

**AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS DEGRADADORES  
DE CIANURO**

**TATIANA COLEY BENJUMEA  
DIANA PAULINA ZAPATA ZULUAGA**

**UNIVERSIDAD EAFIT  
ESCUELA DE INGENIERIA  
DEPARTAMENTO DE INGENIERIA DE PROCESOS  
MEDELLÍN  
2006**

**AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS DEGRADADORES  
DE CIANURO**

**TATIANA COLEY BENJUMEA  
DIANA PAULINA ZAPATA ZULUAGA**

**Proyecto de Grado para optar el título de Ingeniero de Procesos**

**Asesor:**

**CATALINA GIRALDO ESTRADA  
Ingeniera de Procesos**

**UNIVERSIDAD EAFIT  
ESCUELA DE INGENIERIA  
DEPARTAMENTO DE INGENIERIA DE PROCESOS  
MEDELLÍN  
2006**

Nota de aceptación:

---

---

---

---

---

---

---

Firma del presidente del jurado

---

Firma del jurado

---

Firma del jurado

Medellín, 12 de Octubre de 2006

***He aquí el reflejo de nuestro esfuerzo,  
compromiso y dedicación; que no hubiese  
sido posible sin la voluntad de Dios,  
el apoyo incondicional de nuestros padres  
y la valiosa colaboración de Catalina Giraldo,  
quien nos brindó siempre su ayuda y motivación  
para la ejecución de este proyecto.***

***A todas las personas que creyeron en él  
y de una u otra forma contribuyeron a su  
realización.***

## **AGRADECIMIENTOS**

Los autores expresan sus agradecimientos a todas las personas que colaboraron en la realización de este proyecto:

Catalina Giraldo E., Ingeniera de Procesos. Profesora Universidad EAFIT. Aspirante al MSc en Biotecnología

Olga Inés Montoya C., MSc Microbiología. Profesora Universidad Nacional de Colombia sede Medellín.

Sandra Marcela Porras A., Bacterióloga. Investigadora Universidad Eafit. Aspirante al MSc en Biotecnología

Personal de los laboratorios de Ingeniería de Procesos, Edgar Arbelaez, Jhon Jairo Estrada y especialmente Sigifredo Cárdenas encargado del laboratorio de Biotecnología.

Marleny Gallego, Bacterióloga. Universidad de Antioquia

## CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCION	1
OBJETIVOS	4
1. REVISIÓN DE LITERATURA	6
1.1 EL CIANURO	6
1.1.1 Localización del cianuro	7
1.1.2 Usos del cianuro	9
1.1.3 Exposición de los seres humanos al cianuro	10
1.1.4 Toxicidad y epidemiología de los seres humanos al cianuro	10
1.2 ALTERNATIVAS DE DEGRADACIÓN DEL CIANURO	11
1.2.1 Alternativas Químicas	12
1.2.1.1 Dióxido de Sulfuro / aire	12
1.2.1.2 Peróxido de hidrogeno	12
1.2.1.3 Cloración alcalina	13

1.2.2 Alternativas Biológicas	13
1.3 TIPOS DE MICROORGANISMOS	18
1.3.1 Bacterias	18
1.3.1.1 Crecimiento	19
1.3.1.2 Clasificación morfológica de las bacterias	20
1.3.1.2.1 Cocos	20
1.3.1.2.2 Bacilos	20
1.3.2 Hongos	20
1.3.2.1 Crecimiento	21
1.3.2.2. Clasificación de los hongos	22
1.3.2.3 Estructura Fúngica	22
1.3.2.4 Moho dematiáceo <i>Exophiala spp</i>	23
1.3.3 Levaduras	24
1.3.3.1 Formación de hifas, plastoconidias, clamidiosporas y artrosporas en las levaduras	25
1.3.3.2 <i>Rodhotorula mucilaginosa</i>	28

1.4 PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS	29
1.4.1 Bacterias	29
1.4.1.1 Tinción de gram	29
1.4.1.2 Prueba de la oxidasa	30
1.4.1.3 Agar Mc Conkey	30
1.4.1.4 Agar cetrimide	30
1.4.1.5 Producción de pigmentos	31
1.4.1.5.1 Agar king A y king B	31
1.4.1.6 Prueba de la catalasa	31
1.4.1.7 Baird Parker medio base	32
1.4.1.8 Agar manitol salado	32
1.4.2 Hongos	32
1.4.2.1 Tinción en fresco	32
1.4.2.2 Sistema semiautomático 20C AUX	33
2. METODOLOGÍA	34

2.1 MICROORGANISMO	34
2.2 MEDIO DE CULTIVO	34
2.3 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL PARA EL AISLAMIENTO, ADAPATACIÓN Y PURIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS DEGRADADORES DE CIANURO	35
2.4 SELECCIÓN DE LOS MICROORGANISMOS CON MAYOR POTENCIAL DE DEGRADACIÓN DE CIANURO	36
2.5 CINÉTICAS DE CRECIMIENTO Y DEGRADACIÓN DE CIANURO DE LOS MICROORGANISMOS SELECCIONADOS	37
2.6 MEDICIÓN DE LA BIOMASA	39
2.7 MEDICIÓN DEL CONSUMO DE GLUCOSA	39
2.8 MEDICIÓN DEL CIANURO	40
2.9 IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS QUE CRECIERON A LA MAXIMA CONCENTRACION DE CIANURO.	40
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
3.1 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS DEGRADADORES DE CIANURO	42

3.2 ENSAYO PRELIMINAR DE SELECCIÓN DE LOS MICROORGANISMOS CON MAYORES VELOCIDADES DE DEGRADACIÓN	42
3.3 CONSUMO DE CIANURO	44
3.4 CINÉTICAS DE CRECIMIENTO CELULAR Y DEGRADACIÓN DE CIANURO DE LOS MICROORGANISMOS SELECCIONADOS.	45
3.4.1 Análisis de varianza para la variable respuesta concentración de cianuro	49
3.5 PARAMETROS CINÉTICOS DE LOS MICROORGANISMOS SELECCIONADOS	53
3.6 VELOCIDADES DE DEGRADACIÓN DE CIANURO PARA CADA MICROORGANISMO	55
3.6.1 Análisis de varianza para la variable respuesta: velocidad de degradación de cianuro	57
3.7 IDENTIFICACION DE LOS MICROORGANISMOS AISLADOS Y PURIFICADOS	59
3.7.1 Bacterias	59
3.7.1.1 Bacilo gram negativo	59
3.7.1.2 Coco gram positivo	63
3.7.2 Hongos	66

3.7.2.1 Levaduras	66
3.7.2.2 Hongo filamentoso	68
CONCLUSIONES	70
RECOMENDACIONES	72
BIBLIOGRAFÍA	73
ANEXOS	84

## LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Microorganismos degradadores de cianuro	18
Tabla 2. Análisis de Varianza para la variable respuesta: Concentración de cianuro del microorganismo B	49
Tabla 3. Análisis de Varianza para la variable respuesta: Concentración de Cianuro microorganismo H	50
Tabla 4. Análisis de Varianza para la variable respuesta: Concentración de Cianuro microorganismo A	50
Tabla 5. Análisis de Varianza para la variable respuesta: Concentración de Cianuro microorganismo G	50
Tabla 6. Método de comparaciones múltiples de Tukey para el microorganismo B	51
Tabla 7. Método de comparaciones múltiples de Tukey microorganismo H	52
Tabla 8. Método de comparaciones múltiples de Tukey microorganismo A	52
Tabla 9. Método de comparaciones múltiples de Tukey microorganismo G	53
Tabla 10. Parámetros cinéticos para cada microorganismo	54
Tabla 11. Porcentajes de degradación de cada microorganismo	56
Tabla 12. Análisis de Varianza para la variable respuesta: Velocidad de degradación de cianuro	57
Tabla 13. Método de comparaciones múltiples de Tukey para las velocidades de degradación de cianuro	58
Tabla 14 . Preparación del medio Manitol	86
Tabla 15 . Preparación del Medio Baird Parker	87

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Diagrama de la degradación del cianuro	8
Figura 2. Esquema de la oxidación completa de cianuro con un tratamiento aeróbico	14
Figura 3. Estructura interna de las bacterias	19
Figura 4. Clasificación morfológica de las bacterias	21
Figura 5. Tipos de Hongos filamentosos	22
Figura 6. Tipos de Hongos levaduriformes	22
Figura 7. Septos en un hongo	23
Figura 8. Tipos de Levaduras	26
Figura 9. Blastoconidias “Oreja de conejo”	27
Figura 10. Blastoconidias “Palo de Jockey”	28
Figura 11. Clamidosporas	28
Figura 12. Método Bioquímico API 20C AUX (Linares <i>et al</i> ; 2006)	33
Figura 13. Procedimiento para el aislamiento, adaptación y purificación de los microorganismos degradadores de cianuro	35
Figura 14. Procedimiento para la selección de los microorganismos con mayor potencial Biodegradador	36
Figura 15. Cinéticas de los microorganismos	37
Figura 16. Procedimiento para las cinéticas de crecimiento y biodegradación de los microorganismos seleccionados.	38
Figura 17. Procedimiento para realizar la curva de calibración para la medición de biomasa	39
Figura 18. Procedimiento para la identificación y la caracterización de los microorganismos	41

Figura 19. Velocidad de degradación para cada microorganismo en el ensayo Preliminar:	43
a. Microorganismo A;	
b. Microorganismo B;c. Microorganismo C;	
d. Microorganismo F; e. Microorganismo G;	
f. Microorganismo H	
Figura 20. Consumo de cianuro de los microorganismos y del Medio de Control:	44
a. Microorganismo B;	
b. Microorganismo H; c. Microorganismo A;	
d. Microorganismo G	
Figura 21. a. Producción de biomasa y consumos de cianuro microorganismo B; b. Consumo de glucosa para el microorganismo B	46
Figura 22. a. Producción de biomasa y consumos de cianuro microorganismo H; b. Consumo de glucosa para el microorganismo H	47
Figura 23. a. Producción de biomasa y consumos de cianuro microorganismo A; b. Consumo de glucosa para el microorganismo A	48
Figura 24. a. Producción de biomasa y consumos de cianuro microorganismo G; b. Consumo de glucosa para el microorganismo G	48
Figura 25. Linealizaciones de la velocidad máxima	54
a. Microorganismo B;	
b. Microorganismo H; c. Microorganismo A;	
d. Microorganismo G	
Figura 26. Velocidad de degradación	56
a. Microorganismo B;	
b. Microorganismo H; c. Microorganismo A;	
d. Microorganismo G	
Figura 27. Bacilo Gram Negativo	59
Figura 28. Bacilo en Agar Nutritivo	60
Figura 29. Repica Bacilo en Agar Nutritivo	60

Figura 30. Bacilo en Agar Cetrimide	61
Figura 31. Bacilo en Agar King A	61
Figura 32. Bacilo en Agar King B	61
Figura 33. Bacilo en Agar Mc Conkey	62
Figura 34. Bacilo en Agar Manitol	62
Figura 35. Coco Gram Positivo	63
Figura 36. Coco en Agar Extracto de Malta	64
Figura 37. Coco en Agar Nutritivo	64
Figura 38. Coco en Agar Baird Parker	65
Figura 39. Coco en Agar Manitol	65
Figura 40. Levadura a	66
Figura 41. Microorganismo A	67
Figura 42. Microorganismo B	67
Figura 43. Microorganismo F	67
Figura 44. Microorganismo A en PDA	67
Figura 45. Microorganismo A en Saboraud	67
Figura 46. Microorganismo B en PDA	68
Figura 47. Microorganismo B en Saboraud	68
Figura 48. Microorganismo F en PDA	68
Figura 49. Microorganismo F en Saboraud	68
Figura 50. Hifas del hongo	69
Figura 51. Microorganismo H	69
Figura 52. Curvas de calibración de peso seco para los microorganismos B, H, A y G	90

## LISTA DE GRÁFICAS

	Pág.
Gráfica 1. Curva de Calibración del Método DNS	91
Gráfica 2. Curva de calibración de cianuro	92

## LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS	84
Anexo 2. RESULTADOS DE LAS PRUEBAS BIOQUIMICAS DE LAS LEVADURAS Y EL HONGO	88
Anexo 3. CURVAS DE CALIBRACIÓN DE PESO SECO PARA CADA MICROORGANISMO	90
Anexo 4. CURVA DE CALIBRACIÓN DEL MÉTODO ÁCIDO DINITROSALICÍLICO (DNS)	91
Anexo 5. CURVA DE CALIBRACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CIANURO	92

## RESUMEN

Se realizó el aislamiento, adaptación y purificación de microorganismos degradadores de cianuro a partir de un efluente de una empresa de recubrimientos metálicos ubicada en el Valle de Aburrá, con el fin de encontrar especies microbianas con potencial biodegradador del contaminante y poder ampliar el banco de cepas del laboratorio de Biotecnología de la Universidad Eafit.

Se lograron aislar 6 especies diferentes, las cuales se adaptaron a una concentración máxima de cianuro de 150 mg/L y se realizó un ensayo preliminar para seleccionar aquellas con mayores velocidades de degradación; éstas fueron la B, H, A y G, identificadas como *Pichia ohmeri*, *Exophiala spp*, *Candida spp*, *Staphilococcus spp*, respectivamente. Los microorganismos con menores velocidades de degradación fueron C y F, identificados como *Pseudomonas spp* y *Rodhotorula mucilaginosa*, después de haberse hecho las diferentes pruebas bioquímicas.

Los microorganismos con mayores velocidades de degradación fueron *Pichia ohmeri*, *Exophiala spp*, con valores de 2.3166 mg/Lh y 2.3109 mg/Lh respectivamente y los de menores velocidades de degradación fueron *Candida spp* con un valor de 1.9747 mg CN/Lh y *Staphilococcus spp* con un valor de 1.7664 mg CN/Lh. Todos los microorganismos tuvieron un porcentaje de remoción de cianuro cercano al 97%; lo cual significa que son una buena alternativa para el tratamiento de aguas residuales contaminadas con cianuro.

**Palabras clave:** Velocidad de degradación, Cianuro, *Pichia ohmeri*, *Exophiala spp*, *Candida spp*, *Staphilococcus spp*, Identificación Microbiana.

## INTRODUCCIÓN

El cianuro es un compuesto altamente tóxico para los organismos vivos porque inactiva el sistema de respiración (Porter *et al.*, 1983 ; Chena and Liu, 1999; Yanase *et al.*, 2000). Por la biogénesis, las plantas producen cianuros a bajos niveles, es por esto que los efluentes producidos por industrias que procesan plantas como almendras, también contienen grandes cantidades de cianuro debido a la descomposición de glucósidos cianogénicos (Conn, 1980). Adicionalmente, otras industrias como las de extracción de metales, de gasificación del carbón, producción de fibras sintéticas producen altas concentraciones de cianuro (Ingvorsen *et al.*, 1991). Como consecuencia los efluentes industriales deben reducir el cianuro a bajos niveles, generalmente entre 4 y 40  $\mu\text{M}$  antes de ser descargados (Wild, 1987), para proteger el medio ambiente y los cuerpos de agua.

Las aguas residuales que contienen cianuro son tratadas por métodos de oxidación química tales como : cloración alcalina, ozonización, oxidación húmeda con aire (Palmer *et al.*, 1988; Watanabe *et al.*, 1998). Sin embargo, estos métodos son costosos y los reactivos empleados son peligrosos (cloro e hipoclorito de sodio) (Watanabe *et al.*, 1998). Además, estas técnicas en muchos casos no pueden degradar completamente los complejos de cianuro (Figueira *et al.*, 1996). Otra alternativa para la degradación del cianuro es el tratamiento biológico de efluentes industriales que usualmente depende de la actividad oxidativa de los microorganismos. Sin embargo, los efluentes industriales contienen inhibidores que pueden disminuir la degradación (Pereira *et al.*, 1996).

Aunque los cianuros son peligrosos para muchos organismos vivos, algunas bacterias y hongos, pueden descomponer estos, dichos

microorganismos no han sido estudiados en detalle (Pereira *et al.*, 1996). También existen algunos sistemas biológicos que tienen mecanismos para la desintoxicación y se han descrito varios sistemas para la conversión del cianuro en productos menos tóxicos. Por ejemplo: sistemas de lodos activados y filtros.

Los microorganismos degradadores de cianuro poseen varias enzimas capaces de convertir el cianuro en compuestos que pueden ser utilizados como fuentes de carbono y nitrógeno. Tales enzimas incluyen L-3 cianoalanina sintetasa, formamida hidrolasa, cianasa, cianohidrolasa y oxigenasas (Knowles, 1976; Fry and Myers, 1981; Gastric, 1981; Padmaja and Balagopal, 1985; Ingvorsen *et al.*, 1991; Basheer *et al.*, 1992). De acuerdo con esto, el tratamiento biológico puede ser una alternativa efectiva de remoción de cianuro comparada con las técnicas comúnmente empleadas (Raybuck, 1992; Dubey and Holmes, 1995).

Se ha reportado que la desintoxicación microbiana de cianuro en efluentes de minerías tiene una ventaja sobre los métodos químicos convencionales, por su bajo costo de tratamiento y su completa desintoxicación (Thompson *et al.*, 1994; Adams *et al.*, 2001).

Es de anotar la importancia que tiene la remoción del cianuro de los efluentes industriales por medio de técnicas biológicas que según lo expuesto anteriormente han demostrado ser bastante eficientes para la remoción de dicho contaminante, además, como etapa previa a la aplicación de técnicas de biodegradación, es necesario identificar aquellos microorganismos mas eficientes para realizar esta labor.

En estudios realizados por el Grupo de Investigación en Procesos Ambientales y Biotecnológicos - GIPAB, de la Universidad EAFIT (“Fotodegradación de cianuros libres presentes en una corriente residual” y “Tratamiento de aguas residuales contaminadas con cianuro”), se obtuvo un aislado nativo proveniente del efluente

de una empresa de recubrimientos metálicos ubicada en el Valle de Aburrá, el cual resultó ser compatible bioquímica, morfológica y fisiológicamente con la especie *Pseudomonas fluorescens*, que se fue cultivada en un medio de cultivo enriquecido con glucosa y cianuro a un pH de 9.5, el cual dio buena respuesta de degradación, alrededor del 96 %, a las 72 horas, con una concentración inicial de cianuro de 15 mg/L y una velocidad de agitación de 200 rpm, se obtuvo una concentración final menor a 1mg/L (Gil-Pavas *et al*; 2005).

A pesar de que estos resultados son satisfactorios, el tiempo de degradación es prolongado comparado con otros tratamientos, y la máxima concentración inicial de cianuro aún es baja considerando que la concentración de cianuro en el efluente de una empresa de recubrimientos metálicos puede llegar hasta los 400 mg/L (Gil-Pavas *et al*, 2005), por lo tanto, con este trabajo se busca encontrar otros microorganismos degradadores de cianuro, a través de una purificación de los mismos por presión de selección, incrementando gradualmente la concentración de cianuro en el medio de cultivo que permita obtener los de mayor potencial biodegradador y posteriormente, realizar una caracterización bioquímica, morfológica y fisiológica de las especies.

Esta investigación contribuye con la formación de un banco de cepas de microorganismos degradadores de cianuro, en el laboratorio de Biotecnología de la Universidad EAFIT, lo cual se logra mediante el aislamiento, la identificación y caracterización de especies microbianas con potencial para disminuir la concentración de cianuro de un efluente industrial, ayudando a reducir el impacto ambiental generado por aquellas industrias cuyas descargas contienen una alta concentración del contaminante y que generan un impacto ambiental negativo. Además, no se tiene conocimiento de la existencia de un cepario de este tipo de microorganismos.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Aislar y purificar de un efluente industrial microorganismos con potencial para la degradación de cianuro mediante su capacidad de crecimiento y de asimilación del contaminante a altas concentraciones del mismo en el medio de cultivo, con el fin de proponer microorganismos alternativos para la biodegradación de cianuro.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Seleccionar los microorganismos degradadores de cianuro por medio del incremento en la concentración de este compuesto en el medio de cultivo, con el fin de aislar especies nativas con alto potencial de degradación.
- Evaluar el consumo de sustrato de los microorganismos degradadores de cianuro seleccionados por medio de la técnica de DNS, con el fin de construir la cinética correspondiente.
- Evaluar la producción de biomasa de los microorganismos degradadores de cianuro por medio de un método de determinación de biomasa, para realizar la cinética de crecimiento celular de los microorganismos seleccionados.
- Evaluar la remoción de cianuro de los microorganismos degradadores, empleando un electrodo de ión selectivo, con el fin de conocer la velocidad de degradación de los microorganismos aislados.
- Identificar los microorganismos degradadores de cianuro por medio de pruebas bioquímicas, para conocer el género al cual pertenecen las especies aisladas.

- Comparar las cinéticas de crecimiento celular y de biodegradación de cianuro de los microorganismos seleccionados para la remoción, por medio de parámetros cinéticos, para clasificarlos de acuerdo al potencial de degradación.

## 1. REVISIÓN DE LITERATURA

### 1.1 EL CIANURO

El cianuro de hidrógeno (HCN) es un gas incoloro, con un olor fuerte y penetrante. El cianuro de sodio y de potasio son sólidos blancos (Anónimo<sup>1</sup>, 2006). Estos compuestos son usados en industrias metalúrgicas, producción de químicos, desarrollo fotográfico, elaboración de plásticos, procesos de minerías como la extracción del oro. (Patil and Paknikar, 1999).

Las sales simples de cianuro consisten en la combinación de un catión simple con el ión cianuro. Los metales complejos de cianuro son producidos durante la etapa de cianidación del oro por la reacción del cianuro con una variedad de minerales. Estos son formados como débiles, moderados o fuertes complejos en términos de estabilidad química. Complejos con el hierro como:  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]_4$  y  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$  son los más fuertes complejos de cianuro, los cuales solo susceptibles a la disociación por luz ultravioleta (Patil and Paknikar, 1999).

