

# **ESCUELA POLITÉCNICA NACIONAL**

**“INMOVILIZACIÓN DE MICROORGANISMOS DEGRADADORES DE  
CIANURO PARA PREPARACIÓN DE BIOFILTROS”**

**PROYECTO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE  
MASTER OF SCIENCE DE LA ESCUELA POLITÉCNICA NACIONAL**

***Ing. MYRIAN JUDITH VARELA TORRES***

**DIRECTORA: Ing. Margoth Ávila**

**Quito, noviembre del 2006**

# DECLARACIÓN

Yo, Ing. Myrian Judith Varela Torres, declaro que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado de calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Escuela Politécnica Nacional, puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su Reglamento y por la normatividad institucional vigente.

**Ing. Myrian Judith Varela Torres**

# CERTIFICACIÓN

Certifico que el siguiente trabajo fue realizado en su totalidad por la Ing.. Myrian Judith Varela Torres como requerimiento parcial a la obtención del título de Master of Science de la Escuela Politécnica Nacional

***Ing. Margoth Ávila***  
**DIRECTORA DE PROYECTO**

## **AUSPICIO**

La presente investigación contó con el auspicio financiero de la Cooperación Técnica Belga, ejecutada en el Departamento de Metalurgia Extractiva

# DEDICATORIA

En el camino de este trabajo  
entendí que la vida y todo cuanto en ella se nos brinda  
alegrías, penas  
triumfos, tropiezos  
satisfacciones, decepciones  
las respuestas, las dudas  
son un don  
Por eso este trabajo se lo dedico  
al padre, al maestro, al amigo  
Dios.  
Y siendo mis padres el primer don que de Dios recibí  
a ellos dedico este trabajo

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a Dios por haberme dado el don de tener a mi papá Marcos y mi mamá Judith, mis hermanos Marly, Marco y Rodrigo, a mis maestros queridos y a amigas. A todos ellos expreso de corazón mi agradecimiento, pues siempre supieron apoyarme en todos los proyectos emprendidos y en especial en la realización de este trabajo de investigación.

Agradezco la amistad y el cariño de todos los miembros que conforman el DEMEX a quienes les guardo en un lugar especial en mi corazón porque con ellos he caminado un largo trecho, donde llegué a entender que hay que hacer frente a los desafíos de la compañía de buenos compañeros. Gracias porque me permitieron ver crecer y florecer a éste, el mejor de todos los departamentos de la Politécnica Nacional. Con cariño: Ernesto, Alicia, Margoth, Marcelo, Verito, Maggy, Evelyncita, Kléveriño, Vale, Dianita, Juan Fra y todos los chicos tesistas con quienes compartimos trabajo, alegrías, penas, triunfos y tropiezos.

Agradezco también los aportes de Gustavo Muñoz, tanto en las enseñanzas dentro de sus clases como en la corrección de este documento escrito.

Agradezco a Irina, Ibeth, Rosanna y Ximena por su apoyo y amistad brindada

## INDICE GENERAL

<b>Introducción</b> .....	1
<b>1.Biodegradación</b> .....	18
1.1.Fundamentos de la biodegradación .....	19
1.1.1.Transformación biológica de compuestos orgánicos .....	20
1.1.2.Transformación biológica de compuestos inorgánicos .....	20
1.1.3.Parámetros que afectan la biodegradación.....	21
1.2.Biorremediación .....	22
<b>2.Biodegradación del cianuro de sodio</b> .....	<b>23</b>
<b>3.Microorganismos degradadores de cianuro</b> .....	<b>25</b>
3.1.Bacillus cereus .....	25
3.2.Bacillus subtilis .....	27
3.3.Bacillus lentus .....	28
<b>4.Biorreactores</b> .....	<b>29</b>
4.1.Operación en biorreactores .....	29
4.2.Tipos de biorreactores.....	30
4.2.1.Reactores homogéneos y heterogéneos .....	30
4.2.2.Reactores aerobios y anaerobios .....	30
4.2.3.Reactores continuos y discontinuos .....	31
4.2.4.Reactores con biomasa libre y con biomasa inmovilizada	31
<b>5.Biofiltros</b> .....	<b>33</b>
5.1.Operación en un biofiltro .....	33
5.2.Tipos de biofiltros .....	34
5.3.Ventajas y desventajas de un biofiltro respecto a reactores con biomasa libre.....	35
<b>6.Inmovilización de microorganismos</b> .....	<b>36</b>
6.1.Mecanismos de inmovilización de microorganismos .....	36
6.1.1.Adsorción .....	36
6.1.2.Enlace covalente.....	37
6.1.3.Atrapamiento.....	37
6.1.4.Formación de agregados o flóculos .....	38
6.2.Características de la biomasa inmovilizada.....	38

6.3.Ventajas y desventajas de biomasa inmovilizada respecto a biomasa libre.....	39
6.4.Aplicaciones de la biomasa inmovilizada .....	41
6.5.Soportes para inmovilización de biomasa para elaboración de biofiltros.....	43
6.5.1.Carbón activado como soporte para inmovilización de biomasa .....	44
6.5.2.Zeolita como soporte para inmovilización de biomasa.....	46
<b>7.Desarrollo de la experimentación.....</b>	<b>47</b>
7.1.Metodología.....	47
7.1.1.Preparación de la biomasa: bacterias autótrofas .....	47
7.1.2.Adaptación de la biomasa al NaCN .....	48
7.1.2.1Controles para la adaptación de la biomasa al NaCN	49
7.1.2.2.Caracterización de los microorganismos .....	52
7.1.3.Pruebas de degradación de cianuro en soluciones preparadas con la biomasa adaptada .....	52
7.1.4.Inmovilización de biomasa en soportes sólidos.....	40
7.1.4.1.Preparación del soporte.....	53
7.1.4.2.Parámetros de operación y control para inmovilización de biomasa .....	54
7.1.4.3.Adaptación de la biomasa inmovilizada a mayores concentraciones de NaCN .....	55
7.1.5.Pruebas de cinética de degradación de cianuro en reactores de lecho agitado con biomasa inmovilizada.....	56
7.1.6.Pruebas de degradación de cianuro en reactores de lecho fijo con la biomasa inmovilizada .....	44
7.1.6.1Condiciones de operación .....	59
7.1.6.2.Controles en la degradación de NaCN en lecho fijo ..	60
7.1.7.Caracterización de la biomasa inmovilizada .....	60
7.2.Resultados de la experimentación .....	61
7.2.1.Preparación de la biomasa .....	61
7.2.1.1.Crecimiento de bacterias autótrofas .....	61
7.2.1.2.Adaptación de la biomasa al NaCN .....	62



7.2.1.3.	Caracterización de microorganismos.....	63
7.2.1.4.	Resultados de la evaluación de las pruebas de degradación de NaCN con biomasa adaptada.....	63
7.2.2.	Resultados de la inmovilización de biomasa.....	67
7.2.2.1.	Caracterización de los soportes sólidos para uso en inmovilización de biomasa.....	67
7.2.2.2.	Inmovilización de biomasa.....	68
7.2.2.3.	Adaptación de la biomasa inmovilizada a mayores concentraciones de NaCN.....	69
7.2.2.4.	Adaptación de biomasa inmovilizada en carbón activado a 650 y 700 mg/l de NaCN.....	70
7.2.2.5.	Adaptación de biomasa inmovilizada en zeolita a 650 y 700 mg/l de NaCN.....	73
7.2.3.	Cinética degradación de NaCN en lecho agitado con biomasa inmovilizada en carbón activado y zeolita.....	77
7.2.4.	Evaluación de parámetros de operación para degradación de cianuro en sistemas en lecho fijo.....	81
7.2.4.1.	Influencia de altura de lecho en la degradación de cianuro.....	81
7.2.4.2.	Influencia del flujo de alimentación de la solución en la degradación de cianuro.....	84
7.2.4.3.	Estabilidad de biomasa inmovilizada operando en el biofiltro.....	86
7.2.5.	Degradación de cianuro en una solución procedente de proceso de cianuración.....	88
<b>8.</b>	<b>Diseño del biofiltro.....</b>	<b>77</b>
8.1.	Selección de soporte.....	90
8.2.	Parámetros de operación de biofiltro.....	92
<b>9.</b>	<b>Conclusiones.....</b>	<b>93</b>
<b>10.</b>	<b>Bibliografía.....</b>	<b>96</b>
<b>Anexo 1</b>	<b>.....</b>	<b>90</b>
<b>Anexo 2</b>	<b>.....</b>	<b>96</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Composición de caldo nutritivo para obtención de cultivos de bacterias autótrofas en general.....	34
<b>Tabla 2:</b> Condiciones de operación para obtención de cultivos.....	35
<b>Tabla 3:</b> Medio de cultivos para adaptación de microorganismos al NaCN.....	36
<b>Tabla 4:</b> Relación sólido/cultivo para adsorción de biomasa.....	41
<b>Tabla 5:</b> Variables y condiciones de operación para pruebas de biofiltros.....	46
<b>Tabla 6:</b> Caracterización de cultivos fijados en soportes para biofiltro.....	50
<b>Tabla 7:</b> Caracterización físicas, químicas y mineralógicas de Zeolita.....	54
<b>Tabla 8:</b> Caracterización físicas y químicas del carbón activado.....	54
<b>Tabla 9:</b> Velocidades de degradación de cianuro en reactor de lecho agitado con biomasa inmovilizada en soporte de carbón (650 mg/l NaCN).....	58
<b>Tabla 10:</b> Velocidades de degradación de NaCN en reactor con biomasa inmovilizada en soporte de carbón (700 mg/l NaCN).....	60
<b>Tabla 11:</b> Velocidades de degradación de NaCN en reactor con biomasa inmovilizada en soporte de zeolita (650 mg/l de NaCN).....	62
<b>Tabla 12:</b> Velocidades de degradación de NaCN en reactor con con biomasa inmovilizada en soporte de zeolita (700 mg/l NaCN).....	63
<b>Tabla 13:</b> Comparación de velocidades medias de degradación. Reactores agitados con biomasa inmovilizada (650 y 700 mg/l NaCN).....	64
<b>Tabla 14:</b> Resultados de ensayo de degradación de NaCN con biomasa inmovilizada en carbón activado .....	66
<b>Tabla 15:</b> Acción de la biomasa inmovilizada en carbón activado en la degradación de NaCN en lecho agitado.....	66

