

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL CALLAO
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA QUÍMICA



**“DETERMINACIÓN DE PARAMETROS
ÓPTIMAS EN LA BIORREMEDIACIÓN DE
EFLUENTE CIANURADO DE MINERALES
AURIFEROS, UTILIZANDO *Pseudomonas
alcalófilas*”**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
INGENIERO QUÍMICO**

**YURI CASTILLO ALDAVE
RICARDO LUIS VEGA ALAVE**

Callao, Diciembre, 2018

PERÚ

PRÓLOGO DEL JURADO

La presente tesis fue Sustentada por los Bachilleres **CASTILLO ALDAVE YURI y VEGA ALAVE RICARDO LUIS** ante el **JURADO DE SUSTENTACIÓN DE TESIS** conformado por los siguientes Profesores Ordinarios:

ING. CALDERÓN CRUZ JULIO CESAR	PRESIDENTE
ING. LAZO CAMPOSANO ROBERTO	SECRETARIO
ING. CHAMPA HENRIQUE OSCAR MANUEL	VOCAL
ING. HERRERA SANCHEZ SONIA ELIZABETH	ASESORA

Tal como está asentado en el Libro de Actas N°02 de Tesis sin Ciclo de Tesis Folio N° 39 y Acta N°282 de fecha **VEINTISÉIS DE DICIEMBRE DEL 2018**, para optar el Título Profesional de Ingeniero Químico en la modalidad de Titulación de Tesis sin Ciclo de Tesis, de conformidad establecido por el Reglamento de Grados y Títulos aprobado por Resolución N° 135-2017-CU de la fecha 22 de junio del 2017 y modificado con Resolución N°631-2017-CU de la fecha 24 de julio del 2017.

DEDICATORIA

A mis padres queridos por todo su apoyo incondicional y su amor.

AGRADECIMIENTO

El presente trabajo de investigación lo dedico a Dios por todo lo bueno que me ha dado en la vida. Sin embargo cabe mencionar mis más sinceros agradecimientos a las siguientes personas Ing. Sonia Sánchez Herrera y el Ing. Vladimir Arias Arce.

INDICE	
INDICE	1
TABLA DE CONTENIDO	5
RESUMEN	8
ABSTRACT	8
I. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN	10
1.1 Identificación del problema	10
1.2 Formulación del problema.....	11
1.2.1 Problema general	11
1.2.2 Problemas específicos.....	11
1.3 Objetivos de la investigación.....	11
1.3.1 Objetivo general.....	11
1.3.2 Objetivos específicos.....	11
1.4 Justificación	12
1.5 Importancia	13
II. MARCO TEÓRICO	14
2.1 Antecedentes del estudio.....	14
2.2.1 Química básica del cianuro	15
2.2.2 Cianuro de hidrogeno.....	17
2.2.3 Cianuros simples.....	18
2.2.4 Cianuros complejos.....	18
2.2.5 Cianuro total (TCN)	20
2.2.6 Compuestos derivados del cianuro	20
2.2.7 Lixiviación de oro.....	22
2.2.8 Efluente cianurado	25

2.2.9	Tecnologías de tratamiento de cianuro	25
2.2.10	Vías de biodegradación de cianuro	34
2.2.11	Biorremediación del cianuro	36
2.2.12	Aplicaciones	45
2.2.13	Análisis de cianuro	48
2.2.14	Análisis Factorial	54
2.3	Términos Básicos.....	55
2.4	Bases Legales	59
III.	VARIABLES E HIPÓTESIS.....	60
3.1	Variables de la investigación.....	60
3.1.1	Variables independientes	60
3.1.2	Variables dependientes	60
3.1.3	Variables controlables	60
3.2	Operacionalización de Variables.....	60
3.3	Hipótesis	62
3.3.1	Hipótesis general	62
3.3.2	Hipótesis específica.....	62
IV.	METODOLOGÍA	63
4.1	Tipo de Investigación	63
4.2	Diseño de la Investigación	65
4.2.1	Etapas de la Investigación.....	65
4.3	Población y muestra.....	67
4.4	Técnicas e instrumentos de recolección de datos	71
4.4.1	Plan de recolección y procesamiento de la información	71

4.4.2	Materiales	72
4.4.3	Reactivos y Soluciones.....	73
4.5.	Procedimiento de recolección de datos	74
4.5.1	Preparación del medio mínimo M9	74
4.5.2	Reactivación de bacterias alcalófilas	75
4.5.3	Caracterización de efluente de cianuro	75
4.5.4	Diseño Experimental de la biorremediación de efluente	76
4.6.	Procedimiento estadístico y análisis de datos.....	77
4.6.1.	Tratamiento Estadístico	78
4.6.2.	Análisis Estadístico.....	79
V.	RESULTADOS	82
5.1.	Caracterización del efluente de cianuro	82
5.2.	Diseño experimental	83
5.3.	Análisis Anova	94
VI.	DISCUSION DE LOS RESULTADOS	99
6.1.	Contraste de la hipótesis con el resultado	99
6.2.	Contrastación de resultado con otros estudios similares	100
VII.	CONCLUSIONES	103
VIII.	RECOMENDACIONES.....	104
IX.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105
9.1.	Referencias- textos	105
X.	ANEXOS.....	110
10.1.	Lugar y recolección de muestra	110
10.2	Medios de cultivo	110

10.3	Determinación de la concentración celular de microorganismos. ...	113
10.4	Metodo de Tinción Gram.....	114
10.5	Aislamiento Bacteriano	115
10.6	Identificación de Bacterias Alcalófilas	118
10.7	Adaptación de pseudomonas aislada al cianuro.....	120
10.8	Adaptación de pseudomonas alcalófilas al efluente de cianuro a nivel de matraces de 250ml	129
10.9	Evaluación de la tolerancia a pH alcalinos.....	139
10.10	Determinación de los parámetros significativos del proceso.....	148
10.11	Diseño experimental	151
10.12.	Matriz de consistencia.....	154

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE CUADROS

2.1 Propiedades del cianuro y su significado	16
2.2 Formas de cianuro	20
2.3 Ventajas y Desventajas de la degradación biológica del cianuro.....	32
2.4 <i>Pseudomonas</i> degradadoras de cianuro	39
2.5 Aplicaciones de la Biorremediación	47
3 1 Operacionalización de las Variables	61
4.1 Cuadrados de Ensayo Anova81

LISTA DE FIGURAS

2. 1 Equilibrio del cianuro de hidrogeno –ion cianuro	17
2. 2 Procesamiento de minerales auríferos	23
2. 3 Planta de cianuración en CIP.....	24
2. 4 Ciclo del cianuro y sus comportamientos en relaves	27
2. 5 Biodegradación de cianuro y nitrilos	35
2. 6 Ruta metabolica oxidativa de cianuro con <i>pseudomonas fluoresces</i>	36
2. 7 Metabolismo microbiano	38
2. 8 Morfología de <i>pseudomonas</i>	43
2. 9 <i>Pseudomonas</i> en prueba de piocianina.....	44
2. 10 Clasificacion general de compuestos de cianuro.....	48
4.1 Representación del diseño de investigación.....	64
4.2 Diseño experimental	69
4.3 Conteo microbiano	78
4.4 Diseño experimental central compuesto	79
5.1 Cinetica de crecimiento de <i>pseudomonas alcalofilas</i>	89
5.2 Cinetica de degradación de cianuro total	91
5.3 Porcentaje de degradación de cianuro total.....	93

LISTA DE TABLAS

4. 1 Nivel Decodificado de las variables	66
4. 2 Matriz de Diseño Experimental Central Compuesto	66
4. 3 Distribución del diseño experimental	77
5. 1 Contenido de Cianuro total, WAD y total	82
5. 2 Contenido de cationes e aniones	82
5. 3 Matriz factorial del Diseño Experimental	83
5. 4 Concentración de cianuro total residual a pH:10.0	84
5. 5 Concentración de cianuro total residual a pH:11.0	85
5. 6 Concentración de cianuro total residual a pH:9.729.....	86
5. 7 Concentración de cianuro total residual a pH:11.28	86
5. 8 Concentración de cianuro total residual a pH:10.5	87
5. 9 Diseño experimental central compuesto	88
5. 10 Conteo encamara neubaver pseudomonas alcalofilas	89
5. 11 Concentración cianuro total residual del diseño experimental.....	91
5. 12 Porcentaje de Degradación del diseño experimental.....	93
5. 13 Columnas generadas de la regresión multivariable.....	94
5. 14 Estadística de la regresión	95
5. 15 Analisis de Varianza.....	95
5. 16 Coeficientes del modelo matematico.....	96
5. 17 Parametros optimos de la biorremediación de efluente cianurado.	98

RESUMEN

En este trabajo se determinó los parámetros óptimos del proceso de biorremediación de efluente cianurado, utilizando *pseudomonas alcalófilas*. El procedimiento consistió en determinar las características del efluente cianurado. Luego se empleó el diseño central compuesto variando los parámetros el pH del medio de cultivo que fue ajustado a 9,78; 10,0, 10,5; 11,0 y 11,28 y a diferentes tiempos 17,2 24; 36; 48 y 54,7 horas para determinar el porcentaje de biorremediación de cianuro total. Finalmente se aplicó la regresión multivariable a los resultados y para obtener los coeficientes del modelo matemático, derivando se obtuvo los parámetros óptimos. Los resultados muestra las características del efluente que fueron concentración de cianuro total: 250 ppm y pH: 10,5 y los parámetros significativos que son el pH y el tiempo de biorremediación. En el diseño experimental dando los mejores resultados en el abatimiento de cianuro total fue de 165ppm, con un porcentaje de degradación 34,0% a las condiciones de pH: 10,0 a las 48 horas. Los resultados de la estadística de regresión fue de un coeficiente de correlación múltiple mayor a 0,95, esto quiere decir que los resultados se ajustan al modelo matemático. Los parámetros óptimos fue de pH óptima de 9,9 y tiempo óptima de 2,10 días o 54 horas.

Palabras clave: Efluente cianurado, *pseudomonas alcalófilas*, biorremediación, cianuro total, ANOVA.

ABSTRACT

In this work, the optimal parameters of the cyanide effluent bioremediation process were determined, using *Pseudomonas alcalófilas*. The procedure consisted in determining the characteristics of the cyanide effluent. Then, the central composite design was used, varying the pH parameters of the culture medium, which was adjusted to 9.78; 10.0, 10.5; 11.0 and 11.28 and at different times 17,2 24; 36; 48 and 54.7 hours to determine the percentage of bioremediation of total cyanide. Finally, the multivariable regression was applied to the results and to obtain the coefficients of the mathematical model, the optimum parameters were derived. The results show the characteristics of the effluent that were total cyanide concentration: 250 ppm and pH: 10.5 and the significant parameters that are the pH and the bioremediation time. In the experimental design giving the best results in the total cyanide abatement was 165ppm, with a 34.0% degradation percentage at pH conditions: 10.0 at 48 hours. The results of the regression statistics were of a multiple correlation coefficient greater than 0.95, this means that the results are adjusted to the mathematical model. The optimal parameters were an optimum pH of 9.9 and an optimal time of 2.10 days or 54 hours.

Key words: Effluent cyanide, *Pseudomonas alkalophilic*, bioremediation, total cyanide, ANOVA.

I. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

1.1 Identificación del problema

El cianuro de sodio (NaCN) es el compuesto químico más utilizado para las plantas de procesamiento mineral aurífero. Sin embargo, cabe mencionar que en la mayor parte de las plantas no se controlan técnicamente los procesos de lixiviación del oro, lo cual lleva a la utilización de cantidades de sales de cianuro por encima de las necesarias, generando altas descargas de efluente de cianuro tóxico que se almacenan en la relavera, dando lugar a impactos negativos en el ecosistema que se desarrolla.

Es por ello que es necesario el tratamiento de efluente de cianuro, actualmente los métodos físico-químicos, son costosos e insuficientes que utilizan reactivos químicos como por ejemplo; diversos ácidos; también requiere de personal capacitado, capacitaciones, implementos de trabajo e infraestructura y también generan otras sustancias peligrosas.

Los procesos de tratamiento biológicos de cianuro se han convertido cada vez más extendido en la industria minera, debido a su capacidad para simultáneamente eliminar varios contaminantes, su costo operativo relativamente baja y la capacidad de producir efluente de alta calidad. Es aplicando un proceso Biotecnológico Medio Ambiental, la biorremediación, consiste en el aprovechamiento de microorganismos como la *pseudomonas alcalófilas* en la biodegradación de cianuro.

1.2 Formulación del problema

1.2.1 Problema general

¿Cuál son los parámetros óptimos en la biorremediación de efluente cianurado de minerales auríferos, utilizando *pseudomonas alcalófilas*?

1.2.2 Problemas específicos

¿Cuál es pH óptima para que las pseudomonas alcalófilas degraden con mayor eficiencia al cianuro?

¿Cuál es el tiempo óptimo en la biorremediación, para que la concentración de cianuro este debajo los límites máximos permisibles?

1.3 Objetivos de la investigación

1.3.1 Objetivo general

Determinar los parámetros óptimos en la biorremediación de efluente cianurado de minerales auríferos, utilizando *pseudomonas alcalófilas*.

1.3.2 Objetivos específicos

Evaluar el pH óptima para que las pseudomonas alcalófilas degraden con mayor eficiencia al cianuro.

Evaluar el tiempo óptimo en la biorremediación, para que concentración de cianuro este debajo los límites máximos permisibles.

1.4 Justificación

EL crecimiento de un país requiere de constante investigación dirigida hacia la implementación de tecnología actualizada y adecuada a las necesidades que se plantean en cada momento, tanto de carácter económico, como social o medioambiental.

a) Justificación Legal

La utilización de sales de cianuro de sodio en la planta de procesamiento minerales auríferos genera efluente de cianuro toxico, ponen en peligro en muchos casos el equilibrio de distintos ecosistemas de flora y fauna, salud pública de los habitantes de las zonas cercanas, eso debido a que no se cumplen con los límites máximos permisibles (LMP) que dispone la ley: DS N° 010-2010-MINAM (Reglamento LMP para descarga de efluentes líquidos de actividades Minero-Metalúrgicas es de 1 mg/L de Cianuro Total)

b) Justificación Teórica

El uso de capacidad de algunos microorganismos en la degradación de cianuro de relave de mina, se obtiene resultados de mucha importancia, se determinó los parámetros óptimos en la biorremediación de cianuro en medios no definidos como es el caso de ambientes mineros y es una alternativa amigable con el medio ambiente sin empleo de sustancias químicas.

c) Justificación Tecnológica

Para el desarrollo de nuevas tecnologías para el tratamiento de fluyente de cianuro en solución de relave, la biorremediación es un método alternativo aprovechando las características de algunos microorganismos que tienen la capacidad de degradación de cianuro, hace que tenga un gran interés desde el punto de vista científico y tecnológico en el ámbito ambiental.

d) Justificación Económico

Es un método alternativo, rentable y eficiente en el tratamiento de efluentes cianurados de plantas de cianuración de minerales auríferos utilizando la capacidad de microorganismos tales como las *pseudomonas alcalófilas* en la degradación de cianuro, que cumplan con los LMP para la descarga de actividades Mineros-Metalúrgicas.

1.5 Importancia

En cuanto a su alcance, esta investigación abrirá nuevos caminos para estudios similares, en el tratamiento de contaminantes generados por las industrias, un método eficiente, económico y amigable con el medio ambiente.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes del estudio

HURTADO, J & BERASTAIN, A. (2012) en su trabajo de investigación “Optimización de la Biorremediación en relaves de cianuración adicionando nutrientes y microorganismos”, mediante experimentos factoriales a nivel de columnas con la adición de nutrientes y el empleo de bacterias sulfato reductoras (BSR) para estabilizar iones metálicos mediante la formación de sulfuros y bacterias capaces de biodegradar cianuro (BC). Con las mejores condiciones encontradas se realizó una prueba en columnas donde se adiciono un cultivo mixto (BSR-BC) y una mezcla de lactato y acetato en concentraciones de 1Mm y 10Mm. Se encontró que los nutrientes incrementaban la reducción de sulfatos un 48% en promedio y la adición de inoculo un 42%. La biorremediación de cianuro se mantuvo en 12% sin efecto en la adición de nutrientes o inoculo. Se probó en dos relaves adicionales y la adición de lactato de sodio 1mM permitió la inducción de BSR en 8 días en uno de ellos.

TUYA, S . (2014) en su tesis de investigación “Evaluación de capacidad degradativas de cianuro por bacterias alcalófilas aisladas de los relaves de la planta concentradora de metales Mesapata Cátac-Ancash”, logro aislar 25 cepas de las cuales tres (P-CIAN 2, P-NUT 1 y P-KING 2),

obtuvo los mejores rendimientos en las pruebas de selección, tolerando concentraciones de hasta 100 mg/L de CN^- a pH 11,0.

KHAMAR, Z *et al.* (2015) en su investigación "Remediación de cianuro en la laguna de mina de relaves de oro por una nueva bacteria co-cultivo", determino que a 9 cepas mostraron el mayor nivel de tolerancia y de cianuro podría crecer en un 13 de enero de 2015 a 350 ppm de cianuro, y estudio el efectos de diferentes factores, como el pH, la temperatura, el tamaño del inóculo y concentración cianuro inicial fueron estudiados en el proceso de remediación por OFAT (un factor en un momento) diseño experimental de cianuro.

2.2.1 Química básica del cianuro

El cianuro es una molécula que se encuentra en la naturaleza en gran variedad de formas. La gran diversidad y compleja naturaleza de los diferentes compuestos cianurados se puede explicar en función de las características químicas del grupo ciano ($-\text{C}\equiv\text{N}$).

El anión cianuro, formado por un átomo de carbono y uno de nitrógeno, presenta un enlace σ , dos π y dos orbitales antienlazantes desocupados. Los dos primeros orbitales de su estructura se llenan con el número máximo de electrones, mientras que los otros orbitales están vacíos. Debido a que los orbitales σ y π (1+2) están llenos con electrones, el cianuro se comporta como un halógeno. Sin embargo, su comportamiento

pseudohalogeno no puede explicar la formación de complejos cianurados con los metales de la serie de transición como Fe, Co, Cu y Zn.

A continuación se muestra las siguientes propiedades del cianuro y su significado (véase el cuadro N°2.1).

CUADRO N° 2.1
PROPIEDADES DEL CIANURO Y SU SIGNIFICADO

PROPIEDADES	SIGNIFICADO
Forma compuestos complejos, con los iones metálicos pesados.	Convierte los iones metálicos en solubles en las normalmente precipitaran.
Estabilidad diferente de diversos complejos metálicos.	Afecta la facilidad con que el cianuro puede ser separado del metal, permitiendo la destrucción del cianuro y la precipitación del metal.
Formación de un precipitado insoluble con el cobre cuproso y los ferrocianuros de metales pesados.	Pueden participar en la eliminación final de cobre, cianuro y ferrocianuro en algunos procesos de destrucción de cianuro. Puede dar origen al cobre coloidal reportado en los efluentes de plantas. El cianuro soluble es la forma más toxica.
Oxidación a iones cianato y amonio por oxidantes químicos.	Constituye una forma de eliminar el cianuro de los efluentes Producción de ion amonio toxico en los efluentes tratados de plantas auríferas. El efecto ambiental del cianato no es evidente.
Formación de tiocianato por reacción con compuestos de azufre.	Consume el cianuro necesario en la operación de plantas. Mecanismo de descodificación biológica.
Formación de cianuro de hidrógeno volátil a pH bajo.	Se cree que es un mecanismo importante en la degradación natural del cianuro y como método de tratamiento de efluentes.

Fuente: PERÚ, MINEM. Guía ambiental manejo de cianuro, 1990

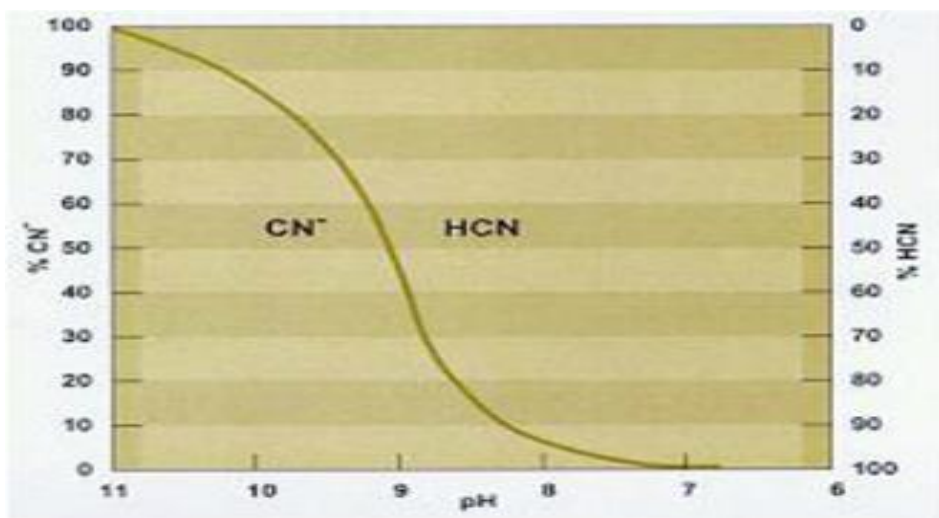
2.2.2 Cianuro de hidrogeno

El cianuro de hidrogeno (HCN) o ácido cianhídrico es un líquido o gas incoloro con un punto de ebullición de 25.7°C. Se trata de un ácido débil, altamente soluble en agua, con una constante de disociación de 4.36×10^{-10} , $pK_a = 9.31$ a 20°C (según Broderius, 1970) para una reacción de equilibrio de:



Se muestra las concentraciones de HCN y del ion CN^- en función del pH. Solo el CN^- forma complejos con metales y únicamente el HCN es volátil a partir de soluciones acuosas (véase la figura 2.1).

FIGURA N°2. 1
EQUILIBRIO DEL CIANURO DE HIDROGENO –ION CIANURO



Fuente: Esteban Miguel, Hidrometalurgia, 2001.

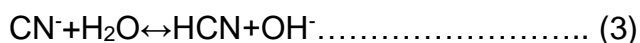
2.2.3 Cianuros simples

Los cianuros simples son sales formadas por la reacción del cianuro de hidrogeno con una base como NaOH o Ca(OH)₂. Los cianuros simples se disocian en agua formando ion cianuro y cationes metálicos solubles. Los cianuros simples están representado por la formula A (CN)_x, donde A es un alcalino (sodio, potasio, amoniaco) o un metal , y x es la valencia de A en el tiempo, es el número de grupo de cianuro .

En algunas soluciones de cianuro simple alcalino, el grupo de cianuro está presente como cianuro libre y molecular HCN. El rango depende del pH y la constante de disociación de HCN molecular (pKa=9.2).



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



El cianuro de sodio (NaCN) y el cianuro de calcio Ca (OH)₂ son cianuros simples que se utilizan comúnmente en el procesamiento de minerales auríferos.

2.2.4 Cianuros complejos

Los cianuros complejos tienen una variedad de fórmulas, pero cianuro metal alcalino normalmente está representado por A_yM(CN)_x. En esta fórmula, A representa metal alcalino, M es el metal pesado Fe(II) y Fe (III)

, Cd, Cu, Ni, Ag, Zn , otros), y x es el número de grupos de cianuro ; x es igual a la valencia tomada de A, e y del metal pesado.

La disociación inicial de cada uno depende de la solubilidad del metal alcalino, el rendimiento del complejo de cianuro en anión que es un radical $M(CN)_x^{y-}$. Este puede disociarse posteriormente, depende de diferentes factores , con la liberación de cianuro libre y consecuencia la formación de HCN.

La formación de complejos metálicos en una solución de cianuro es un proceso secuencial en la medida en que el metal forma inicialmente un producto de baja solubilidad, el que a su vez reacciona con el ion cianuro excedente para formar un complejo de cianuro soluble y estable. El grado de formación de complejos solubles está determinado por la concentración del ion cianuro libre.

Los cianuros de hierro son la especie dominante en el suelo y las aguas subterráneas con concentraciones totales en medios contaminados tan alto como 4% en peso (Stephen Ebbs ,2004). Como es Fe elemento presente en los suelos y acuíferos, el equilibrio favorece la formación de complejos tales como ferrocianuro $[Fe(CN)_6^{4-}]$ y ferricianuro $[Fe(CN)_6^{3-}]$.

Los complejos mixtos, como $M(CN)_5X^{n-}$, donde M es metal , y X puede ser H_2O, NH_3, CO, NO, H o un halógeno (véase el cuadro N°2.2, página siguiente).

CUADRO N° 2.2
FORMAS DE CIANURO SEGÚN ESTABILIDAD

CLASIFICACIÓN	COMPUESTOS
1.Cianuro inorgánicos	
1.1Cianuro libre	CN^{-1} , HCN
1.2cianuro simples	
a)solubles	$NaCN$, KCN , $Ca(CN)_2$, $Hg(CN)_2$
b)sales neutras insolubles	$Zn(CN)_2$, $Ni(CN)_2$, $Cd(CN)_2$, $CuCN$, $AgCN$
1.3Complejos de cianuro débiles	$Zn(CN)_4^{-2}$, $Cd(CN)_3^{-1}$, $Zn(CN)_4^{-2}$
1.4Complejos de cianuro moderadamente fuertes	$Cu(CN)_2^{-1}$, $Cu(CN)_3^{-2}$, $Ni(CN)_4^{-2}$, $Ag(CN)_2^{-1}$,

Fuente: Luque ,Almagro 2004.

2.2.5 Cianuro total (TCN)

Se denomina así a todos los compuestos de cianuro existentes en una solución acuosa. Este es un término que se emplea en los procedimientos analíticos. El "cianuro total real" de una solución puede o no concordar con el "cianuro total" determinado por una técnica analítica particular. En la práctica, la cuantificación del cianuro total depende del método analítico empleado

2.2.6 Compuestos derivados del cianuro

Son compuestos esencialmente no tóxicos que proceden de las transformaciones de compuestos cianurados. Los más importantes son el tiocianato, el cianato, los iones nitrato, nitrito y el amoníaco.

a) **Tiocianato.**- El tiocianato (SCN^-) se forma por la reacción entre el ión cianuro, el oxígeno y sustancias que contienen azufre, resultando ser mucho menos tóxico que el cianuro. Los tiocianatos son más estables que los cianatos y que el ión cianuro en solución acuosa. El tiocianato puede degradarse lentamente debido a la acción de diversos microorganismos, los cuales lo oxidan formando amoníaco y sulfato. Ciertos organismos tienen la capacidad de utilizar el tiocianato como una fuente de nitrógeno, lo cual ocurre sólo después de agotarse todo el amoníaco disponible. Los mecanismos de descomposición química de este compuesto son lentos; además, el tiocianato es resistente a la fotodegradación (Smith y Mudder, 1991).

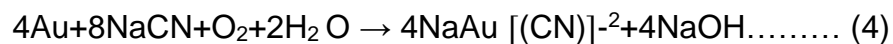
b) **Cianato.**- El cianato (CNO^-) es un producto generado durante el procesamiento de minerales, debido a la reacción entre el ión cianuro y el oxígeno, o durante el tratamiento de efluentes que contienen cianuro por medio de un agente oxidante como el peróxido de hidrógeno, el ión hipoclorito o algunos otros. El cianato es estable en condiciones básicas pero se descompone en medio ácido para generar iones amonio (Gómez, 2012).

c) **Amoníaco.**- A temperatura ambiente, el cianato y el tiocianato reaccionan lentamente con agua para formar amoníaco (NH_3), anión formiato y/o carbonato (Smith y Mudder, 1991). El NH_3 puede formar complejos metálicos con el cobre y el níquel, pero en las 10 concentraciones en las que se presenta en los efluentes del

procesamiento de minerales auríferos, no compite eficazmente con el cianuro o con el tiocianato como agente para la formación de complejos. El amoníaco libre es tóxico para la mayoría de los seres vivos. Este compuesto se volatilizará en el aire a un nivel elevado de pH, pero permanecerá en solución, al igual que el ión amonio, en condiciones neutras de pH.

