante con la aparición de productos adicionales no provenientes del cianuro. La curva de crecimiento apoya esta hipótesis, si se considerara al cianuro como la fuente de nitrógeno primaria de rápida asimilación, a diferencia de la peptona que requeriría ser degradada en el exterior para luego ser asimilada.

Las velocidades máximas determinadas numéricamente para cada una de las concentraciones evaluadas se reúnen en la tabla 10. Coinciden talmente las máximas velocidad hades se alcanzaron en intervalos de tiempos similares sin importar cual fue la concentración inicial de cianuro, entre la hora 18 y la hora 20.

Tabla 10. velocidad hades máximas de degradación de sustrato a diferentes concentraciones de cianuro.

Concentración CN⁻ (mg/L)	Concentración CN⁻N (mg/L)	Velocidad máxima (mg CN⁻-N/L/hora)
407	219	-14,08
350	188	-11,41
258	139	-17,47
149	80	-9,40

Resultados de aislamiento de bacterias degradadoras de cianuro residual

CONCLUSIONES

A partir de muestras provenientes de las plantas de cianuración dedicadas a la explotación aurífera en el municipio de los Andes-Sotomayor (departamento de Nariño) se lograron aislar 16 aislados tolerantes a concentraciones de cianuro de 100 mg CN-/L. De estos 16 aislados, 3 demostraron ser capaces de degradar el cianuro, siendo identificados como *Pseudomonas* Xp5d, *Chromobacterium* Xn5k y *Klebsiella* Xm1m.

El aislado más prometedora es la identificada como *Pseudomonas* Xp5d, quien presenta las constantes específicas de crecimiento (μ) y de degradación de sustrato (k) más altas en comparación con las otras dos cepas.

El aislado *Pseudomonas* Xp5d es capaz de tolerar concentraciones de cianuro de hasta 400 mg CN-/L, con tiempos de vida media para el cianuro de 70 horas. A concentraciones de cianuro de 100 mg CN-/L el tiempo de vida media del cianuro es reducido a sólo 16 horas.

La determinación de μ_{max} , k_{max} y las constantes de saturación (K_s) que permitirían la caracterización cinética completa del aislado *Pseudomonas* Xp5d no fue posible por reemplazo de los datos de las curvas de crecimiento y eliminación de sustrato en la forma integrada de la ecuación Michaelis-Menten. k_{max} y K_s tampoco pudieron calcularse a partir de los dobles recíprocos de k y las concentraciones de cianuro (ecuación Lineweaver-Burk). Schnell y Mendoza⁸⁴, afirman que la aplicación de modelos no lineales de la ecuación Michaelis-Menten podría permitir el cálculo de los parámetros cinéticos restantes.

Considerada la toxicidad del cianuro se determinó que la actividad biológica de el aislado *Pseudomonas* Xp5d, medida como k, depende en forma directa del logaritmo natural de la concentración del cianuro, en concordancia con el modelo típico de toxicidad (APHA, AWWA, WPCF, 1998), . Con base en este modelo la concentración a la que teóricamente se anularía por completo la actividad biológica de el aislado antes mencionado es de 514 mg CN-/L. Esta inhibición ocasionada por el sustrato explicaría la no concordancia de los datos aquí expuestos con el modelo típico de saturación Michaelis-Menten.

⁸⁴ SCHNELL y MENDOZA, op. cit., p.207.

