

PROCESO “ACOPLADO” FÍSICO-QUÍMICO Y BIOTECNOLÓGICO PARA EL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES CONTAMINADAS CON CIANURO

Investigadores Principales:
EDISON GIL PAVAS y
CATALINA GIRALDO

Auxiliares de Investigación:
PAOLA ANDREA CAMARGO MONTOYA
CAROLINA OSSA ABAD

**Grupo de Investigación Procesos Ambientales y Biotecnológicos -GIPAB-
Línea de Investigación: Procesos Avanzados de Oxidación y Fermentaciones
UNIVERSIDAD EAFIT**

Comentarios: Favor dirigirlos a **egil@eafit.edu.co**

Los contenidos de este documento son responsabilidad de los autores.

Está autorizada la reproducción total o parcial de este material siempre y cuando se cite la fuente.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
AUTORES	1
RESUMEN	2
ABSTRACT	3
1. OBJETIVO	5
1.1 OBJETIVO GENERAL	5
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
2. INTRODUCCIÓN	5
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	6
4. MARCO TEÓRICO	7
4.1 EL CIANURO	7
4.1.1 Intoxicación por Cianuro	8
4.2 QUÍMICA DEL CIANURO	8
4.2.1 Cianuro libre	8
4.2.2 Complejos de Cianuro	8
4.3 ALTERNATIVAS PARA DEGRADAR CIANURO	9
4.4 PARÁMETROS INDICADORES DE MATERIAL ORGÁNICO POR DEMANDA DE OXÍGENO	12
4.4.1 Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO)	12
4.4.2 Demanda Química de Oxígeno (DQO)	12
4.5 PROCESO DE GALVANIZADO	13
4.6 <i>Pseudomonas fluorescens</i>	13
5. METODOLOGÍA	14
5.1 MATERIALES Y EQUIPOS	14
5.1.1 Reactivos	14
5.1.2 Equipos	15
5.1.3 Especificaciones técnicas del Foto-reactor	15
5.2 AISLAMIENTO DEL MICROORGANISMO	15
5.3 IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO	16
5.4 MEDICIÓN DE CIANURO	16
5.4.1 Aplicaciones Electrodo Ión Selectivo.....	16
5.5 ENSAYOS PRELIMINARES	17
5.5.1 Esterilización.....	17
5.5.2 Variables de Operación	17
5.5.2.1 pH	17
5.5.2.2 Temperatura	17
5.5.2.3 Agitación.....	17
5.5.2.4 Nutrientes	17
5.5.2.5 Inóculo	18

5.6	MEDICIÓN DE BIOMASA.....	18
5.6.1	Curva estándar para medición de biomasa	18
5.7	MEDICIÓN DE GLUCOSA	19
5.7.1	Protocolo para la determinación de glucosa y azúcares reductores con DNS (Ácido 3.5-Dinitro Salicílico).....	19
5.8	CONSERVACIÓN DE MICROORGANISMOS	19
5.9	ADAPTACIÓN DEL MICROORGANISMO EN MEDIO LÍQUIDO	19
5.10	DISEÑO DE EXPERIMENTOS	20
5.11	ACOPLAMIENTO	21
5.11.1	Fotocatálisis.....	21
5.11.2	Biorremediación.....	21
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
6.1	IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO.....	22
6.2	ESTERILIZACIÓN	23
6.3	pH	23
6.4	NUTRIENTES	23
6.5	ADAPTACIÓN	24
6.6	COMPARACIÓN SOLUCIÓN REAL Y SINTÉTICA	26
6.7	FOTOCATÁLISIS	26
6.8	BIODEGRADACIÓN	28
6.8.1	Diseño de Experimentos.....	28
6.8.1.1	Análisis de Varianza	29
6.8.1.2	Diagrama de Pareto	29
6.8.1.3	Gráfica de Superficie de Respuesta Estimada.....	31
6.8.1.4	Condiciones Óptimas de Operación.....	32
6.8.2	Resultados de experimentos del proceso de biorremediación	32
6.9	CINÉTICA DE DEGRADACIÓN DE CIANURO	35
6.9.1	Cinética de Degradación de Cianuro Empleando Luz Artificial	35
6.9.2	Cinética de Degradación de Cianuro Empleando Luz Solar	37
6.10	CINÉTICA DE BIODEGRADACIÓN	38
6.11	CINÉTICA DE CRECIMIENTO	39
6.12	DEMANDA QUÍMICA DE OXIGENO (DQO) Y DEMANDA BIOLÓGICA DE OXÍGENO (DBO)	41
6.13	ACOPLAMIENTO	41
7.	CONCLUSIONES	42
8.	BIBLIOGRAFÍA.....	43

LISTA DE TABLAS

	Pág.
TABLA 1. Características generales de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	14
TABLA 2. Diluciones para realizar la curva de calibración	19
TABLA 3. Factores y niveles del diseño de experimentos	20
TABLA 4. Diseño de experimentos factorial.....	20
TABLA 5. Resumen de las variables del diseño para el proceso de fotocatalisis.....	21
TABLA 6. Comparación de porcentaje de degradación de solución sintética de cianuro a 4 mg/L con y sin glucosa.	24
TABLA 7. Porcentaje de degradación de cianuro empleando luz artificial.....	27
TABLA 8. Porcentaje de degradación de cianuro empleando luz solar.....	27
TABLA 9. Fotocatálisis con luz artificial prolongando el tiempo de residencia	28
TABLA 10. Resultados obtenidos de porcentaje de degradación de cianuro	28
TABLA 11. Tabla ANOVA para análisis de varianza	29
TABLA 12. Condiciones óptimas de operación	32
TABLA 13. Resultados de degradación de cianuro.	32
TABLA 14. Resultados de crecimiento de biomasa.....	32
TABLA 15. Resultados de consumo de glucosa	32
TABLA 16. Parámetros cinéticos del proceso de degradación empleando luz artificial y luz solar.....	38
TABLA 17. Parámetros cinéticos de degradación y crecimiento de biomasa	40
TABLA 18. Resultados de medición de DQO y DBO.....	41

LISTA DE ECUACIONES

	Pág.
ECUACIÓN 1. Reacción de oxidación fotocatalítica del cianuro	10
ECUACIÓN 2. Ecuación de Langmuir-Hinshelwood	36

LISTA DE FIGURAS

		Pág.
FIGURA 1.	Relación entre HCN y cianuro con el pH	8
FIGURA 2.	Acoplamiento de procesos fotocatalíticos y biorremediación a nivel industrial	10
FIGURA 3.	Operación de una partícula de catalizador excitada fotoquímicamente	11
FIGURA 4.	Fotorreactor cilíndrico parabólico compuesto (CPC)	15
FIGURA 5.	Curva estándar para la medición de biomasa <i>Pseudomonas fluorescens</i>	18
FIGURA 6.	Proceso de adaptación	19
FIGURA 7.	Cultivo sumergido para el proceso de biorremediación	22
FIGURA 8.	Secuencia para la identificación de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	22
FIGURA 9.	Adaptación a 4 mg/L	24
FIGURA 10.	Adaptación a 6 mg/L	24
FIGURA 11.	Adaptación a 9 mg/L	25
FIGURA 12.	Adaptación a 12 mg/L	25
FIGURA 13.	Adaptación a 15 mg/L	25
FIGURA 14.	Biodegradación de soluciones real y sintética de cianuro	26
FIGURA 15.	Cinética de degradación proceso fotocatalisis	26
FIGURA 16.	Diagrama de Pareto estandarizado para la reducción de cianuro	30
FIGURA 17.	Efectos principales para el porcentaje de degradación de cianuro	30
FIGURA 18.	Efecto de la interacción concentración cianuro agitación	31
FIGURA 19.	Superficie de respuesta estimada	31
FIGURA 20.	Resultados de biodegradación de cianuro.....	33
FIGURA 21.	Resultados de crecimiento de biomasa.....	34
FIGURA 22.	Resultados de consumo de glucosa en el tiempo.....	34
FIGURA 23.	Resultados velocidad de degradación de cianuro	35
FIGURA 24.	Concentración de cianuro en el tiempo empleando luz artificial	36
FIGURA 25.	Modelo Langmuir-Hinshelwood para la fotocatalisis empleando luz artificial	36
FIGURA 26.	Concentración de cianuro en el tiempo empleando luz solar	37
FIGURA 27.	Modelo Langmuir-Hinshelwood para la fotocatalisis empleando luz solar	37
FIGURA 28.	Curva de biodegradación de cianuro para el caso óptimo	38
FIGURA 29.	Método de integración cinética de primer orden	39
FIGURA 30.	Linealización método Langmuir	40

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos al Comité de Investigación de la Universidad EAFIT por el apoyo financiero para la realización de este trabajo, al personal técnico del laboratorio de Ingeniería de Procesos.

AUTORES

EDISON GIL PAVAS. M.Sc En Ingeniería Química

Ingeniero Químico de la Universidad de Antioquia, Magíster en Ingeniería Química de la Universidad Nacional, Sede Bogotá.

Director del Grupo de Investigación en Procesos Ambientales y Biotecnológicos (GIPAB) de la Universidad EAFIT. Reconocido por COLCIENCIAS.

Docente Investigador, Departamento de Ingeniería de Procesos, Universidad EAFIT, además ha sido profesor de la Universidad de Antioquia en el departamento de Ingeniería Química y en la Escuela de Ingeniería de Antioquia.

Área de desempeño: Procesos Avanzados de Oxidación

Asignaturas que imparte: Transferencia de Calor y Transferencia de Masa

e-mail: egil@eafit.edu.co

CATALINA GIRALDO ESTRADA. Ingeniera de Procesos

Ingeniera de Procesos de la Universidad EAFIT. Profesora de medio tiempo en el Departamento de Ingeniería de Procesos, candidata a Magíster en Biotecnología en la Universidad Nacional sede Medellín.

Área de desempeño: Biotecnología

Asignaturas que imparte: Manejo de Sólidos y Operaciones Biotecnológicas.

e-mail: cgiraldo@eafit.edu.co

La hoja de vida y la del grupo se puede consultar en la siguiente dirección de COLCIENCIAS:
<http://pamplonita.colciencias.gov.co:8081/scienti/html/index.html>.

PAOLA ANDREA CAMARGO MONTOYA

Ingeniera de Procesos, egresada de la Universidad EAFIT.

CAROLINA OSSA ABAD

Ingeniera de Procesos, egresada de la Universidad EAFIT.

RESUMEN

Esta investigación contribuye al estudio y desarrollo de nuevas técnicas de degradación fotoquímicas (con luz solar y artificial) y biológicas para el tratamiento de sustancias no biodegradables altamente tóxicas presentes en aguas residuales industriales. Los procesos de pretratamiento eficientes como la fotocatalisis, son necesarios para modificar la estructura del contaminante convirtiéndolo en sustancias menos tóxicas y de fácil biodegradación permitiendo así que un tratamiento biológico complete la degradación de éste.

Se evalúa, a escala laboratorio, el comportamiento de la concentración de cianuro presente en una corriente residual del proceso de recubrimientos metálicos (400 mg/L de CN⁻), empleando las técnicas de fotocatalisis heterogénea con luz artificial y solar, dióxido de titanio y peróxido de hidrógeno en un foto-reactor Cilíndrico Parabólico Compuesto (CPC) y biorremediación con una cepa nativa aislada en medio natural, con el fin de obtener concentraciones de cianuro permisibles por la legislación nacional (1 mg/L).

Algunas bacterias como la *Pseudomonas sp.* pueden efectivamente degradar el cianuro en productos menos tóxicos. Durante el metabolismo, ellas emplean el cianuro como fuente de nitrógeno y la glucosa como fuente de carbono para convertirlo en amoníaco y dióxido de carbono

La bacteria es aislada e identificada de un lodo proveniente de la industria de recubrimientos metálicos, ésta es adaptada en una solución de cianuro de 15 mg/L. Durante la biodegradación se cuantifica la eficiencia de remoción, el porcentaje de degradación y se elaboran las curvas de crecimiento de biomasa en el tiempo.

Se analizan, en el proceso biológico, los efectos de concentración inicial de cianuro y agitación sobre el porcentaje de reducción de la concentración de cianuro mediante un diseño de experimentos factorial. En este proceso de biodegradación se determina que la variable más significativa es la agitación y que la concentración inicial de cianuro no es tan relevante para éste. El estudio cinético de la degradación de cianuro se ajusta a cinética de primer orden, siguiendo un régimen Langmuiriano y la cinética de crecimiento de biomasa se ajusta al modelo de Monod.

Las condiciones óptimas de biodegradación de cianuro son pH 9.5, temperatura 28 °C, tamaño del inóculo 1.21×10^5 UFC/ml, agitación de 200 rpm y concentración inicial de cianuro 15 mg/L. Los resultados obtenidos indican que el tratamiento biológico empleando *Pseudomonas sp* puede ser más competitivo que otros tratamientos químicos.

Empleando el acoplamiento de ambas técnicas (fotocatalítica y biotecnológica) se obtiene un 99.86% de reducción en la concentración de cianuro; estos resultados indican que puede emplearse este acoplamiento para la eliminación de compuestos orgánicos tóxicos en aguas residuales.

PALABRAS CLAVES: Cianuro, Fotocatalisis, Biodegradación, *Pseudomonas sp.*

ABSTRACT

This investigation contributes to the study and development of a new photochemical degradation technique (solar and artificial light) and biological process for the treatment of non biodegradable highly toxic substances present in wastewater. Efficient pretreatments as the photocatalytic process are necessary to modify the structure of the pollutants, by transforming them into less toxic substances of easy biodegradation allowing a biological treatment to complete the degradation.

The behavior of cyanide concentration present in a effluent wastewater (400 mg/L of CN⁻) is evaluated to laboratory scale, by the techniques of heterogeneous photocatalytic with artificial and solar light, titanium dioxide and hydrogen peroxide in a Compound Parabolic Cylindrical photo-reactor (CPC) and bioremediation with an isolated native stump; with the purpose of obtaining permissible cyanide concentrations by national legislation (1 mg/L).

Several bacterial species as *Pseudomonas sp* can effectively degrade cyanide into less toxic products. During the metabolism, they use the cyanide as a nitrogen source and glucose as a carbon source to transform it to ammonia and carbon dioxide.

Bacterium is isolated and identified of a mud coming from the industry of metallic compounds recovery, then it is adapted in a solution of cyanide of 15 mg/L. During biodegradation the cyanide efficiency removal and percentage of degradation are quantified and curves of biomass growths are elaborated to the time.

In the biological process, the effects of initial concentration of cyanide and agitation on the percentage of reduction of the cyanide concentration by means of a factorial design of experiments are analyzed.

In this biodegradation process is determined that the most significant variable is agitation and initial concentration of cyanide is not as outstanding for this. The kinetic study of cyanide degradation is adjusted to first order kinetics, following a Langmuirian regime and growth biomass kinetics is model by the Monod equation.

Optimal conditions of cyanide biodegradation are pH 9.5, temperature 28 °C, inoculum size 1.21×10^5 UFC/ml, agitation of 200 rpm and initial concentration of cyanide 15 mg/L. Tests indicate that the biological treatment with *Pseudomonas sp* might be competitive with other chemical treatment process.

Using both techniques together (photocatalytic and biotechnology) a 99.86% of reduction of cyanide concentration is achieved; the results indicate that using the two techniques together could be used to remove toxic organic pollutants from the wastewater.

KEY WORDS: Cyanide, Photocatalytic, Process, Biodegradation, *Pseudomonas sp*.

PROCESO “ACOPLADO” FÍSICO-QUÍMICO Y BIOTECNOLÓGICO PARA EL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES CONTAMINADAS CON CIANURO



1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Degradar el cianuro presente en una corriente residual del proceso de galvanoplastia de la industria de recubrimientos metálicos, empleando la técnica de fotocátalisis heterogénea y biorremediación con una cepa nativa, a escala de laboratorio, con el fin de disminuir la concentración inicial de cianuro. –

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar y seleccionar un microorganismo nativo con potencial para la biodegradación de aguas contaminadas con cianuro, mediante la medición del porcentaje de degradación del contaminante.
- Fotodegradar el cianuro presente en una corriente residual producto del proceso de galvanoplastia de la industria de recubrimientos metálicos, utilizando TiO_2 , peróxido de hidrógeno, un fotorreactor Cilíndrico Parabólico Compuesto (CPC) a escala laboratorio, luz solar y luz artificial para obtener una corriente de menor carga contaminante que pueda ser tratada posteriormente por biorremediación. Se cuantificará la cantidad de cianuro presente en el efluente mediante el método de ión selectivo.
- Evaluar, a escala laboratorio, la biodegradación del cianuro presente en el efluente del proceso

de fotocátalisis, con una cepa nativa en cultivo sumergido, mediante la medición de parámetros involucrados en el tratamiento biológico como: pH y concentración del sustrato en el medio de cultivo; con el fin de obtener concentraciones de cianuro menores a los resultados arrojados en el proceso de fotocátalisis.

- Evaluar el acoplamiento entre los Procesos Avanzados de Oxidación y biodegradación como una estrategia para descontaminar aguas residuales industriales con contenidos altos de cianuro, cuantificándolo por medio del método del ión selectivo. Comparando los valores obtenidos con los límites permitidos por la legislación nacional.

2. INTRODUCCIÓN

El cianuro (CN^-) es una sustancia altamente tóxica, la cual contiene carbono y nitrógeno unidos por un enlace triple; es capaz de reaccionar con facilidad, inclusive en muy bajas concentraciones con metales pesados y puede absorberse por los tejidos con facilidad, aunque en medios aerobios puede oxidarse a ión cianato (OCN^-) que es 1000 veces menos tóxico. (Blesa, 2001).

Anualmente se utiliza más de un millón de toneladas de cianuro en la producción de químicos orgánicos como el nitrilo, el nylon y los plásticos acrílicos, los cuales representan alrededor del 80% de la

producción total. Otras aplicaciones industriales incluyen la galvanoplastia, el procesamiento de metales, la extracción del oro, el endurecimiento del acero, las aplicaciones fotográficas y la producción de goma sintética. (Logsdon *et al.*, 2003).

En la industria de galvanoplastia, el cianuro es empleado en altas concentraciones en el proceso electrolítico con el fin de recubrir metálicamente las piezas y así disminuir la posibilidad de oxidación. A medida que el proceso de galvanoplastia transcurre, la concentración de cianuro disminuye cumpliendo su función en el proceso, finalmente este es desechado y su concentración en el efluente final es considerada tóxica para el medio ambiente.

En la actualidad, esta sustancia es altamente regulada en las descargas al ambiente, según decreto 1594 en la resolución número 1074 del 28 de Octubre de 1997 por la cual se establecen estándares ambientales en materia de vertimientos y en donde se resuelve que todo vertimiento de residuos líquidos de la red de alcantarillado público y/o a un cuerpo de agua deberá cumplir con los estándares establecidos. Para el parámetro de cianuro, expresado como CN en mg/L, se establece un valor máximo de 1.0. (Acercar, 2003).

Una tecnología pionera en el tratamiento de aguas contaminadas con productos orgánicos resistentes a la biodegradabilidad, son los Procesos de Oxidación Avanzada (AOP), estos se emplean como un pretratamiento modificando la estructura de los contaminantes, los cuales se transforman en sustancias menos nocivas e intermediarios fácilmente biodegradables, permitiendo entonces que un procedimiento biológico complete la degradación de la carga contaminante después de un tratamiento fotocatalítico. (Blanco y Malato, 2001, Domènech *et al.*, 2001; Blanco y Malato, 2001).