“Cianuro libre” es el término utilizado para el ión de cianuro ( $\text{CN}^-$ ) y para el cianuro de hidrógeno (HCN) que se forma en la solución. 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, por lo tanto, este producto puede volatilizarse y dispersarse en el aire. El cianuro libre, especialmente el gas HCN a un pH de 9.31 o menos es un agente tóxico para el medio ambiente (Huiatt *et al.*, 1983, Mudder y Botz, 2001).

Cuando el pH es superior a 10.5, hay pocos iones de hidrógeno por lo que casi todo el cianuro libre está presente como  $\text{CN}^-$ ; en cambio en condiciones normales

de temperatura y presión, las concentraciones de HCN y  $\text{CN}^-$  son iguales a un valor de pH de aproximadamente 9.4.

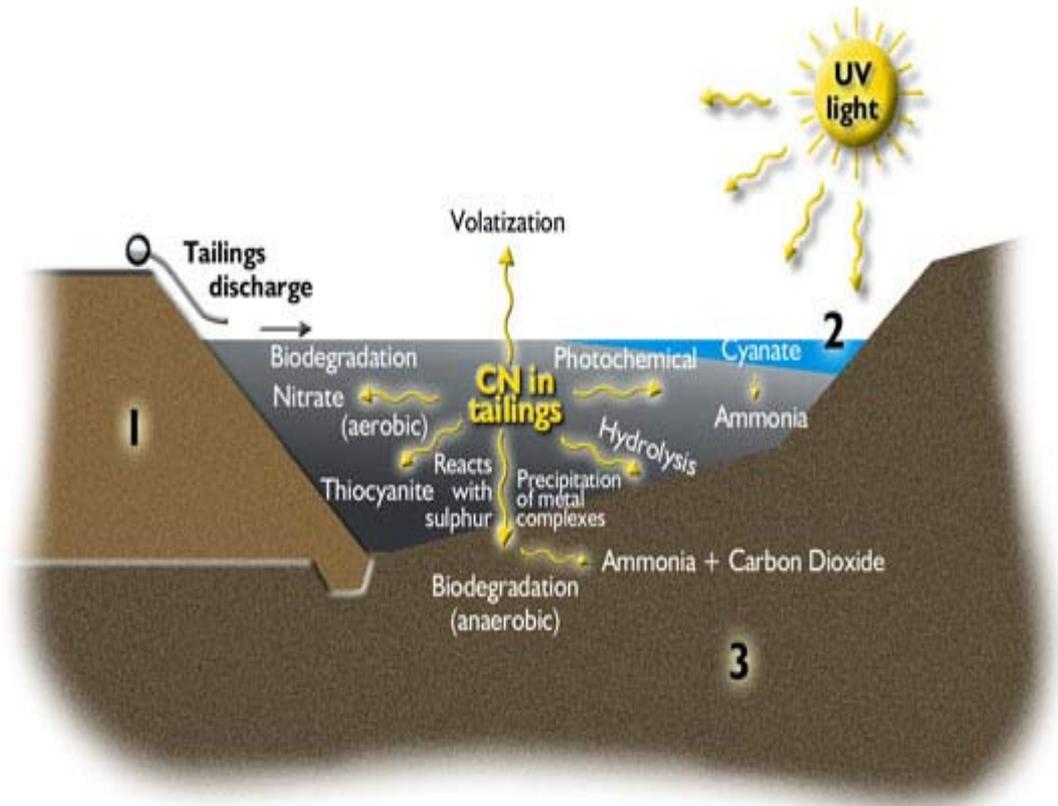
### **1.1.1 Localización del cianuro**

El Cianuro es ampliamente usado en la minería y en otros procesos industriales. Puede ser producido por algunas bacterias, hongos y algas y es encontrado en algunas plantas. Estas plantas llamadas cianogénicas, liberan cierta cantidad de cianuro en el período de post cosecha. (Ingvorsen *et al.*, 1992).

Al menos 1000 especies de plantas y microorganismos de 90 familias se ha demostrado que contienen de uno a más de 20 compuestos capaces de producir cianuro. Cerca de 800 especies de plantas superiores de 70 a 80 familias, incluyendo importantes especies como lino, sorgo, alfalfa, bambú, durazno, pera, cereza, ciruela, maíz, papa, algodón, almendra, y frijoles son cianogénicos (Eyjolfsson, 1970). El daño que ocasiona el cianuro al ganado por algunas especies de sorgo y otras plantas cianogénicas también se ha investigado (Mudder, 1997).

Existen hongos y bacterias productores de cianuro. Además de plantas y microorganismos, algunos insectos también producen cianuro. Especies de ciempiés, escarabajos, polillas y mariposas sintetizan y excretan cianuro como mecanismo de defensa (Duffey, 1981) (Ver Figura 1).

**Figura 1.** Diagrama de la degradación del cianuro (Anónimo<sup>3</sup>, 2006).



El humo de los cigarrillos y los productos de la combustión de materiales sintéticos como los plásticos contienen cianuro (Anónimo<sup>3</sup>, 2006).

El cianuro se usa en la fabricación de papel, de textiles y plásticos, también se encuentra en las sustancias químicas que se utilizan para revelar fotografías. Las sales de cianuro se utilizan en la metalurgia para la galvanización, limpieza de metales, y la recuperación de oro de la mina. El gas de cianuro se utiliza para exterminar plagas e insectos en barcos y edificios (Anónimo<sup>3</sup>, 2006).

### 1.1.2 Usos del cianuro

La mayor parte del cianuro producido se utiliza como compuesto básico para la industria química. El cianuro se produce en grandes cantidades (alrededor de 1.4 millón de toneladas por año) como uno de los pocos compuestos básicos que se utilizan principalmente para sintetizar una amplia gama de químicos orgánicos industriales, como el nylon y los acrílicos. Por razones técnicas y económicas, el cianuro es la sustancia química elegida para la recuperación del oro del mineral. La recuperación de oro utiliza aproximadamente el 18% de la producción mundial de cianuro (Logsdon *et al.*, 2003).

El cianuro ha sido utilizado en la extracción de metales desde 1887 y actualmente se le utiliza y maneja en forma segura en la recuperación de oro en todo el mundo en las minas industrializadas pero no en las artesanales. Las operaciones mineras para la extracción de oro utilizan soluciones muy diluidas de cianuro de sodio, típicamente entre 0.01% y 0.05% de cianuro (100 a 500 partes por millón).

El cianuro no es persistente. Una de las principales preocupaciones para la salud y el ambiente relacionados con los químicos sintéticos es que no se descomponen rápidamente y por lo tanto, pueden acumularse en la cadena alimenticia. Sin embargo, el cianuro se transforma en otras sustancias químicas menos tóxicas mediante procesos físicos, químicos y biológicos naturales. Dado que el cianuro se oxida cuando es expuesto al aire o a otros oxidantes, se descompone y no persiste. Es un veneno mortal cuando es ingerido en una dosis lo suficientemente elevada, puede causar problemas crónicos en la salud o en el ambiente cuando está presente en concentraciones bajas (Logsdon *et al.*, 2003).

### **1.1.3 Exposición de los seres humanos al Cianuro**

El cianuro se absorbe en el agua, la tierra, o el aire como resultado tanto de procesos naturales como industriales. En el aire, el cianuro está principalmente presente como cianuro de hidrógeno gaseoso.

Los seres humanos pueden exponerse al cianuro al respirar el aire, beber agua, ingerir alimentos, o tocar la tierra que contenga cianuro.

Fumar cigarrillos es probablemente una de las mayores fuentes de exposición al cianuro entre personas que no trabajan en industrias que lo utilizan. (Anónimo<sup>2</sup>, 2006).

### **1.1.4 Toxicidad y Epidemiología del Cianuro en Seres Humanos**

El cianuro es un potente inhibidor del crecimiento y el metabolismo celular incluyendo la respiración, el metabolismo del nitrógeno y fósforo (Knowles, 1976; Knowles and Bunch, 1986).

El cianuro impide a las células utilizar el oxígeno, lo cual causa hipoxia de los tejidos y “cianosis” (decoloración azulada de la piel). El sistema respiratorio deja de nutrir a las células con oxígeno, un estado que, si no se trata, causa respiración rápida y profunda seguida por convulsiones, pérdida del conocimiento y asfixia. El antídoto más común es el nitrito de amilo, que puede administrarse en forma oral o por inyección. Aunque hay muchas fuentes diarias de exposición al cianuro (escapes de los automóviles, humo de tabaco, incendios), el cianuro no se acumula en los tejidos porque el cuerpo transforma esas pequeñas cantidades en un compuesto menos tóxico llamado tiocianato, que luego se excreta. No es conocido que el cianuro cause cáncer o defectos congénitos o que pueda afectar adversamente la reproducción. La forma más tóxica del cianuro es el HCN gaseoso. La Conferencia Norteamericana de Higienistas Industriales

Gubernamentales (ACGIH) establece el límite de umbral tope de HCN en 4.7 mg/L. En concentraciones de 20 a 40 mg/L de HCN en el aire, se puede observar cierto malestar respiratorio después de varias horas. La muerte ocurre en pocos minutos con concentraciones de HCN por encima de aproximadamente 250 mg/L en el aire. Para el cianuro libre, la dosis letal en humanos por ingestión o inhalación varía entre 50 y 200 mg (1 a 3 mg de cianuro libre por kg. de masa corporal). La dosis letal por absorción dérmica es considerablemente mayor, alrededor de 100 mg por Kg. de peso corporal. (Anónimo<sup>2</sup>, 2006).

## **1.2 ALTERNATIVAS DE DEGRADACIÓN DEL CIANURO**

Existen algunos procesos de recuperación o destrucción para tratar soluciones y llevarlas a bajos niveles de cianuro (Akcil, 2001; Botz, 2001; McNulty, 2001; Akcil, 2002). Los tratamientos para remover el cianuro pueden ser de destrucción, que incluyen reacciones químicas o biológicas que son empleadas para convertir el cianuro en compuestos menos tóxicos o procesos físicos como la adsorción con carbón activado.

Tradicionalmente, el tratamiento biológico, adsorción con carbón activado, extracción con solvente, oxidación química con ozono y radiación ultravioleta son ampliamente usados para remover complejos iónicos metálicos del cianuro, incluyendo los del hierro, que son aniónicos y los mas estables. (Aksu *et al.*,1999).

Los tratamientos biológicos son alternativas factibles, puesto que un amplio rango de microorganismos pueden metabolizar estos químicos.

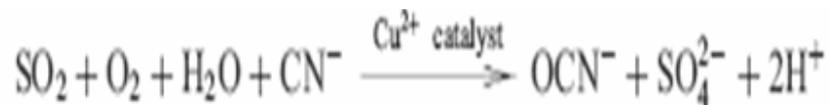
La bioadsorción es generalmente usada para el tratamiento de metales pesados en desechos y podría ser empleada para el tratamiento de efluentes que contienen

iones metálicos complejos. La pared celular de *Rhizopus arrhizus* consiste esencialmente en varios compuestos orgánicos que incluyen quitina, polisacáridos ácidos, lípidos, aminoácidos y otros compuestos celulares que podrían generar una superficie de adsorción de complejos iónicos de cianuro y hierro (Aksu *et al.*, 1999).

### 1.2.1 Alternativas Químicas

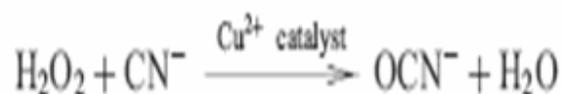
#### 1.2.1.1 Dióxido de Sulfuro / aire

Este utiliza SO<sub>2</sub> o un derivado y aire en presencia de cobre soluble como catalizador para oxidar el cianuro a cianato (OCN) que es menos tóxico, como se muestra a continuación: (Akcil , 2003).



#### 1.2.1.2 Peróxido de hidrogeno

Es similar al proceso INCO pero se emplea peróxido de hidrógeno en lugar de dióxido de sulfuro y aire, también se emplea cobre soluble como catalizador y el producto de la reacción es el cianato, como se muestra a continuación:

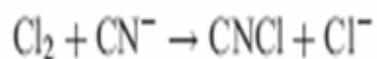


Es un proceso que puede trabajarse en amplios rangos de pH, produce efluentes aceptables ambientalmente pero incrementa el total de sólido disueltos (Akcil , 2003).

### **1.2.1.3 Cloración alcalina**

Ha sido el más ampliamente empleado para procesos de tratamiento de cianuro, pero gradualmente se ha venido reemplazando por otros métodos químicos (Akcil, 2003).

La reacción de destrucción del cianuro ocurre en dos etapas, que involucran la conversión de cloruro de cianuro (CNCl) seguido de su hidrólisis a cianato como se muestra a continuación: (Akcil, 2003).



### **1.2.2 Alternativas Biológicas**

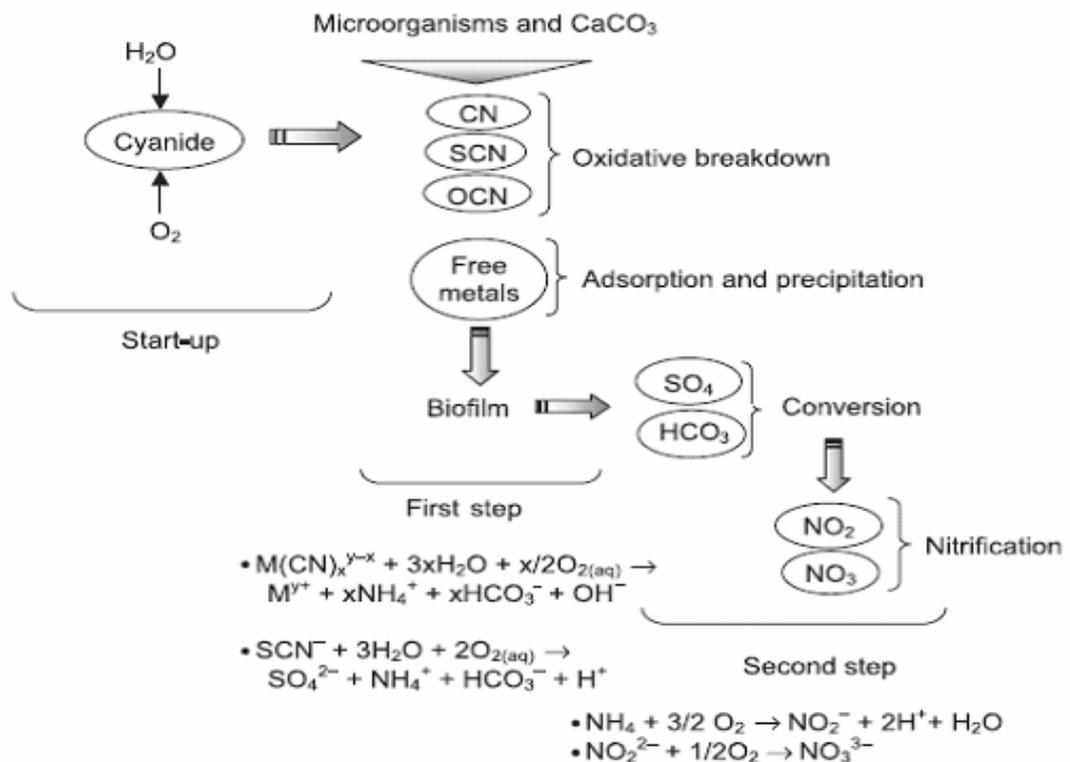
En el tratamiento biológico del cianuro, las bacterias convierten los cianuros libres o complejados a dióxido de carbono y amoníaco, mientras que los metales liberados son adsorbidos por la biopelícula o precipitados de la solución (Akcil, 2003).

En la primera etapa del tratamiento biológico ocurre la oxidación del cianuro y tiocianato y la subsiguiente adsorción y precipitación de metales libres dentro de la biopelícula. El cianuro y tiocianato son degradados a dióxido de carbono, amoníaco y sulfato. En una segunda etapa se convierte el amoníaco a nitrato con nitrito

como intermediario. Varias especies de *Pseudomonas* son responsables de la oxidación completa de cianuro, tiocianato y amoniaco (Ver Figura 2).

Normalmente, una población de bacterias es expuesta a condiciones aeróbicas para la nitrificación y a condiciones anóxicas para la desnitrificación. Durante la nitrificación el amoniaco es oxidado a nitrito como intermediario y posteriormente a nitrato. Durante la desnitrificación el nitrato es reducido a gas nitrógeno resultando la completa remoción del nitrógeno de la solución tratada (Akcil, 2003).

**Figura 2.** Esquema de la oxidación completa de cianuro con un tratamiento aeróbico (Akcil, 2003).



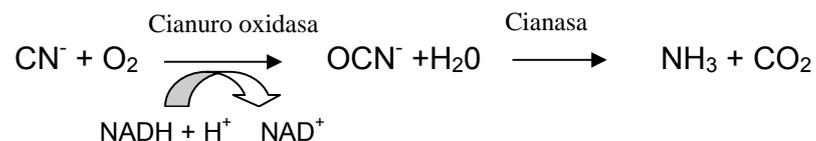
El tratamiento biológico es mas conveniente puesto que los procesos que involucran peróxido de hidrogeno y dióxido de sulfuro no remueven el tiocianato, amoniaco y nitrato. Aunque la cloración alcalina remueve estos constituyentes, es

muy costosa y produce alto contenido de sólidos totales disueltos y altas concentraciones de cloruro (Given *et al.*, 1998).

El tratamiento biológico o proceso de biodegradación ha sido adoptado en industrias mineras construidas y operadas en Estados Unidos y Canadá desde mediados de los 80`s (Mudder and Whitlock, 1984; Mudder *et al.*, 1995). En estas plantas es utilizado un tratamiento biológico aeróbico para la remoción de cianuro, tiocianato, cianato, amoníaco y metales antes de ser descargado el efluente. Esta biodestrucción ha sido efectiva en el tratamiento de varios niveles de cianuro y tiocianato.

Ambos procesos de tratamiento biológico: aerobios y anaerobios han sido estudiados (White *et al.* 1988; Fallon *et al.* 1991), pero los tratamientos aerobios y los microorganismos utilizados han recibido mucha mayor atención (Knowles and Bunch, 1986; White *et al.*, 1988), puesto que la actividad degradadora de cianuro por metanogénesis es probablemente inhibida bajo condiciones anaerobias.

La degradación de cianuros bajo condiciones aeróbicas puede ser ilustrada en dos etapas como se muestra en las reacciones:



De la descomposición de cianuro usualmente resulta la producción de formas inorgánicas de nitrógeno, tales como amoníaco (Dictor *et al.*, 1997). Las reacciones hidrolíticas son catalizadas por la cianuro hidratasa o por la cianidasa, formando formamida o formato y amoníaco, respectivamente. La cianuro hidratasa es primordialmente una enzima fúngica y la cianidasa es bacterial (Ebbs, 2004).

La toxicidad del cianuro puede limitar la disponibilidad del microorganismo de emplearlo como sustrato para su crecimiento. Por tanto, los microorganismos capaces de desintoxicar cianuro y complejos de cianuro pueden ser aislados de muestras de lodos no contaminadas (Patil and Paknikar, 1999).

Para el desarrollo de un tratamiento biológico de degradación de cianuro se han identificado microorganismos con alto potencial de degradación del contaminante (Watanabe *et al.*, 1998), tales como: ***Pseudomonas***, ***Acinetobacter***, ***Bacillus***, y ***Alcaligenes*** (Ingvorsen *et al.*, 1991; Meyers *et al.*, 1991).

Las ***Pseudomonas*** son los microorganismos más comúnmente reportados como degradadores de cianuro pues lo pueden convertir a amoníaco y fumarato bajo condiciones aerobias y anaerobias (Watanabe *et al.*, 1998). Usualmente crecen en el suelo o en superficies de aguas. Por ejemplo la ***Pseudomonas putida*** y ***Pseudomonas fluorescens*** pueden emplear el cianuro como fuente de nitrógeno y metabolizarlo hasta amoníaco (Babu *et al.*, 1996). La ***Pseudomonas aeruginosa*** también lo hace con niveles adecuados de aireación (Castric *et al.*, 1981). La ***Pseudomonas paucimobilis*** emplea moderadamente fuertes complejos metálicos de cianuro como el [K,Ni(CN)] (Barclay *et al.*, 1998(1)).

Además de las ***Pseudomonas***, existen otras bacterias que producen enzimas de conversión de cianuros (Ingvorsen *et al.*, 1992) como ***Chromobacterium violaceum*** que puede crecer y degradar en presencia de este (Ebbs *et al.*, 2004). Además, algunas cepas de ***Klebsiella oxytoca*** fueron aisladas de efluentes industriales con altas concentraciones de cianuro y crecieron empleándolo como fuente de nitrógeno. (Ebbs, 2004). La ***Burkholderia cepacia*** es capaz de usar el cianuro como fuente de nitrógeno. Esta bacteria puede emplear alta concentración del contaminante para su crecimiento, es una de las más prometedoras para el biotratamiento de efluentes con altas concentraciones de cianuro (Adjei and Ohta, 2000). Otras especies previamente identificadas por su capacidad para degradar

cianuro son ***Ifrobacter freundii*** ***Bacillus subtilis*** ***Cifrobacter freundii***, y ***Enterobacter spp*** (Dubey *et al.*, 1995). Algunas cepas de ***Cifrobacter fiemdii*** y ***Enferobacter aerogenes***, juegan un papel muy importante en la desintoxicación del cianuro (Porter and Knowles, 1979).

Algunos hongos como ***Gloeocerocospora sorghi*** (Fry and Munch, 1975; Wang *et al.*, 1992), ***Fusarium lateritum*** (Cluness *et al.*, 1993), y ***Stemphylium loti*** (Fry and Millar, 1972) también son capaces de degradar cianuro. Ha sido demostrada la habilidad del ***Fusarium solani*** de utilizar el cianuro como nutriente para su crecimiento. El ***Fusarium oxysporum*** también posee tolerancia al KCN para transformarlo en formamida (Barclay *et al.*, 1998 (2)). El ***Fusarium lateritium*** presenta tolerancia al cianuro por la inducción de la enzima cianuro hidratasa en presencia de cianuro (Barclay *et al.*, 1998 (2)).

Las enzimas degradadoras de cianuro en ***Trichoderma spp***, también han sido reportadas. Se ha encontrado que una variedad de cepas de ***Trichoderma harzianum***, poseen enzimas capaces de degradar cianuro (Ezzi and Lynch, 2002).