2.2.7 Lixiviación de oro

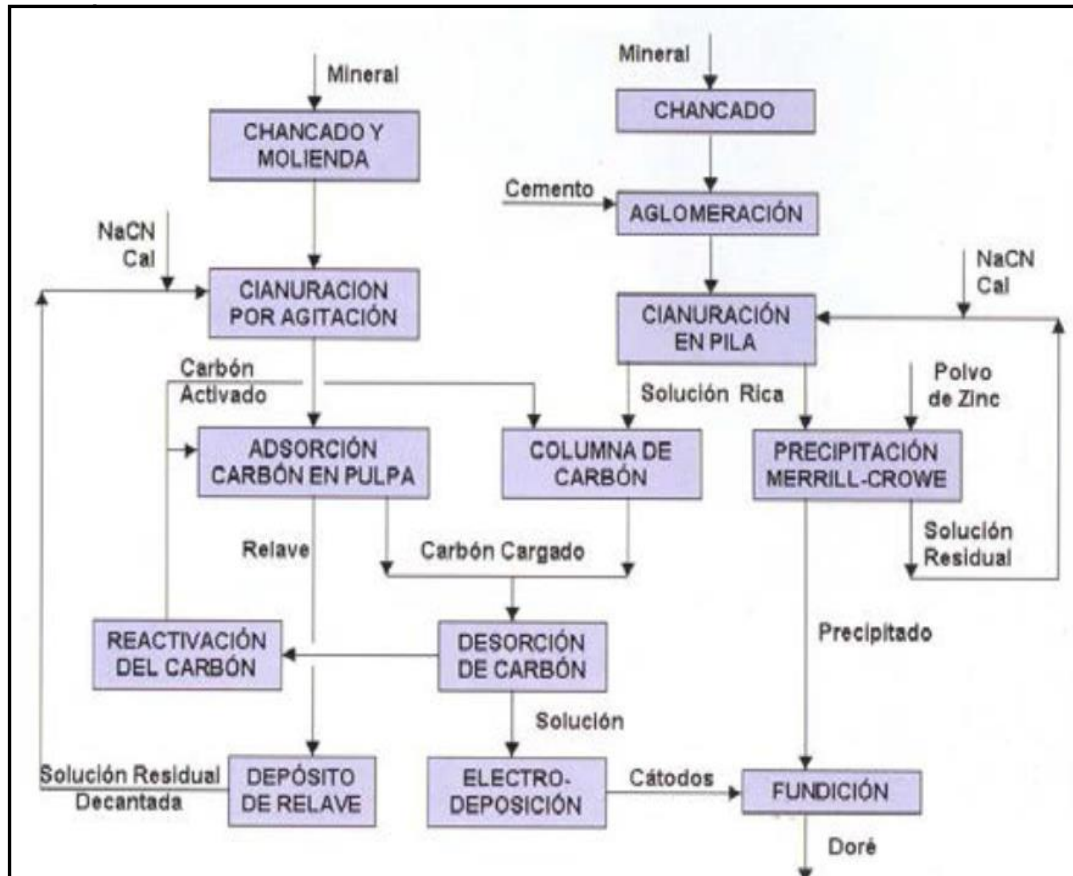
Tanto el oro como la plata metálicos pueden ser recuperados de los minerales por procesos de lixiviación que utilizan cianuro para formar complejos estables. Para ello se requiere un agente oxidante, según la siguiente ecuación general conocida como de Elsner.



El procesamiento de minerales auríferos al igual que otros procesos metalúrgicos se realiza en diversas etapas desde la preparación mecánica hasta la concentración del mineral .Durante el proceso de cianuración de minerales que contienen metales preciosos, se producen varias reacciones secundarias, los productos de estas reacciones aparecen en los efluentes de planta, con importantes consecuencias para el medio ambiente. Los constituyentes del mineral que participan en estas reacciones consumiendo cianuro, se denominan cianicidas (véase la figura 2.2).

FIGURA N° 2. 2

PROCESAMIENTO DE MINERALES AURÍFEROS



Fuente: *Metalurgia del oro Fidel Misari 2010.*

➤ **Lixiviación por tanques agitados**

También conocido como proceso CIP, carbón en pulpa, el circuito CIP comprende de tanques agitados en cascada a través de los cuales la pulpa fluye por gravedad. En cada tanque, la pulpa es contactada con carbón granulado que preferentemente adsorbe oro y plata a partir de la solución, según la pulpa fluye por un rebose de un tanque al siguiente, vía un tamiz estático, a través del cual el carbono granulado no puede pasar.

Periódicamente, una proporción del inventario es transferido al próximo tanque mediante bombeo con aire (air lift). El carbón cargado de oro y plata es extraído del tanque superior y subsecuentemente procesado en la sección de elución (desorción) de la planta para recuperar oro y plata. El carbón desorbido retorna al tanque que se encuentra en la parte más baja de la cascada para completar el ciclo del carbón. Debido a que la adsorción opera en contracorriente, el oro y plata en pulpa es reducido a muy bajos niveles.

La lixiviación generalmente requiere un tiempo de residencia mucho mayor que la adsorción. En consecuencia, es posible reducir la cantidad de equipo se usa en el proceso CIP (véase la figura 2.3).

FIGURA N°2. 3
PLANTA DE CIANURACIÓN EN CIP



Fuente: Minera Paraíso 2017.

2.2.8 Efluente cianurado

Los efluentes cianurados, son subproductos que se obtienen de los procesos de lixiviación de cianuro con metales pesados como Cu, Fe, Zn, Ni, As, Sb los cuales forman complejos al reaccionar con el cianuro llamase $\text{Cu}(\text{CN})_2^-$, $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-4}$ y otros más. El Fe es el elemento presente en los suelos y acuíferos, el equilibrio favorece formación de complejos tales como ferrocianuro $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{-4}]$ y ferricianuro $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3}]$. Además de la formación de complejos cianurados de metales pesados están de metales disociables y la formación de cianuro libre, como resultado de este proceso se forman compuestos derivados de cianuro tales como tiocianato, cianato, amoníaco

Los efluentes de cianuro tienen el potencial de influir negativamente en los suelos, aguas superficiales y subterráneas, debido a que el cianuro es un compuesto tóxico inhibidor del metabolismo celular. Por lo tanto los efluentes que contienen cianuro no pueden ser liberados al ambiente sin antes pasar por un tratamiento que reduzca sus contenidos a niveles permisibles (Arévalo, 2011).

2.2.9 Tecnologías de tratamiento de cianuro

Uno de los principales problemas que enfrenta el sector industrial en la extracción de metales preciosos como el oro, la plata y la producción metalúrgica, son las altas concentraciones de cianuro (cianuro libre, complejos débiles y fuertes de cianuro y tiocianato) empleado en sus

procesos y que forma parte de los efluentes que son desechados al ambiente sin haberse realizado un tratamiento adecuado. Se encuentran cuatro formas generales en el tratamiento para la atenuación del cianuro:

- Degradación natural
- Oxidación química
- Precipitación
- Biológico

A. Degradación natural

Uno de los principales mecanismos de degradación del cianuro se basa en los efectos generados por la luz solar, acompañado de otros factores importantes como la oxidación biológica y la precipitación. El principal mecanismo es la volatilización con posteriores transformaciones atmosféricas a sustancias químicas menos tóxicas.

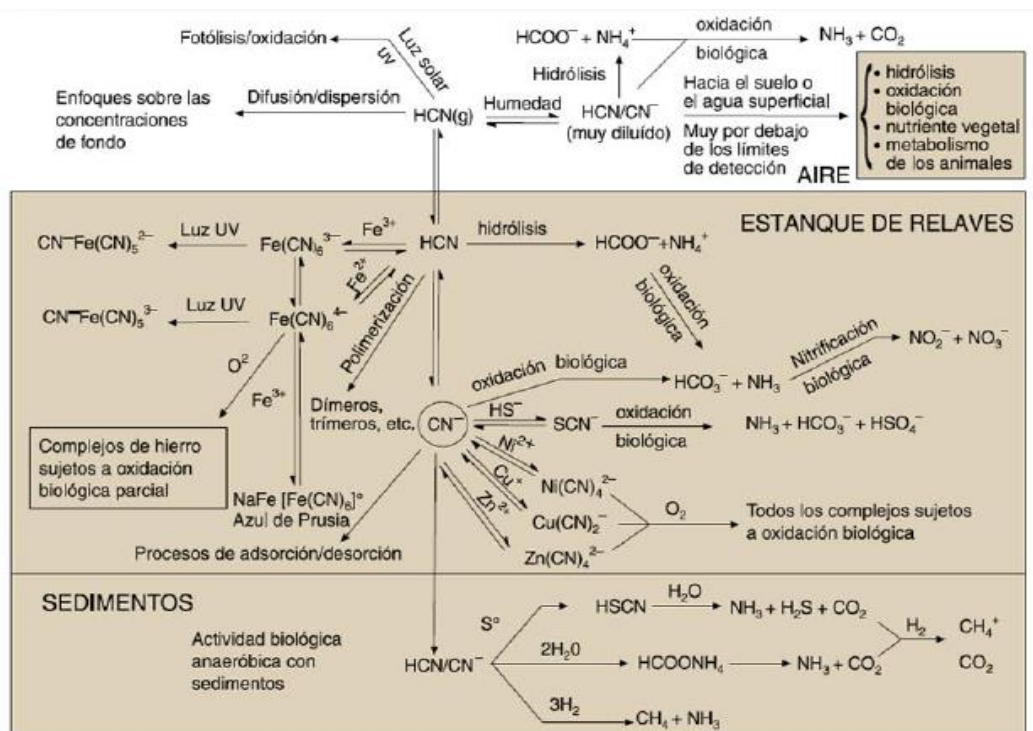
Este proceso es llevado a cabo en las empresas de extracción de metales mediante la instalación de relaveras, balsas o pozas de tratamiento, en donde las especies de cianuro pueden ser adsorbidas sobre las superficies de los minerales o del desecho de carbono orgánico en los suelos del terraplén del estanque. Sin embargo, existe un riesgo medioambiental latente por eventos como filtraciones o roturas que pueden producir una catástrofe; por este motivo, en la actualidad se

pretende que la reducción del contenido en cianuros de los efluentes del proceso sea antes del ingreso a las balsas.

En este tipo de tratamientos para la reducción del cianuro las velocidades reales de degradación deben determinarse mediante ensayos basados en la especificidad del emplazamiento y empleando condiciones que imiten, tanto como sea posible, los tipos de soluciones y los procesos naturales que probablemente ocurran en ese lugar. El proceso de degradación natural se fundamenta en el ciclo del cianuro con respecto a las condiciones medioambientales (vease la figura N°2.4).

FIGURA N°2.4

CICLO CIANURO Y SUS COMORTAMIENTOS EN RELAVES



Fuente: Smith y Mudder, 1991.

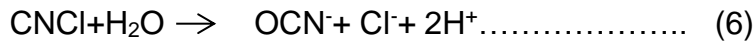
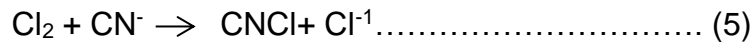
B. Oxidación química

Los efluentes industriales mineros contienen típicamente concentraciones entre 0,1 a 100 mg/L de CNT, mientras que en efluentes de industrias galvanoplásticas pueden encontrarse concentraciones de cianuro entre 0,1 a 1000 mg/L de CNT (Patil y Kulkarni, 2008).

Diversas técnicas se han aplicado para el tratamiento de residuos que contienen cianuro, los métodos más abundantes son los físicos y químicos. Estos métodos incluyen el proceso Clorinación alcalino, SO_2 / mezcla de aire (proceso de INCO), la oxidación de peróxido de hidrógeno catalizada por cobre, ozonización, la precipitación de hierro, y la descomposición electrolítica (Akcil et al., 2003), a continuación describiremos algunos de ellos.

a) Proceso de clorinación alcalina

Cloración alcalina, o cloración, al mismo tiempo fueron los más ampliamente aplicado de los procesos de tratamiento de cianuro, pero ha sido poco a poco sustituidos por otros procesos y ahora se utiliza sólo ocasionalmente. La cloración alcalina es eficaz en el tratamiento con cianuro a niveles bajos, pero el proceso puede ser relativamente costoso de operar debido a los altos usos de reactivos. La reacción de destrucción de cianuro es de dos etapas, la primera etapa en la que se convierte en cianuro cloruro de cianógeno (CNCl) y el segundo paso en el que el cloruro de cianógeno hidroliza para producir cianato.



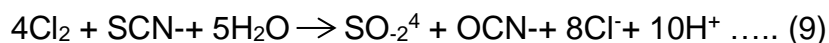
En presencia de un ligero exceso de cloro a pH alcalino, cianato es más hidrolizado para producir amoníaco en una reacción catalítica:



Si suficiente exceso de cloro está disponible, la reacción continúa a través cloración punto de interrupción, en el que el amoníaco se oxida a nitrógeno gaseoso (N₂). La eliminación completa de amoníaco a partir de soluciones es una ventaja principal del proceso de cloración alcalina:



Además de reaccionar con cianuro, cianato y el amoníaco, la cloración alcalina proceso será preferentemente oxidar tiocianato, que de algunos casos pueden conducir a altos consumos de exceso de cloro. Es la eliminación de amoniaco y tiocianato que hace que este proceso de tratamiento de cianuro único en comparación con otros procesos de oxidación-químico:



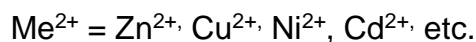
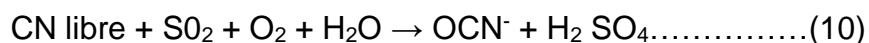
b) Proceso con so₂/ aire

En el proceso con SO₂/Aire, el cianuro libre y el cianuro DAD se oxidan y el cianuro de hierro se precipita como un sólido insoluble. El proceso

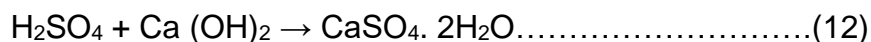
puede aplicarse a soluciones o lodos y la reacción es rápida. Las posibles limitaciones son la necesidad de obtener una licencia para utilizar el proceso, el costo de construcción de una planta procesadora, la necesidad de realizar ensayos empíricos para optimizar el sistema y la incapacidad del proceso para oxidar subproductos intermedios del cianuro.

Las ecuaciones básicas de este proceso se pueden resumir en las siguientes:

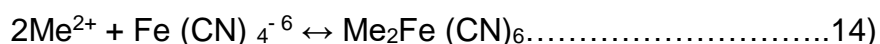
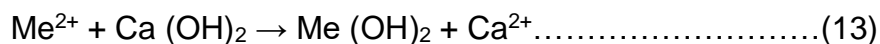
➤ Oxidación



➤ Neutralización



➤ Precipitación



c) Proceso con peróxido de hidrógeno (H₂O₂)

El peróxido de hidrógeno es un potente oxidante, oxida el cianuro libre y el cianuro WAD y los convierte en amonio y carbonato. Los cianuros de hierro no se oxidan mediante el peróxido, pero precipitan como sólidos insolubles y estables. Algunas veces es necesario añadir sustancias químicas para controlar la concentración de cobre en las soluciones con el

fin de cumplir con las normas ambientales. El sistema con peróxido no se adapta bien al tratamiento de lodos debido a los irregulares requerimientos de peróxido de hidrógeno cuando hay sólidos presentes.

Ambos métodos de oxidación química son capaces de producir concentraciones residuales de cianuro que pueden satisfacer exigentes normas de descarga. Ambos procesos exigen la realización de pruebas en muestras representativas de materiales específicos al sitio antes del diseño final de la planta. El ácido de Caro, que combina ácido sulfúrico con peróxido de hidrógeno para formar H_2SO_5 , también se emplea como agente oxidante para descomponer el cianuro en solución.

C. Precipitación

La finalidad de este tratamiento es reducir la concentración de cianuro libre a través del agregado deliberado de complejantes como el hierro. Los cianuros de hierro generados como producto de la reacción pueden reaccionar con otras sustancias químicas en solución y producir precipitados sólidos que pueden contener varias sustancias insolubles del cianuro. Es así que parte del cianuro de las soluciones de los procesos reaccionará con otros componentes químicos que se encuentren dentro del sistema y formarán concentraciones mucho menos tóxicas de compuestos tales como el amoníaco, el nitrato y el dióxido de carbono.

D. Procesos biológicos

En comparación con la degradación natural y los métodos fisicoquímicos, los tratamientos biológicos son más rápidos, económicos y eficientes ya

que requieren poco capital, bajos costos operativos y no produce productos intermediarios tóxicos (Akciil et al., 2003; Dash et al., 2008; Nelson et al., 1998). En el cuadro 2.3 se resume los beneficios y aplicaciones del tratamiento biológico.

CUADRO N° 2.3

VENTAJAS Y DESVENTAJAS RELACIONADOS LA DEGRADACIÓN BIOLÓGICA DEL CIANURO

Tratamiento	Ventaja	Desventaja	Remueve			Tratamiento adicional
			CN ⁻	SCN ⁻	CN ⁻ (WAD)	
Oxidación biológica /Biodegradación	Aprovecha un proceso natural. Puede tratar CN ⁻ sin generar otro tipo de desecho. No requiere el uso de químicos o controles extensos. El costo es fijado por el volumen a tratar. Es amigable con el ambiente	La tecnología no está totalmente establecida. Requiere la combinación de la metalurgia, biología y procesos de ingeniería. Se requieren evaluaciones y estudios específicos para cada tipo y sitio. No remueve concentraciones altas	SI	SI	SI	NO

Fuente: Dash et al , 2008

Las transformaciones biológicas envuelven procesos de biodegradación y asimilación del cianuro en formas de aminoácidos, tiocianato, β -cianolanina y vitaminas por plantas y microorganismos (Gupta et al., 2010). La biodegradación hace referencia a las reacciones que convierten el cianuro a moléculas orgánicas o inorgánicas más simples, las cuales pueden ser fácilmente metabolizadas a amonio y dióxido de carbono o metano. Muchas especies microbianas (bacterias, hongos y algas) y las plantas pueden desintoxicar cianuro para el medio ambiente niveles aceptables y al menos dañinos subproductos (Akcil, 2003; Akcil y Mudder, 2003; Akcil et al., 2003; Trapp et al., 2003; Gurbuz et al., 2004).

Con los procesos biológicos de crecimiento adjunto, biodegradación se produce en un fijo medios sólidos, por ejemplo, en un contactor giratorio biológica (RBC) o goteo filtrar. Periódicamente, Slough biomasa procedente de los medios de comunicación sea que arrastrados por el efluente. Sistemas de crecimiento adjuntos se utilizan generalmente con baja constituyente influente los niveles para evitar la sobrecarga de los medios de comunicación con la biomasa. Con los procesos biológicos de crecimiento suspendido, biodegradación se produce un sistema suspendido de lodos, similar a una suspensión de lechada. La biomasa de desechos se retira como flujo inferior de un clarificador, con la mayoría de la biomasa de reciclados clarificador a la corriente de agua de alimentación. Los sistemas de cultivo en suspensión son usados

generalmente con niveles más altos constituyentes del afluente, debido a la mayor tasa de crecimiento de la biomasa.

2.2.10 Vías de biodegradación de cianuro

Existen diversas rutas para hacer menos compleja a esta molécula de cianuro. Hay cuatro vías generales para la biodegradación de cianuro libre: hidrolítica; oxidativo; reductora; y sustitución / transferencia.

Una primera ruta involucra la enzima cianuro hidratasa, que resulta en la conversión irreversible del cianuro en formamida, que finalmente es transformada en CO_2 y en el grupo NH_3 .

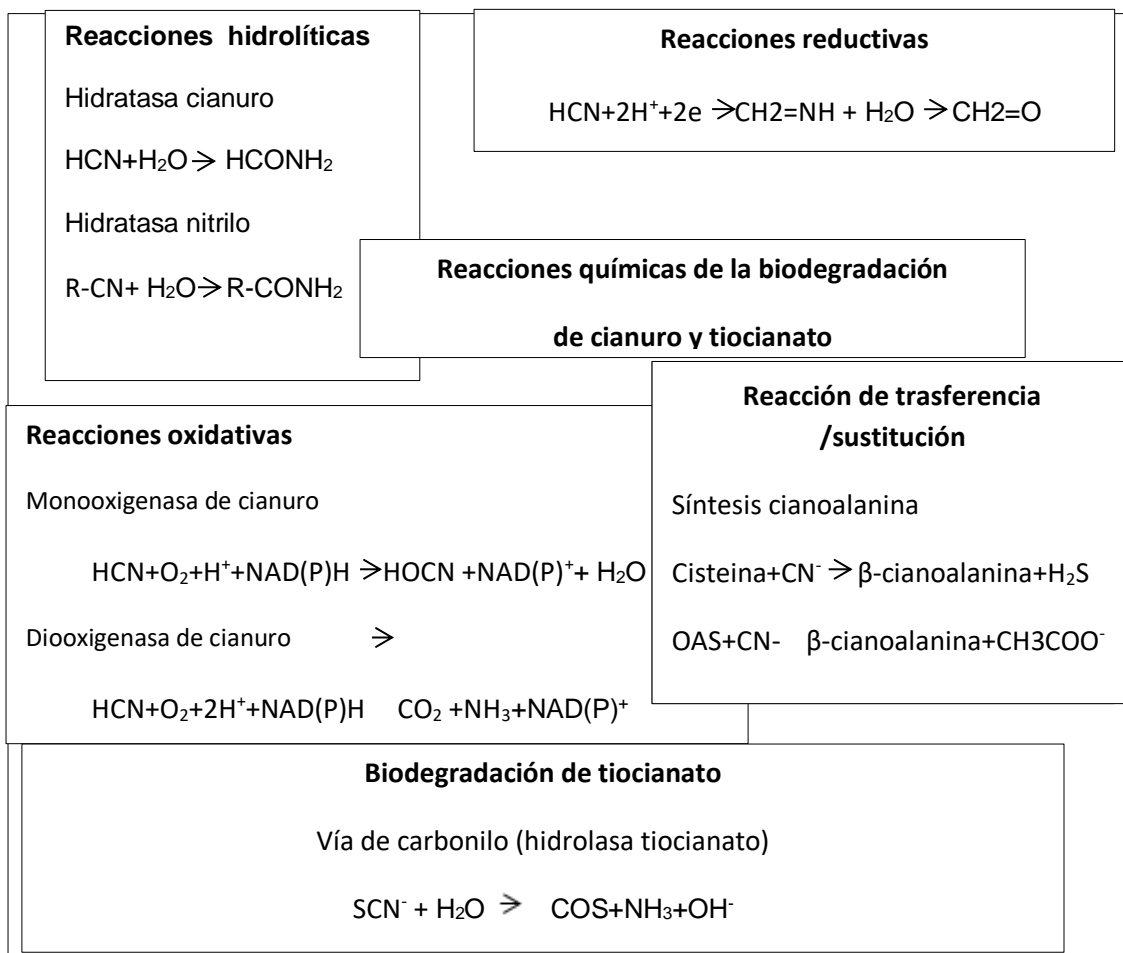
Una segunda ruta involucra el cianuro también puede ser convertido en cianoalanina o en un aminonitrilo por la enzima cianoalanina sintetasa, seguida de la hidrólisis de los productos para liberar un ácido y amoníaco (NH_3 .)

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

Vías de degradación son sensibles a la forma y concentración del compuesto de cianuro, las condiciones físico-químicas de los medios de

comunicación, y la presencia de interferencia y los compuestos inhibidores. El desarrollo de estrategias de biodegradación de estas variadas condiciones requiere una comprensión global de los procesos biológicos. Varias revisiones han descrito estas vías y los organismos en los que se encuentran. Las vías de biodegradación de cianuro y nitrilo (véase la figura N° 2.5).

FIGURA N°2. 5
BIODEGRADACIÓN DE CIANURO Y NITRILOS

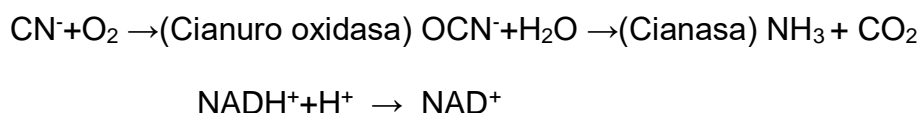


Fuente: Stephen et al , 2004

Se ha logrado la adaptación de algunos sistemas biológicos a altas concentraciones de cianuro, como es el caso de *Pseudomonas fluorescens*, la cual involucra la oxidación de cianuro por la siguiente ruta metabólica (Suh et al.,1994), *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus cereus* y *Bacillus pumillus* producen reacciones enzimáticas oxidativas de cianuro dioxigenasa descrita a continuación (véase la figura N° 2.6).

FIGURA N°2. 6

RUTA METABOLICA OXIDATIVA DE CIANURO CON PSEUDOMONAS FLUORESCENS



Fuente: Suh et al., 1994

En la biodegradación de cianuro, este compuesto supone tanto una fuente de carbono como de nitrógeno, aunque en la mayoría de los casos es empleado como fuente de nitrógeno. A pesar de la variedad de rutas degradativas todas dan como producto final al amonio (compuesto nitrogenado fácilmente asimilable por microorganismos) en el proceso de conversión.

2.2.11 Biorremediación del cianuro

En el proceso de biorremediación implica el uso de microorganismos y su capacidad de biodegradación para eliminar los contaminantes (Atlas y Pramer 1991). Los subproductos de la biorremediación efectiva, como el

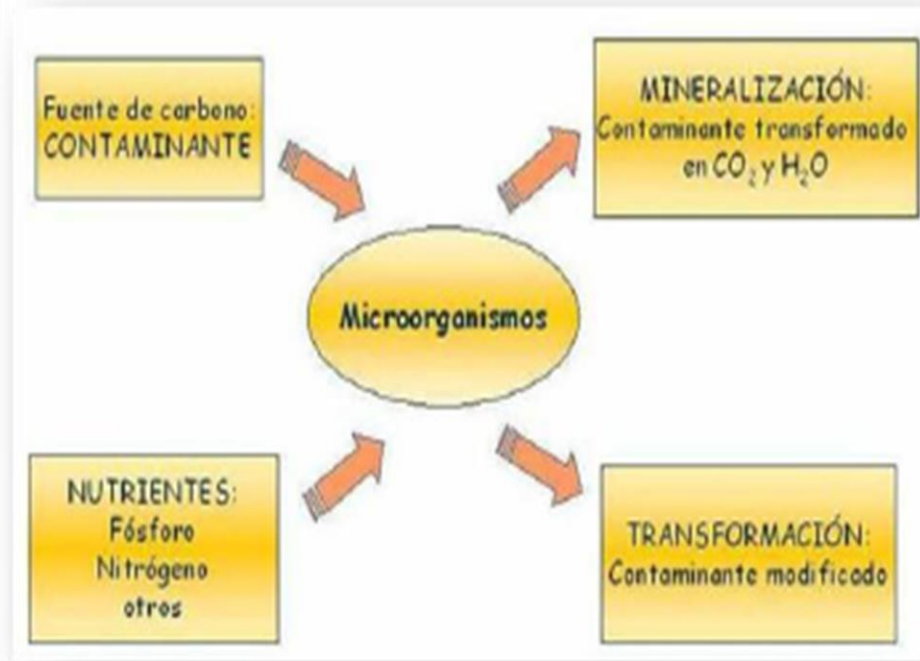
agua y el dióxido carbono, son no tóxicos y se pueden acomodar sin daño para el medio ambiente y los seres vivos.

Uso de biorremediación tiene muchas ventajas, esta su diseño simple y la facilidad de controlar el proceso operativo, la capacidad para tratar todas las formas de cianuro, el amplio rango de microorganismos que pueden metabolizar el contaminante, la facilidad de trabajar a través de cultivos puros o en ciertas ocasiones de forma mixta, ya que actúan de manera comensal y por último sus procesos no provocan daños, puesto que no se añaden sustancias químicas en el medio.