Dentro de los tratamientos biotecnológicos para la disminución de sustancias tóxicas se encuentra la biorremediación, la cual presentan gran interés debido a que puede llegar a descomponer la totalidad de las sustancias a un bajo costo.

Una de las alternativas para el tratamiento de esta sustancia es acoplar los procesos fotocatalíticos y biotecnológicos, que lleven a la degradación de trazas de cianuro presentes en una corriente residual de la industria de recubrimientos metálicos, permitiendo de esta forma obtener un líquido no tóxico que pueda ser vertido al río y no perjudique el medio ambiente.

Con la realización de este proyecto se pretende degradar el cianuro presente en una corriente residual del proceso de galvanizado, acoplando un sistema biológico que contenga una cepa nativa, con el fin de obtener concentraciones de cianuro permisibles y valorar las aguas industriales como no tóxicas.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la actualidad los residuos líquidos industriales vertidos a la naturaleza sin ningún tratamiento sobrepasa la capacidad de auto-recuperación de los efluentes, alterando sus características y provocando una eminente contaminación ambiental. Entre los residuos que mayor impacto ambiental generan son los llamados no biodegradables o persistentes, debido a que pueden destruir ecosistemas y afectar la salud de poblaciones.

Se ha avanzado en el tratamiento de contaminantes en agua para reducirlos a concentraciones permitidas y dar cumplimiento con especificaciones de vertido determinadas por los organismos competentes, sin embargo, uno de los problemas más serios está relacionado con las sustancias denominadas contaminantes orgánicos persistentes, cuya procedencia es generalmente aguas residuales industriales.

Actualmente, los procesos de galvanoplastia de la industria de recubrimientos metálicos, cuyo objetivo primordial es depositar por medio de un proceso electrolítico una capa de zinc sobre las piezas metálicas, de manera que se obtenga una capa

de recubrimiento que disminuya la posibilidad de oxidación, requiere inevitablemente de soluciones altamente concentradas de cianuro.

A medida que el proceso de galvanoplastia transcurre, la concentración de cianuro disminuye y hay un punto en el cual la concentración de cianuro es tal que la solución ha finalizado su vida útil dentro del proceso y debe ser desechada.

Otro de los procesos que utiliza grandes cantidades de cianuro, es el proceso de recuperación de metales preciosos de oro y plata a partir de yacimientos formados por rocas intrusivas de vetas de cuarzo, presentándose reacciones colaterales con los minerales asociados al oro, bastante complejas y tóxicas. Éstas reacciones forman complejos con la mayoría de los metales presentes en estos minerales, tal es el caso del hierro, cobre, arsénico, mercurio, antimonio, zinc, níquel, plomo entre otros. (Mesa, 1999).

Con la realización del este proyecto se pretende degradar el cianuro presente en una corriente residual del proceso de galvanizado, acoplado un sistema biológico que contenga una cepa nativa, con el fin de obtener concentraciones de cianuro permisibles y valorar las aguas industriales como no tóxicas.

Como consecuencia de este planteamiento, se consideran las siguientes preguntas de investigación:

¿Cuál microorganismo presente en una corriente residual del proceso de galvanoplastia puede crecer en un medio de cultivo selectivo?

¿Existe algún microorganismo nativo con potencial para la biorremediación de aguas contaminadas con cianuro?

¿Cómo se puede fotodegradar el cianuro presente en una corriente residual del proceso de galvanoplastia?

¿Qué parámetros se debe tener en cuenta para evaluar a escala laboratorio el tratamiento biológico

para la biorremediación de cianuro presente en una corriente residual?

¿Qué estrategia se puede emplear para degradar altos contenidos de cianuro presente en una corriente residual industrial?

4. MARCO TEÓRICO

4.1 EL CIANURO

Existen más de 2,000 fuentes naturales de cianuro, entre ellos, distintas especies de artrópodos, insectos, bacterias, algas, hongos y plantas superiores. Las principales formas de cianuro producidas por el hombre son el cianuro de hidrógeno gaseoso y el cianuro sólido de sodio y de potasio. (Logsdo *et al*, 2003).

El cianuro hidrogenado es la forma básica a partir de la cual se derivan otros compuestos y se produce en el mundo entero a partir de sustancias como el amoníaco y gas natural. La producción anual mundial es de 3.000.000 toneladas. (Anónimo 2, 2003).

El cianuro se produce industrialmente de dos maneras: como subproducto de la fabricación de fibras acrílicas y de ciertos plásticos o mediante la combinación de gas natural y amoníaco a altas temperaturas y presiones para producir cianuro de hidrógeno (HCN) gaseoso. Posteriormente, el cianuro de hidrógeno gaseoso se puede combinar con hidróxido de sodio (NaOH) para producir cianuro de sodio (NaCN) y agua (H₂O). Luego se elimina el agua mediante secado y filtrado y el cianuro de sodio se convierte en briquetas blancas y sólidas de aproximadamente 10 centímetros cuadrados. (Logsdo *et al.*, 2003).

El cianuro, en forma de cianuro de sodio y de potasio, es utilizado en la industria manufacturera de joyas, en el proceso de galvanoplastia, "bombardeo de cianuro" (Cyanide bombing), y decapado (stripping) del metal.

Estos procesos generan los siguientes tipos de desechos peligrosos:

- Baños del proceso que contienen cianuro, una alta concentración de metales disueltos y agentes "abrillantadores" orgánicos e inorgánicos.
- Aguas de enjuague que contienen cianuro y metales disueltos.
- Sedimentos y residuos de los baños del proceso que contienen metales y cianuro. (Environmental Protection Agency, 2002).

4.1.1 Intoxicación por Cianuro

Las causas de intoxicación con los cianuros son muy variadas debido al gran uso que se le ha dado; el cianuro es un inhibidor enzimático que bloquea la producción de ATP (Adenosín Trifosfato) induciendo a la hipoxia celular. La ingestión de 200 mg de cianuro de potasio o de sodio puede ser letal.

Es muy rápido el inicio de los signos y síntomas luego de una exposición e incluyen náuseas, olor a almendras amargas, convulsiones, coma, depresión respiratoria, colapso cardíaco entre otras. (Córdoba, 2000; Fuentes y Gómez, 2001).

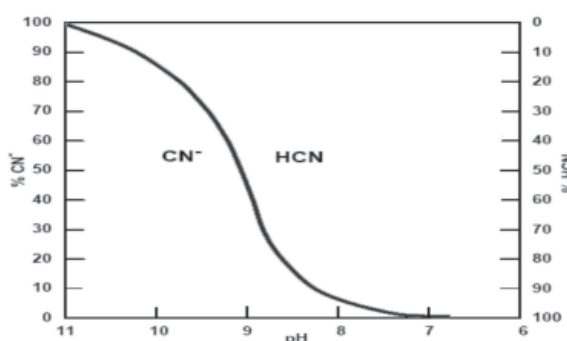
4.2 QUÍMICA DEL CIANURO

4.2.1 Cianuro libre

"Cianuro libre" es el término utilizado para describir tanto el ión de cianuro (CN^-) que se disuelve en el agua del proceso como cualquier cianuro de hidrógeno (HCN) que se forma en la solución. Las briquetas sólidas de cianuro de sodio se disuelven en el agua para formar el ión de sodio y el anión de cianuro (CN^-). El anión de cianuro se combina luego con el ión de hidrógeno para formar HCN molecular. La concentración del ión de hidrógeno en el agua del proceso se expresa mediante el conocido parámetro pH. Casi todo el cianuro libre está presente como HCN cuando hay abundantes iones de hidrógeno presentes, es decir, a un valor de pH de 9.3 o menos. El HCN, entonces, puede volatilizarse y

dispersarse en el aire. Cuando el pH es superior a 10.5, hay pocos iones de hidrógeno presentes y casi todo el cianuro libre está presente como CN^- . En condiciones normales de temperatura y presión, las concentraciones de HCN y CN^- son iguales a un valor de pH de aproximadamente 9.4. En la figura 1 se muestra la relación entre el HCN y el cianuro con el pH (Smith *et al*, 1991).

FIGURA 1
Relación entre HCN y cianuro con el pH



Estas formas de cianuro libre son importantes porque se consideran como los cianuros más tóxicos. Sin embargo, también son las formas que se eliminan más fácilmente de las soluciones mediante elaborados procesos de tratamiento y mecanismos naturales de atenuación.

4.2.2 Complejos de Cianuro

Cuando los elementos químicos se combinan en una solución para formar especies solubles, los químicos se refieren a ellas como "complejos". Existe una amplia gama de interacciones químicas y físicas entre los componentes de los complejos.

Los complejos de cianuros metálicos alcalinos normalmente pueden ser representados por $\text{A}_y\text{M}(\text{CN})_x$. A representa el elemento alcalino presente, y veces en que esta presente el elemento alcalino, M el metal pesado y x el número de grupos CN. La disociación inicial de cada uno de estos complejos de cianuro

solubles producen un anión que es el radical $M(CN)_x^y$. Este puede disociarse con la liberación de CN^- y la consecuente formación de HCN (Smith *et al.*, 1991).

Convencionalmente, los químicos en cianuro distinguen entre los complejos “débiles” y “fuertes” de cianuro. Los complejos débiles de cianuro, con frecuencia denominados cianuros “disociables en ácidos débiles” o cianuros DAD (WAD), pueden disociarse en solución y producir concentraciones ambientalmente significativas de cianuro libre. Los complejos débiles incluyen complejos de cianuro de cadmio, cobre, níquel, plata y zinc. El grado al cual se disocian estos complejos depende en gran medida del pH de la solución.

Por otra parte, los complejos fuertes de cianuro se degradan mucho más lentamente que el cianuro DAD en condiciones químicas y físicas normales. Los complejos de cianuro con oro, cobalto y hierro son fuertes y estables en solución. (Logsdon *et al.*, 2003).

4.3 ALTERNATIVAS PARA DEGRADAR CIANURO

Actualmente existen varias formas de tratar las descargas de cianuro al ambiente, bien sea por métodos tradicionales de separación, o bien sea por métodos de remediación. Los métodos tradicionales de separación transfieren la sustancia tóxica de una corriente a otra por lo cual el problema de fondo persiste. Los métodos de remediación buscan por su parte degradar estas sustancias y transformarlas en otras no tóxicas o menos tóxicas. (Parra, 2001)

La incapacidad de los métodos tradicionales en el tratamiento de aguas residuales para remover efectivamente muchos contaminantes biorrecalcitrantes pone en evidencia la necesidad de nuevos sistemas de tratamientos eficientes. Además de los procesos biológicos, muchos sistemas de oxidación son empleados corrientemente en

diferentes etapas de desarrollo. Durante los últimos 25 años, las investigaciones en purificación de aguas han crecido extensivamente. El riguroso control de contaminantes y la legislación en muchos países han conllevado a una búsqueda intensa para nuevas tecnologías de tratamiento más eficientes. (Parra, 2001)

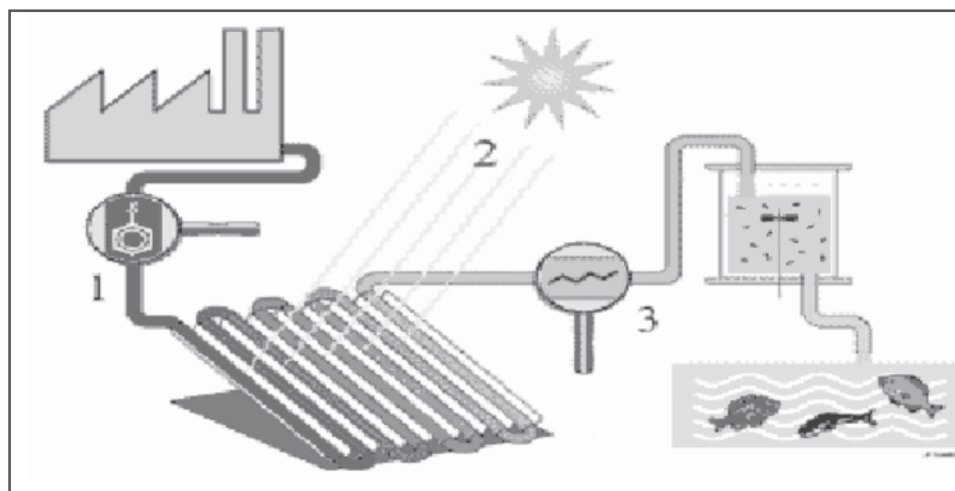
Una nueva técnica de degradación es la combinación de procesos solares y biológicos para el tratamiento de sustancias orgánicas no biodegradables presentes en sistemas acuosos; antes de un tratamiento biotecnológico que completa la degradación de la carga contaminante, es necesario realizar pretratamientos fisicoquímicos para modificar la estructura de los contaminantes, transformándolos en sustancias menos nocivas e intermediarios fácilmente biodegradables.

En la figura 2 se muestra un acoplamiento a escala industrial de los procesos Fotocatalíticos y Biotecnológicos.

Las aguas residuales de los efluentes procedentes de procesos industriales, tales como recubrimientos metálicos, refinación de metales de oro, plata, limpieza de gases procedentes de hornos, cementación de aceros, entre otros, contienen distintas formas de cianuros que, por su alta toxicidad, han de ser tratadas antes de ser vertidas a los cauces públicos.

El tratamiento de oxidación fotocatalítico presenta una gran ventaja sobre las técnicas anteriormente citadas ya que se trata de una técnica que asegura la destrucción de los cianuros sin generarse compuestos intermedios extremadamente tóxicos, como es el caso del cloruro de cianógeno en la cloración, y evitándose también la posibilidad de reversibilidad de alguna de las reacciones. Además, en algunos casos, no es necesario reactivos químicos adicionales, algunos de los cuales en los procesos convencionales de tratamiento son difíciles de manejar, por lo que tampoco se requiere su almacenaje. (Blanco y Malato, 2001).

FIGURA 2
Acoplamiento de procesos fotocatalíticos y biorremediación a nivel industrial

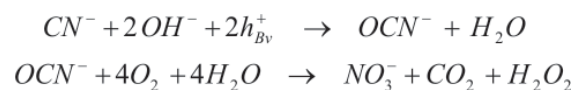


(1) Propiedades fisicoquímicas de los contaminantes y su foto-reactividad. (2) Aplicación de la tecnología de escala de campo solar. (3) Integración de procesos biológicos-fotocatalíticos. (Parra, 2001).

Puesto que los cianuros libres no absorben radiación solar en las longitudes de onda características del espectro solar, es decir, longitudes de onda superiores a 300 nm, la fotólisis no juega un papel importante en la degradación de estos compuestos. En el proceso fotocatalítico la oxidación tiene lugar directamente en la superficie de la partícula del semiconductor, siendo la radiación solar la única fuente de energía empleada y el oxígeno disuelto el único oxidante. En este sentido, se ha demostrado que la oxidación fotocatalítica conduce a una transformación cuantitativa del cianuro a cianato (CN a OCN). (Blanco y Malato, 2001).

ECUACIÓN 1

Reacción de oxidación fotocatalítica del cianuro



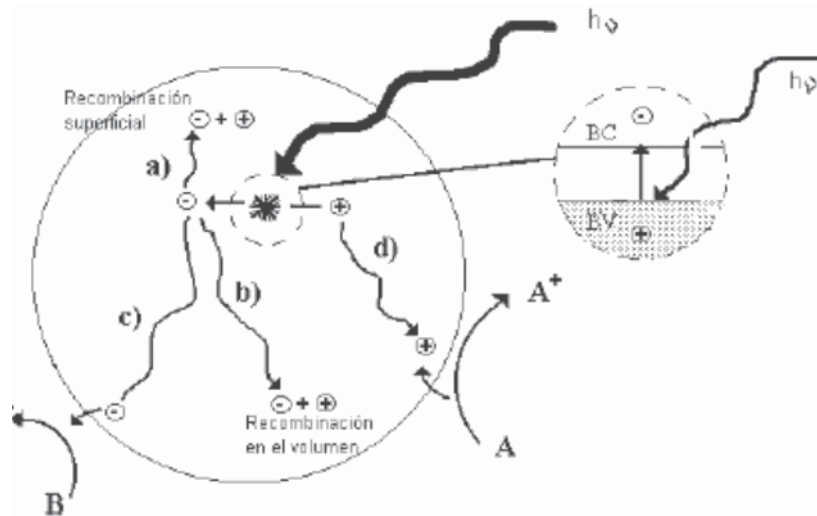
La fotocatalisis, es una reacción catalítica que involucra absorción de luz por un catalizador o un

substrato, entendiéndose como catálisis la acción de un catalizador y como catalizador una sustancia que incrementa la velocidad de reacción sin modificar el cambio en la energía de Gibbs estándar de la reacción. (Serpone y Emeline, 2002).

La fotocatalisis heterogénea es un proceso que se basa en la absorción directa o indirecta de energía radiante (visible o UV) por un sólido (el fotocatalizador, que normalmente es un semiconductor de banda ancha). En la región interfacial entre sólido excitado y la solución tienen lugar las reacciones de destrucción o de remoción de los contaminantes, sin que el catalizador sufra cambios químicos. (Yurramendi *et al.*, 1994; Doménech *et al.*, 2001)

Cuando una partícula del catalizador es excitada con luz suficientemente energética ($h\nu$), un electrón (e^-) es promovido de la banda de valencia a la banda de conducción originando un hueco (h^+), este fenómeno es conocido como el par electrón-hueco y es ilustrado en la figura 3.

FIGURA 3
Operación de una partícula de catalizador excitada fotoquímicamente



En los semiconductores una porción de los pares electrón-hueco fotoexcitados se difunde a la superficie de la partícula catalítica (los pares electrón-hueco son atrapados en la superficie) y toman parte en la reacción química con el dador adsorbidos (D) o el aceptor (A). Los huecos pueden oxidar la molécula dador, mientras que los electrones de la banda de conducción pueden reducir apropiadamente las moléculasceptoras de electrones. (Benedix, 2000)

Se han realizado ensayos para fotodegradar el cianuro empleando luz artificial, presente en una corriente residual producto del proceso de galvanoplastia de la industria de recubrimientos metálicos, en los que se obtiene en un tiempo de recirculación de dos horas un porcentaje de reducción en la concentración de cianuro de 65.50%; sin embargo, prolongando el tiempo de recirculación se descubre una disminución en la velocidad de degradación del cianuro y una estabilización del proceso al cabo de cuatro horas en un 73.17% de reducción, esto se debe al fenómeno de agotamiento del peróxido de hidrógeno durante el tiempo de operación. Adicionando peróxido a intervalos de dos horas, se logra aumentar significativamente el porcentaje de reducción de

cianuro en cuatro horas. Aunque en este último caso se obtiene un excelente porcentaje de reducción, partiendo de una concentración inicial de cianuro de 400 ppm mediante el proceso se llega a una concentración final 10.68 ppm, la cual sigue estando por encima del valor establecido por la legislación nacional de 1 mg/L de CN^- , para vertimientos a alcantarillado público y/o a un cuerpo de agua. Se sugiere un tratamiento biológico. (Gil *et al.*, 2005).

Las medidas de biorremediación consisten principalmente en el empleo de los microorganismos naturales (levaduras, hongos o bacterias) existentes en el medio para descomponer o degradar sustancias peligrosas en sustancias de carácter menos tóxico o bien inocuas para el medio ambiente y la salud humana, estos microorganismos obtienen de la sustancia orgánica la fuente de carbono necesaria para el crecimiento de sus células y una fuente de energía para llevar a cabo todas sus funciones metabólicas. (Marloto y Rogel, 2004).

