

**“EVALUACIÓN DE LA INMOVILIZACIÓN DE *Pseudomonas fluorescens*
PARA LA BIODEGRADACIÓN DE CIANURO EN SOLUCIÓN ACUOSA”**

**FRANCISCO JAVIER NARANJO VALENCIA
MANUEL ANDRÉS SANTA MARÍA LARA**

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

**“EVALUACIÓN DE LA INMOVILIZACIÓN DE *Pseudomonas fluorescens*
PARA LA BIODEGRADACIÓN DE CIANURO EN SOLUCIÓN ACUOSA”**

**FRANCISCO JAVIER NARANJO VALENCIA
MANUEL ANDRÉS SANTA MARÍA LARA**

**ASESORA: Catalina Giraldo Estrada
Ingeniera de Procesos**

**Trabajo de investigación presentado para optar al título de Ingeniero de
Procesos**

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

Nota de aceptación:

Firma del presidente del jurado

Jurado

Jurado

Ciudad y fecha

AGRADECIMIENTOS

CATALINA GIRALDO ESTRADA, Docente del departamento de Ingeniería de Procesos de la Universidad EAFIT, por su asesoría para la realización del proyecto.

EDGAR DARIO ARBELÁEZ, Coordinador de los laboratorios de Ingeniería de Procesos de la Universidad EAFIT, por su gran colaboración durante la elaboración del proyecto.

ERIC ALEJANDRO MENESES, Ingeniero Químico de la Universidad Nacional.

JOHN JAIRO ESTRADA, Auxiliar de los laboratorios de Ingeniería de Procesos.

PAOLA ANDREA CAMARGO Y CAROLINA OSSA, Ingenieras de procesos.

SIGIFREDO ANTONIO CÁRDENAS, por la colaboración prestada en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad EAFIT.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	13
RESUMEN	16
1. OBJETIVOS	18
1.1 OBJETIVO GENERAL	18
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
2. MARCO TEÓRICO	19
2.1 EL CIANURO	19
2.1.1 Intoxicación por cianuro	21
2.2 ALTERNATIVAS PARA DEGRADAR CIANURO	21
2.3 <i>Pseudomonas fluorescens</i>	23
2.4 INMOVILIZACIÓN	25
2.5 MÉTODOS DE INMOVILIZACIÓN CELULAR	26
3. MATERIALES Y EQUIPOS	30
3.1 MATERIALES	30
3.2 Equipos	30
3.2.1 Especificaciones de la bomba peristáltica	31
3.2.2 Especificaciones del compresor de aire	33
3.2.3 Especificaciones de columnas	33
4. METODOLOGÍA	35
4.1 MICROORGANISMO	35
4.2 MEDIO DE CULTIVO	35
4.3 MEDICIÓN DE CIANURO	35
4.3.1 Construcción de la gráfica de calibración	36
4.3.2 Mediciones	37
4.4 ADAPTACIÓN DEL MICROORGANISMO EN EL MEDIO	38
4.5 INMOVILIZACIÓN CELULAR POR ATRAPAMIENTO	39

4.5.1	Matrices de inmovilización	39
4.5.2	Inoculo	39
4.5.3	Nutrientes	39
4.5.4	Proceso de preparación de las esferas	40
4.5.4.1	Esferas de agar-agar	40
4.5.4.2	Esferas de alginato de calcio	40
4.6	ENSAYOS PRELIMINARES	41
4.7	DISEÑO DE EXPERIMENTOS	42
4.8	PROCESO BIODEGRADATIVO	43
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
5.1	ADAPTACIÓN DEL MICROORGANISMO EN MEDIO LÍQUIDO	46
5.2	CINÉTICA DE CRECIMIENTO CELULAR Y DEGRADACIÓN DE CIANURO EN CULTIVO SUMERGIDO	47
5.3	RESULTADOS DEL PROCESO BIODEGRADATIVO	48
5.3.1	Resultados obtenidos con agar-agar como matriz de inmovilización	48
5.3.1.1	Control para determinación de la variación de la concentración de cianuro con agar-agar como matriz de inmovilización	48
5.3.1.2	Proceso biodegradativo con agar-agar como matriz de inmovilización	49
5.3.2	Resultados obtenidos con alginato de calcio como matriz de inmovilización	53
5.3.2.1	Control para determinación de la variación de la concentración de cianuro con alginato de calcio como matriz de inmovilización	53
5.3.2.2	Proceso biodegradativo con alginato de calcio como matriz de inmovilización	53

5.3.3	Velocidades de degradación	58
5.4	ANÁLISIS DE DISEÑO DE EXPERIMENTOS	59
5.4.1	Análisis de varianza	60
5.4.2	Prueba del rango múltiple de Duncan	61
5.4.2.1	Caudal	61
5.4.2.2	Matriz	62
5.4.2.3	Tiempo	64
5.4.2.4	Comparaciones cruzadas	65
5.4.3	Condiciones óptimas de operación	67
5.5	ENSAYOS ADICIONALES	67
5.5.1	Ensayo con agar-agar a pH 8.6	67
5.5.2	Ensayo sin esterilizar	70
6.	ESTIMACIÓN ECONOMICA	73
6.1	COSTO DE CAPITAL	73
6.2	COSTO DE OPERACIÓN	74
6.2.1	Costo de materias primas	74
6.2.2	Costo de mano de obra	75
6.2.3	Costo de servicios industriales	76
6.3	COSTO TOTAL	76
6.4	INDICADORES ECONOMICOS	77
	CONCLUSIONES	79
	RECOMENDACIONES	82
	BIBLIOGRAFÍA	83
	ANEXOS	89

LISTA DE TABLAS

		Pág.
Tabla 1.	Células microbianas inmovilizadas por atrapamiento	28
Tabla 2.	Especificaciones de la bomba peristáltica.	32
Tabla 3.	Especificaciones del compresor de aire	33
Tabla 4.	Datos técnicos de la columna.	34
Tabla 5.	Factores y niveles del diseño de experimentos.	42
Tabla 6.	Tiempos de residencia y caudales	43
Tabla 7.	Control de la variación de la concentración de cianuro en las esferas de agar-agar (sin células inmovilizadas).	49
Tabla 8.	Datos obtenidos en agar-agar como matriz y con un caudal de 0,17 mL/s	50
Tabla 9.	Datos obtenidos en agar-agar como matriz y con un caudal de 0,23 mL/s	50
Tabla 10.	Datos obtenidos en agar-agar como matriz y con un caudal de 0,29 mL/s	51
Tabla 11.	Control de variación de la concentración de cianuro en las esferas de alginato de calcio (sin células inmovilizadas) a pH 8.6	53
Tabla 12.	Datos obtenidos en alginato de calcio como matriz y con un caudal de 0,17 mL/s	54
Tabla 13.	Datos obtenidos en alginato de calcio como matriz y con un caudal de 0,23 mL/s	54
Tabla 14.	Datos obtenidos en alginato de calcio como matriz y con un caudal de 0,29 mL/s	55
Tabla 15.	Velocidades de degradación en agar-agar y alginato de calcio como matrices de inmovilización	58
Tabla 16.	Tabla Anova	60

Tabla 17.	Prueba de Duncan para el caudal	61
Tabla 18.	Prueba de Duncan para matriz	63
Tabla 19.	Prueba de Duncan para tiempo	64
Tabla 20.	Condiciones óptimas de operación	67
Tabla 21.	Datos ensayo agar-agar pH 8,6 y 9,6 con caudal de 0,17 mL/s	67
Tabla 22.	Análisis de varianza para ensayos con agar, caudal 0,17 mL/s a pH 8.6 y 9.6	68
Tabla 23.	Prueba del rango múltiple de Duncan	69
Tabla 24.	Datos ensayo agar-agar, caudal 0,17 mL/s y sin Esterilizar	70
Tabla 25.	Análisis de varianza para ensayos con agar, caudal 0,17 mL/s a pH con y sin esterilizar	71
Tabla 26.	Prueba del rango múltiple de Duncan	71
Tabla 27.	Costo de los equipos	74
Tabla 28.	Costos de reactivos	74
Tabla 29.	Costos de reactivos necesarios para el montaje del Proceso	75
Tabla 30.	Costos de mano de obra	75
Tabla 31.	Servicios industriales basados en costos proporcionados por la Universidad EAFIT	76
Tabla 32.	Costo total del montaje	76
Tabla 33.	Indicadores económicos	77

LISTA DE GRÁFICAS

	Pág.
Gráfica 1. Relación entre HCN y cianuro con el pH	20
Gráfica 2. Curva estándar del electrodo de ión selectivo de cianuro	37
Gráfica 3. Cinética de crecimiento realizada en cultivo sumergido.	47
Gráfica 4. Comparación de degradación entre los tres caudales y el control en agar-agar como matriz.	52
Gráfica 5. Comparación de degradación entre los tres caudales y el control en alginato de calcio como matriz.	56
Gráfica 6. Comparación de la degradación de cianuro en las dos matrices y los tres caudales trabajados. A: caudal 0,17 mL/s; B: caudal 0,23mL/s; C: caudal 0,29 mL/s	58
Gráfica 7. Prueba de Duncan para el caudal	62
Gráfica 8. Prueba de Duncan para matriz	63
Gráfica 9. Prueba de Duncan para tiempo	64
Gráfica10. Relación del caudal y la matriz con respecto al porcentaje de degradación.	65
Gráfica 11. Relación del caudal y el tiempo con respecto a la degradación.	66
Gráfica 12. Relación de la matriz y el tiempo con respecto a la degradación.	66
Gráfica 13. Comparación entre ensayos a pH 8,6 y 9,6 bajo las mismas condiciones de caudal y matriz.	68
Gráfica 14. Comparación de ensayo estéril y ensayo sin esterilizar bajo las mismas condiciones de operación.	70

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Bomba peristáltica Masterflex	32
Figura 2. Compresor de aire Elite 801	33
Figura 3. Columna de cromatografía	34
Figura 4. Electrodo de ión selectivo de cianuro	36
Figura 5. Medición de la concentración de cianuro	38
Figura 6. Montaje para la biodegradación de cianuro con células Inmovilizadas	44
Figura 7. Diagrama de flujo del proceso para la biodegradación De cianuro con células inmovilizadas	45
Figura 8. Tinción de Gram realizada después del proceso Biodegradativo	72

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO A. Análisis estadístico obtenido con el Software SAS	10
ANEXO B. Análisis estadístico obtenido con el Software Statgraphics para el cambio de pH	20 30
ANEXO C. Análisis estadístico obtenido con el Software Statgraphics para el ensayo sin esterilizar	40 50
ANEXO D. Cotización 1 reactivos	60
ANEXO E. Cotización 2 reactivos	70
ANEXO F. Cotización 3 reactivos	80
ANEXO G. Cotización columnas de cromatografía	90
ANEXO H. Cotización de bomba peristáltica	10

INTRODUCCIÓN

Día a día el hombre se preocupa por mejorar sus condiciones de vida presente y futura. Durante el último siglo, el ser humano ha creado toda una industria a su alrededor la cual contribuye a satisfacer las necesidades que existen en la sociedad, pero no se ha fijado en el daño que le ha causado al ecosistema para conseguir lo que quiere.

La contaminación con cianuro es una de las consecuencias que ha traído la industrialización, siendo éste un compuesto altamente tóxico, el cual contiene carbono y nitrógeno unidos por un enlace triple; es capaz de reaccionar fácilmente con metales pesados, inclusive en muy bajas concentraciones y puede absorberse por los tejidos con facilidad. Informaciones recientes indican que cada año se utiliza más de un millón de toneladas de cianuro en la producción de químicos orgánicos como el nitrilo, el nylon y los plásticos acrílicos, los cuales representan alrededor del 80% de la producción total. Otras aplicaciones industriales en las cuales interviene este compuesto incluyen la galvanoplastia, el procesamiento de metales, la extracción del oro, las aplicaciones fotográficas y la producción de goma sintética (Logsdon *et al.*, 2003).

De estos procesos se generan efluentes con cianuro, los cuales deben ser tratados para minimizar los impactos sobre el ambiente. Los métodos tradicionales en el tratamiento de aguas residuales han demostrado ser incapaces de remover muchos contaminantes biorrecalcitrantes, creando la necesidad de nuevos tratamientos eficientes. Durante los últimos 25 años, las investigaciones en purificación de aguas han crecido extensivamente; el riguroso control de contaminantes y la legislación en muchos países han conllevado a una búsqueda intensa para nuevas tecnologías de tratamiento

más eficientes (Parra, 2001). Es por esto que la biotecnología puede convertirse en una de las vías para la solución de estos problemas de contaminación.

Los tratamientos biológicos para degradar cianuro en solución acuosa, pueden convertirse en una técnica económicamente viable, ya que algunos microorganismos pueden metabolizarlo y como consecuencia, transformar los complejos de cianuro como fuentes de carbono y/o nitrógeno, convirtiéndolos en compuestos menos tóxicos para el ambiente (Suh *et al.*, 1994; Mosher y Figueroa, 1996; Ebbs, 2004). Se ha encontrado que las *Pseudomonas fluorescens* son los microorganismos que presentan una mayor eficiencia en la degradación de compuestos persistentes y tóxicos (Shivaraman *et al.*, 1991; Suh *et al.*, 1994; Chapatawala *et al.*, 1997; Arzu *et al.*, 2000; Arzu *et al.*, 2002; Akcil, 2003; Gutiérrez *et al.*, 2003; Ebbs, 2004).

La utilidad de la biotecnología en aras de encontrar un mejor futuro para la humanidad en aspectos tales como el económico, social y ecológico, estimula a realizar estas investigaciones. Bacterias como la *Pseudomonas* han mostrado una respuesta positiva en la degradación de cianuro, el contaminante a tratar, y técnicas como la inmovilización de células se pueden utilizar con este propósito, para aumentar la eficiencia del proceso con una disminución de costos. (Dictor *et al.*, 1997; Kowalska *et al.*, 1998).

La inmovilización consiste en unir una molécula o conjunto de moléculas a un soporte insoluble. Este método se puede utilizar para inmovilizar enzimas y células. Entre las aplicaciones más importantes se encuentran los biocatalizadores inmovilizados, la cromatografía de afinidad y la industria de reacciones soportadas sobre polímeros. Se ha estudiado diferentes soportes (orgánicos e inorgánicos como: quitosan, poliuretano, polivinilalcohol y carragenina, entre otros) para la mejor inmovilización de células de

Pseudomonas (Jerabkova *et al.*, 1999), con lo cual se lograría un proceso más eficiente ya que éstas pueden ser utilizadas más de una vez, además el proceso se podría llevar a cabo de forma continua, ahorrando tiempo, materiales y recursos valiosos, siendo éstos de suma importancia para la industria.

Esta investigación busca desarrollar un proceso de inmovilización de células de *Pseudomonas fluorescens* para la biodegradación de Cianuro en solución acuosa que pueda ser llevado posteriormente a escala piloto y/o industrial.

RESUMEN

Muchas empresas que utilizan cianuro en sus procesos no controlan éstos técnicamente, lo que lleva a la utilización de cantidades de cianuro por encima de las necesarias, generando altas descargas de este compuesto. El cianuro presenta efectos nocivos, entre los que se pueden destacar su alta toxicidad y su efecto inhibitorio en la respiración celular.

En este trabajo se investigó la alternativa biológica de degradar cianuro evaluando, a escala laboratorio, el comportamiento de la concentración de cianuro, presente en solución acuosa, con una concentración inicial de 15 ppm, empleando la técnica de inmovilización celular.

Para el desarrollo de esta investigación se utiliza una cepa de *Pseudomonas fluorescens* aislada del lodo proveniente de la industria de recubrimientos metálicos, e identificada por Camargo y Ossa (2005), la cual se encuentra conservada a 4°C en el laboratorio de Biotecnología de la universidad EAFIT.

La bacteria es adaptada en un medio que contiene 15 ppm de cianuro y 1,2 g/L de caldo nutritivo en buffer carbonato a pH 9,6. Durante la biodegradación se cuantifica el porcentaje y velocidad de degradación, en dos matrices de inmovilización (agar-agar y alginato de calcio) y a tres diferentes caudales (0,17 mL/s, 0,23 mL/s y 0,29 mL/s).

Las condiciones óptimas para el proceso de biodegradación de cianuro con células inmovilizadas se obtienen con la matriz agar-agar y con un caudal de 0,17 mL/s. Los resultados obtenidos indican que el tratamiento biológico de células inmovilizadas empleando *Pseudomonas fluorescens* puede ser más competitivo que otros tratamientos biológicos.

Los resultados alcanzados muestran que la concentración de cianuro bajo las condiciones de operación óptimas se reduce en un 99.12% en 48 horas a una velocidad de degradación 1,0445 mg/L-h, estos resultados indican que puede emplearse la inmovilización de *Pseudomonas fluorescens* para el tratamiento de aguas contaminadas con cianuro.

Palabras clave: Inmovilización, biodegradación, cianuro, *Pseudomonas*.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la degradación, a escala laboratorio, de cianuro en solución acuosa, utilizando el método de inmovilización por atrapamiento aplicado a la bacteria *Pseudomonas fluorescens*.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la incidencia de dos soportes para la inmovilización de la *Pseudomonas fluorescens* y tres caudales de la solución de cianuro, sobre el proceso biodegradativo, a escala de laboratorio, midiendo la concentración de cianuro por el método del electrodo de ión selectivo, a la entrada y salida del proceso.
- Determinar el mejor proceso de biodegradación de cianuro en solución entre la inmovilización de *Pseudomonas fluorescens* bajo las condiciones de operación seleccionadas y el cultivo de células en suspensión previamente reportado, comparando las eficiencias de degradación obtenidas.
- Hacer una estimación de los costos del proceso a partir de los datos recolectados en el laboratorio, los materiales y equipos para tener un criterio de viabilidad del proceso.