BIBLIOGRAFIA

- AIBA, S. ; HUMPHREY, A. E., and MILLIS, N. F. Biochemical Engineering. 2th. ed. Academic press, London : Academic Press,1996.1160 p.
- APHA, AWWA, WPCF. Standard Methods for the Examination of water and wastewater 16th. ed. New York.: Harris, R, 1998. 1060 p.
- BAUD, F.; BARRIOT, P. and RIOU, B. Les antidotes. Paris : Masson, 1992. 588 p.
- BAUER, J. L. Lixiviación Bacteriana: Introducción a la parte microbiológica de la Biohidro-metalurgia con sp. de Thiobacillus. En: Revista de la ANBIOP, 1986. 462 p.
- BROCK, Thomas and MADIGAN, Michael. Microbiología. 9 ed. México : Prentice Hall Hispanoamericana, 1998. 712 p.
- CORTIJO, Agusberto y ALVAREZ, Hernán. Pre-tratamientos hidrometalurgicos alternativos para disminuir el consumo de cianuro y aumentar la recuperación de oro en plantas de cianuración. Lima : Facultad de Toxicología, 1997. 769 p.
- CURRY, S. Medical Toxicology. Critical care clinics. Philadelphia: W.B. Saunders, 1997. 792 p.
- DUEÑAS, Laita A. Intoxicaciones agudas en medicina de urgencia y cuidados críticos Barcelona: Mason, 1999. 305 p.
- EI-GHAOUI, E. A., JANNSON, R. E. W. and MORELAND, C. Application of the Trickle Tower to Problems of Pollution Control. ii. The direct and Indirect Oxidation of Cyanide. In: Journal of Applied Electrochemistry, volume 12, 1993. 680 p.
- ESCOBAR, J. Y ECHEVERRI, A. Notas sobre minería de veta y cianuración. Medellín : Fundación Escobar, 1995. 1410 p.
- GENTINA, J. C. y ACEVEDO, F. C. Lixiviación bacteriana de minerales. En : IV Curso Latinoamericano de Biotecnología. Chile, 1992. 1252 p.
- GROSSE, E. Croquis Geológico de la parte sur oriental del Departamento de Nariño. Bogota : s. n., 1984. 1821 p.
- KLAASSEN, C. D. and EATUN, D. L.. Principles of toxicology casarett and doulls toxicology. 8ª ed. New York : Elmsfors, 1997. 686 p.

LIEN, R. et al. Chemical and biological cyanide destruction and selenium removal from precious metals tailings pond water. Proceedings GOLD '90. Symposium, Salt Lake City Utah 26. Editors :Donald M Hausen, Douglas N Halbe, Erich U Petersen and William J Tafuri. February to 1 March, 1990. 913 p.

MACFADIN, J. F. Biochemical Tests for Identification of bacteria. 2th. ed. Baltimore : Williams & Wilkins, 1997. 507 p.

MARRUECOS, L.; NOGUÉ, S. , NOLLA J. Toxicología clínica. Barcelona : Springer-Verlag Ibérica, 1993. 708 p.

MEYERS, P. R. et al. Book General Mycrobiology. 15.th. ed. Chicago : R. Harris, 1995. 1922 p.

MUDDER, F. et al. Biological treatment of cyanide wastewaters : design, start-up and operation of a full scale facility. Lead, South Dakota : Homestake Mining Company, 1998. 993 p.

MUIR, D. M.; AZIZ, M. and HOECKER, W. Cyanide losses under cip conditions and effects of carbon on cyanide oxidation. Canada :International Plubishers, 1995. 785 p.

NAEMURA and WOODWARD. Et al microbiology identification of bph genes encoding biphenyl/polychlorinated biphrnyl degradation in soil bacteria. s.l. : s.n.,1979. 1124 p.

OKOH, A.m et al. Potential of *Stenotrophomas maltophilia* (GB1) in the biodegradation of weathered heavy crude oil (Maya).GAZZ.MED.ITAL-ARCH.SCI.MED, 2000. 2030 p.

RONALD L., Crawford and DON L., Crawford. Cambridge Bioremediation: principles and applications. New York : Cambridge University Press, 1996. 936 p.

SCHNELL, S. and MENDOZA, C. Closed form solution for time-dependent enzyme kinetics. In: Journal of Theoretical Biology,1997. 187, 436 p.

SEGEL, I. H. Enzyme kinetics. Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems. New York : s.n.,1975. 867 p.

SEMPRINI, Lewis. Bioremediation of chlorinated and polycyclic aromatic hydrocarbon compounds. Boca Raton, Florida: Lewis Publishers, 1994. 1521 p.