<b>Tabla 16:</b> Resultados de ensayo de degradación de NaCN con biomasa inmovilizada en zeolita.....	67
<b>Tabla 17:</b> Acción de biomasa fijada en carbón activado en la degradación de NaCN en lecho agitado.....	67
<b>Tabla 18:</b> Comparación de la acción de la biomasa en carbón activado y zeolita en la degradación de NaCN.....	68
<b>Tabla 19:</b> Comparación de degradación de NaCN en biofiltros con soportes de zeolita y carbón activado .....	70
<b>Tabla 20:</b> Contaje en los soportes sólidos antes y después de la biofiltración.....	71
<b>Tabla 21:</b> Comparación de degradación de NaCN y contaje de microorganismos para biofiltros con carbón activado y zeolita con variación en el flujo de alimentación.....	72
<b>Tabla 22:</b> Velocidad de degradación en sistemas de lecho fijo con los flujos óptimos de alimentación.....	73
<b>Tabla 23:</b> Comparación de la degradación de cianuro en biofiltros de zeolita y carbón activado al variar el flujo de alimentación	77
<b>Tabla 24:</b> Parámetro de operación para biofiltro.....	79

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> a) <i>Bacillus cereus</i> . b) Esporas <i>Bacillus cereus</i> .....	13
<b>Figura 2</b> Diagrama morfológico de <i>B. subtilis</i> .....	14
<b>Figura 3</b> Esquema de biorreactor para la descontaminación de aguas residuales.....	29
<b>Figura 4</b> Representación esquemática del sistema poroso de carbón activado y la clasificación de poros según su tamaño .....	31
<b>Figura 5</b> Diagrama de secuencia para adaptación de microorganismos a NaCN.....	38
<b>Figura 6</b> Esquema de Columna para filtración de solución preparada de NaCN con biomasa inmovilizada.....	45
<b>Figura 7</b> Crecimiento de microorganismos autótrofos.....	48
<b>Figura 8</b> Adaptación de microorganismos al NaCN.....	49
<b>Figura 9</b> Degradación de NaCN con biomasa adaptada.....	51
<b>Figura 10</b> Degradación de NaCN con biomasa adaptada.....	52
<b>Figura 11</b> Degradación de NaCN sin biomasa.....	53
<b>Figura 12</b> Inmovilización de biomasa en carbón activado.....	55
<b>Figura 13</b> Inmovilización de biomasa en zeolita .....	56
<b>Figura 14</b> Adaptación a 650 mg/l de NaCN de la biomasa inmovilizada en carbón activado.....	.57
<b>Figura 15</b> Concentración de NaCN en reactor agitado con biomasa inmovilizada en carbón activado. ....	.58
<b>Figura 16</b> Adaptación a 700 mg/l de NaCN de biomasa inmovilizada en carbón activado.....	.59
<b>Figura 17</b> Concentración de NaCN en reactor agitado con biomasa inmovilizada en carbón activado.....	.59
<b>Figura 18</b> Adaptación a 650 mg/l de NaCN de biomasa inmovilizada en zeolita.....	.61

<b>Figura 19</b> Concentración de NaCN en reactor agitado con biomasa inmovilizada en zeolita.....	.61
<b>Figura 20</b> Adaptación a 700 mg/l de NaCN de biomasa inmovilizada en zeolita.....	.62
<b>Figura 21</b> Concentración de NaCN en reactor agitado con biomasa inmovilizada en zeolita.....	.63
<b>Figura 22</b> Degradación de NaCN con biomasa inmovilizada en carbón activado. Sistema en lecho agitado.....	.65
<b>Figura 23</b> Degradación de NaCN con biomasa inmovilizada en zeolita. Sistema de lecho agitado.....	.65
<b>Figura 24</b> Comparación de la biodegradación con biomasa fijada en carbón activado y zeolita.....	68
<b>Figura 25</b> Degradación de NaCN en función de altura de lecho del biofiltro.....	69
<b>Figura 26</b> Degradación de NaCN en función de flujo de alimentación.....	72
<b>Figura 27</b> Curva de agotamiento para biofiltros de zeolita y carbón activado.....	74
<b>Figura 28</b> Contaje de macroorganismos respecto al volumen de solución tratada.....	75

## Introducción

El cianuro de sodio es un compuesto químico empleado en varias industrias como son la de producción de nitrilo, nylon, plásticos acrílicos, galvanoplastia, procesamiento de metales, extracción de oro, endurecimiento de acero, aplicaciones fotográficas, producción de goma sintética, entre otras; por tanto los efluentes generados presentan concentraciones con valores considerables de cianuro.

Un mal manejo de los efluentes cianurados representa un grave impacto ambiental debido a la alta toxicidad de este compuesto de manera especial por la generación de ácido cianhídrico, en condiciones ácidas, pH menor a 10, compuesto que resulta nocivo para la salud del ser humano. Así, la exposición a períodos de inhalación crónica (a largo plazo) resulta en efectos sobre el sistema nervioso central, y sobre el sistema respiratorio y cardiovascular, así como un agrandamiento de la glándula tiroides e irritación de los ojos y la piel.<sup>1</sup>

Además del hombre, los animales pueden verse afectados por los efectos del cianuro. Por ejemplo, aves migratorias y acuáticas que llegan a pozas o espejos de agua abiertos con altos contenidos de cianuro. Los organismos acuáticos son más sensibles a los efectos tóxicos de este reactivo, y físicamente no es posible evitar su ingreso a los cuerpos de agua.

Este problema ambiental puede ser evitado mediante la colocación de coberturas o “bolas flotantes”, o disminuyendo la concentración del cianuro disociable con ácidos débiles, por sus siglas en inglés denominado cianuro WAD. Por esta razón, las descargas que contienen este contaminante deben ser controladas y en la actualidad, regirse a una legislación ambiental, que para el caso del Ecuador se ha establecido como los límites máximos permisibles para aguas de consumo humano y uso doméstico una concentración de

cianuro total de 0,2 mg/l y para el caso de descargas para preservación de flora y fauna tanto en aguas dulces como aguas marinas y de estuario, una concentración de cianuro libre de 0,01 mg/l.<sup>2,3</sup>

A diferencia de otros contaminantes químicos y a pesar de la alta toxicidad del cianuro, este se caracteriza por no ser persistente, y por el contrario puede transformarse con cierta facilidad en otros compuestos químicos que no son nocivos para la salud y el ambiente.

Para acelerar los procesos de transformación de cianuro una de las opciones es emplear la biorremediación como una alternativa donde los microorganismos catalizan las reacciones de oxidación.<sup>4</sup> En su mayoría estos microorganismos son propios del medio, suelo o agua donde existe cianuro; son bacterias del tipo *Pseudomonas*, *Bacilos subtilis*, *Citrobacter freundii*, entre otros microorganismos.<sup>5</sup>

Según estudios realizados de los microorganismos aislados de arenas que contienen cianuro (relaves de cianuración), se obtuvieron cultivos de bacterias del tipo de *Pseudomonas* adaptados a concentraciones de 750 mg/l de NaCN libre en forma progresiva, siendo aptos para destoxificar efluentes con contenido de 3000 mg/l de NaCN total.<sup>6</sup>

Esta técnica de biodegradación de cianuro fue aplicada a nivel industrial por primera vez en 1984 en la Planta de Homestake Mining Co. en Lead, Dakota del Sur – EE.UU. Se reporta que, por acción de microorganismos se puede degradar alrededor del 92% del cianuro libre ( $CN^-$  y  $HCN$ ) y 99% de cianuro WAD.<sup>4</sup>

El objetivo del presente trabajo se basa en utilizar la capacidad de ciertos microorganismos y a su vez optimizar su acción mediante la inmovilización de

estos en soportes sólidos, los mismos que se emplearán como lecho de biofiltros para el tratamiento de efluentes cianurados.

La inmovilización tanto de enzimas como de microorganismos es ampliamente utilizada, desde hace 25 años, a fin de lograr estabilidad en las condiciones de operación, facilitar su separación del medio de reacción, reutilización luego del proceso e incluso alcanzar una mayor especificidad en su acción.<sup>7</sup> Todo esto permite lograr una reducción de los costos de operación de procesos enzimáticos o de acción de microorganismos.