2. MARCO TEÓRICO

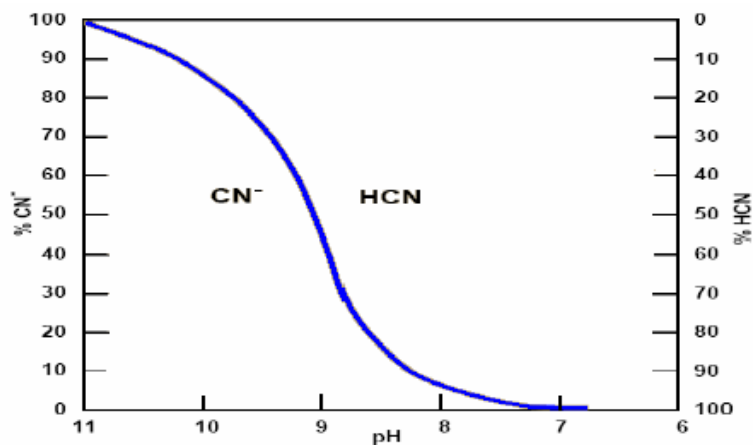
2.1 EL CIANURO

Los cianuros son compuestos formados por la unión de átomos de carbono y nitrógeno que puede ocurrir en forma natural o ser sintetizados. La mayoría son venenos potentes y de acción rápida. El cianuro de hidrógeno, que es un gas, y las sales simples de cianuro de sodio y potasio son ejemplos de los compuestos que son producidos por el hombre. Algunas bacterias, hongos y algas pueden producir cianuro, también se puede encontrar en numerosos alimentos y plantas. Los cianuros ocurren en forma natural como parte de azúcares o de otros compuestos naturales en algunas plantas comestibles, por ejemplo almendras, algunos tipos de frijoles, soya, espinaca, vástagos de bambú y raíces de mandioca las cuales son una fuente importante de alimentación en países tropicales (Logsdon *et al.*, 2003).

Muchos de los cianuros en el suelo o el agua provienen de procesos industriales. Las sales de cianuro y el cianuro de hidrógeno son los compuestos con mayor probabilidad de ocurrir en el ambiente como producto de las actividades industriales, se usan en galvanoplastia, metalurgia, revelado de fotografías, manufactura de plásticos, fumigación de barcos y en algunos procesos de minería. Las fuentes principales de descargas de cianuro en suelo y agua se originan en algunos procesos de minado de minerales, industrias de sustancias químicas orgánicas, manufactura de hierro o acero. Otras fuentes son el tubo de escape de vehículos, liberaciones desde algunas industrias químicas, la incineración de basura municipal y el uso de algunos plaguicidas (ATSDR, 2005).

El cianuro de hidrógeno es un gas incoloro con leve olor amargo a almendras. El cianuro de sodio y de potasio son sólidos blancos con leve olor amargo a almendras en ambientes húmedos.

El ión de cianuro (CN^-) que se disuelve en el agua del proceso como cualquier cianuro de hidrógeno (HCN) que se forma en la solución se denomina "Cianuro libre". Las briquetas sólidas de cianuro de sodio se disuelven en el agua para formar el ión de sodio y el anión de cianuro (CN^-). El anión de cianuro se combina luego con el ión de hidrógeno para formar HCN molecular. La concentración del ión de hidrógeno en el agua del proceso se expresa mediante el conocido parámetro pH. Casi todo el cianuro libre está presente como HCN cuando hay abundantes iones de hidrógeno presentes, es decir, a un valor de pH de 9.3 o menos. El HCN, entonces, puede volatilizarse y dispersarse en el aire. Cuando el pH es superior a 10.5, hay pocos iones de hidrógeno presentes y casi todo el cianuro libre está presente como CN^- . En condiciones normales de temperatura y presión, las concentraciones de HCN y CN^- son iguales a un valor de pH de aproximadamente 9.4. En la gráfica 1 se muestra la relación entre el HCN y el cianuro con el pH (Smith y Mudder, 1991).



Gráfica 1. Relación entre HCN y cianuro con el pH (Smith y Mudder, 1991).

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

2.1.1 Intoxicación por Cianuro

La severidad de las consecuencias producidas por la exposición al cianuro depende, en parte, del tipo de compuesto.

El cianuro es un inhibidor enzimático que bloquea la producción de ATP (Adenosín Trifosfato) induciendo a la hipoxia celular. La exposición a niveles altos de cianuro por un período breve causa daños en cerebro y corazón, causando un estado de coma y la muerte.

Algunos de los primeros indicios de envenenamiento por cianuro son: respiración profunda y rápida, falta de aliento, seguidos por convulsiones y pérdida del conocimiento. Estos síntomas pueden ocurrir rápidamente, dependiendo de la cantidad de cianuro ingerida. Los efectos a la salud luego de respirar, ingerir o beber grandes cantidades de cianuro son similares. El cianuro entra al cuerpo a través de la piel más lentamente que cuando se respira o ingiere. El cianuro de hidrógeno y las sales de cianuro pueden causar irritación y ampollas en la piel. (Córdoba, 2000; Fuentes y Gómez, 2001; ATSDR, 2005)

2.2 ALTERNATIVAS PARA DEGRADAR CIANURO

Como se mencionó anteriormente, las aguas residuales de los efluentes procedentes de procesos industriales, tales como recubrimientos metálicos,

refinación de metales de oro, plata, limpieza de gases procedentes de hornos, cementación de aceros, entre otros, contienen distintas formas de cianuros que, por su alta toxicidad, han de ser tratadas antes de ser vertidas a los cauces públicos (Blanco y Malato, 2001).

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

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

Para realizar la biodegradación es necesario considerar algunas etapas.

- Caracterizar el Contaminante: Se deben conocer los parámetros básicos como concentración de contaminante, DBO, DQO, pH y temperatura.
- Selección del Microorganismo: Esta etapa es muy importante ya que cada especie presenta diferentes capacidades para la biodegradación; para la remediación de aguas contaminadas con trazas de cianuro la literatura recomienda emplear bacterias del género *Pseudomonas*. (Suh *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1996).

- Medio de cultivo: todos los microorganismos vivos necesitan cierta cantidad de macronutrientes y micronutrientes o trazas de elementos para sobrevivir y realizar todas sus funciones metabólicas.
- Inóculo: es el proceso que se lleva a cabo para dar inicio al cultivo.
- Cultivo: esta etapa es la parte más importante en el proceso de biorremediación, porque es aquí donde se da la biotransformación o bioadsorción de los contaminantes (Eweis y Ergas, 1999; White *et al.*, 2000). Puede hacerse en cultivo sumergido o con células inmovilizadas, siendo esta técnica de especial interés en los últimos años, debido a que se pueden reducir los tiempos de operación, aumentar los volúmenes tratados y, en general, puede resultar más económica.

Cuando se emplean microorganismos que convierten los cianuros libres y complejos en formas menos tóxicas se tienen las siguientes ventajas: la destrucción de todas las formas de cianuro y no se da inhibición en la degradación por la presencia de metales pesados (Smith y Mudder, 1991; Yurramendi *et al.*, 1994; Akcil, 2003).

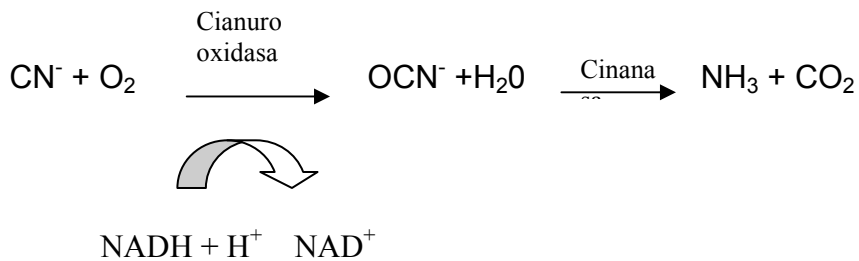
2.3 *Pseudomonas fluorescens.*

Son bacterias que pertenecen al reino prokaryotae, poseen membrana y pared celular bien definida, pertenecen a la familia *Pseudomonadaceae*, son bacilos Gram Negativo, rectos o curvados no vibriodes, sin esporas, vainas, ni apéndices, con flagelos polares, son organismos aerobios organotróficos sin metabolismo fermentativo que dependen de reacciones de óxido reducción para obtener energía y utilizan sustancias oxidables a pH neutro o básico. Su diámetro se encuentra entre 0.7-0.8 μm . Se reproducen a temperaturas mesófilas (entre 25 y 30°C); presentan gran capacidad para utilizar una diversidad de nutrientes como donadores y aceptores de electrones, haciéndolos nutricionalmente muy sencillos y permitiéndoles una

amplia distribución en la naturaleza. Arrojan resultados positivos en pruebas bioquímicas como Oxidasa y Catalasa. (Macfaddin, 1980; Breed, 1997)

Su diversidad nutricional y por lo tanto su dotación enzimática, hace de estas bacterias un grupo importante ecológicamente, dado que son probablemente responsables de la degradación aeróbica de muchos compuestos en los diferentes ecosistemas, algunos de ellos tóxicos para otros organismos acompañantes. (Macfaddin, 1980; Breed, 1997).

Se ha logrado la adaptación de algunos sistemas biológicos a altas concentraciones de cianuro, como es el caso de *Pseudomonas fluorescens*, la cual involucra la oxidación de cianuro por la siguiente ruta metabólica (Suh *et al.*, 1994):



Dhillon y Shivaraman (1999), evaluaron una especie de *Pseudomonas* en la degradación de diferentes compuestos con cianuro y determinaron que estas usan los nitrilos como fuente de carbono y nitrógeno, los compuestos evaluados los categorizaron de mayor a menor degradación así: acetonitrilo, butironitrilo, acrilonitrilo, adiponitrilo, benzonitrilo, glutaronitrilo, fenilacetona nitrilo y succinonitrilo, además, estudiaron la descomposición de estos compuestos como mezclas binarias y determinaron que la presencia de acrilonitrilo o KCN retardaban la degradación de acetonitrilo en la mezcla, mientras que los otros compuestos de CN afectaban la degradación de los componentes.

En otros estudios, una cepa de *Pseudomonas stutzeri* UP-1 fue inmovilizada en alginato de calcio para la biodesulfuración de combustibles para mejorar las condiciones ambientales ya que el dióxido de sulfuro contribuye a la polución (Kong *et al.*, 2005). También se ha utilizado *Pseudomonas* para la degradación de cianuro proveniente de aguas de desecho de la industria de la joyería (Luque-Almagro *et al.*, 2005).

2.4 INMOVILIZACIÓN

La inmovilización de células es un proceso en el que se confina o localiza a la célula en una región definida del espacio, para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica y que pueden ser reutilizadas repetidamente (Arroyo, 1998).

Este concepto también se aplica a las enzimas debido a que a menudo son lábiles y no son fácilmente reutilizables, de modo que el concepto de enzimas inmovilizadas en cuanto a los catalizadores reusables estabilizados tiene un gran atractivo en la intensificación del proceso y, por lo tanto, afecta la economía de éste.

La inmovilización de células comenzó en los años 70; durante este tiempo de estudio se ha podido establecer que el uso de células inmovilizadas en lugar de aquellas cultivadas en un proceso intermitente normal tiene las siguientes ventajas:

Las fermentaciones en lotes se pueden reemplazar por reacciones continuas. Las células inmovilizadas permiten el uso de una densidad celular considerablemente mayor, con lo que se logra una mayor eficacia del proceso.

Muchas enzimas o metabolitos solo son activos en la fase celular estacionaria o de reposo; en un sistema de inmovilización las células se pueden retener en este estado (Scragg, 2000).

La inmovilización de células, entonces, es una técnica atractiva para fijar y retener biomasa en materiales sintéticos o naturales, bajo un rango de condiciones de operación físicas y bioquímicas. Las ventajas de esta técnica incluyen la retención de biomasa en el ambiente de trabajo, fácil separación de productos desde la célula y una alta densidad celular local (Akzu *et al.*, 1999).

Los criterios para seleccionar un método de inmovilización celular son:

- Debe ser seguro. El enorme costo para la determinación de la seguridad de un producto significa que se debe evitar el uso de reactivos químicos novedosos y se debe usar materiales aceptables para su aplicación en alimentos.
- El proceso no debe ser complicado, puesto que el uso de soportes caros y procedimientos largos aumentará los costos del proceso.
- Debe ser suave con el fin de mantener la viabilidad celular, la integridad de la membrana o la actividad enzimática.
- La actividad celular se debe mantener tanto como sea posible. Esto implica la unión firme de las células al fin de evitar pérdidas por fuga de células, pero no tan extremas como para provocar restricciones difusionales (Scragg, 2000).

2.5 MÉTODOS DE INMOVILIZACIÓN CELULAR

Se han descrito varios métodos y soportes para la inmovilización de bacterias y a menudo, su atrapamiento físico en matrices poliméricas ha sido elegido

con éxito. Se ha estudiado una amplia gama de soportes (orgánicos e inorgánicos) para la mejor inmovilización de células de *Pseudomonas* (Jerabkova *et al.*, 1999). El uso de soportes inertes para inmovilizar células en una secuencia de reactores batch aparece como un método alternativo para mejorar la retención de sólidos y reducir los tiempos de ciclo. De igual forma, la inmovilización de biomasa en soportes inertes elimina la incertidumbre de granulación de lodos (Zaiat *et al.*, 2001).

A continuación se describe uno de los métodos que se utilizan para la inmovilización de células:

Atrapamiento: El atrapamiento de células en una red tridimensional de polímero es un método muy popular. Se ha usado polímeros similares a los de las enzimas para atrapar células completas, como poliacrilamida, poliuretano, colágeno, gelatina, agarosa, alginato y k-carragenano. El alginato es un biopolímero que ha sido usado extensivamente en estudios de inmovilización celular. Entre las ventajas para usarlo se incluye su fácil preparación, biocompatibilidad y capacidad para retener células por atrapamiento en una matriz de finos poros, además es un sistema seguro y simple que ofrece un esfuerzo mecánico adecuado (Dey *et al.*, 2003; Abu Al-Rub *et al.*, 2004). En la tabla 1 se muestra algunos ejemplos de células inmovilizadas por atrapamiento.

Método	Organismo	Producto
Poliacrilamida	<i>E-coli</i>	β -lactamasa
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Etanol
Poliuretano	<i>Capsicum frutescens</i>	Capsaicina
	<i>Aspergillus niger</i>	Ácido cítrico
Agar, agarosa	<i>E. coli</i>	Hidrólisis de lactosa
	<i>Saccharomyces</i>	Sucrosa
	<i>pastorianus</i>	Oxidación de
	<i>Methylomonas</i>	metano
Alginato	<i>Arthobacter simplex</i>	Pedrisolona
	<i>Curvularia</i>	Cortisona
	<i>Gluconobacter oxidans</i>	Dihidroxiacetona
K- carregenano	<i>Acetobacter oxidans</i>	L- sorbosa
	<i>Bacillus amyloliquifaciens</i>	α -amilasa
	<i>Penicillium</i>	Patulina

Tabla 1. Células microbianas inmovilizadas por atrapamiento (Scragg, 2000).

Específicamente, Roig *et al.* (1999) evaluaron los métodos de inmovilización mediante el crecimiento de biopelículas, atrapamiento físico de células y su unión química sobre soportes inorgánicos. Comprobaron que la espuma reticulada de poliuretano proporciona una elevada capacidad de carga celular, actividad biodegradativa satisfactoria, así como estabilidad operacional durante el funcionamiento del biorreactor. Además, el costo de ese soporte es bajo y su síntesis sencilla (Jerabkova *et al.*, 1999).

El mecanismo implicado en la unión de microorganismos sobre superficies sólidas no se ha llegado a elucidar del todo. Sin embargo, parece que algunos tipos de organismos secretan macromoléculas que inician interacción microorganismo-superficie y este puede ser el caso de las

Pseudomonas, que crecen fácilmente como biopelícula unida a soporte sólido (Jerabkova *et al.*, 1999).

Por ejemplo, la *Pseudomonas fluorescens* fue inmovilizada en fibras de algodón para degradar benceno, tolueno y etilbenceno presentes logrando altas velocidades de degradación (Shim *et al.*, 2001). En el proceso de degradación de aguas de desecho contaminadas con cianuro provenientes de la industria del acero, la *Pseudomonas fluorescens* fue inmovilizada en zeolita, con el fin de disminuir el contenido de este contaminante, obteniendo buenos resultados. (Suh *et al.*, 1994)

3. MATERIALES Y EQUIPOS

3.1 MATERIALES

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

- Cianuro de Potasio analítico marca Merck
- Agua destilada
- Caldo nutritivo marca Merck
- Agar nutritivo marca Merck
- Solución de hidróxido de potasio 0,1 M
- Agar selectivo para *Pseudomonas*
- Solución 2N de Hidróxido de Sodio
- Solución de Carbonato de Sodio 0.1 M
- Solución de Bicarbonato de Sodio 0.1 M
- Agar-Agar marca Merck
- Alginato de Sodio marca Sigma
- Cloruro de Calcio anhidro granular marca Carlo Erba
- Aceite estéril

3.2 EQUIPOS

- Cajas Petri
- Micropipetas
- Asa bacteriológica
- Tubos taparrosca de 15 ml
- Vidrio de reloj

- Espátula
- Cronómetro
- pH-metro marca METROHM
- Incubadora marca WTBinder
- Centrífuga Universal marca HETTICH
- Bomba peristáltica marca Cole Parmer serie Masterflex
- Compresor para suministro de aire Elite 802
- Balanza Adventurer™ OHAUS con precisión de 0.01 g.
- Shaker marca New Brunswick Science
- Electrodo ión-selectivo de cianuro Monokrystal.
- Electrodo de referencia Monokrystal.
- Espectrofotómetro marca Cole Parmer, Helios Gamma.
- Agitador magnético con calentamiento marca Barnsted/Thermolyne corporation.
- Manguera de Tygon marca Cole Parmer serie Masterflex®
- Filtros de aire (poro de 0.2 µm)
- Columnas de cromatografía modificadas de 25 mm d.i. x 275 mm longitud.
- Beakers para almacenamiento de muestras.
- Material volumétrico: Erlenmeyers de 500 mL, balones volumétricos de 250 mL y 25 mL, pipetas volumétricas de 1, 5, 10 ml, beakers de 50 ml, 100 mL, 500 mL y 1000 mL, probetas de 200 mL y 250 mL.

3.2.1 Especificaciones de la bomba peristáltica

En la figura 1 y en la tabla 2, se muestra la bomba peristáltica usada y las especificaciones dadas por el fabricante.

Serie de la bomba	L/S ®	
Cabeza de la bomba	L/S ® 4-channel multichannel pump head for L/S precision pump tubing 07535-04	
Manguera	Tygon ® Lab two-stop tube set L/S 16, 06416-16	
Drive	L/S ® precision standard drive 77521-50	
Número de canales	4	
Caudal máximo (mL/min)	47 mL/min per channel	
Caudal mínimo (mL/min)	0.47 mL/min per channel	
rpm	1 to 100	
Potencia	VAC	115
	Amps	1.5
	Hz	50/60

Tabla 2. Especificaciones de la bomba peristáltica.



Figura 1. Bomba peristáltica Masterflex®

3.2.2 Especificaciones del compresor de aire

En la figura 2 y la tabla 3 se muestra el compresor de aire utilizado y las especificaciones de éste, respectivamente.