El fundamento bioquímico de la biorremediación se basa en que en la cadena respiratoria, o transportadora de electrones de las células, se van a

producir una serie de reacciones de óxido-reducción cuyo fin es la obtención de energía. La cadena la inicia un sustrato orgánico que es externo a la célula y que actúa como dador de electrones, de modo que la actividad metabólica de la célula acaba degradando y consumiendo dicha sustancia. (Marloto y Rogel, 2004).

Los factores que interviene en el proceso de biodegradación son múltiples:

- **Temperatura y humedad del suelo**, estimulan el crecimiento y la actividad de los microorganismos aerobios, que necesitan oxígeno para vivir.
- **La acidez del medio**, el pH ácido limita la capacidad de desarrollo de los microorganismos.
- **La disponibilidad de oxígeno**, hay sustancias como el aceite que no se degrada en un medio anaerobio. Por otro lado, hay sustancias como algunos pesticidas y los tóxicos difenilos policlorados PCBs que sólo se degradan en medios aerobios.

Para realizar la biodegradación es necesario considerar algunas etapas.

- **Caracterizar el Contaminante:** Se deben conocer los parámetros básicos como concentración de contaminante, DBO, DQO, pH y temperatura.
- **Selección del Microorganismo:** Esta etapa es muy importante ya que cada especie presenta diferentes capacidades para la biodegradación; para la remediación de aguas contaminadas con trazas de cianuro la literatura recomienda emplear *Pseudomonas*. (Suh, 1994; Wang *et al.*, 1996).
- **Medio de Cultivo:** Todos los microorganismos vivos necesitan cierta cantidad de macronutrientes y micronutrientes o trazas de elementos para sobrevivir y realizar todas sus funciones metabólicas.

- **Inóculo:** Es el proceso que se lleva a cabo para dar inicio a la fermentación.
- **Fermentación:** Esta etapa es la parte más importante en el proceso de biorremediación. (Eweis y Ergas, 1999; White, 2000).

4.4 PARÁMETROS INDICADORES DE MATERIAL ORGÁNICO POR DEMANDA DE OXÍGENO

Tanto la actividad natural como la humana contribuyen a la contaminación orgánica de las aguas naturales, es así como, en los vertimientos industriales y domésticos se obtienen múltiples compuestos orgánicos que pueden llegar a deteriorar el medio ambiente.

El empleo de los tratamientos biológicos para su eliminación utiliza, en ciertos casos, microorganismos aerobios que aprovechan el oxígeno molecular para la conversión de material orgánico en inorgánico.

Entre los parámetros mas comunes para determinar la materia orgánica presente en un cuerpo de agua, se tiene la Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO₅), la Demanda Química de Oxígeno (DQO) y el Carbono Orgánico Total (COT). (Restrepo, 2000).

4.4.1 Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO)

La Demanda Bioquímica de Oxígeno se define como la cantidad de oxígeno requerido por las bacterias en el proceso de estabilización de la materia orgánica; es una medida que permite establecer la biodegradabilidad del agua contaminada y por lo tanto sirve como control en el proceso de tratamiento biológico.

4.4.2 Demanda Química de Oxígeno (DQO)

Mide la capacidad de consumo de un oxidante químico (dicromato o permanganato) por las materias oxidables contenidas en el agua y se expresa en ppm (mg/L) de O₂.

4.5 PROCESO DE GALVANIZADO

El proceso de recubrimientos metálicos por vía electrolítica hace referencia a la aplicación de capas delgadas de metales sobre sustratos metálicos o plásticos mediante electricidad. Los metales para recubrimiento más comunes son: oro, plata, cromo, níquel, cobre, estaño y zinc. (CNPML, 2000).

El recubrimiento metálico se emplea para proporcionar resistencia contra la corrosión, resistencia contra el uso, conductividad eléctrica o térmica, dureza y decoración (mejora apariencia visual).

El galvanizado, es un tipo de procedimiento para proteger al acero contra la corrosión, está basado en el contacto electrolítico de las piezas a proteger con un ánodo de zinc, en presencia de un electrolito.

El recubrimiento se lleva a cabo en tanques (baños de recubrimiento) en donde se encuentra dispuesto el electrólito. El electrólito utilizado es una solución de cianuro de sodio (por ser el cianuro una sustancia que se acompleja fácilmente con los metales), de esta forma el metal menos noble (ánodo de zinc) aporta iones a la solución, la solución contiene así al metal que va a ser depositado en forma aniónica. Una vez la corriente eléctrica es generada por una fuente de energía continua, pasa a través de la solución por medio de dos láminas sumergidas en el líquido, denominadas electrodos.

El objeto a galvanizar va dentro de la solución y entre los electrodos (en el trayecto por donde atraviesa la corriente). El electrólito se descompone por efecto de la corriente eléctrica, separándose del mismo las partículas metálicas que se desean fijar sobre el objeto a galvanizar, es decir, el cátodo (objeto a ser recubierto) recibe los iones metálicos de la solución. Así, la galvanización es un fenómeno electroquímico provocado por la acción de una corriente eléctrica en un líquido conductor, produciendo la fijación

sobre una pieza de partículas provenientes de dicho líquido. (Castro y Pineda, 2004).

4.6 *Pseudomonas fluorescens*

Las *Pseudomonas fluorescens*, son bacilos Gram Negativo, rectos o curvados no vibríodes sin esporas, vainas, ni apéndices, con flagelos polares, pertenecientes a la familia *Pseudomonaceae*; son organismos aerobios órganotróficos sin metabolismo fermentativo, aunque pueden producir pequeñas cantidades de ácido procedente de la glucosa. Su diámetro se encuentra entre 0.7-0.8 μm .

Crecen quimiorganotróficamente, es decir, son organismos que dependen de reacciones de óxido reducción para obtener energía y utilizan sustancias oxidables a pH neutro o básico. Se reproducen a temperaturas mesófilas (entre 25 y 30 °C); son organismos que presentan gran capacidad para utilizar una diversidad de nutrientes como donadores y aceptores de estos, haciéndolos nutricionalmente muy sencillos y permitiéndoles una amplia distribución en la naturaleza. Arrojan resultados positivos en pruebas bioquímicas como Oxidasa y Catalasa. (Macfaddin, 1980; Anónimo 3, 1996; Breed, 1997)

Su versatilidad 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; Anónimo 3, 1996; Breed, 1997).

La *Pseudomonas fluorescens* se encuentra involucrada en algunos procesos de infección, casi siempre como agente oportunista, se suele aislar como patógeno en pacientes cuyas defensas se encuentran comprometidas. En la tabla 1 se muestran algunas características generales de la *Pseudomonas fluorescens*. (Córdoba, 2000).

TABLA 1
Características generales de *Pseudomonas fluorescens*

Característica	Resultado
Producción de pigmentos pirocianínicos	-
Reacción oxidasa	+
Reacción catalasa	+
Fermentación de carbohidratos	-
Producción de pioverdina	+
Prueba Indol	-
Tolerancia a la cetrimida	+
Reducción de nitratos	+
Crecimiento autótrofo con H ₂	-
Movilidad	+
Utilización de citrato	+
Crecimiento a 41°C	-
Prueba ureasa	+
Prueba lipasa	-

+ : Resultado positivo
- : Resultado negativo

5. METODOLOGÍA

5.1 MATERIALES Y EQUIPOS

En la siguiente lista se resumen los equipos de laboratorio empleados para el desarrollo del proyecto:

5.1.1 Reactivos

- Cianuro de sodio
- Cianuro de potasio
- Agua destilada
- Ácido acético
- Caldo nutritivo
- Agar nutritivo
- Solución DNS
- Solución de hidróxido de potasio
- Agar selectivo para *Pseudomonas*.
- Dióxido de titanio (Degussa P-25).
- Solución 1N de hidróxido de sodio.
- Solución de carbonato de sodio 0.1 M
- Solución de bicarbonato de sodio 0.1 M
- Aguas residuales provenientes de la industria de recubrimientos metálicos

5.1.2 Equipos

- Tubos Eppendorf
- Cajas Petri
- Micropipeta 10 mL
- Asa bacteriológica
- Tubos taparroscas de 25 ml
- Vidrio de reloj
- Espátula
- Cronómetros
- Foto-reactor
- pH-metro marca METROHM
- Incubadora marca WTBinder
- Centrífuga Universal marca HETTICH
- Balanza Adventurer™ OHAUS con precisión de 0.01 g.
- Beakers para almacenamiento de muestras
- Balde para preparación de muestras
- Shaker marca New Brunswick Science
- Electrodo ión-selectivo de cianuro Monokrystal
- Electrodo de referencia Monokrystal
- Espectrofotómetro marca Cole Parmer, Helios Gamma
- Agitador magnético con calentamiento marca Barnsted/Thrmolyne corporation
- Material volumétrico: Erlenmeyers de 1L y 500 ml, balones volumétricos de 250 ml y 25 ml, pipetas volumétricas de 1, 5, 10 ml, beakers de 50 ml.

5.1.3 Especificaciones técnicas del foto-reactor

- Número de lámparas 10
- Diámetro de las lámparas 2.25 cm
- Potencia de la lámpara 30 W
- Tubos de cuarzo 10
- Diámetro de tubos 3.2 cm
- Longitud tubos 150 cm
- Capacidad 20 L

En la figura 4 se muestra el reactor cilíndrico parabólico compuesto (CPC) empleado en el proceso fotocatalítico.

FIGURA 4
Foto-reactor cilíndrico parabólico compuesto (CPC)



5.2 AISLAMIENTO DEL MICROORGANISMO

Para obtener microorganismos nativos adaptados a la presencia de cianuro, se toman diferentes muestras de los lodos generados en los tanques de descarga de los baños de recubrimientos metálicos presentes en el proceso de galvanizado, los cuales se encuentran abiertos, haciendo contacto con el ambiente de la planta, lo que facilita el crecimiento de microorganismos. Las muestras para los ensayos de biodegradación se recolectan en envases plásticos de 20 litros, y las muestras de lodo para el aislamiento de la cepa son almacenadas en envases de vidrio por personal de la planta.

Las muestras de lodo recolectadas en la industria de galvanizado se clasifican en: lodo de baños y lodo de descarga. *El lodo de baño* hace referencia a la biopelícula que se ha ido formando por acumulación de sólidos y microorganismos a través del tiempo en los tanques de galvanizado. *El lodo de descarga* es aquel que se genera luego de filtrar el efluente que es descargado al cauce público.

Para el aislamiento, se realizan varios medios de cultivo, con el fin de estudiar el crecimiento de los microorganismos presentes en el lodo. Según la revisión bibliográfica las *Pseudomonas sp.* son los microorganismos que presentan una mayor eficiencia en la degradación de compuestos persistentes, por esta razón se tiene un gran interés por aislar este tipo de microorganismos en un medio selectivo. (Shivaraman *et al*, 1991; Suh *et al*, 1994; Chapatawala *et al*, 1997; Arzu *et al*, 2000; Arzu *et al*, 2002, Akcil *et al*, 2003; Gutiérrez *et al*, 2003; Ebbs, 2004)

En la etapa inicial del aislamiento, se realizan siembras de cada uno de los lodos en agar nutritivo con el fin de conocer la variedad de microorganismos que habitan en el lodo; para esto se emplea la técnica de estriado en placa por método clásico, incubando las placas durante 24 horas a 30°C.

Luego de la incubación se observa que en la muestra procedente del *lodo de baños* no hay presencia de microorganismos, posiblemente por la alta concentración de cianuro presente en los baños de recubrimiento (8000 mg/L) lo que impide la proliferación de microorganismos, por el contrario, en la muestra del *lodo de descarga*, cuya concentración de cianuro es 6 mg/L y pH 10.7, crecieron microorganismos como: hongos, levaduras y bacterias; éstas últimas se seleccionan para ser aisladas en medios selectivos y poder así encontrar la bacteria de interés. Además, se procede a la observación microscópica mediante montaje en húmedo y coloración de Gram, mostrando abundancia de bacilos cortos Gram-negativos.

Debido al especial interés por aislar *Pseudomonas sp.* para llevar a cabo la biodegradación, se eligen los siguientes medios selectivos para este microorganismo:

Agar F (Merck 10989), Agar P (Merck 10988), Agar GSP (Merck 10230) y Agar Cetrimide (Merck 5284). Una vez preparados los medios de cultivo se hacen varias siembras de las bacterias seleccionadas empleando la técnica de estriado en placa por método clásico y método francés, incubando las placas durante una semana a 30°C.

5.3 IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO

Transcurrido el tiempo sugerido, se observa que en el agar GSP crecen colonias grandes de coloración azul-violeta rodeadas por una zona rojo-violeta. En el agar F, P y Cetrimide crecen diferentes colonias y se seleccionan aquellas que la literatura sugiere como posibles *Pseudomonas sp.*, las cuales presentan características generales como colonias de 2-3 mm, de color blanco-hueso, forma circular, borde entero y elevación convexa. Al observar las colonias bajo luz ultravioleta éstas muestran una coloración fluorescente. (Merck, 1981)

5.4 MEDICIÓN DE CIANURO

Se emplea un electrodo ión selectivo tipo 06-37, marca Monokrystal, fabricado en la República Checa, para la determinación de la concentración de cianuro

5.4.1 Aplicaciones Electrodo Ión Selectivo

El electrodo ión-selectivo de cianuro, es utilizado como un electrodo selectivo de detección de iones de cianuro: para mediciones directas de la concentración o actividad de iones de cianuro en varias soluciones o suspensiones cuando se usa una curva de calibración (Monokrystal, 2004).

Para la determinación de la curva de calibración se realiza varias soluciones estándar de cianuro de potasio de concentraciones 10^{-2} a 10^{-6} M. Una solución 10^{-2} M de cianuro de potasio es preparada pesando 0.6511 g de KCN por litro. Las demás soluciones estándar son preparadas mediante la dilución correspondiente usando siempre solución 10^{-1} M de KOH (5.61 g KOH en 1 litro de agua destilada).

Las soluciones estándar son medidas mediante el electrodo ión-selectivo de cianuro y un electrodo referencia, en un dispositivo apropiado para la medida. La lectura de los valores de la fuerza electromotriz

en mV de cada una de las soluciones estándar son ubicadas en una gráfica semilogarítmica contra los datos de concentración de CN⁻.

5.5 ENSAYOS PRELIMINARES

En los ensayos preliminares, se trabaja con un medio de cultivo sintético de cianuro de sodio (NaCN) como única fuente de nitrógeno.

Se emplean erlenmeyers de 500 ml con volúmenes de 200 ml del medio sintético, se realizan ensayos por triplicado y con un control abiótico (sin células), a los cuales cada dos horas se les extrae muestra de 2.5 ml para llevar a cabo la medición de degradación de cianuro, crecimiento de biomasa (Método de densidad óptica) y pH.

5.5.1 Esterilización

Los medios de cultivo sintéticos son “autoclavados” al inicio de los ensayos preliminares; sin embargo, la concentración de cianuro disminuye luego de ser sometidos a este proceso, por lo que se verifica si es posible omitir este paso al trabajar con medios de cultivo (sintético de NaCN y solución real del proceso de galvanizado) con concentraciones de cianuro de 4 mg/L y pH 9.5

Se realizan varias pruebas para determinar si es posible el crecimiento de microorganismos en este medio sin previa adaptación. Se dejan erlenmeyers expuestos al ambiente con medio de cultivo durante 48 horas y con agitación a 140 rpm; luego se sacan alícuotas de 1 ml, se siembran por vaciado en superficie en cajas de Petri con Agar nutritivo y se incuban durante 48 horas a 30°C.

5.5.2 Variables de Operación

Se realizan varias pruebas con el fin de establecer las variables de operación.

5.5.2.1 pH

Se realizan ensayos para establecer el pH adecuado para el crecimiento de la bacteria, se eligen intervalos entre 8.5 y 10; debido a que la solución de cianuro presenta valores altos de pH.

Una vez el valor de pH se haya establecido, se procede a seleccionar una solución buffer que cumpla con la función de controlar cambios en esta variable de operación.

Se realizan ensayos con varias soluciones buffer que cumplan con el objetivo de mantener el pH básico (en el valor de interés), para ello se pre-seleccionan tres soluciones buffer: (Merck, 1981).

- 1 Buffer Glicina
- 2 Buffer Borato
- 3 Buffer Carbonato

5.5.2.2 Temperatura

La temperatura juega un papel muy importante en las condiciones ambientales de crecimiento microbiano. Teniendo en cuenta que la *Pseudomonas fluorescens*, es un microorganismo mesófilo que crece a temperatura ambiente, y el lugar de trabajo permanece a temperatura constante de 28°C, esta variable de operación se fija en 28°C.

5.5.2.3 Agitación

Debido a que la *Pseudomonas* es una bacteria aerobia, la agitación es de vital importancia para suministrarle oxígeno por medio del intercambio gaseoso entre el medio de cultivo y el microorganismo. Con base en las referencias bibliográficas, se determina emplear un Shaker (New Brunswick scientific - C1 classic) con velocidad fija de operación de 140 rpm para los ensayos preliminares (Jerabkova y Kralova, 1999; Patil y Paknika, 2000).

5.5.2.4 Nutrientes

Teniendo en cuenta los elementos esenciales para la bacteria: nitrógeno y carbono, se realizan ensayos preliminares en los cuales se prepararon medios de cultivo con cianuro como única fuente de nitrógeno y carbono, y medios de cultivo con glucosa y cianuro (Como única fuente de nitrógeno).

A partir de la revisión bibliográfica, se determina la adición de glucosa al medio de 1 g/L (Arzu *et al*, 2000; Patil y Paknikar 2000).

5.5.2.5 Inóculo

Se toma una muestra de la cepa aislada de *Pseudomonas fluorescens* empleando un asa bacteriológica y se adiciona dentro del caldo nutritivo estéril.

Una vez se ha sembrado la bacteria en caldo nutritivo con 24 horas de incubación, se adiciona el 10% de volumen del medio de cultivo a cada uno de los erlenmeyers.

Para garantizar la misma cantidad de biomasa inoculada, se tiene en cuenta la medición de la biomasa por absorbancia en un Espectrofotómetro uv-visible a 540 nm (Cole Parmer, Helios Gamma).