La inmovilización es una técnica aplicada también para enzimas, con una amplia aplicación; enzimas inmovilizadas pueden ser empleadas como biosensores en el control de la industria alimenticia, detección de compuestos contaminantes; inmovilización de tripsina o colagenasa en celulosa o fibras que luego son empleadas como reemplazo de tejidos muertos de heridas, quemaduras, entre otro tipo de aplicaciones.<sup>8</sup>

En el caso de microorganismos, la inmovilización es mucho más sencilla que para, enzimas puesto que los microorganismos pueden ser inmovilizados prácticamente en cualquier superficie; por esta razón una de sus principales aplicaciones es en el tratamiento de aguas residuales, donde se realiza un proceso de biofiltración. El agua atraviesa por goteo un filtro con soporte de arena o piedrilla donde se han adherido microorganismos: bacterias, hongos o algas.<sup>9</sup>

Otras opciones para inmovilizar microorganismos son: atrapamiento en material que no sea inocuo como por ejemplo en hidrogeles, cerámica, grava, entre los más usados.<sup>8</sup>



En el presente trabajo se pretende obtener biomasa adaptada a soluciones de cianuro de sodio, inmovilizada en soportes sólidos, carbón activado y zeolita, para su empleo en biofiltros.

Adicionalmente se establecen las diferencias entre cada uno de los soportes tanto en el proceso de inmovilización, así como también, en la acción de la biomasa inmovilizada sobre soluciones preparadas de cianuro de sodio empleando un sistema de lecho agitado por una parte y por otra en un sistema de lecho fijo. De los resultados obtenidos en la experimentación se determinan los parámetros necesarios para el diseño de un biofiltro con biomasa inmovilizada en carbón activado y en zeolita.

## **1. Biodegradación**

Una de las consecuencias del avance tecnológico – industrial es la producción de residuos tóxicos cada vez más difíciles de degradar y que son vertidos directamente al suelo o agua, generando así un impacto nocivo sobre el medio ambiente.

En los últimos años, en varios países del mundo se están desarrollando investigaciones en lo referente a la aplicación de nuevas alternativas que coadyuven como herramientas para prevenir ó restaurar los daños ocasionados por acciones antropogénicas o desastres naturales que dañan de manera severa el ambiente. Una de ellas es sin duda alguna la biorremediación, entendida esta como el uso de organismos vivos (plantas y microorganismos) para contrarrestar los efectos nocivos causados por desastres naturales u ocasionados intencionalmente.<sup>10</sup>

En términos generales, también se puede decir que la biodegradación es el resultado del metabolismo heterótrofo de algún microorganismo en particular en el que el residuo orgánico nocivo para el ambiente es su sustrato. La transformación puede ser realizada por acción directa de los microorganismos sobre el contaminante, transformándolo en otro tipo de compuestos o mediante otros mecanismos como el cometabolismo o cooxidación.<sup>11,12</sup>

En ocasiones la degradación de un compuesto determinado puede realizarse sin que este compuesto sea el sustrato o fuente de energía para el microorganismo. En este caso el microorganismo debe tener una provisión de un sustrato del cual toma carbono y una fuente de energía, es decir, se tiene un sustrato como fuente primaria de energía y paralelamente, metabolizan otro

compuesto utilizando las enzimas que fueron sintetizadas para degradar el sustrato primario.<sup>10</sup>

## **1.1. Fundamentos de la biodegradación**

La biodegradación se refiere al resultado de la actividad biológica que altera la estructura molecular del contaminante y es el grado de alteración el que determina si se ha producido biotransformación o mineralización. La biotransformación es la descomposición de un compuesto orgánico en otro similar no contaminante o menos tóxico, mientras que la mineralización es la descomposición a dióxido de carbono, agua, y compuestos celulares.<sup>11</sup>

La biodegradación de un compuesto presente en un determinado ambiente requiere de la presencia de microorganismos capaces de asimilar este compuesto; muchas veces, estos microorganismos son propios del medio en el que se realizará el proceso o pueden ser microorganismos aislados que van a ser adaptados posteriormente al sitio de la contaminación o utilizados en biorreactores.<sup>12, 13</sup>

Los procesos de biodegradación pueden ocurrir de forma espontánea, como una respuesta del mismo medio ambiente ante un impacto determinado, o también pueden ser inducidos propiciando las condiciones adecuadas para crecimiento de los microorganismos nativos del medio contaminado, esto es controlando los valores de humedad, suministro de nutrientes y oxígeno, pH, parámetros necesarios para desarrollo de los microorganismos, entre otros.<sup>11</sup>

Si en el medio afectado no se tiene en forma natural presencia de microorganismos capaces de metabolizar los contaminantes presentes, estos serán introducidos en una etapa de adaptación, que en ocasiones puede requerir tiempos prolongados respecto del proceso total.<sup>11,12</sup>

### **1.1.1. Transformación biológica de compuestos orgánicos**

Los microorganismos son capaces de metabolizar gran parte de productos, entre estos: compuestos orgánicos como los hidrocarburos, productos farmacéuticos, pinturas, disolventes, para lo cual, han desarrollado enzimas muy especializadas que atacan a compuestos que tienen un esqueleto carbonado con sustituyentes tóxicos, como el flúor, cloro, bromo, grupos nitro o sulfo.<sup>14,15</sup>

Las sustancias químicas presentes en el sistema se transformarán por acción de los microorganismos en productos habituales del metabolismo: agua y dióxido de carbono.<sup>14</sup>

Si esta biotransformación se da en condiciones ambientales, las velocidades son insuficientes para conseguir la rápida degradación de los compuestos orgánicos peligrosos para la salud, por ello es preciso suministrar el oxígeno y los nutrientes, normalmente nitrógeno y fósforo, necesarios para promover una metabolización rápida de los compuestos de interés, incrementando si es necesario, la temperatura a la que se encuentran los microorganismos, lo que acelerará el metabolismo.<sup>14</sup>

### **1.1.2. Transformación biológica de compuestos inorgánicos**

Las reacciones que permiten la transformación de compuestos inorgánicos son las involucradas en el ciclo del nitrógeno (nitrificación y desnitrificación) y en el ciclo del azufre.<sup>12,16</sup>

Para llevar a cabo un proceso de biodegradación, primeramente se debe hacer una selección de los microorganismos capaces de metabolizar el componente químico tóxico. Generalmente estos microorganismos son autóctonos de un medio en el cual está presente el contaminante.<sup>17,18, 19</sup>

### **1.1.3. Parámetros que afectan la biodegradación**

Generalmente los microorganismos utilizados en procesos de biodegradación, son los procedentes del lugar de la contaminación (microorganismos autóctonos), pues éstos ya están adaptados a la presencia del contaminante. O también suelen ser introducidos de cepas aisladas, en este caso el proceso de degradación requiere mayor tiempo en la adaptación de los microorganismos al nuevo medio.<sup>13,17</sup>

Una vez seleccionados los microorganismos, estos deben ser adaptados a las condiciones en las que van a operar. Esta adaptación debe ser tal que promueva la permanencia de microorganismos con el metabolismo idóneo para degradar el componente de interés.<sup>6</sup>

Es importante determinar los factores que promueven o que inhiben el crecimiento y metabolismo de los microorganismos seleccionados, esto es fuentes de energía y sustrato, condiciones de pH, humedad, temperatura, suministro de aire, inhibición por toxicidad, entre otros factores.<sup>18</sup>

En forma general se puede decir que los microorganismos pueden degradar una serie de compuestos tanto orgánicos como inorgánicos; sin embargo, esto dependerá en gran parte de la biodegradabilidad de un determinado compuesto, esto dependerá a su vez de la complejidad de la estructura molecular.<sup>12</sup>

Los microorganismos pueden actuar en forma directa sobre el compuesto contaminante, tomando nutrientes y energía de los contaminantes del medio, transformándolo en compuestos compatibles con el medio ambiente o menos tóxicos o mineralizándolos, es decir, transformándolos en CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O, y en ocasiones también en NH<sub>3</sub>.<sup>12, 18</sup>

## **1.2. Biorremediación**

Es una de las aplicaciones de la biotecnología, orientada al tratamiento de ecosistemas que mantienen una cantidad remanente de contaminante a través del uso de organismos vivos (plantas y/o microorganismos) para que sean degradados mediante su metabolismo.<sup>19</sup>

La biorremediación es un fenómeno común en la naturaleza cuando en un ambiente o ecosistema se produce una alteración del equilibrio como es el caso de una gran tala de árboles, lo cual origina un aumento considerable de materia orgánica en el suelo.<sup>20</sup> En este caso, los factores físicos y bióticos tratan de reponer el daño, se produce entonces un aumento de organismos saprófitos los cuales ocasionan una gran mineralización de la materia caída, además el resto de esa materia puede ser reciclada o humificada.<sup>20</sup>

## 2. Biodegradación del cianuro de sodio

La degradación biológica o biodegradación del cianuro aprovecha de la capacidad de ciertos grupos de microorganismos, mayormente bacterias, de utilizar compuestos cianurados como fuente de carbono y nitrógeno, convirtiendo el compuesto tóxico en sustancias inocuas.<sup>11</sup>

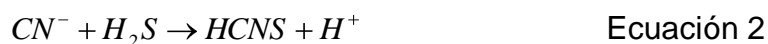
Los microorganismos involucrados poseen varios sistemas enzimáticos específicos que les permite desarrollarse en ambientes con alta concentración de cianuro.