También se ha examinado la desintoxicación de cianuro por algas. Se han encontrado algunas especies con capacidad para degradar cianuro: ***Arthrospira maxima***, ***Chlorella sp.*** and ***Scenedesmus obliquus*** (Gurbuz,2003). La bioquímica de degradación del cianuro y los microorganismos involucrados se reportan en la literatura (Ver Tabla 1).

**Tabla 1.** Microorganismos degradadores de cianuro (Dubey *et al.*, 1995).

---

<b>1. Cyanide monooxygenase</b> (e.g. <i>Pseudomonas</i> sp.; Harris & Knowles 1983b; Dorr & Knowles 1989)
$\text{HCN} + \text{O}_2 + \text{H}^+ + \text{NADPH} \rightarrow \text{HOCN} + \text{NADP}^+ + \text{H}_2\text{O}$
<b>2. Cyanide dioxygenase</b> (e.g. <i>P. fluorescens</i> , <i>Bacillus pumilus</i> , <i>P. cereus</i> ; Harris & Knowles 1983a)
$\text{HCN} + \text{O}_2 + 2\text{H}^+ + \text{NADPH} \rightarrow \text{CO}_2 + \text{NH}_3 + \text{NADP}^+$
<b>3. Cyanase</b> (e.g. <i>Escherichia coli</i> ; Taussig 1960, 1965; Dorr & Knowles 1989; Kunz & Nagappan 1989)
$\text{HOCN} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CO}_2 + \text{NH}_3$
<b>4. Cyanide hydratase</b> (e.g. snow moulds and common pathogenic fungi; Fry & Myers 1981)
$\text{HCN} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HCONH}_2$
<b>5. Cyanidase</b> (e.g. <i>Alcaligenes xylosoxidans denitrificans</i> ; Ingvorsen <i>et al.</i> 1991)
$\text{HCN} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HCOOH} + \text{NH}_3$
<b>6. Nitrilase</b> (e.g. <i>Klebsiella ozaenae</i> , <i>Nocardia</i> sp., <i>Arthrobacter</i> sp., <i>P. aeruginosa</i> ; Harper 1985; Bandyopadhyay <i>et al.</i> 1986; McBride <i>et al.</i> 1986; Nawaz <i>et al.</i> 1991)
Bromoxynil (nitrile) $\rightarrow$ 3, 5-Dibromo, 4-Hydroxy benzoic acid
<b>7. Rhodanese</b> e.g. <i>B. subtilis</i> , <i>Thiobacillus denitrificans</i> , <i>B. stearothersmophilus</i> ; Bowen <i>et al.</i> 1965; Atkinson 1975)
Cyanide $\rightarrow$ Thiocyanate + sulphite
<b>8. Cyanoalanine synthase</b> (e.g. <i>B. megaterium</i> ; Dunnill & Fowden 1965; Castric & Strobel 1969)
Cyanide $\rightarrow$ $\beta$ -Cyanoalanine

---

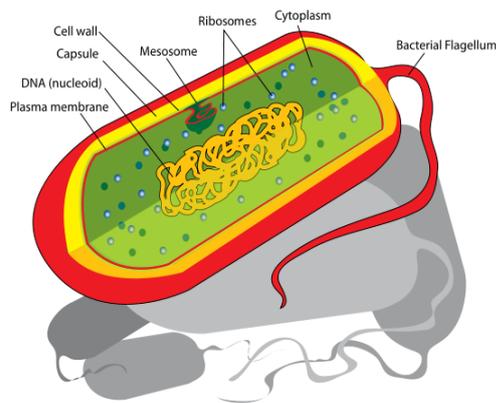
## 1.3 TIPOS DE MICROORGANISMOS

### 1.3.1 Bacterias

Son microorganismos eucariotas, algunas presentan cápsula y otras son capaces de evolucionar a esporas, formas viables capaces de resistir condiciones extremas. Sus dimensiones son muy reducidas, unas 2 micras de ancho por 7-8 de longitud en la de forma cilíndrica de tamaño medio; aunque son muy frecuentes las especies de 0,5-1,5 micras. (Anónimo <sup>5</sup>,2006). Pueden presentar flagelos generalmente rígidos, implantados en la membrana mediante un corpúsculo basal.

Pueden poseer también, fimbrias o pili muy numerosos y cortos, que pueden servir como pelos sexuales para el paso de ADN de una célula a otra. Poseen ARN y ribosomas característicos, para la síntesis de proteínas. La pared celular es rígida y con moléculas exclusivas de bacterias. El citoplasma presenta un aspecto viscoso, y en su zona central aparece un nucleoide que contiene la mayor parte del ADN bacteriano, y en algunas bacterias aparecen fragmentos circulares de ADN con información genética, dispersos por el citoplasma: son los plásmidos (Ver Figura 3).

**Figura 3.** Estructura interna de las bacterias (Anónimo <sup>5</sup>, 2006).



### 1.3.1.1 Crecimiento

El éxito evolutivo de las bacterias se debe en parte a su versatilidad metabólica. Todos los mecanismos posibles de obtención de materia y energía podemos encontrarlos en ellas.

Dependiendo de la fuente de energía y de carbono, las bacterias se pueden clasificar así:

- *Quimioheterótrofas*: utilizan un compuesto químico como fuente de carbono , y a su vez, este mismo compuesto es la fuente de energía.
- *Quimioautótrofas*: utilizan compuestos inorgánicos reducidos como fuente de energía y el CO<sub>2</sub> como fuente de carbono. Como por ejemplo, *Nitrobacter*, *Thiobacillus*.

- *Fotoautótrofas*: utilizan la luz como fuente de energía y el CO<sub>2</sub> como fuente de carbono. Bacterias purpúreas.
- *Fotoheterótrofas*: utilizan la luz como fuente de energía y biomoléculas como fuente de carbono. Ejemplos como *Rodospirillum* y *Cloroflexus*. (Anónimo <sup>4</sup>, 2006).

### 1.3.1.2 Clasificación morfológica de bacterias

**1.3.1.2.1 Cocos:** son bacterias que tienen forma circular, cuando se observan al microscopio. De acuerdo a la forma en que se agrupan se clasifican en: diplococos (cocos en parejas), estafilococos (cocos en racimos), estreptococos (cocos en cadena), tetracocos (cocos en cuatro). (Ver Figura 4)

**1.3.1.2.2 Bacilos:** son bacterias que tienen forma de bastón, cuando se observan al microscopio (Ver Figura 4).

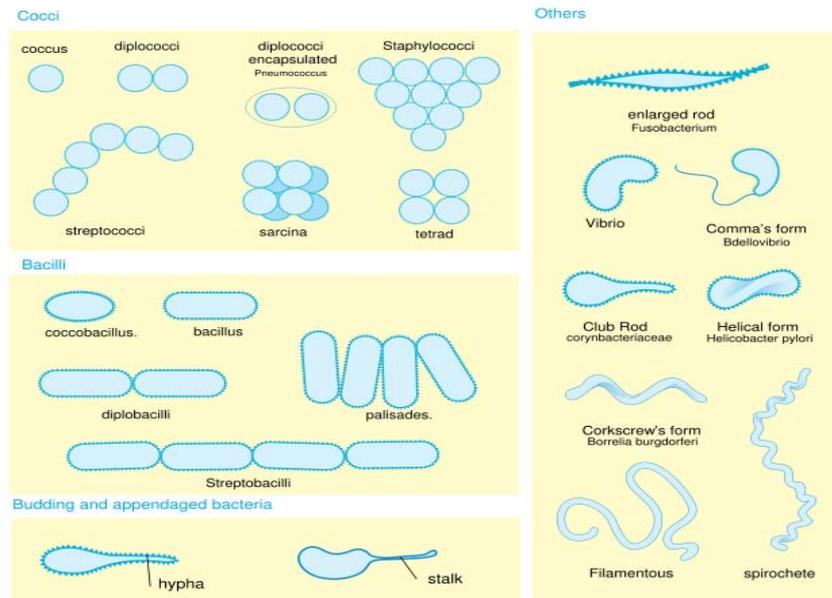
Pueden ser muy cortos aguzados en los extremos (*Bacilos fusiformes*), arrollados en hélice (*Espirilos*), son bacterias flageladas de forma helicoidal o de espiral, cortos e incurvados (*Vibrios o Vibriones*) (Anónimo <sup>5</sup>, 2006).

### 1.3.2 Hongos

Los hongos son organismos eucarióticos (con células nucleadas) que realizan una digestión externa de sus alimentos, secretando enzimas y absorbiendo luego las moléculas disueltas resultantes de la digestión (Anónimo <sup>6</sup>, 2006).

Es decir, se alimentan osmotróficamente como las plantas absorbiendo sustancias disueltas pero a diferencia de aquéllas, los nutrientes que toman son orgánicos (Anónimo <sup>6</sup>, 2006).

**Figura 4.** Clasificación morfológica de las bacterias (Anónimo <sup>5</sup>, 2006).



Los hongos son organismos unicelulares, pluricelulares o dimórficos; carecen de clorofila, por lo tanto son heterótrofos, es decir, obtienen sus alimentos por absorción; el componente principal de sus paredes celulares es la quitina. El talo o cuerpo vegetativo, en la mayoría de los hongos, es filamentoso, está constituido por filamentos delgados llamados hifas, las que presentan crecimiento apical y en conjunto integran el micelio (Anónimo <sup>6</sup>, 2006).

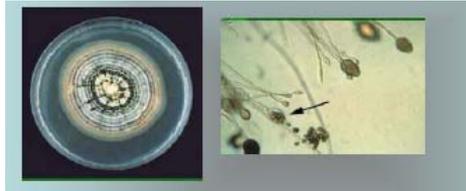
### 1.3.2.1 Crecimiento

- Suelen crecer en medios de cultivo (suelos) ácidos (6,2 – 6,5 pH), pero también en medio alcalino. Los medios de cultivo en el laboratorio: SDA, PDA, medios especiales.
- Son heterótrofos, por lo que necesitan de C y N orgánico.
- Temperatura: es variable. La mayoría crece a 30 °C, otros no a más de 30°C y otros a 37°C.
- Tiempo: variable, desde unos días a varios meses (Anónimo <sup>7</sup>, 2006).

### 1.3.2.2 Clasificación de los hongos según su morfología

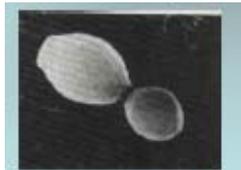
- Filamentosos: Tienen filamentos (Ver Figura 5).

**Figura 5.** Tipos de Hongos filamentosos (Anónimo <sup>7</sup>, 2006).



- Levaduriformes: Sin filamentos (Ver Figura 6).

**Figura 6.** Tipos de Hongos levaduriformes (Anónimo <sup>7</sup>, 2006).



### 1.3.2.3 Estructura Fúngica

El cuerpo vegetativo es el talo que está formado por hifas que son filamentos microscópicos que se ramifican. El conjunto de hifas también se llama micelio. Las hifas están formadas por una pared delgada en forma de cilindro hueco transparente, tapizada o llena en su interior por una masa protoplasmática en la que están todos los órganos más el núcleo (Anónimo <sup>7</sup>, 2006).

Se pueden clasificar los hongos según la cantidad de masa protoplasmática que haya separada por unos tabiques o septos. Si las cantidades de masa son semejantes, es decir, si los septos se disponen a distancias regulares, son hongos septados, sinfonados o tabicados (Anónimo <sup>7</sup>, 2006).

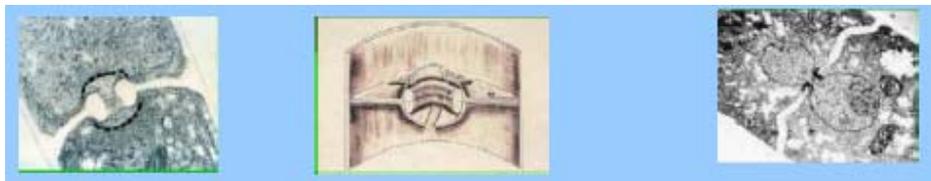
Si las cantidades de masa entre los septos son muy inconstantes, es decir, si los septos se encuentran a distancias irregulares, son hongos no septados, no sinfonados, cenocíticos (Ver Figura 7) (Anónimo <sup>7</sup>, 2006).

Los hongos septados se consideran más evolucionados que los otros, por lo que se les llama hongos superiores. Los hongos no septados son los hongos inferiores.

Los septos pueden ser de 2 tipos:

- *Primarios*: Se van formando conforme el hongo crece multiplicándose. Se relacionan con la división celular.
- *Adventicios*: Sólo se diferencian en que se originan debido a la concentración de masa protoplasmática: la separan.

**Figura 7.** Septos en un hongo (Anónimo <sup>7</sup>, 2006).



#### **1.3.2.4 Moho dematiáceo *Exophiala spp.***

Los hongos dematiáceos son un grupo heterogéneo de organismos polimórficos unificados por la presencia de melanina o pigmentos similares (dihidroxi-naftaleno melanina) en la pared de las células vegetativas, conidias o en ambas, que da lugar a colonias de color negro oliváceo u oscuro. Estos hongos saprofitos están ampliamente distribuidos en la naturaleza, particularmente en el suelo, madera y restos vegetales en descomposición.

Las llamadas levaduras negras (black yeasts) son un grupo de hongos dematiáceos representado por géneros anamorfos tan conocidos como *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Exophiala*, *Rhinoctadiella*, etc.

La mayoría de estas especies se reconocen por sus colonias levaduriformes, pequeñas al principio, lisas, húmedas, de color verde claro o beige, que con el tiempo aumentan de tamaño y se tornan de color marrón, oliváceo o negro, adquiriendo un aspecto seco a veces aterciopelado o con borde micelial. (García *et al*; 2006)

### 1.3.3 Levaduras

La mayoría de las levaduras son mesófilas, con una temperatura máxima de crecimiento entre 24 y 48°C. Solo unas pocas (2%) son psicrófilas con una temperatura máxima de crecimiento por debajo de 24°C, pero mayor es el número de las levaduras que tienen la temperatura óptima de crecimiento por encima de 20°C. No hay levaduras que puedan crecer a 50°C y solamente unas pocas pueden desarrollar cerca de 0°C, entre las que se encuentran *Yarrowia lipolytica*, *Debaryomyces hansenii* y *Pichia membranaefaciens*. Por otra parte, *Kluyveromyces marxianus* crece a 48°C, mientras que otras de los molinos azucareros son capaces de proliferar por sobre los 40°C, entre ellas *Pichia polymorpha*, *Geotrichum capitatum*, *Saccharomyces cerevisiae* y especies de *Candida* y *Debaryomyces*. En general, la presencia de etanol o bicarbonato aumenta la temperatura mínima de crecimiento (Carrillo, 2006).

La mayoría de las levaduras toleran un rango de pH entre 3 y 10, pero prefieren un medio ligeramente ácido con un pH de 4,5 a 6,5. Sin embargo *Issatchenkia orientalis*, *P. membranaefaciens*, *Dekkera intermedia* y *Saccharomyces exiguus* pueden crecer a 1,3-1,7 si el acidulante es un ácido inorgánico. Adicionalmente, las levaduras basidiomicéticas *Rhodotorula* y *Cryptococcus* son especialmente

tolerantes a los medios alcalinos, mientras que *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* y *Dekkera* no crecen a pH mayor que 8 (ver Figura 8).

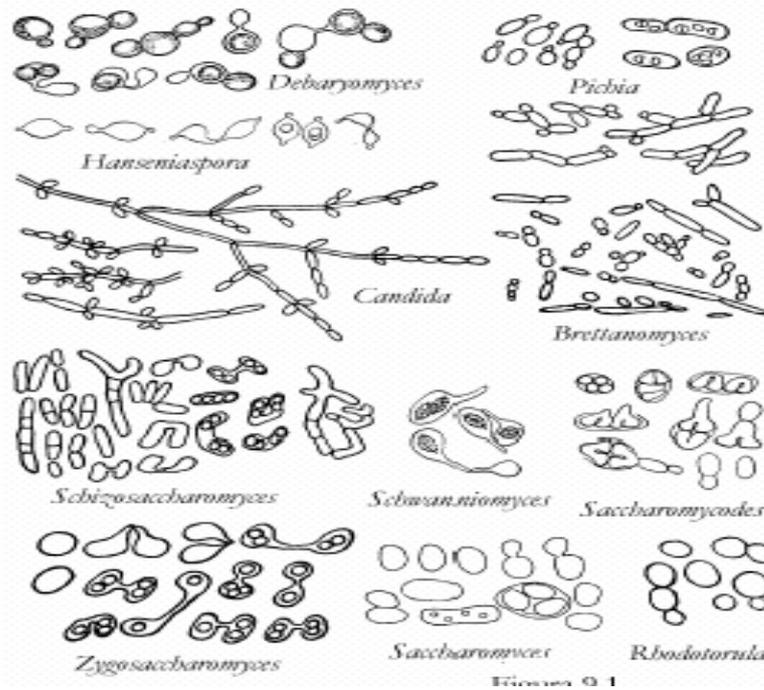
Las levaduras son organismos aerobios y aunque unas especies son fermentadoras otras no lo son como por ejemplo los géneros *Cryptococcus* y *Rhodotorula*. *Saccharomyces* y unos pocos géneros más, son fermentadores energéticos de los azúcares pero pronto detienen su crecimiento y multiplicación por falta de oxígeno. *Dekkera* y su anamorfo *Brettanomyces*, *Zygosaccharomyces bailii* y algunas otras, fermentan glucosa más rápidamente bajo condiciones aerobias que anaerobias. Solo unos pocos glúcidos, principalmente hexosas y oligosacáridos, pueden ser fermentados por las levaduras, pero el rango de compuestos que pueden asimilar es mucho más amplio incluyendo pentosas, alcoholes, ácidos orgánicos, aminoácidos y glicósidos. Solo *Schwanniomyces*, *Lipomyces* y *Saccharomyces diastaticus* (una variedad de *S. cerevisiae*) pueden hidrolizar almidón (Carrillo, 2006).

La utilización de nitratos está confinada a ciertas especies de levaduras, mientras que las fuentes comunes de nitrógeno son amonio, urea y aminoácidos. Muchas especies sintetizan todas las vitaminas necesarias pero otras requieren biotina y otros compuestos. *Dekkera* necesita altas concentraciones de tiamina y *Schizosaccharomyces octosporus* de adenina, para un buen crecimiento.

#### **1.3.3.1 Formación de hifas, blastoconidias, clamidosporas y artrosporas en las levaduras**

La formación de hifas, blastoconidias, clamidosporas o artrosporas por parte de las levaduras constituye una característica morfológica de gran importancia para la identificación de algunas especies de levadura.

**Figura 8.** Tipos de Levaduras (Carrillo, 2006).



Ante la presencia de estructuras con aspecto de hifas, lo primero que hay que determinar es si se trata de pseudohifas (resultantes del proceso de formación de blastoconidias y, por tanto, con puntos regulares de estrechamiento) o, por el contrario, son verdaderas hifas que se fragmentan en artroconidias.

Si el desarrollo en medios especiales revela la presencia de pseudohifas y blastoconidias, la levadura a identificar pertenece a alguna especie del género *Candida*. Si por el contrario, revela verdaderas hifas y artroconidias, lo más probable es que se trate de especies de *Trichosporon*, *Geotrichum* o *Blastoschizomyces* (Ver Figura 8) (Carrillo, 2006).

*Trichosporon* y *Blastoschizomyces* producen tanto artroconidias como blastoconidias; estas últimas nacen en brotes de los ángulos de las artroconidias adquiriendo la forma característica de “oreja de conejo” (Ver Figura 9). Las especies del género *Geotrichum* también producen blastoconidias a partir del

ángulo de la artroconidia, pero, en este caso, forman una estructura denominada “palo de hockey” (Ver Figura 10). *C. tropicalis* produce pequeñas cantidades de blastoconidias, muy esparcidas o en pequeños grupos a lo largo de las hifas. Sin embargo, *C. parapsilosis*, *C. kefyr* y *C. krusei* se ordenan a lo largo de una corriente de blastoconidias, siendo esta la característica que permite su identificación; además, algunas cepas pueden producir hifas gigantes (Carrillo, 2006).

Las clamidosporas son formas de resistencia, redondas u ovals, de 6-12  $\mu\text{m}$  de diámetro y pared gruesa, con aspecto de esporas laterales o terminales. Su producción es característica y diagnóstica de *C. albicans* (Ver Figura 11). También puede hacerse una identificación presuntiva de esta especie si se observa la formación de grupos compactos de blastoconidias, a intervalos regulares, a lo largo de la pseudohifa (Carrillo, 2006).

**Figura 9.** Blastoconidias “Oreja de conejo” (Carrillo, 2006).

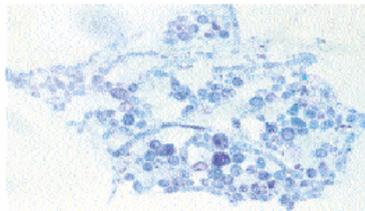


Figura 11.9. Aspecto microscópico de *Trichosporon beigeli* (x1.000) que muestra arthrosporas y Blastosporas.

**Figura 10.** Blastoconidias “Palo de Jockey” (Carrillo, 2006).



Figura 11.10. Aspecto microscópico de *Geotrichum candidum* (x1.000).

**Figura 11.** Clamidosporas (Carrillo, 2006).



Figura 11.11. Formación de pseudomicelio y clamidosporas por *Candida albicans* (x400).

### 1.3.3.2 *Rodhotorula mucilaginosa*

EL género *Rodhotorula* es muy abundante en un gran número de fuentes naturales y superficies húmedas. Se caracteriza por producir colonias de color rojo coral, debido a la presencia de un pigmento carotenoide y por su incapacidad para formar hifas o pseudohifas. Produce ureasa y carece de actividad fermentativa.

La diferenciación de las distintas especies del género *Rodhotorula* se basa principalmente en la asimilación y reducción de nitratos (positiva para *R. glutinis* y negativa para *R. mucilaginosa* y *minuta*). Crecimiento a 37 °C (positivo para *mucilaginosa* y variable para *glutinis* y *minuta*).