Las posibles limitaciones son su reducido rendimiento con temperaturas frías y con concentraciones muy altas de cianuro.

Las bacterias, hongos y virus empleados en procesos de biorremediación ingieren contaminantes como fuente de carbono y algunos nutrientes como fósforo y nitrógeno y al ser metabolizados son degradados de manera parcial o total como se muestra a continuación:

FIGURA N° 2. 7
METABOLISMO MICROBIANO



Fuente: Argenbio. 2006.

En los procesos de biorremediación los microorganismos más utilizados son las bacterias, ya que se las considera como "los seres vivos con mayor capacidad metabólica del planeta, que pueden degradar prácticamente cualquier sustancia orgánica", además que tienen la capacidad de adaptarse a ambientes aeróbicos y anaeróbicos. Algunas ventajas de estos tratamientos son:

- La destrucción de todas las formas de cianuro.
- No se da inhibición en la degradación por la presencia de metales pesados.

Las especies de pseudomonas degradadora cianuro (véase el cuadro N° 2.4).

CUADRO N° 2.4
PSEUDOMONAS DEGRADADORAS DE CIANURO

Compuesto a ser removido	Microorganismo	Parámetros dependientes			Referencias
		Concentración	pH	T °C	
Cianuro WAD	<i>Pseudomonas sp.</i> (CM5, CMN2)	100-400 mg/L	9,2-11,4	30	Akcil <i>et al.</i> , 2003
Cianuro de Potasio	<i>Fusarium solani</i>	0,5-0,8 mM	9,2-10,7	30	Dumestre <i>et al.</i> , 1997
Complejo cianuro ferroso (II)	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	4,0-7,0	25-35	Dursun y Akzu, 2000
Complejo cianuro ferroso (II)	<i>P. fluorescens</i>	100 mg/L	5,0	25	Dursun <i>et al.</i> , 1999
Cianuro de Potasio	<i>Klebsiella oxytoca</i>	0,58 mM	7,0	30	Kao <i>et al.</i> , 2003
Nitrilos	<i>K. oxytoca</i>	25-100 mM	7,0	30	Kao <i>et al.</i> , 2006
Cianuros	<i>Cultivo mixto</i>	20 mg/L	7,0	22	White y Schnabel, 1998
Cianuro de sodio	<i>Pseudomona putida inmovilizada</i>	100-400 mg/L	6,7	25	Babu <i>et al.</i> , 1992

Fuente: Dash *et al.*, 2008

a) Bacterias degradadoras de cianuro

Las principales bacterias a las cuales de las considera degradadoras el cianuro podemos mencionar a la *E. coli*, *Pseudomonas Fluorescens*, *Citrobacter*, *Bacillus Subtilis* *Pichiaohmeri*, *Exophialas sp*, *Candidas sp*, *Staphilococcus sp*. Las características principales de estas bacterias es

que en su mayoría son unicelulares y más pequeñas que los hongos, redondas o bacilares, motiles, etc. Según resultados de algunas investigaciones, los microorganismos aerobios presentan un porcentaje mayor de remoción. A continuación presentamos las bacterias empleadas en investigaciones y los compuestos que han degradado:

Pseudomonas Fluorescens se destaca dentro de todas las bacterias degradadoras de cianuro, ya que resiste a condiciones desfavorables y se acopla fácilmente a los diferentes factores del medio en lo que se refiere a la degradación del cianuro.

b) *Pseudomonas* como agentes de control ambiental y de biorremediación

Algunos miembros del género *Pseudomonas* pueden metabolizar agentes contaminantes químicos en el ambiente, y consecuentemente pueden ser utilizados para procesos de biorremediación. Su diversidad nutricional y por lo tanto su dotación enzimática, hace de estas bacterias un grupo importante ecológicamente, dado que son probablemente responsables de la degradación aeróbica de muchos compuestos en los diferentes ecosistemas, algunos de ellos tóxicos para otros organismos acompañantes (Macfaddin, 1980; Breed, 1997). Es así que estudios realizados determinan las siguientes especies idóneas para la degradación biológica de ciertos compuestos.

- ✓ *P. alcaligenes*, que puede degradar hidrocarburos aromáticos policíclicos.
- ✓ *P. mendocina*, degrada tolueno.
- ✓ *P. pseudoalcaligenes* puede utilizar cianuro como fuente de nitrógeno
- ✓ *P. resinovorans*, degrada carbazol (compuesto orgánico heterocíclico empleado en tratamiento de enfermedades microbianas y fúngicas).
- ✓ *P. veronii* se ha demostrado que puede degradar una variedad de compuestos aromáticos simples
- ✓ *P. putida* tiene la capacidad de degradar solventes orgánicos como por ejemplo el tolueno. Esta bacteria puede tetracloruro de carbono.

c) Taxonomía

Con el avance de la bioquímica y la genética, análisis recientes de las secuencias del RNAr 16S han definido la taxonomía de muchas especies bacterianas y como resultado, el género *Pseudomonas* incluyen algunas cepas clasificadas anteriormente dentro de las *Chryseomonas* y *Flavimonas*. Otras cepas clasificadas previamente en el género *Pseudomonas*, ahora son agrupadas en los géneros *Burkholderia* y *Ralstonia*. El género demuestra una gran diversidad metabólica, y consecuentemente son capaces de colonizar un amplio rango de nichos.

Son de fácil cultivo in vitro y ampliamente están disponibles en número, por lo que ciertas cepas son empleadas en investigaciones científicas, como por ejemplo, *P. aeruginosa* y su rol como patógeno oportunista de

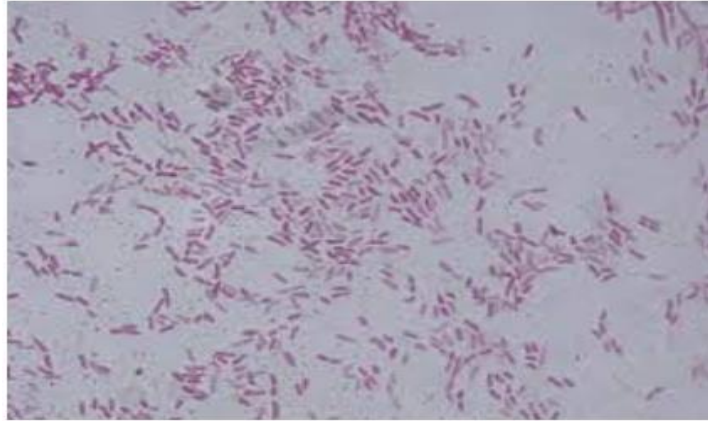
humanos, el patógeno de plantas *P. syringae*, la bacteria de tierra *P. putida* y la *P. fluorescens* que promueve el crecimiento de plantas y la biodegradación de cianuro en las minas de extracción aurífera.

d) Morfología y Estructura

Las Pseudomonas bacilos Gram Negativo, rectos o curvados no vibriodes, sin esporas, vainas, ni apéndices, con flagelos polares, son organismos aerobios organográficos sin metabolismo fermentativo que dependen de reacciones de óxido reducción para obtener energía y utilizan sustancias oxidantes a pH neutro o básico. Su diámetro se encuentra entre 0.7-0.8 μm .

Su diámetro se encuentra entre 0.7-0.8 μm , Se reproducen a temperaturas mesófitas (entre 25 y 30°C); presentan gran capacidad para utilizar una diversidad de nutrientes como donadores y aceptores de electrones, haciéndolos nutricionalmente muy sencillos y permitiéndoles una amplia distribución en la naturaleza. Arrojan resultados positivos en pruebas bioquímicas como Oxidasa y Catalasa.(Macfaddin, 1980; Breed, 1997) (véase la figura N°2.8).

FIGURA N°2. 8
MORFOLOGÍA DE PSEUDOMONAS



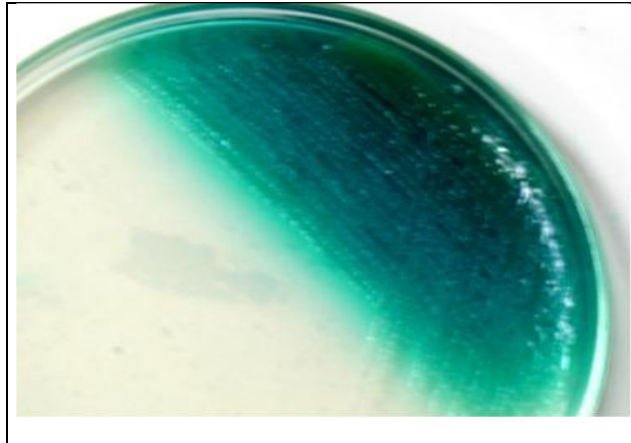
Fuente: Elaboración Propia

e) Reproducción

Se reproducen a temperaturas mesófitas (entre 25 y 30°C); presentan gran capacidad para utilizar una diversidad de nutrientes como donadores y aceptores de electrones, haciéndolos nutricionalmente muy sencillos y permitiéndoles una amplia distribución en la naturaleza.

Las bacterias de este género se caracterizan por crecer en medios simples. En caldo crecen abundantemente formando un anillo y un sedimento de color verde azulado. En agar simple forman colonias brillantes, confluentes, de borde continuo y a veces ondulado con un centro opaco. El pigmento (piocianina) se difunde en el medio dándole una tonalidad verdosa (vease la figura N°2.9):

FIGURA N°2. 9
PSEUDOMONAS EN PRUEBA DE PIOCIANINA



FUENTE: Vallejo et al ,2010.

f) Metabolismo

Al tratarse de microorganismos aerobios, usan oxígeno como aceptor de electrones, sin embargo existen unos pocos que no lo usan. Presentan una versatilidad metabólica muy grande que les permite utilizar como fuente de carbono como substratos muy variados (hay especies, como *Pseudomonas cepacia*, que pueden utilizar como nutrientes más de 100 compuestos químicos diferentes. Por otra parte, hay algunas especies quimiolitótrofas usando H₂ o CO como donadores de electrones.

g) Patogenicidad

De las numerosas especies de *Pseudomonas*, sólo unas pocas tienen importancia en patología humana. *Pseudomonas mallei* P., *pseudomallei* causan enfermedad severa en el hombre pero se aíslan raramente en el

Hemisferio Occidental. Por otra parte *P. cepacia* es un oportunista poco frecuentemente asociado con enfermedades en el hombre.

La especie *Pseudomonas aeruginosa*, es la más estudiada por su frecuencia en patología humana. Es muy versátil, ampliamente extendida en el suelo, agua, plantas e intestino de animales. Causa enfermedades en el hombre, ciertos animales, plantas e insectos.

Puede sobrevivir y replicarse en medios húmedos de hospitales, incluso en aguas termales. La identificación de esta especie se lo hace por la producción de piocianina y produce un pigmento conocido como pioverdina.

2.2.12 Aplicaciones

La aplicación de métodos biotecnológicos en la minería de oro, plata, cobre etc., suelen ser más baratos que las tecnologías convencionales, por ejemplo, en la desintoxicación de efluentes, las bacterias se han venido utilizando en la minería de cobre y oro en Chile, India, Ghana, Uzbekistán y Australia; al menos 34% del cobre y el 15% del oro producido en el mundo proviene de estos países (Ginebra: Trade map ; 2016).

Numerosas pruebas de laboratorio han demostrado la capacidad de los microorganismos en la biodegradación y biosorción. Sin embargo, su éxito depende de condiciones físicas y químicas estables que en condiciones de campo son fluctuantes como: pH, concentración del

contaminante, la presencia de sólidos, entre otras (Perenguez B, Valdez C; 2017) .

“El primer tratamiento biológico de eliminación de cianuro a escala industrial se llevó acabo hace 20 años en Estados Unidos, en la mina Homestake desarrollado por Mudder y Whitlock en 1984. A partir de éste año, los procesos de degradación biológica son considerados una alternativa económica y efectiva.

Una publicación del 20 de julio del 2009 la UCO (Grupo de Metabolismo Microbiano del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Córdoba), publica el diseño de un reactor biológico que elimina el cianuro a partir de la bacteria *Pseudomonas pseudoalcaligenes* *CECT 5344* que ha aislado una estirpe mutante de la bacteria mencionada que soporta concentraciones de cianuro cinco veces superiores a las que resiste la estirpe silvestre, que puede combatir unos 0,2 gramos de cianuro por cada litro de desecho. Su trabajo ha sido calificado como "Proyecto de Excelencia" por la Consejería de Innovación de la Junta y además recibe el apoyo de la empresa cordobesa Gema sur, que trata los residuos de joyería y se ha encargado de suministrarlos a los científicos. En el cuadro 2.5 muestra las aplicaciones de la biorremediación.

CUADRO N° 2.5
APLICACIONES DE LA BIORREMEDIACIÓN

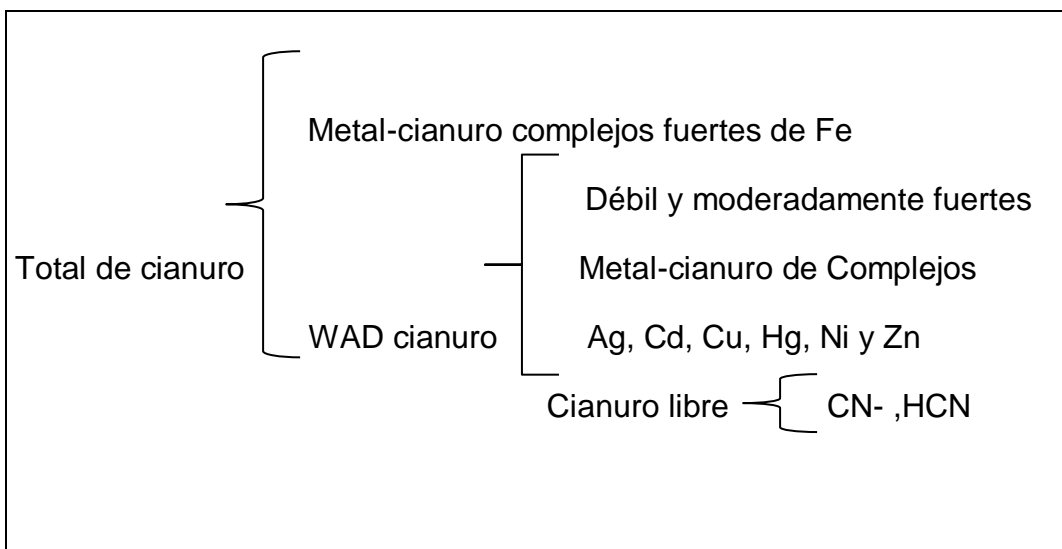
Tipo de remediación	Lugar	Contaminante	Nivel de degradación	Duración de tratamiento	Autor
Adición de aceptores de electrones (perclorato de hierro III , nitrato de hierro III, peróxido de hidrogeno).	Suelo contaminado artificialmente	Diésel	>99%	1 hora	Watts y Dilly (1996)
Adición de aceptores de electrones sulfato de hierro III y perclorato de hierro.	Suelo contaminado artificialmente	Pentaclorofenol	70-80%	1horas	Watts y Dilly (1996)
Bioamentación con un cultivo mixto de bacterias.	NR	Derrame de aceite contaminado con hidrocarburos polinucleares aromáticos y alifáticos.	NR	10 semanas	Dott <i>et al</i> (1995)
Bioreactores	Fábrica de pesticidas	Compuestos orgánicos clorados	20-90%	300 días	Dott <i>et al</i> (1995)
Bioreactores con adición de Pseudomonas	Fábrica de herbicidas Arkanxas EUA	Compuestos orgánicos clorados	100%	14 horas	Finn(1983)
Bioreactores , nivel de laboratorio	Fábrica de BPCs, Checoslovaquia	BPCs	70-94%	22 días	Kastanek <i>et al</i> (1995)

Fuente: Rittmann, 2001.

2.2.13 Análisis de cianuro

➤ Las tres clases de cianuro son: el cianuro total; de cianuro WAD; y de cianuro libre, como se muestra en la Fig. 2.13. Cada una de estas formas de cianuro tiene específicas metodologías analíticas para su medición, y es importante que la relación entre estas formas se entienda la hora de analizar contenido de soluciones de cianuro, para una solución dada el nivel total de cianuro es siempre mayor que o igual que el nivel de cianuro WAD, y asimismo, el nivel de cianuro WAD es siempre mayor que o igual a la concentración de cianuro libre.

FIGURA N° 2. 10
CLASIFICACION GENERAL DE COMPUESTOS DE CIANURO



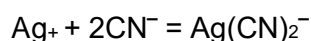
Fuente: Akcil et al , 2003.

El enfoque adecuado para evaluar la calidad de las muestras de agua en la mayor partes analizar las situaciones de cianuro WAD ya que este

incluye el punto de vista toxicológico formas ambientalmente importantes de cianuro, incluyendo cianuro libre y moderadamente y débilmente acomplejado cianuros metálicos. Cianuro total incluye cianuro libre, cianuro WAD más la relativamente no tóxica de hierro-cianuro complejos. Caracterización completa de una solución de cianuro generalmente incluye los análisis de pH, cianuro total, cianuro, tiocianato, cianato, amoníaco, nitrato, nitrito y metales básicos tales como cobre, hierro, níquel y zinc. Sólidos totales disueltos (TDS) y el potencial de oxidación-reducción (ORP).

a) Determinación de cianuro libre (CN⁻) por método volumétrico

La cuantificación del cianuro se realizó mediante un análisis volumétrico, siguiendo la metodología descrita por Nava *et al.*, 2007. La técnica se basa en la reacción del nitrato de plata (AgNO₃) con el ión cianuro en solución alcalina (pH≥11) para formar el complejo soluble Ag(CN)₂⁻ según la reacción:



Cuando no queda más cianuro en solución, el exceso de plata precipita como AgCN o reacciona con el indicador yoduro de potasio (KI) para formar AgI. En ambos casos, el punto final de la titulación lo proporciona la aparición de una turbidez permanente, blanca o amarillo opalescente. El análisis volumétrico del CN⁻ se realizó por duplicado.

A. Reactivos:

- Solución indicadora de yoduro de potasio al 5%: Disolver 5 g de KI en 95 ml de agua destilada.
- Solución estándar de nitrato de plata: Disolver 0,6522 g de AgNO_3 en agua y aforar a un litro. Mezclar bien. Guardar en botella oscura y proteger de la luz.
- Solución de hidróxido de sodio 1 M: Disolver lentamente y con cuidado 4 g de NaOH en agua destilada, esperar a que se enfríe y aforar a 100 mL.

B. Procedimiento:

1. Verificar que las muestras a las que se va a medir el cianuro estén alcalinas ($\text{pH} > 11$). Si no es el caso, adicionar gotas de la solución de NaOH 1 M.
2. Verter con una pipeta volumétrica 10 ml de la muestra en un vaso de precipitado y adicionar tres gotas del indicador KI al 5%.
3. Titular con la solución estándar de nitrato de plata hasta cambio de color de transparente incoloro a amarillo claro opaco si está utilizando.
4. Registrar el volumen de solución utilizado.
5. Repetir el análisis en blanco (utilizando agua destilada como muestra).

C. Interpretación:

1 mL de la solución de nitrato de plata equivale a 20 mg/L de cianuro cuando se toma una alícuota de 10 ml de la muestra problema.

D. Cálculos:

$$\text{Concentración de cianuro (mg/L)} = (A - B) \times 20$$

A = mL de nitrato de plata empleados en titular 10 mL de la muestra problema.

B = mL de nitrato de plata empleados en titular 10 mL de agua.

b) Determinación de Cianuro ácido débil separable (WAD) y total por método colorimétrico

La cuantificación del cianuro ácido débil separable (total) se realizó mediante un análisis volumétrico, siguiendo la metodología descrita por Apha *et al.*, 1992.

1. Discusión general

El cianuro de hidrógeno (HCN) es liberada desde un ligeramente acidificada (pH 4.5 a 6.0) muestra bajo la destilación condiciones prescritas. El método no recuperar CN^- desde apretados complejos que no serían susceptibles a la oxidación por el cloro. El buffer acetato usado contiene sales de zinc para precipitar el cianuro de hierro como un ulterior testimonio de la selectividad del método. En otras respectos el método es similar a 4500-CN- .C.

2 .Ver interferencias

Ver 4500-CN- .B.3.

Proteger la muestra y un aparato de luz ultravioleta para evitar foto descomposición de algunos complejos metal-cianuro y un aumento en la concentración de ácido débil separable cianuro.

Si el procedimiento se utiliza para determinar bajas concentraciones de cianuro en muestras de ferri y ferrocianuro, añadir más, por ejemplo, cinco veces el exceso de solución de acetato de cinc, antes de agregar el ácido y la destilación.

3. Aparato

Véase la sección 4500-CN-.C.2 y la figura 4500-CN-:1, y también la sección 4500-CN- .D.2, 4500-CN- .E.2, o 4500-CN- .F.2, dependiente sobre el método de estimación.

4. Los reactivos

- a. Reactivos enumerados en la sección 4500-CN-. C.3.
- b. Reactivos enumerados en la sección 4500-CN-. D.3, 4500-CN-. E.3 o 4500-CN-.F.J, según el método de estimación.
- c. Ácido acético, 1 + 9: Mezclar 1 volumen de ácido acético glacial con 9 volúmenes de agua.

d. Buffer acetato: disolver 410 g de acetato de sodio trihidratado ($\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) en 500 mL de agua. Añadir ácido acético glacial para ofrecer una solución de pH 4,5 (aproximadamente 500 mL).

e. Solución de acetato de cinc, 100 g/l: Disolver 120 g $\text{Zn}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en 500 mL de agua. Diluir 1 L.

f. El indicador rojo metilo .

5. Procedimiento

Siga el procedimiento descrito en 4500-CN- .C.4, pero con las siguientes modificaciones:

a. No agregue Sulfamic Acid, puesto que el NO_2 y NO_3^- • No interferir.

b. En lugar de H_2SO_4 y los reactivos de MgCl_2 , añadir 20 mL de cada uno de los buffer acetato y soluciones acetato de zinc a través del tubo de admisión de aire. También añadir 2 a 3 gotas de indicador de rojo de metilo. Enjuague el tubo de admisión de aire con agua y deje que la mezcla de aire contenido. Si la solución no es rosa, añadir el ácido acético (1 + 9) gota a gota a través del tubo de admisión de aire hasta obtener un color rosa persiste.

c. Siga las instrucciones a partir de 4500-CN- .C.4d.

d. Para determinar CN⁻ en la solución de absorción, utilice el método finish (4500-CN- .D, E o F).

2.2.14 Análisis Factorial

El análisis factorial es una técnica de reducción de datos que sirve para encontrar grupos homogéneos de variables a partir de un conjunto numeroso de variables.

El diseño experimental utilizado es del tipo: Diseño central compuesto (octogonal), que está conformado por una factorial 2^n (cuadrilátero de radio 1 y centro en el origen) al que se le agrega el diseño estrella 2^n (rotación del factorial hasta que el vértice del cuadrilátero coincida con las coordenadas) y las consiguientes pruebas al centro para análisis del error experimental, otras pruebas son el centro para determinar el error se tiene que $\alpha=1.4142$. La ventaja de usar el diseño central compuesto es que se logra estudiar valores menores que el rango mínimo y mayores que el rango máximo elegidos.

Podemos indicar que los valores -1 y +1 corresponden a los niveles inferior y superior de un rango de experimentación encontrada bien sea por investigación de referencias especializadas en el proceso estudiado o por experiencia propia.

Los puntos estrella $-2k/4$ y $+2 k/4$ son puntos por fuera del rango y se incluyen con propósitos exploratorios. El punto central con valor cero representa un nivel en el proceso con el que se supone se obtiene buenos resultados.

2.3 Términos Básicos

- **Efluente de cianuro.-** El efluente de cianuro, se obtienen de los procesos de lixiviación de minerales auríferos, los productos de estas reacciones aparecen en los efluentes de planta, con importantes consecuencias para el medio ambiente.
- **Compuestos simples de cianuro.-** Son compuestos iónicos que se disocian directamente en el agua liberando un catión y un anión que contiene al ión cianuro. El anión, denominado complejo, puede seguir disociándose, produciendo en última instancia un catión y varios iones cianuro por ejemplo, el $\text{Cu}(\text{CN})_3^{-2}$ o triciano cuprito.
- **Cianuro libre.-**Esta denominación comprende tanto al HCN molecular como al ion de cianuro. Esta terminología se emplea tanto para la descripción analítica del cianuro como para evaluar su toxicidad.
- **Cianuro disociable en ácido débil (WAD).-**Es un término analítico utilizado para designar a los compuestos de cianuro que se disocian bajo reflujo, con un ácido débil, normalmente a pH 4,5.
- **Cianuro total (CT).-**Se denomina así a todos los compuestos de cianuro existentes en una solución acuosa.
- **Compuestos derivados del cianuro.-** Son compuestos esencialmente no tóxicos que proceden de las transformaciones de

compuestos cianurados. Los más importantes son el tiocianato, el cianato, los iones nitrato, nitrito y el amoníaco.

- **Aeróbico.**-Un organismo que puede crecer en presencia de aire.
- **Alcalófilas.**-Organismos que crecen mejor bajo condiciones alcalinas (hasta un pH de 10.5).
- **Autótrofos.**-Son organismos capaces de sintetizar sus metabolitos esenciales a partir de sustancias inorgánicas.
- **Heterótrofos.**-Son aquellos que se alimentan de sustancias orgánicas sintetizadas por otros organismos autótrofos , ya que no son capaces de fabricar su propio alimento como lo hacen los autótrofos(plantas, algas y cianobacterias).
- **Bacterias.**-Un grupo de microorganismos unicelulares procarióticos diversos y ubicuos.
- **Biodegradación.**-La descomposición de sustancias orgánicas por microorganismos.
- **Adaptación.**-Cambio en un organismo o población de organismos a través del cual se hacen más adecuados al ambiente predominante. La adaptación puede ser genética y/o fisiológica.

- **Biomasa.**-Cantidad de materia viva presente en un habitat particular.
- **Microorganismos.**-Incluye bacterias, algas y virus .
- **Tinción.**-Utilizado para teñir bacterias y que permiten diferenciar los dos grandes grupos bacterianos gram- positivas y las gram negativas.
- **Inoculación.**-La introducción de un microorganismo en un organismo huésped.
- **Mesófilos.**-Un organismo cuyo rango de crecimiento óptimo es 20 a 45 °C.
- **Biorremediación.**- Se refiere a cualquier proceso de recuperación medioambiental producido por microorganismos, bacterias, hongos, plantas o enzimas derivadas de ellos.
- **Biorremediación ex situ.**-Consiste en la eliminación del material contaminado a tratar en otro lugar.
- **Pseudomonas.**- Son bacterias que pertenecen al reino proKaryotae, poseen membrana y pared celular bien definida, pertenecen a la familia *Pseudomonadacea*, son bacilos Gram Negativo, rectos o curvados no vibriodes, sin esporas, vainas, ni apéndices, con flagelos polares, son organismos aerobios organotróficos sin metabolismo

fermentativo que dependen de reacciones de óxido reducción para obtener energía y utilizan sustancias oxidantes a pH neutro o básico.

➤ **Caldo Acetamida.-** Medio líquido para la prueba de confirmación de la presencia de *Pseudomonas aeruginosa* en agua embotellada.

➤ **Caldo nutritivo.-** Medio líquido de cultivo de uso general para microorganismos poco exigibles.

➤ **Medio.-**Cualquier material que se soporte el crecimiento de un organismo.

➤ **Medio Mínimo.-** Medio de cultivo que carece de ciertos factores de crecimiento para que solo soporte el crecimiento de ciertos tipos de microorganismos.

➤ **Medio Mínimo Mineral Modificado (M9).-** Medio líquido compuesto de sales y extracto de levadura como fuente de nitrógeno, donde se da las condiciones mínimas de crecimiento.