THOMPSON, Leslie. Cyanide biotreatment and metal biomineralization in spent ore and process solutions. www. Cyanide bioremediation.com, 1998. 1263 p.

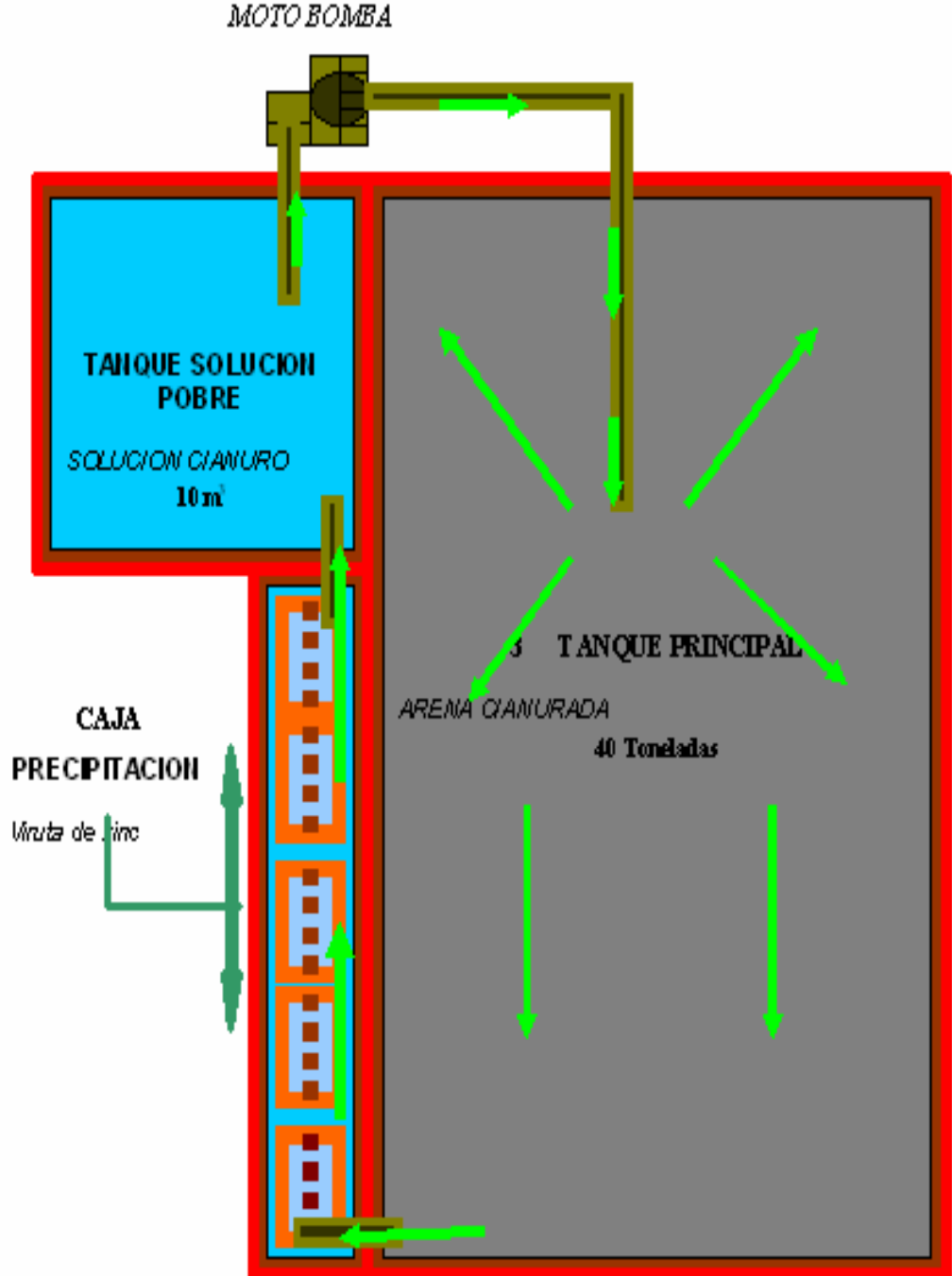
VICCELIO, P. Handbook of medical toxicology. Boston : Little Brown's, 1993. 586 p.