Bajo condiciones aeróbicas, el cianuro puede ser oxidado biológicamente como se indica en la ecuación 1:<sup>4</sup>



Para luego ser hidrolizado en amoníaco y dióxido de carbono.<sup>4</sup>

En menor proporción se puede también tener degradación biológica en condiciones anaerobias siempre y cuando se tenga presencia de  $H_2S$  o  $HS^-$ . Las Ecuaciones 2 y 3 expuestas a continuación:<sup>4</sup>



El HCNS hidrolizará para formar amoníaco, gas sulfhídrico y  $CO_2$ . El proceso anaeróbico comparado con el proceso aeróbico es mucho más lento y además los microorganismos presentan una menor adaptación al cianuro.<sup>1,11</sup>

Los mecanismos de los microorganismos para lograr romper la molécula de cianuro son varios, uno de ellos involucra a la enzima cianuro hidratasa, que resulta en la conversión irreversible del cianuro en formamida, que finalmente es transformada en  $\text{CO}_2$  y  $\text{NH}_3$ .<sup>1,11</sup>

El cianuro también puede ser convertido en -cianoalanina o en un -aminonitrilo por la -cianoalanina sintetasa, seguida de la hidrólisis de los productos para liberar un ácido y  $\text{NH}_3$ .<sup>1</sup>

Un tercer tipo de mecanismo involucra la utilización de la cianuro monoxigenasa para catalizar la conversión de HCN en cianato (HOCN), lo que lleva a una descomposición catalítica mediada por otra enzima, cianasa, para producir  $\text{CO}_2$  y  $\text{NH}_3$ .<sup>1</sup>

Existen algunas cepas bacterianas que transforman directamente cianuro en  $\text{CO}_2$  y  $\text{NH}_3$  por medio de la cianuro dioxigenasa, sin la formación de cianato como compuesto intermediario.<sup>1,11</sup>



### 3. Microorganismos degradadores de cianuro

Dentro de los microorganismos que tienen capacidad de degradar cianuro se tiene hongos (*Fusarium sp.*, *Hansenula anomala*) y bacterias (*Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Citrobacter freundii*, *Bacillus subtilis* y otros cultivos de bacillus).<sup>1,12</sup>

La forma como se realiza la conversión de cianuro es muy variada. Una de las más frecuentes es que ciertos microorganismos empleen cianuro hidratasa para degradar el cianuro pasando el cianuro a formamida y esta última es convertida a CO<sub>2</sub> y NH<sub>3</sub> como es el caso de la *Pseudomona fluorescens*.<sup>21,22</sup>

En otras cepas bacterianas, el cianuro es transformado directamente a CO<sub>2</sub> y NH<sub>3</sub> con empleo de cianuro dioxigenasa, siendo producto intermedio el cianato.<sup>23</sup>

También el cianuro puede ser empleado como fuente de nitrógeno y/o carbono, como por ejemplo las cepas de *Citrobacter freundii*, *Enterobacater sp*, *Pseudomona fluorescens* y *Bacillus spp.*<sup>24</sup>

#### 3.1. *Bacillus cereus*<sup>25</sup>

Estos son aerobios facultativos, formadores de esporas en presencia de oxígeno, rasgo característico de su género y morfología.

Su hábitat natural el suelo, pueden crecer bien en medios sintéticos que contengan azúcares, ácidos orgánicos, alcoholes, entre otros componentes, como fuente de carbono, y amoniaco como fuente de nitrógeno.

Muchos de estos bacilos producen enzimas hidrolíticas polielulares que degradan polisacáridos, ácidos nucleicos y lípidos, lo que permite a estos

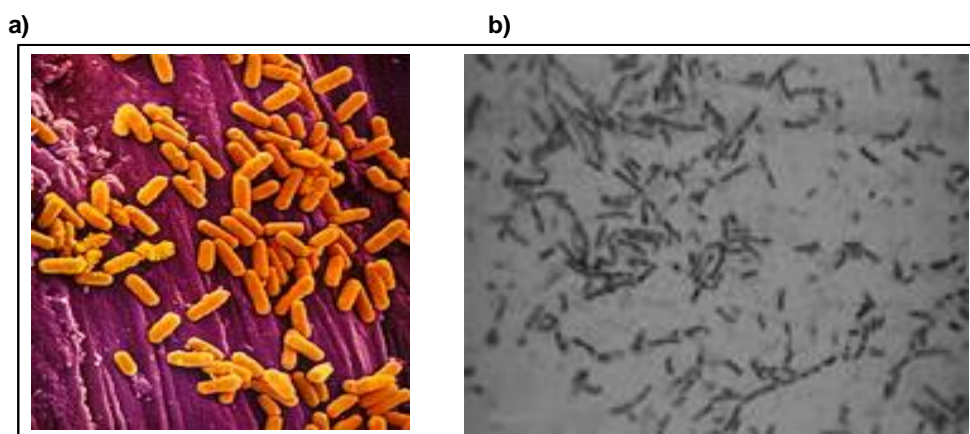
organismos usar dichos productos como fuente de carbono, y son donadores de electrones.

Es un microorganismo gram positivo en los cultivos jóvenes y a medida que envejece puede verse como gram variable o gram negativo.

Las temperaturas de crecimiento: mínima están entre 15 °C a 20 °C, las máximas entre 40 °C a 45 °C con un óptimo de 37 °C; pero algunos tipos de *Bacillus cereus* pueden vivir sobre los 50 °C. El rango de pH es de 4,3 a 9,3 aunque algunos pueden vivir hasta en un pH 2 y en otros casos pueden desarrollarse en pH 11.<sup>26, 27</sup>

Se inactivan por presencia de ácido acético, cuando este alcanza concentraciones 0,1 M, ácido fórmico o ácido láctico.

A continuación en la figura 1, se puede observar la forma que presentan estos bacilos.



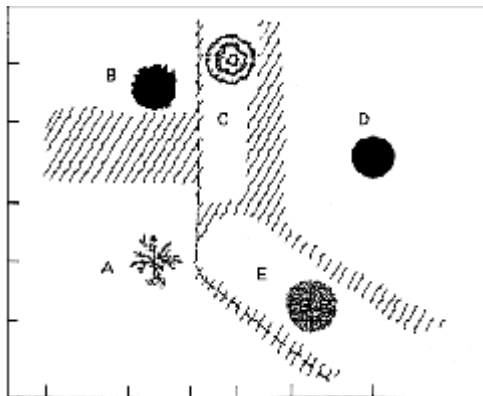
**Figura 29** a) *Bacillus cereus*. b) Esporas *Bacillus cereus*

### 3.2. *Bacillus subtilis*<sup>28</sup>

Este tipo de bacterias son formadoras de endoesporas, crecen en el suelo y raíces de plantas; son microorganismos aerobios.

Las colonias de estas bacterias presentan diversas formas debido a la movilidad que este tipo de bacteria tienen y también a las condiciones de concentración de nutrientes en el agar.

En la figura 2, se representa las formas típicas de las colonias que pueden presentar estos bacilos.



**Figura 30 Diagrama morfológico de *B. subtilis***

- A) Diffusion-limited aggregation-like (DLA)
- B) Eden-like
- C) Concentric ring-like
- D) Disk-like
- E) Dense branching morphology-like.

El rango de pH para desarrollo de este bacilo es de 7 a 10. Metabolizan enzimas extracelulares como alfa-amilasa, bacteriocina. Algunas enzimas son utilizados como fungicidas en control de plagas con la característica de no ser tóxicos para el ambiente.

### **3.3. Bacillus lentus<sup>29</sup>**

Se desarrolla principalmente en el suelo, es un microorganismos aerobio, su temperatura óptima de crecimiento son los 26 °C, degradan la urea presente en los suelos, se caracterizan por la generación de proteasa en medio altamente alcalino (pH 11) y de la enzima subtilisin en un rango de pH 7 – 10.

## **4. Biorreactores**

Son recipientes en los cuales se llevan a cabo reacciones bioquímicas y/o bioprocesos, ya sea con enzimas, microorganismos o células vegetales o animales, viables y no viables. Las reacciones químicas se aprovechan para la transformación y producción de sustancias biológicas y químicas.<sup>30</sup>

En los biorreactores se procura elevar el grado de rendimiento de la biomasa a través del control de los parámetros que promuevan una mejor actividad biológica, esto es minimizar el tiempo de retención hidráulica y maximizar la eficiencia de biodegradación.<sup>16</sup>

### **4.1. Operación en biorreactores**

El medio de reacción en un biorreactor básicamente está constituido por los microorganismos y el sustrato específico que requieren para su desarrollo, este debe proveer de los nutrientes principales: carbono, nitrógeno, fósforo, micronutrientes; suministro o eliminación de reactantes o productos gaseosos; partículas sólidas deseadas o indeseadas.<sup>30,31,32</sup>

Los biorreactores se caracterizan por trabajar a temperaturas y presiones bajas y comparados con algunos reactores químicos, los consumos de energía por parte del medio reaccionante son bajos.<sup>30</sup>

Para el funcionamiento de un biorreactor es necesario conocer la cinética de crecimiento de los microorganismos, esto es el tiempo que necesita para adaptación, crecimiento exponencial, crecimiento constante y finalmente la etapa de decrecimiento y adicionalmente determinar en qué etapa se tiene una mayor transformación del sustrato que será el contaminante que se requiere degradar y si alguno de los productos generan inhibición.<sup>31</sup>