5.6 MEDICIÓN DE BIOMASA

5.6.1 Curva estándar para medición de biomasa

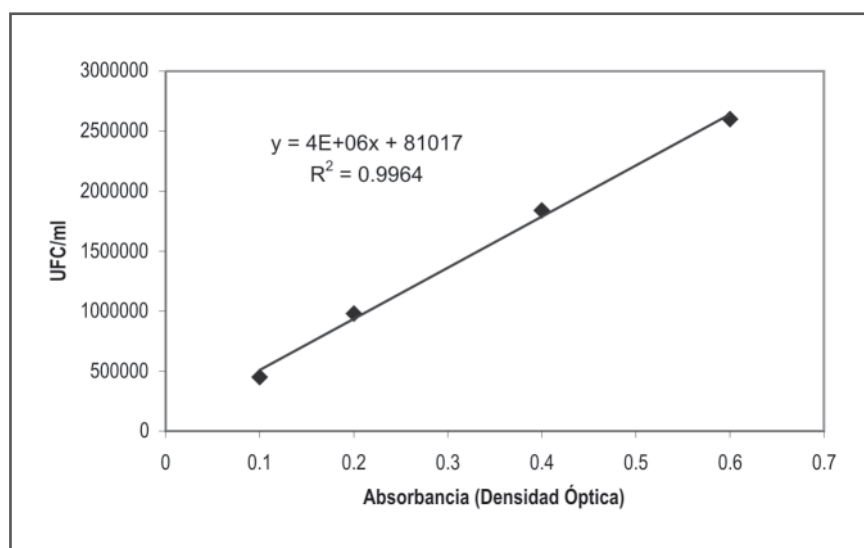
El conteo en placa o de colonias es un método de medición de biomasa que permite un

recuento de células viables. Una célula viable es aquella que es capaz de reproducirse para dar origen a una descendencia (cada célula viable da origen a una colonia) y la forma para realizar este conteo es determinando un número de células capaces de generar colonias sobre la superficie de un medio sólido. Las unidades para este método están dadas en: Unidades Formadoras de Colonia por mililitro de muestra (UFC/ml). (Madigan *et al.*, 1999)

Para medir la concentración de biomasa y al mismo tiempo tener aproximadamente la misma cantidad de biomasa en cada ensayo, es necesario elaborar una curva estándar, la cual permite relacionar medidas directas de recuento en placa (UFC) con las indirectas de densidad óptica (absorbancia). Para esto se hacen varias diluciones de la muestra original que contiene la bacteria.

En la figura 5 se muestra la curva estándar para la medición de biomasa de la *Pseudomonas fluorescens*.

FIGURA 5
Curva estándar para la medición de biomasa *Pseudomonas fluorescens*



5.7 MEDICIÓN DE GLUCOSA

5.7.1 Protocolo para la determinación de glucosa y azúcares reductores con DNS (Ácido 3,5-dinitro Salicílico). (Sáez, 2004)

Se preparan 50 ml del Stock de glucosa 4 mg/mL, se distribuyen en eppendorf, y se almacenan a 4°C. La tabla 2 muestra las diluciones para realizar la curva de calibración.

TABLA 2
Diluciones para realizar la curva de calibración

Nº Dilución	1	2	3	4	5	6
Glucosa stock (mL)	0.025	0.05	0.075	0.1	0.125	0.15
H ₂ O destilada (mL)	0.475	0.450	0.425	0.4	0.375	0.35
Volumen total (mL)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

5.8 CONSERVACIÓN DE MICROORGANISMOS

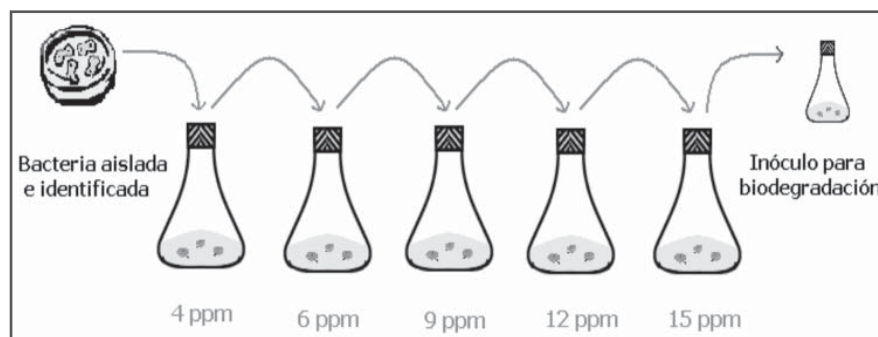
Se emplean los métodos de conservación por suspensión en agua destilada estéril y en agar inclinado con agar nutritivo en aceite mineral estéril. Estos métodos alternativos dan altos porcentajes de viabilidad en diversos tipos de microorganismo, y consiste en conservar unas cuantas células del cultivo en suspensión de agua estéril o en viales con agar nutritivo suspendidas en aceite mineral estéril.

5.9 ADAPTACIÓN DEL MICROORGANISMO EN MEDIO LÍQUIDO

El microorganismo identificado se lleva a diluciones de la solución sintética de cianuro de sodio de la siguiente forma:

- Se prepara una solución de 4 m/L de NaCN en 1 litro de Solución Buffer carbonato y agua destilada.
- Se adiciona a la solución anterior 1 g/L de glucosa y se mide el pH.
- Una vez lista la solución, se vierten 200 mL del medio sintético en erlenmeyers de 500 mL y cada uno es inoculado con la bacteria (0.01 Densidad óptica) y puestos en agitación constante a 140 rpm (Figura 6).

FIGURA 6
Proceso de adaptación



Se toma 1.2 mL de muestra cada 2 horas durante 2 días con el fin de medir el crecimiento de la biomasa por el método de densidad óptica y degradación de cianuro mediante el método de ión selectivo.

Las bacterias en la solución de 4 mg/L de cianuro se adaptan y siguiendo el mismo procedimiento anterior se incrementa la concentración gradualmente (6, 9, 12 mg/L) hasta llegar a una concentración final de 15 mg/L.

5.10 DISEÑO DE EXPERIMENTOS

En un experimento factorial, los efectos de dos o más factores se investigan en forma simultánea. Si se sospecha que la conducta de un factor varía con los cambios de otro, dicha conducta puede probarse mediante un conjunto factorial de tratamientos, planificando un diseño experimental adecuado.

Cuando dos o más factores se prueban en todas las combinaciones posibles, se dice que los tratamientos resultantes son factoriales. Los efectos diferenciales de un factor sobre otro reciben el nombre de interacción. (Little y Jackson, 1979).

En esta investigación se realiza un diseño de experimentos factorial, empleando el paquete estadístico Statgraphics Versión 5.0 para la realización del análisis de varianza. Este diseño de experimentos solo se realiza para el proceso de biorremediación en donde se decide variar la concentración inicial de cianuro y la agitación en el cultivo sumergido. En la tabla 3 se muestra los factores y niveles del diseño de experimentos y en la tabla 4 se muestra el diseño de experimentos empleando el paquete estadístico Statgraphics. La variable de respuesta a medir en este diseño es el porcentaje de degradación de cianuro.

TABLA 3
Factores y niveles del diseño de experimentos

Factor	Nivel 1	Nivel 2
Concentración inicial cianuro	10 mg/L	15 mg/L
Agitación	140 rpm	200 rpm

TABLA 4
Diseño de experimentos factorial

Repeticiones	Concentración CN (mg/L)	Agitación (rpm)
1	10	200
1	15	200
1	10	140
1	15	140
2	10	200
2	15	200
2	10	140
2	15	140
3	10	200
3	15	140
3	10	140
3	15	200

En el proceso de fotocatalisis se retoma el diseño de experimentos de superficie de respuesta del proyecto "Oxidación Fotocatalítica de cianuros" (Gil *et al.*, 2005), cuyos parámetros adecuados para este mismo efluente fueron definidos y sirven de base para el desarrollo de esta investigación.

5.11 ACOPLAMIENTO

El proceso de degradación del cianuro presente en una corriente residual del proceso de galvanoplastia de la industria de recubrimientos metálicos se lleva a cabo de la siguiente forma:

5.11.1 Fotocatálisis

Para el proceso de fotocatalisis heterogénea con luz solar y artificial se emplea un fotorreactor Cilindro Parabólico Compuesto (CPC) a escala laboratorio (figura 5), agua residual proveniente de la industria de recubrimientos metálicos, la cual se encuentra a 400 ppm de cianuro.

El agua proveniente del proceso de fotocatalisis es preparada teniendo en cuenta los parámetros de operación establecidos en el trabajo de Gil *et al.* (Gil *et al.*, 2005), en el cual se obtuvieron los resultados que se presentan en la tabla 5.

TABLA 5
Resumen de las variables del diseño para el proceso de fotocatalisis

Factor	Óptimo
pH	9.51
TiO ₂ (g/L)	0.05
H ₂ O ₂ 30% (mL/L)	2

Después de finalizar la preparación del agua, esta se deja recirculando en el reactor por un período de 30 minutos en la oscuridad, durante este tiempo el agua preparada no se pone a circular con las lámparas encendidas, con el fin de permitir que se alcance el equilibrio de adsorción entre los sustratos y el TiO₂,

el cual, según la revisión bibliográfica, se consigue a los 30 minutos. (Salem, 2000; Tanaka *et al.*, 2000; Al-qaradawi y Salman, 2002; Lachheb *et al.*, 2002).

Después de transcurridos los 30 minutos, se adiciona el H₂O₂. Una vez acondicionado el efluente se toma una primera muestra de 25 mL para medirle DQO.

Con el fin de garantizar la homogeneidad en la solución se deja circular 1 minuto más, antes de encender las lámparas, una vez cumplido ese tiempo, se deja circular la solución un caudal de 12.76 L/min. Se procede a tomar muestras de 5 mL cada 30 minutos para medir el porcentaje de degradación de cianuro mediante el método de lón selectivo de cianuro. El pH se mantiene constante en 9.51 adicionándole gotas de hidróxido de sodio.

Se hace una reinyección de peróxido de hidrógeno a las dos horas y se continúa sacando muestras durante dos horas más.

Una vez cumplido el tiempo de degradación, el efluente que se trata mediante fotocatalisis ingresa inmediatamente al proceso de biorremediación, esta configuración se conoce como sistema acoplado.

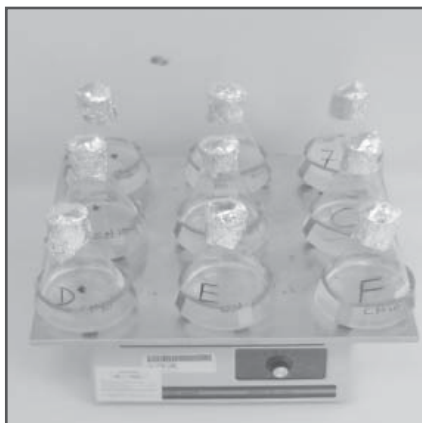
5.11.2 Biorremediación

Al efluente de fotocatalisis se le adiciona 1 g/L de glucosa. El proceso de biorremediación se hace en medio sumergido empleando erlenmeyers de 1 L, con volumen de trabajo de 300 mL Cada uno es inoculado con la bacteria teniendo en cuenta que la absorbancia debe ser constante (0.01) con el fin de garantizar aproximadamente las mismas UFC/mL. Los erlenmeyers se ponen en agitación constante según diseño de experimentos y se hace control de pH para mantenerlo en 9.5 durante todo el proceso.

Se toman muestras de 2 mL cada tres horas y se hace medición de concentración de cianuro, absorbancia y concentración de glucosa.

En la figura 7 se muestra el montaje para el desarrollo de la biorremediación.

FIGURA 7
Cultivo sumergido para el proceso de biorremediación



6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

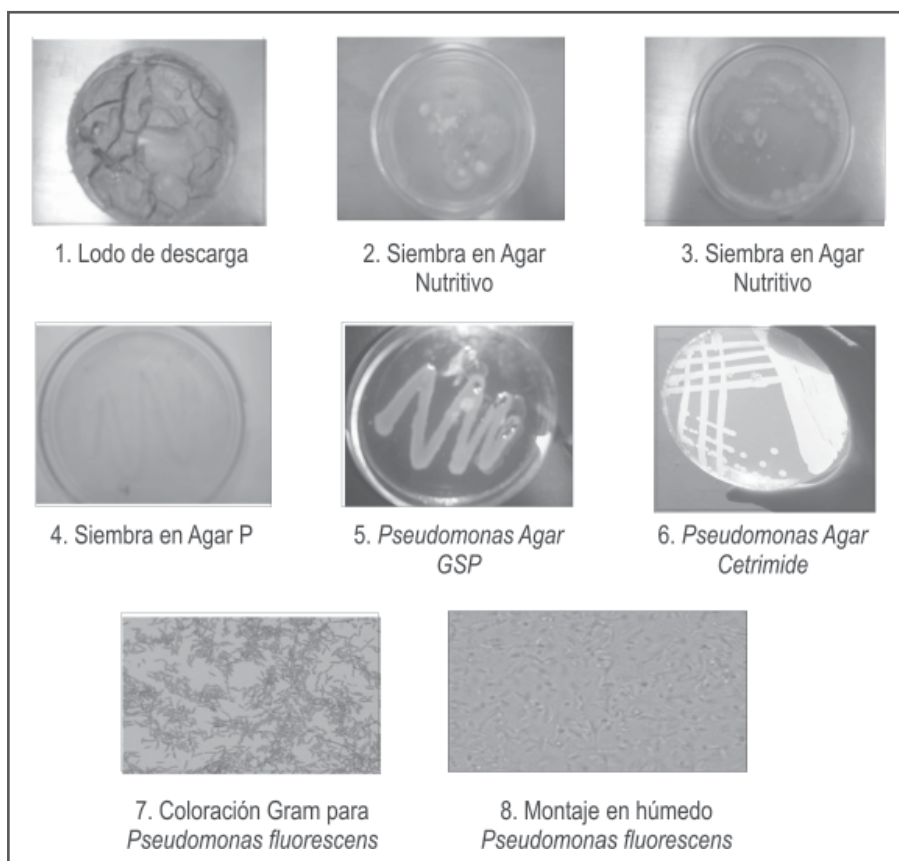
6.1 IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO

Las descripciones presentadas, indican que la bacteria es *Pseudomonas sp.*, y para confirmarlo, se somete a un análisis microbiológico. Los resultados para *Pseudomonas sp.* son positivos.

Las pruebas de identificación para determinar el género, por medio del sistema Vitek (Bio Mérieux); el resultado indica que la bacteria es *Pseudomonas fluorescens*.

En la figura 8 se muestra la secuencia que se hace para la identificación de la *Pseudomonas sp.*

FIGURA 8
Secuencia para la identificación de *Pseudomonas fluorescens*



6.2 ESTERILIZACIÓN

En los procesos biotecnológicos, la asepsia juega un papel muy importante en la eliminación o destrucción de todos los microorganismos presentes, capaces de competir con el organismo deseado en las condiciones de cultivo.

Para evitar la contaminación, es necesario emplear inóculos puros, esterilizar el medio de cultivo y el fermentador, así como todos los elementos o aditivos que hayan de suministrarse durante el proceso de fermentación, la estrategia debe completarse con el mantenimiento de las condiciones de esterilidad durante el proceso de operación. Sin embargo, en algunos procesos, características específicas del medio de cultivo como por ejemplo, nutrientes aprovechados solamente por un reducido número de microorganismos, o condiciones extremas de operación en cuanto a pH o temperatura, confieren una cierta protección desde el punto de vista de contaminación al proceso fermentativo. (Gódia y López, 1998).

Los resultados de las pruebas de esterilidad aplicadas a muestras sin inocular tratadas con fotocátalisis, revelan que no hay crecimiento alguno de microorganismos, ningún microorganismo crece en esta sustancia sin previa adaptación. A partir de esto se determina que la esterilización se realiza a todos los elementos y aditivos que intervienen durante el proceso de operación, exceptuando la solución de cianuro, ya que éste a altas temperaturas se volatiliza.

6.3 pH

Los resultados de los ensayos preliminares muestran que a pH entre 9.7 y 10 no hay crecimiento de biomasa y la concentración inicial de cianuro permanece constante, es decir, no hay cambio entre los ensayos y el control (Abiótico).

A pH entre 8.5 y 9.2 el control abiótico muestra una reducción significativa de la concentración de cianuro inicial, comprobando con el control abiótico que a pH por debajo de 9.3 el ión cianuro forma ácido cianhídrico, el cual es un compuesto altamente tóxico y volátil, por lo tanto la reducción de cianuro se debe a la volatilización del producto, mas no al metabolismo de las células. (Smith *et al*, 1991).

Para realizar los ensayos se establece un valor fijo de pH 9.5, garantizando así que la degradación de cianuro se lleve a cabo por la intervención de las bacterias. (Shivaraman *et al*, 1991).

Por costos, efectividad y componentes que adicionan nutrientes al medio de cultivo, se elige el buffer carbonato para el control de pH, el cual esta compuesto por carbonato de sodio 0.1 M y bicarbonato de sodio 0.1 M .

6.4 NUTRIENTES

Siendo el carbono y el nitrógeno compuestos esenciales para el crecimiento de este tipo de microorganismo, es importante agregar glucosa al medio de cultivo debido a que el carbono presente en el cianuro no es suficiente para un crecimiento efectivo y además, en altas cantidades puede resultar inhibidor. La comparación en el porcentaje de degradación con y sin glucosa se muestra en la tabla 6. (Harris y Knowles, 1983; Kunz *et al.*, 1998; Siller y Winter, 1998; White *et al*, 2000).

Los ensayos realizados muestran una reducción en la concentración de cianuro inicial, pero se elige el medio de cultivo con glucosa por degradar el cianuro en mayor cantidad si se compara con el medio de cultivo sin éste compuesto.

TABLA 6
Comparación de porcentaje de degradación de solución sintética de cianuro a 4 mg/L con y sin glucosa

Muestra	Tiempo (h)	%Degradación Cianuro	Crecimiento biomasa	Velocidad de remoción (mg/Lh)
Con Glucosa	48	71.06%	89.97%	0,0558
Sin Glucosa	48	32,63%	40.74%	0,0256

6.5 ADAPTACIÓN

A continuación se muestran las curvas de biomasa y de degradación de cianuro que se obtienen en el proceso de adaptación. La biomasa obtenida al terminar cada adaptación se emplea como inóculo para la siguiente. En las figuras 9 a la 13 se muestran las curvas de crecimiento y biodegradación de las adaptaciones de 4 mg/L, 6 mg/L, 9 mg/L, 12 mg/L y 15 mg/L de cianuro, respectivamente.