La *Rodhotorula* se asemeja a *Cryptococcus* en su velocidad de crecimiento, la morfología de las colonias, el tamaño y la forma de las células, la posible presencia de cápsula, la producción de ureasa y la carencia de actividad

fermentativa, pero se diferencia por la capacidad de asimilar el inositol. (García; *et al*, 2006)

## **1.4 PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS**

### **1.4.1 Bacterias**

#### **1.4.1.1 Tinción de Gram**

La pared celular de las bacterias está compuesta por peptidoglicano, que es un polímero complejo de aminoazúcares y diferentes tipos de proteínas, dependiendo del tipo de bacteria pueden además encontrarse lípidos, polisacáridos y otros componentes ácidos, lipoprotéicos y lipopolisacáridos; dicha composición de la pared es utilizada para diferenciar dos tipos de bacterias, de acuerdo a su respuesta a la tinción según demostró el científico danés Gram de donde se reconocen las bacterias Gram positivas y las Gram negativas (Anónimo <sup>8</sup>, 2006).

- Gram positivas: no se lavan con etanol, retienen el colorante violeta y se observan de ese color, la pared esta formada por una capa homogénea y espesa de peptidoglicano, polisacáridos y poco o ningún lípido.
- Gram negativas: se decoloran cuando se lavan con etanol, no retienen el colorante violeta y se observan rosadas, la pared esta formada por una capa delgada de peptidoglicano y otra externa con lipoproteínas y polisacáridos (Anónimo <sup>8</sup>, 2006).

#### **1.4.1.2 Prueba de la oxidasa**

La identificación de las bacterias puede iniciarse con la prueba de la oxidasa. Cualquier organismo que dé positivo en esta prueba queda excluido de la familia *Enterobacteriaceae*, cuyos miembros no poseen la enzima citocromo c oxidasa (Anónimo<sup>8</sup>, 2006). En caso positivo el papel cambia de color pasando a púrpura y negro en 10-20 segundos, como consecuencia de que el reactivo se oxida en presencia de citocromo c oxidasa formándose azul de Wuster. En caso negativo la tira de papel no cambia de color (Koneman, 1997).

Los microorganismos oxidasa positiva pueden clasificarse en fermentadores de glucosa y no fermentadores; por ello, estos dos grupos de microorganismos se identifican mediante la prueba de utilización de la glucosa (oxidativa o fermentativa) (Anónimo<sup>8</sup>, 2006).

#### **1.4.1.3 Agar Mc Conkey**

Al ser un medio selectivo para microorganismos Gram negativos, en donde pueden crecer *Pseudomonas*, y cuyas características de colonias lactosa negativa no cambian la coloración del medio a amarillo. La importancia de este medio es la de poder identificar las colonias aisladas lactosa negativas, particulares en bacterias no fermentadoras como lo son las del género *Pseudomonas*. (Jaramillo *et al.*, 2006).

#### **1.4.1.4 Agar Cetrimide**

La siembra directa sobre este medio, permite comprobar si efectivamente se puedan aislar colonias de *Pseudomonas*, pues tiene componentes que favorecen su aislamiento y es un medio común para la recuperación del género. (Jaramillo, *et al.*; 2006).

#### **1.4.1.5 Producción de pigmentos**

##### **1.4.1.5.1 Agar King A y King B**

Es una prueba útil para poner de manifiesto la formación de compuestos pigmentados por microorganismos no fermentadores (Anónimo<sup>9</sup>,2006).

La presencia de *Pseudomonas aeruginosa* sobre la placa de agar King B se manifiesta por la aparición de un pigmento amarillo fluorescente (fluoresceína o pioverdina) y un pigmento azul (piocianina) sobre la placa de agar King A. La composición de sales de cada uno de estos dos medios potencia la producción de uno de los pigmentos e inhibe la del otro (Koneman, 1997).

##### **1.4.1.6 Prueba de la catalasa**

La catalasa es una enzima que cataliza la descomposición el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. Se encuentra presente en la mayoría de los microorganismos aeróbicos y anaeróbicos facultativos, excluyendo los *estreptococos*. La prueba se considera positiva cuando se produce una efervescencia rápida con desprendimiento de burbujas: la enzima catalasa convierte el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular (Koneman, 1997).

Esta prueba se emplea para diferenciar los géneros *Micrococcus* y *Staphylococcus* (catalasa positivo) del género *Streptococcus* (catalasa negativo) (Anónimo<sup>8</sup>,2006).

#### **1.4.1.7 Baird Parker medio base**

Medio de alta especificidad diagnóstica, selectivo y diferencial debido al telurito de potasio y al cloruro de litio, los cuales inhiben el desarrollo de la flora acompañante y la yema de huevo permite demostrar la actividad lecitinásica. Los *estafilococos* coagulasa positiva reducen el telurito a telurio y originan colonias de color grisáceo-negro, y dan reacción sobre la yema de huevo produciendo alrededor de la colonia una zona opaca que a menudo tiene una zona clara mas externa. (Anónimo<sup>11</sup>, 2006).

#### **1.4.1.8 Agar Manitol salado**

Medio de cultivo selectivo y diferencial, utilizado para el aislamiento y diferenciación de estafilococos. Es un medio altamente selectivo debido a su alta concentración salina. Los estafilococos coagulasa positiva hidrolizan el manitol acidificando el medio; las colonias aparecen rodeadas de una zona amarilla brillante. Los estafilococos coagulasa negativos, presentan colonias rodeadas de una zona roja o púrpura. (Anónimo<sup>10</sup>, 2006).

### **1.4.2 Hongos**

#### **1.4.2.1 Tinción en fresco**

También conocido como montaje húmedo, consiste en colocar la muestra a examinar entre un porta y un cubreobjetos estériles. El examen en fresco se dirige principalmente a la detección de microorganismos directamente en las muestras, a cuantificar su concentración, a obtener alguna información sobre su morfología y, con frecuencia, a determinar la movilidad de una especie aislada. El montaje con azul de lactofenol es de gran utilidad para el estudio de estructuras fúngicas, y el procedimiento consiste en adicionar una gota del colorante sobre la muestra y

cubrirla con el cubreobjetos y de esta forma observar estructuras especialmente fúngicas en el microscopio (Anónimo<sup>12</sup>, 2006).

#### 1.4.2.2 Sistema semiautomático API 20C Aux

Es un método de asimilación de nutrientes. La galería API 20 C AUX (bioMérieux) se compone de 20 cúpulas con sustratos deshidratados que permiten realizar 19 pruebas de asimilación (Ver Figura 12). La lectura de estas reacciones se hace por comparación con un control de crecimiento y la identificación se obtiene, a partir de un código numérico, mediante un catálogo analítico o un programa informático. (Linares *et al.*, 2006).

**Figura 12.** Método Bioquímico API 20C AUX (Linares *et al.*; 2006).



Figura 11.25. Sistema API 20C AUX (bioMérieux).

## **2. METODOLOGÍA**

### **2.1 MICROORGANISMO.**

Se trabajó con el efluente de una empresa de recubrimientos metálicos ubicada en el Valle de Aburrá, de donde se aislaron los microorganismos degradadores de cianuro; estos se caracterizaron bioquímicamente cuando alcanzaron su purificación, que fue de acuerdo con la presión de selección al aumentar la concentración de cianuro en el medio de cultivo sólido.

### **2.2 MEDIO DE CULTIVO.**

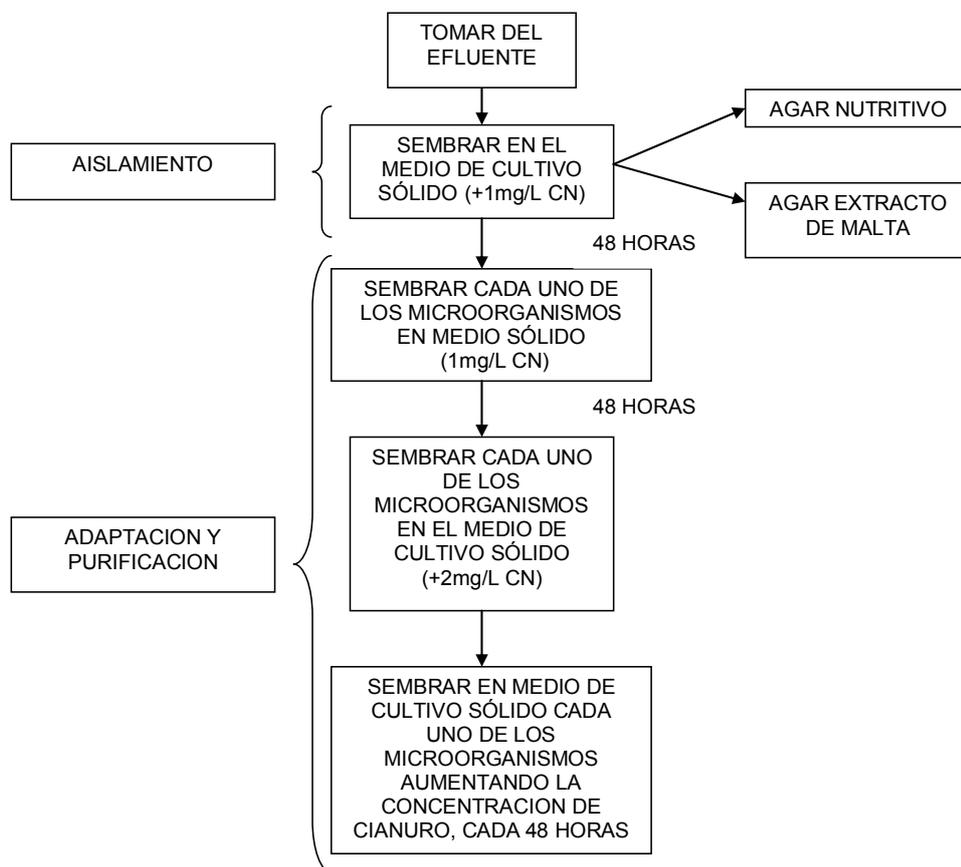
Para el cultivo en medio líquido se utilizó una solución buffer que mantuvo el pH en un valor de  $9.8 \pm 0.2$ , la cual contenía: 21g/L de carbonato de sodio, 9g/L de bicarbonato de sodio, 5g/L de NaCl y 0.5 g/L de  $KNO_3$  (Sorokin *et al.*, 2001). El medio se enriqueció con 1g/L de glucosa como fuente de carbono, 2g/L de Extracto de Malta, 1mg/L de CN como fuente de carbono y nitrógeno para el aislamiento y se aumentó gradualmente para la adaptación y purificación (Gil-Pavas *et al.*, 2005). Se esterilizó por filtración tanto el medio como la solución de cianuro.

Para el cultivo en medio sólido se utilizó Agar Extracto de Malta para los hongos y Agar Nutritivo para las bacterias, suplementado con diferentes concentraciones de cianuro, iniciando en 1 ppm, 2ppm, 3ppm, 5ppm, 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm y así sucesivamente hasta llegar a la concentración máxima de cianuro.

### 2.3 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL PARA EL AISLAMIENTO, ADAPTACIÓN Y PURIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS DEGRADADORES DE CIANURO.

Para realizar el aislamiento, la adaptación y purificación de los microorganismos con potencial para la degradación de cianuro se llevó a cabo el procedimiento de presión de selección que se describe a continuación (Ver Figura 13):

**Figura 13.** Procedimiento para el aislamiento, adaptación y purificación de los microorganismos degradadores de cianuro



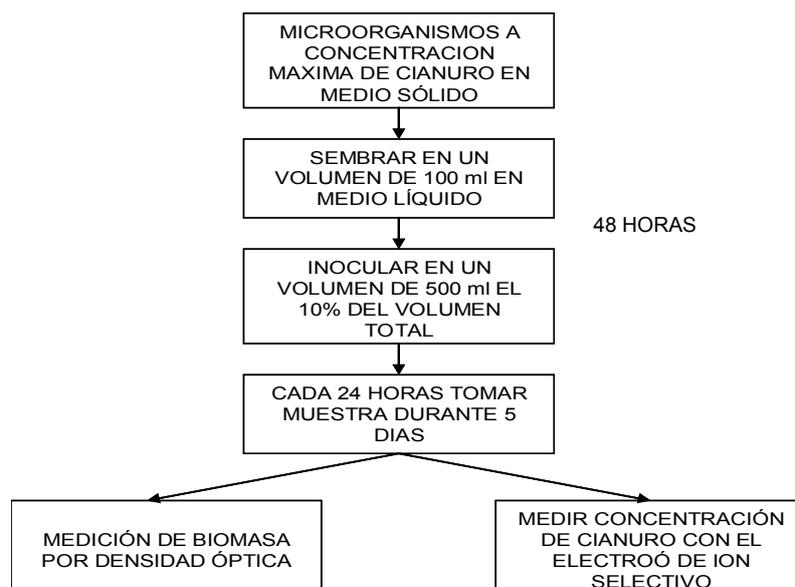
Se realizó el mismo procedimiento aumentando la concentración de cianuro cada 48 horas, por duplicado, hasta encontrar la máxima concentración a la cual los microorganismos se pudieron adaptar.

Después de tener cada microorganismo aislado totalmente y adaptado a la concentración máxima de cianuro, se sembró cada uno en medio de cultivo líquido, para garantizar la adaptación en este medio y así poder realizar las cinéticas de crecimiento.

## 2.4 SELECCIÓN DE LOS MICROORGANISMOS CON MAYOR POTENCIAL DE DEGRADACIÓN DE CIANURO

Para seleccionar los microorganismos con mayor potencial de degradación de cianuro se hizo un cultivo en medio líquido con cada uno de los microorganismos adaptados, siguiendo el procedimiento que se describe a continuación (Ver Figura 14):

**Figura 14.** Procedimiento para la selección de los microorganismos con mayor potencial biodegradador



Los microorganismos se seleccionaron con base en los resultados obtenidos en la cinética preliminar.

## **2.5 CINÉTICAS DE CRECIMIENTO Y DEGRADACIÓN DE CIANURO DE LOS MICROORGANISMOS SELECCIONADOS**

Las cinéticas de crecimiento celular y degradación de cianuro de los microorganismos seleccionados y adaptados a la máxima concentración de cianuro asimilada, se agitaron a 200rpm, a una temperatura de 30°C, por triplicado durante cinco días, tomando muestra cada 12 horas (Ver Figura 15). Se realizó para cada uno de los microorganismos un diseño de experimentos unifactorial, donde el factor era el tiempo, con 10 niveles y la variable respuesta la concentración de cianuro.

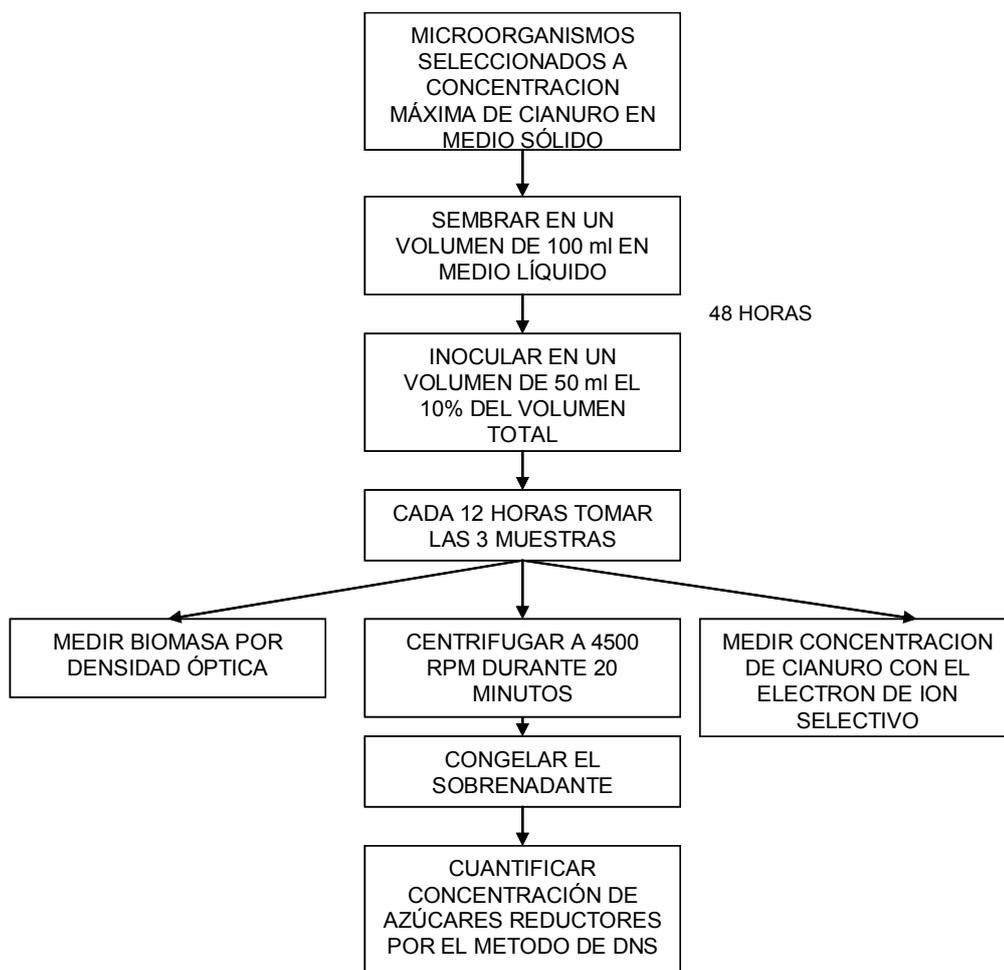
Además, para la variable de respuesta velocidad de degradación de cianuro se hizo otro análisis estadístico donde el factor bajo estudio era el tipo de microorganismo con 4 niveles. A estos resultados se les realizó un análisis de varianza, con un nivel de confianza del 95%, en el software Statgraphics y, adicionalmente, con los resultados de crecimiento celular se realizaron las linealizaciones para determinar las velocidades máximas de crecimiento de cada uno de los microorganismos.

**Figura 15.** Cinéticas de los microorganismos



Se tuvo en cuenta un control negativo (sin células), para verificar que no hubiera cambios en la concentración de cianuro con el tiempo, debido a la volatilización. Para realizar las cinéticas de los microorganismos seleccionados se llevo a cabo el siguiente procedimiento (Ver Figura 16):

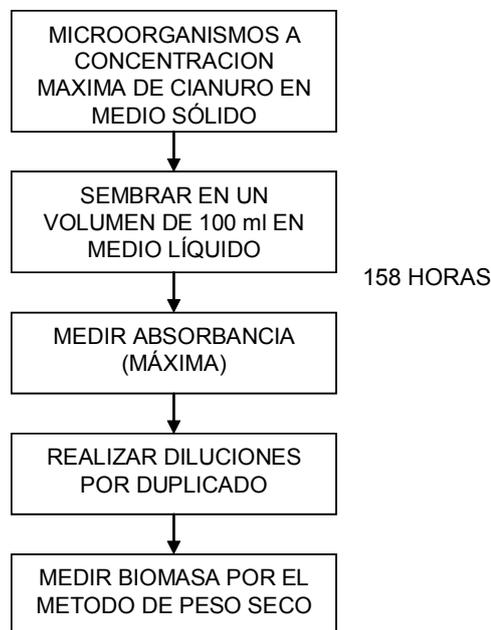
**Figura 16.** Procedimiento para las cinéticas de crecimiento y biodegradación de los microorganismos seleccionados



## 2.6 MEDICIÓN DE LA BIOMASA.

En los diferentes cultivos, la medición de crecimiento microbiano (producción de biomasa), se realizó por densidad óptica, leyendo la absorbancia a una longitud de onda de 540nm (Camargo y Ossa, 2005). Para relacionar este resultado con la concentración de cianuro por peso seco, se hizo una curva de calibración así (Ver Figura 17):

**Figura 17.** Procedimiento para realizar la curva de calibración para la medición de biomasa



## 2.7 MEDICIÓN DEL CONSUMO DE GLUCOSA.

La determinación del consumo de glucosa se realizó por el método de DNS, que se basa en la medición de los azúcares reductores libres por medio de la reducción del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), formando un compuesto nitroaminado amarillo, cuya densidad óptica es proporcional a la concentración de los grupos reductores (Miller, 1959).