## **4.2. Tipos de biorreactores**

Se puede realizar una serie de clasificaciones de los biorreactores, en función de las fases presentes (homogéneos – heterogéneos), del tipo de metabolismo (aeróbios – anaeróbios), de la forma de producción (continuos – discontinuos), o si se opera con biomasa libre o biomasa inmovilizada.<sup>30, 32</sup>

### **4.2.1. Reactores homogéneos y heterogéneos**

Se dice que un reactor es homogéneo si todo el medio reaccionante se encuentra en una sola fase, en cambio el reactor es heterogéneo si coexisten varias fases. En los reactores heterogéneos frecuentemente hay un sustrato líquido continuo y un sólido discontinuo que es la fase catalítica.<sup>32,33</sup>

### **4.2.2. Reactores aerobios y anaerobios**

El metabolismo de los microorganismos puede realizarse en presencia o ausencia de oxígeno según estos sean aeróbios o anaeróbios<sup>31</sup>

Los reactores aerobios son abiertos al paso de oxígeno del aire o eventualmente suministrarse oxígeno por algún mecanismo de difusión de aire. Los reactores anaeróbios en cambio deben contemplar un diseño que impida el ingreso de oxígeno al sistema, y mantener un control de escape de gases producidos del metabolismo para evitar sobrepresión en el sistema.<sup>17,30</sup>

En ciertos reactores aerobios, podrían existir ciertas zonas muertas, donde los microorganismos tendrán comportamiento anaerobio hasta que de algún modo vuelva a retornar a condiciones aeróbicas, a estos microorganismos se les conoce como anaeróbicos facultativos.<sup>17</sup>

### **4.2.3. Reactores continuos y discontinuos** <sup>17, 32</sup>

Un reactor es continuo cuando al sistema de reacción esta entrando y saliendo continuamente material contaminado y material tratado respectivamente. En cambio los reactores discontinuos se mantienen cerrados hasta que la reacción se haya completado. Para operaciones a pequeña escala se utiliza preferencialmente sistemas discontinuos, en cambio para tratamiento de grandes volúmenes, dado que se puede realizar un mejor control, se prefieren sistemas continuos.<sup>33,34</sup>

En los reactores continuos es importante determinar el tiempo de residencia, esto es relación de volumen que permanece en el reactor respecto al flujo de trabajo, éste determinará el grado de conversión de los reactivos. Mientras mayor sea el tiempo de residencia se tiene que el material tratado permanecerá mayor tiempo en el sistema de reacción lo cual económicamente no es factible; en este caso será más conveniente trabajar en un sistema discontinuo.<sup>19,33</sup>

Existen sistemas en los cuales se trabaja en un proceso semicontinuo, que consiste en una combinación de las dos operaciones continua y discontinua. El material a tratar entra al reactor y luego de terminada la reacción se descarga el equipo e inmediatamente se carga para una nueva operación.<sup>33</sup>

### **4.2.4. Reactores con biomasa libre y con biomasa inmovilizada**

En los reactores con biomasa libre, los microorganismos se encuentran en contacto directo con el medio de cultivo y el sistema sobre el cual actúan para la biotransformación.<sup>32</sup>

En cambio en los reactores con biomasa inmovilizada, los microorganismos se encuentran confinados sea en un soporte sólido o a través de membranas permeables, limitando su movilidad y contacto con el medio circundante y a su vez haciendo que este medio sea heterogéneo.<sup>30</sup>

La biomasa inmovilizada puede emplearse en sistemas agitados o de lecho fluido o en columnas con lecho fijo a través de este lecho pasa el líquido a ser tratado, denominándose a este sistema biofiltro.<sup>17</sup>

El empleo de la biomasa inmovilizada permite alcanzar una mayor concentración de biomasa respecto a un reactor con biomasa libre, y en caso de ser utilizada en relleno de un biofiltro, la eficiencia de biotransformación aumenta, siendo un parámetro importante de controlar la velocidad del flujo para evitar arrastre de la biomasa fijada, o formación de canales preferenciales. Otro parámetro es la carga de relleno en la columna para evitar fenómenos de autocompresión.<sup>32</sup>

Los reactores de lecho fijo son de mayor eficiencia en la mayoría de aplicaciones de tratamiento de aguas residuales, (eficiencia es proporcional a la concentración de contaminante presente en el flujo de salida). Sin embargo es importante en este tipo de reactores controlar la velocidad de flujo para evitar bajos grados de degradación por producirse un arrastre de la biomasa fijada en el soporte.<sup>8</sup>

El grado de conversión en los reactores de mezcla completa es función del tiempo de retención, en cambio en los reactores de lecho fijo es función de la longitud de lecho.<sup>33</sup>

El principio de operación de los reactores de lecho fijo es aplicado en biofiltros para tratamiento de líquidos que contienen algún sustrato requerido por microorganismos fijados en el soporte sólido que constituye el filtro. A continuación se expone sobre las características de biofiltros.



## 5. Biofiltros

Los biofiltros son reactores de lecho fijo en el cual se ha inmovilizado microorganismos mediante mecanismos de adsorción o atrapamiento.

El material empleado para el soporte del biofiltro debe cumplir determinados requerimientos como son: gran área superficial, afinidad con los microorganismos para que estos se adhieran a su superficie y puedan desarrollar su metabolismo, resistencia mecánica, entre las más importantes. Los materiales que se emplean son muy diversos: gravilla, piedra de lava, material sintético, carbón activado, hidrogeles, entre otros.<sup>8,35</sup>

Cuando la inmovilización se ha realizado por técnicas de adsorción, en la superficie del soporte sólido se encontrará recubierta de un biofilm muy fino compuesto por microorganismos, polisacáridos extracelulares y agua. El espesor de este biofilm dependerá del contenido de humedad, que oscila entre un 50 a 60 %. Para valores de superficie específica del relleno de 6 a 10 m<sup>2</sup>/g las películas tienden a un espesor de 0,5 a 5 μm.<sup>16</sup>

### 5.1. Operación en un biofiltro

En los biofiltros por lo general el efluente a tratar es alimentado por goteo o por aspersión sobre el lecho que contiene microorganismos inmovilizados, en este se pueden distinguir dos zonas: una aerobia que está en contacto directo con el exterior y una anaerobia en la parte más interna de la columna.<sup>36</sup>

El porcentaje de degradación que se obtenga en un reactor de lecho fijo dependerá de la longitud de la columna, de la estabilidad de la biomasa fijada en el soporte sólido y de la velocidad de flujo de alimentación.<sup>19</sup>

A una mayor altura de lecho se tendrá un mayor porcentaje de degradación, pero no se puede incrementar indefinidamente la altura de lecho, pues habrá que considerar factores como la caída de presión, fractura del soporte sólido por efecto del peso, problemas de taponamiento, disminución de la transferencia de oxígeno, entre otros.<sup>16,19</sup>

Los microorganismos fijados en el soporte sólido deben presentar un buen grado de estabilidad, para conseguir largos períodos de operación manteniendo la misma capacidad de degradación de la biomasa. Para esto se debe tener presente las condiciones de pH, suministro de nutrientes y oxígeno necesario para la mantención de la biomasa.<sup>37</sup>

Adicionalmente, también se debe procurar que la velocidad de alimentación de la solución con contaminante debe ser tal que no promueva la desorción de la biomasa, y a la vez alcanzar el tiempo de retención necesario hasta que se lleve a cabo la degradación del contaminante, para lo cual es importante una adecuada selección de la granulometría del soporte.<sup>38</sup>

## **5.2. Tipos de biofiltros<sup>16,30,36,39</sup>**

Considerando que los biofiltros son por lo general reactores de lecho fijo, se puede establecer las siguientes categorías:

- Cerrados o abiertos, refiriéndose a suministro de aire.
- De flujo ascendente o descendente, en los primeros el contacto partículas de lecho con fluido es mejor y se minimiza la caída de presión, en los de flujo descendente en cambio habrá problemas de formación de canales, atrición del soporte, pero como ventaja se tiene que su operación es más sencilla puesto que generalmente el fluido circula por gravedad.

- Reactores de lecho fluido, estos son una alternativa cuando se requiere suministrar un reactivo gaseoso, se debe tener control sobre la velocidad de fluidización puesto que si se sobrepasa un determinado límite, puede provocarse el lavado del soporte

### **5.3. Ventajas y desventajas de un biofiltro respecto a reactores con biomasa libre**

El hecho de emplear un soporte en el cual se tiene inmovilizada la biomasa que actúa en las reacciones, hace que este reactor presente una mayor concentración de biomasa.<sup>40</sup>

Estos reactores presentan una mayor eficiencia cinética si se toma como base la actividad volumétrica, por otra parte la operación es más sencilla que en el caso de un tanque agitado, por esta razón son utilizados más comúnmente en sistemas a gran escala, sin embargo en el caso de tener que suministrar un reactante gaseoso al medio líquido, estos presentan una desventaja, por problemas de difusión.<sup>5</sup>

La selectividad en reactores de flujo pistón es mayor además que se puede obtener más fácilmente un producto con un alto grado de pureza, en cambio en los reactores de lecho agitado la selectividad es pequeña y el producto obtenido tiene también un alto contenido de reactantes.<sup>32</sup>

Dada la forma de operación de este reactor, se evita la acumulación de producto, haciendo que la inhibición sea mínima, sin embargo cuando se tiene inhibición por sustrato es más eficiente un reactor de mezcla completa antes que uno de flujo pistón.<sup>30</sup>

## **6. Inmovilización de microorganismos**

La inmovilización de microorganismos (o enzimas) consiste en restringir el libre movimiento que estos tienen en una fase o región definida del espacio que aunque insoluble mantiene intercambio con el entorno, a fin de optimizar la retención de biomasa dentro del reactor.<sup>8</sup>

### **6.1. Mecanismos de inmovilización de microorganismos<sup>41</sup>**

Los microorganismos pueden ser inmovilizados en una serie de materiales, dependerá de la afinidad que estos presenten al soporte.