➤ **Agar cianuro.-** Medio solido de cultivo con cianuro para el aislamiento de pseudomonas alcalófilas.

➤ **Agar nutritivo.-** Medio solido de cultivo de uso general para aislamiento y recuento de microorganismos con escasos requerimientos nutricionales.

- **Agar Medio Mínimo Mineral.-** Medio solido de cultivo compuesto de sales donde se realiza las condiciones mínimas de crecimiento para el aislamiento de *pseudomonas alcalófilas*.
- **Agar Medio Mínimo Mineral Modificado (M9) .-** Medio solido de cultivo compuesto de sales y extracto de levadura como fuente de nitrógeno, donde se realiza las condiciones mínimas de crecimiento para el aislamiento de *pseudomonas alcalófilas*.
- **Agar Cetrimide.-** Es un medio selectivo utilizado para el aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa*.
- **Agar King B.-** Un medio para la detección y diferenciación de *Pseudomonas aeruginosa* de otras *Pseudomonas* basado en la producción de fluoresceína.
- **DS.-**Decreto Supremo

2.4Bases Legales

- **DS.-** N° 010-2010-MINAM.Aprueban límites máximos permisibles para la descarga de efluentes líquidos de Actividades Minero – Metalúrgicas.

III. VARIABLES E HIPÓTESIS

3.1 Variables de la investigación

3.1.1 Variables independientes

X1: pH de biorremediación (pH 7-14)

X2: Tiempo de biorremediación (d)

3.1.2 Variables dependientes

Y1: Degradación de cianuro total (%)

3.1.3 Variables controlables

X3: Temperatura (°C)

X4: Agitación (rpm)

X5: Concentración de cianuro (ppm)

X6: Tamaño de inoculo (ufc/ml)

3.2 Operacionalización de Variables

CUADRO N°3 1

OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES

Variable Independiente	Dimensión	Indicador	Escala
pH de biorremediación de efluente cianurado	✓ pH	✓ Valor de pH.	✓ 10-11pH.
Tiempo de biorremediación del efluente cianurado	✓ Tiempo	✓ Días.	✓ 1-2 días.
Variable dependiente	Dimensión	Indicador	Escala
Porcentaje de degradación de cianuro total del efluente cianurado	✓ %Rendimiento	✓ Contenido abatimiento de cianuro total.	✓ 0 a 250ppm

Fuente: Elaboración Propia

3.3 Hipótesis

3.3.1 Hipótesis general

Si determinamos los parámetros óptimos en la biorremediación de efluente cianurado utilizando una cepa de *pseudomonas alcalófilas*, entonces el proceso será significativo.

3.3.2 Hipótesis específica

a) La biorremediación óptima del efluente cianurado utilizando una cepa *pseudomonas alcalófilas* se producen cuando el pH se encuentra en un intervalo de: pH: 10 - 11.

b) La biorremediación de efluente cianurado óptima utilizando una cepa de *pseudomonas alcalófilas* se producen cuando el tiempo se encuentra intervalo de: 1-2 días.

IV. METODOLOGÍA

4.1 Tipo de Investigación

➤ **Por su finalidad**

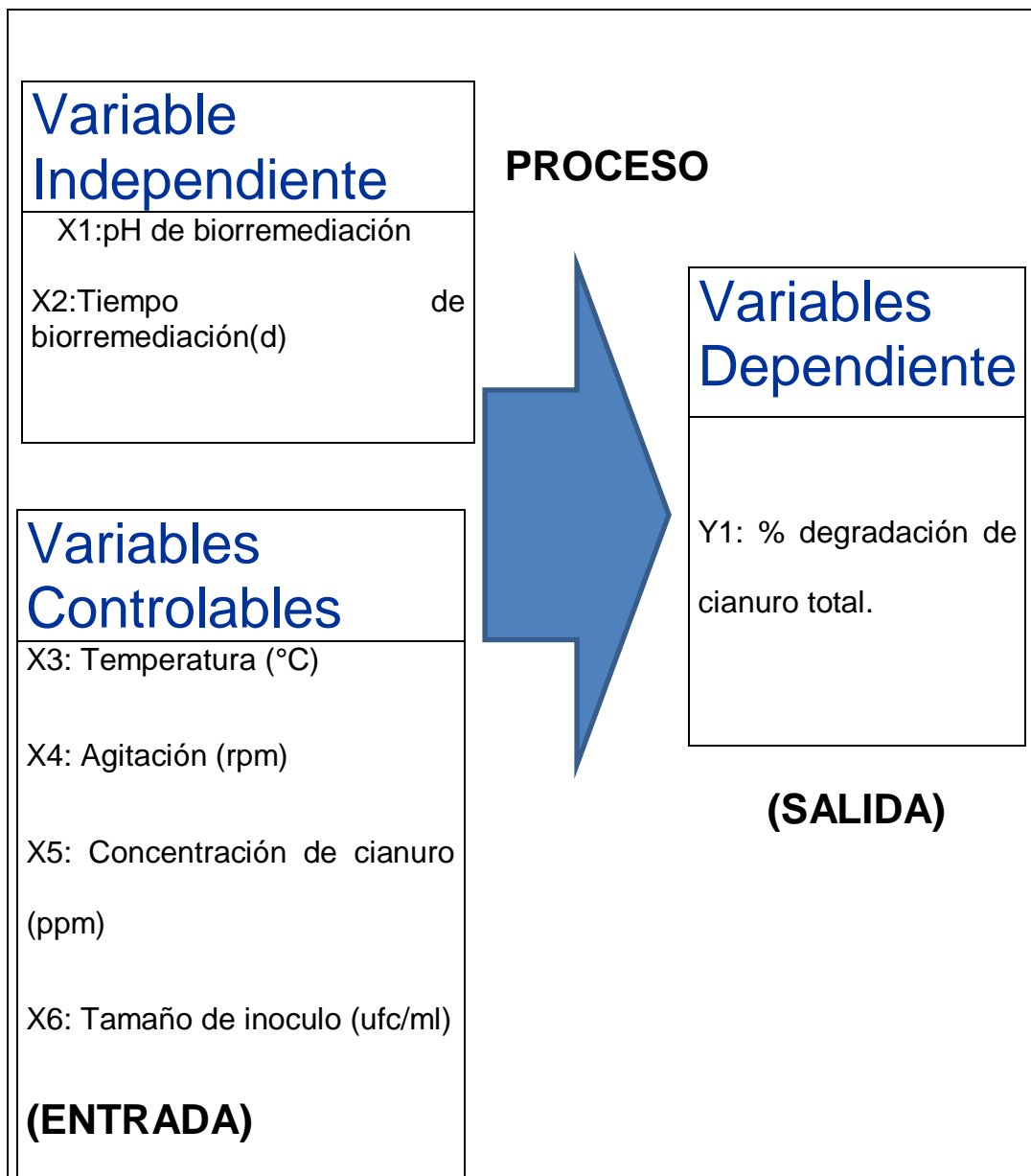
La investigación es de tipo **aplicada** ya que los resultados servirán para ser aplicadas a las industrias en temas de conservación del medio de ambiente.

➤ **Por su diseño interpretativo**

La investigación es de tipo experimental ya que los estudios fueron realizados mediante la observación, registro y análisis de las variables que intervinieron.

En la siguiente figura N°4.1 esta representación del diseño experimental.

FIGURA N°4. 1
REPRESENTACION DEL DISEÑO INVESTIGACIÓN



Fuente: Elaboración Propia

4.2 Diseño de la Investigación

El presente estudio corresponde a una investigación del tipo experimental porque permitió mediante un diseño factorial investigar los efectos conjuntamente de los factores.

Consistió en adaptar la cepa de *pseudomonas alcalófilas* a diferentes de rango de pH 10,0 a 11,0 y evaluar el tiempo de biodegradación del efluente de cianuro en medio mínimo mineral modificado (M9).

Luego se optimizó los parámetros del proceso biorremediación de efluente cianurado tales como, tiempo de degradación de cianuro, el pH de degradación de efluente de cianuro, para luego un obtener el porcentaje de biodegradación de efluente de cianuro.

4.2.1 Etapas de la Investigación

- **Primera etapa de la investigación:** En esta etapa consistió en identificar las características físicas y químicas del efluente de cianuro, se midió el contenido de cianuro libre, cianuro débil separable disociable (WAD), cianuro total, se midió los aniones y cationes por VH-ME-ICP2 para 38 elementos, la temperatura y pH.
- **Segunda etapa de la investigación:** En esta etapa se determinó los parámetros óptimos tales como el pH, el tiempo de biodegradación de cianuro total en el proceso biorremediación de efluente de cianuro, utilizando *pseudomonas alcalófilas*, además del porcentaje de biodegradación de cianuro total abatido.

TABLA N°4. 1
NIVEL DECODIFICADO DE LAS VARIABLES

N°	Variabes	Notación	Nivel(-)	Nivel(+)
1	pH de solución de efluente de cianuro	X1	10	11
2	Tiempo de Biorremediación(días)	X2	1	2

Fuente: Elaboración Propia

TABLA N°4. 2
MATRIZ DE DISEÑO EXPERIMENTALCENTRAL COMPUESTO

N°	Codificado		Observación	Natural	
	Códigos			X1=pH	X2=Tiempo(días)
1	-	-	Factorial 2 ⁿ	10	1
2	+	-		11	1
3	-	+		10	2
4	+	+		11	2
5	1,4142	0	Estrella 2 ⁿ $\alpha=2^{1/n}$	9,792	1.5
6	-1,4142	0		11,28	1.5
7	0	1,4142	=1.4142	10,5	0,71746
8	0	-1,4142		10,5	2,28254
9	0	0	Pruebas al centro	10,5	1.5
10	0	0		10,5	1.5

Fuente: Elaboración Propia

pH: Grado de basicidad ; t: Tiempo de Biorremediación

También se determinó un modelo una ecuación multivariable que describa el comportamiento general de la biorremediación de efluentes de cianuro, restringiendo al rango de variación de los niveles de los factores (véase la ecuación 1).

Para hacer la regresión multivariable se debe crear las columnas para pH^2 , t^2 , $pH \cdot t$, que se logra operando elevando al cuadrado las columnas correspondientes y multiplicando ambas columnas.

$$y = X_0 + X_1 \cdot pH + X_2 \cdot t + X_3 \cdot pH^2 + X_4 \cdot t^2 + X_5 \cdot pH \cdot t \quad (1)$$

Derivando la ecuación con respecto a pH y al tiempo se obtiene.

$$\frac{dy}{dpH} = X_1 + 2 \cdot X_3 \cdot pH + X_5 \cdot t \dots \dots \dots (2)$$

$$\frac{dy}{dt} = X_2 + 2 \cdot X_4 \cdot t + X_5 \cdot pH \dots \dots \dots (3)$$

Resolviendo las ecuaciones, obtenemos el pH óptimo y el tiempo óptimo del proceso de biorremediación de efluente cianurado utilizando *pseudomonas alcalófilas*.

4.3 Población y muestra

La población consistió en 25L de efluente de cianuro provenientes del proceso de lixiviación de oro de la planta CIA. Minera Macdesa donde se almacena en la relavera situada en la Ciudad Chala-Arequipa, Perú.

La muestra consistió en 20Kg de líquido con cianuro y 5 Kg de sólido de mineral.

Se tomaron muestras para el aislamiento de bacterias un volumen de 225 mL en recipientes estériles de vidrio y se transportaron según (Nicholas J. Ashbolt 2015) a temperatura < 10°C horas antes de ser analizadas en el laboratorio de Microbiología Ambiental y Biotecnología – UNMSM. (Ver anexo N°1).

FIGURA N°4. 2
DISEÑO EXPERIMENTAL

(1) Toma de muestra



(2) Caracterización del efluente

Muestra	pH	Temperatura (°C)	Concentración cianuro libre(ppm)	Concentración cianuro VVAD(ppm)	Concentración cianuro Total(ppm)
Relave	10.5	30	100	150	250

Elemento	Ag ⁺	Al ³⁺	As	Ca ²⁺	Cu ²⁺	Fe ²⁺	C	S ⁻²	Zn ²⁺
ppm	0,33	9,29	1,08	6,81	51,29	156,8	36,3	166,7	1,76

(3) Diseño central compuesto

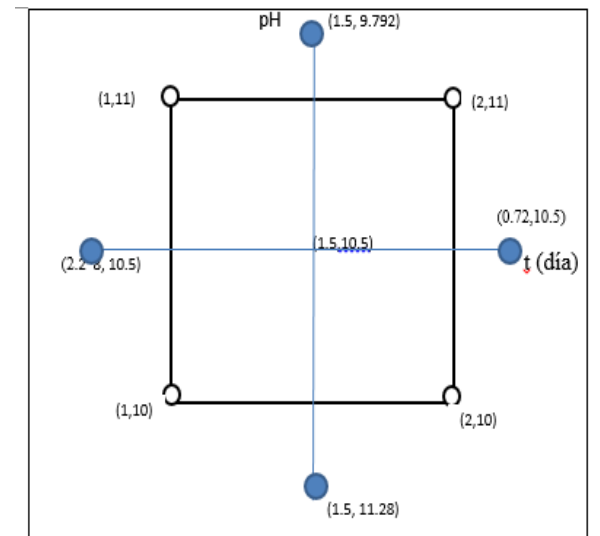


FIGURA N°4. 3
DISEÑO EXPERIMENTAL

(4) Biorremediación

$$\% \text{ Degradación (CT)} = -1052.6706 + 214.57 * \text{pH} + 22.47 * t - 10.72 * \text{pH}^2 - 3.09 * t^2$$

$$- 0.948 * \text{pH} * t$$

$$\frac{dy}{d\text{pH}} = 214.57 - 21.44 * \text{pH} - 0.948 * t$$

$$\frac{dy}{dt} = 22.47 - 6.19 * t - 0.948 * \text{pH}$$

$$\text{pH (optima)} = 9.9$$

$$t \text{ (optima)} = 2.1 \text{ dia} = 50.4 \text{ h}$$



(5) Condiciones Optimas



(6) Resultados

Orden	X1=Basicidad del medio	X2=Tiempo de Biorremediación (días)	Y=Porcentaje degradación de cianuro total
1	10	1	31,05%
2	10	1	48,00%
3	11	2	18,67%
4	11	2	28,75%
5	9,79	1,5	40,00%
6	11,2	1,5	18,52%
7	10,5	0,72	19,53%
8	10,5	2,28	32,44%
9	10,5	1,5	31,44%
10	10,5	1,5	31,44%

4.4 Técnicas e instrumentos de recolección de datos

Para la recolección de datos se usaron los siguientes instrumentos para la medición directa:

- pH meter multivariable Marca Hanna y de rango 0-14 pH.
- Analizados por VH-ME-ICP2 para 38 elementos.
- Para medir el contenido de cianuro libre fue por el método titulación, el cianuro disociable ácido débil (WAD) y cianuro total fueron analizadas por el método colorimétrico y equipo de destilación.
- Para medir la población bacteriana: Conteo en Cámara de Neubaver en Microscopio Compuesto Trinocular.
- Para medir la tinción Gram (pureza): Microscopio Trinocular. Marca Leica DM750.
- Para el sistema de agitación de biorremediación bacteriana a 150rpm: agitador GEMMY Orbit Shaker VRN-480.

4.4.1 Plan de recolección y procesamiento de la información

- a) Tabla de la recolección de datos para hallar la temperatura (°C), pH y el contenido de concentración de cianuro libre, WAD y total del efluente cianurado (Tabla N° 5.1).

- b) Tabla de recolección de datos para hallar el contenido de cationes y aniones del efluente de cianuro. (Tabla N° 5.2).
- c) Tabla de recolección de datos de la concentración cianuro residual de los 5 experimentos del diseño. (Tabla N°5.3, Tabla N° 5.4, Tabla N° 5.5, Tabla N° 5.6, Tabla N° 5.7).
- d) Tabla de recolección de datos para hallar el porcentaje de biodegradación de cianuro total del diseño experimental (Tabla N° 5.8).
- e) Tabla de recolección de datos de la población bacteriana en el proceso de biorremediación de efluente de cianuro total.(Tabla5.9)
- f) Tabla de recolección de datos para determinar los coeficientes del modelo matemático multivariable del diseño experimental (Tabla5.12)
- g) Tabla de recolección de datos de la estadística de regresión del modelo matemático.(Tabla5.13)
- h) Tabla de recolección de datos de la análisis de varianza del modelo matemático (Tabla5.14)
- i) Tabla de recolección de datos del pH y el tiempo optima del proceso de biorremediación de efluente de cianuro total .(Tabla5.16)

4.4.2Materiales

- Matraces Erlenmeyer de 25mL, 50 mL,100 mL, 250 mL, 1L y 2L.
- Probeta de 25 mL, 100 mL y 1000 mL.

- Bureta de 50 mL.
- Vasos de precipitación
- Pipeta volumétrica de 1 mL, 5 mL y 20 mL.
- Placa Petri
- Porta objeto
- Cámara de Neuvaber

Material biológico

- Cepas *Pseudomonas* nativas aisladas de plantas de beneficio oro-plata.

4.4.3 Reactivos y Soluciones

- Fosfato ácido de sodio $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- Fosfato diácido de sodio KH_2PO_4
- Sulfato de Magnesio Heptahidratado $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- Cloruro de Calcio CaCl_2
- Acetato de sodio 0,2% CH_3COONa
- Extracto de levadura 0,2%
- Ácido sulfúrico 1M H_2SO_4

- Hidróxido de sodio 1M NaOH
- Buffer Carbonato-Bicarbonato 0,1 M
- Nitrato de Plata 2.1164 g/L AgNO₃
- Cianuro de sodio 0,1% NaCN
- Indicador yoduro de potasio al 5%. KI

4.5. Procedimiento de recolección de datos

4.5.1 Preparación del medio mínimo M9

- Primero se llevó al autoclave para esterilizar los materiales de vidrio: Matraces, luna de reloj, espátula y vaso precipitado.

- Después pesamos los componentes del medio de cultivo M9:

$$W (\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}) = 12,8 \text{ g}$$

$$W \text{ KH}_2\text{PO}_4 = 3 \text{ g}$$

$$W \text{ NaCl} = 0,5\text{g}$$

$$W \text{ MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} = 0,5 \text{ g}$$

$$W \text{ CaCl}_2 = 0, 1 \text{ g}$$

$$W \text{ CH}_3\text{COONa} = 2, 0 \text{ g}$$

$$W \text{ extracto de levadura} = 2, 0 \text{ g}$$

- A continuación se adiciono 1 L de H₂O destilada esterilizada y agregamos unas de 1,0 M NaOH (CC) hasta llegar a pH 10,5.

4.5.2 Reactivación de bacterias alcalófilas

- Se agregó el contenido del medio M9 en matraces de 1L (225 mL cada uno) y fueron llevados a la cámara de aislamiento.
- Después del matraz que tenía el inóculo puro, se tomó 25mL para cada uno de los 5 matraces con el medio mínimo M9 , se les colocaron tapones de algodón y fueron llevados al Shaker.
- A continuación se esperó 48 horas que la solución de cada matraz, inicialmente transparente, se torne color blanco debido al crecimiento de bacterias.

4.5.3 Caracterización de efluente de cianuro

Para la caracterización del efluente de cianuro, primero se realizó la recolección adecuada del efluente de cianuro de la relavera, para esto seguiremos las indicaciones de muestreo de efluente de cianuro.

- Se utilizaron para la toma de muestra EPPs tales como respirador 3M con un cartucho multigas, guantes de nitrilo y un guardapolvo.
- Se tomó la muestra de efluente de cianuro de varios puntos de la relavera en un balde de plástico no transparente de volumen de 25 L.
- Se tomó 25mL de muestra de efluente cianurado y llevamos al laboratorio Actlabs Skyline Perú S.A.C. para realizar los análisis químicos.

- Luego se tomó 500 mL de muestra representativa de efluente cianurado y llevamos al laboratorio ALS S.A.C para realizar los análisis químicos.

4.5.4 Diseño Experimental

- Primero se llevó al autoclave para esterilizar los materiales de vidrio.
- Después se preparó una biomasa de 800mL de microorganismos por 48 horas en medio mínimo M9 que contenga cianuro como única fuente de nitrógeno incubado a 150 rpm en un agitador orbital.
- Se agregó en 5 matraces de 3L , se inoculo al 10%(v/v) de bacterias alcalófilas, trabajando un volumen total en cada matraz de 1500mL.
- El pH del medio de cultivo fue ajustado a 9,78, 10,0, 10,5, 11,0 y 11,28 con NaOH 0,1 M y un buffer de carbonato-Bicarbonato 0,1 M
- El tiempo de biodegradación de cianuro fue medido en: 17,2, 24, 36, 48 , 54,7 horas según el experimento y se tomaron un volumen de 500 mL para analizar el contenido de cianuro total residual biorremediado.
- En todas los experimentos la concentraciones inicial de cianuro total fue 250 ppm, la población bacteriana inicial del inculo de *pseudomonas alcalófilas* es de $4E+07$ ufc /mL.
- Las variables controlables fueron a una agitación de 150 rpm y temperatura de ambiente, ver la tabla siguiente.

- Además se evaluó la cinética de crecimiento, la cinética de degradación de cianuro total y el porcentaje de degradación de cianuro total.
- La distribución de los 5 matraces fue de la siguiente forma.

TABLA N°4. 3
DISTRIBUCIÓN DEL DISEÑO EXPERIMENTAL

N°	X1	X2	X1=pH	X2=Tiempo de biorremediación (días)
1	-	-	10	1
2	+	-	11	1
3	-	+	10	2
4	+	+	11	2
5	1.4142	0	9.792	1.5
6	-1.4142	0	11.28	1.5
7	0	1.4142	10.5	0.71746
8	0	-1.4142	10.5	2.28254
9	0	0	10.5	1.5
10	0	0	10.5	1.5

Fuente: Elaboración Propia

- Se realizó el seguimiento del número de bacterias.

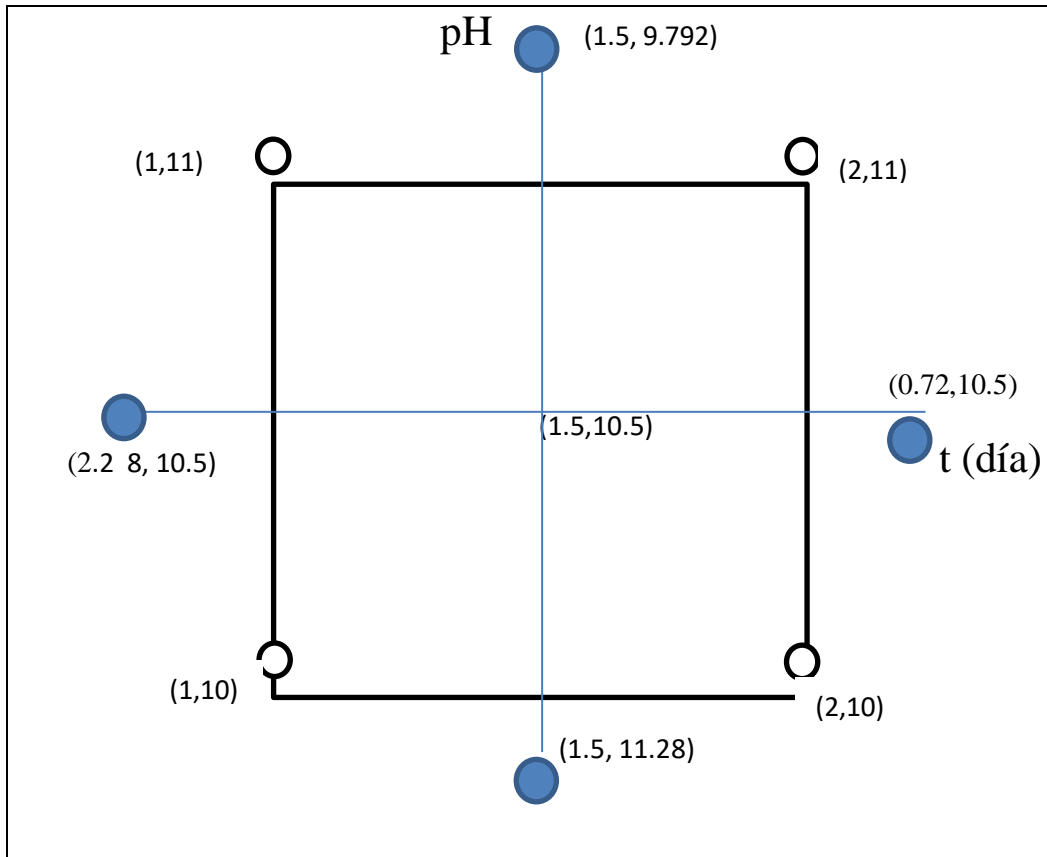
FIGURA N°4. 3
CONTEO MICROBIANO



- Todos los días se controló el pH se encuentre fijo según el diseño experimental centra compuesto.
- En los tiempos determinados según el diseño se tomó muestra y analizamos cianuro total por método colorímetro equipo de destilación.
- Con los resultados obtenidos se determinó el porcentaje de degradación de cianuro total.

- A continuación se presenta el diseño central compuesto.

FIGURA N°4.4
DISEÑO EXPERIMENTAL CENTRAL COMPUESTO



Fuente: Elaboración Propia

4.6. Procedimiento estadístico y análisis de datos

4.6.1. Tratamiento Estadístico

Se realizó una experimentación activa con un diseño experimental del tipo central compuesto para dos variables, que permitió cuantificar el efecto de una variable y sus interrelaciones para un producto dado, se puede hacer la

suposición de que la respuesta que se quiere evaluar es una función de las variables más importantes que afectan el proceso y con base a ella se plantea un modelo matemático.

La evaluación e interacción se realizó en base al modelo factorial central compuesto empleando el software MINITAB 16.

4.6.2. Análisis Estadístico

Se realizó en base al análisis de la varianza (ANOVA). Para lo cual se utilizó como software el MINITAB.16 y el Excel 2010.

➤ El análisis de la varianza (Anova)

El objetivo del ANOVA fue comparar los diversos valores medios para determinar si alguno de ellos difiere significativamente del resto.

Expresiones para el cálculo del ANOVA de un factor (K indica el número de ensayos y N el número total de resultados)

Un método computacional conocido como tabla ANOVA facilita los cálculos.

Se trata de disponer en forma de tabla ciertas cantidades que conducen a la obtención de F.

CUADRO N°4.1

CUADRADOS DE ENSAYO ANOVA

Fuente	Suma de errores cuadrados	Grados de libertad	Varianza	Fcal
Entre ensayos	$SSENSAYO = \frac{\sum nk(\bar{x} - \bar{\bar{x}})^2}{2}$	K-1	$MSensa = \frac{SSensa}{K-1}$	$F = \frac{MSens}{MSR}$
	$SSR = \sum_{kj=1}^K \sum_{K=1}^n nk(x_{kj} - \bar{\bar{x}})^2$	N-1	$MSR = \frac{SSR}{N-K}$	
Total	$SST = \sum \sum nk(x_{kj} - \bar{\bar{x}})^2$	N-1	$MSt = \frac{SSt}{N-1}$	

Fuente: Herramientas estadísticas – 2005

Mediante los métodos de regresión y matricial se determinó los coeficientes del modelo matemático multivariable, luego se calculó el tiempo óptimo de biorremediación bacteriana y el pH óptimo del medio, después fueron reemplazados e la ecuación del modelo matemático y se determinó la máxima porcentaje de degradación de cianuro total.

V. RESULTADOS

5.1. Caracterización del efluente de cianuro

Todos los análisis realizados del efluente de cianuro se realizaron a temperatura de ambiente.

a) Determinación de cianuro libre, wad y total

En la tabla siguiente se muestra los contenidos de cianuro libre, WAD y total del efluente cianuro de la relavera.