Marca	Elite 802
Suministro mínimo de aire	2900 cc/min
Presión	4.0 PSI
Tensión de la corriente	115 Volt AC. 60 Hz 4.0 Vatios
Peso	280 g
Diámetro de la tubería de aire	5 mm

Tabla 3. Especificaciones del compresor de aire



Figura 2. Compresor de aire Elite 801.

3.2.3 Especificaciones de columnas

Se emplean columnas de cromatografía (Ver figura 3) para contener las esferas con células inmovilizadas. Las dimensiones se determinan con base

en resultados reportados por Akzu *et al.* (1999) y se encuentran en la tabla 4.

Material	Vidrio
Diámetro interno	25 mm
Longitud	275 mm

Tabla 4. Datos técnicos de la columna.

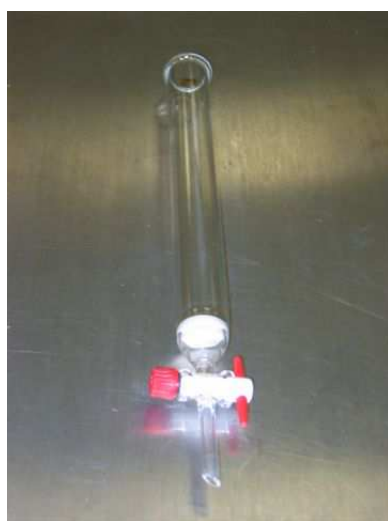


Figura 3. Columna de cromatografía.

4. METODOLOGÍA

4.1 MICROORGANISMO

De acuerdo a la revisión bibliográfica y al aislamiento realizado por Camargo y Ossa (2005), las *Pseudomonas sp.* presentan una mayor eficiencia en la degradación de compuestos persistentes, por esta razón se tiene un gran interés en trabajar con este tipo de microorganismos (Shivaraman *et al*, 1991; Suh *et al*, 1994; Chapatawala *et al*, 1997; Arzu *et al*, 2000; Arzu *et al*, 2002, Akcil *et al*, 2003; Gutiérrez *et al*, 2003; Ebbs, 2004).

Este trabajo se realiza con la bacteria *Pseudomonas fluorescens* previamente aislada y caracterizada por Camargo y Ossa (2005), la cual es conservada a 4°C en el laboratorio de Biotecnología de la Universidad EAFIT.

4.2 MEDIO DE CULTIVO

El medio de cultivo está compuesto de 15 ppm de cianuro, como fuente de carbono y nitrógeno y 1,2 g/L de caldo nutritivo, como fuente de nutrientes adicionales, estabilizado con buffer carbonato a un pH de 9,6.

4.3 MEDICIÓN DE CIANURO

Se emplea un electrodo ión selectivo tipo 06-37, marca Monokrystal, fabricado en la República Checa, para la determinación de la concentración de cianuro, el cual se puede apreciar en la figura 4.

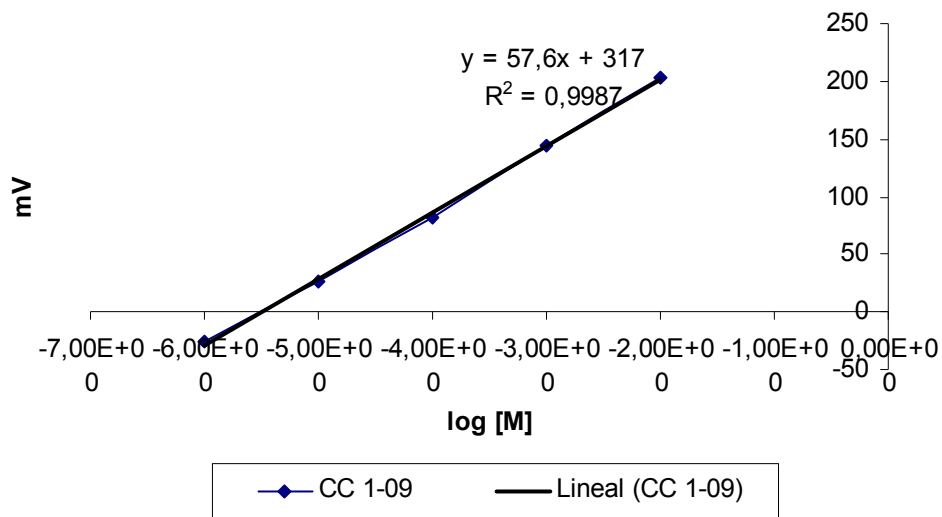


Figura 4. Electrodo de ión selectivo de cianuro

4.3.1 Construcción de la gráfica de calibración

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

Las soluciones estándar son medidas mediante el electrodo ión-selectivo de cianuro y un electrodo referencia, en un dispositivo apropiado para la medida. La lectura de los valores de la fuerza electromotriz en mV de cada una de las soluciones estándar es ubicada en una gráfica semilogarítmica contra los datos de concentración de CN^- . Ver gráfica 2.



Gráfica 2. Curva estándar del electrodo de ión selectivo de cianuro

4.3.2 Mediciones

Las mediciones de una muestra desconocida se realizan mediante la inmersión de los electrodos (ión selectivo y referencia) en la solución, se lee después de estabilizarse la fuerza electromotriz y con la ayuda de la curva de calibración se obtiene la concentración o actividad de los iones cianuro. El electrodo debe ser almacenado seco. Antes de cada aplicación las soluciones estándar deben ser medidas para obtener reproducibilidad de los resultados. Si durante el chequeo, el valor de la fuerza electromotriz de las soluciones estándar difiere de la gráfica de calibración, se debe construir una nueva curva. Cada vez que se realice una medición, el electrodo debe ser lavado adecuadamente con agua destilada y secado (Monokrystaly, 2004).

Para realizar las mediciones de concentración de Cianuro se toman muestras de 25 mL en Beakers de 50 mL. Se sumergen los electrodos en la muestra, teniendo en cuenta que éstos no toquen las paredes o el fondo del recipiente. Se espera a que la medida esté estable por 5 minutos y se toma

el dato en mV para luego aplicar la curva de calibración y poder encontrar la concentración de Cianuro (Figura 5).



Figura 5. Medición de la concentración de cianuro.

4.4 ADAPTACIÓN DEL MICROORGANISMO EN EL MEDIO

El microorganismo es inoculado en 100 mL de un medio que contiene 1,2 g/L de caldo nutritivo y 2 ppm de CN, dejándolo en agitación a 200 rpm durante 24 horas.

Transcurrido el tiempo, se mide la absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm y se toman 10 mL para inocular en 90 mL de otro medio de cultivo que contiene 1,2 g/L de caldo nutritivo y 4 ppm de CN.

Con base en los mejores resultados obtenidos por Camargo y Ossa (2005), este procedimiento se repite aumentando gradualmente la concentración de cianuro hasta llegar a 15 ppm estabilizado a un pH de 9,6.

4.5 INMOVILIZACIÓN CELULAR POR ATRAPAMIENTO

4.5.1 Matrices de inmovilización

Con base en el tipo de matrices empleadas para la inmovilización celular por atrapamiento reportadas en la literatura, se selecciona agar-agar y alginato de calcio debido a su fácil manipulación y buena disponibilidad en el mercado.

4.5.2 Inóculo

Se toman 100 mL del cultivo, se pasan a 10 tubos para centrifuga (10 mL en cada tubo) y se centrifuga a 4500 rpm durante 20 minutos. Pasado el tiempo se sacan los tubos, se bota el sobrenadante, se resuspende cada pellet en 1 mL de agua destilada estéril y se vuelve a centrifugar a 4500 rpm durante 20 minutos. Luego, se sacan los tubos, se bota el sobrenadante y se resuspende cada pellet en 1 mL de agua destilada estéril. Esta nueva suspensión (10 mL en total) es adicionada a la solución de agar- agar o alginato, según el caso.

4.5.3 Nutrientes

Teniendo en cuenta que los nutrientes requeridos por la bacteria son carbono, nitrógeno y oxígeno, se prepara un medio de cultivo que contiene 1,2 g/L de caldo nutritivo y 15 ppm de cianuro.

4.5.4 Proceso de preparación de las esferas

4.5.4.1 Esferas de agar-agar

Se prepara una solución de agar-agar al 12-15%, la cual contiene los 10 mL de células en suspensión que corresponden al inóculo, con una concentración celular de $3,28E6$ UFC/mL.

Esta solución se deja en el baño maría, el cual se encuentra a una temperatura estable de 50°C para evitar la gelificación antes del proceso de formación de las esferas, teniendo en cuenta que la temperatura no debe aumentar para evitar afectar las células.

Se conecta la bomba peristáltica, con una manguera de 0.5 mm de diámetro interno, a 200 rpm y se empieza el bombeo de la solución de agar y células en suspensión hacia una probeta de 200 mL que contiene aceite frío previamente esterilizado. La solución cae gota a gota en el aceite gelificándose al entrar en contacto con éste.

Luego se hace un lavado con agua destilada estéril a 40°C para eliminar el aceite residual que queda adherido a las esferas (Ramírez, 2002; Vilain *et al.*, 2004).

4.5.4.2 Esferas de alginato de calcio

Se prepara una solución de Cloruro de calcio al 20% P/V.

Se prepara la solución de Alginato de sodio al 2% P/V, la cual contiene los 10 mL de células en suspensión que corresponden al inóculo con una concentración celular de $3,28E6$ UFC/mL.

La solución de alginato de sodio se hace pasar a través de la bomba peristáltica hasta un beaker que contiene la solución de Cloruro de Calcio. El alginato de sodio cae gota a gota en la solución de calcio, produciéndose así la reacción de sustitución para formar el Alginato de Calcio insoluble.

Las esferas ya formadas de alginato de calcio que contienen las células atrapadas deben ser enfriadas en la nevera a 4°C por 2 horas, para garantizar la formación de esferas completamente insolubles en agua (Akzu *et al.*, 1999).

4.6 ENSAYOS PRELIMINARES

Se realizan ensayos con esferas de agar-agar y alginato sin células atrapadas, para comprobar si existe variación en la concentración de cianuro.

Se emplean erlenmeyer con una solución de 500 ml que contiene 15 ppm de CN⁻ y 1,2 g/L de caldo nutritivo preparado en buffer carbonato a un pH de 9.6.

Se empacan las esferas en las columnas de forma tal que ocupen el 50% de estas. Por medio de la bomba peristáltica se hace recircular la solución de cianuro a través de la columna con un caudal constante, teniendo en cuenta que el nivel del líquido dentro de esta se mantenga constante al 70% de su longitud (Fiol *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2002). Se toman muestras de 25 mL cada 12 horas durante 48 horas para determinar la concentración de cianuro y el pH a través del tiempo.

Esterilización

Antes de cada ensayo se esterilizan tanto los medios como las columnas, filtros de aire, tapones y mangueras utilizadas. Los medios no son esterilizados con el cianuro, pues altas temperaturas disminuyen la concentración de éste.

Se realizan otros ensayos sin esterilizar para determinar la incidencia de esta variable en el proceso biodegradativo del cianuro.

4.7 DISEÑO DE EXPERIMENTOS

En esta investigación se realiza un diseño de experimentos factorial donde se varía el caudal y la matriz de inmovilización utilizada para el atrapamiento de las células. En la tabla 5, se muestran los factores y niveles del diseño de experimentos:

Factores	Niveles	Valores				
Matriz	2	Agar-Agar		Alginato		
Caudal (mL/s)	3	0.17	0.23	0.29		
Tiempo (horas)	5	0	12	24	36	48

Tabla 5. Factores y niveles del diseño de experimentos.

Caudales de operación

De acuerdo con los tiempos de residencia reportados en la literatura por Sá *et al.* (2001) y las limitaciones de la bomba, se calculan los caudales a trabajar. El tiempo de residencia es el tiempo en que se encuentra en contacto el fluido con las esferas y equivale al tiempo que le toma al fluido desocupar completamente la columna.

Teniendo en cuenta que el nivel de líquido en la columna se mantiene constante, se puede decir que la cantidad de fluido que entra es igual a la que sale, por tanto, el tiempo que toma desaguar completamente la columna es el mismo tiempo que toma llenarla hasta el nivel determinado. Para obtener mayores tiempos de residencia, es decir, mayores tiempos de contacto del medio con la bacteria inmovilizada, es necesario trabajar con caudales pequeños.

En la tabla 6 se especifican los tiempos de residencia y los respectivos caudales que se trabajan.

Tiempos de residencia (s)	Caudales (mL/s)
236	0.17
169	0.23
134	0.29

Tabla 6. Tiempos de residencia y caudales

Debido a que el tamaño de poro de la placa en las columnas es muy pequeño, los caudales no pueden ser muy altos, ya que el nivel de líquido dentro de la columna debe mantenerse constante y si el paso a la salida está restringido, el nivel de éste aumentará. Además, estos caudales no pueden ser muy bajos por la limitación de la bomba. Sin embargo, los valores con los que se trabaja están dentro del rango de tiempos de residencia reportados por Sá *et al.* (2001).

4.8 PROCESO BIODEGRADATIVO

Para el proceso se preparan 500 mL de un medio de cultivo que contiene 1,2 g/L de caldo nutritivo y 15 ppm de CN en Buffer carbonato a un pH de 9.6. Se

toman muestras de 25 mL cada 12 horas durante 48 horas y se les mide el pH así como la concentración de cianuro por medio del electrodo de ión selectivo.

El medio se hace pasar por la columna, la cual contiene las células atrapadas en las esferas, a un caudal constante durante el proceso de acuerdo con los valores establecidos en el diseño de experimentos. Este proceso se realiza por duplicado.

En la figura 6, se muestra el montaje para la biodegradación de cianuro con células inmovilizadas:



Figura 6. Montaje para la biodegradación de cianuro con células inmovilizadas.

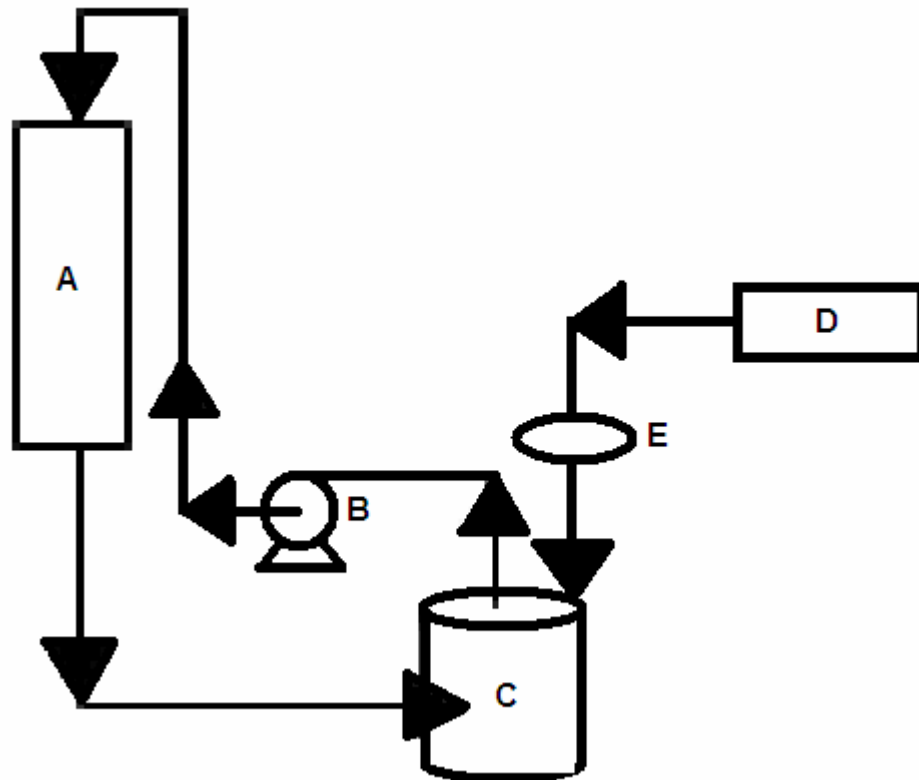


Figura 7. Diagrama de flujo del proceso para la biodegradación de cianuro con células inmovilizadas.

Descripción del montaje

- A. Columna con células inmovilizadas
- B. Bomba peristáltica Cole Parmer serie Masterflex
- C. Erlenmeyer con medio a tratar
- D. Compresor de aire Elite 801
- E. Filtros de aire

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 ADAPTACIÓN DEL MICROORGANISMO EN MEDIO LÍQUIDO

La adaptación del microorganismo se realiza a partir de una cepa aislada previamente por Camargo y Ossa (2005) que se encuentra en el laboratorio de biotecnología de la Universidad EAFIT. La cepa se siembra en medio selectivo para *Pseudomonas* (Agar P) y transcurridas 24 horas se inocula de éste a un medio líquido que contiene 8 g/L de caldo nutritivo a un pH de 7,0.

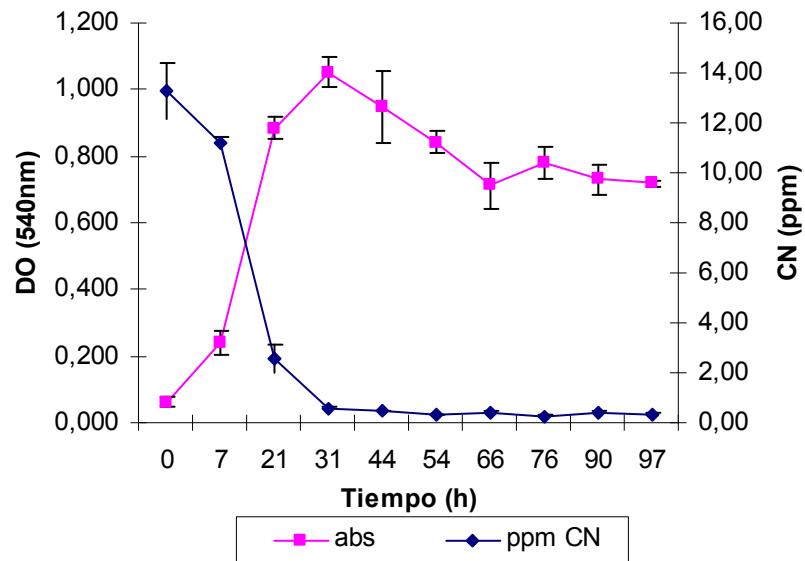
Inicialmente se busca adaptar la bacteria a un medio que contenga 1 g/L de glucosa y 15 ppm de cianuro en buffer carbonato a un pH de 9,6, los cuales son parámetros establecidos por Camargo y Ossa (2005).