## **2.8 MEDICIÓN DEL CIANURO.**

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

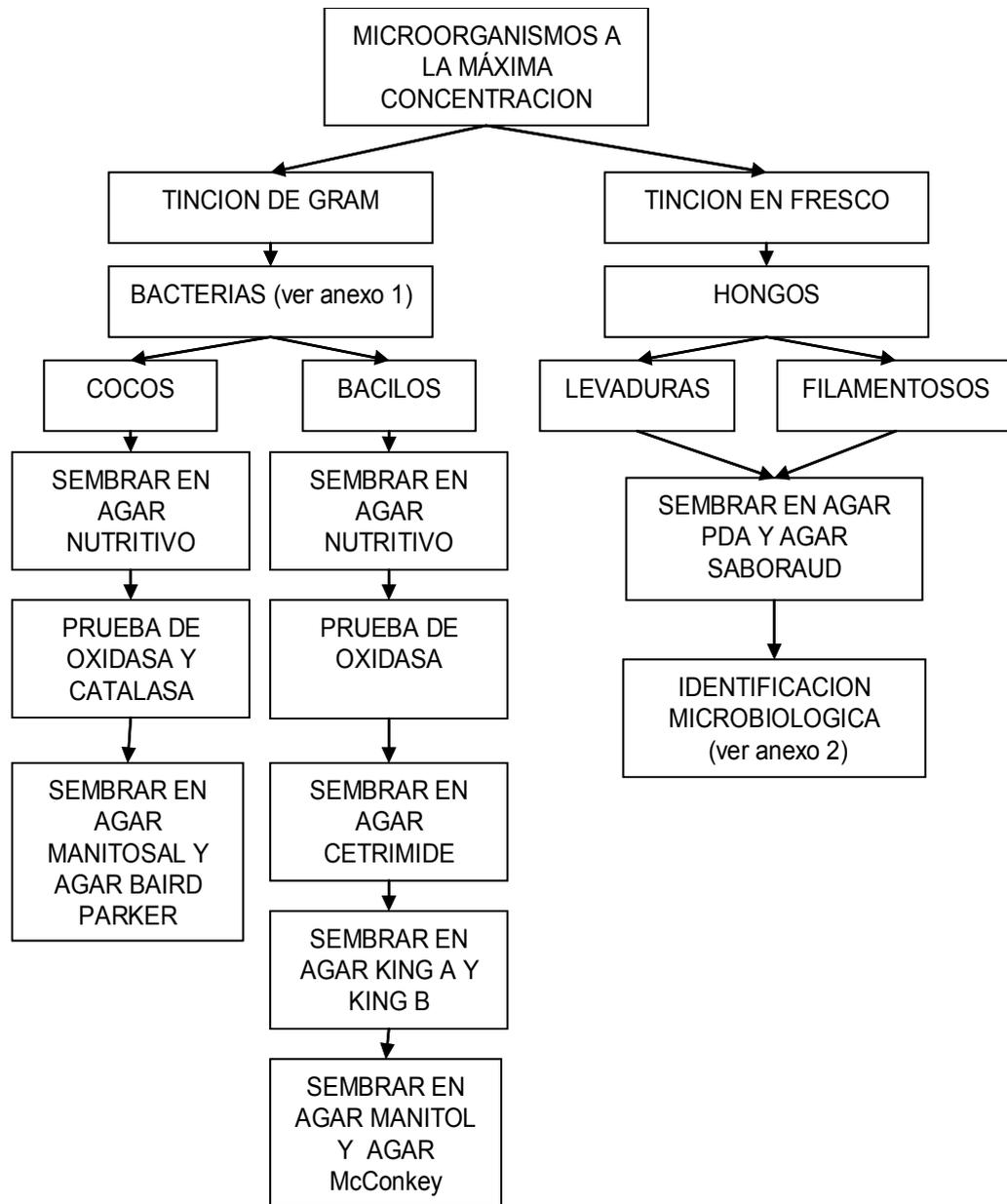
Para la determinación de la curva de calibración se realizaron varias soluciones estándar de cianuro de potasio de concentraciones  $10^{-2}$  a  $10^{-6}$  M. Una solución  $10^{-2}$  M de cianuro de potasio es preparada pesando 0.6511 g de KCN por litro. Las demás soluciones estándar son preparadas 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 fueron 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 graficadas contra los datos de concentración de CN, en una escala semilogarítmica (Camargo y Ossa, 2005).

## **2.9 IDENTIFICACION Y CARACTERIZACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS QUE CRECIERON A LA MÁXIMA CONCENTRACIÓN DE CIANURO**

Para la caracterización bioquímica, fisiológica y morfológica de los microorganismos que crecieron a la concentración máxima de cianuro, se siguió el procedimiento descrito (Ver Figura 18):

**Figura 18.** Procedimiento para la identificación y la caracterización de los microorganismos



### **3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **3.1 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS DEGRADADORES DE CIANURO**

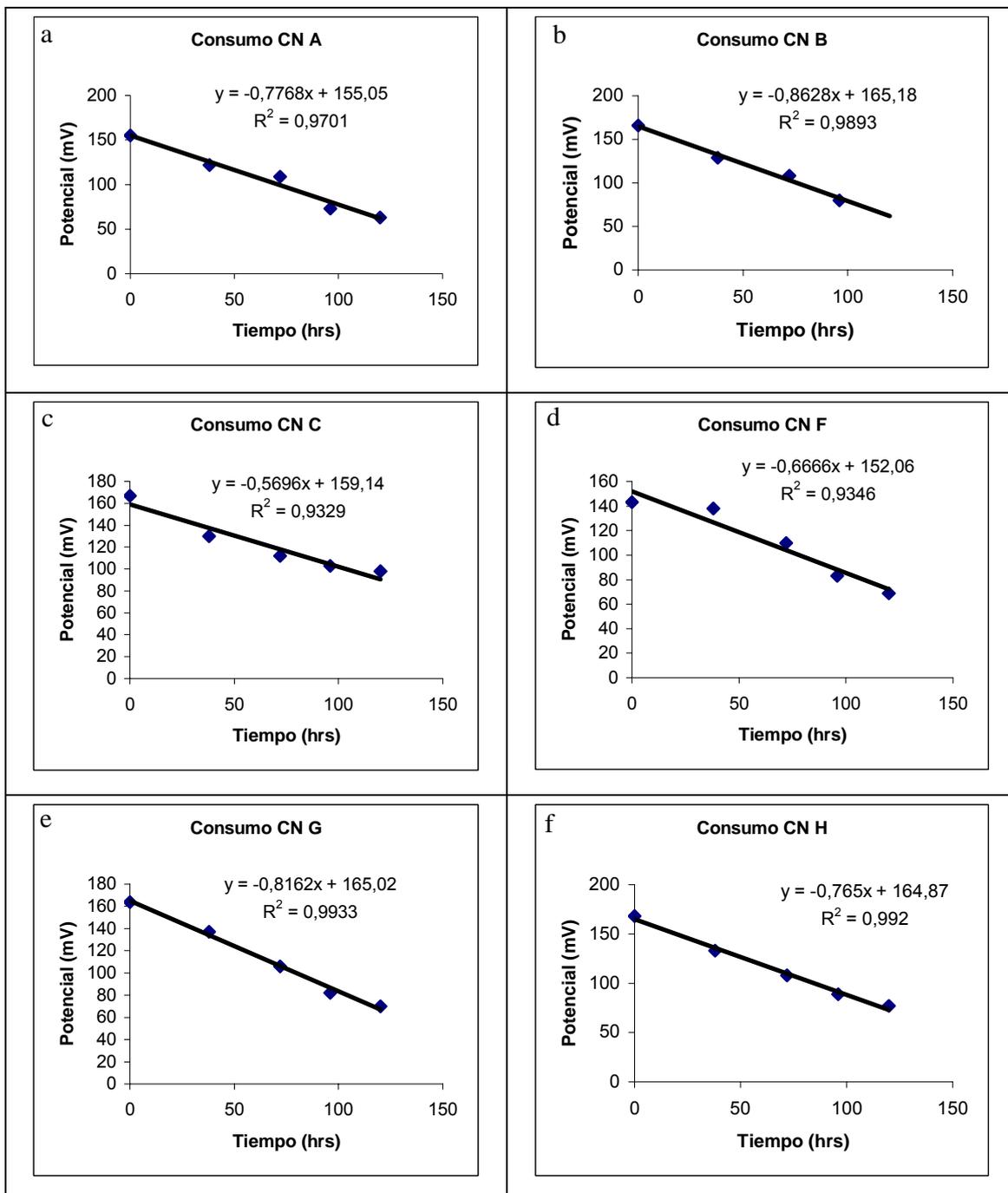
De los 15 microorganismos que se aislaron inicialmente con una concentración de cianuro de 1 ppm, se lograron aislar 8 microorganismos, de los cuales 6 resultaron ser diferentes entre sí y lograron adaptarse hasta una concentración de cianuro de 150 ppm, los cuales se nombraron: A, B, C, F, G y H.

Al aumentar la concentración de cianuro en el medio de cultivo sólido a 200mg/L el crecimiento fue muy lento, razón por la cual se decidió trabajar a una concentración aproximadamente de 150mg/L, en las suspensiones celulares.

#### **3.2 ENSAYO PRELIMINAR DE SELECCIÓN DE LOS MICROORGANISMOS CON MAYORES VELOCIDADES DE DEGRADACIÓN**

Se realizó un ensayo preliminar de selección de los microorganismos que crecieron a la máxima concentración de cianuro, con el fin de determinar aquellos que presentaron una mayor velocidad de degradación y con estos últimos proceder a realizar las cinéticas de degradación de cianuro y producción de biomasa. Estas cinéticas se realizaron durante cinco días, tomando muestras cada 24 horas.

**Figura 19.** Velocidad de degradación para cada microorganismo en el ensayo Preliminar:  
 a. Microorganismo A; b. Microorganismo B; c. Microorganismo C; d. Microorganismo F;  
 e. Microorganismo G; f. Microorganismo H

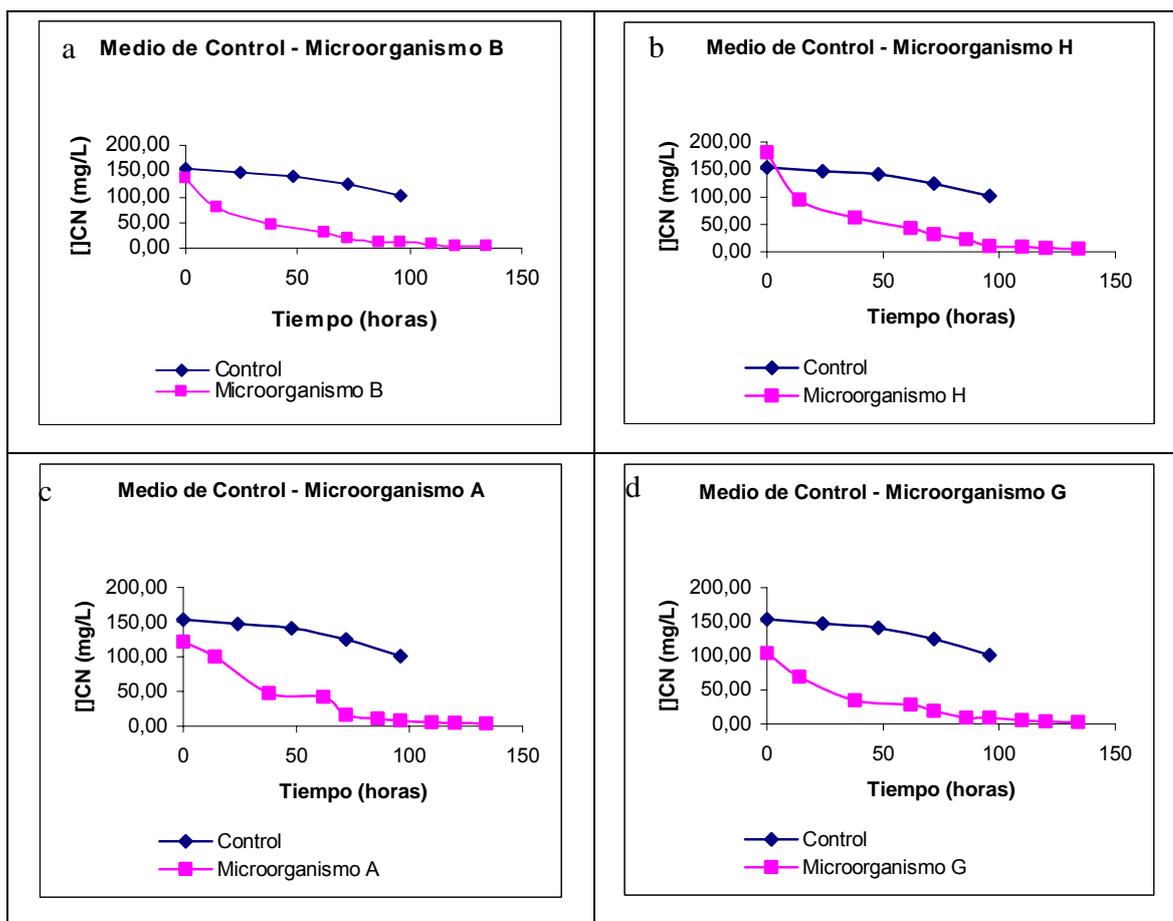


De los resultados obtenidos puede concluirse que los microorganismos que presentaron mayores velocidades de degradación del contaminante (cianuro) fueron A, B, G y H, con valores de 0.7768 mV/h, 0.8628 mV/h, 0.8162 mV/h 0.765 mV/h, respectivamente. Los microorganismos C y F presentaron las menores velocidades de degradación con valores de 0.5696 mV/h y 0,6666 mV/h, respectivamente. Por tal motivo fueron seleccionados los microorganismos A, B, G y H para realizar las respectivas cinéticas de crecimiento celular y degradación de cianuro (Ver Figura 19).

### 3.3 CONSUMO DE CIANURO

**Figura 20.** Consumo de cianuro de los microorganismos y del Medio de Control:

a. Microorganismo B; b. Microorganismo H; c. Microorganismo A; d. Microorganismo G

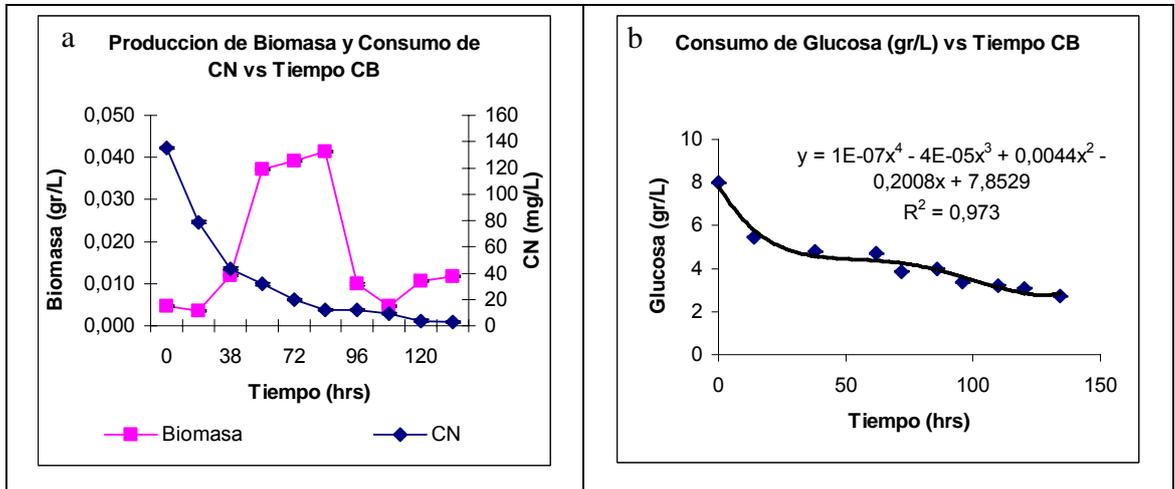


Al realizar el medio de control para el cianuro (sin células), se observó que hubo cambio en la concentración de este en el tiempo, disminuyendo, debido a que el medio se encontraba a un pH de  $9.8 \pm 0.2$ , a este pH el una proporción menor al 50% del cianuro presente se encuentra como HCN y el resto como CN; la diferencia en la concentración de cianuro en el tiempo se debe a que un porcentaje del cianuro en forma de HCN se volatiliza, el resto queda presente en el medio y es degradado por el microorganismo. Al comparar la gráfica del medio de control con las gráficas de concentración de cianuro vs tiempo de cada microorganismo se observa que la mayor cantidad de cianuro presente en el medio es degradada por el microorganismo y que el porcentaje de cianuro que se volatiliza es mínimo (Ver Figura 20).

### **3.4 CINÉTICAS DE CRECIMIENTO CELULAR Y DEGRADACIÓN DE CIANURO DE LOS MICROORGANISMOS SELECCIONADOS**

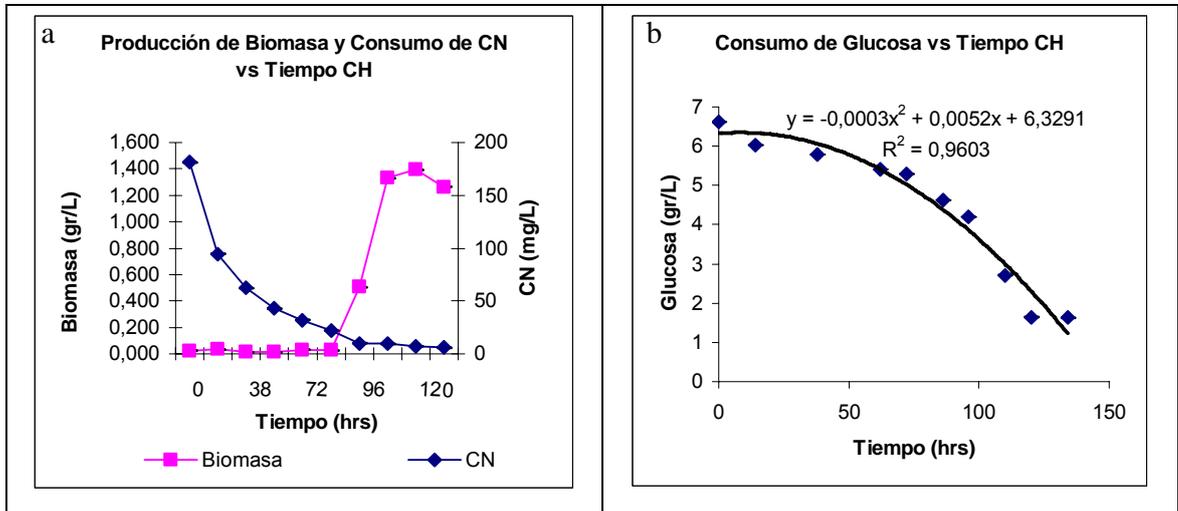
Para la fermentación del microorganismo B (Ver figura 21 a), se observa que la fase exponencial del crecimiento comienza a las 14 horas y va hasta las 62 horas y el inicio de la fase exponencial se da cuando la concentración de cianuro ha disminuido a 78 (mg/L), aunque no es la concentración máxima de cianuro, es aún una concentración alta si se tiene en cuenta que la concentración mínima de cianuro al finalizar la cinética fue de 2.95 mg/L, esto indica que el microorganismo consumió el carbono y nitrógeno presente en el cianuro, pero además utilizó la glucosa como fuente de energía, pues se ve una alta disminución en la concentración de azúcares reductores en aquellos puntos donde se presenta la fase exponencial del crecimiento (Ver figura 21 b), aunque para el resto de puntos también se observa la disminución en la concentración de glucosa, dicha disminución no es muy significativa.

**Figura 21.** a. Producción de biomasa y consumos de cianuro microorganismo B; b. Consumo de glucosa para el microorganismo B



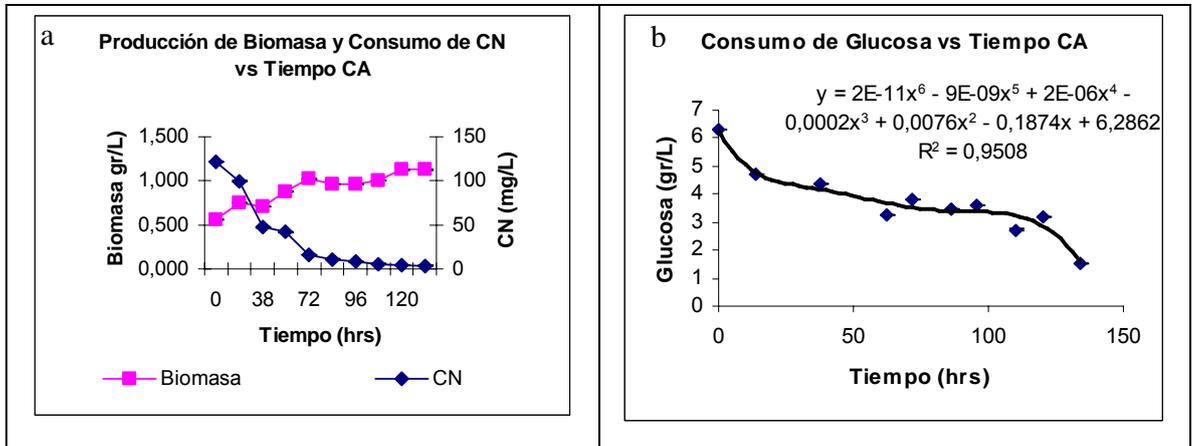
Al realizar la gráfica de crecimiento de biomasa vs tiempo se observó que el microorganismo H inició su crecimiento a las 86 horas, cuando la concentración de cianuro había disminuido a 22 (mg/L), esto indica que aunque fue capaz de degradar el cianuro, el carbono presente en este no lo utilizó para su crecimiento sino para el mantenimiento celular. En el consumo de glucosa vs tiempo se observó que una disminución significativa en la concentración de azúcares reductores inicio a las 62 horas y continuó hasta que se finalizó la cinética de crecimiento, lo que indica que utilizó para su crecimiento como fuente de carbono, la glucosa (Ver Figura 22).

**Figura 22.** a. Producción de biomasa y consumos de cianuro microorganismo H; b. Consumo de glucosa para el microorganismo H

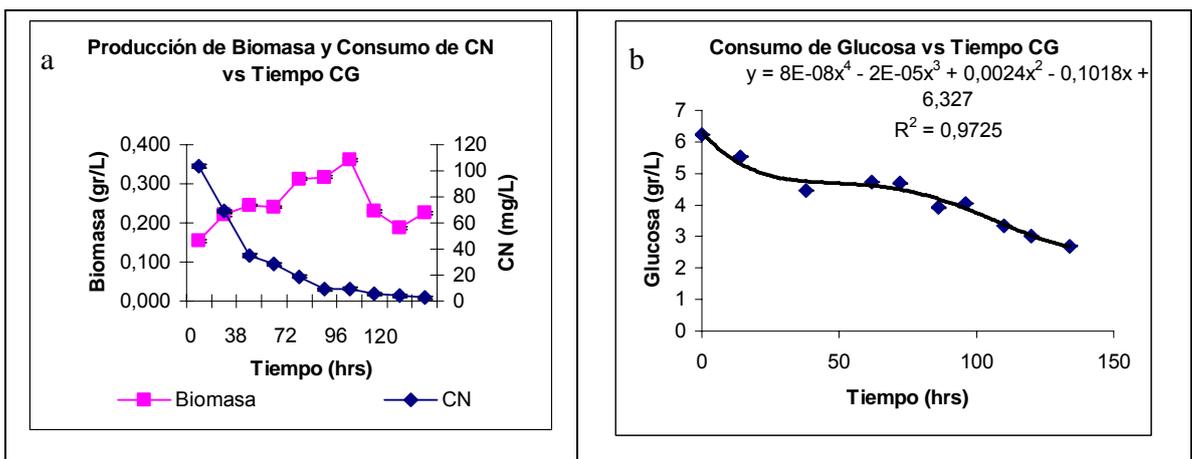


Al igual que para el microorganismo H, los microorganismos A y G, también iniciaron la fase exponencial en el punto en el cual la concentración de cianuro había disminuido considerablemente, para el microorganismo A la concentración del cianuro fue de 47 mg/L (Ver Figura 23) y para el microorganismo G de 28 mg/L (Ver figura 24). La concentración de glucosa disminuyó durante todo el tiempo que transcurrió la cinética, de esto se puede decir que dichos microorganismos no utilizaron el carbono presente en el cianuro para su crecimiento, pero si para mantenerse vivos antes de entrar en fase exponencial y utilizaron la glucosa como fuente de carbono para poder iniciar el crecimiento.