Existen diferentes técnicas de inmovilización de microorganismos, la selección de una de estas depende del tipo de célula, su cinética de crecimiento, consideraciones de diseño del reactor y factores económicos.

Entre las principales técnicas de inmovilización se puede citar:

- Adsorción
- Enlace covalente
- Atrapamiento
- Formación de agregados o flóculos

#### **6.1.1. Adsorción<sup>5,8,41</sup>**

Esta es la técnica más común para inmovilización de microorganismos, pues estos tienden a adherirse a superficies sólidas en forma natural, acumulándose una película de biomasa sobre el soporte. Es necesario que el soporte tenga una gran superficie para tener una alta concentración de microorganismos inmovilizados.

El procedimiento para esta técnica es muy sencillo, pues basta con poner en contacto el soporte (generalmente en un reactor agitado) con el caldo de cultivo que contiene el microorganismo de interés. Dependiendo si el sistema es agitado o no se requerirá un mayor o menor tiempo de contacto.

### **6.1.2. Enlace covalente**<sup>5, 32,41</sup>

Esta técnica es empleada cuando el microorganismo no presenta adherencia natural en la superficie del sólido, entonces la unión se hace a través de un enlace covalente entre la pared celular y el soporte. Por ejemplo, usando glutaraldehído como enlace covalente para adherir a las *Flavum brevivactrium* a una matriz de colágeno.

El uso de compuestos químicos para establecer un enlace covalente implica tener mucha precaución sobre la afinidad que presente este compuesto con el organismo a inmovilizarse.

### **6.1.3. Atrapamiento**<sup>5,37,42</sup>

En este caso se pretende confinar en los poros de la matriz, siempre que estos sean lo suficientemente grandes como para albergar a los microorganismos; otra forma es envolver a los microorganismos en una matriz de gel, siempre y cuando esta permita el intercambio de nutrientes y productos del microorganismo y medio circundante; se puede también, en lugar de un gel, emplear membranas o fibras que presentan un diámetro de poro menor al tamaño del microorganismo.

Un ejemplo de este tipo de inmovilización es el empleo de geles de alginato de calcio, los cuales han dado buenos resultados en el empleo de biomasa atrapada en este soporte en reactores tipo columna, siendo más resistentes a la caída de presión y abrasión. Esta técnica implica adición por goteo de

alginato en el caldo de cultivo e inmediatamente se tiene la formación de pellets que contienen en su interior los microorganismos.

De lo descrito anteriormente, se puede ver que uno de los problemas que presentará este método es restricciones respecto a la difusión de materiales a través de los poros de la matriz que envuelve a los microorganismos a más de la compatibilidad que debe existir entre microorganismo y soporte.

#### **6.1.4. Formación de agregados o flóculos<sup>30,37,43</sup>**

En este caso se promueve la agregación de biomasa a tal punto que formen partículas de tamaño grande, insolubles en el medio reaccionante. Generalmente es necesario el uso de agentes coagulantes que deben ser afines con el cultivo.

Un ejemplo de aplicación de esta técnica es la producción de lodos activados. En el agua residual a ser tratada se promueve el crecimiento de microorganismo por inyección de aire y nutrientes, bajo condiciones óptimas los microorganismos generan un polisacárido que es el responsable de provocar la aglomeración de los microorganismos y formar flóculos (fango activado) que actúan sobre el material contaminante.

Otra técnica para inmovilización de microorganismos es también unión con metales o quelación, empleando oxohidróxido de titanio (IV) e hidróxido de zirconio o celulosa activada.

## **6.2. Características de la biomasa inmovilizada**

Una de las características que adquiere la biomasa inmovilizada es ganar estabilidad y resistencia en el medio de trabajo, pues las variaciones de

temperatura y pH que pudieran presentarse no afectan de manera importante su actividad.<sup>44</sup>

Pueden presentarse casos en los cuales la actividad enzimática de las células disminuye debido a problemas de difusión del sustrato al interior de la matriz y al microorganismo y a su vez de los productos al exterior.<sup>5</sup>

Por otra parte al trabajar con biomasa inmovilizada se puede alcanzar una mayor concentración de microorganismos en el sistema en el cual se realiza la degradación,<sup>44</sup> se pueden separar fácilmente del medio de reacción, se logran procesos continuos y pueden reutilizar dichos sistemas.<sup>40</sup>

### **6.3. Ventajas y desventajas de biomasa inmovilizada respecto a biomasa libre**

El trabajar con biomasa inmovilizada presenta ciertas ventajas respecto a biomasa libre, entre las que se puede citar:

- La biomasa inmovilizada se vuelve más resistente a cambios de pH, de temperatura, a concentraciones de sales más altas respecto a la biomasa libre.<sup>45</sup>
- Se permite un mejor manejo de microorganismos en los biorreactores, puesto que al hallarse fijas a un soporte, es más fácil retirarlos del medio de reacción, además que permite trabajar con una mayor concentración de microorganismos por volumen de líquido tratado.<sup>45</sup>
- Al tener microorganismos inmovilizados se puede prevenir de mejor manera problemas de contaminación, se mantienen las células

autóctonas y no patógenas, además que se facilita la transferencia de gases dentro de los agregados microbianos.<sup>44,45</sup>

- La manipulación de células puede ser tratada como una fase discreta<sup>45</sup>
- Se puede tener una coinmovilización de diferentes poblaciones en el mismo biorreactor que actúan en forma sintrófica.<sup>45</sup>
- La biomasa inmovilizada puede adaptarse con mayor facilidad a los niveles de concentración del residuo y a su vez a diferentes tipos de compuestos presentes en el sistema a biotransformarse.<sup>44</sup>

Sin embargo se pueden presentar algunas desventajas:

- Se afectará a la estequiometría en el medio reaccionante debido a que se trabaja con un medio heterogéneo.<sup>45</sup>
- La morfología, fisiología y metabolismo de la célula puede sufrir cambios. Esto principalmente debido a la edad y vitalidad de las células antes y después de la inmovilización.<sup>5</sup>
- Las células pueden sufrir autólisis debido a cambios en la permeabilidad de la pared celular y a su vez otras células se verán afectadas por la generación de productos de la autólisis nocivos para la célula.<sup>5</sup>



## **6.4. Aplicaciones de la biomasa inmovilizada**

La biomasa inmovilizada en soportes sólidos se utiliza en diferentes campos, por ejemplo el tratamiento de aguas residuales, a fin de mejorar el desempeño de las plantas de tratamiento que tienen problemas de operación por las altas cargas orgánicas, se utiliza biomasa inmovilizada en hidrogeles de PVA/alginato. Otra opción es la inmovilización de microalgas en silicatos.<sup>35,46</sup>

En el tratamiento de derrames marinos una de las opciones de tratamiento es emplear biomasa inmovilizada. Actualmente se realizan investigaciones en este tema para mejorar la fijación de la biomasa al soporte sólido, para lo cual se estudia el desarrollo de algún producto adhesivo empleando soportes poliméricos adecuados con características específicas de adhesividad, biodegradabilidad, hinchamiento y resistencia mecánica, además de compatibilidad con la viabilidad celular. Adicionalmente esta biomasa puede ser aplicada en la limpieza de tanques o vertidos terrestres accidentales, recuperación de pozos petrolíferos agotados, entre otras aplicaciones.<sup>47</sup>

Otra aplicación es en la elaboración de sistemas biológicos para el tratamiento de suelos y aguas contaminados por vertidos industriales y agrícolas como herbicidas, pesticidas y organoclorados. La técnica se basa en la inmovilización de cepas, autóctonas del suelo contaminado, en soportes cerámicos para de este modo incrementar la eficiencia de la biotransformación de los compuestos tóxicos y persistentes.<sup>48</sup>

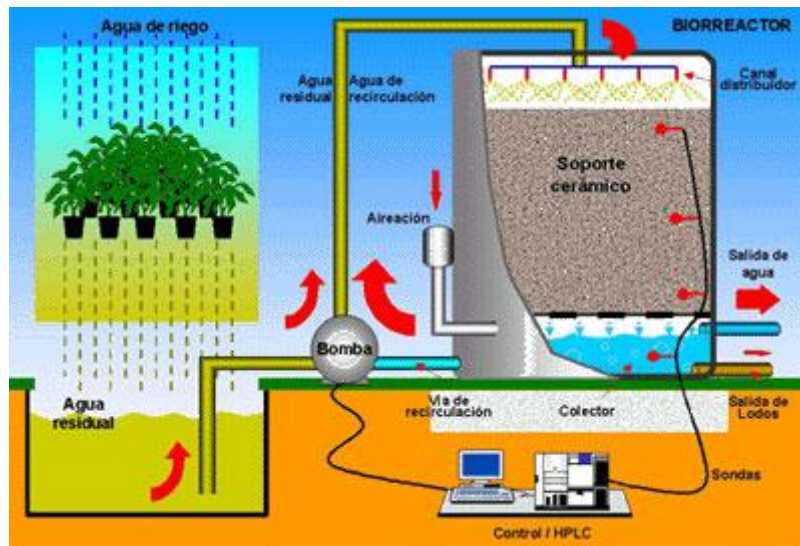


Figura 31 Esquema de biorreactor para la descontaminación de aguas residuales<sup>48</sup>