Para poder establecer la metodología de adaptación, primero debe desarrollarse una estrategia experimental que permita el crecimiento celular en un medio de cultivo con 15 ppm de cianuro a pH 9.6.

Debido a que se requiere llegar a un medio de cultivo con 1 g/L de glucosa pH 9.6 y 15 ppm de cianuro se inicia con una adaptación a 1 g/L de glucosa, pH 7 sin cianuro. Cuando se aumenta el pH o se suplementa con cianuro se inhibe el crecimiento celular. Por lo que se decide cambiar la glucosa por caldo nutritivo para obtener un medio de cultivo enriquecido. En este si se logra crecimiento celular al aumentar pH y adicionar cianuro. Es así como se obtiene el medio de cultivo propuesto para adaptar la cepa a las condiciones requeridas y para desarrollar el trabajo. Todo este proceso se tarda 6 meses.

5.2 CINÉTICA DE CRECIMIENTO CELULAR Y DEGRADACIÓN DE CIANURO EN CULTIVO SUMERGIDO

En la gráfica 3 se puede observar la cinética de crecimiento celular con la cual se determina el tiempo en que debe realizarse el inóculo así como el tiempo de duración del proceso biodegradativo con células inmovilizadas.



Gráfica 3. Cinética de crecimiento realizada en cultivo sumergido.

Con esta cinética de degradación se determina que el tiempo en que se debe inocular el proceso es de 21 horas, es decir, este es el tiempo de cultivo en el que deben ser inmovilizadas las células, pues como se puede apreciar en la gráfica 3, el microorganismo se encuentra en la fase exponencial, obteniendo una alta concentración celular ($3,28E6$ UFC/mL).

Se determina la duración total del proceso en 48 horas, ya que en este tiempo se ha alcanzado la fase de muerte celular y la concentración de cianuro se acerca a 1 ppm, límite permitido para el agua establecido por la EPA (ASTDR, 2005).

En la cinética en cultivo sumergido se alcanza una concentración de cianuro mínima de 0,31 ppm, un porcentaje de degradación de 97,66% en un tiempo de 97 horas y una velocidad de degradación de 0,6193 mg/L-h. Estos resultados cumplen con la legislación nacional, la cual exige una concentración máxima de 1ppm de cianuro en las descargas. Es importante mencionar que esta velocidad de degradación es mayor que la máxima reportada por Camargo y Ossa (2005), 0,1626 mg/L-h, lo que puede explicarse por el cambio en la composición del medio de cultivo.

En el proceso de degradación de cianuro en células en suspensión reportado por Camargo y Ossa (2005) se tiene una velocidad de degradación de 0.1626 mg/L-h inferior a la obtenida en la cinética de degradación en células en suspensión de la grafica 3.

5.3 RESULTADOS DEL PROCESO BIODEGRADATIVO

5.3.1 Resultados obtenidos con Agar-Agar como matriz de inmovilización

5.3.1.1 Control para determinación de la variación de la concentración de cianuro con agar-agar como matriz de inmovilización

Para determinar si existe variación en la concentración de cianuro en el proceso, se realiza un experimento con las esferas de agar-agar sin bacteria inmovilizada para cuantificar este fenómeno, obteniendo los resultados mostrados en la tabla 7.

Tiempo (horas)	Concentración de cianuro promedio (ppm)	% de variación
0	15,90	0
12	15,19	4,49
24	13,85	12,88
36	13,85	12,88
48	13,85	12,88

Tabla 7. Control de la variación de la concentración de cianuro en las esferas de agar-agar (sin células inmobilizadas).

La variación en la concentración de cianuro no es muy significativa para ser determinante en el proceso. Esta variación se puede deber a la volatilización del cianuro y/o adsorción de este en la matriz de agar.

5.3.1.2 Proceso biodegradativo con agar-agar como matriz de inmobilización

Los resultados que se muestran a continuación en las tablas 8, 9 y 10, corresponden a los experimentos hechos con agar como matriz de inmobilización celular y con los tres caudales escogidos 0,17 mL/s, 0,23 mL/s y 0,29 mL/s en un tiempo de 48 horas. Este tiempo es considerado de acuerdo con la cinética de crecimiento celular y degradación de cianuro obtenidas en cultivo en suspensión, como el necesario para alcanzar concentraciones finales de cianuro por debajo del límite establecido por las autoridades ambientales (1 ppm) (Camargo y Ossa, 2005).

Tiempo (horas)	Concentración de cianuro promedio (ppm)	% de degradación
0	14,84	0
12	2,31	84,45
24	0,51	96,59
36	0,17	98,84
48	0,13	99,12

Tabla 8. Datos obtenidos en agar-agar como matriz y con un caudal de 0,17 mL/s

En la tabla 8 se puede observar que se reduce la concentración de cianuro hasta 0.13 ppm degradando un 99.12% del mismo, adicionalmente se llega a una concentración de cianuro inferior a 1 ppm en aproximadamente 15.2 horas.

Tiempo (horas)	Concentración de cianuro promedio (ppm)	% de degradación
0	14,17	0
12	2,20	84,45
24	0,88	93,80
36	0,49	96,51
48	0,35	97,53

Tabla 9. Datos obtenidos en agar-agar como matriz y con un caudal de 0,23 mL/s

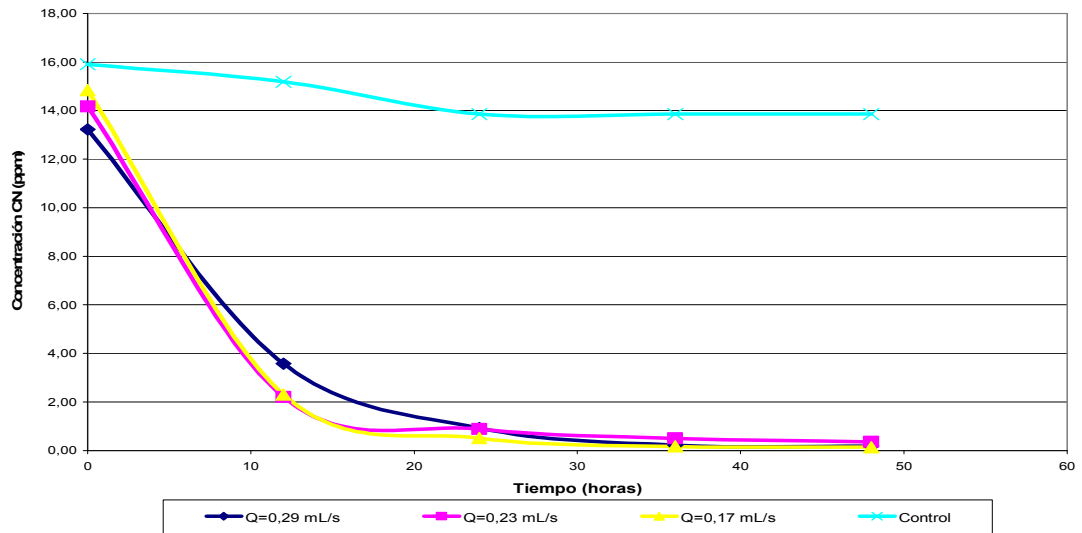
En la tabla 9 se puede observar que se reduce la concentración de cianuro a 0.35 ppm con un porcentaje de degradación de 97,53% y llegando a una concentración inferior a 1 ppm en 15.8 horas

Tiempo (horas)	Concentración de cianuro promedio (ppm)	% de degradación
0	13,23	0
12	3,57	73,01
24	0,92	93,04
36	0,22	98,36
48	0,18	98,67

Tabla 10. Datos obtenidos en agar-agar como matriz y con un caudal de 0,29 mL/s

En la tabla 10 se puede observar que se reduce la concentración de cianuro hasta 0.18 ppm con un porcentaje de degradación de 98.67% y se alcanza una concentración inferior a 1 ppm en 23,4 horas.

En la gráfica 4, se agrupa los resultados de la biodegradación de cianuro y se observa que hay un comportamiento similar entre si. Se puede notar que la concentración de cianuro que baja más rápido es la que corresponde al proceso con un caudal de 0,17 mL/s. Además, se aprecia que en un tiempo menor a 24 horas la concentración de cianuro es inferior a 1 ppm.



Gráfica 4. Comparación de degradación entre los tres caudales y el control en agar-agar como matriz.

En la gráfica 4 se observa cómo el control de la variación de la concentración de cianuro (sin células) realizado tiene un comportamiento muy diferente a los demás, demostrando que no es un factor muy relevante en el proceso. También se observa que en los tres casos hay una disminución muy alta de cianuro en las primeras 12 horas.

5.3.2 Resultados obtenidos con alginato de calcio como matriz de inmovilización

5.3.2.1 Control para determinación de la variación de la concentración de cianuro con alginato de calcio como matriz de inmovilización

En la tabla 11 se muestran los resultados obtenidos para la determinación de la variación de la concentración de cianuro, en la matriz de alginato sin células inmovilizadas.

Tiempo (horas)	Concentración de cianuro promedio (ppm)	% de variación
0	16,65	0
12	13,85	16,79
24	12,64	24,10
36	11,01	33,88
48	10,04	39,68

Tabla 11. Control de variación de la concentración de cianuro en las esferas de alginato de calcio (sin células inmovilizadas) a pH 8.6

En la tabla 11 se observa que la concentración de cianuro disminuye hasta 10.04 ppm en 48 horas y hay una volatilización y/o adsorción del compuesto en la matriz de alginato del 39.68%.

5.3.2.2 Proceso biodegradativo con alginato de calcio como matriz de inmovilización

Los resultados que se muestran a continuación, corresponden a los experimentos hechos con alginato de calcio como matriz y con los tres

caudales escogidos 0.17 mL/s, 0.23 mL/s y 0.29 mL/s en un tiempo de 48 horas.

El pH para estos ensayos se fija en 8,6 a diferencia de los ensayos realizados con agar-agar como matriz. Esto se debe a que el alginato de calcio no tiene buena compatibilidad con sustancias alcalinas, como la solución acuosa de cianuro.

Tiempo (horas)	Concentración de cianuro promedio (ppm)	% de degradación
0	15,54	0
12	9,81	36,85
24	6,79	56,28
36	2,36	84,81
48	1,13	92,72

Tabla 12. Datos obtenidos en alginato de calcio como matriz y con un caudal de 0,17 mL/s

En la tabla 12 se observa que con la matriz de alginato a un caudal de 0,17 mL/s se reduce la concentración de cianuro hasta 1,13 ppm en 48 horas, alcanzando un porcentaje de degradación de 92.72%.

Tiempo (horas)	Concentración de cianuro promedio (ppm)	% de degradación
0	15,54	0
12	11,53	25,82
24	8,55	44,98
36	2,77	82,16
48	1,71	88,99

Tabla 13. Datos obtenidos en alginato de calcio como matriz y con un caudal de 0,23 mL/s

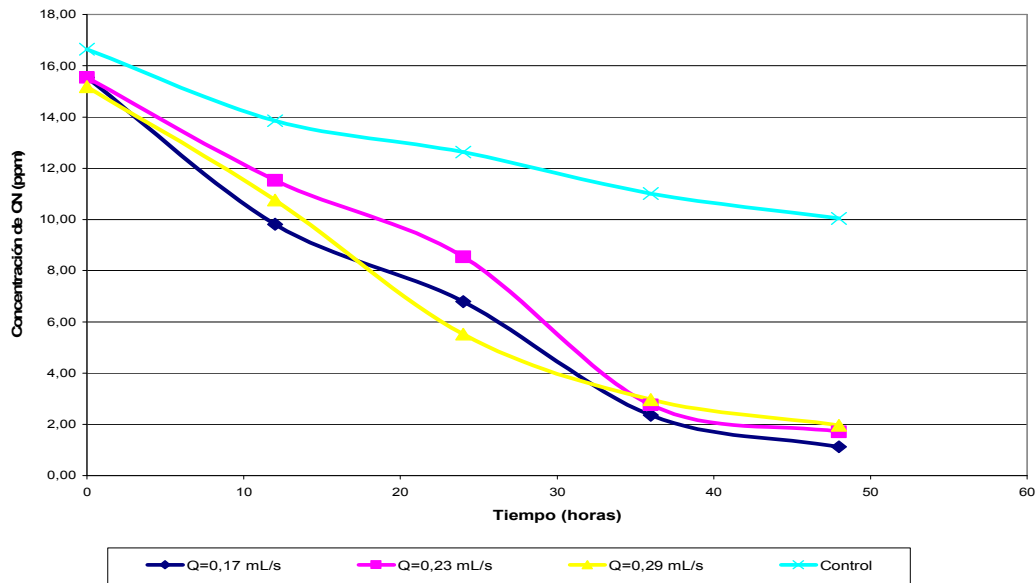
En la tabla 13 se observa que el porcentaje de degradación es del 88.99%, para el caudal de 0,23 mL/s. En ningún momento del proceso hay una concentración de cianuro inferior a 1 ppm

Tiempo (horas)	Concentración de cianuro promedio (ppm)	% de degradación
0	15,19	0
12	10,76	29,16
24	5,52	63,62
36	2,97	80,44
48	1,96	87,06

Tabla 14. Datos obtenidos en alginato de calcio como matriz y con un caudal de 0,29 mL/s

Los resultados obtenidos con alginato y caudal de 0,29 mL/s, reportados en la tabla 14, muestran que el porcentaje de degradación es de 87.06% y la concentración de cianuro mínima alcanzada es de 1.96 ppm.

En la grafica 5 se agrupa los resultados de la biodegradación de cianuro con la matriz de alginato y los tres caudales evaluados; se observa que hay un comportamiento similar entre sí. De nuevo se puede ver que el proceso que reporta la más rápida degradación de cianuro es el que se lleva a cabo con caudal 0,17 mL/s. Además, se puede observar que transcurrido el tiempo del proceso, la concentración de cianuro no ha disminuido hasta 1 ppm en ninguno de los tratamientos, concentración a la cual se espera llegar.

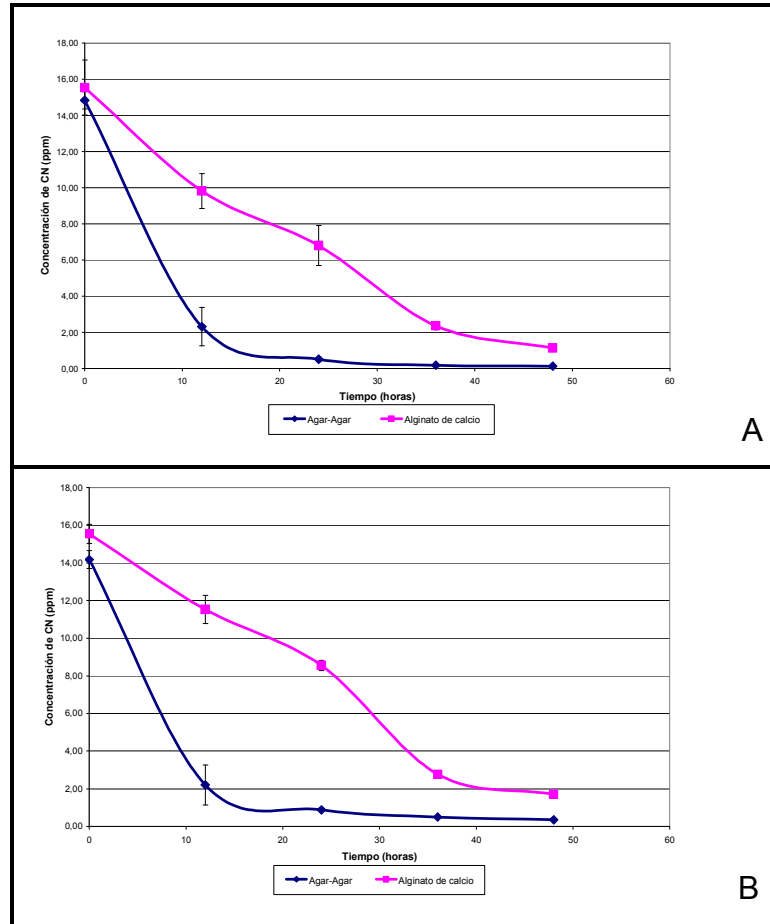


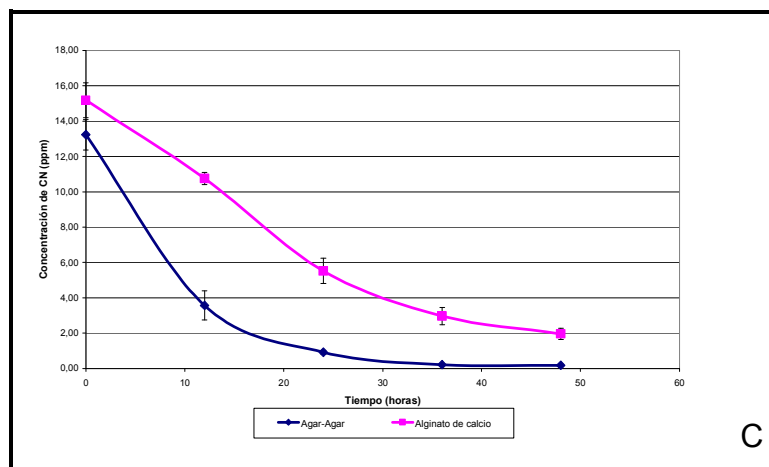
Gráfica 5. Comparación de degradación entre los tres caudales y el control en alginato de calcio como matriz.

En la gráfica 5 se observa como el control para determinar la disminución en la concentración de cianuro (sin células) presenta un comportamiento diferente al de los demás, pero con un porcentaje de adsorción y/o volatilización alto. Si se compara con los tratamientos a diferentes caudales con células inmovilizadas, se puede observar que la disminución en la concentración de cianuro es mucho menor, por lo que se puede decir que la disminución en esta concentración se debe principalmente a la acción biodegradativa del microorganismo.

Como se puede apreciar en las gráficas 6-A, 6-B y 6-C, la concentración de cianuro disminuye más rápido y hasta un punto mas bajo cuando se trabaja con agar-agar como matriz de inmovilización, comparado con la concentración de cianuro en alginato de calcio como matriz, sin importar el caudal al que se lleve a cabo el proceso. Esto se debe a que las esferas de alginato de calcio son más duras que las de agar-agar, lo cual hace que la velocidad de difusión del cianuro a través de éstas sea menor que la

velocidad a través de las esferas de agar-agar, por tanto, al sustrato le toma más tiempo (o mayor dificultad) llegar hasta la célula. Los resultados obtenidos para cada una de las matrices pueden ser comparables sin tener en cuenta que se hayan trabajado a pH distinto, tal como se explica en el numeral 5.5.1.