**Figura 23.** a. Producción de biomasa y consumos de cianuro microorganismo A; b. Consumo de glucosa para el microorganismo A



**Figura 24.** a. Producción de biomasa y consumos de cianuro microorganismo G; b. Consumo de glucosa para el microorganismo G



De tal manera se puede decir que durante esta cinética hubo dos sustratos: la glucosa y el cianuro. En el caso del cianuro, este es un sustrato inhibitor del crecimiento, lo que significa que el microorganismo necesita una fuente adicional de energía para poder iniciar la fase exponencial y contrarrestar el efecto de dicho compuesto. En este caso el sustrato adicional fue la glucosa.

La concentración de cianuro en cada una de las cinéticas disminuyó a medida que transcurrió el tiempo, presentándose los mayores deltas hasta las 38 horas

aproximadamente, tiempo después del cual siguió la degradación pero a menor velocidad. Esto pudo confirmarse mediante un análisis de varianza ANOVA en Statgraphics. En total se realizaron 30 observaciones, ya que se tomaron muestras por triplicado y un factor bajo estudio que era el microorganismo (B, H, A, y G) y la variable respuesta el tiempo de degradación del cianuro.

### 3.4.1 Análisis de varianza para la variable respuesta: concentración de cianuro

Para cada uno de los microorganismos se tiene:

Variable Dependiente: Cianuro

Factor: Tiempo

Número de observaciones: 30

Number of levels: 10

**Tabla 2.** Análisis de Varianza para la variable respuesta: Concentración de cianuro del microorganismo B

#### Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	48466,2	9	5385,13	1 22,30	0,0000
Within groups	880,613	20	44,0306		
Total (Corr.)	49346,8	29			

**Tabla 3.** Análisis de Varianza para la variable respuesta: Concentración de Cianuro microorganismo H

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	82191,0	9	9132,34	557,44	0,0000
Within groups	327,653	20	16,3827		
Total (Corr.)	82518,7	29			

**Tabla 4.** Análisis de Varianza para la variable respuesta: Concentración de Cianuro microorganismo A

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	48940,9	9	5437,88	515,02	0,0000
Within groups	211,172	20	10,5586		
Total (Corr.)	49152,1	29			

**Tabla 5.** Análisis de Varianza para la variable respuesta: Concentración de Cianuro microorganismo G

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	30141,2	9	3349,03	145,37	0,0000
Within groups	460,767	20	23,0384		
Total (Corr.)	30602,0	29			

Para todos los microorganismos se obtuvo un P value de 0,0000; como este valor es menor de 0.05 significa que el factor bajo estudio: *tiempo* tiene un efecto estadísticamente significativo sobre la *concentración de cianuro* a un nivel de

confianza del 95 % (Ver Tablas 2, 3, 4, 5). Entonces se realizó un análisis de comparaciones múltiples por el método de Tukey para cada uno de los microorganismos. De las tablas 6, 7 y 8 puede decirse que a medida que transcurre el tiempo la concentración de cianuro disminuye, presentándose los mayores deltas de concentración hasta las 38 horas aproximadamente y en los últimos tiempos dichos cambios de concentración fueron mucho menores, razón por la cual estos tres primeros datos fueron los seleccionados para calcular las velocidades de degradación, pues es donde se presentan mayores diferencias, pues en los últimos datos las concentraciones de cianuro no presentan diferencias muy significativas y esto puede verificarse en las medias obtenidas.

**Tabla 6.** Método de comparaciones múltiples de Tukey para el microorganismo B

Method: 95,0 percent Tukey HSD			
Tiempo	Count	Mean	Homogeneous Groups
134	3	3,01667	X
120	3	4,00667	X
110	3	9,08667	X
96	3	12,2033	X
86	3	12,2433	X
72	3	20,49	XX
62	3	31,6267	XX
38	3	43,53	X
14	3	79,4767	X
0	3	135,947	X

**Tabla 7.** Método de comparaciones múltiples de Tukey microorganismo H

---

Method: 95,0 percent Tukey HSD

Tiempo	Count	Mean	Homogeneous Groups
134	3	5,94333	X
120	3	6,99	X
110	3	9,54	X
96	3	10,2067	X
86	3	22,37	X
72	3	32,17	XX
62	3	42,88	X
38	3	62,5167	X
14	3	94,51	X
0	3	181,21	X

---

**Tabla 8.** Método de comparaciones múltiples de Tukey microorganismo A

---

Method: 95,0 percent Tukey HSD

Tiempo	Count	Mean	Homogeneous Groups
134	3	3,54667	X
120	3	4,29667	X
110	3	5,58667	X
96	3	8,15	XX
86	3	11,0433	XX
72	3	16,0633	X
62	3	42,0533	X
38	3	47,27	X
14	3	99,8833	X
0	3	121,38	X

---

**Tabla 9.** Método de comparaciones múltiples de Tukey microorganismo G

Method: 95,0 percent Tukey HSD			
Tiempo	Count	Mean	Homogeneous Groups
134	3	2,80333	X
120	3	4,17667	X
110	3	5,6	XX
86	3	9,07	XX
96	3	9,49333	XX
72	3	19,05	XX
62	3	28,3633	XX
38	3	34,96	X
14	3	69,09	X
0	3	104,353	X

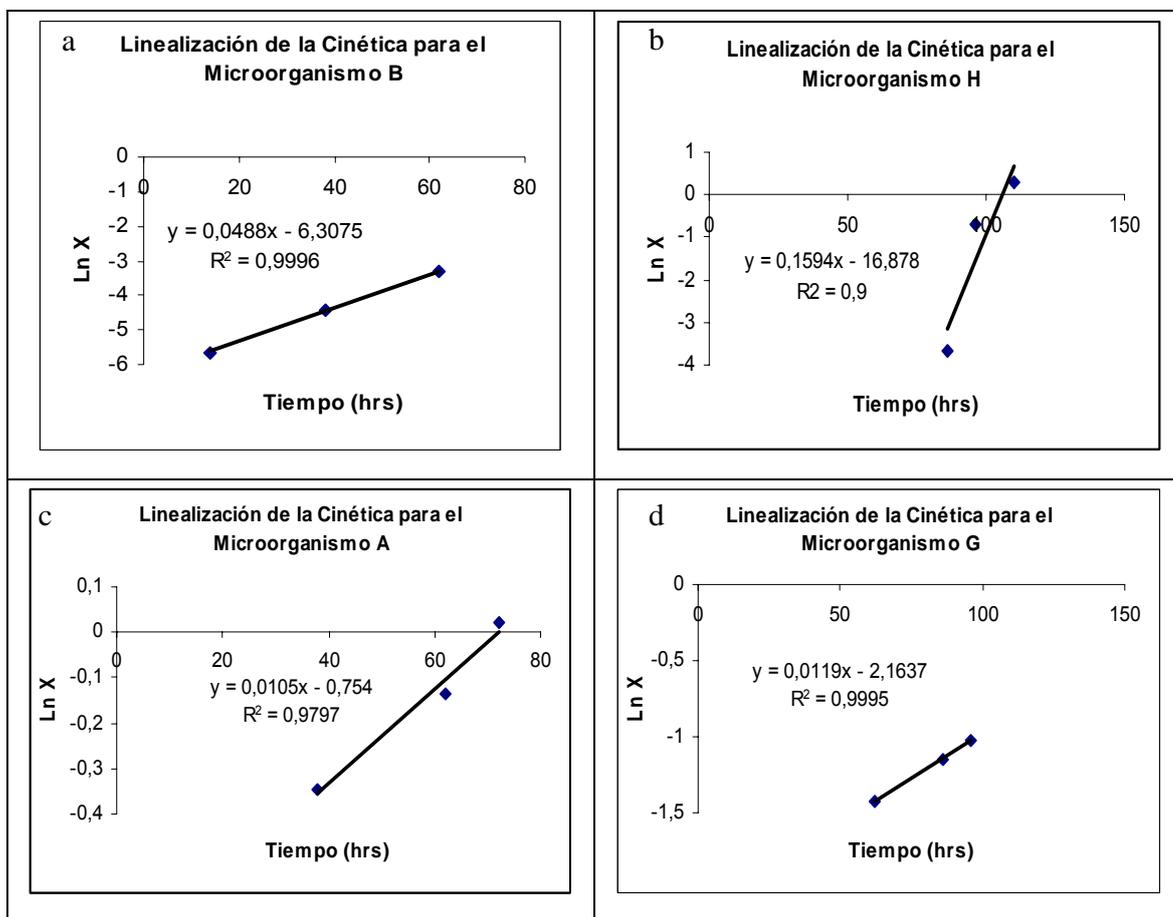
### 3.5 PARAMETROS CINÉTICOS DE LOS MICROORGANISMOS SELECCIONADOS

Para las cinéticas realizadas, los datos obtenidos se graficaron y se linealizaron con el objetivo de hallar la velocidad máxima de crecimiento para cada uno de los microorganismos (Doran, 1995), (Ver figura 25) El microorganismo que logró la velocidad máxima de crecimiento fue el H, aunque este al inicio de la cinética creció lentamente debido a la presencia del cianuro en el medio, después de que ya se había consumido, este inicio la fase exponencial y creció con mayor rapidez (Ver Tabla 10), además puede observarse que la pendiente en la fase exponencial del crecimiento para el microorganismo H es mucho mayor que la de los demás.

**Tabla 10.** Parámetros cinéticos para cada microorganismo

Microorganismo	Velocidad Máxima de Crecimiento: $\mu_{\text{máx}}$ (1/h)
B	0.0488
H	0.1594
A	0.0105
G	0.0119

**Figura 25.** Linealizaciones de la velocidad máxima a. Microorganismo B; b. Microorganismo H; c. Microorganismo A; d. Microorganismo G



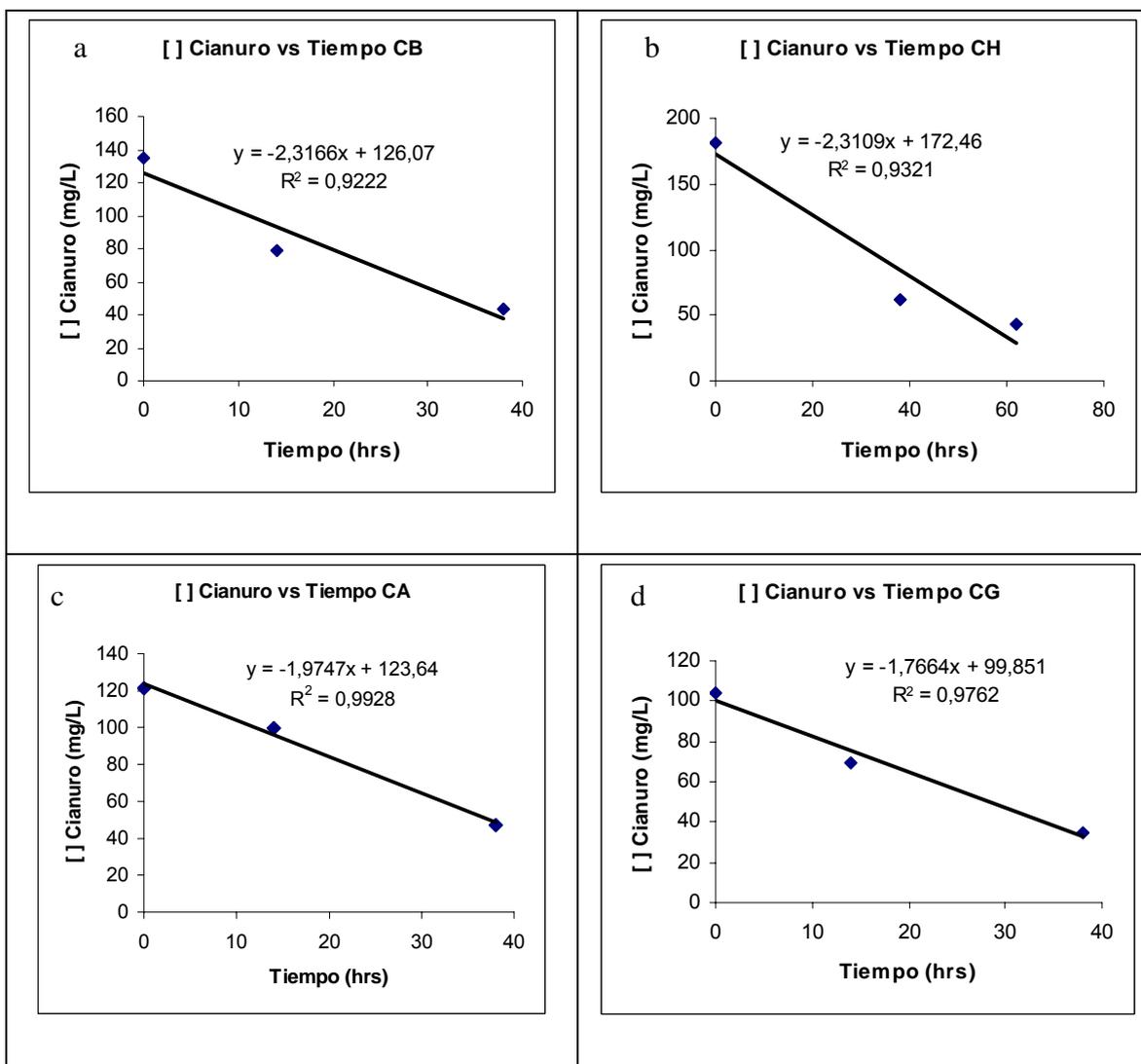
### **3.6 VELOCIDADES DE DEGRADACIÓN DE CIANURO PARA CADA MICROORGANISMO**

Los microorganismos bajo estudio degradaron un alto porcentaje de cianuro, alrededor del 97% (ver Tabla 11) aunque este aspecto es importante, porque lo que se buscaba con este trabajo era encontrar microorganismos capaces de degradar altas concentraciones de cianuro, también es muy importante analizar cada velocidad de degradación del contaminante (Ver Figura 26), la cual se calculó graficando las concentraciones de cianuro en el tiempo. Para esto, se tomaron aquellos datos en los cuales se observó inicialmente una mayor pendiente, hasta el punto en el cual no había un cambio significativo. De dichos datos se dedujo que los microorganismos con mayores velocidades de degradación fueron el B y el H, para los cuales se obtuvieron valores de 2.3166 mg CN/Lh y 2.3109 mg CN/Lh, respectivamente. Para A fue de 1.9747 mg CN/Lh y para G de 1.7664 mg CN/Lh. Aunque A y G degradaron un alto porcentaje de cianuro (97.13 % y 97.42% respectivamente), las velocidades de degradación fueron mucho menores comparadas con las de B y H, sin importar que todos alcanzaron porcentajes de degradación similares, en el tiempo total del cultivo. A pesar de que la cantidad de cianuro degradada es un factor importante a la hora de escoger los microorganismos, hay que tener en cuenta que a mayor velocidad de degradación, menor es el tiempo que se toma el microorganismo para consumir o degradar el cianuro, y para efectos de costos este si es un factor altamente relevante, pues es claro que estos dos microorganismos degradan la mayor cantidad en un tiempo más corto que los otros.

**Tabla 11.** Porcentajes de degradación de cada microorganismo

Microorganismo	Porcentaje de degradación
B	97.82 %
H	96.74 %
A	97.13 %
G	97.42 %

**Figura 26.** Velocidad de degradación a. Microorganismo B; b. Microorganismo H; c. Microorganismo A; d. Microorganismo G



### 3.6.1 Análisis de varianza para la variable respuesta: velocidad de degradación de cianuro

Madiante un análisis de varianza se tuvo que el P Value menor de 0.05, lo cual significa que el factor: tipo de microorganismo tuvo un efecto estadísticamente significativo sobre la variable respuesta: Velocidad de Degradación de cianuro a un nivel de confianza del 95 %. (Ver Tabla 12).

**Tabla 12.** Análisis de Varianza para la variable respuesta: Velocidad de degradación de cianuro  
Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0,533772	3	0,177924	4,08	0,0495
Within groups	0,34845	8	0,0435563		
Total (Corr.)	0,882223	11			

Debido a esto, procedió a realizar el Método de Comparaciones Múltiples de Tukey para analizar cada una de las medias y puede decirse que no es muy grande la diferencia entre las velocidades para cada uno de los microorganismos. Pero aún así puede afirmarse que el microorganismo los microorganismos H y B presentaron mayores velocidades de degradación, con valores de 2.3121 mg/Lh, luego el B con 2.2372 mg/Lh, después el A con 1.9764 mg/Lh y el que presentó menor velocidad de degradación de cianuro fue el G con 1.78227 mg/Lh. (Ver Tabla 13).

**Tabla 13.** Método de comparaciones múltiples de Tukey para las velocidades de degradación de cianuro

Method: 95,0 percent Tukey HSD			
Microorganismo	Count	Mean	Homogeneous Groups
G	3	1,78227	X
A	3	1,9764	X
B	3	2,2372	X
H	3	2,3121	X

Estos resultados presentados son coherentes y muy similares a los valores ya calculados anteriormente de velocidades de degradación de cada uno de los microorganismos estudiados (Ver Figura 26).

Si se comparan los valores de velocidad de degradación y porcentaje de remoción de cianuro con los valores reportados en la literatura (Camargo y Ossa, 2005), se puede observar que el porcentaje de remoción reportado en la literatura para *Pseudomonas fluorescens* (96.126%) es similar a los resultados obtenidos para los cuatro microorganismos que fueron alrededor del 97%. Pero las velocidades de degradación de cada uno de los microorganismos B, H, A y G fueron mayores (2.3166 mg CN/Lh, 2.3109 mg CN/Lh, 1.9747 mg CN/Lh y 1.7664 mg CN/Lh, respectivamente) comparadas con la de esta especie (0.1626 mg/Lh); teniendo en cuenta que las cinéticas de este estudio se iniciaron a una concentración de cianuro mayor y la concentración inicial reportada por Camargo y Ossa (2005) fue de 15 mg/L.

### **3.7 IDENTIFICACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS AISLADOS Y PURIFICADOS**

Para identificar los 6 microorganismos aislados, purificados y adaptados a la mayor concentración de cianuro (150 mg/L) se realizaron las tinciones simples de gram y los montajes en fresco con el fin de determinar cuales de ellos pertenecían al grupo de las bacterias y cuales al de los hongos.

#### **3.7.1 Bacterias**

Mediante la tinción de Gram se diferenciaron dos tipos de bacterias: un coco gram positivo (microorganismo G) y un bacilo Gram Negativo (microorganismo C).

##### **3.7.1.1 Bacilo Gram Negativo**

El bacilo observado al microscopio (microorganismo C) presentó estructuras en forma de bastón, eran cortas y agudizadas en los extremos. Fue identificado como bacilo gram negativo, debido al resultado en la tinción de gram, donde la coloración que presentó fue rosada (Ver Figura 27).

**Figura 27.** Bacilo Gram Negativo



Debido a las características morfológicas y a la apariencia física (cremosa y mucosa), esta bacteria puede ser compatible con el género *Pseudomonas* (Ver Figura 28).

**Figura 28.** Bacilo en Agar Nutritivo



La bacteria fue sembrada en medio líquido BHI (Brain Heart Infusión), para su enriquecimiento y, posteriormente, en agar nutritivo con el fin de que la colonia tuviera un periodo de crecimiento de 24 horas y así proceder con la identificación bioquímica (Ver Figura 29).

**Figura 29.** Repica Bacilo en Agar Nutritivo



Se realizó la prueba de la oxidasa, que dio positiva debido a la coloración violeta que se presentó en la lámina con el reactivo oxidasa. Con este resultado el microorganismo quedaba excluido de la familia *Enterobacteriaceae*.

Se pensó que se trataba del género *Pseudomonas* y para confirmarlo la bacteria fue sembrada en agar cetrimide, que es un medio específico para el crecimiento de este tipo de microorganismos (Ver Figura 30).

**Figura 30.** Bacilo en Agar Cetrimide



Pasadas 24 horas se observó crecimiento en este medio, por lo que fue sembrada en agar King A y en agar King B, otros medios selectivos para *Pseudomonas*, con el fin de observar la producción de pigmentos (Ver Figuras 31, 32).

**Figura 31.** Bacilo en Agar King A



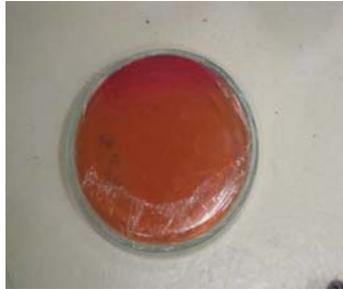
**Figura 32.** Bacilo en Agar King B



Pasadas 48 horas, se observó crecimiento pero no hubo producción de pigmentos en ninguno de los dos medios. Con estos resultados se puede decir que la bacteria se puede clasificar dentro del grupo de las *Pseudomonas* que no producen pigmentos.

Posteriormente, se sembró la bacteria en Agar Mc Conkey que también es un medio específico para el crecimiento de *Pseudomonas*. Como resultado se obtuvo que el medio no cambió su color a amarillo en el área de crecimiento de la colonia, es decir, la prueba fue negativa, lo que significa que la bacteria no desdobra la lactosa presente en el medio. Lo expuesto anteriormente confirma que el género del microorganismo bajo estudio es *Pseudomonas* (Ver Figura 33).