TABLA N°5. 1
CONTENIDO DE CIANURO LIBRE, WAD Y TOTAL

Muestra	pH	Temperatura (°C)	Concentración cianuro libre(ppm)	Concentración cianuro WAD(ppm)	Concentración cianuro Total(ppm)
Relave	10,5	30	100	150	250

Fuente: Laboratorio Certimin SAC 2017.

b) Determinación de aniones y cationes

La concentración de los principales cationes y aniones fueron los siguientes (ppm), (véase la tabla N°5.2).

TABLA N°5. 2
CONTENIDO DE ANIONES Y CATIONES

Elemento	Ag ⁺	Al ⁺³	As	Ca ⁺²	Cu ⁺²	Fe ⁺²	C	S ⁻²	Zn ⁺²
ppm	0,33	9,29	1,08	6,81	51,29	156,8	36,3	166,7	1,76

Fuente: Laboratorio Actlabs Skyline SAC 2017.

5.2. Diseño experimental

Para determinar la cantidad de experiencia se utilizó el diseño factorial central compuesto, con el software-MINITAB 16.

Diseño central compuesto

Factores: 2 Réplicas: 1
 Corridas base: 10 Total de corridas: 10
 Bloques base: 1 Total de bloques: 1

TABLA N°5.3

MATRIZ FACTORIAL DEL DISEÑO CENTRAL COMPUESTO

Orden	FACTORES					
	pH	Tiempo (días)	Concentración cianuro total	Tamaño de inculo (v/v)	Agitación (rpm)	Temperatura (°C)
N°1	10	1,0	250ppm	10%	150	20
	10	2,0	250ppm	10%	150	20
N°2	11	1,0	250ppm	10%	150	20
	11	2,0	250ppm	10%	150	20
N°3	9,792	2,0	250ppm	10%	150	20
N°4	11,28	2,0	250ppm	10%	150	20
N°5	10,5	0,72	250ppm	10%	150	20
	10,5	2,28	250ppm	10%	150	20
	10,5	2,0	250ppm	10%	150	20
	10,5	2,0	250ppm	10%	150	20

Fuente: Elaboración Propia

De acuerdo a la matriz factorial central compuesto de los experimentos, se realizaron 5 experiencias, cuyo porcentaje de degradación de cianuro total del efluente, los ensayos de pH: 10 y 11 se realizaron hasta 2 días o 48 horas, el de pH: 9,79 y 11,28 hasta 1,5 días o 36 horas y el de pH 10,5 hasta 2.28 días o 54.7 horas.

1. EXPERIMENTO N°1

Orden	pH	Tiempo (días)	Inoculo (v/v)	Agitación (rpm)	Temperatura (°C)
N°1	10	1,0	10%	150	20
	10	2,0	10%	150	20

TABLA N°5. 4

CONCENTRACIÓN DE CIANURO RESIDUAL A pH:10,0

Orden	pH	Tiempo (días)	Población (ufc/ml)	Concentración de cianuro total residual	Porcentaje degradación de cianuro total
N°1	10	1.0	1,92E+08	172,37	31,05%
	10	2,0	1,75E+08	130,0	48,00%

Fuente: Elaboración Propia

2. EXPERIMENTO N°2

Orden	pH	Tiempo (días)	Inoculo (v/v)	Agitación (rpm)	Temperatura (°C)
N°1	11	1,0	10%	150	20
	11	2,0	10%	150	20

TABLA N°5.5

CONCENTRACIÓN DE CIANURO RESIDUAL A pH:11,0

Orden	pH	Tiempo días)	Población (ufc/ml)	Concentración de cianuro total residual	Porcentaje degradación de cianuro total
N°2	11	1,0	5,10E+07	203,71	18,67%
	11	2,0	1,20E+07	178,12	28,75%

Fuente: Elaboración Propia

3. EXPERIMENTO N°3

Orden	pH	Tiempo (días)	Inoculo (v/v)	Agitación (rpm)	Temperatura (°C)
N°3	9,79	2,0	10%	150	20

TABLA N°5. 6

CONCENTRACIÓN DE CIANURO RESIDUAL A pH:9,79

Orden	pH	Tiempo (días)	Población (ufc/ml)	Concentración de cianuro total residual	Porcentaje degradación de cianuro total
N°3	9,79	2,0	1,72E+08	150,0	40,00%

Fuente: Elaboración Propia

4. EXPERIMENTO N°4

Orden	pH	Tiempo (días)	Inoculo (v/v)	Agitación (rpm)	Temperatura (°C)
N°4	11,3	2,0	10%	150	20

TABLA N°5. 7

CONCENTRACIÓN DE CIANURO RESIDUAL A pH:11,3

Orden	pH	Tiempo (días)	Población (ufc/ml)	Concentración de cianuro total residual	Porcentaje degradación de cianuro total
N°4	11,3	2,0	9,33E+06	203,71	18,52%

Fuente: Elaboración Propia

5. EXPERIMENTO N°5

Orden	pH	Tiempo (días)	Inoculo (v/v)	Agitación (rpm)	Temperatura (°C)
N°5	10,5	0,72	10%	150	20
	10,5	2,28	10%	150	20
	10,5	1,5	10%	150	20
	10,5	1,5	10%	150	20

TABLA N°5. 8

CONCENTRACIÓN DE CIANURO RESIDUAL A pH: 10,5

Orden	pH	Tiempo (días)	Población (ufc/ml)	Concentración de cianuro total residual	Porcentaje degradación de cianuro total
N°5	10,5	0,72	1,31E+08	203,66	18,53%
	10,5	2,28	8,67E+07	171,38	31,44%
	10,5	1,5	8,67E+07	171,38	31,44%
	10,5	1,5	5,16E+07	169,31	32,28%

Fuente: Elaboración Propia

- A continuación mostramos los resultados de porcentaje de degradación de cianuro total del diseño central compuesto (véase la tabla N°5.9)

TABLA N°5. 9
DISEÑO EXPERIMENTAL CENTRAL COMPUESTO

Orden	X1=Basicidad del medio	X2=Tiempo de Biorremediación (días)	Y=Porcentaje degradación de cianuro total
1	10	1	31,05%
2	10	1	48,00%
3	11	2	18,67%
4	11	2	28,75%
5	9,79	1.5	40,00%
6	11,2	1.5	18,52%
7	10,5	0.72	18,53%
8	10,5	2.28	31,44%
9	10,5	1.5	31,44%
10	10,5	1.5	32,28%

Fuente: Elaboración Propia

a) Evaluación de la cinética de crecimiento

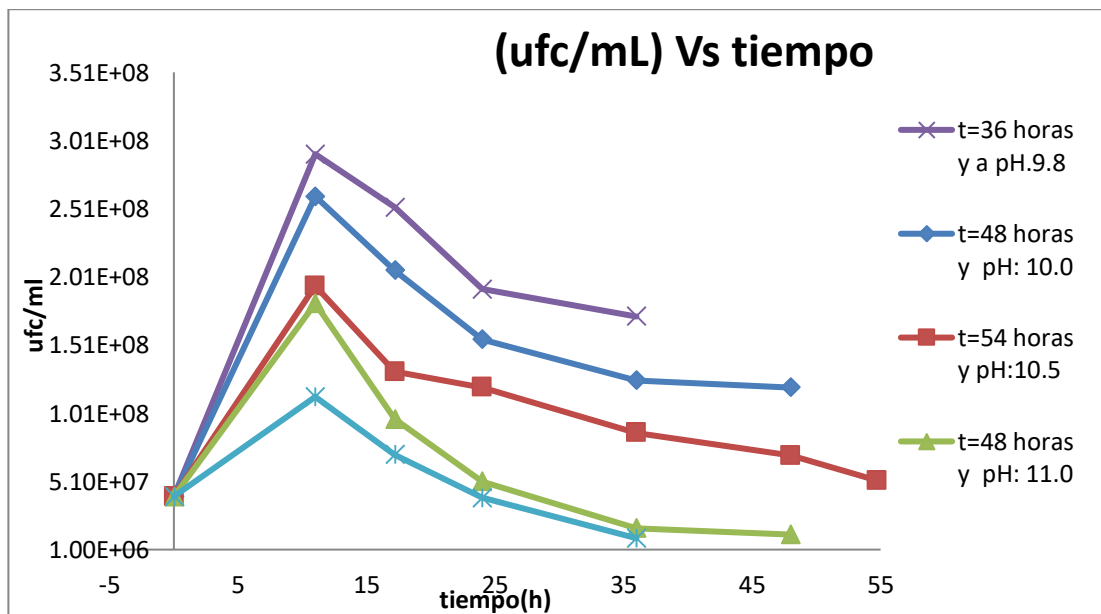
La máxima crecimiento de las *pseudomonas alcalófilas* se da en rango de 5 a 15 horas a pH: 9,8 con un valor de 2,91E+08 ufc/mL. Luego después de 36 horas disminuyo la población bacteriana a 1.72E+08 ufc/ml (Ver la tabla N°5.9).

TABLA N°5. 10
CONTEO EN CAMARA NEUBAVER DE PSEUDOMONAS ALCALÓFILAS
A UNA DILUCIÓN (10⁻⁵)

	pH:9.8	pH:10.0	pH:10.5	pH:11.0	pH:11.28
tiempo(días)	ufc/mL				
0	4,00E+07	4,00E+07	4,00E+07	4,00E+07	4,00E+07
17.2	2,52E+08	2,06E+08	1,31E+08	9,67E+07	7,07E+07
24	1,92E+08	1,55E+08	1,20E+08	5,10E+07	3,90E+07
36	1,72E+08	1,25E+08	8,67E+07	1,67E+07	9,33E+06
48		1,20E+08	7,00E+07	1,20E+07	
54,7			5,16E+07		

Fuente: Elaboración Propia

FIGURA N°5. 1
CINETICA DE CRECIMIENTO DE PSEUDOMONAS ALCALOFILAS



Fuente: Elaboración Propia

b) Evaluación de la cinética de degradación de cianuro total

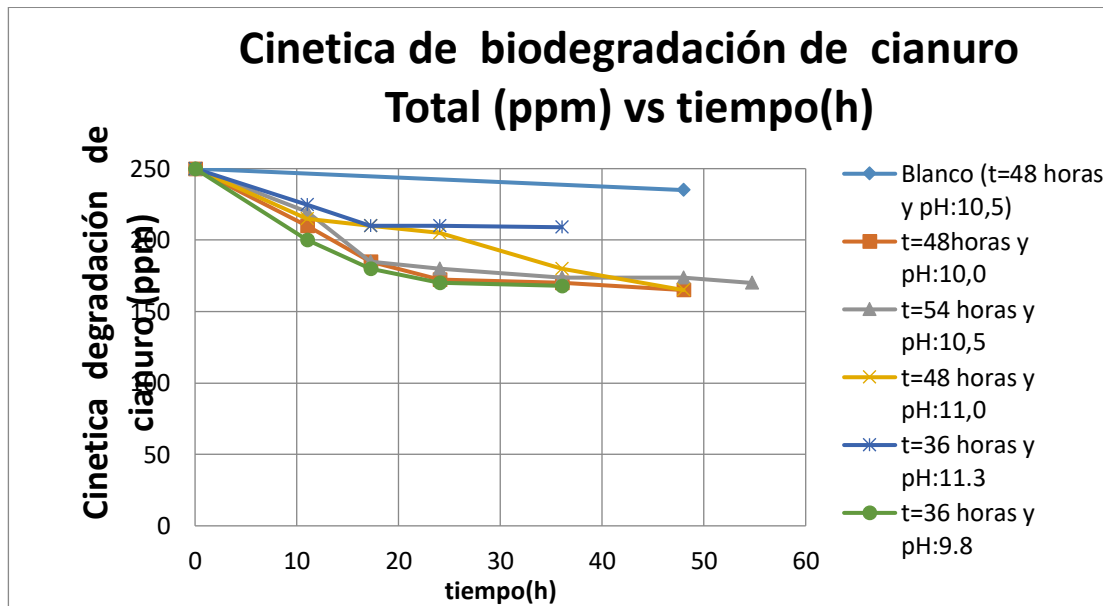
La degradación de cianuro total utilizando *pseudomonas alcalófilas*, se partió con una concentración de cianuro total de 250ppm y se midió cianuro abatido en el ensayo de pH: 10 y 11 hasta 48 horas, el ensayo de pH: 9,79 y 11,28 hasta 36 horas y el ensayo de pH: 10,5 hasta 54,7 horas. (Ver la Tabla N°5.10). El control negativo de cianuro libre de 250 ppm como blanco sin inóculo se evaluó durante 48 horas.

TABLA N°5. 11
CONCENTRACIÓN DE CIANURO TOTAL RESIDUAL

Tiempo(h)	250ppm (blanco)	pH:9.8	pH:10.0	pH:10.5	pH:11.0	pH:11.3
0	250	250.0	250.0	250.0	250.0	250.0
11	-	200.0	210.0	220.0	215.0	225.0
17	-	180.0	185.0	185.0	210.0	210.0
24	-	170.0	172.4	180.0	205.0	210.0
36		168.0	170.0	173.7	180.0	209.0
48	235		165.0	173.7	165.0	
54				170.0		

Fuente: Elaboración Propia

FIGURA N°5. 2
CINETICA DE DEGRADACIÓN DE CIANURO TOTAL



Fuente: Elaboración Propia

c) Evaluación de la degradación de cianuro total

Se calculó el porcentaje de degradación de cianuro total proveniente del efluente generado del proceso de lixiviación de oro utilizando *pseudomonas alcalófilas*, de las concentraciones cianuro total abatido a pH: 10 y 11 en tiempos de hasta 48 horas, pH: 9,79 y 11,28 hasta tiempo de 36 horas y 10,5 hasta tiempo de 54,7 horas. (Ver la Tabla N° 5.11) En el control negativo el porcentaje de volatilización fue del 6,0%.

TABLA N°5. 12

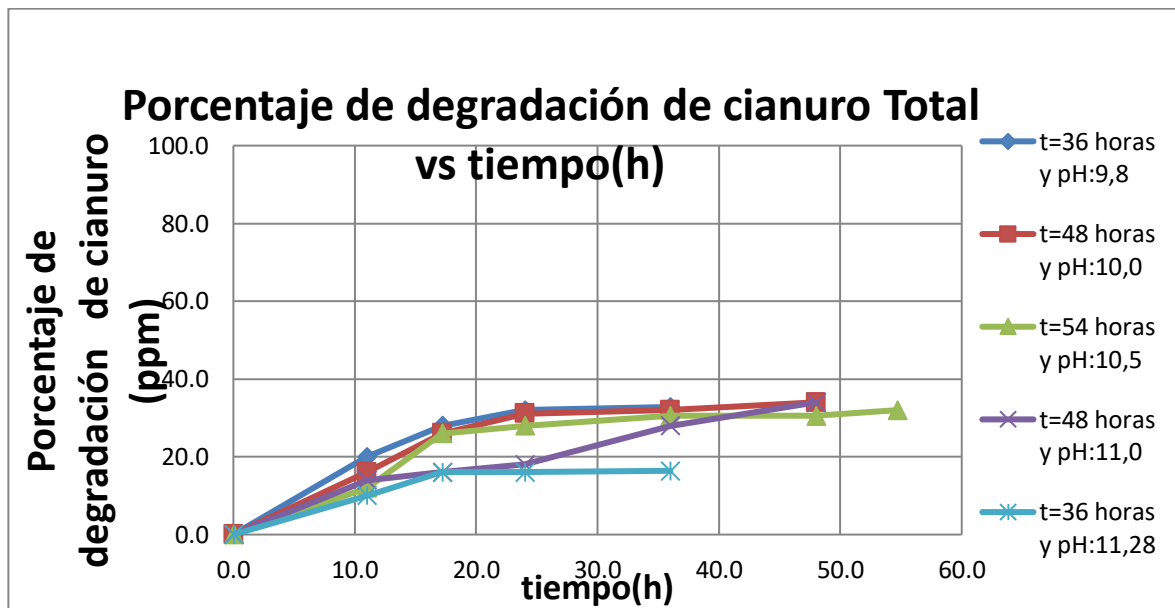
PORCENTAJE DE DEGRADACIÓN DE CONCENTRACION DE CIANURO TOTAL DE 250 ppm

t(h)	pH:9.8	%	pH:10	%	pH:10,5	%	pH:11	%	pH:11.2	%
0	250.0	0.0	250.0	0.0	250.0	0.0	250	0.0	250.0	0.0
11	200.0	20.0	210.0	16.0	220.0	12.0	215	14.0	225.0	10.0
17	180.0	28.0	185.0	26.0	185.0	26.0	210	16.0	210.0	16.0
24	170.0	32.0	172.4	31.1	180.0	28.0	205	18.0	210.0	16.0
36	168.0	32.8	170.0	32.0	173.7	30.5	180	28.0	209.0	16.4
48			165.0	34.0	173.7	30.5	165	34.0		
54					170.0	32.0				

Fuente: Elaboración Propia

FIGURA N°5. 3

PORCENTAJE DE DEGRADACIÓN DE CIANURO TOTAL



Fuente: Elaboración Propia

Se observa un porcentaje de degradación máxima de cianuro total a un tiempo de 48 horas a un pH: 9.8 y 11,0 de 34%.

5.3. Análisis Anova

➤ Para determinar los coeficientes del modelo matemático multivariable del diseño experimental central compuesto se realizó la siguiente tabla:

TABLA N°5. 13
COLUMNAS GENERADAS PARA EL MODELO MATEMATICO

pH	t	pH²	t²	pH*t	%CN(TOTAL)
10	1	100	1	10	31.052
11	1	121	1	11	18
10	2	100	4	20	34
11	2	121	4	22	20
9.79	1.5	95.88	2.25	14.69	33
11.28	1.5	127.24	2.25	16.92	16
10.5	0.72	110.25	0.51	7.53	26
10.5	2.28	110.25	5.21	23.97	32
10.5	1.5	110.25	2.25	15.75	30.5
10.5	1.5	110.25	2.25	15.75	30.5

➤ Luego se realizó el método de regresión se determinó la estadística de la regresión, el análisis de varianza (ANOVA) y los coeficientes del modelo matemático multivariable.

TABLA N°5.14
ESTADISTICA DE LA REGRESION

Coefficiente de correlación múltiple	0.98592471
Coefficiente de determinación R²	0.97204753
R² ajustado	0.93710695
Error típico	1.67775727
Observaciones	10

➤ De los resultados obtenidos para el coeficiente de correlación múltiple de 0.986, y el R² ajustado de 0,9859; se concluyó que el diseño experimental central compuesto se ajusta al modelo multivariable

TABLA N°5. 15
ANALISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	5	391.548556	78.3097112	27.820	0.00332
Residuos	4	11.2594778	2.81486945		
Total	9	402.808034			

- Del análisis de varianza (ANOVA) se determinó que el valor crítico de F es menor a 0,05 ($0.0033 < 0.05$) esto nos indica que los datos experimentales se ajustan al modelo matemático multivariable.

TABLA N°5. 16
COEFICIENTE DEL MODELO MATEMATICO

Coeficientes	Valores	Error típico	Estadístico t	Probabilidad
X0	-1052.67055	331.564919	-3.17485503	0.03370073
X 1	214.570441	62.004525	3.46056099	0.02580456
X 2	22.4740485	36.1570165	0.62156811	0.56789751
X 3	-10.7209362	2.9358729	-3.65170311	0.02173877
X 4	-3.09917941	2.6813586	-1.15582429	0.31208968
X 5	-0.948	3.35551454	-0.28252001	0.79156116
Coeficientes	Inferior 95%	Superior 95%	Inferior 95.0%	Superior 95.0%
X0	-1973.24235	-132.098755	-1973.24235	-132.098755
X 1	42.4182808	386.722601	42.4182808	386.722601
X 2	-77.9139231	122.86202	-77.9139231	122.86202
X 3	-18.8722262	-2.56964626	-18.8722262	-2.56964626
X 4	-10.5438244	4.34546556	-10.5438244	4.34546556
X 5	-10.2644019	8.36840191	-10.2644019	8.36840191

- El modelo matemático multivariable (ecuación cuadrática) para el diseño experimental central compuesto fue la siguiente:

$$Y = X_0 + X_1 \cdot \text{pH} + X_2 \cdot t + X_3 \cdot \text{pH}^2 + X_4 \cdot t^2 + X_5 \cdot \text{pH} \cdot t$$

- Reemplazando los coeficientes obtenidos para el modelo matemático:

$$\% \text{ Degradación (CT)} = -1052.6706 + 214.57 \cdot \text{pH} + 22.47 \cdot t - 10.72 \cdot \text{pH}^2 - 3.09 \cdot t^2 - 0.948 \cdot \text{pH} \cdot t$$

- A partir del modelo matemático multivariable obtenida se determina para los factores : la basicidad optima del medio y el tiempo de biorremediación
- Entonces la ecuación cuadrática se derivó con respecto a pH y al tiempo se obtiene:

$$\frac{dy}{d\text{pH}} = 214.57 - 21.44 \cdot \text{pH} - 0.948 \cdot t$$

$$\frac{dy}{dt} = 22.47 - 6.19 \cdot t - 0.948 \cdot \text{pH}$$

- Resolviendo el sistema de ecuación con 2 variables se obtiene :

$$\text{pH (optima)} = 9.9$$

$$t \text{ (optima)} = 2.1 \text{ dia} = 50.4 \text{ h}$$

- Finalmente reemplazando en el modelo matemático multivariable se determinó la máxima porcentaje de degradación de cianuro total para la condición óptima de biorremediación.

$$\% \text{ Degradación (CT)} = -1052.6706 + 214.57 \cdot \text{pH} + 22.47 \cdot t - 10.72 \cdot \text{pH}^2 - 3.09 \cdot t^2 - 0.948 \cdot \text{pH} \cdot t$$

$$\% \text{ Degradación optima (CT)} = 34.64\%$$

- En la tabla siguiente se muestra los parámetros óptimos del proceso de biorremediación de efluente cianurado utilizando *pseudomonas alcalófilas*.

TABLA N°5. 17

PARAMETROS ÓPTIMAS DEL PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN

Compuesto a ser removido	Microorganismos	Concentración	Parámetros Óptimos	
			pH	t(días)
Cianuro total	<i>Pseudomonas alcalófilas</i>	250ppm	9.9	2.1

Fuente: Elaboración Propia

VI. DISCUSION DE LOS RESULTADOS

6.1. Contraste de la hipótesis con el resultado

a) Hipótesis General:

Se obtuvo los parámetros óptimos a pH:10,0 y un tiempo de 2,1 días en el proceso de biorremediación de efluente cianurado, además se obtiene el porcentaje de degradación de cianuro total del 34,64%. De la estadística se obtiene un coeficiente de 0,986 entonces el proceso es significativo, demostrando la **hipótesis general**.

b) Hipótesis específica

- Según los resultados del diseño experimental, se obtiene un pH óptimo de 10,0 en el proceso de biorremediación de efluente de cianuro, que se encuentra en el rango de 10,0 a 11,0, demostrando la **hipótesis específica 1**.
- Del proceso de biorremediación óptima de efluente cianurado se obtuvo a un tiempo de 2,1 días o 50,4 horas, que se encuentra aprox. en el rango de 1 a 2 días, demostrando la **hipótesis específica 2**.

6.2. Contratación de resultado con otros estudios similares

En este estudio realizado por Z.Khamar *et al* "Remediación de cianuro en la laguna de mina de relaves de oro por una nueva bacteria co-cultivo", se puede comparar con los resultados obtenidos.

- Los resultados tienen una variación en el tiempo de degradación cianuro total debido a que el microorganismo aislado BN1 por Z.Khamar *et al* fue de 96 horas comparado con los resultados de la investigación que fue de 50,4 horas o 2,1 días.
- El pH empleado en ambos casos es el medio básico, en *al* fue de 9,5 pero en nuestro caso fue de pH: 10,0 con un porcentaje de formación de cianuro cianhídrico (HCN) menor al 10%.
- Las concentraciones de cianuro total en los relaves es muy similar, debido al control de la dosificación de cianuro de sodio en la cianuración de minerales auríferos.
- El porcentaje de biorremediación de cianuro total en Z.Khamar *et al* fue de 66% pero en nuestra investigación con los parametros optimas fue del 34% .

En el estudio realizado por el Ing. Tuya Salas, Jonathan David "Evaluación de capacidad degradativas de cianuro por bacterias alcalófilas aisladas de los relaves de la planta concentradora de metales Mesapata Cátac-Ancash", expresa lo siguiente:

- Los resultados mostrados por Tuya, tolerando concentraciones de hasta 100 mg/L de CN^- a pH 11,0 con cepas (P-CIAN 2, P-NUT 1 y P-KING 2) y en nuestra investigación las *pseudomonas alcalófilas* toleraron hasta concentraciones de cianuro total de 250ppm a pH: 11,0.

- El porcentaje de biorremediación de cianuro total en Tuya fue de 66% pero en nuestra investigación con los parametros óptimas fue del 34%.
- En esta tesis se degrado cianuro de plantas concentradoras de metales, obteniendo resultados muy similares al de la investigación que degrado efluente cianurado.

En este estudio realizado por la Jasmin Hurtado, Arturo Berastain Jasmin Hurtado y Arturo Berastain (2012) en su trabajo de investigación “Optimización de la Biorremediación en relaves de cianuración adicionando nutrientes y microorganismos”.

- Los resultados mostrados tienen una variación en el tiempo de degradación cianuro total en la biorremediación de cianuro utilizando 3 cepas de *Pseudomonas s.p* utilizado por la Jasmin Hurtado que fue de 4 semanas es muy lento, e incluso empleando nutrientes como el lactato, acetato de sodio y un cultivo mixto de (BSR+BC), en comparación con nuestra investigación que fue de 50,4 horas o 2,1 día.
- El porcentaje de biorremediación de cianuro total en el estudio realizado por Jasmin Hurtado fue de 12% en comparación nuestra investigación que fue de 34.0% con los parametros óptimos de pH y tiempo.
- En ambas investigaciones se utilizó relaves de cianuración, biorremediando con pseudomonas.

- En ambas investigaciones las concentraciones de los relaves de cianuro total fue 200ppm y en nuestra investigación fue de 250ppm.

VII. CONCLUSIONES

a) En el presente estudio de investigación se determinó que los parámetros óptimos fueron : pH= 10, 0 y un tiempo de 2,1 día o 50,4 horas para la biorremediación de efluente cianurados , utilizando *pseudomonas alcalófilas*.

b) Se evaluó que a un pH 10 se obtiene un porcentaje máximo de degradación de efluente de cianuro de 34,64 %.

c) Se evaluó al tiempo óptima a un valor de 2,1 día o 54 horas se obtiene una porcentaje de degradación de 34,64% que se adapta al modelo matemático , sin embargo la concentración final se encontró por encima del LMP de descarga de efluente cianurado .

VIII. RECOMENDACIONES

- a)** En la caracterización del efluente de cianuro se recomienda mantener en recipiente de plástico estéril, mantener en la oscuridad a una temperatura de ambiente unas horas antes de ser analizadas en el laboratorio y a un pH mayor de 10.5.
- b)** En pruebas de biorremediación considerar el parámetro de potencial de óxido reducción ORP (mv) para determinar los compuestos de cianuro que se forman en el proceso.
- c)** Se recomienda que en trabajos similares de biorremediación de efluente cianurado, considerar los parámetros de contenido de amoníaco y el hierro en cianuro residual biorremediado .
- d)** Seguir investigando alternativas amigables con el medio ambiente para el tratamiento de aguas contenidos con cianuro de las industrias tales como minería y galvanoplastia, joyería, etc.