Gráfica 6. Comparación de la degradación de cianuro en las dos matrices y los tres caudales trabajados. A: caudal 0,17 mL/s; B: caudal 0,23 mL/s; C: caudal 0,29 mL/s

5.3.3 Velocidades de degradación

La tabla 15 muestra las velocidades de degradación de los experimentos realizados con agar-agar y alginato de calcio como matrices de inmovilización.

Caudal (mL/s)	Velocidad de degradación (mg/L-h)	
	Agar-agar	Alginato de calcio
0,17	1,0445	0,4771
0,23	0,9976	0,3344
0,29	0,805	0,369

Tabla 15. Velocidades de degradación en agar-agar y alginato de calcio como matrices de inmovilización.

El resultado de la velocidad de degradación y del porcentaje de degradación son los mas altos para el caudal de 0,17 mL/s, donde hay un mayor tiempo de residencia, para cualquiera de las dos matrices.

Hay una gran disminución en la velocidad de degradación en los experimentos efectuados con la matriz alginato, con respecto a la de agar-agar. Aunque se trabaja con los mismos tiempos de residencia se encuentra una gran diferencia, debido a que con la matriz de alginato hay mayor dificultad en la difusión del cianuro hasta la célula.

En el proceso de degradación de cianuro con células en suspensión realizado por Camargo y Ossa (2005), la mejor velocidad de degradación obtenida es de 0.1626 mg/L-h, en 72 horas. Este valor es aproximadamente 10 veces menor que la velocidad máxima de degradación obtenida en el proceso por inmovilización, la cual es de 1.0445 mg/L-h, alcanzada durante las primeras 15 horas, aspecto muy relevante considerando que ambos trabajos se llevan a cabo con la misma cepa.

Los resultados obtenidos en la degradación en cultivo sumergido son menores a los obtenidos en la degradación por inmovilización para la matriz de agar-agar que se presentan en la sección 5.3, donde, se reduce la concentración de cianuro de 15 ppm a 0.13 ppm, con una velocidad de degradación de 1.0445 mg/L-h y un porcentaje de degradación del 99.12% en 48 horas, pero son superiores a los obtenidos en la sección 5.3 para la matriz de alginato en la cual se reduce la concentración de cianuro de 15 ppm a 1.13 ppm, se obtiene una velocidad de degradación de 0,4771 y un porcentaje de degradación de 92,72%.

5.4 ANÁLISIS DE DISEÑO DE EXPERIMENTOS

El análisis se realiza para las dos matrices de inmovilización a pesar de ser trabajadas a un pH diferente pues como se explica y se reporta en el numeral

5.5.1, no hay una influencia significativa de este cambio de pH sobre el proceso biodegradativo.

Con los resultados obtenidos, se hace un análisis estadístico empleando el Software SAS donde se incluye la tabla ANOVA y la prueba para rango múltiple de Duncan.

5.4.1 Análisis de varianza

La tabla ANOVA permite establecer los factores más significativos del proceso de biodegradación del cianuro. Se establece un intervalo de confianza del 95%, incluyendo como significativos aquellos que tienen un valor $Pr > F$ menor de 0.05 y tomando como variable de respuesta el porcentaje de degradación de cianuro.

En la tabla 16 se muestran los resultados obtenidos para la variable de respuesta del diseño de experimentos empleando el Software SAS.

R-Cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	Degradación Media
0.994903	5.351572	3.364442	62.86829

Fuente	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Caudal	2	123.64929	61.82464	5.46	0.0082
Matriz	1	7782.53503	7782.53503	687.54	<0.0001
Tiempo	4	70430.85341	17607.71335	1555.52	<0.0001
Caudal*Matriz	2	90.98949	45.49474	4.02	0.0261
Caudal*Tiempo	8	26.96666	32.99583	2.91	0.0123
Matriz*Tiempo	4	5276.01537	1319.00384	116.53	<0.0001

Tabla 16. Tabla Anova

Los resultados arrojados por el Software SAS generan un R-cuadrado igual a 99.4903% lo cual indica que el modelo explica en un 99.4903% la variabilidad en el porcentaje de reducción de la concentración de cianuro al cabo de 48 horas y se minimizan las posibles causas de error a un 0.5097% restante.

Según la tabla 16 se observa que tanto los factores caudal, matriz y tiempo como sus interacciones presentan un valor menor de 0.05, lo que indica que las variables son significativas para el desarrollo de los experimentos. El factor más representativo del proceso es el tiempo con un 83,88% de incidencia sobre el porcentaje de degradación.

5.4.2 Prueba del rango múltiple de Duncan

Se realiza una prueba de medias de Rango Múltiple de Duncan, la cual compara la incidencia de los parámetros en el proceso de degradación, para determinar cuáles de éstos son más relevantes.

5.4.2.1 Caudal

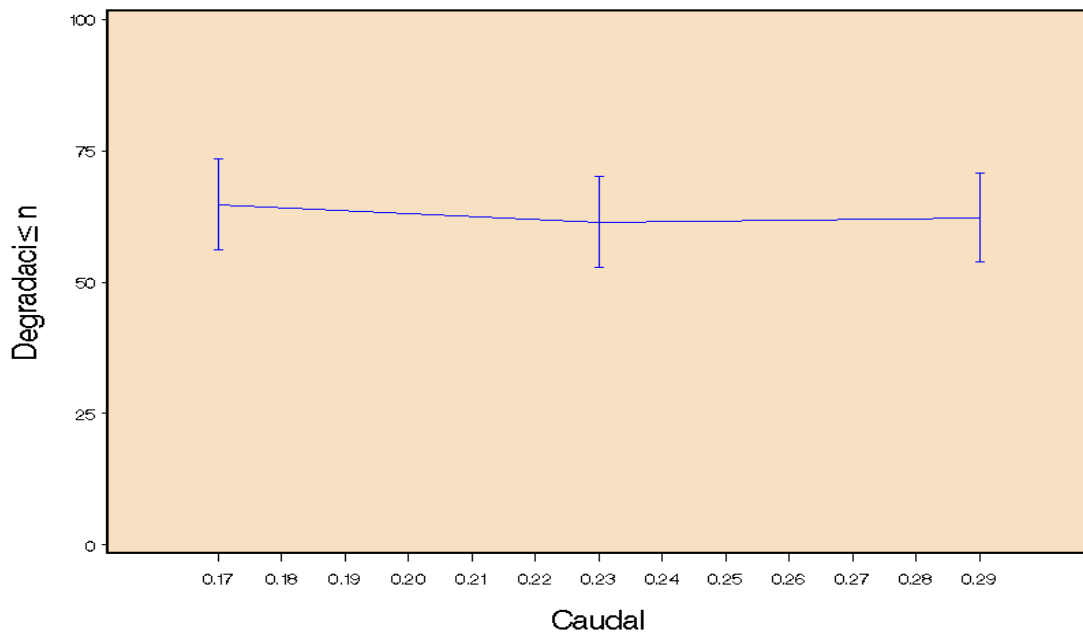
La comparación de la incidencia de los tres caudales trabajados sobre el proceso biodegradativo arroja los resultados que se encuentran en la tabla 17.

Agrupamiento Duncan	Media	N	Caudal
A	64.847	20	0.17
B	62.272	20	0.29
B	61.486	20	0.23

Tabla 17. Prueba de Duncan para el caudal.

Se sabe que medias con la misma letra no son significativamente diferentes, por lo tanto, de acuerdo a la prueba de Duncan, existe una diferencia significativa en la degradación de cianuro entre el caudal de 0.17 mL/s respecto a los caudales 0.23 mL/s y 0.29 mL/s, pero entre estos últimos no se observan diferencias significativas.

En la grafica 7 donde se ilustran los resultados se puede observar lo anteriormente dicho. El punto correspondiente al caudal 0.17 mL/s se encuentra en un punto más alto que los otros dos caudales, es decir, con este caudal se logra un mayor porcentaje de degradación de cianuro.



Grafica 7. Prueba de Duncan para el caudal

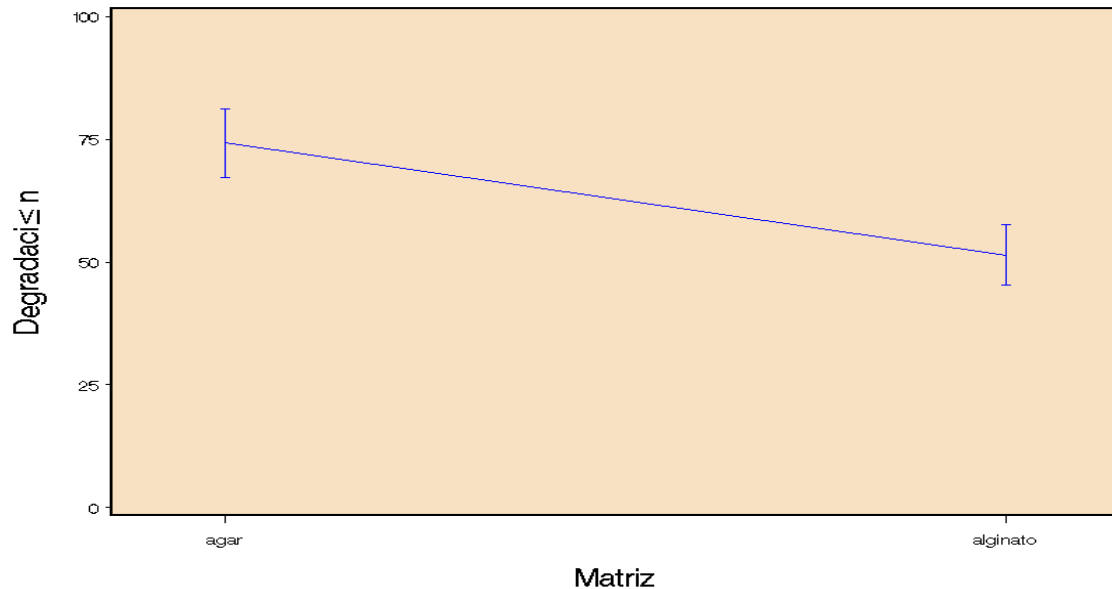
5.4.2.2 Matriz

La comparación de la incidencia de las dos matrices trabajadas sobre el proceso biodegradativo arroja los resultados que se encuentran en la tabla 18.

Agrupamiento Duncan	Media	N	Matriz
A	74.2573	30	Agar-Agar
B	51.4793	30	Alginato

Tabla 18. Prueba de Duncan para matriz

Sabiendo que medias con la misma letra no son significativamente diferentes, se puede observar que las dos matrices tienen diferencias significativas en cuanto a la incidencia de éstas sobre el proceso biodegradativo de cianuro. La matriz de agar con una media de 74.2573% de degradación obtuvo un mejor resultado comparada con la de alginato, como lo demuestran los resultados experimentales obtenidos. En la gráfica 8 se ilustra claramente la gran diferencia entre los dos resultados obtenidos para las diferencias de matriz.



Gráfica 8. Prueba de Duncan para matriz

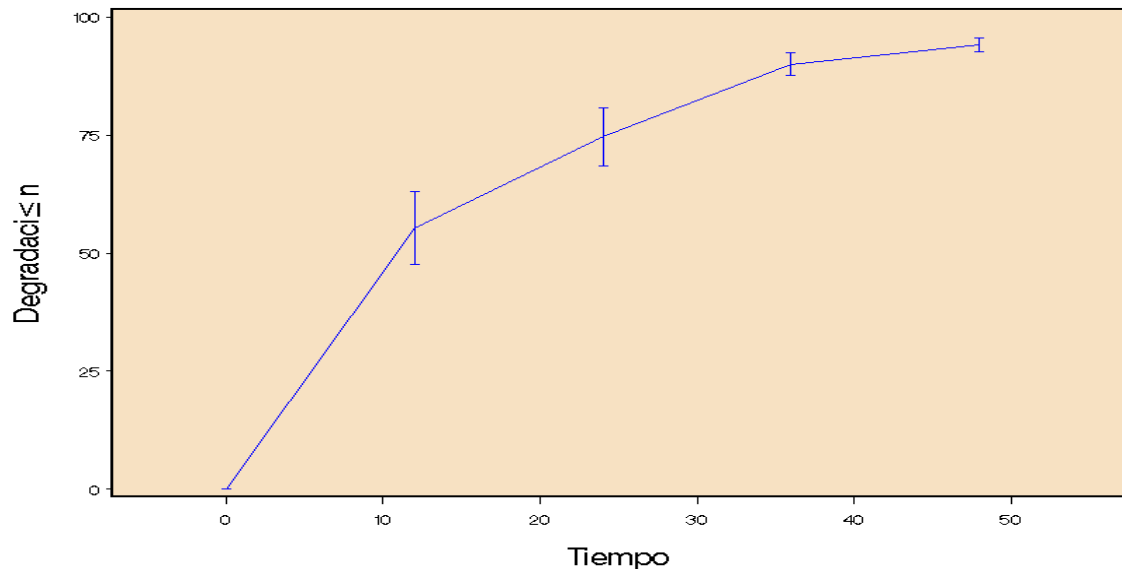
5.4.2.3 Tiempo

La comparación de la incidencia de los diferentes tiempos sobre el proceso biodegradativo arroja los resultados que se encuentran en la tabla 19.

Agrupamiento Duncan	Media	N	Tiempo
A	94.180	12	48
B	90.088	12	36
C	74.682	12	24
D	55.391	12	12
E	0.000	12	0

Tabla 19. Prueba de Duncan para tiempo.

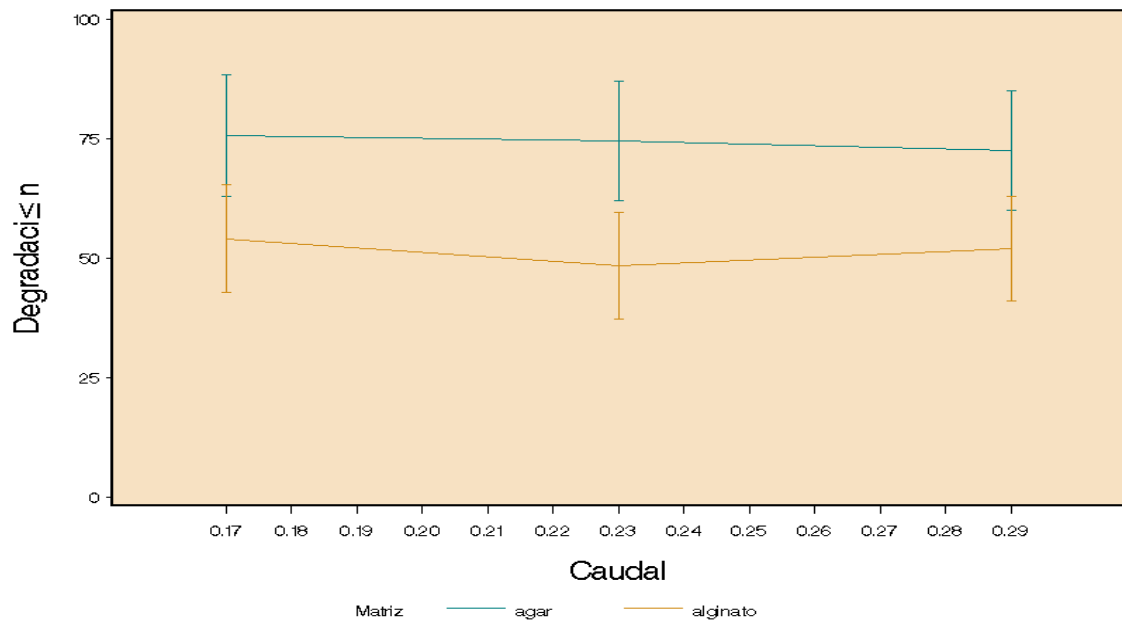
Sabiendo que medias con la misma letra no son significativamente diferentes y de acuerdo a los datos arrojados por el análisis estadístico, se puede ver que la incidencia de los tiempos sobre el proceso biodegradativo es diferente para cada uno de éstos, lo cual se puede observar más claramente en la grafica 9.



Grafica 9. Prueba de Duncan para tiempo

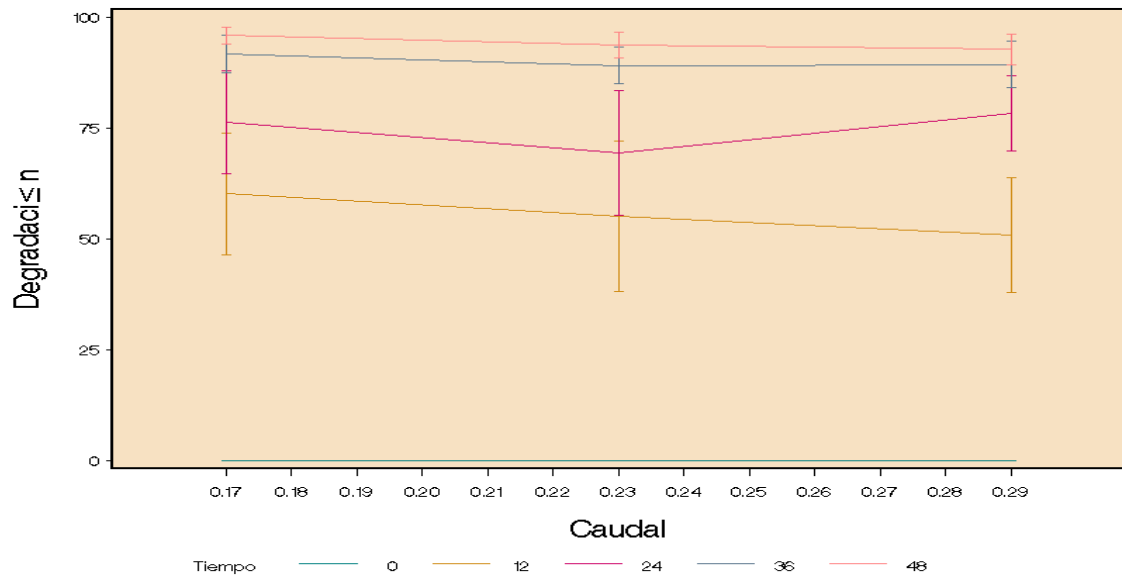
5.4.2.4 Comparaciones cruzadas

El análisis del rango múltiple de Duncan permite realizar comparaciones cruzadas, es decir, comparar la incidencia de dos factores al tiempo sobre el proceso biodegradativo. En el caso de la gráfica 10, se muestra la diferencia en la incidencia del caudal y la matriz sobre el porcentaje de degradación. A primera vista se puede observar que con los mismos caudales, los procesos realizados con Agar-Agar como matriz tienen un porcentaje de degradación mucho mayor que los realizados con Alginato de calcio.