**Figura 33.** Bacilo en Agar Mc Conkey



El microorganismo fue sembrado en agar manitol y como resultado se obtuvo que si fermentaba el manitol, debido al cambio de color rojo a amarillo en el área de crecimiento de la colonia (Ver Figura 34).

**Figura 34.** Bacilo en Agar Manitol



De los resultados de las pruebas bioquímicas presentados anteriormente puede concluirse que el microorganismo C es una *Pseudomonas spp* y que no fermenta el manitol, ni produce pigmentos, por lo tanto pueden descartarse las especies de *Pseudomonas aeruginosa*, pues ésta no produce los pigmentos piocianina (pigmento azul producido en el agar King A) y pioverdina (pigmento amarillo fluorescente producido en el agar King B). Tampoco pertenece a las especies *putida* y *fluorescens*, que producen pioverdina. De tal forma que puede clasificarse dentro de las especies de *Pseudomonas*, que no producen pigmentos; entre las que se encuentran: *maltophilia*, *cepacia* y *sutzeri*. La *Pseudomonas maltophilia*, es oxidasa negativa por lo que puede descartarse; en cambio la *cepacia* y *sutzeri* son oxidasa positiva y no producen pigmentos (piocianina y pioverdina), por lo

tanto la especie en cuestión puede ser una *Pseudomonas cepacia* o *Pseudomonas stutzeri*. Pero para determinar con certeza de que especie se trata es necesario continuar con diferentes pruebas bioquímicas tales como: lisina, arginina, dihidrolasa, y reducción de nitratos, lo cual permitiría escoger entre estas dos opciones (Konema *et al*; 1997).

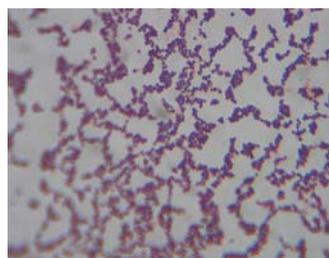
Como se reportó en la revisión de literatura las *Pseudomonas* son microorganismos prometedores para la biodegradación de aguas contaminadas con cianuro, debido a su alto potencial de remoción (Ver Tabla 1).

### 3.7.1.2 Coco Gram Positivo

El coco observado al microscopio (microorganismo G) después de realizar la tinción de Gram fue identificado como coco gram positivo, por la coloración violeta que presentó al realizar al prueba.

Tenía estructuras esféricas, se encontraban agrupadas en forma de racimo, por tal motivo se llegó a pensar que se trataba del género *Staphilococcus* (Ver Figura 35)

**Figura 35.** Coco Gram Positivo a



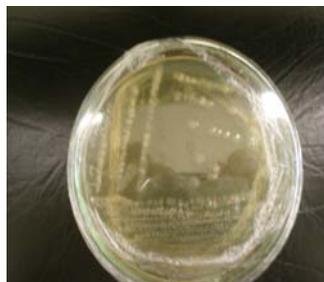
Las colonias eran redondas y pequeñas. Estas crecían aisladas especialmente en agar nutritivo que era más adecuado para su desarrollo, pues en el extracto de malta, al ser un medio mas propicio para el crecimiento de hongos, no se observa mucho crecimiento y diferenciación de las colonias (Ver Figura 36).

**Figura 36.** Coco en Agar Extracto de Malta



Para confirmar que se trataba de un coco gram positivo se procedió primero a sembrarlo en medio líquido BHI (Brain Heart Infusión), para su enriquecimiento, y posteriormente en agar nutritivo con el fin de que la colonia tuviera un periodo de crecimiento de 24 horas y así proceder con la identificación bioquímica (Ver Figura 37)

**Figura 37.** Coco en Agar Nutritivo



Pasadas 24 horas se observó un buen crecimiento en agar nutritivo. Después de esto, se realizaron las pruebas de oxidasa, la cual dio negativa, al no cambiar el color de la lámina con el reactivo oxidasa a violeta y catalasa que fue positiva, pues al adicionarle  $H_2O_2$  al 3% sobre la colonia se observó un burbujeo por el desprendimiento de oxígeno, lo que significa que era un microorganismo aerobio. Esto confirmó una vez más que se trataba del género *Staphilococcus*.

Posteriormente, fue sembrado en medio Baird Parker, que es un medio específico para el crecimiento de *Staphilococcus* y pudo observarse que la bacteria reducía el telurito a telurato y como consecuencia de esto el medio se tornaba de color oscuro, dando un resultado positivo para este género (Ver Figura 38).

**Figura 38.** Cocolo en Agar Baird Parker



También fue sembrado en agar Manitol y no presentó respuesta positiva, pues el medio no cambió de rojo que era su color inicial a color amarillo, que es el criterio cualitativo de la prueba para confirmar que el microorganismo fermenta el manitol, (Ver Figura 39).

**Figura 39.** Cocolo en Agar Manitol



De los resultados de las pruebas bioquímicas presentados anteriormente puede concluirse que el microorganismo G es un *Staphilococcus spp* y que no fermenta el manitol. Con lo que puede descartarse la especie *aereus*, que si lo fermenta y podría clasificarse dentro de las especies *epidermidis* o *auricularis* que no fermentan el manitol. Pero para identificar con certeza la especie en cuestión es

necesario realizar las correspondientes pruebas bioquímicas de utilización de carbohidratos (Sistema API) (Konema *et al*; 1997).

En la literatura se reporta que la especie *Staphilococcus epidermidis* tiene un alto potencial para la degradación del cromo y algunos nitratos (Vatsouria *et al.*, 2005).

### 3.7.2 Hongos

#### 3.2.1 Levaduras

Al realizar la tinción en fresco se observaron estructuras de levaduras globosas, gemantes y de formas esféricas (Ver Figura 40).

**Figura 40.** Levadura

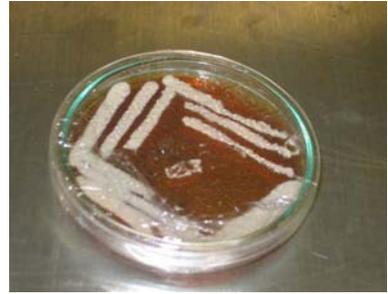


Las colonias de las tres levaduras aisladas y purificadas A, B y F presentaban características morfológicas muy similares, pues eran cremosas y no crecían separadas (Ver Figuras 41, 42, 43).

**Figura 41.** Microorganismo A



**Figura 42.** Microorganismo B



**Figura 43.** Microorganismo F



Las tres levaduras fueron sembradas en los agares PDA y Saboraud, pues estos medios eran más propicios para su crecimiento (Ver Figuras 44, 45, 46, 47, 48, 49).

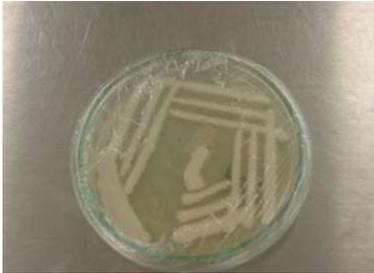
**Figura 44.** Microorganismo A en PDA



**Figura 45.** Microorganismo A en Saboraud



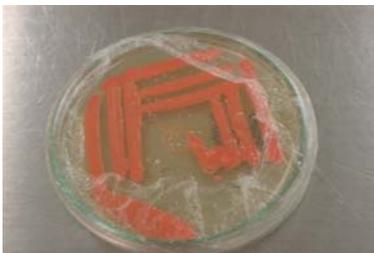
**Figura 46.** Microorganismo B en PDA



**Figura 47.** Microorganismo B en Saboraud



**Figura 48.** Microorganismo F en PDA



**Figura 49.** Microorganismo F en Saboraud



La identificación bioquímica de las levaduras fue realizada mediante un sistema API 20C AUX (ver Anexo 2), y como resultado fueron identificados los microorganismos A, B y F como: ***Candida spp***, ***Pichia ohmeri***, ***Rhodotorula mucilaginosa***. Además se ha reportado que algunas especies de *Rhodotorula* como la *glutinidis* tienen la capacidad de reducir iones de aluminio o manganeso y emplearse en procesos de biodegradación (Viet *et al.*, 2001). Las especies de *Candida* tienen la capacidad de degradar fenoles por ejemplo la *Candida parasilopsis* puede remover fenoles monocíclicos (Eppink *et al.*, 2000). Especies del género *Pichia* pueden degradar compuestos aromáticos, por ejemplo *Pichia anomala* puede remover ciclohexanos (Tarr, 2004).

### 3.7.2.2 Hongo Filamentoso

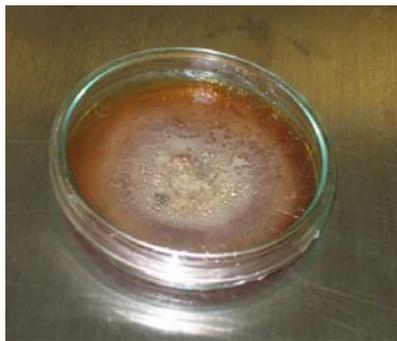
Observado al microscopio pudieron apreciarse las hifas que conformaban el micelio del microorganismo H (Ver figura 50).

**Figura 50.** Hifas del Hongo



El hongo aislado y purificado era filamentoso. El micelio era razante a la superficie, aterciopelado, tenía pigmentación negra en el reverso y era rugoso. La colonia cuando estaba joven presentó consistencia semejante a la de las levaduras antes del desarrollo del micelio (Ver Figura 51).

**Figura 51.** Microorganismo H



La identificación bioquímica del hongo fue realizada mediante un sistema API 20C AUX (Ver Anexo 2), y como resultado fue identificado como un hongo dematiáceo ***Exophiala spp.*** De este género se ha reportado que posee un gran potencial para remover hidrocarburos, al igual que las especies de *Pseudomonas cepacea*, *fluorescens* y *Candida famata* (Ulfig, 2005).

## CONCLUSIONES

El método de presión de selección (incrementando gradualmente la concentración de cianuro) fue adecuado para el aislamiento, adaptación y purificación de las especies nativas con alto potencial de degradación del contaminante, puesto que se lograron obtener 6 cepas puras de diferentes microorganismos de las 15 con las cuales se inicio el proceso, adaptadas a una concentración de cianuro de 150 mg/L.

Mantener el pH entre 9.5 y 10 garantiza que la reducción de la concentración de cianuro en el medio es debido a la degradación de los microorganismos y no a la volatilización de este; no obstante una pequeña cantidad del contaminante se volatiliza (Alrededor del 5 %), pero es despreciable si se compara con la cantidad degradada por los microorganismos (97 %).

La glucosa que se adicionó al medio de cultivo para realizar las cinéticas correspondientes solo actuó como una fuente de energía extra y no como el sustrato limitante del crecimiento, pues la concentración final de este compuesto al terminar la fase exponencial fue mayor que la concentración del otro sustrato (cianuro) presente en el medio.

El cianuro es un sustrato inhibidor de crecimiento, especialmente para los microorganismos B y H (*Pichia ohmeri*, *Exophiala spp*) respectivamente, puesto que la fase exponencial inicia cuando la concentración de cianuro disminuye considerablemente.

El incremento en la concentración de biomasa de los microorganismos degradadores de cianuro no fue significativo, debido a la alta concentración de

cianuro con las que fueron evaluadas las cinéticas de crecimiento celular y a que el consumo de glucosa fue bajo. Esto indica que las células no aprovecharon la energía suministrada por la glucosa para el crecimiento celular, posiblemente por el efecto inhibitor del cianuro.

Los microorganismos aislados, purificados, seleccionados e identificados como ***Pichia ohmeri***, ***Exophiala spp***, ***Candida spp***, ***Staphiloccocus spp***, son una buena alternativa para la biodegradación de aguas residuales contaminadas con cianuro, ya que estos disminuyeron altas concentraciones de dicho contaminante en medio líquido.

El porcentaje de degradación de cianuro fue alto (alrededor del 97 %), pero muy similar en los diferentes microorganismos; por tal motivo puede decirse que éste es independiente de la velocidad de degradación y no es un criterio suficiente para seleccionar los microorganismos. Por el contrario, la velocidad de degradación si fue un buen parámetro para estimar el potencial de remoción del cianuro de los microorganismos y poder clasificarlos de acuerdo a la cantidad de cianuro degradada en el tiempo. Sin embargo, una mayor velocidad de degradación no implica un mayor porcentaje de remoción.

La velocidad de degradación depende tanto del tipo de microorganismo, como de la concentración inicial de cianuro en el medio. A mayor concentración de cianuro, mayor es el tiempo de degradación y por ende la velocidad es menor.

## RECOMENDACIONES

Realizar un tratamiento previo al efluente, para que la concentración inicial de cianuro en el proceso de biodegradación sea menor y por ende se puedan alcanzar los niveles de descarga de cianuro exigidos por la legislación (1mg/L), puesto que la concentración de los efluentes industriales puede llegar hasta las 500 ppm y la concentración máxima alcanzada para realizar la degradación fue de 150 ppm.

Emplear los microorganismos seleccionados para la formación de consorcios microbianos de degradación de cianuro y de esta forma aumentar la eficiencia en el proceso de biodegradación.

Emplear los microorganismos seleccionados para el tratamiento de efluentes en los cuales haya presencia de otro tipo de contaminantes como fenoles o metales pesados.

Utilizar una fuente de energía diferente de la glucosa menos costosa (melaza u otro) y de igual manera evaluar el efecto sobre las cinéticas de crecimiento celular y degradación de cianuro.

Encontrar para cada uno de los microorganismos identificados sus condiciones óptimas de crecimiento y evaluar la degradación de cianuro bajo las mismas.

Continuar realizando la identificación microbiológica de los microorganismos que solo se identificaron hasta el género para llegar hasta la especie.

## BIBLIOGRAFÍA

Adams et al., 2001; Thompson et al., 1994. Referenciado por : Gurbuz Fatma, Ciftci Hasan, Akcil Ata, Gul Karahan, Aynur. 2004. Microbial detoxification of cyanide solutions: a new biotechnological approach using algae. *Hydrometallurgy*. 72: 167-176.

Adjei Michael D. and Ohta Yoshiyuki. 2000. Factors Affecting the Biodegradation of Cyanide by *Burkholderia cepacia* Strain C-3. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 89 (3): 274-277.

Akcil, 2001; Akcil 2002; Botz, 2001; McNulty, 2001;. Referenciado por: Akcil Ata. 2003. Destruction of cyanide in gold mill effluents: biological versus chemical treatments. *Biotechnology Advances*. 21: 501-511.

Akcil Ata. 2003. Destruction of cyanide in gold mill effluents: biological versus chemical treatments. *Biotechnology Advances*. 21: 501-511 Aksu Z., Calik A., Dursun A.Y., Demircan Z. 1999

Aksu Z., Calik A., Dursun A.Y., Demircan Z. 1999. Biosorption of iron(III)–cyanide complex anions to *Rhizopus arrhizus*: application of adsorption isotherms. *Process Biochemistry*. 34: 483-491.

Anónimo<sup>1</sup> , 2006. Cianuro

<http://enciclopedia.us.es/index.php/Cianuro>. (Consultado: Mayo 22 de 2006).

Anónimo<sup>2</sup>, 2006. Indiana State Department of Health.

[http://www.in.gov/isdh/bioterrorism/agents/cyanide\\_spanish.htm](http://www.in.gov/isdh/bioterrorism/agents/cyanide_spanish.htm).

(Consultado: Mayo 22 de 2006).

Anónimo<sup>3</sup>, 2006. Martha Mine, New Zeland.

<http://www.marthamine.co.nz/cyanide.html>. (Consultado: Mayo 22 de 2006).

Anónimo<sup>4</sup> 2006. Bacterias.

[http://www.juntadeandalucia.es/averroes/recursos\\_informaticos/concurso1998/acc\\_esit6/microbio.html](http://www.juntadeandalucia.es/averroes/recursos_informaticos/concurso1998/acc_esit6/microbio.html). (Consultado: Septiembre 9 de 2006).

Anónimo<sup>5</sup>2006. Bacterias.

<http://es.wikipedia.org/wiki/Bacteria> (Consultado: Septiembre 10 de 2006).

Anónimo<sup>6</sup>, 2006. Hongos.

<http://es.wikipedia.org/wiki/Hongo>. (Consultado: Septiembre 10 de 2006).

Anónimo<sup>7</sup>, 2006. Universidad Autónoma de León. Facultad de Ciencias Químicas. Hongos.

<http://www.respyn.uanl.mx/especiales/2005/ee-12-2005/documentos/ponencias/02p.pdf#search=%22pruebas%2Bidentificacion%2Bhongos%22>. (Consultado: Septiembre 8 de 2006).

Anónimo<sup>8</sup>, 2006. Bacterias.

<http://fbio.uh.cu/monera/bacterias.htm>. (Consultado: Septiembre 8 de 2006).

Anónimo<sup>9</sup>, 2006. Aislamiento e identificación de bacterias a partir de un cultivo mixtobacteriano.

<http://www.ucm.es/info/mfar/pdfs/GuiaMicro3.pdf#search=%22metodos%2Bidentificacion%2Bmicroorganismos%22>. (Consultado: Septiembre 26 de 2006)

Anónimo<sup>10</sup>, 2006. Manitol Salado Agar

<http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/manitosalagar.htm>. (Consultado: Septiembre 29 de 2006).

Anónimo<sup>11</sup>,2006. Baird Parker Medio Base.

<http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/bairdparker.htm>. (Consultado: Septiembre 29 de 2006).

Anónimo<sup>12</sup>,2006. Métodos ópticos para el diagnóstico de las enfermedades infecciosas.

<http://inspeccion-uvmi3.iespana.es/inde6983.htm>. (Consultado: Septiembre 29 de 2006).

Babu et al., 1996. Referenciado por : Kao C.M., Liu J.K., Lou H.R., Lin C.S., Chen S.C. 2003. Biotransformation of cyanide to methane and ammonia by *Klebsiella oxytoca*. Chemosphere. 50: 1055-1061.

Barclay Michelle, Tett Vanessa A., Knowles Christopher J. 1998 (1). Metabolism and enzymology of cyanide/metallocyanide biodegradation by *Fusarium solani* under neutral and acidic conditions. Enzyme and Microbial Technology. 23:321–330.

Barclay Michelle, Hart Alwyn, J. Knowles Christopher, Meeussen Johannes C. L., Tett Vanessa A. 1998 (2). Biodegradation of metal cyanides mixed and pure cultures of fungi. Enzyme and Microbial Technology. 22:223-231.

Camargo P y Ossa C. 2005. Tratamiento de Aguas Contaminadas con cianuro. Trabajo de Grado. Universidad EAFIT. Medellín.

Carrillo, 2006. Los hongos de los alimentos y los forrajes.

<http://www.unsa.edu.ar/matbib/hongos/09htextolevaduras.pdf#search=%22Candida%2BPichia%2BOhmeri%22>. (Consultado: Octubre 5 de 2006)

Castric Kathleen F., Mcdevitt David A., Castric Peter A. 1981. Influence of Aeration on Hydrogen Cyanide Biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa*. *Usacurrent Microbiology*. 5: 223-226.

Cluness et al., 1993. Referenciado por : Kao C.M., Liu J.K., Lou H.R., Lin C.S., Chen S.C. 2003. Biotransformation of cyanide to methane and ammonia by *Klebsiella oxytoca*. *Chemosphere*. 50: 1055-1061.

Conn, 1980. Referenciado por: Pereira P. T., Arrabaqa J. D., Amaral-Collaço M. T. 1996. Isolation, Selection and Characterization of a Cyanide-Degrading Fungus from an Industrial Effluent. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 45-52.

Dictor et al., 1997. Referenciado por: Aitimbetov Timur; White Daniel M. Seth Indranil. 2005. Biological gold recovery from gold–cyanide solutions. *Int. J. Miner. Process*. 76: 33-42.

Doran, P. 1995. *Bioprocess Engineering Principles*. Academic Press, London pp 278, 279.

Dubey S.K., Holmes D.S. 1995. Biological cyanide destruction mediated by microorganisms. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 11: 257-265.

Duffey, 1981. Referenciado por : Anónimo<sup>3</sup>, 2006. Martha Mine, New Zeland. <http://www.marthamine.co.nz/cyanide.html>. (Consultado: Mayo 22 de 2006).

Ebbs Stephen. 2004. Biological degradation of cyanide compounds. *Current Opinion in Biotechnology*. 15:231–236.

Eppink, Michael ; Cammart, Erwin ; Wassenaar, Dick van ; Middelhoven, Wouter ; Berkelt, Willen. 2000. Purification and properties of hydroquinone hydroxylase, a FAD-dependente monooxygenase involved in the catabolism of 4-hydroxybenzoate in *Candida parapsilosis* CBS604.

<http://content.febsjournal.org/cgi/reprint/267/23/6832.pdf#search=%22candida%2Bbioremediation%22>. (Consultado : Octubre 10 de 2006)

Ezzi Mufaddal I., Lynch James M. 2002. Cyanide catabolizing enzymes in *Trichoderma* spp. *Enzyme and Microbial Technology* 31: 1042–1047.

Eyjolfsson, 1970. Referenciado por : Anónimo<sup>3</sup>, 2006. Martha Mine, New Zeland. <http://www.marthamine.co.nz/cyanide.html>. (Consultado: Mayo 22 de 2006).

Figueira et al., 1996. Referenciado por: Kao C.M., Liu J.K., Lou H.R., Lin C.S., Chen S.C. 2003. Biotransformation of cyanide to methane and ammonia by *Klebsiella oxytoca*. *Chemosphere*. 50: 1055-1061.

Fry and Millar, 1972. Referenciado por: Kao C.M., Liu J.K., Lou H.R., Lin C.S., Chen S.C. 2003. Biotransformation of cyanide to methane and ammonia by *Klebsiella oxytoca*. *Chemosphere*. 50: 1055-1061.

Fry and Munch, 1975; Wang et al., 1992. Referenciado por: Kao C.M., Liu J.K., Lou H.R., Lin C.S., Chen S.C. 2003. Biotransformation of cyanide to methane and ammonia by *Klebsiella oxytoca*. *Chemosphere*. 50: 1055-1061.