WUTE, David., and HANER, N. B. / and applied approach toxicology for engineers U.S. New York : Department of Healt, 1997. 1345 p.

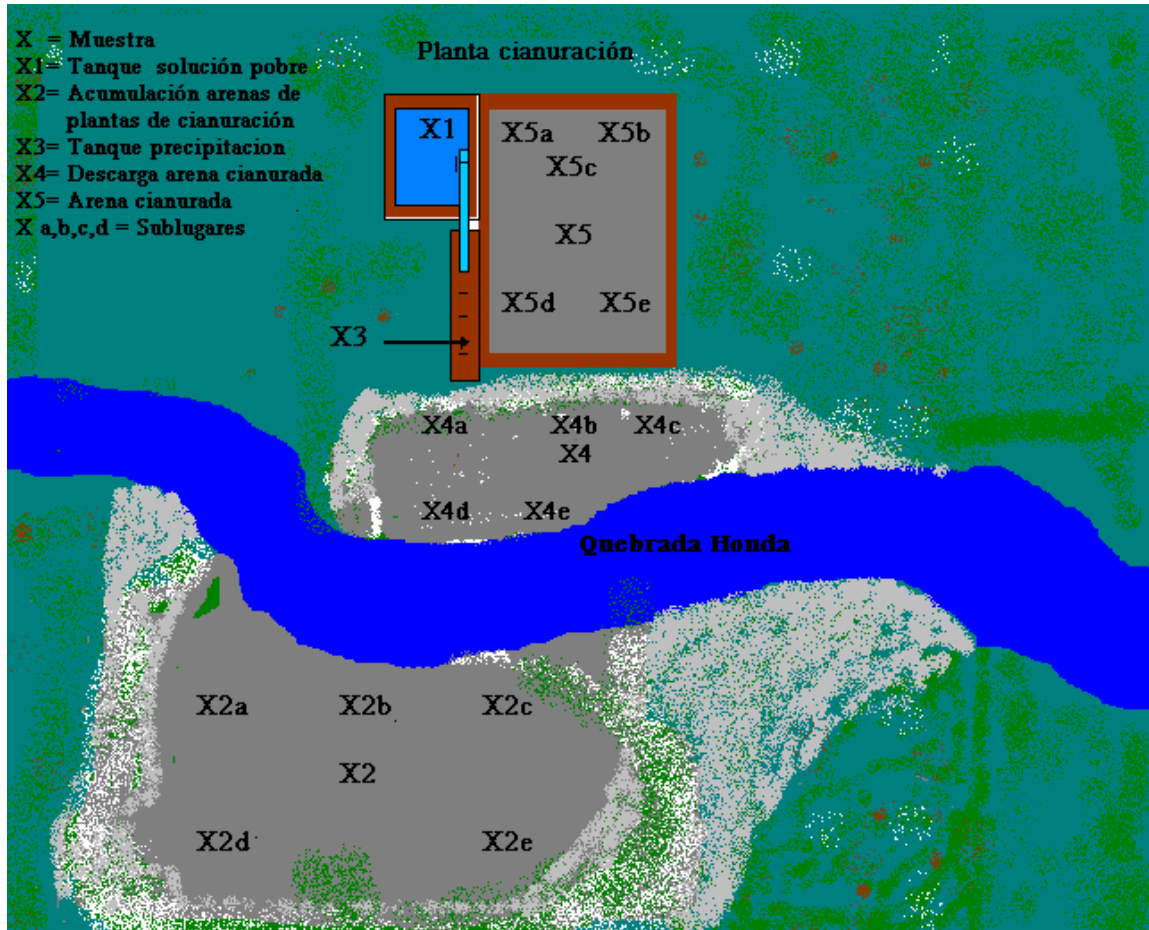
YADAV, J. et al. Degradation of Polychlorinated Biphenyl Mixtures (Aroclors 1242-1254 y 1260) by the white Rot Fungus Phanaerochaete chrysosporium as Evidenced by congener-Specific Analysis. Applied and Environmental Microbiology vol.61. N°7, 1995. 2606 p.