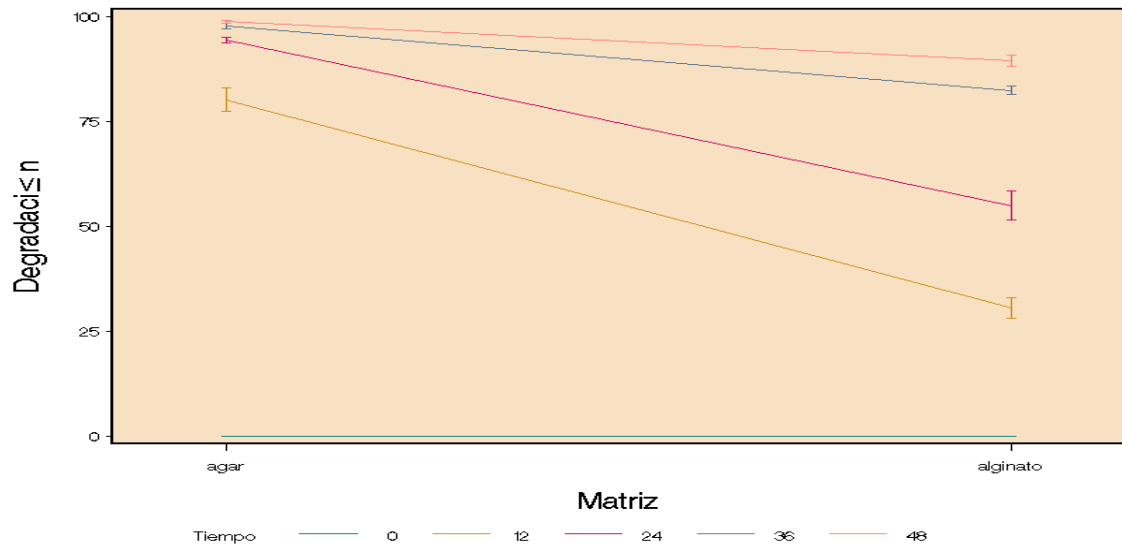
Grafica 10. Relación del caudal y la matriz con respecto al porcentaje de degradación.

En la grafica 11, se puede ver la diferencia en la incidencia del caudal y el tiempo, siendo, para todos los tiempos el caudal menor, el que presenta mayor porcentaje de degradación. En forma general se observa que a las 48 horas se ha alcanzado el mayor porcentaje de degradación.



Gráfica 11. Relación del caudal y el tiempo con respecto a la degradación.

De forma similar, la gráfica 12 muestra la diferencia entre la incidencia de las matrices y el tiempo del proceso sobre el porcentaje de degradación del mismo. Se puede apreciar que a las 48 horas se ha alcanzado el mayor porcentaje de degradación y que para todos los tiempos, la matriz de Agar-Agar fue mucho más eficiente que la matriz de Alginato de calcio.



Gráfica 12. Relación de la matriz y el tiempo con respecto a la degradación.

5.4.3 Condiciones óptimas de operación

En la tabla 20 se muestra las condiciones óptimas de operación con las cuales se obtiene el máximo porcentaje de degradación de cianuro. Estos datos son obtenidos del Software SAS y como se observa en las gráficas de los resultados obtenidos.

Factor	Óptimo
Matriz	Agar - Agar
Caudal	0.17 mL/s

Tabla 20. Condiciones óptimas de operación.

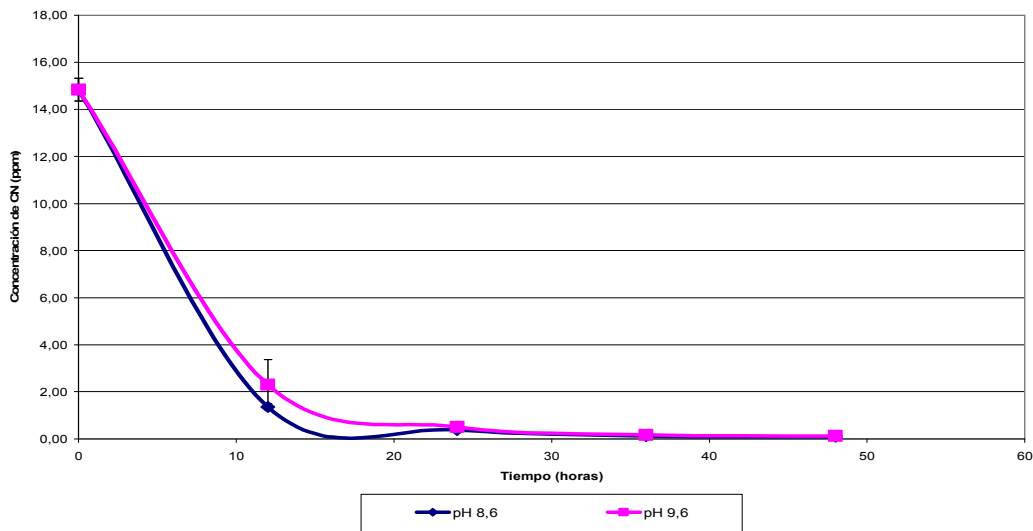
5.5 ENSAYOS ADICIONALES

5.5.1 Ensayos con agar-agar a pH 8,6

El alginato de calcio es poco estable en medios alcalinos, observándose una desintegración de las esferas a pH 9,6, por lo cual se decide realizar los ensayos con ésta matriz de inmovilización en un pH inferior al trabajado con agar-agar (8,6). De acuerdo con lo anterior, se repite el ensayo con agar-agar como matriz y caudal 0,17 mL/s, pero esta vez ajustando el pH de la solución a 8,6, para determinar si pueden ser comparables los datos obtenidos en ambas matrices.

Tiempo (horas)	Concentración de cianuro promedio (ppm)	% de degradación a pH 8,6	% de degradación a pH 9,6
0	14,84	0	0
12	1,36	90,84	84,45
24	0,38	97,41	96,59
36	0,12	99,18	98,84
48	0,10	99,33	99,12

Tabla 21. Datos ensayo agar-agar pH 8,6 y 9,6 con caudal de 0,17 mL/s.



Grafica 13. Comparación entre ensayos a pH 8,6 y 9,6 bajo las mismas condiciones de caudal y matriz.

En la tabla 21 y en la gráfica 13, se puede observar que la diferencia en la disminución de cianuro para cada pH trabajado no es muy significativa, con lo cual se puede decir que los datos obtenidos a pH 9,6 pueden ser comparables con los obtenidos a pH 8,6.

Esto se confirma con el análisis de varianza que se presenta en la tabla 22

Fuente	Suma de los cuadrados	Df	Media cuadrada	F-Ratio	P-Valor
Entre grupos	15,1069	1	15,1069	0,01	0,9249
Dentro de grupos	29731,9	18	1651,77		
Total (Corr.)	29747,0	19			

Tabla 22. Análisis de varianza para ensayos con agar, caudal 0,17 mL/s a pH 8.6 y 9.6

En la tabla 22 se observa que en el análisis de varianza realizado con el Software Statgraphics para comparar los resultados obtenidos en los ensayos de agar-agar a pH 8.6 y 9.6, se obtiene un P-Valor superior a 0.05 lo cual indica que no se encuentran diferencias significativas entre los dos ensayos y confirma lo observado en la gráfica 13.

Prueba del rango múltiple de Duncan

En la tabla 23 se muestran los resultados obtenidos de la prueba del rango múltiple de Duncan.

pH	Cuenta	Media	Grupos Homogéneos
9,6	10	75,6029	X
8,6	10	77,3412	X
Contraste			Diferencia
8,6 – 9,6			1,73821

Tabla 23. Prueba del rango múltiple de Duncan.

En la tabla 23 se observa que no hay diferencias significativas entre los dos procesos, obteniéndose una media para el pH 9.6 de 75.6029 y 77.3412 para el ensayo con pH 8.6, las cuales son muy similares, y además se puede ver que la diferencia entre el contraste de los dos ensayos es de 1.73821%, el cual es un porcentaje de diferencia muy bajo.

La velocidad de degradación para este ensayo se calcula en 1,1234 mg/L-h, de acuerdo a los datos obtenidos en las primeras 12 horas de proceso, la cual es muy similar a la calculada a pH 9.6 (1,0445 mg/L-h).

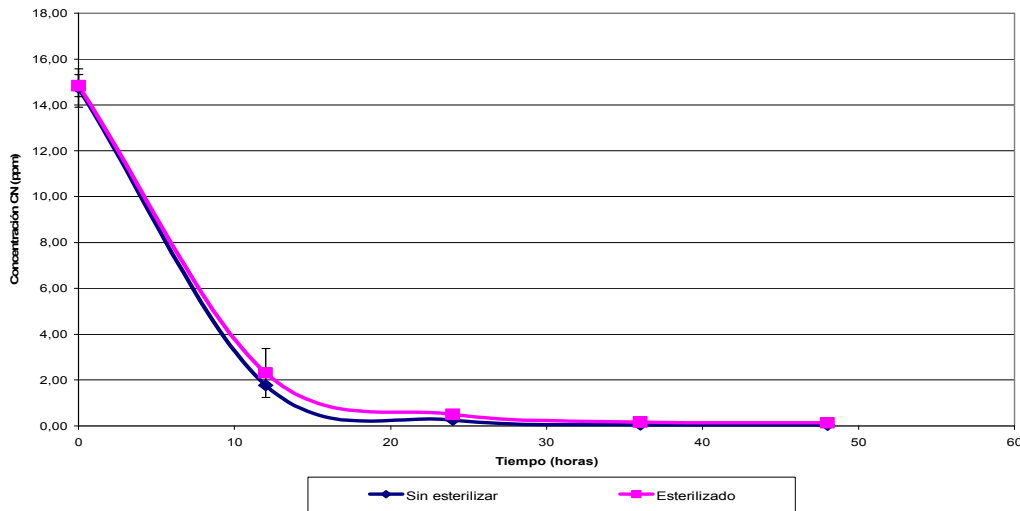
5.5.2 Ensayo sin esterilizar

Con el fin de determinar la viabilidad del proceso a escala industrial donde se puede dificultar el proceso de esterilización, se realiza un ensayo, con las condiciones óptimas de operación, sin esterilizar previamente los materiales a utilizar. En la tabla 24 se muestran los resultados obtenidos.

Tiempo (horas)	Concentración de cianuro (ppm)	% de degradación
0	14,74	0
12	1,77	87,98119992
24	0,26	98,2358814
36	0,05	99,65053573
48	0,04	99,7410628

Tabla 24. Datos ensayo agar-agar, caudal 0,17 mL/s y sin esterilizar.

Adicionalmente se realiza una comparación gráfica de los datos obtenidos con un ensayo estéril y otro sin esterilizar, bajo las mismas condiciones de operación (pH 9,6, caudal 0,17 mL/s y agar-agar como matriz de inmovilización). La grafica 14 muestra esta comparación.



Gráfica 14. Comparación de ensayo estéril y ensayo sin esterilizar bajo las mismas condiciones de operación.

La velocidad de degradación para este ensayo se calcula en 1,0806 mg/L-h, de acuerdo a los datos obtenidos en las primeras 12 horas de proceso, la cual no difiere del resultado obtenido bajo condiciones estériles (1,0445 mg/L-h).

Se comprueba, con el análisis de varianza, que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los ensayos con y sin esterilizar, el cual se presenta en la tabla 25

Fuente	Suma de los cuadrados	Df	Media cuadrada	F-Ratio	P-Valor
Entre grupos	11,2559	1	11,2559	0,01	0,9351
Dentro de grupos	29736,9	18	1652,05		
Total (Corr.)	29748,1	19			

Tabla 25. Análisis de varianza para ensayos con agar, caudal 0,17 mL/s con y sin esterilizar

En la tabla 25 se observa que en el análisis de varianza realizado en el Software Statgraphics para determinar la diferencia entre los ensayos con agar-agar a caudal 0.17 mL/s con y sin esterilizar, no presenta diferencias significativas, obteniendo un p valor de 0.9351, el cual es inferior a 0.05 que es el que indica si existen diferencia, esto corrobora lo que se aprecia en la grafica 14 donde casi que existe una superposición de los resultados

Prueba del rango múltiple de Duncan

pH	Cuenta	Media	Grupos Homogéneos
2	10	75,6029	X
1	10	77,1033	X
Contraste			Diferencia
1 - 2			1,50039

Tabla 26. Prueba del rango múltiple de Duncan.

En la tabla 26 correspondiente a la prueba de Duncan, se observa que existe una diferencia porcentual entre los dos ensayos de 1.50039%, indicando una diferencia muy mínima entre los dos procesos.

Después de terminado el proceso de degradación de cianuro se procede a hacer una tinción de Gram para determinar si hay algún tipo de contaminación en el proceso. En la figura 7 se presenta el resultado de esta prueba.

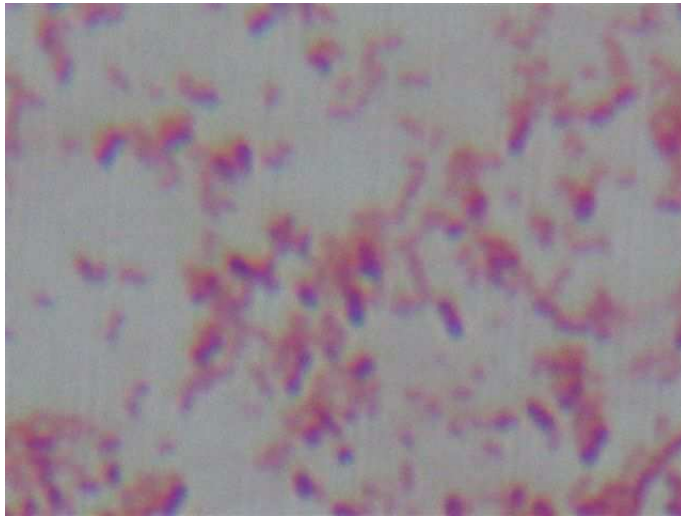


Figura 8. Tinción de Gram realizada después del proceso biodegradativo

Como se puede apreciar en la figura 7, durante el proceso biodegradativo realizado sin esterilizar previamente, se presenta contaminación, pero ésta no afecta de manera significativa los resultados obtenidos al ser comparados con el ensayo llevado a cabo bajo las mismas condiciones de operación pero esterilizado.

6. ESTIMACIÓN ECONOMICA

Para determinar una posible viabilidad económica del proceso con los datos obtenidos en el laboratorio, los materiales y equipos empleados en el desarrollo del proyecto, se proporciona una estimación económica para la cual es importante tener en cuenta que se asegura un rango de +25% a -15% en precisión, 25% por encima y 15% por debajo. Debido a que el proceso de inmovilización para degradación de cianuro montado en el laboratorio no tiene un similar en el mercado, los costos fijos de inversión se basan en los costos de adquisición de materias primas, equipos, mano de obra y servicios consumidos. También es importante aclarar que se tienen datos muy confiables de los equipos y materia primas utilizadas en el proceso, bien sea porque fueron recientemente adquiridos o porque se tienen cotizaciones actualizadas (Turton, 2003).

Los costos que se presentan a continuación corresponden al montaje con los mejores resultados obtenidos en el análisis estadístico.

6.1 COSTO DE CAPITAL

Los costos aquí reportados se basan en precios de equipos y materiales cotizados por proveedores actuales del mercado, los cuales se presentan como anexos a este trabajo.

Costo equipos

En la tabla 27 se presenta los costos de los equipos utilizados en el proceso.

Equipo	cantidad	Precio
Bomba multicanal L/S [®] (incluidas mangueras)	1	\$ 7.493.600.00
Compresor de aire	1	\$24.000.00
Electrodo de lón selectivo de CN	1	\$443.822.00
Columna	1	\$121.800.00
Filtros de aire	2	\$80.000.00
Shaker	1	\$11.000.000.00
Costo total		\$19.163.222.00

Tabla 27. Costo de los equipos

6.2 COSTO DE OPERACIÓN

6.2.1 Costos de materias primas

En la tabla 28 se presentan los costos de las materia primas utilizadas en el proceso.

Reactivo	cantidad	Precio
Na ₂ CO ₃	1000 g	\$8000.00
NaHCO ₃	1000 g	\$8000.00
Cianuro de potasio	100 g	\$266.336.00
Agar-agar	1000 g	\$721.056.00
Caldo nutritivo	500 g	\$560.000.00
Aceite	250 mL	\$2500.00
Costo total		\$1.565.892.00

Tabla 28. Costos de reactivos

La tabla 29 muestra el costo de los materiales y su cantidad necesaria para el montaje del experimento realizado bajo las condiciones óptimas de operación y con un volumen de solución de cianuro a tratar de 500 mL.

Reactivo	cantidad	Precio
Na ₂ CO ₃	0.5 g	\$4.00
NaHCO ₃	1.05 g	\$8.40
Cianuro de potasio	0.0075 g	\$20.00
Agar-agar	1.2 g	\$865.26
Caldo nutritivo	0.6 g	\$672.00
Aceite	150 mL	\$1500.00
Costo total		\$3069.66

Tabla 29. Costos de reactivos necesarios para el montaje del proceso

6.2.2 Costo de mano de obra

Para el proceso de degradación de cianuro por inmovilización se estima que es necesaria solo una persona para su operación, ya que no es un proceso muy complicado que con la práctica se hace cada vez más fácil, la persona que lo opere debe tener un nivel de conocimiento medio.

Los datos consignados en la tabla 30 son calculados para un mes.

Descripción	Costo (\$)
Numero de trabajadores	1
Salario mensual	408.000.00
Parafiscales (70%)	285.600.00
Total mano de obra directa	693.600.00

Tabla 30. Costos de mano de obra

6.2.3 Costo de servicios industriales

Los costos de servicios industriales (utilities) se calculan para un batch, es decir, para un proceso de 48 horas en continuo. La tabla 31 muestra los costos energéticos estimados.

Descripción	Valor
Costo kw-h	\$215
Potencia de la bomba	0.075 KW
Potencia del compresor	0.0025 KW
Duración del proceso	48 horas
Consumo energético Bomba	3.6 KW-h
Consumo energético compresor	0.12 KW-h
Costo total consumo energía	\$799.80

Tabla 31. Servicios industriales basados en costos proporcionados por la Universidad EAFIT.

6.3 COSTO TOTAL.

La tabla 32 muestra el costo total del montaje.