En el área de los procesos de fermentación, la técnica de inmovilización celular contribuye a la disminución de la mayoría de los problemas que se tiene al utilizar células libres.<sup>49</sup>

La inmovilización celular desacopla el crecimiento microbiano de los procesos metabólicos de interés industrial, así por ejemplo se impide la formación de sedimento celular simplificando el proceso de recuperación del producto de la fermentación alcohólica.<sup>49</sup>

Otro campo de aplicación de la biomasa inmovilizada es la obtención de derivados altamente activos en la industria farmacéutica de esteroides, donde al emplearse sistemas "in vivo", por medio de la inmovilización de células recombinantes, se puede evitar de mejor manera la inactivación de la enzima deseada al final de un proceso de purificación.<sup>40</sup>

La elaboración de soportes para biofiltros es otra de las aplicaciones de la biomasa inmovilizada. La biofiltración se define como todo proceso biológico utilizado para tratamiento de compuestos orgánicos e inorgánicos presentes en una fase gaseosa o líquida. En la biofiltración, los microorganismos

inmovilizados en el soporte sólido son los responsables de la degradación biológica de los contaminantes contenidos en corrientes de aire residual.<sup>50</sup>

## **6.5. Soportes para inmovilización de biomasa para elaboración de biofiltros**

Los primeros biofiltros fueron sistemas abiertos en los que se empleaba suelo poroso como soporte, actualmente el desarrollo en la técnica de inmovilización ha permitido emplear diversos tipos de materiales.<sup>50</sup>

Una de las propiedades de los microorganismos es la de generar una biopelícula sobre cualquier superficie sólida que no sea inocua a su desarrollo, esto es, que el soporte sólido en que se adhiere permita el paso de nutrientes y productos del metabolismo celular, así como también el intercambio de gases, regulación de pH dentro del rango aceptable para el metabolismo.<sup>51</sup>

Este mecanismo de formación de una biopelícula se conoce como adsorción, y por lo general este soporte sólido con biomasa inmovilizada se emplea en biofiltros. Los soportes son similares a los que se usan para filtración convencional: arena, antracita, carbón activado, zeolita, materiales cerámicos, grava.<sup>38,44,51</sup>

Cuando el método de inmovilización es por encapsulamiento se emplean hidrogeles o sustancias que tienen la propiedad de gelificación: carraginato de calcio, 2-hidroxietilmetacrilato (HEMA), N-vinil pirrolidona (NVP), hidrogeles basados en alcohol polivinílico (PVA)/alginato y polivinil pirrolidona (PVP)/alginato. Estos hidrogeles forman membranas permeables en las que quedan atrapados los microorganismos.<sup>35,52</sup>

En el presente trabajo de investigación se utilizó como soportes carbón activado y zeolita. A continuación se citan las características principales de estos dos tipos de soporte.

### 6.5.1. Carbón activado como soporte para inmovilización de biomasa

El carbón activado es un tipo de carbón preparado por procesos físico-químicos para que obtenga un elevado grado de porosidad y una alta superficie interna, entre 500 a 1500 m<sup>2</sup>/g e incluso 3000 m<sup>2</sup>/g. Esta superficie interna grande es una de las razones para que el carbón tenga una alta capacidad de adsorción.<sup>53,54</sup>

El carbón activo se obtiene a partir de diversas sustancias carbonosas de origen animal, vegetal o mineral a las que se somete a altas temperaturas (800-1000 °C), en atmósfera reductora, seguido por inyección de vapor para activación del carbón.

En la figura 4 se presenta un esquema ilustrativo de la superficie porosa del carbón activado.

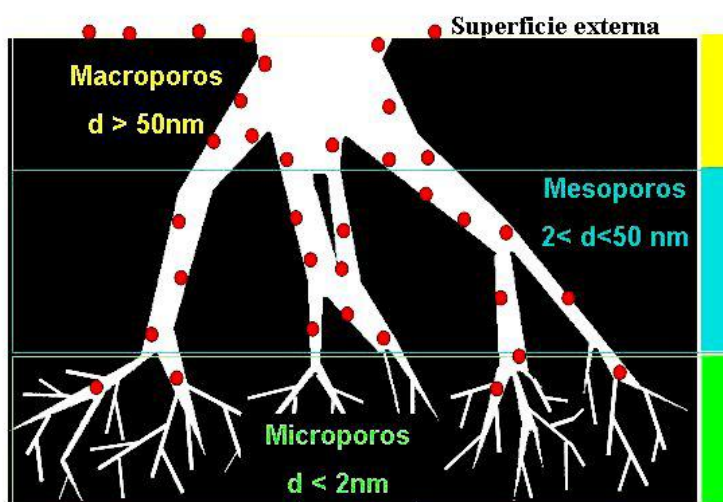


Figura 32 Representación esquemática del sistema poroso de carbón activado y la clasificación de poros según su tamaño (d: dimensión, nm: micras). Los círculos representan las moléculas del adsorbato.<sup>53</sup>

La activación física consiste esencialmente en una oxidación selectiva de los hidrocarburos residuales en el sólido, que se realiza con anhídrido carbónico, vapor de agua, aire u otro agente oxidante. También se puede emplear un tratamiento químico húmedo a más bajas temperaturas mediante reactivos tales como ácido fosfórico, hidróxido potásico o cloruro de zinc.<sup>55</sup>

En su estructura, el carbón activado presenta átomos con valencia insaturada, grupos funcionales (principalmente de oxígeno y nitrógeno) y componentes inorgánicos responsables de las cenizas. Estos grupos funcionales hacen que la superficie del carbón se haga químicamente reactiva por lo que aumenta la capacidad de adsorción.<sup>53, 56</sup>

La adsorción de compuestos químicos como material orgánico responsable de colores y olores, entre otros, a la superficie interna del carbón activado es debido a la acción de las fuerzas débiles de Van der Waals, fuerzas de atracción que actúan entre las moléculas.<sup>53</sup>

Debido al desarrollo tecnológico en elaboración de carbón activado, este puede ser empleado actualmente en problemas vinculados con la filtración, tratamiento de efluentes industriales, saneamiento ambiental entre otras aplicaciones, pues presenta una considerable capacidad de adsorción de diversos compuestos, tanto en fase gaseosa como líquida, principalmente gracias a su estructura porosa que le confiere una gran superficie específica.<sup>53,56</sup>

Otra de sus aplicaciones es en el uso de carbón activado asistido biológicamente para depuración de efluentes industriales acuosos. Estos sistemas están basados en una sinergia de los procesos de adsorción y de biodegradación que puede obtenerse a la superficie de materiales adsorbentes como el carbón activado.<sup>57</sup>

La superficie porosa del carbón activado ofrece un ambiente favorable para la fijación de microorganismos y para el desarrollo de verdaderas biopelículas. Los compuestos orgánicos que se adsorben en el interior de los poros del carbón activado constituyen una fuente constante de sustrato que se desorbe paulatinamente, por un gradiente de concentración, para ser degradado por la biopelícula que se forma en la superficie del carbón activado, de esta manera la capacidad de adsorción del carbón activado se recupera continuamente por medios biológicos, biorregeneración.<sup>57</sup>

Se han realizado estudios sobre los tipos de efluentes industriales que pueden ser tratados con carbones biológicos, entre estos: compuestos halogenados adsorbibles (AOX), hidrocarburos aromáticos (BTEX), compuestos orgánicos volátiles halogenados (COVC) y compuestos de nitrógeno, es decir de procesos de nitrificación y desnitrificación.<sup>57</sup>

### **6.5.2. Zeolita como soporte para inmovilización de biomasa**

La zeolita pertenece a la familia de minerales aluminosilicatos hidratados altamente cristalinos, que al deshidratarse desarrollan, en el cristal ideal, una estructura con diámetros de poro mínimos de 3 a 10 ángstrom.<sup>58</sup>

En su estructura se forman cavidades ocupadas por iones grandes y moléculas de agua con gran libertad de movimiento que permiten el cambio iónico y la deshidratación reversible. Están compuestas por aluminio, silicio, sodio, hidrógeno, y oxígeno. La estructura cristalina está basada en las tres direcciones de la red con  $\text{SiO}_4$  en forma tetraédrica con sus cuatro oxígenos compartidos con los tetraedros adyacentes. Las propiedades físicas proveen aspectos únicos para una variedad amplia de aplicaciones prácticas.<sup>59</sup>

Debido a su estructura altamente microporosa, la zeolita presenta una gran capacidad de adsorción y actúa como tamiz molecular, por lo que es empleada como adsorbente en procesos de purificación y separación.

## 7. Desarrollo de la experimentación

### 7.1. Metodología

#### 7.1.1. Preparación de la biomasa: bacterias autótrofas

La biomasa para el desarrollo de la presente investigación se obtiene por aislamiento de microorganismos autóctonos de relaves de cianuración de piscinas de captación de la planta de beneficio de la compañía Liga de Oro, Distrito Minero Ponce Enríquez.