FIGURA 9
Adaptación a 4 mg/L

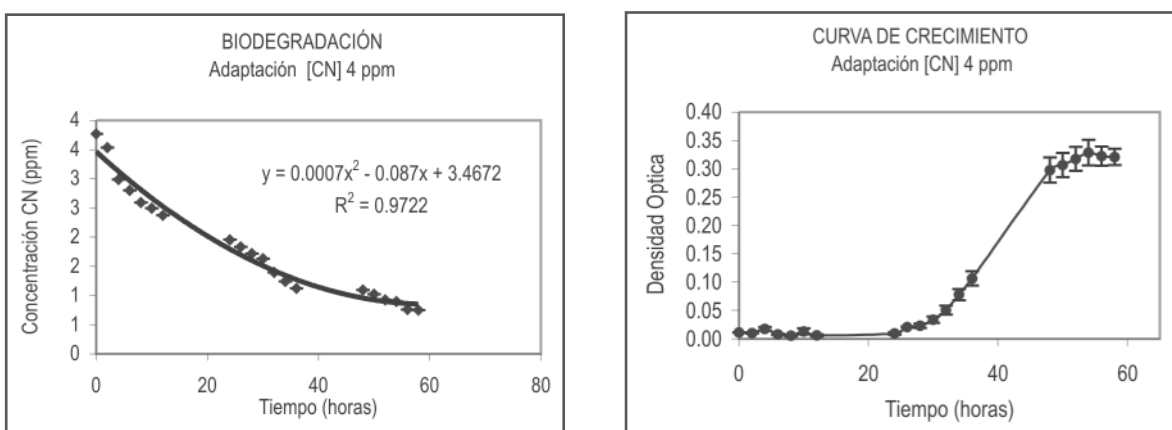


FIGURA 10
Adaptación a 6 mg/L

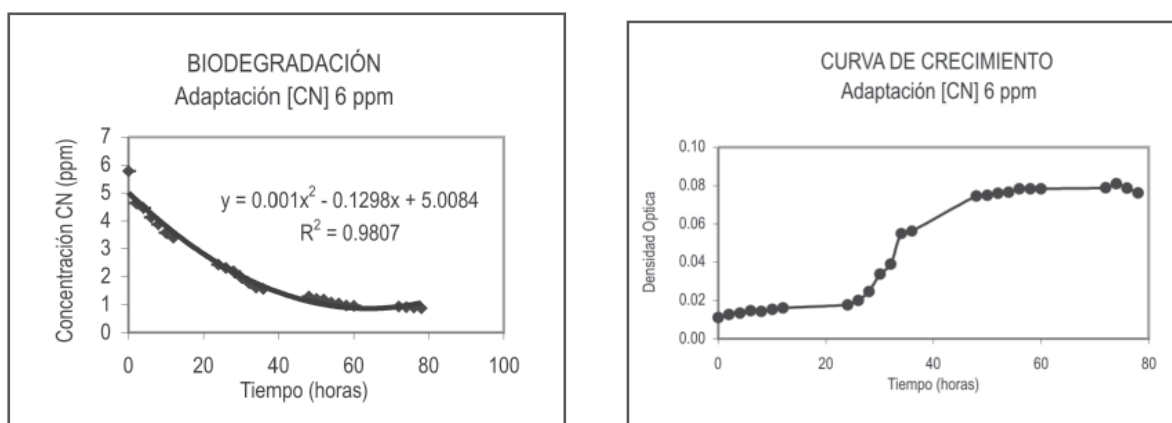


FIGURA 11
Adaptación a 9 mg/L

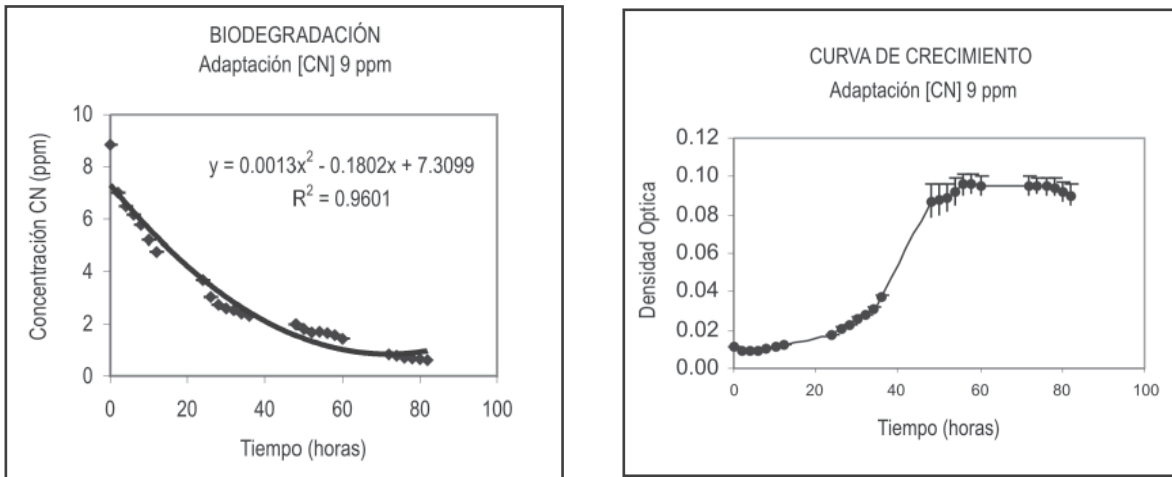


FIGURA 12
Adaptación a 12 mg/L

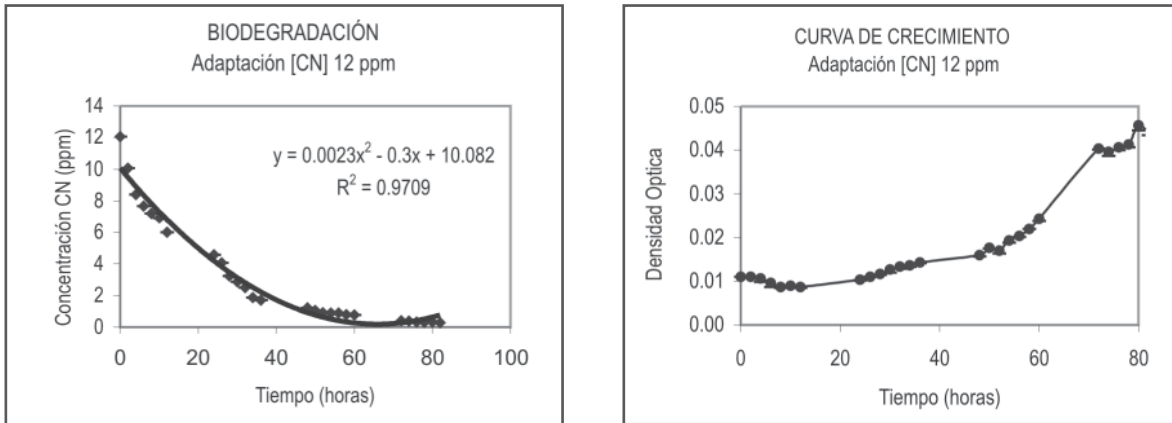
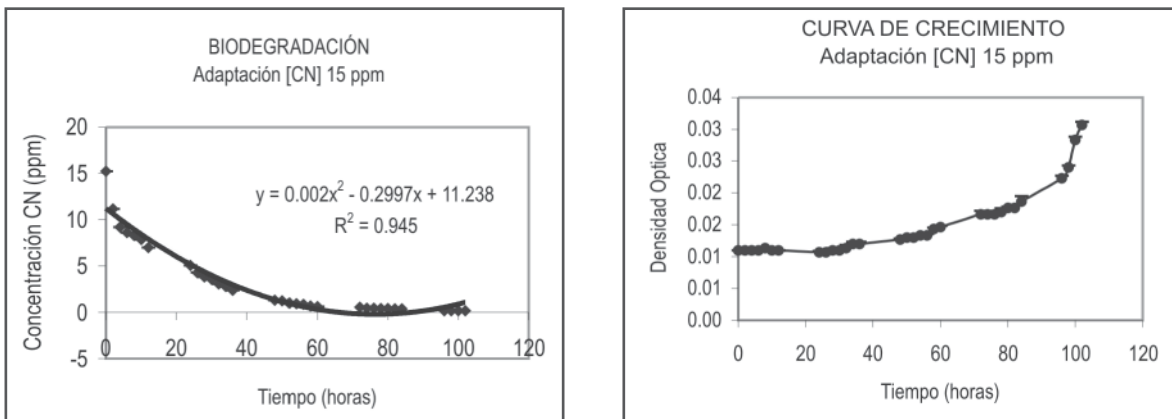


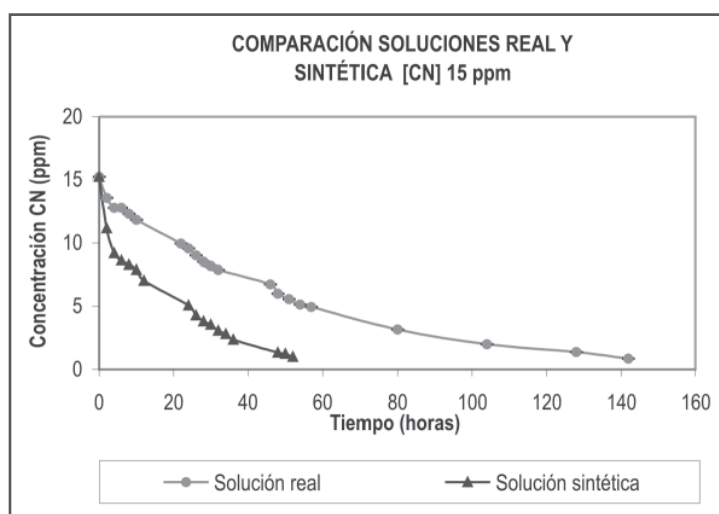
Figura 13
Adaptación a 15 mg/L



6.6 COMPARACIÓN SOLUCIÓN REAL Y SINTÉTICA

Como se observa en la figura 14, la velocidad de degradación de cianuro fue mayor en la solución sintética que en la real debido a que esta última se compone de varios compuestos propios de la industria de recubrimientos metálicos (ver tabla 1) los cuales le imparten mayor complejidad al agua a tratar. Lo anterior se observa al comparar la velocidad de degradación entre la solución sintética y real de 15 mg/L, con agitación de 140 rpm e inóculo de $1,21 \times 10^5$ UFC/mL (0.01 Densidad óptica). El límite permisible según la autoridad ambiental (1 mg/L) se alcanza en la solución sintética al cabo de 52 horas, mientras que en la solución real este límite se alcanza en un tiempo de 150 horas.

FIGURA 14
Biodegradación de soluciones real y sintética de cianuro



6.7 FOTOCATÁLISIS

En la figura 15 y en la tablas 7 y 8 se muestra la cinética y el porcentaje de degradación de cianuro en el proceso de fotocátalisis empleando luz artificial y luz solar; teniendo en cuenta los parámetros de la tabla 7.

Figura 15
Cinética de degradación proceso fotocátalisis

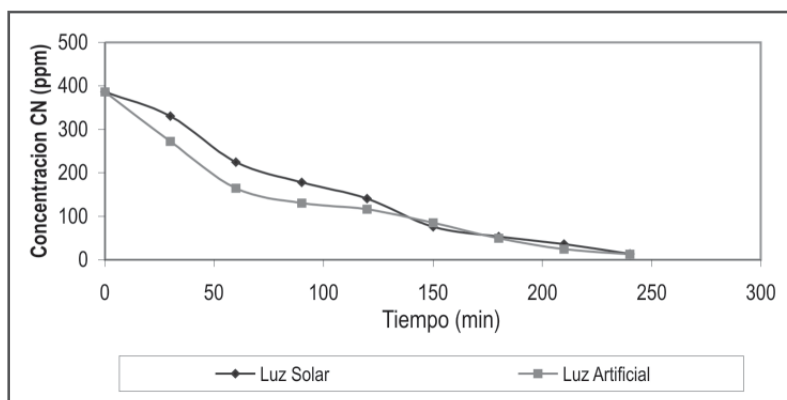


TABLA 7
Porcentaje de degradación de cianuro empleando luz artificial

Tiempo (min.)	Concentración CN (mg/L)	% degradación CN
0	386.092	0.000
30	272.380	29.452
60	164.558	57.378
90	130.410	66.223
120	116.093	69.931
150	85.138	77.949
180	49.481	87.184
210	24.627	93.622
240	12.741	96.700

TABLA 8
Porcentaje de degradación de cianuro empleando luz solar

Tiempo (min)	Concentración CN (mg/L)	% degradación CN
0	386.092	0,000
30	330.636	14.363
60	224.388	41.882
90	177.824	53.943
120	140.922	63.500
150	75.791	80.370
180	53.469	86.151
210	36.287	90.601
240	13.768	96.434

Al comparar la fotocátalisis realizada con luz solar y artificial se observa que el porcentaje de degradación es similar, resaltando que mediante luz artificial la velocidad de degradación es mayor al cabo de 4 horas. En ambos casos se presenta una reducción significativa en la concentración de cianuro, por lo anterior se decide trabajar con luz solar por la disminución en los costos de operación.

En la tabla 9 se observa que aumentando 6 horas más el tiempo de residencia en el proceso fotocatalítico con luz artificial, el porcentaje de degradación de cianuro no resulta ser tan significativo comparado con la concentración final obtenida, ya que ésta aún no cumple con el límite establecido por las autoridades ambientales de 1 mg/L.

TABLA 9
Fotocatálisis con luz artificial prolongando el tiempo de residencia

Tiempo (min)	Concentración Cianuro (mg/L)	% de degradación
0	386.09	0.00
30	272.38	29.45
60	164.56	57.38
90	130.41	66.22
120	103.35	73.23
150	85.14	77.95
180	49.48	87.18
210	24.63	93.62
240	12.74	96.70
270	6.34	98.36
300	4.65	98.80
330	4.14	98.93

6.8 BIODEGRADACIÓN

6.8.1 Diseño de experimentos

De acuerdo con los resultados obtenidos en el diseño de experimentos, se hace un análisis estadístico empleando el Software Statgraphics versión 5.0 donde se incluye la tabla ANOVA, diagrama de pareto y el valor óptimo que maximice el porcentaje de degradación de cianuro en las muestras analizadas en un tiempo de 80 horas.

En la tabla 10 se muestran los resultados obtenidos del porcentaje de degradación de cianuro al realizar el diseño de experimentos.

TABLA 10
Resultados obtenidos de porcentaje de degradación de cianuro

Repeticiones	Concentración CN (mg/L)	Agitación (rpm)	Porcentaje de degradación
1	10	200	93.466
1	15	200	92.289
1	10	140	77.077
1	15	140	77.949
2	10	200	93.208
2	15	200	95.284
2	10	140	76.171
2	15	140	80.370
3	10	200	93.349
3	15	140	81.050
3	10	140	75.229
3	15	200	93.798

6.8.1.1 Análisis de varianza

La tabla ANOVA permite determinar los factores más significativos del proceso de biodegradación del cianuro. Se establece un intervalo de confianza del 95%, es decir, se aceptan como significativos aquellos que tienen un valor P (error) menor de 0.05.

En la tabla 11 se muestra los resultados obtenidos para la variable de respuesta del diseño de experimentos empleando el software Statgraphics.

TABLA 11
Tabla ANOVA para análisis de varianza

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Relación-F	Valor -P
A:[CN]	12.485	1	12.485	8.11	0.0292
B: Agitación	729.286	1	729.286	473.93	0.0000
AB	7.59053	1	7.59053	4.93	0.0681
Bloques	2.30375	2	1.15188	0.75	0.5126
Error Total	9.23278	6	1.5388		
Total	760.899	11			
R ² = 98.7866%					
R ² (ajustado para los grados de libertad) = 98.3316%					

Se obtuvo un valor de R² = 98.7866% lo cual indica que el modelo explica en un 98.7866% la variabilidad en el porcentaje de reducción de la concentración de cianuro al cabo de 80 horas y se minimizan las posibles causas de error a un 1.2134% restante.

Según la tabla 11 se observa que los factores concentración de cianuro y agitación presentan un valor P menor de 0.05, lo que indica que ambas variables son significativas para el desarrollo de los experimentos; pero su interacción no lo es. El factor más representativo del proceso (95.85%) es la agitación, cuyo cuadrado medio es 729.286 con relación al total de la suma de cuadrados de 760.899. Ver tabla 11.

6.8.1.2 Diagrama de Pareto

El diagrama de Pareto estandarizado que se muestra en la figura 24, es una gráfica donde se pueden observar las variables más significativas del

proceso de biodegradación del cianuro. Este diagrama incluye una línea vertical (Roja) la cual depende del intervalo de confianza que se le asigne al diseño; es decir, todas aquellas barras que sobrepasen esta línea son significativas para el proceso.

En la figura 16, se observa que tanto la variable concentración inicial de cianuro y agitación son significativas; sin embargo, la variable predominante del proceso es la agitación, esto demuestra que si se hace un pequeño cambio a la variable concentración inicial de cianuro no resultaría ser tan significativo para el proceso como si se le hiciera un pequeño cambio a la variable agitación.

En la figura 17 se puede apreciar el efecto particular de cada una de las variables de entrada sobre la variable respuesta. La representación del efecto de agitación muestra una pendiente pronunciada, la cual explica lo que se dijo anteriormente de la gran significancia que tiene sobre la variable respuesta.

FIGURA 16
Diagrama de Pareto estandarizado para la reducción de cianuro

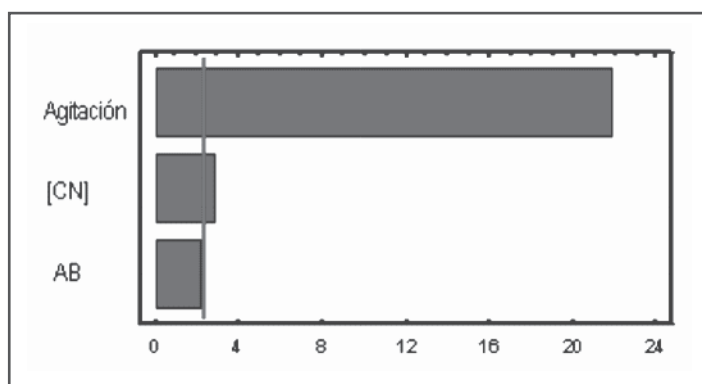
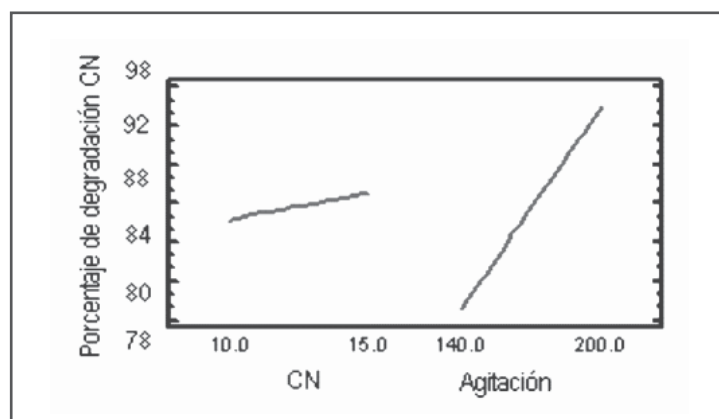


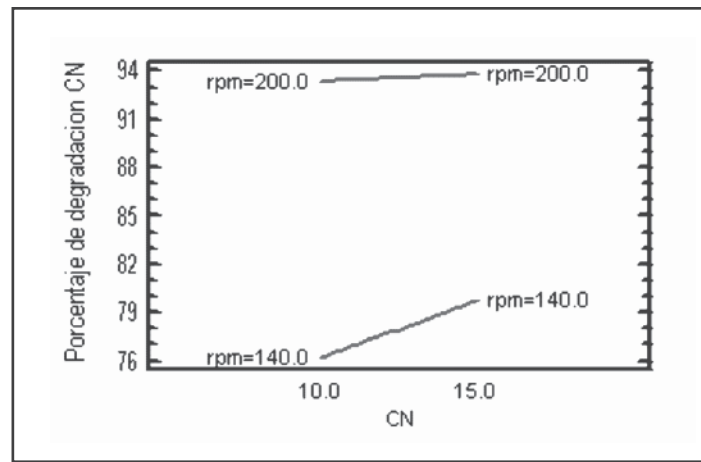
FIGURA 17
Efectos principales para el porcentaje de degradación de cianuro



Por otro lado, el efecto de la concentración inicial de cianuro presenta una pendiente menos pronunciada, lo que significa un efecto menos representativo para el proceso. Es así como un pequeño aumento en la agitación provocará una variación considerable en la reducción de la concentración de cianuro.

En la figura 18 se puede apreciar que no importa cual sea la concentración de cianuro inicial, el aumento de la agitación produce un efecto positivo sobre la variable de respuesta.