IX.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9.1. Referencias- textos

1. AREVALO S. (2011).*Control de efluentes cianurados mediante la oxidación con Peroxido de Hidrogeno en un laboratorio de análisis de minerales* (Tesis pregrado). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima.
2. ARGENBIO. (2006).Programa Educativo Por Qué Biotecnología, *El cuaderno de Por Qué Biotecnología*, N°36.
3. ATLAS RM y PRAMER D. (1991). Bioremediation of Fossil Fuel Contaminated Soils. *In Situ Bioreclamation*, Pág 14-32.
4. AKCIL, A., KARAHAN, A.G., CIFTCI, H., SAGDIC, O, (2003). Biological treatment of cyanide by natural isolated bacteria *Pseudomonas sp .Min. Eng*, Vol 16, Pág. 643-649.
5. A.Y DURSUN, *et al.* (1999). Degradation of ferrous (II) cyanide complex ions by *Pseudomonas fluorescens*. *Process Biochemistry*, Vol 34, Pág. 901–908 .
6. GREENBERG A.E., APHA, C.L.S CLESCERI, WEF Y A.D. EATON, AWWA. (1992). *Standard Methods for the Examination of Water and Waste water* (18th ed).

7. BRUCE E. R, PERRY L. (2001). *Environmental Biotechnology: Principles and Applications*, Mexico. Editorial Mc Graw-Hill
8. BREED R. Bergey's. (1997). *Manual of determinate bacteriology* (7th Ed). London: Williams and Wilkins Co. Baltimore.
9. COTTON, F. A. & WILKINSON, G. (1972) *Advanced Inorganic Chemistry*. (Third Ed). Inc. ISBN 0-471-17560.
10. DÍAZ X, C. R. (Julio, 1999). *Bioremediation of cyanide leaching residues in Process Metallurgy*. International biohydrometallurgy symposium: 595-606 Von. El sevier, Amsterdam, Oxford.
11. ESTEBAN M. & DOMIC M. (2001) *Hidrometalurgia, fundamentos, procesos y aplicaciones*, pág. 198.
12. MISARI.F. (2010). *Metalurgia del oro*. Lima: Editorial San Marcos.
13. GÓMEZ, P. L. (2012). *Degradación de cianuros mediante oxidación química de efluentes industriales* (tesis de Maestría). Departamento de Química orgánica e Inorgánica, Universidad de Oviedo. Oviedo.
14. GURBUZ *et al.* (2004). Microbial detoxification of cyanide solutions: a new biotechnological approach using algae. *Hydrometallurgy*, Vol (72), 167-176.
15. GUPTA, *et al.* (2010). Enzymatic Mechanism and Biochemistry for Cyanide Degradation: A Review. *J. Hazard. Mater*, Vol (176), p.1–13.

16. HURTADO, J & BERASTAIN, A. (2012). Berastain. Optimización de la Biorremediación en relaves de cianuración adicionando nutrientes y microorganismos. *Revista peru.biol.* Vol (19 (2)), Pag.187-192.
17. KHAMAR, Z *et al.* (2014). Remediation of cyanide from the gold mine tailing pond by a novel bacterial co-culture. *International Biodeterioration and Biodegradation*, Vol. (99.No 49), Pág. 123 a 128 .
18. LUQUE, ALMAGRO, (2004). *Metabolismo del cianuro y del cianato en Pseudomonas pseudoalcaligenes CECT5344*. Aplicaciones Biotecnológicas. VII Premio Unicaja de Investigación sobre Desarrollo Económico y Estudios Agrarios. España.
19. LUQUE, ALMAGRO *et al.* (2016). Biodegradation of cyanide wastes from mining and jewellery industries. *El Sevier Current Opinion in Biotechnology* Vol (38). Pag 9 a 13.

Disponible en:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958166915001676>.
20. MACFADDIN, J. (1980). *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. Buenos aires: Medica Panamericana S.A.p.370.
21. MEKUTO, *et al.* (2013). Biodegradation of Free Cyanide Using Bacillus Sp. Consortium Dominated by Bacillus Safensis, Lichenformis and Tequilensis Strains: A Bioprocess Supported Solely with Whey. *Journals Bioremediation & Biodegradation* .

22. MURILLO M, *et al.* (2015). Degradación de cianuro de sodio por pseudomonas sp. a dos temperaturas y tres pH” en *Revistas. untru.*
23. NICHOLAS J. Ashbolt. (2015). *Curr Environ Health Rep.* 2015; Vol (2(1)), Pag.95-106.
24. MINAM .DECRETO SUPREMO N° 010. (2010). *Aprueban límites máximos permisibles para la descarga de efluentes líquidos de Actividades Minero – Metalúrgicas.*
Disponible en:
<http://www.minam.gob.pe/disposiciones/decreto-supremo-n-010-2010-minam/> . Consultado el 15 de Enero de 2016.
25. PERÚ, MINEM. Resolución Directoral N° 025-96-EM/DGAA (1996). *Aprueba la publicación de las siguientes Guías Ambientales: Guía para el manejo de cianuro y Guía Ambiental para el manejo de reactivos y productos químicos.* Pág. 1-2,7-14.
26. PERENGUEZ B, Valdez C.(2017). *Análisis de remoción de cadmio por acción de la micro alga Chlorella sp. inmovilizada en perlas de alginato.* (tesis Ingeniería en Biotecnología de los Recursos Naturales). Universidad Politécnica Salesiana, Quito.
27. SMITH, A. & MUDDER, T. (1991). *The Chemistry and Treatment of Cyanidation Wastes, Mining, en Journal Books Ltd, London, p. 345.*

28. SUH Y, PARK J, YANG J. (1994) .Biodegradation of cyanide compounds by *Pseudomonas fluorescens* immobilized on zeolite. *Enzyme and microbial technology*. Vol (16(6)), Pag. 529-533.
29. STEPHEN Ebb .(2004).Biological degradation of cyanide compounds. *Current Opinion in Biotechnology*, Vol (15), Pag 231–236.
30. TRADE map. (2016).Lista de los países exportadores para Cobre y Oro en 2016 [Internet]. Ginebra: Trade map. Available from: <http://www.trademap.org/Index.aspx>. Consultado el 28 de Abril de 2018.
31. TUYA ,S (2014). *Evaluación de capacidad degradativa de cianuro por bacterias alcalófilas aisladas de los relaves de la planta concentradora de metales Mesapata Cátaç-Ancash* (Tesis pregrado). Lima. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
32. VALLEJO, et al. (2010). *Análisis comparativo in vitro de la actividad biodegradadora de bacterias del genero Pseudomonas sp. y microorganismos nativos, para su uso en un proceso de biorremediación in situ de sales de cianuro.*

:

X. ANEXOS

10.1. Lugar y recolección de muestra

FIGURA 10.1
RECOLECCIÓN DE MUESTRA DE RELAVE



Fuente: Minera Paraíso 2016

➤ **Caracterización del efluente cianuro**

Se determinó el contenido de cianuro total, cianuro libre , cianuro WAD (mg/L) del efluente cianurado en Laboratorio Actlabs Skyline Perú S.A.C.



Registro N° LE -029

INFORME DE ENSAYO N° 2-00353/17

Solicitante : **YURI CASTILLO ALVAVE**
Domicilio Legal : Calle 1 LT-1A Mz-D Esq. Con Calle A Urb. Industrial Bocanegra
. Callao 1. Lima.
Producto Declarado : **AGUA RESIDUAL NO DOMESTICA**
Lugar de Muestreo : Cia Minera Macdesa SAC , Chala-Arequipa
Fecha de Muestreo : 2017 – 06 – 20
Método de Muestreo para el : NTP-ISO 5667-10-2012. Calidad de agua. Muestreo. Parte 10: Guía
muestreo de aguas residuales no doméstica.
Cantidad de muestra para ensayo : 1 muestras puntuales
Forma de presentación : En frascos de plástico y vidrio, cerrados, preservados y
refrigerados.
Identificación de la muestra : **P-1 BUZON FINAL DE EFLUENTE**
Fecha de recepción : 2017 – 06 – 21
Fecha de inicio del ensayo : 2017 – 06 – 22
Fecha de término del ensayo : 2017 – 06 – 23
Ensayo realizado en : Laboratorio Ambiental
Identificada con : **H/S 15000096 (00237)**
Validez del documento : Este documento es válido solo para la muestra descrita.

Muestras Puntuales		Ensayo / Resultados
Nº Muestra	Fecha	Cianuro Total (mL/L) (LD: 0,001 mg/L)
1º Toma	2017-06-23	250.37

LD: Limite de Detección

Métodos :

Cianuro Total: SMEWW-APHA-AWWA-WEF Part 4500-CN-C,E, 22nd Ed. Cyanide. Colorimetric Method. 2012

OBSERVACIONES

Informe de ensayo emitido en base a resultados de nuestros laboratorios sobre muestras proporcionadas a ALS LS PERU S.A.C.
Prohibida la reproducción total o parcial de este informe, sin la autorización escrita de ALS LS PERU S.A.C.
Los resultados de los ensayos no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce.

Callao, 25 de Junio del 2017
KC

ING. FELIPE CAMPOS YAUCE

CIP: 136871

JEFE DELABORATORIO

10.2 Medios de cultivo

a) MEDIO MINIMO MINERAL MODIFICADO (M9)

Medio líquido compuesto de sales y extracto de levadura como fuente de nitrógeno, donde se da las condiciones mínimas de crecimiento (véase el cuadro N°10.1).

CUADRO N°10.1
MEDIO MINERAL M9

COMPONENTES	CONCENTRACION (g/L)
Extracto de levadura	2
K ₂ HPO ₄	1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2
Traza de Mineral	0.2 mL
Buffer carbonato-bicarbonato	13.3 mL
Acetato de Sodio	2

Fuente: Luque-Almagro et al., 2005

A continuación se presenta se presenta los minerales traza del medio mínimo (véase el cuadro N°10.2).

CUADRO 10.2

MINERALES TRAZA

COMPONENTES	CANTIDAD (g/L)
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,05
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,6
CaCl ₂ .H ₂ O	2,6
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.005
CuCl ₂ .2H ₂ O	0.005
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.05
Na ₂ B ₄ O ₇ .10H ₂ O	0.002
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.0003

Fuente: Huertas et al., 2010.

10.3 Determinación de la concentración celular de microorganismos.

a) Conteo de Neubaver

1. Colocar 10 uL de muestra en la cámara
2. Realizar diluciones en solución salina (0.9%) de ser necesario.
3. Cubrir con la laminilla.
4. Observar en microscopio con un aumento 40X.
5. Contar si los microorganismos, si hay demasiada población se contara en 10 cuadrados pequeños al azar y aplicara la siguiente formula.

$$\text{Población (células/mL)} = (\bar{y}) * (4 * 10^6) \dots EC(1)$$

6. Para el caso de poblaciones bajas se contara 5 cuadrados grandes y se aplicara la siguiente ecuación:

$$\text{Población (células / ml)} = (\bar{y}) * (25 * 10^4)$$

\bar{y} : promedio de células en los cuadrados

Fd: factor de dilución.

b) Conteo en placa

Inoculo inicial de la biomasa en una dilución seriadas hasta 10^{-5} por duplicado en solución salina 0.9% NaCl según la siguiente ecuación:

Para conteo en placa en una dilución de de 10^{-5} realiza de la siguiente manera:

$$\frac{\text{ufc}}{\text{ml}} = x * 10^6 \quad EC(2)$$

Dónde:

x: Número de colonia en placa.

10.4Metodo de Tinción Gram

7. Recoger la muestra para ubicarlas en el microscopio.
8. Hacer el extendido con un palillo de madera
9. Dejar secar a temperatura ambiente o fijarlas utilizando un mechero.
10. Fijar la muestra con metanol durante un minuto o el calor flameando 3 veces aprox.
11. Agregar azul violeta y esperar un min.
12. Enjuagar con agua no directamente sobre la muestra.
13. Agregar lugol y esperar un min aprox.

14. Agregar alcohol acetona y esperar entre 5 a 3 seg, las Gram negativas se decolara las Gram positivas no.
15. Enjuagar con agua destilada.
16. Tinción de contraste agregando safranina o fucsina básica esperar un min.
17. Lavar levemente con agua.
18. Para observar al microscopio óptico es con aceite de inmersión convenientemente hacerlo en un aumento 100X.

10.5 Aislamiento Bacteriano

a) Enriquecimiento de bacterias alcalófilas

Se siguió la metodología propuesta por (Tuya 2014). Se tomaron 6 muestras líquidas de los relaves y del 4 último tanque de planta de procesamiento. Las muestras del 1 hasta 5 se trabajaron en tubos de ensayo se tomó 1 mL de cada muestra y se agregó 9ml de Medio de Cultivo de Acetamida según (Sancho et al. 1996).

Las muestras del 6 y 7 se trabajaron en matraces tomando 10 ml de cada muestra con 90ml caldo Medio Mínimo Mineral según (Tuya 2014) se seleccionó los cultivos que presentaron turbidez.

Las muestras 8 hasta 10 se trabajaron en matraces tomando 10 mL de cada muestra y se agregó 90ml de Medio Acetamida y caldo Medio Mínimo

Mineral se seleccionó los cultivos que presentaron el cambio de viraje rojo intenso / verde y turbidez. Todas las muestras se sometieron en agitación 150 rpm por 5 días se ajustó a pH: 10.5 con NaOH 1M y se controló el pH con un buffer Carbonato – Bicarbonato.

El aislamiento de bacterias se tomó un volumen de 225 mL en recipientes estériles de vidrio y se transportaron según (Nicholas J. Ashbolt 2015) a temperatura < 10°C horas antes de ser analizadas en el laboratorio de Microbiología Ambiental y Biotecnología – UNMSM.

En el aislamiento primario, se realizó para todas las muestras del 1 hasta 10 se observó las características de la colonia después de 24 horas a temperatura 28° C, tales como el color verdoso de las colonias en placa, la morfología y se realizaron la tinción Gram. En las placas con Agar Cetrimide se observó que las muestras 1 y 5 presentan bacilos pequeños Gram negativos, en las muestras 2 y 3 son cocos Gram positivos y en la muestra 4 bacilos pequeños Gram positivos. La cepa de la muestra 1 se estió en placa Agar Medio Minino Mineral modificado, se observó las características de la colonia de *pseudomonas alcalófilas*, la forma de pequeños bacilos y la presencia del color verdoso

Las muestras del 6 se observó los bacilos pequeños Gram positivas y la muestra 7 se observó los bacilos pequeños Gram negativos confirmando la presencia *pseudomonas s.p.*

Las muestras 8 hasta 10 en Agar Cetrimide se observó los bacilos pequeños Gram negativos confirmando la presencia *pseudomonas aeruginosa*. Las muestras 8 hasta 10 en Agar Medio Mínimo Mineral se observó los bacilos pequeños Gram negativos confirmando la presencia *pseudomonas s.p.*

El aislamiento secundario bacteriano, se obtuvo cepas puras en las muestras del 1 hasta 5 realizando cultivo sucesivo en Agar nutritivo, se realizó la tinción Gram observando en las muestras 1 y 5 la forma de bacilos pequeños Gram-negativas.

b) Aislamiento y selección de bacterias alcalófilas

El aislamiento primario bacteriano, en todas las muestras se sembró mediante el método de diseminación en placa. En las muestras de 1 hasta 5 se estió en Agar Cetrimide que es selectivo para *pseudomonas*. La cepa de la muestra 1 también se seleccionó las colonias de *pseudomonas* en Agar Medio Mínimo Mineral Modificado M9 que contiene (g /l): $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (12,8); KH_2PO_4 (3); NaCl (0,5); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5); CaCl_2 (0,1); acetato de sodio 0,2% (w / v); extracto de levadura 0,2% (w / v); y (v/v) mezcla de sales minerales (g/l): $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,05); $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,05); $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,005);

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.005); $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (0.002); $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,0003)
(Luque- Almagro et al., 2005).

Las muestras del 6 y 7 se estriaron en Agar Medio Minino Mineral para simular las condiciones oligotróficas del relave minero. Las muestras 8 hasta 10 se estriaron en placa Agar Medio Minino Mineral .Todas las muestras se sembraron a 25°C y se incubo por 5 días, se ajustó a pH: 10 con NaOH 1M y se controló el pH con un buffer Carbonato – Bicarbonato. El aislamiento secundario bacteriano, se realizó para la muestra 1 hasta 5 en cultivo sucesivo en Agar nutricio y Agar King B para obtener cepas puras de acuerdo a las características organolépticas, morfológicas de las *pseudomonas*.

10.6 Identificación de Bacterias Alcalófilas

Para la identificación presuntiva de las bacterias, se realizó la observación morfología de las colonias en medio de cultivo, el cambio de viraje, la tinción Gram. La identificación final se realizó únicamente sobre las cepas que mostraron un buen rendimiento en el ensayo de biodegradación de cianuro.

a) Selección e identificación de bacterias alcalófilas

La identificación presuntivamente de las cepas aisladas de las 10 muestras e relave y último tanque de planta en cultivos de Acetamida y Medio Mínimo Mineral (véase en la tabla N°10.1).

TABLA 10.1
IDENTIFICACION DE MICROORGANISMOS

Muestra	pH	Tipo de muestra	Medio de cultivo	Morfología Bacteria	Identificación Gram
1	10.5	Relave	Acetamida	Bacilos	-
2	10.5	Relave	Acetamida	Cocos	+
3	10.5	Relave	Acetamida	Cocos	-
4	10.5	Planta	Acetamida	Bacilos	+
5	10.5	Planta	Acetamida	Bacilos	-
6	10,5	Planta	Medio Mineral	Bacilos Pequeños	+
7	10,5	Planta	Medio Mineral	Bacilos pequeños	-
8	10,5	Planta	Medio Mineral		-
9	10,5	Planta	Acetamida	Bacilos	-
10	10,5	Planta	Acetamida	Bacilos	-

Fuente: Elaboración Propia

b) Conservación bacterias alcalófilas

En la conservación de cepas aisladas de las muestras 1 y 5 como *pseudomonas alcalófilas* se mantuvieron después del cultivo sucesivo al 70% en Agar Nutricio en plano inclinado a 4°C y en medio de Caldo nutriente suplementado con 30% (v / v) de glicerol a -20°C para tiempos largos.

Se realizó un microcepario para la conservación de cepas aisladas de las muestras 1 y 5 como *pseudomonas alcalófilas* se mantuvieron después del cultivo sucesivo al 70% en Agar Nutricio en plano inclinado a 4°C y en medio

de Caldo nutriente suplementado con 30% (v / v) de glicerol a -20°C para tiempos largos.

c) Reactivación de bacterias alcalófilas

En la reactivación se utilizó la cepa aislada de la muestra 1 identificada presuntivamente como pseudomonas alcalófilas en 10 ml Cado Nutricio por triplicado, se usó un banco de cepario (germoplasma) o en cepario en plano inclinado del ensayo C.

Se reactivó la cepa de la muestra 1 en Caldo nutricio a pH: 10,5 fue por un periodo de tiempo de 48 horas se observó turbidez en el tubo número 1, presenta sedimento, control negativo. Se realizó un conteo en cámara de Neubaver obteniéndose poblaciones de $2,5 \cdot 10^6$ - $4 \cdot 10^6$ ufc/ ml.

10.7 Adaptación de pseudomonas aislada al cianuro

El procedimiento para la adaptación se utilizó una cepa de pseudomonas reactivada del ensayo anterior al cianuro de sodio en medio mínimo modificado a nivel de tubo de ensayo de 20ml es la siguiente:

a) Preparación DE 100 mL de NaCN AL 1%

- Pesar 10 g cianuro de sodio al 100%.
- Vaciar el reactivo pesado en una fiola 100ml tipo A.
- Agregar 90ml de lechada de cal.
- $0.05g \text{ cal}/10ml \times 90ml \text{ de cianuro} = 0.45g \text{ cal}$

- Etiquetar o rotular la solución preparada con el nombre de la solución y guardarlo en un lugar seguro.
- $1\% = 10000\text{ppm} = 10\text{g/L}$

b) Preparación de 100 mL de NaCN al 0,1%

- Tomar 10 ml de NaCN al 1%
- Vaciar el reactivo pipeteado en una fiola 100ml.
- Agregar 90 ml de lechada de cal.
- Etiquetar o rotular la solución preparada con el nombre de la solución.

c) Preparación de la solución 0.01M de AgNO_3

- Pesar 2.1664 g/L AgNO_3 utilizar vaso precipitado agregar agua destilada 70ml agitar hasta disolver en su totalidad.
- Trasladar a la fiola de 1000ml.
- Lavar el vaso con agua destilada eliminando toda el resto de reactivado y las aguas de lavado trasvasar a la misma fiola, agitar.
- Aforar hasta enrase trasvasar al frasco de la bureta de cero automático.

d) Estandarización de la solución de AgNO_3

- En los vasos de precipitado de 100ml pipetear 3x5ml de la solución de 0.01M de AgNO_3 al 0.1%.
- Agregar a cada una tres (03) gotas de solución de KI al 5%.

- Titular con la solución de nitrato de plata hasta que la solución vire de transparente a amarillo pálido/lechoso que el punto final de la titulación , anotar el volumen de gasto (4ml que se predeterminado) para determinar la fuerza de cianuro.

CALCULOS:

- Preparación de la solución 0.01m de AgNO_3

$$\text{AgNO}_3 \left(\frac{\text{g}}{\text{L}} \right) = \frac{[\text{NaCN}] * \text{Volumen NaCN} * \text{PM}_{\text{AgNO}_3}}{\text{PM}_{\text{NaCN}} * \text{Volumen Gasto}_{\text{AgNO}_3}} \quad EC(3)$$

Dónde:

$$[\text{NaCN}] = 0.1\% = (1\text{g/L}) = 1000\text{ppm o mg/L} = 1000\text{ppm}$$

$$\text{Volumen NaCN alicota} = 5\text{ml}$$

$$\text{PM AgNO}_3 = 169,874(\text{mol/L})$$

$$\text{PM NaCN} = 98,016(\text{mol/L})$$

$$\text{Volumen de gasto AgNO}_3 = 4\text{ml}$$

Reemplazando datos:

$$\text{AgNO}_3 \left(\frac{\text{g}}{\text{L}} \right) = \frac{[1\text{g/L}] * 5\text{ml} * 169,874 \left(\frac{\text{mol}}{\text{L}} \right)}{98,016 \left(\frac{\text{mol}}{\text{L}} \right) * 4\text{ml}} \quad EC(4)$$

$$= 2.1164 \text{ (g/L)}$$

e) Estandarización de solución de AgNO₃

$$\text{NaCN} \left(\frac{\text{g}}{\text{L}} \right) = \frac{[\text{AgNO}_3] * \text{Volumen AgNO}_3 * \text{PM}_{\text{NaCN}}}{\text{PM}_{\text{AgNO}_3} * \text{Volumen Gasto}_{\text{NaCN}}} \quad EC(5)$$

Dónde:

$$[\text{AgNO}_3] = 2.1164 \text{ (g/L)}$$

$$\text{PM NaCN} = 98,016 \text{ (mol/L)}$$

$$\text{Volumen de gasto AgNO}_3 = 4 \text{ ml}$$

$$\text{PM AgNO}_3 = 169,874 \text{ (mol/L)}$$

$$\text{Volumen NaCN alicota} = 5 \text{ ml}$$

Reemplazando datos para obtener el factor de contenido de cianuro libre en cualquier muestra analizada.

$$\text{CN}^- \left(\frac{\text{g}}{\text{L}} \right) = \frac{[2.1164 \text{ g/L}] * \text{Volumen de Gasto AgNO}_3 * 98.016 \left(\frac{\text{mol}}{\text{L}} \right)}{169.874 \left(\frac{\text{mol}}{\text{L}} \right) * 5 \text{ ml}} \quad EC(6)$$

$$\text{CN}^- \left(\frac{\text{g}}{\text{L}} \right) = 0.25 * \text{Volumen de Gasto AgNO}_3$$

$$\text{CN}^- \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) \text{ o ppm} = 0.25 * 1000 * \text{Volumen de Gasto AgNO}_3 \quad EC(7)$$

f) Evaluación de la tolerancia de las pseudomonas alcalófilas al cianuro

- Se siguió la metodología por Tiago *et al.*, 2004, se inoculó 1 ml de un cultivo de una cepa reactivada de pseudomonas alcalófilas en medio de cultivo de Medio Mínimo Mineral líquido M9 que contiene (g/l): $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (12,8); KH_2PO_4 (3); NaCl (0,5); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5); CaCl_2 (0,1); acetato de sodio 0,2% (w / v); extracto de levadura 0,2% (w / v); y (v/v) mezcla de sales minerales (g/l): $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,05); $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,05); $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,005); $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,005); $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (0,002); $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,0003) (Luque- Almagro *et al.*, 2005).
- El medio fue complementado con diferentes concentraciones de soluciones de cianuro de sodio a 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm, 200 ppm por duplicado y una concentración de 100 ppm como control para la volatilización de cianuro, todos los cultivos se ajustaron a pH: 10.5 tamponado con buffer carbonato-bicarbonato 0,1 M. Los cultivos se incubaron en agitación a 150 rpm durante 5 días a temperatura ambiente.
- Se preparó un blanco para el control de cianuro de 100 ppm.

La cepa seleccionada tenía una concentración celular al inicio de $2.0 \cdot 10^6$ ufc/ml, logró tolerar rápidamente frente a concentración de cianuro libre (CN^-) hasta 100 mg/L en un periodo 72 horas, en agitación. Sin embargo, la cepa tolera concentraciones de 150 a 200 mg/L de CN^- mostrando un crecimiento lento. Se representan los resultados de la prueba de tolerancia a

diferentes concentraciones de cianuro de las pseudomonas alcalófilas (véase la tabla N°10.2).

TABLA N°10. 2
TOLERANCIA DE BACTERIAS ALCALÓFILAS DE LA CEPA DE LA MUESTRA 1 A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CIANURO DE 50PPM, 100PPM,150PPM Y 200PPM

CEPAS	CN ⁻ (mg/L)			
	50	100	150	200
P-CETR1	+++	+++	+	+

Fuente: Elaboración Propia

: Sin crecimiento, +: Crecimiento lento, ++: Crecimiento moderado, +++: Crecimiento rápido

Por la prueba de tinción, se observa la forma de bacilos pequeños Gram negativos para diferentes concentraciones con cianuro de 50, 100, 150 y 200ppm.

g) Evaluación de la degradación de cianuro de sodio

Del ensayo anterior al 10% de inóculo en Medio Mínimo Mineral suplementado con diferentes concentraciones de cianuro de 50, 100,150 y 200ppm fue preparado y evaluado para la degradación de cianuro libre (CN⁻) a pH: 10.5 tamponado con buffer carbonato-bicarbonato 0,1 M. Se preparó

un blanco para el control de cianuro de 100ppm, la biodegradación de cianuro se calculó de la siguiente ecuación de balance de masa (Mekuto et al., 2013).

$$CN_B^- = CN_S^- - (CN_R^- + CN_V^-) \quad EC(8)$$

$$CN_V^- = (CN_{V0}^- + CN_{Vf}^-) \quad Ec(9)$$

Dónde:

CN_S^- : Concentración inicial F-CN en el Caldo de cultivo (mg / L).

CN_R^- : Concentración residual F-CN medido en el cultivo (mg / L).

CN_V^- : Concentración de cianuro que volatiliza durante la incubación de cultivo (mg / L).

CN_B^- : Concentración de cianuro F-CN que se biorremedia (mg / L)

CN_{V0}^- : Concentración de cianuro inicial en los cultivos de control (mg / L)

CN_{Vf}^- : Concentración de cianuro final en los cultivos de control (mg / l).

El cultivo de *pseudomonas alcalófilas* en Medio Mínimo Mineral del ensayo anterior fue evaluado para la degradación de cianuro libre. El cianuro residual (CN_R^-) de 50 y 100 mg CN/L después 48 horas fue 42.7 y 50,2 mg CN/L respectivamente, obteniéndose el 85.4% y 50% , respectivamente Utilizando la ecuación N°3, para calcular la concentración de cianuro que se biorremedia (CN_B^-), tomando en cuenta la volatilización del blanco de cianuro , de la ecuación N°8.

$$CN_B^- = CN_S^- - (CN_R^- + CN_V^-)$$

CN_S^- : Concentración inicial F-CN en el Caldo de cultivo (mg / L).