ANEXOS

Anexo A. Esquema planta de cianuración.



Anexo B. Lugares de muestreo



Anexo C. Sistema BBl crystal.

El sistema BBL CRYSTAL E/NF para la identificación (ID) de patógenos entéricos/no fermentantes es un método de identificación en miniatura que utiliza substratos cromógenos y convencionales modificados. Se han diseñado para la identificación de bacterias aeróbicas gram-negativas de importancia clínica pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, así como algunas de las bacterias gram-negativas, de origen humano, fermentantes y no fermentantes de glucosa mas frecuentemente aisladas.

Cada reacción positiva recibe un valor de 4.2 % correspondiente a donde se encuentra la reacción. Cada resultado negativo recibe un valor de 0 (cero). Los resultado positivos en cada columna se suman. Se obtiene de esta manera un numero de 10 dígitos; este es el numero de perfil.

Ejemplo

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
4	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-
2	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-
1	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Perfil	5	4	6	0	2	4	4	3	7	1

El numero de perfil resultante y los resultados de pruebas independientes (indol y Oxidasa) deben tabularse en un PC con un libro electrónico de códigos para el sistema BBL CRYSTAL ID instalado, para poder obtener una identificación. También se dispone de un libro de códigos manual. Si no se posee un PC, comuníquese con el servicio técnico de Becton Dickinson Microbiology Systems para ayuda con la identificación.

SISTEMA BBL CRYSTAL

Posición en el papel	código	Substrato	<i>Pseudomona Aeuroginosa</i>	<i>Chromobacterium</i>	<i>Klebsiella</i>
4 A	ARA	Arabinosa	-	-	+
4 B	MNS	Monosa	V	-	+
4 C	SUC	Sucrosa	-	+	+
4 D	MEL	Melibosa	-	-	v
4 E	RHA	Ramnosa	-	-	+
4 F	SOR	Sorbitol	-	-	+
4 G	MNT	Maniol	-	-	+
4 H	ADO	Adonitol	-	-	+
4 I	GAL	Galactosa	+	+	+
4 J	INO	Inositol	-	-	+
2 A	PHO	p-n-p-fosfato	V	+	V
2 B	BGL	p-n-p-a-B-glucósido	-	(+)	+
2 C	NPG	p-n-p-B-galactósido	-	-	+
2 D	PRO	Prolina p- nitroanilida	+	-	V
2 E	BPH	p-n-p- bifostato	-	+	V
2 F	BXY	p-n-p- xilósido	-	-	+
2 G	AAR	p-n-p-a- arabinósido	-	-	(+)
2 H	PHC	p-n-p- fosforilocolina	V	+	-
2 I	GLR	p-n-p-B- glucorónido	-	-	-
2 J	NAG	p-n-p-N-acetil-glucosaminida	-	-	-
1A	GGL	y-L-glutamil p- nitoanilida	+	V	+
1B	ESC	Esculina	-	+	+
1 C	PHE	p- nitrol-DL-fenilalanina	-	+	-
1 D	URE	Urea	+	+	V
1 E	GLY	Glicina	+	V	-
1 F	CIT	Citrato	+	(+)	+
1 G	MLO	Malomato	+	-	+
1 H	TTC	Terazolio	+	V	+
1 I	ARG	Arginina	+	V	V
1 J	LYS	Lisina	-	-	+

Anexo D. Cuantificación del cianuro total.

Instrumental:

- 1- Matraz de ebullición de 1 l. con un tubo introducido y un adaptador para el condensador de agua fría.
- 2- Absorbente de gas, con un tubo de dispersión de gas.
- 3- Elemento calefactor ajustable.
- 4- Tapones.