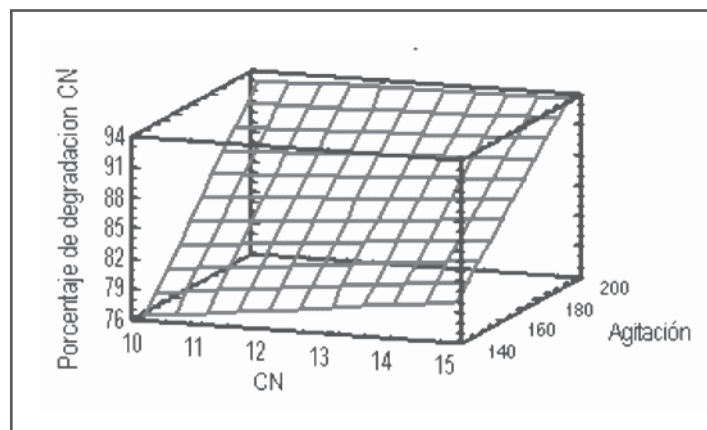
FIGURA 18
Efecto de la interacción concentración cianuro agitación



6.8.1.3 Gráfica de Superficie de Respuesta Estimada

En la figura 19 se muestra la gráfica tridimensional de superficie de respuesta, la cual relaciona el porcentaje de degradación del cianuro con las dos variables evaluadas; esta gráfica muestra la relación que tiene el porcentaje de degradación con las dos variables más importantes (Concentración y agitación) en un tiempo fijo de 80 horas. En esta figura se aprecia que a mayor agitación la concentración inicial de cianuro no es tan relevante para alcanzar altos porcentajes de degradación; por el contrario con una menor agitación la variable concentración inicial de cianuro si resulta ser significativa en el proceso para alcanzar cierto porcentaje de degradación.

FIGURA 19
Superficie de respuesta estimada



6.8.1.4 Condiciones óptimas de operación

En la tabla 12 se muestran las condiciones óptimas de operación con las cuales se obtiene el máximo porcentaje de degradación de cianuro. Estos datos son obtenidos del software Statgraphics.

Meta: Maximizar el porcentaje de degradación de cianuro

TABLA 12
Condiciones óptimas de operación

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
[CN]	10	15	15
Agitación	140	200	200

6.8.2 Resultados de experimentos del proceso de biorremediación

Los resultados que se muestran a continuación, corresponden a los valores de agitación de 140 rpm en un tiempo de 150 horas y de 200 rpm en un tiempo de 90 horas. Este tiempo es considerado como el requerido para alcanzar concentraciones finales de cianuro por debajo del límite establecido por las autoridades ambientales (1 mg/L). Cabe resaltar que el porcentaje de degradación del efluente es proporcional al tiempo de residencia en el proceso de biodegradación. En las tablas 13, 14 y 15 aparecen los resultados del desarrollo de los experimentos.

TABLA 13
Resultados de degradación de cianuro

Resultados	Agitación 140 rpm		Agitación 200 rpm	
	10	15	10	15
Concentración inicial (mg/L)	10	15	10	15
Concentración final (mg/L)	0,923	0,856	0,626	0,590
% Degradación	91,064	94,379	93,942	96,126
Velocidad de remoción (mg/Lh)	0,0627	0,0958	0,1079	0,1626

TABLA 14
Resultados de crecimiento de biomasa

Resultados	Agitación 140 rpm		Agitación 200 rpm	
	10	15	10	15
Concentración inicial cianuro (ppm)	10	15	10	15
Concentración inicial Biomasa UFC/ml	1,21x10 ⁵	1,21x10 ⁵	1,21x10 ⁵	1,21x10 ⁵
Concentración final Biomasa UFC/ml	2,33x10 ⁵	2,35x10 ⁵	7,53x10 ⁵	1,20x10 ⁶

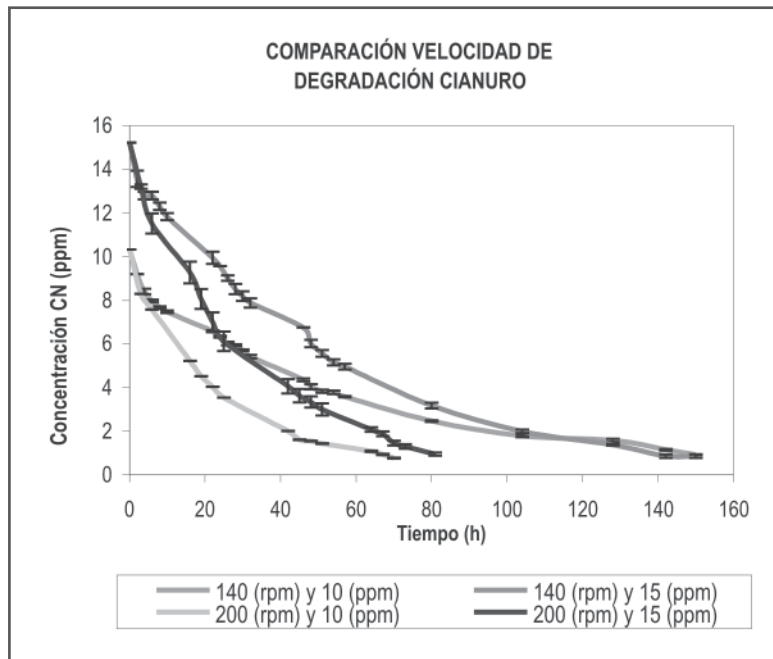
TABLA 15
Resultados de consumo de glucosa

Resultados	Agitación 140 rpm		Agitación 200 rpm	
	10	15	10	15
Concentración inicial cianuro (mg/L)	10	15	10	15
Concentración inicial glucosa gr/lt	1	1	1	1
Concentración final glucosa gr/lt	0,476	0,759	0,226	0,224

En las figuras 20 a la 23 se agrupan los resultados obtenidos al desarrollar el diseño de experimentos.

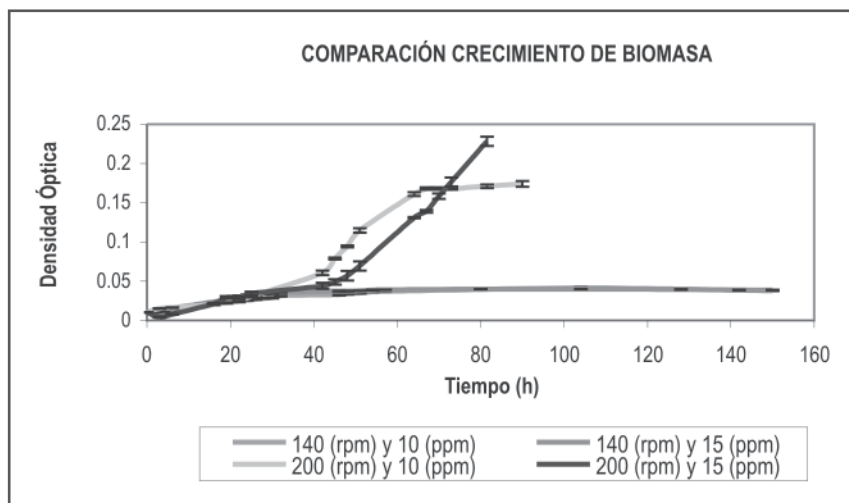
Las curvas de biodegradación de cianuro tienen un comportamiento similar entre si. En la figura 20, se observa que la degradación de cianuro es más rápida cuando se trabaja a altas agitaciones y la concentración inicial de cianuro es mayor, alcanzando el límite permisible en un tiempo de residencia de 90 horas.

FIGURA 20
Resultados de biodegradación de cianuro



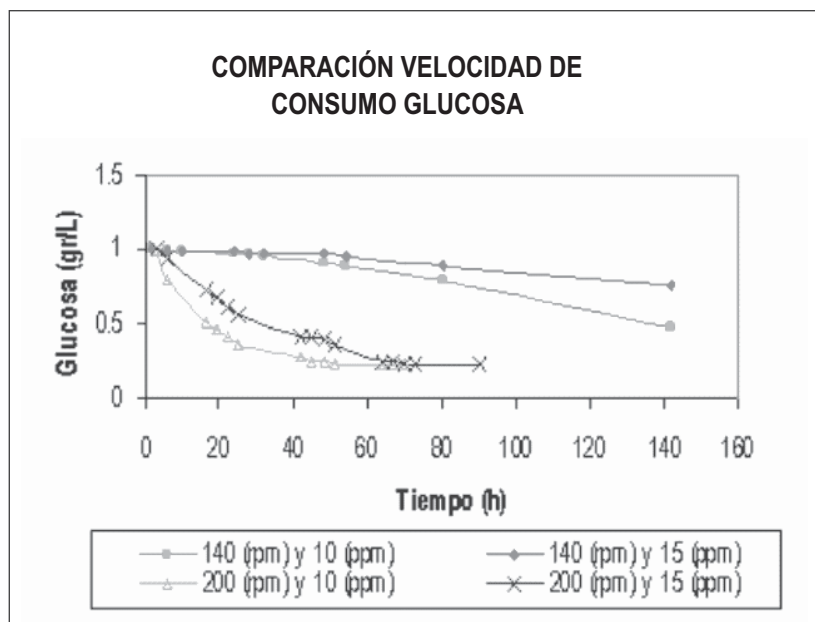
En la figura 21 se identifican las curvas de crecimiento de biomasa para cada experimento. Es posible diferenciar que la degradación de cianuro en agitación de 140 rpm se lleva a cabo durante la fase de latencia, mientras que para agitación de 200 rpm esta degradación se da principalmente durante la fase de crecimiento exponencial. Así mismo, se aprecia un mayor crecimiento de biomasa para la agitación de 200 rpm. Lo anterior se debe probablemente al comportamiento aerobio de la bacteria la cual requiere oxígeno para sus procesos metabólicos, por lo tanto a altas agitaciones habrá una mayor transferencia de O_2 al medio, proporcionando así mejores condiciones para el crecimiento de biomasa y por lo tanto mayor degradación de cianuro.

FIGURA 21
Resultados de crecimiento de biomasa



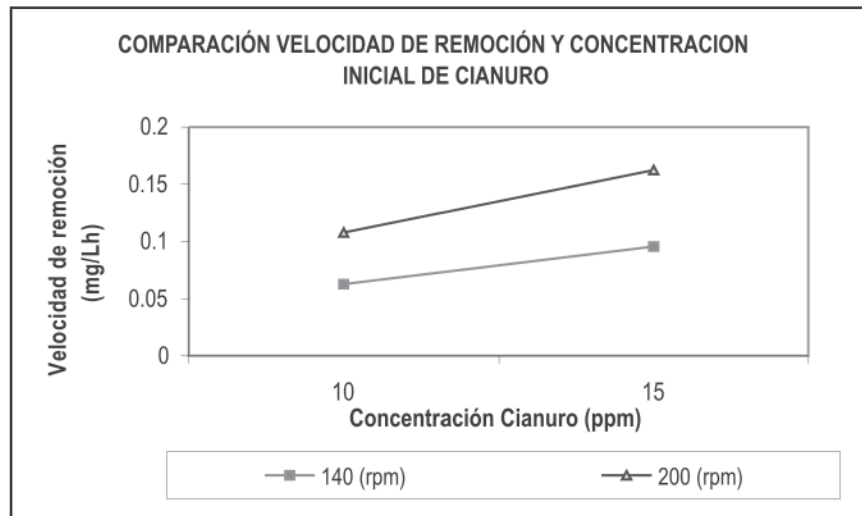
A partir de la figura 22 se puede decir que a condiciones óptimas de 15 mg/L y 200 rpm, el consumo de glucosa por parte de la *Pseudomonas fluorescens* es lento comparado con el consumo de cianuro, por esto cuando ya se ha degradado el 96.1% de cianuro, se ha empleado tan solo el 77.6% de glucosa. Cabe resaltar que la demanda de glucosa es mayor para la agitación de 200 rpm, posiblemente porque la bacteria se encuentra en la fase de crecimiento exponencial en la cual el consumo de nutrientes es mayor para las funciones de reproducción y mantenimiento celular.

Figura 22
Resultados de consumo de glucosa en el tiempo



En la figura 23 se observa la velocidad de degradación de cianuro con la cual se evidencia la relación directamente proporcional con la agitación; es decir, con agitación de 200 rpm se presenta la mayor remoción de cianuro.

FIGURA 23
Resultados velocidad de degradación de cianuro



La influencia de la concentración de cianuro inicial con relación al porcentaje de degradación, se describe en la tabla 13. Según los resultados obtenidos, se puede identificar que cuando la concentración inicial de cianuro es 15 mg/L se obtienen mayores porcentajes de degradación, probablemente este comportamiento se debe al proceso de adaptación, es decir, como el inóculo proviene de la biomasa adaptada hasta una concentración de cianuro de 15 mg/L, para llevar a cabo la degradación a concentración inicial de 10 mg/L los microorganismos deben hacer una readaptación a concentraciones menores, mientras que para degradar cianuro a concentración inicial de 15 mg/L este proceso de readaptación no es necesario.

Con base en los resultados obtenidos y corroborando con la figura 23, se comprueba que la agitación es un factor muy importante en el comportamiento de la bacteria en su relación con la degradación de cianuro. Comparando los valores de agitación para las diferentes concentraciones se observa un mayor porcentaje de degradación (tabla 13), una mayor

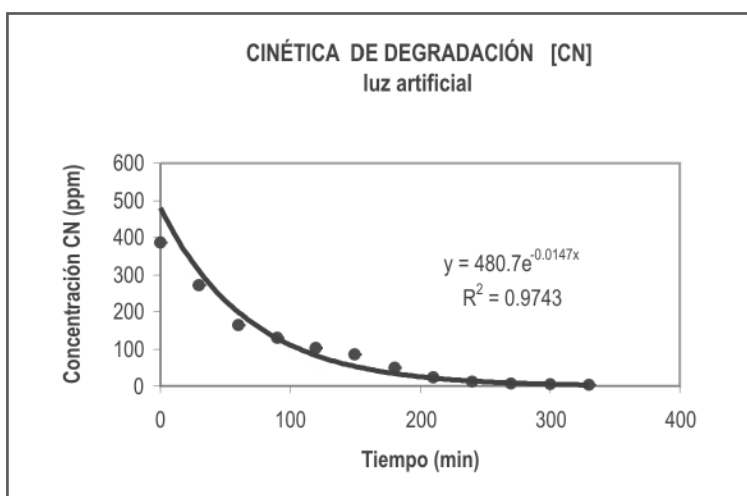
velocidad de remoción (Figura 23), mayor crecimiento de biomasa (Figura 21) y consumo de glucosa (figura 22) en aquellos en donde la agitación es de 200 rpm, resaltando que la combinación entre agitación 200 rpm y concentración inicial de 15 mg/L presenta el mayor porcentaje de degradación (96.1%); esto probablemente porque la bacteria requiere mayor cantidad de oxígeno para sus funciones metabólicas el cual se supe a 200 rpm.

6.9 CINÉTICA DE DEGRADACIÓN DE CIANURO

6.9.1 Cinética de Degradación de Cianuro empleando Luz Artificial

El comportamiento de la concentración de cianuro en el tiempo durante el proceso de degradación por fotocatalisis con luz artificial, muestra una tendencia exponencial (Figura 24). Investigaciones realizadas en sistemas de fotodegradación de cianuro reportan un ajuste al modelo Langmuir-Hinshelwood (Augugliaro, 1997).

FIGURA 24
Concentración de cianuro en el tiempo empleando luz artificial



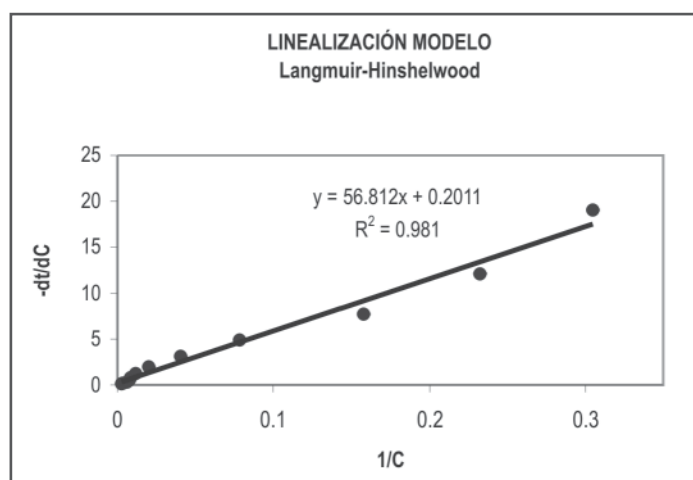
El modelo Langmuir-Hinshelwood predice el comportamiento de la velocidad de reacción mediante la siguiente ecuación:

ECUACIÓN 2
Ecuación de Langmuir-Hinshelwood

$$r = -\frac{dC}{dt} = \frac{kKC}{KC + 1}$$

k representa la constante cinética de la reacción, **K** es la constante de equilibrio de adsorción de Cianuro y **C** la concentración de Cianuro. Como se observa en la figura 25 al linealizar esta ecuación, se pueden ajustar los datos experimentales al modelo y encontrar sus respectivas constantes. (Augugliaro, 1997).

FIGURA 25
Modelo Langmuir-Hinshelwood para la fotocatalisis empleando luz artificial

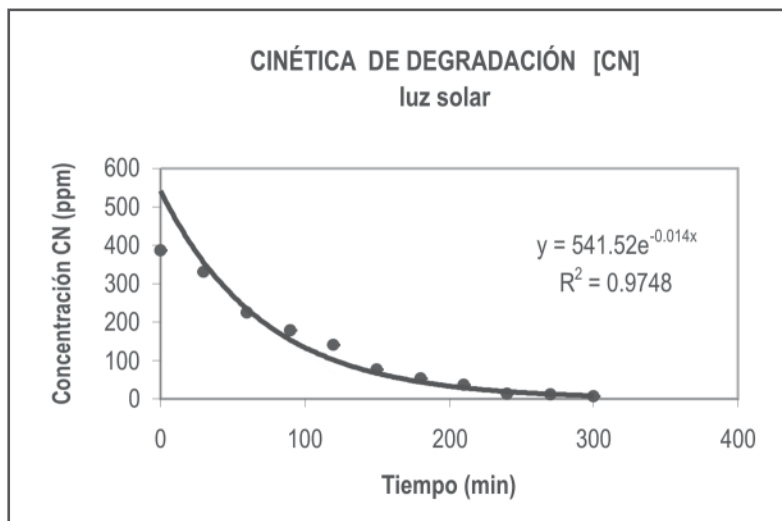


Los datos experimentales muestran una correlación de 0.981 indicando un muy buen ajuste a este modelo.

6.9.2 Cinética de Degradación de Cianuro Empleando Luz Solar

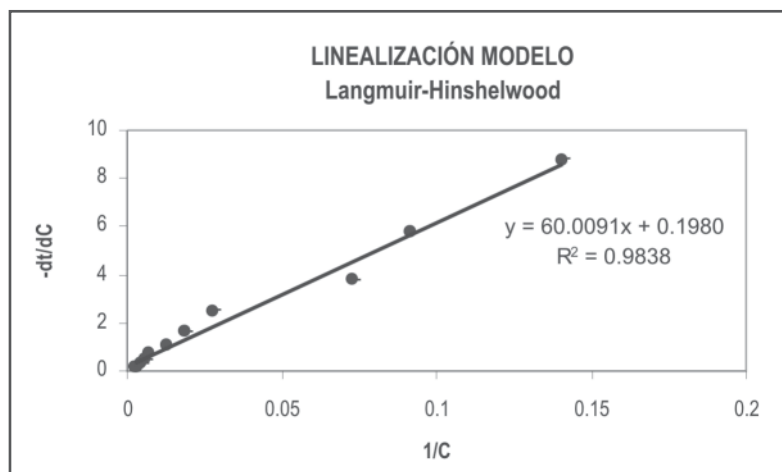
En la figura 26 se puede apreciar que el comportamiento de la concentración de cianuro en el tiempo durante el proceso de degradación fotocatalítico con luz solar también presenta una tendencia exponencial.