CN_R^- : Concentración residual F-CN medido en el cultivo (mg / L).

CN_B^- : Concentración de cianuro F-CN que se biorremedia (mg / L)

El blanco para el control de cianuro a 100ppm se tiene de la ecuación N°9:

$$CN_V^- = (CN_{V0}^- + CN_{Vf}^-)$$

CN_V^- : Concentración de cianuro que volatiliza durante la incubación de cultivo (mg / L).

CN_{V0}^- : Concentración de cianuro inicial en los cultivos de control (mg / L)

CN_{Vf}^- : Concentración de cianuro final en los cultivos de control (mg / l).

Tomando datos de la figura N°10.2:

$$CN_V^- = (100 - 95)$$

$$CN_V^- = 5ppm$$

Reemplazando datos en la ecuación N°8, tomando datos de la tabla N°10.3 y 10.4 para la concentración inicial de 150ppm.

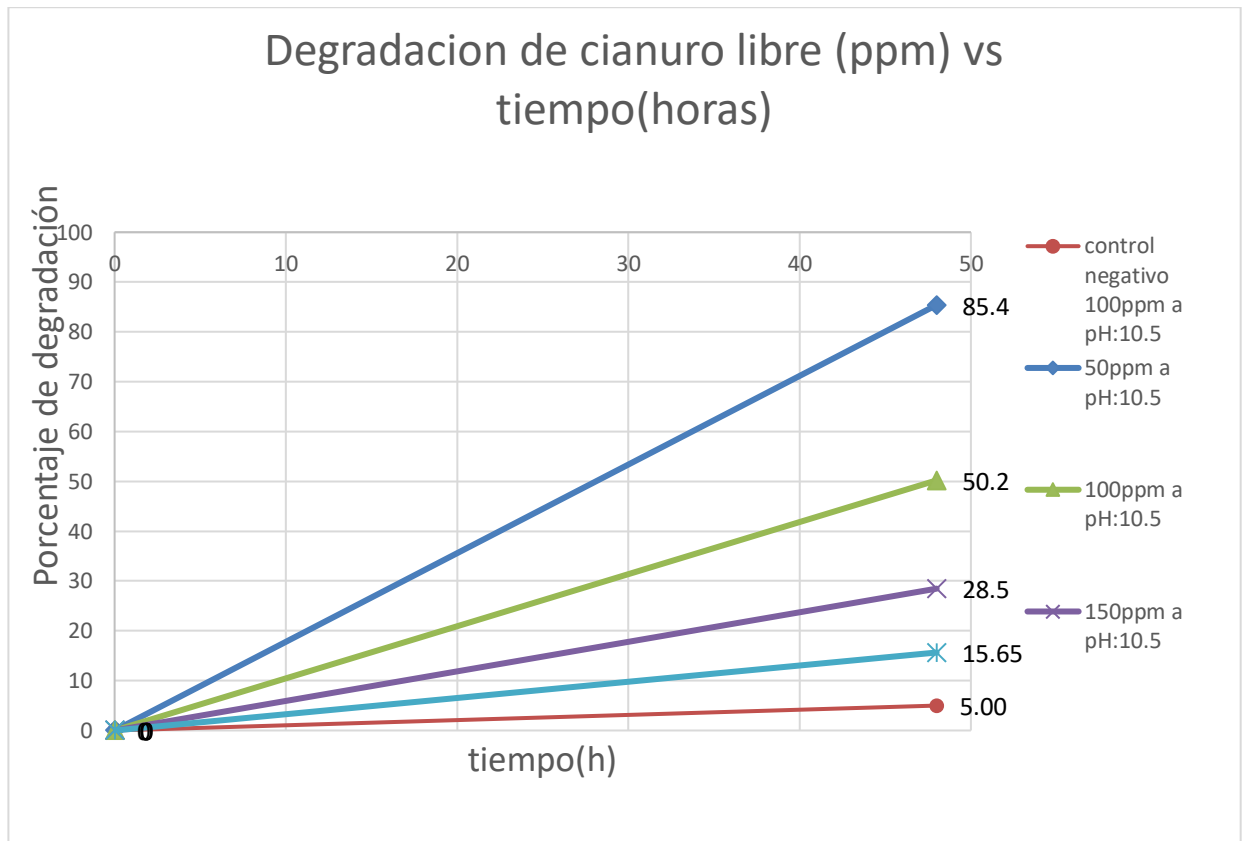
$$CN_B^- = CN_S^- - (CN_R^- + CN_V^-)$$

$$CN_B^- = 150 - (102.3 + 5)$$

$$CN_B^- = 42.7 \text{ ppm}$$

FIGURA N° 10.2

BIODEGRADACIÓN DE CIANURO 50PPM ,100PPM.150PPM Y 200 PPM
EN MEDIO MINIMO MINERAL



Fuente: Elaboración Propia

Se observó que los microorganismos eran capaces de biorremediar 42.7 y 31.3mg CN⁻/L de 150 y 200 mg CN⁻/L de soluciones de cianuro, respectivamente, donde se observó que la formación de especies bacilos pequeños de *Pseudomonas* fueron capaces para soportar y degradar la

concentración de cianuro libre (CN⁻) en cultivos que contienen la concentración de hasta 200 mg CN⁻/L. Se observa los resultados de la evaluación del abatimiento de contenido de soluciones de cianuro cultivado en Medio Mínimo Mineral con bacterias *pseudomonas alcalófilas*. (Véase en la tabla N°10.3).

TABLA N°10.3

EVALUACIÓN DE ABATIMIENTO DE CIANURO UTILIZANDO UNA CEPA DE PSEUDOMONAS

Concentración de cianuro inicial (CNs)	Volumen gastado	Concentración de cianuro residual (CN _R)	%Degradación	Tiempo(días)
50	0.085	50.0	85.4	0
50	0.085	47.0		1
100	0.1	100	50	0
100	0.1	70.0		1
150	0.145	150.0	28.5	0
150	0.09	103		1
200	0.195	200	15	0
200	0.05	163		1
Control negativo	0.1	100		0
100ppm	0.095	100		1
	0.090	95	5.0	2

Fuente: Elaboración Propia

10.8 Adaptación de pseudomonas alcalófilas al efluente de cianuro a nivel de matraces de 250ml

a) Evaluación de la tolerancia de las *pseudomonas alcalófilas* al efluente de cianuro

- Se siguió la metodología por Tiago *et al.*, 2004, se inoculo 10%(v/v) de cultivo en caldo nutritio en matraces de 250ml con 0, 20, 40, 60, 80 y 100 ml de Medio Mínimo (M9). El medio fue complementado con 90, 70, 50, 30, 10 y 0 ml de efluente de cianuro con una concentración de cianuro libre de 700ppm de cianuro libre, dando una concentración de cianuro al inicio en los matraces de 700ppm, 545ppm, 390ppm, 233ppm y 78ppm.
- Se preparó un blanco con efluente de cianuro de concentración 700ppm como control para la volatilización de cianuro, todos los cultivos se ajustaron a pH: 10.5. Los cultivos se incubaron en agitación a 150 rpm durante 7 días a temperatura ambiente.
- Se realizó un conteo en placa con Agar nutritio a pH: 10.5 una dilución hasta 10⁻⁵ por 24 horas provenientes de los cultivos concentraciones de cianuro libre de 700, 545, 390, 233, 78ppm.
- Se realizó la prueba de tinción después de 5 días en los matraces de concentraciones de cianuro de 700ppm, 545ppm, 390ppm, 233ppm y 78ppm después de 7 días.
- Los cultivos fueron incubados a temperatura ambiente por 7 días. Se determinó el nivel óptimo de pH en función al crecimiento microbiano, evidenciado por la turbidez en los tubos de prueba. Para ello se empleó el criterio: Sin crecimiento (-), Poco crecimiento: (+), Crecimiento moderado: (++) y Crecimiento abundante: (+++), el cual corresponde aproximadamente a 0; 0,5; 1 y 2 de la Escala de McFarland, respectivamente.

➤ Finalmente se evaluó la cinética de crecimiento (ufc/ml Vs t) y biodegradación de cianuro (ppm Vs tiempo) del efluente del proceso de lixiviación de oro, el porcentaje de degradación (%Degradación CN-1 Vs tiempo) de cianuro libre.

➤ Para la evaluación de la tolerancia de las *pseudomonas alcalófilas* al efluente de cianuro, se realizó un conteo en placa con Agar nutricio a pH: 10.5 una dilución hasta 10^{-5} por 24 horas, se observa el crecimiento en placa de los cultivos en 7 días, por consecuencia a la tolerancia a las concentraciones de cianuro de 700, 545, 390,233, 78ppm provenientes de efluente del proceso de lixiviación de minerales auríferos con cianuro. En la tabla N°10.4, se representa los resultados de la prueba tolerancia de las *pseudomonas alcalófilas* al efluente de cianuro, dándonos un crecimiento rápido en todas las concentraciones de cianuro.

TABLA N°10. 4
TOLERANCIA DE PSEUDOMONAS AL EFLUENTE DE CIANURO
700, 545, 390,233, 78PPM EN MEDIO MINIMO MINERAL (M9)

CEPAS	CN ⁻ (mg/L)				
	700	545	390	233	78
P-CETR1	+++	+++	+++	+++	+++

Fuente: Elaboración Propia

Sin crecimiento, +: Crecimiento lento, ++: Crecimiento moderado, +++: Crecimiento rápido: -

Se realizó la prueba de tinción en los matraces de concentraciones de cianuro de 700ppm, 545ppm, 390ppm, 233ppm y 78ppm después de 7 días, se observa que los microorganismos tienen la forma de bacilos pequeños Gram negativos confirmando la presencia de *pseudomonas alcalófilas*

b) Evaluación de la cinética de crecimiento de pseudomonas y degradación de efluente de cianuro

Se realizó la cinética de crecimiento y degradación de cianuro libre por 7 días, el conteo en placa hasta una dilución de 10^{-5} por 6 días y el punto 7 se realizó en cámara de Neubaver, se tomaron muestras cada 24 horas de los cultivos con concentración de 78ppm, 233ppm, 390ppm, 545ppm y 700ppm de cianuro libre proveniente de efluente de cianuro. Se preparó un blanco para el control de cianuro de 700ppm en un periodo de 144 horas.

Para la evaluación de la cinética de crecimiento de pseudomonas, se realizó la cinética de crecimiento y degradación de cianuro libre por 7 días, el conteo de microorganismos en placa se realizó una dilución hasta 10^{-5} por 6 días y el séptimo día se realizó en cámara de Neubaver, para la cinética de crecimiento se tomaron muestra cada 24 horas, de los matraces con cianuro de concentración de 78ppm, 233ppm, 390ppm, 545ppm y 700ppm de cianuro libre proveniente de efluente del proceso de lixiviación de oro (Ver la tabla N°10.5). En todas las concentraciones de cianuro, la

población bacteriana inicial del inculo de *pseudomonas alcalófilas* es de $9.94E+08$ ufc /ml.

TABLA N°10. 5

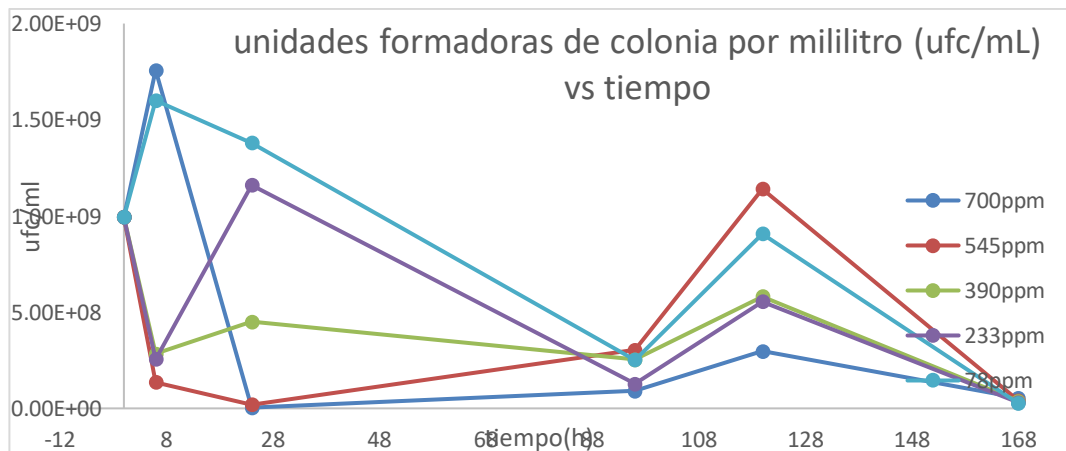
CONTEO EN PLACA DE PSEUDOMONAS ALCALÓFILAS EN CONCENTRACIÓN DE 78PPM,233PPM,390PPM,545PPM Y 700PPM DE CIANURO LIBRE PROVENIENTE DE EFLUENTE A UNA DILUCIÓN (10^{-5})

FECHA DE SIEMBRA 07/09/17 al 14/09/17					
Concentración de cianuro	78ppm	233ppm	390ppm	545ppm	700ppm
tiempo	ufc/mL	ufc/mL	ufc/mL	ufc/mL	ufc/mL
0	$9.94E+08$	$9.94E+08$	$9.94E+08$	$9.94E+08$	$9.94E+08$
6	$1.60E+09$	$2.55E+08$	$2.83E+08$	$1.36E+08$	$1.76E+09$
24	$1.38E+09$	$1.16E+09$	$4.50E+08$	$1.90E+07$	$4.00E+06$
96	$2.52E+08$	$1.28E+08$	$2.53E+08$	$3.03E+08$	$9.10E+07$
120	$9.08E+08$	$5.54E+08$	$5.81E+08$	$1.14E+09$	$2.98E+08$
168	$2.68E+07$	$3.12E+07$	$3.84E+07$	$4.01E+07$	$5.40E+07$

Fuente: Elaboración Propia

FIGURA N°10.3

CINETICA DE CRECIMIENTO DE PSEUDOMONAS ALCALÓFILAS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE EFLUENTE DE CIANURO 78PPM ,233PPM ,390PPM, 545PPM Y 700 PPM EN MEDIO MIMINO (M9)



Fuente: Elaboración Propia

En la concentración de cianuro de 78ppm de cianuro libre a las 6 horas hay crecimiento máximo de $1.38E+09$ ufc/ml y luego a las 96 horas disminuye la población bacteriana de $2.52E+08$ ufc/ml hasta las 168 horas es $2.68E+07$ ufc/ml. En la concentración de cianuro de 233ppm de cianuro libre, la población bacteriana máxima es $1.16E+09$ ufc/ml y luego disminuye hasta $3.12E+07$ ufc/ml en 168 horas. En la concentración de 233ppm de cianuro libre, la población bacteria se mantiene aproximadamente constante de $4.50E+08$ ufc / ml y disminuye hasta $3.84E+07$ ufc / ml en 168horas.

En la concentración de 545ppm de cianuro libre, la población bacteriana disminuye hasta $1.90E+07$ ufc / ml en 24 horas, luego hay un crecimiento máximo de $1.14E+09$ ufc / ml en 120horas y luego disminuye hasta $4.01E+07$ ufc / ml en 168 horas. En la concentración de 700ppm de cianuro libre, la población bacteriana es máximo de $1.14E+09$ ufc / ml en 6 horas y luego disminuye $5.40E+07$ en 168 horas. La cinética de crecimiento de las *pseudomonas alcalófilas* en Medio Mínimo Mineral (M9) en concentración de cianuro libre de 78ppm, 233ppm, 390ppm, 545ppm y 700ppm por un periodo de 7 días se observa en la (Ver figura N°10.3) La degradación de cianuro libre proveniente del efluente generado del proceso de lixiviación de oro utilizando *pseudomonas alcalófilas*, de las concentraciones iniciales de cianuro libre fueron 78ppm, 233ppm, 390ppm, 545ppm y 700ppm y se midió por 168 horas la concentración de cianuro abatido por la prueba de titulación

TABLA N° 10. 6

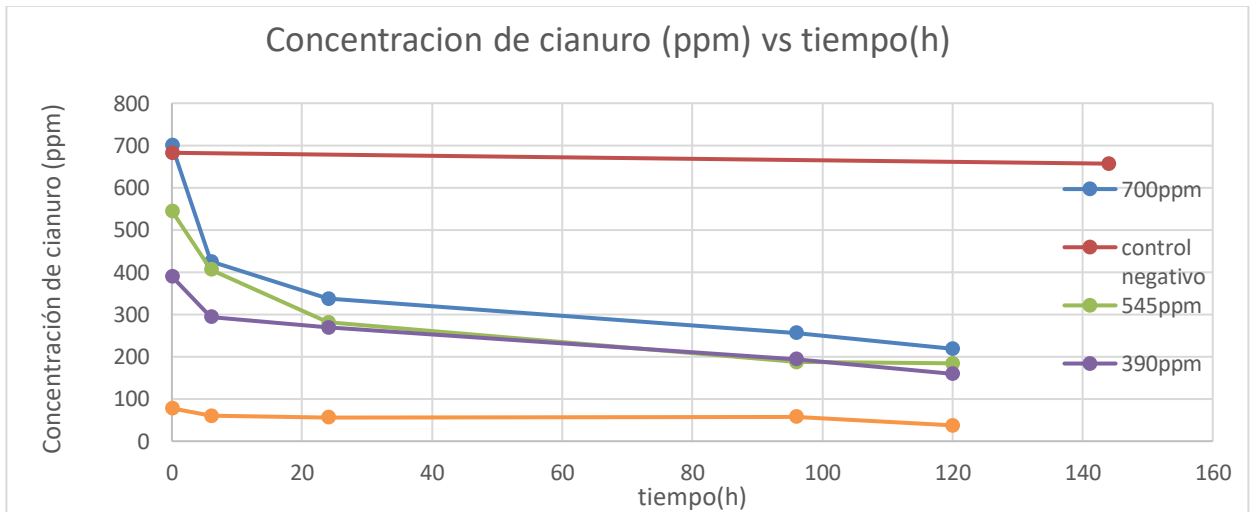
CONCENTRACIÓN DE CIANURO LIBRE (PPM) DE 700, 545, 390,233 Y 77.8PPM EN MEDIO MÍNIMO MINERAL (M9)

Concentración de cianuro residual (CNR)						
Tiempo(h)	tiempo	700ppm (blanco)	545ppm	390ppm	233ppm	77.8ppm
0	T0	700	545	390	233	77.8
6	T1	-	406.25	293.75	200	60.25
24	T2	-	281.25	268.75	187.5	56.25
96	T3	-	187.5	193.75	168.75	55
120	T4	657	184.375	159.375	115.62	37.5
168	%	614	66.16	59.14	50.38	51.29

Fuente: Elaboración Propia

FIGURA N°10.4

CINETICA DE DEGRADACIÓN DE CIANURO LIBRE EN MEDIO MIMINO MINERAL (M9) UTILIZANDO PSEUDOMONAS ALCALÓFILAS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE EFLUENTE DE CIANURO 78PPM ,233PPM ,390PPM, 545PPM Y 700 PPM



Fuente: Elaboración Propia

c) Evaluación del porcentaje de degradación de efluente de cianuro

- Del ensayo anterior al 10% de inóculo en Medio Mínimo Mineral suplementado con diferentes concentraciones de cianuro de 78ppm, 233ppm, 390ppm, 545ppm y 700ppm fue preparado y evaluado para la degradación de cianuro libre (CN⁻) a pH: 10.5 tamponado con buffer carbonato-bicarbonato 0,1 M. Se preparó un blanco para el control de cianuro de 700ppm.
- Primero se reactivó la cepa por duplicado en tubos de ensayo en caldo nutritivo en 72 horas apreciando turbidez en el cultivo, verificando el crecimiento bacteriano. Se estiró en placa se observa pocos bacilos pequeños y se realizó una prueba de tinción resultando bacterias Gram negativos.
- Segundo, se estiró en medio sólido en placa con Agar King B se obtiene colonias puras en 24 horas.
- Tercero, se tomó una colonia y se llevó en medio líquido caldo nutritivo en tubos de ensayo para tener los microorganismos activos, se realizó conteo en cámara de Neubauer, se observó una alta población bacteriana de *pseudomonas alcalófilas*.
- Cuarto, se preparó una biomasa como inóculo inicial para la prueba de adaptación al efluente de cianuro, se realizó un conteo en placa, se contabilizó un promedio de 962 colonias obteniendo una población de inóculo inicial de $9.62 \cdot 10^8$ ufc /ml.

➤ Las concentración inicial de cianuro libre en los medios fue de 700ppm, 545ppm, 390ppm, 230ppm,78ppm respectivamente, además se preparó un blanco con efluente de cianuro de concentración 700ppm como control para la volatización de cianuro, todos los cultivos se ajustaron a pH: 10.5.

En una concentración de cianuro libre inicial de 700ppm después de 168horas es 614ppm obtenido un porcentaje degradación de 12.3%.En la concentración de cianuro libre 545 ppm inicial luego de 168 horas fue 66.16ppm obteniendo un porcentaje degradación de 87.9%.

En la concentración de cianuro libre inicial 390 ppm luego de 168 horas fue 59.14ppm obteniendo un porcentaje degradación de 84.8%. En la concentración de cianuro libre inicial 233 ppm luego de 168 horas fue 150.38ppm obteniendo un porcentaje degradación de 78% y finalmente en la concentración de cianuro libre inicial 77.8 ppm luego de 168 horas fue 51.29ppm obteniendo un porcentaje degradación de 60%.

En la siguiente tabla se muestra los porcentajes de degradación de cianuro de libre proveniente de efluente de cianuro utilizando pseudomonas alcalófilas por un periodo de 7días.

?: Porcentaje de degradación de cianuro libre

TABLA N°10.7

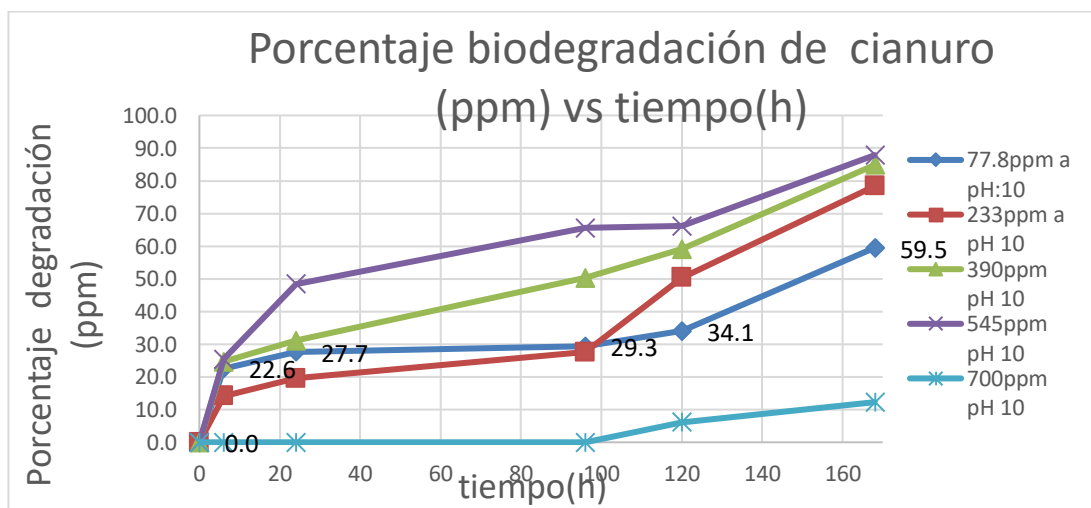
PORCENTAJE DE DEGRADACIÓN EFLUENTE DE CIANURO DE 700, 545, 390,233 Y 77.8PPM UTILIZANDO PSEUDOMONAS

Concentración	77.8ppm	233ppm	390ppm	545ppm	700ppm
t(h)	%	%	%	%	%
0	0	0	0	0	0
6	22.6	14.16	24.67	25.45	0
24	27.7	19.52	31.08	48.39	0
96	29.3	27.57	50.32	65.59	0
120	34.1	50.37	59.13	66.16	6.14
168	59.5	78.37	84.83	87.86	12.28

Fuente: Elaboración Propia

FIGURA N°10.5

PORCENTAJE DE DEGRADACIÓN DE EFLUENTE DE CIANURO LIBRE 78PPM ,233PPM ,390PPM, 545PPM Y 700 PPM UTILIZANDO PSEUDOMONAS ALCALÓFILAS



Fuente: Elaboración Propia

10.9 Evaluación de la tolerancia a pH alcalinos

- Para la realización de esta prueba siguió la metodología propuesta por Tiago *et al.*, 2004. Para ello, se empleó un cultivo de 13 horas del ensayo anterior y un caldo nutritivo conteniendo la décima parte de cada uno de sus componentes, esto con el propósito de recrear las condiciones oligotróficas del suelo.
- Para la evaluar la tolerancia a niveles altos de pH, se inoculo 5%(v/v) 5.0 mL del cultivo en 40 mL de caldo nutritivo en matraces de 250 ml con 20 y 40 ml de Medio Mínimo (M9). El medio fue complementado con 50 y 70 ml de efluente de cianuro con una concentración de cianuro libre de 700ppm de cianuro libre, dando una concentración de cianuro al inicio en los matraces de 350ppm, y 490ppm, ajustado con HCl 1N y NaOH 1N a los siguientes valores de pH: 10,0; 10,5; 11,0.
- Los cultivos fueron incubados a temperatura ambiente por 3 días. Se determinó el nivel óptimo de pH en función al crecimiento microbiano, evidenciado por la turbidez en los tubos de prueba. Para ello se empleó el criterio: Sin crecimiento (-), Poco crecimiento: (+), Crecimiento moderado: (++) y Crecimiento abundante: (+++), el cual corresponde aproximadamente a 0; 0,5; 1 y 2 de la Escala de McFarland, respectivamente.

➤ Finalmente se evaluó la cinética de crecimiento (ufc/ml Vs t) y biodegradación de cianuro (ppm Vs tiempo) del efluente del proceso de lixiviación de oro, el porcentaje de degradación (%Degradación CN-1 Vs tiempo) de cianuro libre.

a) Evaluación de la cinética de crecimiento de pseudomonas y degradación de efluente de cianuro

Se realizó la cinética de crecimiento y degradación de cianuro libre por días, el conteo en placa hasta una dilución de 10^{-5} se realizó en cámara de Neubaver, se tomaron muestras cada 24 horas de los cultivos con concentración de 350ppm, 490ppm de cianuro libre proveniente de efluente de cianuro, llevado a diferentes pH:10.0 , 10.5 y 11.0. Se preparó un blanco para el control de cianuro de 700ppm en un periodo de 144 horas.

Se realizó la cinética de crecimiento y degradación de cianuro libre por 40 horas , el conteo de microorganismos en placa se realizó una dilución hasta 10^{-5} , para la cinética de crecimiento se tomaron muestra cada a las 14,19 y 40 horas, de los matraces con cianuro de concentración de 350ppm, y 490ppm de cianuro libre proveniente de efluente del proceso de lixiviación de oro (Ver la tabla N°10.9).En todas las concentraciones de cianuro, la población bacteriana inicial del inculo de *pseudomonas alcalófilas* es de $3.70E+08$ ufc /ml.

En la concentración de cianuro de 78ppm de cianuro libre a las 6 horas hay crecimiento máximo de $1.38E+09$ ufc/ml y luego a las 96 horas disminuye la población bacteriana de $2.52E+08$ ufc/ml hasta las 168 horas es $2.68E+07$ ufc/ml. En la concentración de cianuro de 233ppm de cianuro libre, la población bacteriana máxima es $1.16E+09$ ufc/ml y luego disminuye hasta $3.12E+07$ ufc/ml en 168 horas. En la concentración de 233ppm de cianuro libre, la población bacteria se mantiene aproximadamente constante de $4.50E+08$ ufc / ml y disminuye hasta $3.84E+07$ ufc / ml en 168horas.