Reactivos:

- 1- Solución de Hidróxido de Sodio, disuélvase 40 g. de NaOH en agua y dilúyase hasta un litro.
- 2- Reactivo de Cloruro de Magnesio, disuélvase 510 mg. De $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ en agua y diluyáse hasta un litro
- 3- Acido Sulfúrico, H_2SO_4
- 4- Carbonato de Plomo, $PbCO_3$
- 5- Acido Sulfámico, NH_2SO_3H

Procedimiento:

- a) Añádase 500 ml de muestra que contenga no más de 10 mg de CN^-/l (diluida con agua destilada, si fuera necesario) al matraz de ebullición. Añádanse 10 ml de solución de NaOH al depurador de gas y dilúyase, si fuera necesario con agua destilada hasta obtener una profundidad de liquido adecuada en el absorbente. Añádanse 50 g de $PbCO_3$ a la solución absorbente para precipitar S^{2-} . conéctese el equipo que consta de entrada de aire al matraz de ebullición, condensador, lavador de gas, sifón del matraz de solución y aspirador. Ajustese la solución de modo que el matraz de ebullición, entre aproximadamente 1 burbuja de aire/segundo. Esa velocidad del aire arrastrará el gas HCN desde el matraz al absorbente.
- b) Añádase 2 g de ácido Sulfámico a través de tubo de entrada de aire y lávese con agua destilada.
- c) añádase 50 ml de ácido Sulfúrico a través del tubo de entrada. Aclárese el tubo con agua destilada y déjese que el aire mezcle el contenido del matraz durante 3 minutos. Añádase 20 ml de reactivo de Cloruro de Magnesio por la entrada de aire y lávense con corriente de agua.
- d) Caliéntese con ebullición rápida, pero sin inundar la entrada del condensador ni permitir que los vapores suban por encima de la mitad. Una tasa de reflujo de 40 a 50 gotas/minuto desde la salida del condensador indica que el reflujo es adecuado. Manténgase el reflujo por una hora por lo menos. Interrumpase el calentamiento, pero manteniendo el flujo de aire. Enfríese durante 15 minutos y vacíese el contenido del lavador de gas en un recipiente aparte. Aclárese el tubo de conexión entre el condensador y el lavador de gas con agua

destilada, añádase el agua de aclarado al líquido vaciado y dilúyase hasta 250 ml en un matraz aforado.

e) Determínese el contenido de Cianuro por método de Titulación, si su concentración supera 1 mg/l utilice el método Spectroquant Merck con fotómetro.

Titulación

Instrumental:

1- Bureta 10 ml de capacidad.

Reactivos:

1- Solución Indicadora, 20 mg de p-dimetilaminobenzalrodanina en 100 ml de acetona

2- Nitrato de Plata titulante. AgNO₃

3- Solución de dilución de Hidróxido de Sodio. NaOH

Procedimiento

Tómese un volumen de muestra de la solución de absorción, de forma que su titulación precipite aproximadamente 1 a 10 ml de Nitrato de Plata titulante. Dilúyase a 250 ml usando la solución de dilución de Hidróxido de Sodio, añádase 0.5 ml de solución indicadora, y titúlese.

Calculos:

$$\text{mg CN/l} = \frac{(A - B) \times 1000}{\text{ml muestra original}} \times \frac{250}{\text{ml porción usada}}$$

donde:

A = ml de AgNO₃ patrón para la muestra.

B = ml de AgNO₃ para el blanco

Método Spectroquant Merck Fotómetro

Por medio de reactivos, el componente de una muestra a analizar se convierte en un compuesto coloreado en una reacción específica. Los reactivos o mezclas de reactivos contienen además del reactivo selectivo para el parámetro a determinar, un determinado número de sustancias que son esenciales para el curso de la reacción. Esto incluyen, por ejemplo soluciones amortiguadoras para ajustar el pH al valor óptimo para la reacción, y agentes enmascarantes que suprimen la influencia de iones interferentes.