FIGURA 26
Concentración de cianuro en el tiempo empleando luz solar



La ecuación (2) se puede linealizar para ajustar los datos experimentales y hallar las respectivas constantes. (Ver figura 27)

FIGURA 27
Modelo Langmuir-Hinshelwood para la fotocatalisis empleando luz solar



Al realizar la linealización se obtiene una correlación de 0.984, indicando una aproximación a este modelo, lo que determina la confiabilidad de los resultados.

En la tabla 16, se muestran los parámetros cinéticos hallados mediante el modelo de Langmuir-Hinshelwood para los procesos de degradación de cianuro empleando luz artificial y luz solar.

TABLA 16
Parámetros cinéticos del proceso de degradación empleando luz artificial y luz solar

Proceso	Constante cinética (k)	Constante de adsorción (K)
Fotocatálisis con luz artificial	4.972 mg L ⁻¹ min ⁻¹	0.00354 L mg ⁻¹
Fotocatálisis con luz Solar	5.051 mg L ⁻¹ min ⁻¹	0.0033 L mg ⁻¹

Al comparar los resultados obtenidos con estudios anteriores se observa una variación respecto a los parámetros cinéticos. En el trabajo de Gil et al. (Gil et al., 2005) se obtuvo una constante cinética k igual a 2.53 mg L⁻¹min⁻¹ y una constante K de adsorción de 0.0187 L mg⁻¹ al trabajar la fotocatalisis con luz artificial; la diferencia en los resultados respecto a los anteriores se debe al tipo de reactor empleado; en el proyecto anterior se utiliza un reactor tipo anular mientras que en esta investigación se emplea un reactor cilíndrico parabólico compuesto (CPC); sin embargo, para ambas investigaciones se conservan las mismas condiciones de trabajo: luz artificial, 2 mL/L de peróxido de hidrógeno (30%), 0.05 g/L de TiO₂, pH 9.5 y concentración de cianuro inicial de 400 mg/L.

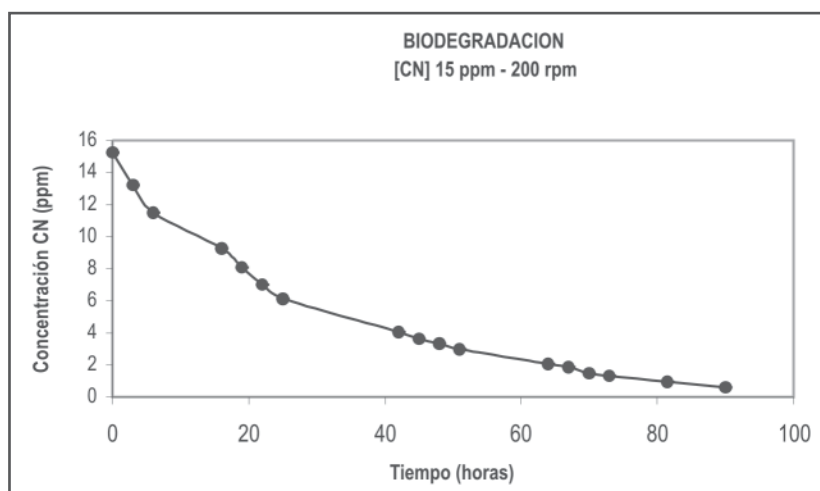
Al comparar los parámetros cinéticos obtenidos en este proyecto empleando luz solar y artificial la diferencia entre sí es mínima, lo que ratifica el empleo de luz solar como una alternativa para llevar a cabo el proceso fotocatalítico de degradación de cianuro.

6.10 CINÉTICA DE BIODEGRADACIÓN

Para conocer la cinética de biodegradación de cianuro es necesario aplicar un tratamiento a los resultados obtenidos en el caso óptimo: concentración inicial de cianuro 15 mg/L y agitación 200 rpm.

La figura 28 muestra el comportamiento de la degradación de cianuro respecto al tiempo para el caso óptimo.

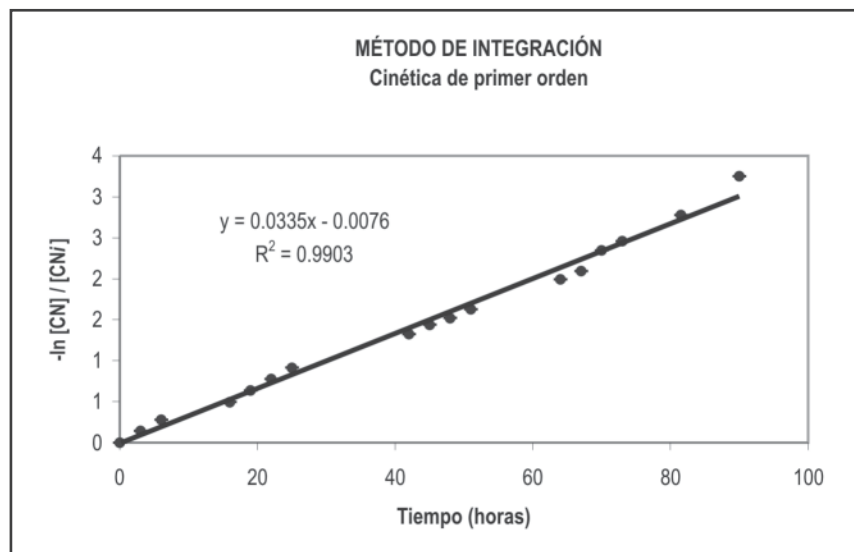
FIGURA 28
Curva de biodegradación de cianuro para el caso óptimo



Los datos de concentración de cianuro vs tiempo se analizan para determinar el orden de la reacción. Este análisis se hace por medio de la asignación de una función que mejor se ajuste a una línea recta y que relacione la concentración de cianuro con el tiempo

En la figura 29 aparece la gráfica que representa la linealización mediante el método de integración.

FIGURA 29
Método de integración cinética de primer orden



Los datos experimentales se evalúan para las cinéticas de diferentes órdenes. Demostrando que la mejor correlación (0.9903) se obtiene al ajustar los datos al modelo de primer orden, lo cual indica que la cinética de biodegradación pertenece a éste orden.

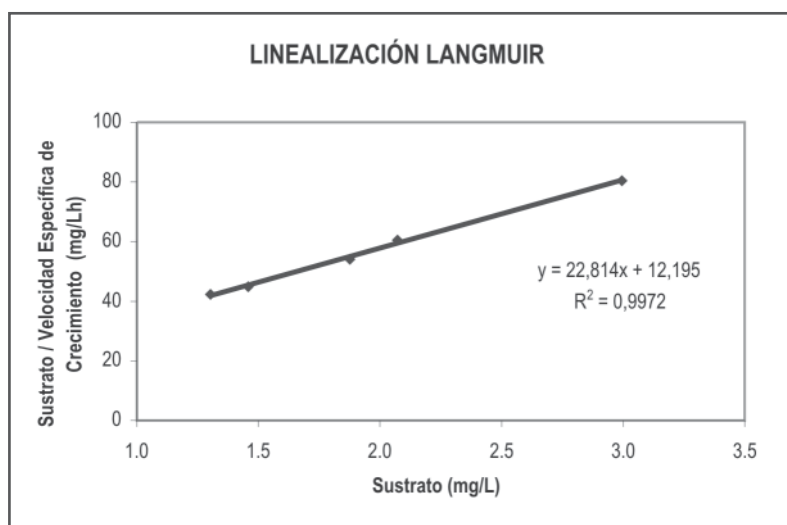
6.11 CINÉTICA DE CRECIMIENTO

Para la replicabilidad del proceso es importante determinar los parámetros cinéticos que relacionen la bacteria *Pseudomonas fluorescens* con la biodegradación de cianuro.

El modelo de Monod describe el crecimiento celular en función de la disponibilidad de un sustrato limitante. Asumiendo el nitrógeno del cianuro como sustrato limitante (Harris y Knowles, 1983; Doran, 1995) se emplea este modelo para encontrar los parámetros cinéticos.

Como se aprecia en la figura 28, el límite requerido de cianuro según autoridades ambientales (1 mg/L), se alcanza durante la fase de crecimiento exponencial. Este comportamiento se ajusta al modelo de Monod y el proceso de linealización se hace por el método de Langmuir (Figura 30) ya que este método de linealización es el que presenta mejor correlación comparada con otros métodos (Lineweaver-Burk y Eadie-Hofstee).

FIGURA 30
Linealización método Langmuir



Los datos experimentales muestran una alta correlación de 0.9972, lo cual indica la confiabilidad de los parámetros ajustados a este modelo.

En la tabla 17 se muestran los parámetros cinéticos calculados para el proceso de biodegradación y crecimiento de biomasa.

TABLA 17
Parámetros cinéticos de degradación y crecimiento de biomasa

Parámetros cinéticos	Unidades	Valor
Ks (constante de saturación)	mg/L	0,5345
μ_{max} (velocidad específica de crecimiento máxima)	1/h	0,0438
ms (coeficiente de mantenimiento)	mg CN/UFC*h	1×10^{-09}
Y_{xs} (rendimiento verdadero de sustrato en biomasa)	UFC/mg CN	1×10^{09}
t_d (tiempo de duplicado)	h	15,8135

La constante de saturación indica la afinidad del microorganismo por el sustrato limitante, el resultado obtenido es 0,5345 mg/L. Este valor es mayor al dato reportado en la literatura para el metano: 0.4 mg/L, haciendo una comparación se puede inferir que existe una mayor afinidad de esta bacteria por el cianuro que por el metano (Doran, 1995).

Para la *Pseudomonas fluorescens* y su interacción con el cianuro, no se encontraron reportes en la literatura de los parámetros cinéticos que se puedan comparar con los resultados obtenidos; generalmente las unidades de biomasa que se reportan son en miligramos (mg) y no en Unidades formadoras de colonias (UFC). Tal

como se menciona anteriormente, los resultados en este proyecto aparecen en UFC porque la variación de biomasa en miligramos es poco significativa entre una medición y otra, mientras que por UFC se obtiene un cambio más representativo en cada una de las muestras tomadas en el tiempo.

La velocidad de crecimiento máxima hace referencia al máximo valor que puede alcanzar la velocidad de crecimiento del microorganismo durante la fase exponencial. El coeficiente de mantenimiento (μ_s) se refiere al gasto de sustrato requerido para el mantenimiento celular (control de pH interno, movilidad, entre otros). El rendimiento verdadero (Y_{xs}) indica la relación cuantitativa entre la cantidad de biomasa y sustrato consumido, se refiere a la cantidad de sustrato requerido para la producción de biomasa, este es importante en la evaluación económica del potencial de un sustrato orgánico para la producción de biomasa o la transformación de subproductos y t_d es el tiempo requerido para duplicar una población celular.

6.12 DEMANDA QUÍMICA DE OXÍGENO (DQO) Y DEMANDA BIOLÓGICA DE OXÍGENO (DBO)

Con el fin de conocer la cantidad de oxígeno presente en el efluente antes y después de cada tratamiento, se realiza la medición de DQO y DBO. Los resultados obtenidos aparecen en la tabla 18.

TABLA 18
Resultados de medición de DQO y DBO

Descripción efluente	DQO (mg/L)	DBO (mg/L)
Sin tratamiento	1228	0.42
Después del Acoplamiento	440	165

Como se observa en la tabla 18, después de realizar el proceso acoplado hay una reducción en el parámetro

de DQO, este disminuye en un 35.83%. Por otro lado, el parámetro de DBO aumenta significativamente en más del 100%, indicando una mayor calidad del efluente tratado. Según el decreto 1594 del régimen legal del medio ambiente de Octubre de 2002 en los artículos 72 y 73 para vertimientos a un cuerpo de agua o alcantarillado público, la remoción de DBO debe ser mayor al 80% en carga; por lo anterior se corrobora que el vertimiento del efluente tratado cumple con las normas ambientales.

6.13 ACOPLAMIENTO

Aplicando el Proceso de Oxidación Avanzada se evidencia que empleando luz solar, TiO_2 y peróxido de hidrógeno para la degradación de cianuro se alcanzan reducciones significativas en la concentración inicial, al cabo de 4 horas de operación se logra un porcentaje de degradación del 96.42% mientras que con luz artificial el porcentaje de degradación es de 96.7%; de acuerdo con las autoridades ambientales, las concentraciones de cianuro obtenidas con estos tratamientos siguen siendo tóxicas, es por eso que se justifica acoplar a este tratamiento el sistema biológico.

Es importante mencionar que, debido al empleo del peróxido de hidrógeno como agente oxidante esta tecnología resulta ser costosa al ser implementada a escala industrial. (Akcil, 2003, Jardim, 2004).

Por otro lado, al tratar el efluente proveniente del proceso fotocatalítico con la técnica de biorremediación, es posible alcanzar en tres días aproximadamente y con agitación de 200 rpm, concentraciones finales de 0.59 mg/L, la cual se encuentra por debajo del límite establecido (1 mg/L). Es pertinente mencionar que aumentando el tiempo de degradación (1 día) se logra llegar al límite establecido por la legislación internacional de 0.2 mg/L. (Patil y Paknika, 2000).

En la literatura se ha reportado que al comparar los tratamientos químicos con los biológicos estos últimos resultan 50% más económicos; la principal

razón es que a pesar de tener un alto costo de capital, presenta bajos costos de operación, contrario a los procesos químicos los cuales reportan un mayor costo de operación. (Shivaraman, 1991; Akcil et al, 2003; Akcil, 2003).

Mediante el acoplamiento de los sistemas fisicoquímicos y biológicos para el tratamiento de aguas contaminadas con cianuro se demuestra que es posible llegar a la concentración de cianuro permisible según los límites establecidos por la legislación nacional (1 mg/L). El porcentaje de degradación alcanzado en este sistema acoplado es de 99.86%.

El sistema acoplado a escala industrial para tratar 100 m³ diarios de efluente con concentración inicial de cianuro de 400 mg/L, consistiría en un conjunto de paneles en serie para llevar a cabo el proceso de fotocátalisis empleando luz solar, cuyo efluente de 15 mg/L de cianuro alimentaría varios tanques con dispersores de aire en los cuales se llevaría a cabo la degradación; la concentración final de cianuro obtenida luego del sistema acoplado (menos de 1 mg/L) estaría cumpliendo con el límite establecido por las autoridades ambientales. Ver figura 2.

7. CONCLUSIONES

La capacidad degradativa de la cepa nativa *Pseudomonas fluorescens* la cual fue aislada de la industria de recubrimientos metálicos, resulta efectiva para el tratamiento de aguas contaminadas con cianuro; los resultados permiten concluir la viabilidad para la utilización de sistemas biológicos en la eliminación de compuestos persistentes bajo condiciones apropiadas, a escala laboratorio estas condiciones fueron: pH 9.5, temperatura 28 °C, agitación 200 rpm, glucosa 1 g/L,, y concentración inicial de cianuro 15 mg/L.

Mediante el tratamiento biológico del efluente proveniente del proceso fotocatalítico, con la bacteria *Pseudomonas fluorescens* y trabajando a condi-

ciones óptimas de 15 mg/L y 200 rpm, se obtuvo un porcentaje de degradación de 96.1% con el cual fue posible alcanzar concentraciones de cianuro por debajo de 1 mg/L. Esto demuestra que esta es una especie bacteriana que puede utilizarse en procesos de degradación.

El tratamiento biológico es viable como una alternativa para biodegradar compuestos orgánicos, al contrario de la mayoría de tratamientos químicos no genera tóxicos ni lodos adicionales y los efluentes tratados tienen menos cantidad de sólidos suspendidos. Además, es una técnica eficiente y económica para biodegradar compuestos persistentes.

Para solucionar a escala industrial los problemas de contaminación de aguas residuales con contenido de cianuro, es conveniente emplear la fotocátalisis con luz solar porque se obtienen porcentajes de degradación similares a los resultados observados con luz artificial. De esta forma, la fotocátalisis con luz solar se convierte en una alternativa más económica porque contribuye a la disminución de los costos de operación.

Mediante el acoplamiento entre los procesos avanzados de oxidación y biodegradación con una cepa nativa, como estrategia para descontaminar efluentes industriales con altos contenidos de cianuro, es posible alcanzar concentraciones finales de cianuro por debajo del límite establecido por la legislación nacional (1 mg/L). El porcentaje de degradación total alcanzado en el sistema acoplado es de 99.86%.

El oxígeno suministrado a los microorganismos mediante la agitación del cultivo sumergido, presenta una directa relación con la eficiencia de degradación del contaminante y el crecimiento celular. El porcentaje y la velocidad de degradación para concentraciones iniciales de cianuro de 10 mg/L y 15 mg/L fueron mayores cuando se trabajó a velocidades de agitación de 200 rpm que cuando se hizo a 140 rpm; lo anterior comprueba el requerimiento de oxígeno para los procesos metabólicos, acorde con

la naturaleza aerobia estricta del microorganismo empleado.

Al comparar el comportamiento de las curvas de degradación y sus diferentes réplicas se aprecia una tendencia similar en los diferentes experimentos, demostrando la replicabilidad del proceso y confiabilidad en los resultados obtenidos.

La cinética de degradación de cianuro para los experimentos realizados de biodegradación, fue de primer orden. Según los resultados, se comprueba que la degradación de cianuro en el proceso fotocatalítico empleando luz solar, se ajusta al modelo de Langmuir-Hinshelwood, la correlación obtenida (0.984) afirma la confiabilidad de los parámetros cinéticos. Al analizar la cinética de crecimiento de biomasa, se evidencia un buen ajuste de los datos al modelo de Monod con el cual se obtiene una correlación de 0.9972. Así mismo, los resultados obtenidos de glucosa en el tiempo sugieren que el sustrato limitante es el cianuro.

La Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO) del efluente de la industria de recubrimientos metálicos aumenta una vez el cianuro presente es degradado, así, mediante el sistema acoplado, el agua tratada recupera gran cantidad de oxígeno, generando un impacto ambiental positivo.