En la concentración de 545ppm de cianuro libre, la población bacteriana disminuye hasta $1.90E+07$ ufc / ml en 24 horas, luego hay un crecimiento máximo de $1.14E+09$ ufc / ml en 120horas y luego disminuye hasta $4.01E+07$ ufc / ml en 168 horas. En la concentración de 700ppm de cianuro libre, la población bacteriana es máximo de $1.14E+09$ ufc / ml en 6 horas y luego disminuye $5.40E+07$ en 168 horas.

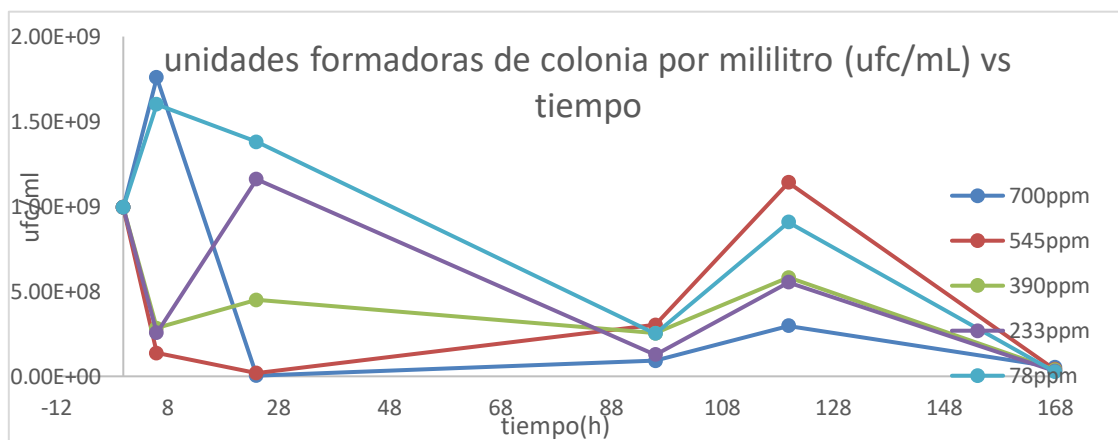
La cinética de crecimiento de las *pseudomonas alcalófilas* en Medio Mínimo Mineral (M9) en concentración de cianuro libre de 78ppm, 233ppm, 390ppm, 545ppm y 700ppm por un periodo de 7 días se observa en la (Ver figura N°10.6).

TABLA N°10.8
CONTEO EN PLACA DE PSEUDOMONAS ALCALÓFILAS EN

FECHA DE SIEMBRA 07/09/17 al 14/09/17					
Concentración de cianuro	78ppm	233ppm	390ppm	545ppm	700ppm
tiempo	ufc/mL	ufc/mL	ufc/mL	ufc/mL	ufc/mL
0	9.94E+08	9.94E+08	9.94E+08	9.94E+08	9.94E+08
6	1.60E+09	2.55E+08	2.83E+08	1.36E+08	1.76E+09
24	1.38E+09	1.16E+09	4.50E+08	1.90E+07	4.00E+06
96	2.52E+08	1.28E+08	2.53E+08	3.03E+08	9.10E+07
120	9.08E+08	5.54E+08	5.81E+08	1.14E+09	2.98E+08
168	2.68E+07	3.12E+07	3.84E+07	4.01E+07	5.40E+07

Fuente: Elaboración Propia

FIGURA N°10.6
CINETICA DE CRECIMIENTO DE PSEUDOMONAS ALCALÓFILAS



Fuente: Elaboración Propia

Se realizó un conteo en placa con Agar nutricio a pH: 10, 10.5 y 11.0 una dilución hasta 10^{-5} por 24 horas, se observa el crecimiento en placa de los cultivos, por consecuencia a la tolerancia a las concentraciones de cianuro de 350 y 490ppm llevado a diferentes pH: 10,10.5 y 11.0 provenientes de efluente del proceso de lixiviación de minerales auríferos con cianuro. En la tabla N°10.8, se representa los resultados de la prueba tolerancia de las *pseudomonas alcalófilas* al efluente de cianuro, dándonos un crecimiento rápido en todas las concentraciones de cianuro.

TABLA N°10. 9

TOLERANCIA DE BACTERIAS ALCALÓFILAS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE EFLUENTE DE CIANURO 700, 545, 390,233,

	pH					
	10.0		10.5		11.0	
CN ⁻ (mg/L)	350	490	350	490	350	490
CEPA-1	+++	+++	+++	+++	+++	+++

78PPM EN MEDIO MINERAL

Fuente: Elaboración Propia

-Sin crecimiento, +: Crecimiento lento, ++: Crecimiento moderado, +++:

Crecimiento rápido:

b) Evaluación de la cinética de degradación de cianuro

La degradación de cianuro libre proveniente del efluente generado del proceso de lixiviación de oro utilizando *pseudomonas alcalófilas*, de las concentraciones iniciales de cianuro libre fueron 78ppm, 233ppm, 390ppm, 545ppm y 700ppm y se midió por 168 horas la concentración de cianuro abatido por la prueba de titulación con nitrato de plata (Ver la Tabla N°10.10).

Se realizó la cinética de degradación de cianuro libre utilizando *pseudomonas alcalófilas* en Medio Mínimo Mineral (M9). El control negativo de cianuro libre inicial fue de 700ppm luego de 144 horas es 657ppm (Ver Figura N°10.7).

TABLA N°10.10

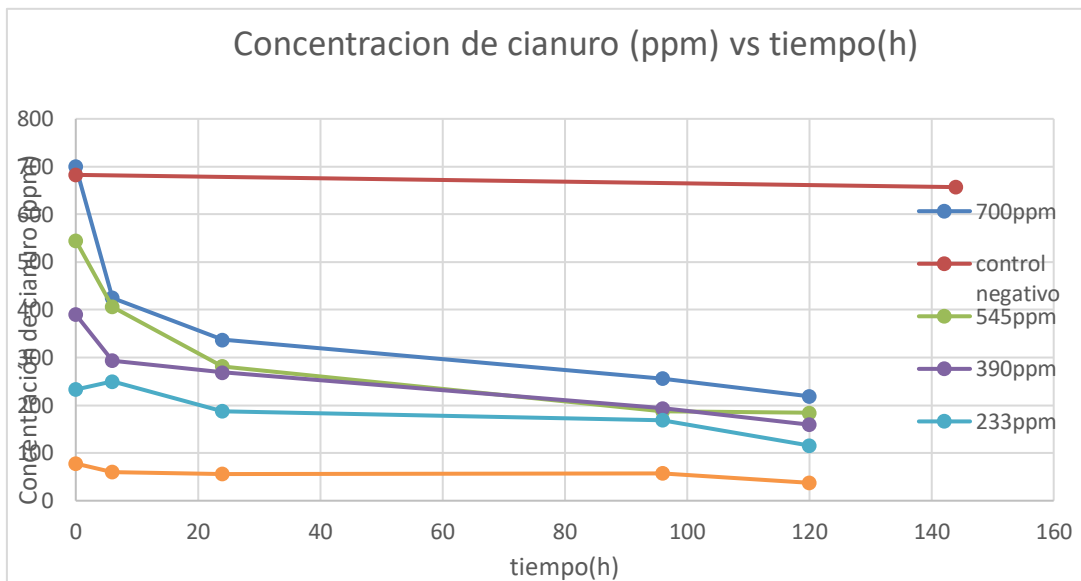
CONCENTRACIÓN DE CIANURO LIBRE (PPM) DE 700, 545, 390,233 Y 77.8PPM EN MEDIO MÍNIMO MINERAL (M9)

Concentración de cianuro residual (CNR)						
Tiempo(h)	tiempo	700ppm	545ppm	390ppm	233ppm	77.8ppm
0	T0	700	545	390	233	77.8
6	T1	-	406.25	293.75	200	60.25
24	T2	-	281.25	268.75	187.5	56.25
96	T3	-	187.5	193.75	168.75	55
120	T4	657	184.375	159.375	115.62	37.5
168	%	614	66.16	59.14	50.38	51.29

Fuente: Elaboración Propia

FIGURA N°10.7

CINETICA DE DEGRADACIÓN DE CIANURO LIBRE



Fuente: Elaboración Propia

c) Evaluación del porcentaje de degradación de efluente de cianuro

En una concentración de cianuro libre inicial de 700ppm después de 168horas es 614ppm obtenido un porcentaje degradación de 12.3%.En la concentración de cianuro libre 545 ppm inicial luego de 168 horas fue 66.16ppm obteniendo un porcentaje degradación de 87.9%.

En la concentración de cianuro libre inicial 390 ppm luego de 168 horas fue 59.14ppm obteniendo un porcentaje degradación de 84.8%. En la concentración de cianuro libre inicial 233 ppm luego de 168 horas fue 150.38ppm obteniendo un porcentaje degradación de 78% y finalmente en la concentración de cianuro libre inicial 77.8 ppm luego de 168 horas fue 51.29ppm obteniendo un porcentaje degradación de 60%.

En la siguiente tabla se muestra los porcentajes de degradación de cianuro de libre proveniente de efluente de cianuro utilizando pseudomonas alcalófilas por un periodo de 7días.

TABLA N°10. 11

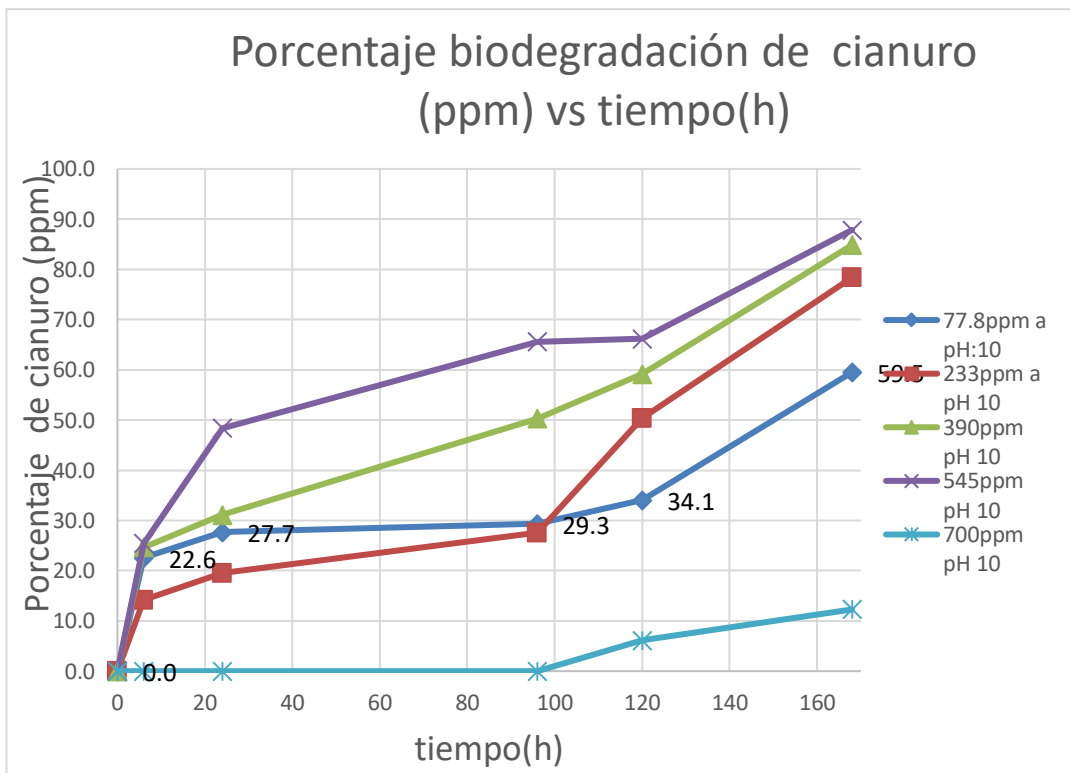
PORCENTAJE DE DEGRADACIÓN

Concentración	77.8ppm	233ppm	390ppm	545ppm	700ppm
t(h)	%	%	%	%	%
0	0	0	0	0	0
6	22.6	14.16	24.67	25.45	0
24	27.7	19.52	31.08	48.39	0
96	29.3	27.57	50.32	65.59	0
120	34.1	50.37	59.13	66.16	6.14
168	59.5	78.37	84.83	87.86	12.28

Fuente: Elaboración Propia

FIGURA N°10.8

PORCENTAJE DE DEGRADACIÓN CIANURO LIBRE



Fuente: Elaboración Propia

10.10 Determinación de los parámetros significativos de biorremediación

- Primero se llevó al autoclave para esterilizar los materiales de vidrio.
- Después se preparó un cepario de 200mL de microorganismos por 48 horas en medio mínimo M9 que contenga cianuro como única fuente de nitrógeno incubado a 150 rpm en un agitador orbital.
- Se agregó en 2 matraces de 500 mL.
- El experimento N°1 con un tamaño de inóculo de 5% (v/v), a pH:10,0 y concentración de cianuro libre inicial de 315,6 ppm a 47 horas.
- El experimento N°2 a 10% (v/v) a pH: 10,5, concentración de cianuro libre 324,61ppm a 47 horas.
- Las variables controlables fueron a una agitación de 150 rpm y temperatura de ambiente, ver la tabla siguiente.

TABLA N°10.12

**EVALUACIÓN DE LOS PARAMETROS MÁS SIGNIFICATIVOS EN LA
BIOREMEDIACIÓN DE CIANURO LIBRE**

FACTORES					
pH	Tiempo (horas)	Concentración cianuro libre	Tamaño de inoculo (v/v)	Agitación (rpm)	Temperatura (°C)
10	16,00	315,6ppm	5%	150	20
10	19,00	315,6ppm	5%	150	20
10	25,00	315,6ppm	5%	150	20
10	39,00	315,6ppm	5%	150	20
10	43,00	315,6ppm	5%	150	20
10	47,00	315,6ppm	5%	150	20
10,5	16,00	324,67ppm	10%	150	20
10,5	19,00	324,67ppm	10%	150	20
10,5	25,00	324,67ppm	10%	150	20
10,5	39,00	324,67ppm	10%	150	20
10,5	43,00	324,67ppm	10%	150	20
10,5	47,00	324,67ppm	10%	150	20

Fuente: Elaboración Propia

➤ Se evaluó el abatimiento de cianuro libre a las 2 condiciones establecidas en un tiempo de 47 horas, ver la tabla siguiente. Se observa que el parámetro tamaño de inoculo no es significativo, en el porcentaje de degradación cianuro libre de efluente de relave.

TABLA N°10.13
PARAMETROS SIGNIFICATIVOS EN LA BIOREMEDIACIÓN DE
CIANURO LIBRE

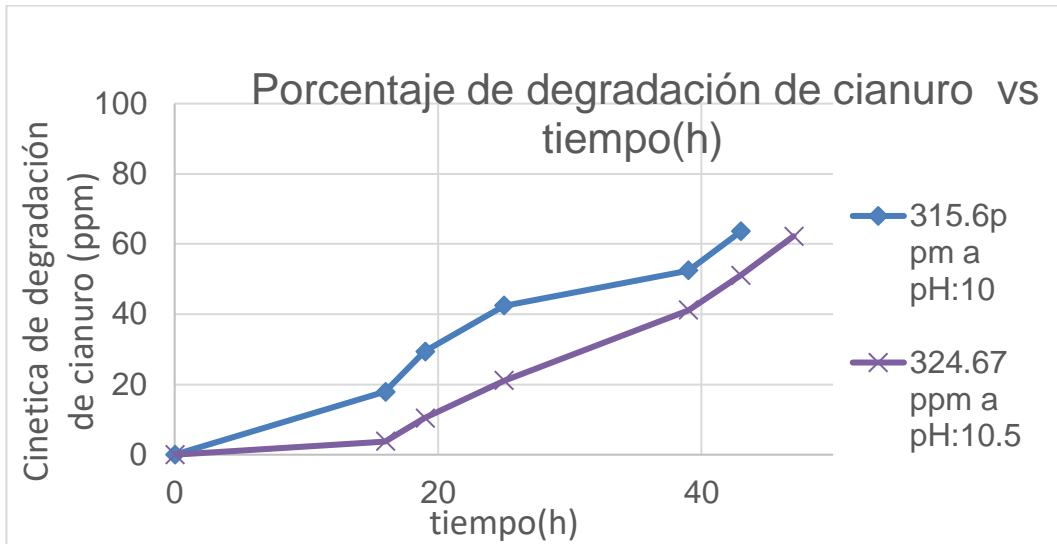
Orden	pH	Tiempo (horas)	Tamaño de Inoculo % (v/v)	Concentración residual de cianuro libre(ppm)	%Degradación de cianuro libre
N°1	10	16,00	5%	260ppm	18%
	10	19,00		230ppm	29%
	10	25,00		200ppm	42%
	10	39,00		180ppm	52%
	10	43,00		160ppm	64%
	10	47,00		155ppm	67%
N°2	10,5	16,00	10%	300ppm	7%
	10,5			280ppm	14%
	10,5			250ppm	25%
	10,5			200ppm	45%
	10,5			180ppm	55%
	10,5			160ppm	66%
	10,5			160ppm	66%

Fuente: Elaboración Propia

a) Evaluación de la cinética de degradación de cianuro libre

La degradación de cianuro libre proveniente del efluente generado del proceso de lixiviación de oro utilizando *pseudomonas alcalófilas*, de las concentraciones iniciales de cianuro libre fue 311,6ppm a pH: 10 y 324.64 1 a pH:10.5 se midió cianuro abatido en tiempos de hasta 47 horas, ver la gráfica N°10.9.

GRAFICA N°10.9
CONCENTRACIÓN DE CIANURO TOTAL RESIDUAL

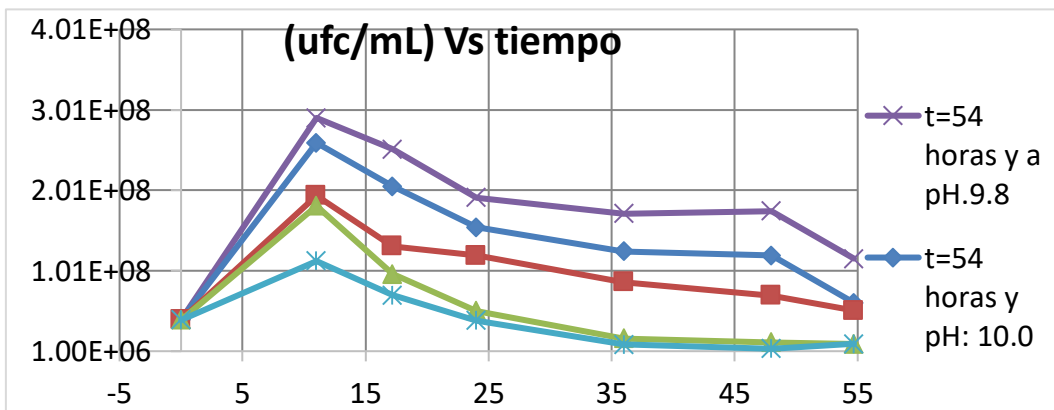


Fuente: Elaboración Propia

10.11 Diseño experimental

➤ Cinética de crecimiento a 54 horas del diseño experimental central compuesto a pH:10,11,9.79,11.3,10.5 (véase la figura N°10.10):

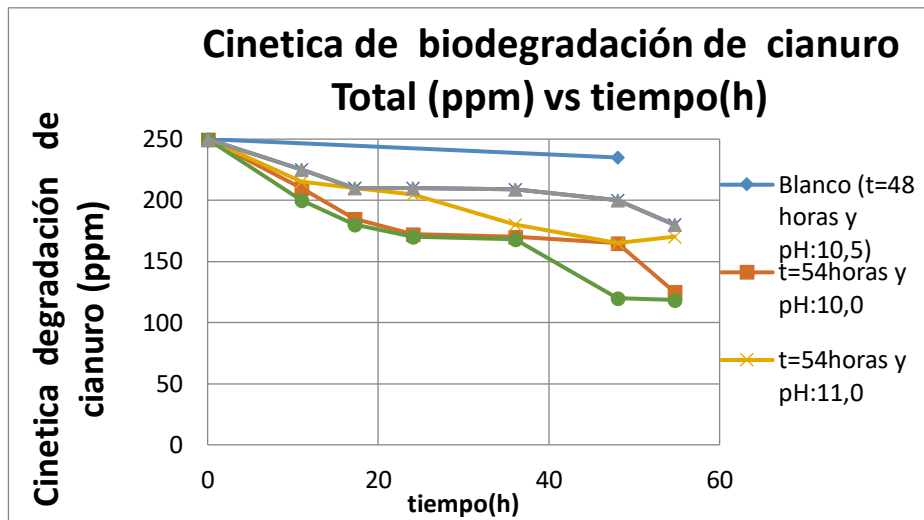
FIGURA N°10.10
CINETICA DE CRECIMIENTO A 54 HORAS



Fuente: Elaboración Propia

➤ Cinética de degradación de cianuro total abatido durante 54 horas .

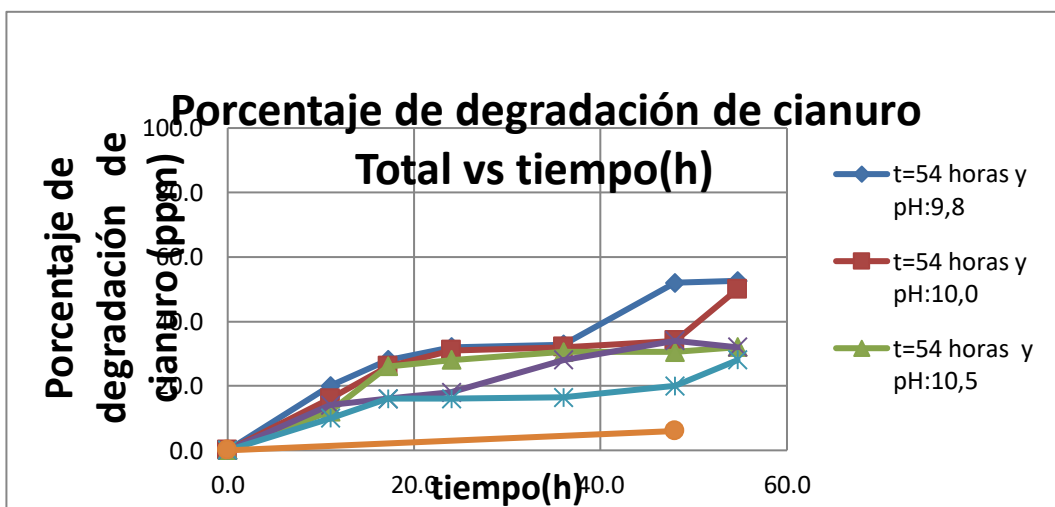
FIGURA N°10.11
CINETICA DE ABATIMIENTO DE CIANURO TOTAL



Fuente: Elaboración Propia

➤ Porcentaje de degradación de cianuro total abatido durante 54 horas.

FIGURA N°10.12
DEGRADACION DE CIANURO TOTAL DE 54 HORAS



Fuente: Elaboración Propia

➤ Resultados de las muestras analizadas en Laboratorio ALS S.A.C.



.INFORME DE ENSAYO N° 3-00353/17

Solicitante : YURI CASTILLO ALVAVE
Domicilio Legal : Calle 1 LT-1A Mz-D Esq. Con Calle A Urb. Industrial Bocanegra
. Callao 1. Lima.
Producto Declarado : AGUA RESIDUAL NO DOMESTICA
Lugar de Muestreo : Laboratorio Químico Biometalurgia, Lima, UNMSM.
Fecha de Muestreo : 2017 – 11 – 20
Método de Muestreo : NTP-ISO 5667-10-2012. Calidad de agua. Muestreo. Parte 10:
Guía para el muestreo de aguas residuales no doméstica.
Cantidad de muestra para ensayo : 10 muestras puntuales
Forma de presentación : En frascos de plástico y vidrio, cerrados, preservados y refrigerados.
Identificación de la muestra : P-1 BUZON FINAL DE EFLUENTE
Fecha de recepción : 2017 – 11 – 22
Fecha de inicio del ensayo : 2017 – 11 – 23
Fecha de término del ensayo : 2017 – 11 – 24
Ensayo realizado en : Laboratorio Ambiental
Identificada con : H/S 15000096 (00237)
Validez del documento : Este documento es válido solo para la muestra descrita.

Muestras Puntuales		Ensayo / Resultados
Nº Muestra	Fecha	Cianuro Total (mL/L) (LD: 0,001 mg/L)
1º Toma	2017-11-23	172,37
2º Toma	2017-11-23	130,00
3º Toma	2017-11-23	203,71
4º Toma	2017-11-23	178,12
5º Toma	2017-11-23	150,00
6º Toma	2017-11-23	203,71
7º Toma	2017-11-23	203,66
8º Toma	2017-11-23	171,38
9º Toma	2017-11-23	171,38
10º Toma	2017-11-23	169,31

LD: Limite de Detección

Métodos:

Cianuro Total: SMEWW-APHA-AWWA-WEF Part 4500-CN-C,E, 22nd Ed. Cyanide. Colorimetric Method. 2012

OBSERVACIONES

Informe de ensayo emitido en base a resultados de nuestros laboratorios sobre muestras proporcionadas a ALS LS PERU S.A.C. Prohibida la reproducción total o parcial de este informe, sin la autorización escrita de ALS LS PERU S.A.C. Los resultados de los ensayos no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce.

Callao, 28 de Noviembre del 2017
KC

ING. FELIPE CAMPOS YAUCE
CIP: 136871
JEFE DELABORATORIO
ALS LS PERU SAC

10.12 Matriz de consistencia

“DETERMINACIÓN DE PARAMETROS ÓPTIMOS EN LA BIORREMEDIACIÓN DE EFLUENTE CIANURADO DE MINERALES AURIFEROS, UTILIZANDO *Pseudomonas alcalófilas*”

PROBLEMA GENERAL	OBJETIVO GENERAL	HIPOTESIS GENERAL	VARIABLE DEP.	DIMENSIONES	INDICADOR	METODO
¿Cuál son los parámetros óptimos en la biorremediación utilizando <i>pseudomonas alcalófilas</i> para efluentes cianurados procedentes de minerales auríferos?	Determinar los parámetros óptimos en la biorremediación utilizando <i>pseudomonas alcalófilas</i> para efluentes cianurados procedentes de minerales auríferos.	Si determinamos los parámetros óptimos en la biorremediación de efluente cianurado utilizando <i>pseudomonas alcalófilas</i> , entonces el proceso de biorremediación de efluente cianurado será significativa.	Y= Porcentaje de degradación de cianuro total.	✓ Rendimiento	✓ Contenido de cianuro total.	✓ Analizador de cianuro.
PROB. ESPECIFICOS	OBJ. ESPECIFICOS	HIP. ESPECIFAS	VARIABLES IND.	DIMENSIONES	INDICADOR	METODO
a) ¿Cuál es pH óptima para que las <i>pseudomonas</i> alcalófilas degraden con mayor eficiencia al cianuro?	Evaluar el pH óptima para que las <i>pseudomonas</i> alcalófilas degraden con mayor eficiencia al cianuro.	a) La biorremediación de efluente cianurado óptima utilizando <i>pseudomonas alcalófilas</i> se producen cuando el pH se encuentra en un intervalo de 10 a 11.	X1= pH	✓ pH	✓ Valor de pH	✓ Lectura de pH.
b)b) ¿Cuál es el tiempo óptimo en la biorremediación, para que la concentración de cianuro este debajo los límites máximos permisibles?	b) Evaluar el tiempo óptimo en la biorremediación, para que concentración de cianuro este debajo los límites máximos permisibles	b) El tiempo óptimo de biorremediación de efluente cianurado utilizando <i>pseudomonas alcalófilas</i> está en el intervalo: 1-2 días.	X2= Tiempo de biorremediación.	✓ Tiempo	✓ Días	✓ Cronometro

Y= Porcentaje de degradación de cianuro total;

X1= pH ; X2= Tiempo de biorremediación