Procedimiento:

Si la muestra es sólida se disuelve en 0.5 g en 100 ml de agua destilada. Luego se toma 5 ml de la muestra en un tubo de ensayo. Se añade una microcucharada verde de CN-3, se agita intensamente, añádase una microcucharada de CN-4, se agita intensamente, se espera 10 minutos para la revelación. Se agrega la solución a la cubeta correspondiente (cubeta de compartimento del Fotómetro), se selecciona el método en el fotómetro y se mide. Automáticamente el fotómetro digitara el resultado expresado en mg/l de CN

Anexo E. Registros fotograficos de las minas de Quebrada Honda



Foto a. Planta de cianuración donde se aislo la cepa *Pseudomonas* Xp5d.

Foto b. Tunnel de veta y molino. Planta de cianuración de Pacho.



Anexo F. Registro fotografico de las pruebas de degradación del cianuro



Foto a. Degradación del cianuro por la bacteria *Pseudomonas Xp5d*.

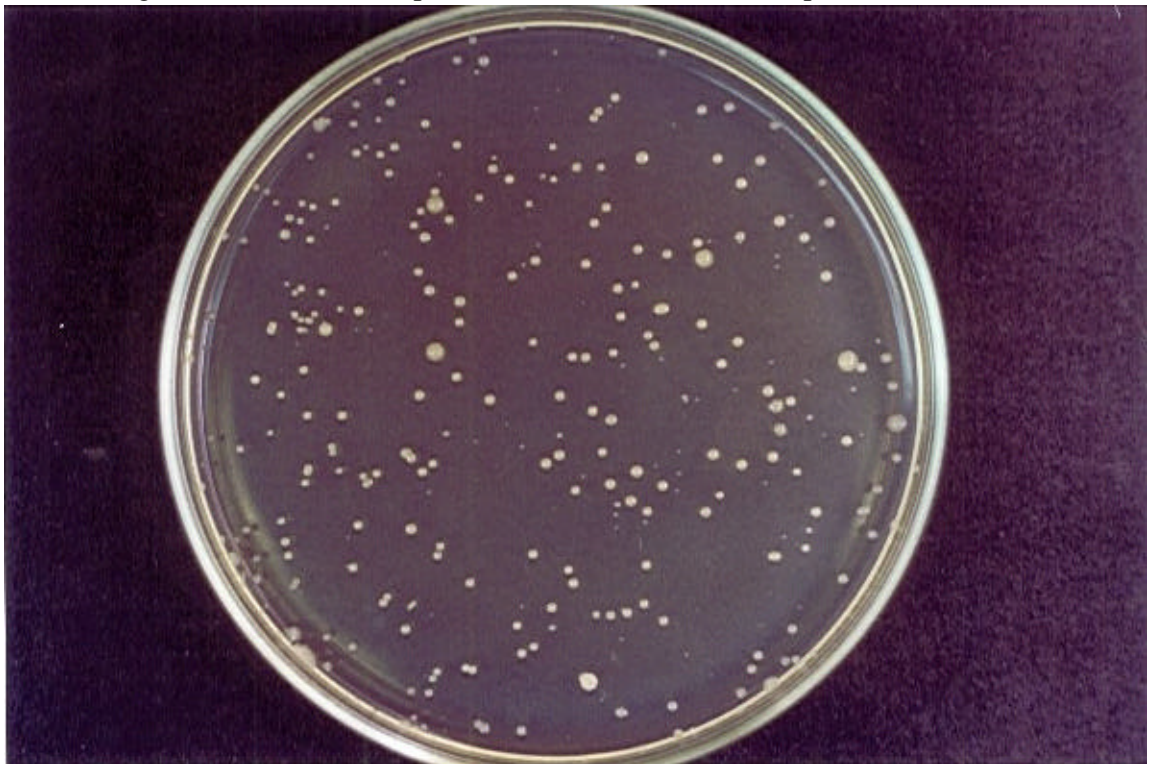


Foto b. Purificación de *Pseudomonas Xp5d*

Fotos c y d. Aislamiento de bacterias tolerantes al cianuro.