8. BIBLIOGRAFÍA

- ACERCAR (2003). RESOLUCIÓN No. 1074 28 OCT 1997. Unidad de asistencia técnica ambiental. www.acercar.org.co/industria/legislacion/residuos/peligrosos/r2309_1986.pdf. (30/09/2004).
- AKCIL, A. (2003). Destruction of cyanide in gold mill effluents: biological versus chemical treatments. En: *Biotechnology Advances*, 21: 501-511
- AKCIL, A.; KARAHAN, A; CIFTCI, C y SAGDIC, O (2003). Biological treatment of cyanide by natural isolated bacteria (*Pseudomonas sp.*). En: *Minerals Engineering*, 16: 643 - 649
- AL-QARADAWI, S. y SALMAN, S.R. (2002). Photocatalytic degradation of methyl orange as a model compound. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 148: 161-168.
- ANÓNIMO 1 (2003). Aplicación de la Energía Solar Ultravioleta al Tratamiento de la Contaminación por Compuestos no Biodegradables. (16/08/2004). http://www.psa.es/webeng/areas/quimica/docs/descontaminacion_mediante_fotocatalisis.pdf
- ANÓNIMO 2. (2003). El Cianuro, La Sustancia más Temida. En: *Vida Cotidiana*. Editorial Rio Negro.
- ANÓNIMO 3. (1996). Manual de laboratorio de biología. Universidad de Antioquia. Medellín.
- ARZU, Y. y ZUMRIYE, A. (2002). Effect of internal diffusivity of ferrous (II) cyanide complex ions in Ca-alginate immobilized *Pseudomonas fluorescens* gel beads on the biodegradation rate. En: *Process Biochemistry*. 37: 747-752.
- ARZU, Y. y ZUMRIYE, A. (2000). Biodegradation Kinetics of Ferrous (II) cyanide complex ions by immobilized *Pseudomonas fluorescens* in a packed bed column reactor. En: *Process Biochemistry*. 35: 615- 622

- AUGUGLIARO, V. (1997). Photocatalytic oxidation of cyanides in aqueous titanium dioxide suspensions. En: Journal of catalysis. 166: 272-283
- BENEDIX, R. (2000). Application of titanium dioxide photocatalysis to create self – cleaning building materials. En: Lacer. 5: 157-168
- BLANCO, J. y MALATO, S. (2001). Purificación de Aguas por Fotocatálisis Heterogénea: Estado del Arte. En Applied Catalysis. Num 28.
- BLESA, M. (2001). Eliminación de contaminantes por fotocatalisis heterogénea: Introducción. En: CYTED. Argentina. (14/09/2004).
<http://www.cnea.gov.ar/xxi/ambiental/CYTED/default.htm>
- BREED, R. (1997). Bergey's manual of determinative bacteriology. 7th. ed. London: Williams and Wilkins Co. Baltimore.
- CASTRO, C y PINEDA, T. (2004). Fotodegradacion de Cianuros Libres Presentes en Una Corriente Residual. Proyecto de Grado Universidad EAFIT. Medellín
- Centro Nacional de Producción Mas Limpia (CNPML). (2000). Guía de Producción mas limpia para el sector de recubrimientos electrolíticos en Colombia. <http://www.cnpml.org>. (14/01/2005).
- CHAPATWALA, K., BABU, G., VIJAYA, O., KUMAR, K. y WOLFRAM, JH. (1997). Biodegradation of cyanides, cyanates and thiocyanates to ammonia and carbon dioxide by immobilized cells of *Pseudomonas putida*. En: Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 20: 28-33.
- CÓRDOBA, D. (2000). Toxicología. 4th ed. Manual moderno.
- DOMÈNECH, X., JARDIM W. y LITTER M. (2001). Eliminación de contaminantes por fotocatalisis heterogénea: Procesos avanzados de oxidación para la eliminación de contaminantes. <http://www.cnea.gov.ar/xxi/ambiental/CYTED/default.htm> (24/08/04).
- DORAN, P. (1995). Bioprocess Engineering Principles. Academic Press, London pp 278, 279
- EBBS, S. (2004). Biological degradation of cyanide compounds. En: Environmental biotechnology. 15: 231-236
- ENVIROMENTAL PROTECTION AGENCY. (2002). Desechos de Cianuro Producido en la Producción de Joyas. Folleto informativo. California.
- EWEIS, J. y ERGAS, S. (1999). Principios de Biorrecuperación. MC Graw Hill.
- FUENTES, J. y GÓMEZ, U. (2001). Guías toxicológicas – Urgencias Manual 1. Gobernación de Antioquia, Dirección Seccional de Salud.
- GIL PAVAS, E.; CASTRO JONES, C. y PINEDA, T. Oxidación Fotocatalítica de Cianuro. En: Colección Cuadernos de Investigación. Documento 29-042005. Universidad EAFIT. Medellín: abril de 2005.
- GÓDIA, F. y LÓPEZ J. (1998). Ingeniería bioquímica. Madrid : Síntesis. 350 p.
- GUTIÉRREZ, F., MARTÍN, M., PLAZA, M. y GARBI, C. (2003). Descontaminación de efluentes Tóxicos por bacterias nativas inmovilizadas: Biofiltración de propacloro. En: Información Tecnológica. 14: 29-35
- HARRIS, R., KNOWLESS, C. (1983). Isolation and growth of a *Pseudomonas* species that utilizes cyanide as a source of nitrogen. En: Journal of general Microbiology. 129:1005-1011.
- INDUSTRIA DE RECUBRIMIENTOS METÁLICOS (2004). Medellín.

- JARDIM, W. (2004). Conferencia: Procesos Avanzados de Oxidación. Universidad de Antioquia.
- JERABKOVA, H. y KRALOVA, Y. (1999). Absorción y biodegradación de n-alcanos. En: Revista de ingeniería Química. 487-492.
- LACHHEB, H., PUZENAT, E., HOUAS, A., KSIBI, M., ELALOUI, E., GUILLARD, C. y HERRMANN, J.M. (2002). Photocatalytic degradation of various types of dyes (Alizarin S, Crocein Orange G, Methyl Red, Congo Red, Methylene Blue) in water by UV-irradiated titania. En: Applied Catalysis. 39: 75-90.
- LITTLE, T. y JACKSON, F. (1979). Métodos estadísticos para la investigación en la agricultura. Editorial Trillas. México.
- LOGSDO, M., HAGELSTEI, K y MUDDER, T. (2003). The Management of Cyanide in Gold Extraction. International council on Metals and the environment. <http://www.cyantists.com>.
- KUNZ, D., NAGAPPAN, O., SILVE, A. y DELONG, G. (1992). Utilization of cyanide as a nitrogenous substrate by *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764: Evidence for multiple pathways of methabolic conversión. En: Applied and environmental microbiology. 58: 2022-2059.
- KUNZ, D., CHEN, J. y PAN, G. (1998). Accumulation of α Keto acids as essential components in cyanide assimilation by *Pseudomonas fluorescens* NCIMC 11764. En: Applied and environmental microbiology. 64: 4452 - 4459.
- MACFADDIN, J. (1980). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Buenos aires: Médica Panamericana S.A. p.370.
- MADIGAN, M., MARTINKO, J. y PARKER, J. (1999). Brock, Biología de los microorganismos. Ed. Prentice Hall, Madrid.
- MARLOTO, E. y ROGEL, J. (2004). Aplicación de Sistemas de biorremediación de Suelos y Aguas Contaminadas Por Hidrocarburos. http://www.igme.es/internet/web_aguas/igme/publica/con_recu_acuiferos/028.pdf (20/08/2004).
- MERCK, E. (1981) . Handbook culture media merck: parations for microbiology / E. Merck. Frankfurter. Merk. 207p.
- MONOKRYSTALY. (2004). Cyanide ion-selective electrode type 06-37: working instruction. Republica Checa.
- PARRA, S. (2001). Combinación de procesos fotocatalíticos y biológicos como contribución a la detoxificación del agua. En: Revista VirtualPro. 3: 10.
- PATIL, Y. y PAKNIKA, K. (2000). Development of a process for biodetoxification of metal cyanides from waste water. En: Process biochemistry. 35: 1139-1151
- RÉGIMEN LEGAL DEL MEDIO AMBIENTE (2002). Recursos naturales renovables y medio ambiente. pp 493
- RESTREPO, A. (2000). El agua, calidad, usos, parámetros de contaminación, tratamiento y minimización. En Tepsa
- SÁEZ, A. (2004). Protocolo determinación de glucosa y azúcares reductores con DNS. Procesos Celulares. Universidad EAFIT.
- SALEM, E. (2000). Kinetics and mechanism of color removal of methylene blue with hydrogen peroxide catalyzed by some supported alumina surfaces. En: Chemosphere, 41: 1173 -1180.
- SERPONE, N. y EMELINE, A.V. (2002). Suggested terms and definitions in photocatalysis and radiocatalysis. En: International journal of photoenergy. 4: 91-131

- SHIVARAMAN, N. y PARHAD, N. (1991). Biological Treatment of Cyanide Wastewaters. En: National Environmental Engineering Research Institute. 39-45.
- SILLER, H. y WINTER, J. (1998). Degradation of cyanide in agroindustrial or industrial wastewater in an acidification reactor or in a single-step methane reactor by bacteria enriched from soil and peels of cassava. En: Applied microbiology Biothechnology. 50: 384-389.
- SMITH, A. y MUDDER, T. (1991). The chemistry and treatment of cyanidation wastes. En: Mini journal book limited.
- SMITH, J. (1995). Ingeniería de la cinética química. Compañía editorial continental, S.A. México.
- SUH, Y. (1994). Biodegradation of cyanide compounds by *Pseudomonas fluorescens* immobilized on zeolite. En: Enzyme and microbial technology. 16 (6): 529-533.
- TANAKA, K., PADERMPOLE, K. y HISANAGA, T. (2000). Photocatalytic degradation of commercial azo dyes. En Water research. 34 (1): 327-333.
- WANG, C., KUNZ, D. y VENABLES, B. (1996). Incorporation of Molecular Oxygen and Water during Enzymatic Oxidation of Cyanide by *Pseudomonas fluorescens*. En: Applied and Environmental Microbiology. 62 (6): 2195 -2197.
- WHITE, D; TIMOTHY, A y WOOLARD, C. (2000). Biological treatment of cyanide containing wastewater. En: water research. 34 (7): 2105-2109.
- YURRAMENDI, L.; IPIÑAZAR E. y PAVÓN J.M. (1994). Eliminación de cianuros presentes en efluentes industriales. En: Ingeniería Química. 306: 129-134.

TÍTULOS PUBLICADOS EN ESTA COLECCIÓN

Copia disponible en: www.eafit.edu.co/investigacion/cuadernosdeinv.htm

Cuaderno 1 - Marzo 2002

**SECTOR BANCARIO Y COYUNTURA
ECONÓMICA EL CASO COLOMBIANO
1990 - 2000**

Alberto Jaramillo, Adriana
Ángel Jiménez, Andrea Restrepo Ramírez,
Ana Serrano Domínguez y Juan Sebastián
Maya Arango

Cuaderno 2 - Julio 2002

**CUERPOS Y CONTROLES, FORMAS
DE REGULACIÓN CIVIL. DISCURSOS Y
PRÁCTICAS EN MEDELLÍN 1948 – 1952**

Cruz Elena Espinal Pérez

Cuaderno 3 - Agosto 2002

UNA INTRODUCCIÓN AL USO DE LAPACK

Carlos E. Mejía, Tomás Restrepo y Christian
Trefftz

Cuaderno 4 - Septiembre 2002

**LAS MARCAS PROPIAS DESDE
LA PERSPECTIVA DEL FABRICANTE**

Belisario Cabrejos Doig

Cuaderno 5 - Septiembre 2002

**INFERENCIA VISUAL PARA LOS
SISTEMAS DEDUCTIVOS LBPCO, LBPC Y
LBPO**

Manuel Sierra Aristizábal

Cuaderno 6 - Noviembre 2002

**LO COLECTIVO EN LA CONSTITUCIÓN DE
1991**

Ana Victoria Vásquez Cárdenas,
Mario Alberto Montoya Brand

Cuaderno 7 - Febrero 2003

**ANÁLISIS DE VARIANZA DE LOS
BENEFICIOS DE LAS EMPRESAS
MANUFACTURERAS EN COLOMBIA,
1995 – 2000**

Alberto Jaramillo (Coordinador),
Juan Sebastián Maya Arango, Hermilson
Velásquez Ceballos, Javier Santiago Ortiz,
Lina Marcela Cardona Sosa

Cuaderno 8 - Marzo 2003

**LOS DILEMAS DEL RECTOR: EL CASO
DE LA UNIVERSIDAD EAFIT**

Álvaro Pineda Botero

Cuaderno 9 - Abril 2003

INFORME DE COYUNTURA: ABRIL DE 2003

Grupo de Análisis de Coyuntura Económica

Cuaderno 10 - Mayo 2003

GRUPOS DE INVESTIGACIÓN

Escuela de Administración

Dirección de Investigación y Docencia

Cuaderno 11 - Junio 2003

**GRUPOS DE INVESTIGACIÓN ESCUELA DE
CIENCIAS Y HUMANIDADES, ESCUELA DE
DERECHO, CENTRO DE IDIOMAS Y
DEPARTAMENTO DE DESARROLLO
ESTUDIANTIL**

Dirección de Investigación y Docencia

Cuaderno 12 - Junio 2003

**GRUPOS DE INVESTIGACIÓN -
ESCUELA DE INGENIERÍA**

Dirección de Investigación y Docencia

Cuaderno 13 - Julio 2003

**PROGRAMA JÓVENES INVESTIGADORES –
COLCIENCIAS: EL ÁREA DE LIBRE COMERCIO
DE LAS AMÉRICAS Y
LAS NEGOCIACIONES DE SERVICIOS**

Grupo de Estudios en Economía y Empresa

Cuaderno 14 - Noviembre 2003

BIBLIOGRAFÍA DE LA NOVELA COLOMBIANA

Álvaro Pineda Botero, Sandra Isabel Pérez,
María del Carmen Rosero y María Graciela Calle

Cuaderno 15 - Febrero 2004

PUBLICACIONES Y PONENCIA 2003

Dirección de Investigación y Docencia

Cuaderno 16 - Marzo 2004

**LA APLICACIÓN DEL DERECHO
EN LOS SISTEMAS JURÍDICOS
CONSTITUCIONALIZADOS**

Gloria Patricia Lopera Mesa

Cuaderno 17 - Mayo 2004

**PRODUCTOS Y SERVICIOS FINANCIEROS A
GRAN ESCALA PARA LA MICROEMPRESA:
HACIA UN MODELO VIABLE**

Nicolás Ossa Betancur

Cuaderno 18 - Mayo 2004

**ARTÍCULOS RESULTADO DE LOS
PROYECTOS DE GRADO REALIZADOS POR
LOS ESTUDIANTES DE INGENIERÍA DE
PRODUCCIÓN QUE SE GRADUARON EN EL
2003**

Departamento de Ingeniería de Producción

Cuaderno 19 - Junio 2004

**ARTÍCULOS DE LOS PROYECTOS DE GRADO
REALIZADOS POR LOS ESTUDIANTES DE
INGENIERÍA MECÁNICA QUE SE GRADUARON
EN EL AÑO 2003**

Departamento de Ingeniería Mecánica

Cuaderno 20 - Junio 2004

**ARTÍCULOS RESULTADO DE LOS
PROYECTOS DE GRADO REALIZADOS
POR LOS ESTUDIANTES DE INGENIERÍA DE
PROCESOS QUE SE GRADUARON EN
EL 2003**

Departamento de Ingeniería de Procesos

Cuaderno 21 - Agosto 2004

**ASPECTOS GEOMORFOLÓGICOS DE LA
AVENIDA TORRENCIAL DEL 31 DE ENERO DE
1994 EN LA CUENCA DEL RÍO FRAILE Y
SUS FENÓMENOS ASOCIADOS**

Juan Luis González, Omar Alberto Chavez,
Michel Hermelín

Cuaderno 22 - Agosto 2004

**DIFERENCIAS Y SIMILITUDES EN LAS
TEORÍAS DEL CRECIMIENTO ECONÓMICO**

Marleny Cardona Acevedo, Francisco Zuluaga
Díaz, Carlos Andrés Cano Gamboa,
Carolina Gómez Alvis

Cuaderno 23 - Agosto 2004

GUIDELINES FOR ORAL ASSESSMENT

Grupo de investigación Centro de Idiomas

Cuaderno 24 - Octubre 2004

**REFLEXIONES SOBRE LA INVESTIGACIÓN
DESDE EAFIT**

Dirección de investigación y Docencia

Cuaderno 25 - Septiembre 2004

**LAS MARCAS PROPIAS DESDE
LA PERSPECTIVA DEL CONSUMIDOR FINAL**

Belisario Cabrejos Doig

Cuaderno 26 - Febrero 2005

PUBLICACIONES Y PONENCIAS -2004-

Dirección de investigación y Docencia

Cuaderno 27 - Marzo 2005

EL MERCADEO EN LA INDUSTRIA DE LA CONFECCIÓN - 15 AÑOS DESPUÉS -

Belisario Cabrejos Doig

Cuaderno 28 - Abril 2005

LA SOCIOLOGÍA FRENTE A LOS ESPEJOS DEL TIEMPO: MODERNIDAD, POSTMODERNIDAD Y GLOBALIZACIÓN

Miguel Ángel Beltrán, Marleny Cardona Acevedo

Cuaderno 29 - Abril 2005

“OXIDACIÓN FOTOCATALÍTICA DE CIANURO”

Grupo de Investigación Procesos Ambientales y Biotecnológicos -GIPAB-

Cuaderno 30 - Mayo 2005

EVALUACIÓN A ESCALA DE PLANTA PILOTO DEL PROCESO INDUSTRIAL PARA LA OBTENCIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE CARDAMOMO, BAJO LA FILOSOFÍA “CERO EMISIONES”

Grupo de Investigación Procesos Ambientales y Biotecnológicos -GIPAB-

Cuaderno 31 - Junio 2005

LA DEMANDA POR FORMACIÓN PERMANENTE Y CONSULTORÍA UNIVERSITARIA

Enrique Barriga Manrique

Cuaderno 32 - Junio 2005

ARTÍCULOS DE LOS PROYECTOS DE GRADO REALIZADOS POR LOS ESTUDIANTES DE INGENIERÍA MECÁNICA QUE SE GRADUARON EN EL AÑO 2004

Escuela de Ingeniería
Departamento de Ingeniería Mecánica

Cuaderno 33 - Julio 2005

PULVERIZACIÓN DE COLORANTES NATURALES POR SECADO POR AUTOMIZACIÓN

Grupo de Investigación Desarrollo y Diseño de Procesos -DDP-
Departamento de Ingeniería de Procesos

Cuaderno 34 - Julio 2005

“FOTODEGRADACIÓN DE SOLUCIONES DE CLOROFENOL-CROMO Y TOLUENO-BENCENO UTILIZANDO COMO CATALIZADOR MEZCLA DE DIÓXIDO DE TITANIO (TiO₂), BENTONITA Y CENIZA VOLANTE”

Grupo de Investigación Procesos Ambientales y Biotecnológicos -GIPAB-
Edison Gil Pavas

Cuaderno 35 - Septiembre 2005

HACIA UN MODELO DE FORMACIÓN CONTINUADA DE DOCENTES DE EDUCACIÓN SUPERIOR EN EL USO PEDAGÓGICO DE LAS TECNOLOGÍAS DE INFORMACIÓN Y COMUNICACIÓN

Claudia María Zea R., María del Rosario Atuesta V., Gustavo Adolfo Villegas L., Patricia Toro P., Beatriz Nicholls E., Natalia Foronda V.

Cuaderno 36 - Septiembre 2005

ELABORACIÓN DE UN INSTRUMENTO PARA EL ESTUDIO DE LOS PROCESOS DE CAMBIO ASOCIADOS CON LA IMPLANTACIÓN DEL TPM EN COLOMBIA

Grupos de Investigación:
Grupo de Estudios de la Gerencia en Colombia
Grupo de Estudios en Mantenimiento Industrial (GEMI)

Cuaderno 37 - Septiembre 2005

PRODUCTOS Y SERVICIOS FINANCIEROS A GRAN ESCALA PARA LA MICROEMPRESA COLOMBIANA

Nicolás Ossa Betancur
Grupo de Investigación en Finanzas y Banca
Área Microfinanzas

Cuaderno 38 - Noviembre 2005

PROCESO “ACOPLADO” FÍSICO-QUÍMICO Y BIOTECNOLÓGICO PARA EL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES CONTAMINADAS CON CIANURO

Grupo de Investigación Procesos Ambientales y Biotecnológicos -GIPAB-