Descripción	Valor
Costo total equipos	\$19.114.400.00
Costo total reactivos consumidos	\$3069.66
Total mano de obra directa	\$693.600.00
Costo total consumo energía	\$799.80
Costo total	\$19.811.869.00

Tabla 32. Costo total del montaje

6.4 INDICADORES ECONÓMICOS

En la tabla 33 se muestran los indicadores más significativos en cuanto a su valor económico, evaluando su incidencia en el producto que para este estudio es ppm de CN degradado.

Indicador	Valor
\$ de Na ₂ CO ₃ / ppm de CN degradadas	0,27
\$ de NaHCO ₃ / ppm de CN degradadas	0,57
\$ de agar-agar / ppm de CN degradadas	58,82
\$ de Caldo Nutritivo / ppm de CN degradadas	45,68
\$ de aceite / ppm de CN degradadas	101,97
\$ de consumo energético / ppm de CN degradadas	54,37
\$ de mano de obra (16 horas) / ppm de CN degradadas	3929,3
\$ total de operación / ppm de CN degradadas	4190,98

Tabla 33. Indicadores económicos

En los datos que se muestran en la tabla 33 se puede observar que el factor que mas influye económicamente en el proceso es el costo de la mano de obra, pero se debe tener en cuenta que ésta se encuentra calculada para 16 horas de trabajo y el proceso realmente no necesita toda esta dedicación, por lo que este costo puede disminuirse notablemente.

La mayor parte de las investigaciones para la biodegradación de cianuro han sido realizadas con cultivos puros a escala de laboratorio y tal información puede ser difícil de aplicar a escala industrial. (Mosher y Figueroa, 1996).

De acuerdo a la información reportada por Mosher y Figueroa (1996), se puede decir que los costos de reactivos para procesos biológicos como éste, es bajo, ya que los únicos reactivos que se utilizan son los nutrientes necesarios para el mantenimiento del microorganismo.

7. CONCLUSIONES

La diferencia que hay entre la incidencia del caudal más pequeño y los otros dos se debe al mayor tiempo de residencia que otorga el caudal de 0.17 mL/s, logrando que haya un mayor contacto de la bacteria con el medio, lo cual permite que ésta pueda realizar su proceso metabólico de forma más eficiente.

El porcentaje de degradación de la solución es proporcional al tiempo de residencia en el proceso de biodegradación, lo cual se puede observar claramente para el caudal de 0.17 mL/s, con el que se obtuvo los mayores porcentajes de degradación de cianuro, mientras que en los otros dos caudales, 0.23 y 0.29 mL/s, no existen diferencias claras entre ellos, para cualquiera de las dos matrices.

Mediante el proceso de inmovilización para la degradación de cianuro en solución, con la bacteria *Pseudomonas fluorescens*, trabajando con la matriz agar y con un caudal de 0.17 mL/s se obtuvo un porcentaje de degradación de 99.12% en 48 horas, con el cual fue posible alcanzar concentraciones de cianuro por debajo de 1 ppm. Lo cual demuestra que la inmovilización por atrapamiento es un proceso viable para la biodegradación.

Con los experimentos hechos con la matriz de alginato de calcio, no se logró en las 48 horas de duración del proceso disminuir la concentración inicial de cianuro a un valor menor a 1 ppm, con lo cual se demuestra que no es una buena matriz para este tipo de experimento comparando con los resultados obtenidos con agar.

En el resultado del análisis del diseño de experimentos se puede evidenciar que el tiempo y el tipo de matriz son las variables más significativas, esto se

respalda en los datos obtenidos en los experimentos ya que se observa que para la matriz agar-agar en un tiempo aproximado de 15 horas ya se tenía una concentración de cianuro inferior a 1 ppm.

Al comparar los resultados obtenidos con las dos matrices de inmovilización se observó que la matriz agar-agar obtuvo una mayor velocidad de degradación, 1.0445 mg/L-h, comparado con 0.4771 mg/L-h, el más alto observado en la matriz de alginato. Con este resultado, la más alta capacidad de degradación y lo que arrojó el análisis estadístico, se puede concluir que la matriz agar-agar fue la mejor para trabajar a las condiciones óptimas en el proceso de inmovilización de *Pseudomonas* para la degradación de cianuro.

Al observar los resultados de la degradación de cianuro en suspensión hechos por Camargo y Ossa (2005), se puede determinar que hay concordancia en el resultado final de las dos investigaciones, ya que se logró obtener una concentración final de cianuro inferior a 1 ppm, apta para ser descargada, ocasionando un efecto muy inferior en el medio ambiente. Pero en la inmovilización se redujo el tiempo de gradación de 72 horas (Camargo y Ossa, 2005) a 15 horas y se alcanzó una velocidad de degradación 1.0445 mg/L-h frente a 0.1626 mg/L-h obtenida en con las células en suspensión.

Se comprueba que la inmovilización de la bacteria *Pseudomonas fluorescens*, para la degradación de cianuro, es efectiva, se produce en un corto tiempo, de manera natural y limpia, lo cual es un logro positivo ya que todo intento se haga para mejorar la calidad de vida de la humanidad es bueno y se debe estimar y seguir mejorando para seguir entregando soluciones a los problemas.

Los resultados obtenidos en el experimento de agar-agar con pH 8,6, aunque muestran un grado más bajo de concentración de cianuro, tienen una similitud muy estrecha con los obtenidos a un pH de 9,6, por lo cual se puede concluir que los resultados pueden ser comparables y que es mucho mayor el efecto de la bacteria sobre la concentración de cianuro que el efecto de volatilización y/o adsorción.

Los resultados obtenidos en el experimento realizado para el mejor resultado sin esterilizar, mostraron que a pesar de que hubo contaminación, el proceso de degradación de cianuro obtuvo un resultado muy similar al que se hizo en condiciones de esterilidad, lo cual es un resultado muy positivo ya que si se pensara llevar el proceso a la industria no habría problemas con la contaminación factor que haría que el montaje del proceso fuera mas rápido, manejable y económico.

En los indicadores económicos encontrados en el estudio financiero se observa que hay valores que son muy altos y se debe tener en cuenta, por ejemplo, el aceite de cocina necesario para hacer las esferas de agar, tiene un costo muy alto de \$101,97 pero puede ser reutilizado varias veces ya que este no se calienta ni se ensucia. Así como para la mano de obra, que se estima por 2 días completos de trabajo (16 horas), pero para el proceso como tal sólo se requiere la atención de la persona encargada en una fracción de este tiempo.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el laboratorio y a los costos calculados, se puede decir que el proceso estudiado en este trabajo, es una alternativa viable para la disminución de la concentración de cianuro en solución acuosa, pues aunque los costos sean altos comparados con trabajos anteriores, se debe tener en cuenta que en esta investigación se trabaja con reactivos grado analítico, los cuales tienen un alto costo.

8. RECOMENDACIONES

Se sugiere evaluar otra fuente de carbono para disminuir costos debido a que el caldo nutritivo tiene un alto precio, se puede pensar en un subproducto industrial como medio de cultivo complejo: melaza, extracto de levadura.

En futuros ensayos se puede ensayar con diferentes métodos de inmovilización, para comparar sus ventajas y desventajas en la búsqueda de tener mejores resultados.

Se recomienda hacer un escalado del proceso para poder degradar grandes cantidades de cianuro y realizar estimaciones económicas para determinar la viabilidad del proceso.

En futuras investigaciones se puede evaluar el número de ciclos viables para las condiciones óptimas obtenidas en este trabajo, es decir, las veces que pueden ser reutilizadas las esferas con las mismas células inmovilizadas.

9. BIBLIOGRAFÍA

Abu Al-Rub F.A, El-Naas M.H, Benyahia F, Ashour I. (2004). Biosorption of nickel on blank alginate beads, free and immobilized algal cells. En: Process Biochemistry. 39: 1767-1773

Akcil, A. (2003). Destruction of cyanide in gold mill effluents: biological versus chemical treatments. En: Biotechnology Advances, 21: 501-511

Akzu Z, Egretli G, Kutsal T. (1999). A comparative study for the biosorption characteristics of chromium (VI) on Ca-alginate, agarose and immobilized *C. vulgaris* in a continuous packed bed column. En: J. Environ. Sci Health. 34: 295-316

Arroyo Miguel. (1998). Immobilized enzymes: theory, methods of study and applications. En: Ars Pharmaceutica. 39 (2): 23-39

Arzu, Y. y Zumriye, A. (2000). Biodegradation Kinetics of Ferrous (II) cyanide complex ions by immobilized *Pseudomonas fluorescens* in a packed bed column reactor. En: Process Biochemistry. 35: 615- 622

Arzu, Y. y Zumriye, A. (2002). Effect of internal diffusivity of ferrous (II) cyanide complex ions in Ca-alginate immobilized *Pseudomonas fluorescens* gel beads on the biodegradation rate. En: Process Biochemistry. 37: 747-752

ATSDR. (2005). Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. Reseña Toxicológica de Cianuro. Atlanta, GA: Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EE.UU., Servicio de Salud Pública (http://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs8.html)

Blanco, J. y Malato, S. (2001). Purificación de Aguas por Fotocatálisis Heterogénea: Estado del Arte. En: Applied Catalysis. Num 28.

Breed, R. (1997). Bergey's manual of determinative bacteriology. 7th. ed. London: Williams and Wiikins Co. Baltimore.

Camargo P y Ossa C. (2005). Tratamiento de aguas contaminadas con cianuro. Trabajo de grado. Universidad EAFIT. Medellín.

Chapatwala, K., Babu, G., Vijaya, O., Kumar, K. y Wolfram, JH. (1997). Biodegradation of cyanides, cyanates and thiocyanates to ammonia and carbon dioxide by immobilized cells of *Pseudomona putida*. En: Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 20: 28-33.

Córdoba, D. (2000). Toxicología. 4th ed. Manual moderno.

Dey Gargi, Singh B, Banerjee R. (2003). Immobilization of α -amilase produced by *Bacillus circulans* GRS 313. En: Brazilian Archives of Biology and Technology. 46(2): 167-176

Dhillon J K, Shivaraman N. (1999). Biodegradation of cyanide compounds by a *Pseudomonas* species (S1). En: Canadian Journal Of Microbiology. Vol. 45 (3): 201-208

Dictor MC, Battaglia-Brunet F, Morin D, Bories A y Clarens M. (1997). Biological treatment of gold ore cyanidation wastewater in fixed bed reactors. En: Environmental Pollution. 97 (3): 287-294

Ebbs, S. (2004). Biological degradation of cyanide compounds. En: Environmental biotechnology. 15: 231-236

Eweis J y Ergas S. (1999). Principios de Biorrecuperación. MC Graw Hill.

Fiol, N., Escudero, C., Poch, J., Villaescusa, I. (2006). Preliminary studies on Cr(VI) removal from aqueous solution using grape stalk wastes encapsulated in calcium alginate beads in a packed bed up-flow column. En: *Reactive & Functional Polymers*. 66: 795-807.

Fuentes, J., Gomez, U. (2001). Guías toxicológicas. Urgencias manual 1. Gobernación de Antioquia, Dirección seccional de salud.

Gutiérrez, F., Mártir, M., Plaza, M. y Garbi, C. (2003). Descontaminación de efluentes Tóxicos por bacterias nativas inmovilizadas: Biofiltración de propacloro. En: *Información Tecnológica*. 14: 29-35

Jerabkova, H. y Kralova, Y. (1999). Absorción y biodegradación de n-alcanos. En: *Revista de ingeniería Química*. 487-492.

Kong Y, Hou Y, Yang J, Zhang J, Shi D, Xin W. (2005) Biodesulfurization of dibenzothiophene by immobilized cells of *Pseudomonas stutzeri* UP-1. En: *Fuel*. 84: 1975-1979.

Kowalska M, Bodzek M y Bohdziewicz J. (1998). Biodegradation of phenols and cyanides using membranes with immobilized microorganisms. En: *Process Biochemistry*. 33(2): 189-197

Logsdon, M., Hagelstein, K y Mudder, T. (2003). The Management of Cyanide in Gold Extraction. International council on Metals and the environment. <http://www.cyantists.com>.

Luque-Almagro, V., Blasco R, Huertas M, Martinez-Luque M, Moreno-Vivian C, Castillo F, Roldan M. (2005). Alkaline cyanide biodegradation by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. Departamento de bioquímica y biología molecular. Universidad de Córdoba, España.

Macfaddin, J. (1980). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Buenos aires: Médica Panamericana S.A. p.370.

Monokrystalý. (2004). Cyanide ion-selective electrode type 06-37: Working instruction. República Checa.

Mosher JB y Figueroa L. (1996). Biological oxidation of cyanide: a viable treatment option for the minerals processing industry?. En: Minerals Engineering, 9(5):573-581

Park, Don-Hee., Cha, Jin-Myeong., Ryu, Hwa-Won., Lee, Gwang-Woo., Yu, Eui-Youn., Rhee, Jong-Il., Park, Ju-Jung., Kim, Si-Wouk., Lee, In-Wha., Joe, Yung-Il., Ryu, Yeon-Woo., Hur, Byung-Ki., Park, Jung-Keug., Park, Kyungmoon. (2002). Hydrogen sulfide removal utilizing immobilized *Thiobacillus sp.* IW with Ca-alginate bead. En: Biochemical Engineering Journal. 11: 167-173.

Parra, S. (2001). Combinación de procesos fotocatalíticos y biológicos como contribución a la detoxificación del agua. En: Revista VirtualPro. 3: 10.

Ramírez M. (2002). Biotecnología ambiental. Diplomado en Biotecnología Aplicada. Universidad EAFIT. Medellín. Pp: 33-62

Roig. M.G, Pedraz MA y Sánchez JM. (1999). Adsorción y biodegradación primaria de surfactantes aniónicos. En: Ingeniería Química. Año XXXI (360)

Sá, C., Boaventura, R. (2001). Biodegradation of phenol by *Pseudomonas putida* DSM 548 in a trickling bed reactor. En: Biochemical Engineering Journal. 9: 211-219.

Scragg A.H. (2000). Células y enzimas inmovilizadas. En: Biotecnología para Ingenieros, Sistemas biológicos en Procesos tecnológicos. Editorial Limisa. Pp 243-261

Shim, H., Shin, E., Yang, S. (2001). A continuous fibrous-bed bioreactor for BTEX biodegradation by a co-culture of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens*. En: Advances in Environmental Research. 7:203-216.

Shivaraman, N. y Parahad, N. (1991). Biological Treatment of Cyanide Wastewaters. En: National Environmental Engineering Research Institute. 39-45.

Smith A y Mudder T. (1991). The chemistry and treatment of cyanidation wastes. En: Mini Journal Book Limited.

Suh Y, Park J, Yang J. (1994). Biodegradation of cyanide compounds by *Pseudomonas fluorescens* immobilized on zeolite. En: Enzyme and microbial technology. 16 (6): 529-533.

Turton R, Bailie R, Whiting W, Shaeiwitz J. (2003). Analysis, Synthesis and Design of Chemical Processes. Segunda edición. Editorial Prentice Hall. Pp 143-219

Vilain S, Cosette P, Hubert M, Lange C, Junter G-A, Jouenne T. (2004). Comparative proteomic analysis of planktonic and immobilized *Pseudomonas aeruginosa* cells: a multivariate statistical approach. En: Analytical Biochemistry. 329:120-130

Wang C, Kunz D y Venables B. (1996). Incorporation of Molecular Oxygen and Water during Enzymatic Oxidation of Cyanide by *Pseudomonas fluorescens*. En: Applied and Environmental Microbiology. 62 (6): 2195 -2197.

White D, Timothy A y Woolard C. (2000). Biological treatment of cyanide containing wastewater. En: Water Research. 34(7): 2105-2109

Yurramendi L, Ipiñazar E y Pavon J M. (1994). Eliminación de cianuros presentes en efluentes industriales. En: Ingeniería Química. 306: 129-134

Zaiat M, Rodríguez J.A.D, Ratzubei S.M, Camargo E.F.M, y Borzani W. (2001). Anaerobic sequencing batch reactor for wastewater treatment: a developing technology. En: Applied of Microbiology and Biotechnology. 55: 29-35

ANEXOS

ANEXO A

12:13 wednesday, September 22, 2006

Procedimiento GLM
Información del nivel de clase

Clase	Niveles	Valores
Caudal	3	0.17 0.23 0.29
Matriz	2	agar alginato
Tiempo	5	0 12 24 36 48

Número de observaciones 60

2

12:13 wednesday, September 22, 2006

Procedimiento GLM

Variable dependiente: Degradaci_n Degradación

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	21	83968.00926	3998.47663	353.24	<.0001
Error	38	430.13991	11.31947		
Total correcto	59	84398.14917			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	Degradaci_n Media
0.994903	5.351572	3.364442	62.86829

Fuente	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Caudal	2	123.64929	61.82464	5.46	0.0082
Matriz	1	7782.53503	7782.53503	687.54	<.0001
Tiempo	4	70430.85341	17607.71335	1555.52	<.0001
Caudal*Matriz	2	90.98949	45.49474	4.02	0.0261
Caudal*Tiempo	8	263.96666	32.99583	2.91	0.0123
Matriz*Tiempo	4	5276.01537	1319.00384	116.53	<.0001

3

12:13 wednesday, September 22, 2006

Procedimiento GLM

Prueba del rango múltiple de Duncan para Degradaci_n

NOTA: Este test controla el índice error comparisonwise de tipo I, no el índice de error experimentwise.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	38
Error de cuadrado medio	11.31947

Número de medias	2	3
Rango crítico	2.154	2.264

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Duncan Agrupamiento	Media	N	Caudal
A	64.847	20	0.17
B	62.272	20	0.29
B	61.486	20	0.23

4

12:13 wednesday, September 22, 2006

Procedimiento GLM

Prueba del rango múltiple de Duncan para Degradaci_n

NOTA: Este test controla el índice error comparisonwise de tipo I, no el índice de error experimentwise.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	38
Error de cuadrado medio	11.31947

Número de medias	2
Rango crítico	1.759

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Duncan Agrupamiento	Media	N	Matriz
---------------------	-------	---	--------

A	74.2573	30	agar
B	51.4793	30	alginato

5

12:13 wednesday, September 22, 2006

Procedimiento GLM

Prueba del rango múltiple de Duncan para Degradaci_n

NOTA: Este test controla el índice error comparisonwise de tipo I, no el índice de error experimentwise.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	38
Error de cuadrado medio	11.31947

Número de medias	2	3	4	5
Rango crítico	2.781	2.923	3.017	3.084

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Duncan Agrupamiento	Media	N	Tiempo
A	94.180	12	48
B	90.088	12	36
C	74.682	12	24
D	55.391	12	12
E	0.000	12	0

ANEXO B

One-Way ANOVA - %degradacion by pH

Analysis Summary

Dependent variable: %degradacion

Factor: pH

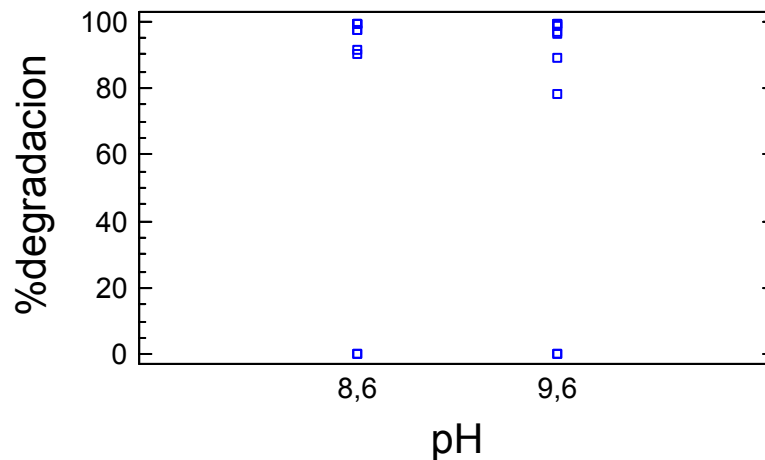
Number of observations: 20

Number of levels: 2

The StatAdvisor

This procedure performs a one-way analysis of variance for %degradacion. It constructs various tests and graphs to compare the mean values of %degradacion for the 2 different levels of pH. The F-test in the ANOVA table will test whether there are any significant differences amongst the means. If there are, the Multiple Range Tests will tell you which means are significantly different from which others. If you are worried about the presence of outliers, choose the Kruskal-Wallis Test which compares medians instead of means. The various plots will help you judge the practical significance of the results, as well as allow you to look for possible violations of the assumptions underlying the analysis of variance.