García, Pedro; Márquez, Adriana y Gené, Josepa , 2006. Infecciones humanas por levaduras negras del género *Exophiala*. *Microbiología*, Facultad de Medicina, España. *Revista Iberomercana de Micología*, 2002,19:72-79  
<http://www.reviberoammicol.com/2002-19/072079.pdf#search=%22exophiala%22>. (Consultado: Octubre 5 de 2006).

Gil-Pavas EH, Giraldo-Estrada C, Camargo PA y Ossa C. 2005. Proceso “Acoplado” Físico-Químico y Biotecnológico para el Tratamiento de Aguas Residuales Contaminadas con Cianuro. Cuaderno de Investigación N°38. Grupo de Investigación en Procesos Ambientales y Biotecnológicos – GIPAB. Universidad EAFIT. Medellín.

Given et al., 1998. Referenciado por : Akcil Ata. 2003. Destruction of cyanide in gold mill effluents: biological versus chemical treatments. *Biotechnology Advances*. 21: 501-511

Gurbuz Fatma, Ciftci Hasan, Akcil Ata, Gul Karahan, Aynur. 2004. Microbial detoxification of cyanide solutions: a new biotechnological approach using algae. *Hydrometallurgy*. 72: 167-176.

Huiatt et al., 1983, Mudder y Botz, 2001. Referenciado por: Gurbuz Fatma, Ciftci Hasan, Akcil Ata, Gul Karahan, Aynur. 2004. Microbial detoxification of cyanide solutions: a new biotechnological approach using algae. *Hydrometallurgy*. 72: 167-176.

Ingvorsen et al., 1991. Referenciado por : Pereira P. T., Arrabaqa J. D., Amaral-Collaço M. T. 1996. Isolation, Selection and Characterization of a Cyanide-Degrading Fungus from an Industrial Effluent. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 45-52.

Ingvorsen et al., 1992. Referenciado por : Aitimbetov Timur; White Daniel M. Seth Indranil. 2005. Biological gold recovery from gold–cyanide solutions. *Int. J. Miner. Process*. 76: 33-42.

Ingvorsen et al., 1991; Meyers et al., 1991. Referenciado por : Kao C.M., Liu J.K., Lou H.R., Lin C.S., Chen S.C. 2003. Biotransformation of cyanide to methane and ammonia by *Klebsiella oxytoca*. Chemosphere. 50: 1055-1061.

Jaramillo, Gustavo; Echeverri, Eugenio; Figueroa, Roque; 2006. Marcha microbiológica para la búsqueda e identificación de *pseudomonas* con potencial de degradar fenol, en ambientes de recepción de aguas residuales generadas en laboratorios de la Universidad de San Buenaventura Cartagena, Colombia. [www.usbctg.edu.co/academica/pregrado/documentos/bac\\_sem\\_artbrocal02.pdf](http://www.usbctg.edu.co/academica/pregrado/documentos/bac_sem_artbrocal02.pdf) (Consultado: Octubre 7 de 2006)

Knowles and Bunch 1986; White et al., 1988. Referenciado por: Dubey S.K., Holmes D.S. 1995. Biological cyanide destruction mediated by microorganisms. World Journal of Microbiology & Biotechnology. 11: 257-265.

Knowles, 1976; Gastric, 1981; Fry and Myers, 1981; Padmaja and Balagopal, 1985; Ingvorsen et al., 1991; Basheer et al., 1992. Referenciado por: Pereira P. T., Arrabaça J. D., Amaral-Collaço M. T. 1996. Isolation, Selection and Characterization of a Cyanide-Degrading Fungus from an Industrial Effluent. International Biodeterioration & Biodegradation. 45-52.

Knowles, 1976; Macadam and Knowles, 1984. Referenciado por: Dubey S.K., Holmes D.S. 1995. Biological cyanide destruction mediated by microorganisms. World Journal of Microbiology & Biotechnology. 11: 257-265.

Knowles, 1976; Solomonson, 1981; Knowles and Bunch, 1986. Referenciado por: Dubey S.K., Holmes D.S. 1995. Biological cyanide destruction mediated by microorganisms. World Journal of Microbiology & Biotechnology. 11: 257-265.

Koneman, Elmer; Allen, Stephen; Janda, William; Sommers, Herbert; Dowell, V.; Hill, Washington. Diagnóstico Microbiológico. México: Médica Panamericana, 1997. p 307,420.

Linares, Maria José; Solís, Francisco, 2006. Identificación de Levaduras  
<http://www.guia.reviberoammicol.com/Capitulo11.pdf#search=%22blastoconidias%22>. (Consultado: Octubre 5 de 2006)

Logsdon Mark J. y otros, 2003. El manejo del cianuro en la extracción de oro  
<http://www.ilustrados.com/publicaciones/EpZpVpEpkjxcfwDzo.php>.  
(Consultado: Mayo 22 de 2006).

Meyers et al., 1991. Referenciado por : Kao C.M., Liu J.K., Lou H.R., Lin C.S., Chen S.C. 2003. Biotransformation of cyanide to methane and ammonia by *Klebsiella oxytoca*. Chemosphere. 50: 1055-1061.

Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 31: 426-430.

Mudder, 1997. Referenciado por: Anónimo<sup>3</sup>, 2006. Martha Mine, New Zeland.  
<http://www.marthamine.co.nz/cyanide.html>. (Consultado: Mayo 22 de 2006).

Mudder and Whitlock, 1984; Mudder et al., 1995. Referenciado por: Akcil Ata. 2003. Destruction of cyanide in gold mill effluents: biological versus chemical treatments. Biotechnology Advances. 21: 501-511

Palmer et al., 1988; Watanabe et al., 1998. Referenciado por: Kao C.M., Liu J.K., Lou H.R., Lin C.S., Chen S.C. 2003. Biotransformation of cyanide to methane and ammonia by *Klebsiella oxytoca*. Chemosphere. 50: 1055-1061.

Patil and Paknikar, 1999. Referenciado por: Aitimbetov Timur; White Daniel M. Seth Indranil. 2005. Biological gold recovery from gold–cyanide solutions. *Int. J. Miner. Process.* 76: 33-42.

Pereira P. T., Arrabaça J. D., Amaral-Collaço M. T. 1996. Isolation, Selection and Characterization of a Cyanide-Degrading Fungus from an Industrial Effluent. *International Biodeterioration & Biodegradation.* 45-52.

Porter et al., 1983 ; Chena and Liu, 1999; Yanase et al., 2000. Referenciado por: Kao C.M., Liu J.K., Lou H.R., Lin C.S., Chen S.C. 2003. Biotransformation of cyanide to methane and ammonia by *Klebsiella oxytoca*. *Chemosphere.* 50: 1055-1061.

Porter and Knowles 1979. Referenciado por: Dubey S.K., Holmes D.S. 1995. Biological cyanide destruction mediated by microorganisms. *World Journal of Microbiology & Biotechnology.* 11: 257-265.

Raybuck, 1992; Dubey and Holmes, 1995. Referenciado por: Kao C.M., Liu J.K., Lou H.R., Lin C.S., Chen S.C. 2003. Biotransformation of cyanide to methane and ammonia by *Klebsiella oxytoca*. *Chemosphere.* 50: 1055-1061.

Sorokin Dimitry Y., Tourova Tatyana P, Lysenko Anatoly M., Kuenen J. Gijs. 2001. Microbial Thiocyanate Utilization under Highly Alkaline Conditions. *Applied and Environmental microbiology.* 67 (2): 528–538

Tarr, Shahida. 2004. Yeasts from Lesotho – their Classification and Possible Applications.

<http://etd.uovs.ac.za/ETD-db//theses/available/etd-09292005-160929/unrestricted/TARRS.pdf#search=%22pichia%20Bohmeri%20Bbioremediation%22>. (Consultado: Octubre 10 de 2006).

Ulfig, Krzysztof; Paza, Grayna; Tien, Albert J; Worsztynowicz, Adam; Hazen, Terry; Altman, Denis. 2005. Microbiological Aspects of Bioremediation.  
<http://www.containment.fsu.edu/cd/content/pdf/488.pdf#search=%22exophiala%2Bbioremediation%22>. (Consultado: Octubre 10 de 2006).

Vatsouria; Vainshtein, M; Kusch, P; Wiessner, A; Kosolapov, D y Kaestner, M. 2005. Anaerobic co-reduction of chromate and nitrate by bacterial cultures of. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 32 (9).  
<http://springerlink.com/content/k1j4152mr196400/>. (Consultado: Octubre 10 de 2006).

Viet, Thi; Senoo, Keishi; Mishima, Takashi; Hisamatsu, Makoto. 2001. Multiple tolerance of *Rhodotorula glutinis* R-1 to acid, aluminum ion and manganese ion, and its unusual ability of neutralizing acidic medium. *Journal of bioscience and bioengineering*. 32 (4): 366-371  
<http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsid=14149305>. (Consultado: Octubre 10 de 2006).

Watanabe et al., 1998. Referenciado por: Kao C.M., Liu J.K., Lou H.R., Lin C.S., Chen S.C. 2003. Biotransformation of cyanide to methane and ammonia by *Klebsiella oxytoca*. *Chemosphere*. 50: 1055-1061.

White and Schnabel, 1997; White et al., 2000. Referenciado por: Aitimbetov Timur; White Daniel M. Seth Indranil. 2005. Biological gold recovery from gold–cyanide solutions. *Int. J. Miner. Process*. 76: 33-42.

White and Schnabel, 1997; White et al., 1999; Patil and Paknikar, 1999; Goncalves et al., 1998. Referenciado por: Aitimbetov Timur; White Daniel M. Seth Indranil.

2005. Biological gold recovery from gold–cyanide solutions. *Int. J. Miner. Process.* 76: 33-42.

White et al. 1988; Fallon et al. 1991. Referenciado por : Dubey S.K., Holmes D.S. 1995. Biological cyanide destruction mediated by microorganisms. *World Journal of Microbiology & Biotechnology.* 11: 257-265.

Wild, 1987. Referenciado por: Pereira P. T., Arrabaqa J. D., Amaral-Collaço M. T. 1996. Isolation, Selection and Characterization of a Cyanide-Degrading Fungus from an Industrial Effluent. *International Biodeterioration & Biodegradation.* 45-52.

## ANEXOS

### ANEXO 1

#### PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS

##### *Prueba de la Oxidasa*

###### Material

Tiras de papel con reactivo de oxidasa, pipeta Pasteur y cultivo microbiano.

###### Técnica

Con una pipeta Pasteur, cerrada y cargada de bacterias, se trazan rayas sobre una tira de papel impregnada en solución acuosa al 1% de cloruro de tetrametil para-fenilen-diamina ( Anónimo<sup>8</sup>,2006).

##### *Agar Cetrimide*

Peptona de Glatina	10 gr / L
Cloruro de Magnesio	1.4 gr / L
Sulfato de Potasio	10 gr 7 L
N Cetil NNN Trimetil Amonium Bromuro	0.3 gr / L
Agar Agar	13 gr / L
Glicerol (opcional)	10 gr / L

Disolver los componentes en el agua, a excepción del agar, y ajustar el pH a 7,0. Añadir el agar y el glicerol, calentando el medio hasta ebullición para que se disuelva por completo. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Dejar enfriar hasta 50 °C y dispensar el medio estéril en placas de Petri.

## ***Producción de Pigmentos***

### Material

Placas de agar F (medio King B) y agar P (medio King A) y cultivo bacteriano.

### Técnica

Inocular cada una de las placas de agar F y agar P con los microorganismos, trazando con el asa estrías paralelas. Incubar a 37°C durante 24 horas, en posición invertida.( Anónimo<sup>8</sup>,2006).

### ***Agar Agar P (medio King A)***

Peptona	20 g
Sulfato potásico	10 g
Cloruro magnésico	1,4 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver los componentes en el agua, a excepción del agar, y ajustar el pH a 7,0. Añadir el agar y 10 g de glicerol, calentando el medio hasta ebullición para que se disuelva por completo. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Dejar enfriar hasta 50 °C y dispensar el medio estéril en placas de Petri .

### ***Agar F (medio King B)***

Peptona	20 g
Fosfato bipotásico	1,5 g
Sulfato magnésico	1,5 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver los componentes en el agua, a excepción del agar, y ajustar el pH a 7,0. Añadir el agar y 10 g de glicerol, calentando el medio hasta ebullición para que se disuelva por completo. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Dejar enfriar y dispensar el medio estéril en placas de Petri y dejar solidificar.

### ***Prueba de la Catalasa***

#### *Material*

Agua oxigenada de 30 volúmenes, cultivo bacteriano y portaobjetos.

#### *Técnica*

En un portaobjetos se depositan una o dos gotas de agua oxigenada de 30 volúmenes y se pone en contacto con ella una colonia de los microorganismos a estudiar con ayuda del asa de siembra.

### ***Manitol Salado Agar***

**Tabla 14 . Preparación del medio Manitol (Anónimo<sup>10</sup>,2006).**

<b>Fórmula (en gramos por litro)</b>		<b>Instrucciones</b>
Extracto de carne	1.0	Suspender 111 g de polvo por litro de agua destilada. Reposar 5 minutos y mezclar calentando a ebullición durante 1 o 2 minutos. Distribuir y esterilizar en autoclave a 118-121°C durante 15 minutos.
Pluripeptona	10.0	
d-Manitol	10.0	
Cloruro de sodio	75.0	
Agar	15.0	
Rojo de fenol	0.025	
pH final: 7.4 ± 0.2		

#### *Siembra*

Sembrar en superficie un inóculo denso de la muestra.

#### *Incubación*

De rutina: durante 18-24 horas a 35-37 °C, en aerobiosis.

La American Public Health Association (A.P.H.A) recomienda la incubación durante 3 días a 32 °C, en aerobiosis. (Anónimo<sup>10</sup>,2006).

### ***Baird Parker Medio Base***

**Tabla 15 . Preparación del Medio Baird Parker (Anónimo<sup>11</sup>,2006).**

<b>Fórmula (en gramos por litro)</b>		<b>Instrucciones</b>
Peptona de caseína	10.0	Suspender 60 g del medio deshidratado en 940ml de agua destilada. Dejar en reposo 5 a 10 minutos. Calentar agitando frecuentemente y hervir durante 1 minuto. Distribuir y esterilizar en autoclave a 121°C (15 libras) durante 15 minutos. Enfriar a 45°-50°C y agregar 50 ml de la emulsión de yema de huevo y 10ml de la solución de telurito (Código B03-601-61). Homogeneizar y distribuir en cajas de Petri.
Extracto de carne	5.0	
Extracto de levadura	1.0	
Cloruro de litio	5.0	
Agar	17.0	
Glicina	12.0	
Piruvato de sodio	10.0	
pH final: 6.8 ± 0.2		

### ***Siembra***

Dejar secar la superficie de la placa preparada y extender 0.1 ml de la dilución de la muestra a analizar.

### ***Incubación***

24-48 horas a 35-37 °C, en aerobiosis.

## ANEXO 2

### RESULTADOS DE LAS PRUBAS BIOQUIMICAS DE LAS LEVADURAS Y EL HONGO.

<b>DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA SECCION MICOLOGIA FACULTAD DE MEDICINA UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA</b>		
Carrera 51D No 62-29 Tel. 210 6053 – 210 6054 Medellin, Colombia		
<hr/> <b>INFORME DE LABORATORIO</b> <hr/>		
Nombre: PORRAS SANDRA MARCELA (Proyecto Efluente de recubrimientos metálicos)	Registro: 0509023	
Teléfono: 2619500	Fecha: 18/09/2006	
Institución: Universidad EAFIT	Cepa F:	
Solicitado: Tipificación de Cepas	Cepa H:	
<hr/>		
<p>Cepa F: La colonia (color salmón) y las estructuras microscópicas (blastoconidias) corresponden a <i>Rhodotorula</i> spp. Las pruebas bioquímicas de asimilación (API 20C AUX) la identifican como <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>.</p>		
<p>Cepa H: La colonia en sabouraud evidencia el crecimiento de un moho pigmentado. Las estructuras microscópicas corresponden a un moho dematiáceo con células conidiógenas tipo anélido de <i>Exophiala</i> spp.</p>		
 Firma Laboratorista		

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA Y  
PARASITOLOGIA  
SECCION MICOLOGIA  
FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA



Carrera 51D No 62-29  
Tel. 210 6053 – 210 6054  
Medellin, Colombia

---

INFORME DE LABORATORIO

---

Nombre: PORRAS SANDRA MARCELA (Proyecto Efluente de recubrimientos metálicos) Registro: 0609023

Teléfono: 2819500

Fecha: 19/09/2006

Institución: Universidad EAFIT

Cepa A:

Cepa B:

Solicitado: Tipificación de Cepas

---

Cepa A: La colonia (blanca a crema) y las estructuras microscópicas (blastoconidias y pseudohifas) corresponden a *Candida* spp. Las primeras pruebas bioquímicas de asimilación (API 20C AUX) la identifican como *Candida parapsilosis* con 65% de probabilidad, por ello se procederá a resislar e identificar la morfología de las colonias y repetir las pruebas bioquímicas.

Cepa B: La colonia (blanca a crema) y las estructuras microscópicas (blastoconidias y pseudohifas) corresponden a *Candida* spp. Las pruebas bioquímicas de asimilación la identifican como *Pichia ohmeri*.

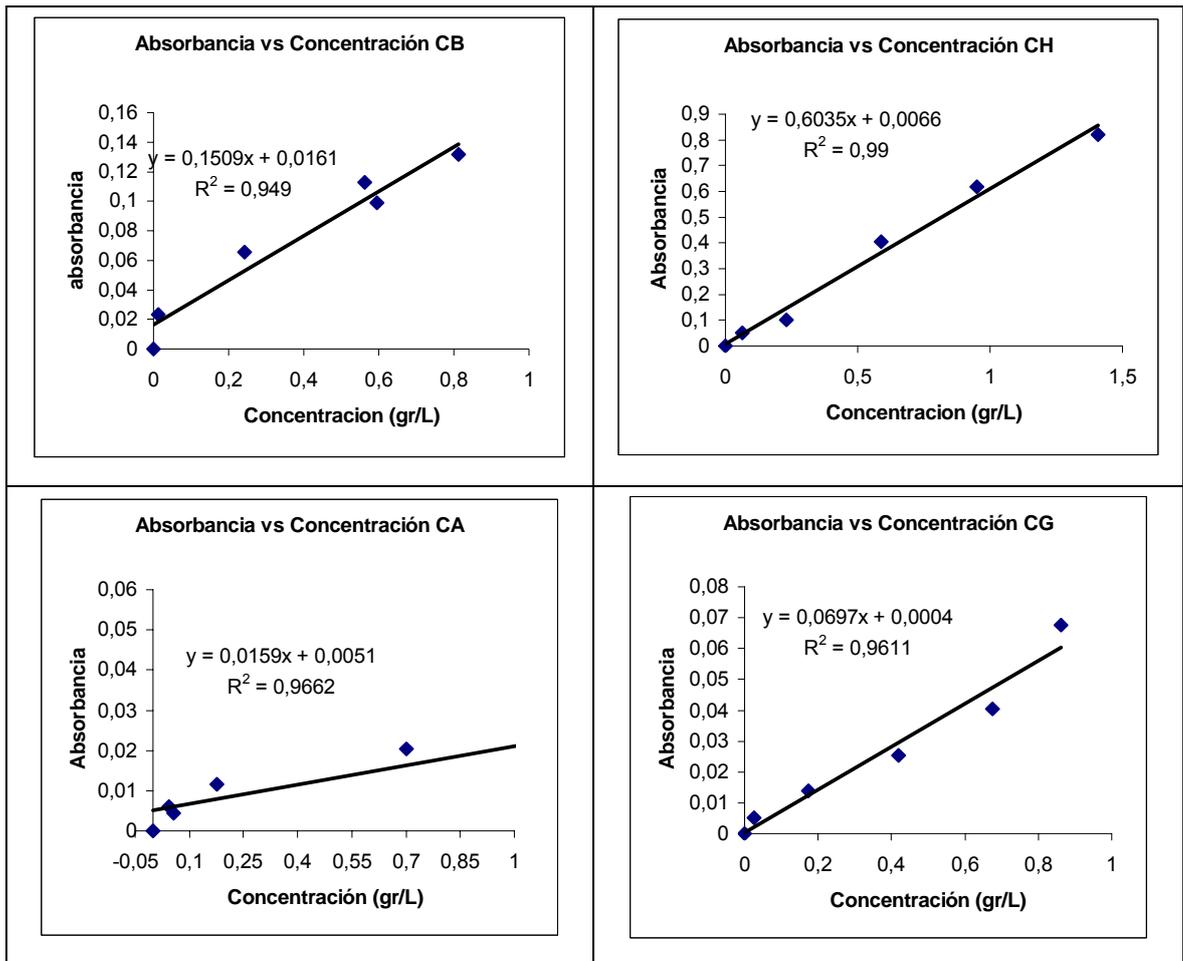
---

Firma Laboratorista

### ANEXO 3

#### CURVAS DE CALIBRACION DE PESO SECO

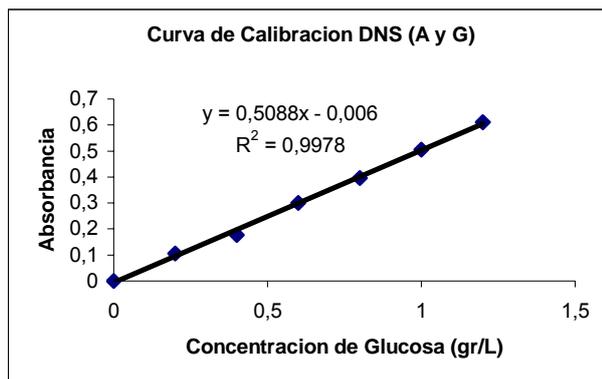
Figura 52. Curvas de calibración de peso seco para los microorganismos B, H, A y G



## ANEXO 4

### CURVA DE CALIBRACION DEL MÉTODO ÁCIDO DINITROSALICÍLICO (DNS)

Gráfica 1. Curva de Calibración del Método DNS



## ANEXO 5

### CURVA DE CALIBRACION DE LA CONCENTRACIÓN DE CIANURO

Gráfica 2. Curva de calibración de cianuro