Scatterplot by Level Code



ANOVA Table for %degradacion by pH

Analysis of Variance

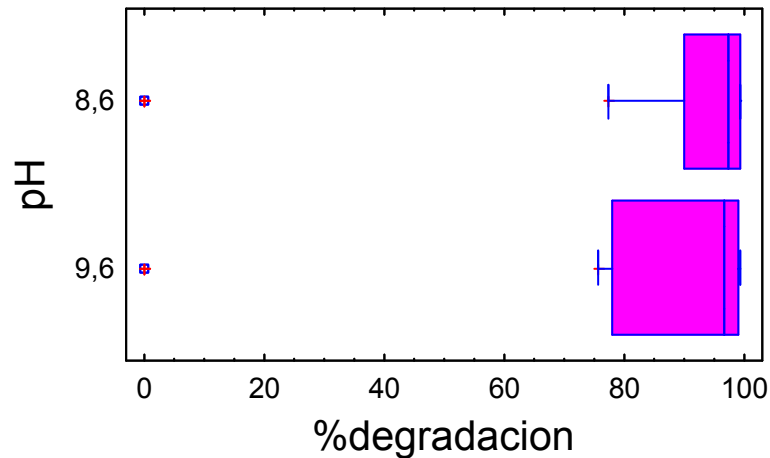
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	15,1069	1	15,1069	0,01	0,9249
Within groups	29731,9	18	1651,77		

Total (Corr.) 29747,0 19

The StatAdvisor

The ANOVA table decomposes the variance of %degradacion into two components: a between-group component and a within-group component. The F-ratio, which in this case equals 0,00914587, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is greater than or equal to 0,05, there is not a statistically significant difference between the mean %degradacion from one level of pH to another at the 95,0% confidence level.

Box-and-Whisker Plot



Multiple Range Tests for %degradacion by pH

Method: 95,0 percent Duncan

pH	Count	Mean	Homogeneous Groups
9,6	10	75,6029	X
8,6	10	77,3412	X
Contrast			Difference
8,6 - 9,6			1,73821

* denotes a statistically significant difference.

The StatAdvisor

This table applies a multiple comparison procedure to determine which means are significantly different from which others. The bottom half of the output shows the estimated difference between each pair of means. There are no statistically significant differences between any pair of means at the 95,0% confidence level. At the top of the page, one homogenous group is identified by a column of X's. Within each column, the levels containing X's form a group of means within which there are no statistically significant differences. The method currently being used to discriminate among the means is Duncan's multiple comparison procedure. With this method, there is a 5,0% risk of calling one or more pairs significantly different when their actual difference equals 0.

Variance Check

Cochran's C test: 0,506271 P-Value = 0,970805
Bartlett's test: 1,00008 P-Value = 0,970785
Hartley's test: 1,0254
Levene's test: 0,00642453 P-Value = 0,937

The StatAdvisor

The four statistics displayed in this table test the null hypothesis that the standard deviations of %degradacion within each of the 2 levels of pH is the same. Of particular interest are the three P-values. Since the smallest of the P-values is greater than or equal to 0,05, there is not a statistically significant difference amongst

the standard deviations at the 95,0% confidence level.

Kruskal-Wallis Test for %degradacion by pH

pH	Sample Size	Average Rank
8,6	10	11,6
9,6	10	9,4

Test statistic = 0,697195 P-Value = 0,403727

The StatAdvisor

The Kruskal-Wallis test tests the null hypothesis that the medians of %degradacion within each of the 2 levels of pH are the same. The data from all the levels is first combined and ranked from smallest to largest. The average rank is then computed for the data at each level. Since the P-value is greater than or equal to 0,05, there is not a statistically significant difference amongst the medians at the 95,0% confidence level.

ANEXO C

One-Way ANOVA - %degradacion by esterilización

Analysis Summary

Dependent variable: %degradacion

Factor: esterilización

Number of observations: 20

Number of levels: 2

The StatAdvisor

This procedure performs a one-way analysis of variance for %degradacion. It constructs various tests and graphs to compare the mean values of %degradacion for the 2 different levels of esterilización. The F-test in the ANOVA table will test whether there are any significant differences amongst the means. If there are, the Multiple Range Tests will tell you which means are significantly different from which others. If you are worried about the presence of outliers, choose the Kruskal-Wallis Test which compares medians instead of means. The various plots will help you judge the practical significance of the results, as well as allow you to look for possible violations of the assumptions underlying the analysis of variance.

Scatterplot by Level Code



ANOVA Table for %degradacion by esterilización

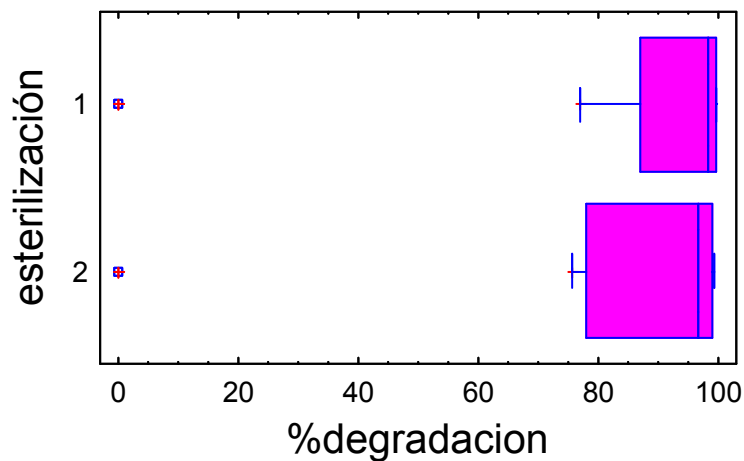
Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	11,2559	1	11,2559	0,01	0,9351
Within groups	29736,9	18	1652,05		
Total (Corr.)	29748,1	19			

The StatAdvisor

The ANOVA table decomposes the variance of %degradacion into two components: a between-group component and a within-group component. The F-ratio, which in this case equals 0,00681328, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is greater than or equal to 0,05, there is not a statistically significant difference between the mean %degradacion from one level of esterilización to another at the 95,0% confidence level.

Box-and-Whisker Plot



Multiple Range Tests for %degradacion by esterilización

Method: 95,0 percent Duncan

esterilización	Count	Mean	Homogeneous Groups
----------------	-------	------	--------------------

2	10	75,6029	X
1	10	77,1033	X

Contrast	Difference
----------	------------

1 - 2	1,50039
-------	---------

* denotes a statistically significant difference.

The StatAdvisor

This table applies a multiple comparison procedure to determine which means are significantly different from which others. The bottom half of the output shows the estimated difference between each pair of means. There are no statistically significant differences between any pair of means at the 95,0% confidence level. At the top of the page, one homogenous group is identified by a column of X's. Within each column, the levels containing X's form a group of means within which there are no statistically significant differences. The method currently being used to discriminate among the means is Duncan's multiple comparison procedure. With this method, there is a 5,0% risk of calling one or more pairs significantly different when their actual difference equals 0.

Variance Check

Cochran's C test: 0,506354 P-Value = 0,97042

Bartlett's test: 1,00008 P-Value = 0,9704

Hartley's test: 1,02574

Levene's test: 0,00122793 P-Value = 0,972432

The StatAdvisor

The four statistics displayed in this table test the null hypothesis that the standard deviations of %degradacion within each of the 2 levels of esterilización is the same. Of particular interest are the three P-values. Since the smallest of the P-values is greater

than or equal to 0,05, there is not a statistically significant difference amongst the standard deviations at the 95,0% confidence level.

FIL TRACCION Y ANALISIS LTDA.
 Nit. 800100094-1
 P.O. BOX 2507554 FAX: 4117340 Medellin

FECHA (D-M-A): 18-05-2006 FAVOR VERLOS
 FORMA DE PAGO: 30 DIAS Ultima rev: 15-06-02
 VALDEZ DE LA OPORTA: 18-05-2006

COTIZACION: 14095
 Señal:
 CATALINA GONZALEZ
 LABORAT ORO
 UNIVERSIDAD EAFIT
 MEDULLIN

ANEXO D

Con nuestro cordial saludo adjuntamos la cotización de los siguientes productos:

Cantidad	Referencia	Descripción	Marca	Valor Unitario	IVA	Total	Días Entrega
1	A1048721000	POTASSIO DIHIDROGENOFOSFATO P.A. Kg	MERCK	92,400	16	92,400	5
1	A1049670100	POTASSIO CLORURO P.A. 100 g	MERCK	329,600	16	329,600	45
1	A1023821000	CLORURO CLORURO ZINCO P.A. Kg	MERCK	171,500	16	171,500	5
1	42400-60	GRANULADA PLASTICA 55 TUBOS 16 mm	BRAND	37,700	16	37,700	5
1	7002-00	TIP BOE EL TACCIA DB	BRAND	94,900	16	94,900	5
1	A1011451000	AMONIO CLORURO P.A. Kg	MERCK	120,200	16	120,200	45
1	419417	AMONIO CLORURO P.A. Kg	C. BRISA	104,300	16	104,300	5

El tiempo de entrega (días) es válido salvo variación
 El desecho de productos controlados por el Consejo Nacional de Espectáculos está limitado a las condiciones legales vigentes.

SUBTOTAL: 690,600.00
 IVA: 198,576.00
 TOTAL: 889,176.00

Nos despedimos atentamente, esperamos su respuesta

CONSTANZA SANCHEZ RODRIGUEZ

Origen: ST-2390

FIL TRACCION Y ANALISIS LTDA.
 NIT. 800160884-1
 P.BOX 2507554 FAX: 4117340 Medellin

FECHA (DAMA) 22 05 2006
 FORMA DE PAGO 30 DIAS
 VALDEZ DELA OFERTA: 22 05 2006

FAVOR Verlos
 Ultimas - 15-06-02

COTIZACION/IVA 14096
 Servicio)
 CATALINA GONZALEZ
 LABORATORIO
 UNIVERSIDAD SAFTI
 MEDULLIN

Con nuestro cordial saludo adjuntamos la cotización de los siguientes productos:

Cantidad	Referencia	Descripcion	Marca	Valor Unitario	IVA	Total	Dias Entrega
1	AL016141000	AGUA AGUA (MULTIPICADO LIBRE)	MERCK	621,600	16	621,600	5

*El tiempo de entrega (días) es valido solo veritapend'
 El despacho de productos controlados por el Consejo Nacional de Espectáculos está
 limitado a las condiciones legales vigentes

SUBTOTAL: 621.600,00
 IVA: 99.456,00
 TOTAL: 721.056,00

Nos despedimos atentamente, esperando su respuesta

CONSTANZA SANCHEZ RODRIGUEZ

Origen ANEXO

ANEXO E

ANEXO F



MR Y CIA LTDA

COMERCIALIZACION DE PRODUCTOS PARA LABORATORIO

NIT 811.026.956-0

Medellín, 23 de mayo de 2006

Señores:

UNIVERSIDAD EAFIT

Att. Docente Catalina Giraldo

Ingeniería de Procesos

Medellín

COTIZACION 7158A

CAN	DESCRIPCION	MARCA	VALOR UNITARIO	IVA
1	Frasco x 100 gr. Alginic Acid Sodium Low Viscosity	SIGMA Ref. A-2158	131.500	16%

NOTA: Sírvase revisar en el catalogo y/o pagina Web de SIGMA: nombre, referencia y presentación antes de enviar orden de compra, ya que por ser productos de importación no se aceptan devoluciones.

CONDICIONES DE VENTA:

VALIDEZ OFERTA: 30 DIAS FECHA COTIZACIÓN
FORMA DE PAGO: 30 DIAS FF
FECHA DE ENTREGA: IMPORTACION 45 A 60 DIAS O DE C

Atentamente,

ADIELA BEDOYA MORENO
Asesor Comercial

Calle 1 A N. 55 –26 Piso 1

PBX: 362 0717 – e-mail: melvarivera@epm.net.co

ANEXO G

Medellín, Junio 21 /2006

Señores

UNIVERSIDAD EAFIT

Atn, MANUEL SANTAMARIA

Ciudad

COT. No. 0425

ITEM	PRODUCTO	CANT	VALOR	TOTAL
1	Columna Cromatográfica de O externo 30 mm espesor 2 mm, O interno 26 mm, llave teflón con placa, altura 100 cm	1	165.000	165.000
2	Columna Cromatográfica de O externo 30 mm espesor 2 mm, O interno 26 mm, llave teflón con placa, altura 27,5 cm. Utilizando tubo de Ustedes	1	105.000	105.000
3	Recortar columna O externo 30 x 2 mm	1	5.000	5.000
		SUB	TOTAL	275.000
			IVA 16%	44.000
			TOTAL	319.000

CONDICIONES COMERCIALES:

FORMA DE PAGO: 30 DIAS

TIEMPO DE ENTREGA: 15 DIAS

Cordial Saludo

Inga. MARIA OLGA MARIN OSPINA

Subgerente y Directora Comercial

Tel: 3516288

Fax EAFIT: 2619381

ANEXO H

Lo invitamos a visitar nuestra página web:
www.lanzettarengifo.com.co
NIT 860.351.784-1

Bogotá D.C., 8 de marzo de 2006

Señores

Ref.:297/06

UNIVERSIDAD EAFIT

Atn.: Ing. Catalina Giraldo

Directora de Proyecto de Investigación

cgiraldo@eafit.edu.co

Medellín

Estimada ingeniera Catalina:

De acuerdo a su solicitud, con mucho gusto estamos cotizando los siguientes artículos de la Casa Cole Parmer Int. de quien somos Representantes Exclusivos para el país.

Cantidad	Descripción
-----------------	--------------------

1	Sistema de bomba multicanal L/S, 115 VAC Ref. Cole Parmer: 77926-07 Valor unitario: \$ 6.460.000
1	Bomba de flujo variable Manostat Rango en pantalla análoga y control remoto, 115 VAC Ref. Cole Parmer: 78223-40 Valor unitario: \$ 4.599.000
1	Bomba peristáltica Manostat, 14 rpm, 115 VAC Ref. Cole Parmer: 78221-00

Valor unitario: \$ 1.244.000

- 1 Paquete x 50 ft de manguera Tygon
Ref. Cole Parmer: 06409-16
Valor unitario: \$ 290.000
- 1 Electrodo ION selectivo, amoniaco
Conector BNC
Rango: 5×10^{-7} a 1.0 M (0.01 a 17.000 ppm)
Ver información adicional en la página 1043 del catálogo 2005/2006
Ref. Cole Parmer: 27502-00
Valor unitario: \$ 1.300.000
- 1 Frasco por 475 ml de solución de ajuste iónico
Ref. Cole Parmer: 27503-50
Valor unitario: \$ 122.000
- 1 Frasco x 125 ml de solución de llenado amoniaco, 0.1 M NH₄ Cl
Ref. Cole Parmer: 27503-71
Valor unitario: \$ 50.000
- 1 Frasco de 475 ml de estandar de amoniaco, 0.1 M NH₄ Cl
Ref. Cole Parmer: 27503-00
Valor unitario: \$ 127.000

CONDICIONES PARA ENTREGA EN PLAZA

- IVA: 16% vigente en el momento de facturar.
- Plazo de entrega: 60 días después de la recepción de su Orden de Compra, confirmada con el anticipo pactado.

Validez de oferta: 30 días fecha de cotización.
Forma de pago: anticipo: 50%
Saldo : 30 días fecha factura.
Consignación en nuestra cuenta nacional No. 032351784-00 de Bancolombia Sucursal Antiguo Country.
Garantía : 1 año por defectos de fabricación

LA **GARANTIA** SOLO SERÁ EFECTIVA CON LOS EQUIPOS QUE EN COLOMBIA SEAN ADQUIRIDOS A TRAVES DEL REPRESENTANTE EXCLUSIVO DE COLE PARMER INTERNATIONAL. - LANZETTA RENGIFO Y CIA LTDA.

LUGAR DE ENTREGA. Los equipos serán entregados en el almacén de acuerdo a la dirección indicada por el cliente. Los equipos se entregarán funcionando correctamente.

Al aprobar los elementos aquí cotizados, favor elaborar una Orden de Compra a nombre de LANZETTA RENGIFO Y CIA LTDA. NIT 860.351.784-1, incluyendo la referencia de nuestra cotización, la dirección donde debe ser entregado el pedido y su NIT. Si es para compra por importación directa favor confirmarlo por escrito y con gusto elaboraremos la factura proforma correspondiente. Este es un requisito indispensable para procesar su pedido.

Agradecemos una vez más su interés en nuestros productos, esperamos la confirmación de su pedido.

Cordialmente,

EMMA OBREGON NAVAS