De los resultados de trabajos sobre aislamiento de microorganismos autótrofos<sup>5,6,12</sup> se determinó que los relaves de cianuración deben ser puestos en contacto con un caldo nutritivo en relación 1/10 de relave/medio de cultivo con la composición detallada en la Tabla 25, para promover crecimiento de bacterias autótrofas en general.

**Tabla 25: Composición de caldo nutritivo para obtención de cultivos de bacterias autótrofas en general**

Constituyentes		Dosis	
Fosfato ácido de potasio	$K_2HPO_4$	1,0	g
Sulfato de magnesio heptahidratado	$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,2	g
Dicloruro de calcio	$CaCl_2$	0,02	g
Dicloruro de manganeso tetrahidratado	$MnCl_2 \cdot 4 H_2O$	0,002	g
Molibdato de sodio tetrahidratado	$Na_2MoO_4 \cdot 4 H_2O$	0,001	g
Agua destilada	$H_2O$	1,0	l

La mezcla sólido – líquido es agitada continuamente en shaker a las condiciones de operación que se presentan en la Tabla 26.

**Tabla 26: Condiciones de operación para obtención de cultivos**

Parámetro	Valor
Velocidad de agitación	150 rpm
pH regulado con NaOH	10.5 – 11
Temperatura	30 – 33 °C

Se controla el crecimiento de microorganismos en intervalos de dos a tres días, mediante siembra en profundidad de 1 ml de muestra de cultivo o diluciones previas si fuera necesario, en agar PCA, utilizando la metodología que se detalla en el Anexo 2. Se realiza el conteo de colonias formadas, y los resultados se expresan en número de unidades formadoras de colonias por mililitro (ufc/ml).

Cuando la biomasa alcanza la fase exponencial de crecimiento se procede a la fase de adaptación de la biomasa al cianuro de sodio (NaCN).

### **7.1.2. Adaptación de la biomasa al NaCN**

La biomasa con características autótrofas obtenidas de los relaves de cianuración requieren ser adaptadas a altas concentraciones de NaCN.

Las condiciones de operación para las etapas de adaptación de los microorganismos al NaCN son tomadas de trabajos anteriores de investigación<sup>6,60</sup> donde se propone el uso de peptona y extracto de carne en las concentraciones especificadas en la Tabla 3.



**Tabla 27. Medio de cultivos para adaptación de microorganismos al NaCN**

Etapa	Extracto de Carne g/l	Peptona g/l	NaCN mg/l	pH
Primera	0,5	0,1	100	10,5
Segunda	0,1	0,01	300	10,5
Tercera	0,05	---	500	10,5

La adaptación al cianuro se realiza en tres etapas, con los medios indicados en la Tabla 3, etapas en las que secuencialmente se incrementa la concentración de cianuro y disminuye la concentración de nutrientes orgánicos, peptona y extracto de carne.

El paso de etapa a etapa se realiza cuando el cultivo alcanza el crecimiento exponencial, donde se toma una alícuota de 100 ml de cultivo y se lleva a un volumen de 300 ml del nuevo caldo de cultivo.

#### **7.1.2.1. Controles para la adaptación de la biomasa al NaCN**

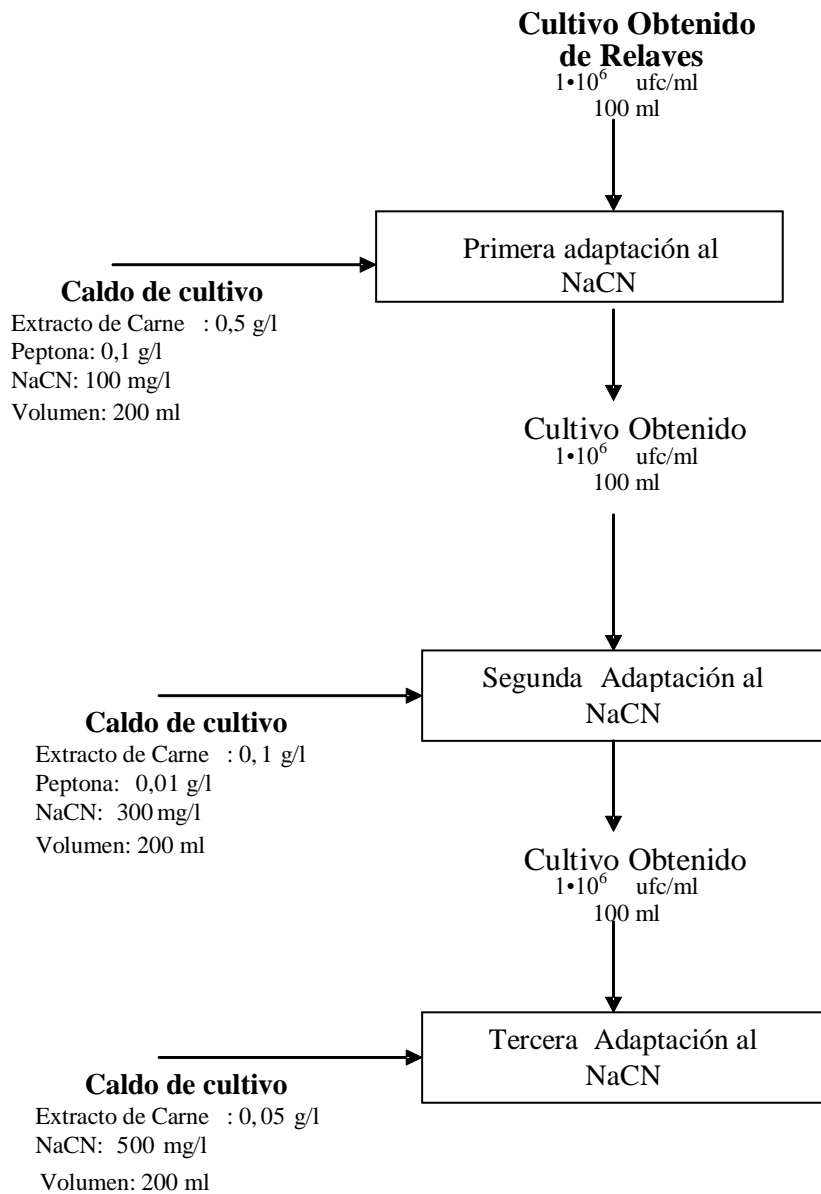
En todas las etapas de adaptación se realizan los siguientes controles en los reactores:

- Crecimiento de microorganismos, mediante conteo de unidades formadoras de colonias en agar PCA por siembra en profundidad. Este control se hace con una frecuencia de dos o tres días.
- Se da por terminada la etapa de adaptación cuando se logra mantener el número de microorganismos en  $1 \cdot 10^6$ . En este punto se toma 100 ml de

este caldo de cultivo para inocularlo en 200 ml del medio de la siguiente etapa.

- Durante la adaptación debe procurarse que la concentración de NaCN sea constante. Para esto se realiza control dos o tres veces por semana de la concentración de NaCN libre por titulación con nitrato de plata, si la concentración disminuye se repone la cantidad faltante de cianuro.
- Adicionalmente debe mantenerse también constante el pH no menor a 10,5. Para el control de pH se hacen mediciones con el equipo, pHmetro, y si fuera necesario se lo regula con una solución de NaOH 0,1N.

E la figura 5 se representa mediante un diagrama de bloques la secuencia de las etapas de adaptación de los microorganismos



**Figura 33 Diagrama de secuencia para adaptación de microorganismos a NaCN**

### **7.1.2.2. Caracterización de los microorganismos**

Se realiza la caracterización de los cultivos inmovilizados en zeolita y carbón activado, pruebas de tinción para determinar si son gram positivas o gram negativas, motilidad en citrato, determinación de fermentación de glucosa, sacarosa y lactosa y prueba API 50 para determinar el género y familia.

### **7.1.3. Pruebas de degradación de cianuro en soluciones preparadas con la biomasa adaptada**

Del cultivo obtenido de la tercera etapa de adaptación se hacen pruebas para determinar si los microorganismos obtenidos en este cultivo han logrado alcanzar un metabolismo que les permita degradar NaCN de una solución preparada.

Se toma una alícuota de 200 ml del cultivo adaptado y se pone en contacto con 300 ml de una solución tal que el sistema inicialmente presente 500 mg/l de NaCN.

Los parámetros de operación y control para biodegradación de NaCN son:

- En los reactores con biomasa para degradación de NaCN se realiza control de crecimiento de microorganismos por contaje en placa con agar PCA; medición de la concentración de NaCN libre por titulación con  $\text{AgNO}_3$  y de pH.
- Se mantienen los reactores en agitación a 150 rpm en shaker, manteniendo un rango de temperatura de 30 – 35 °C.<sup>6</sup>
- En caso de tener una disminución del pH se hace adiciones de solución de NaOH (0,1N) hasta nivelar el pH a 10,5.

- Paralelamente a estas pruebas se realizan blancos en iguales condiciones de pH y concentración de cianuro pero sin biomasa.

#### **7.1.4. Inmovilización de biomasa en soportes sólidos**

El método empleado para la inmovilización de microorganismos en soportes sólidos es por adsorción,<sup>5,41</sup> para lo cual se pone en contacto el cultivo con el soporte escogido y se agita a 100 rpm, se mantiene la temperatura en un rango de 30 – 35°C.<sup>5</sup>

Se seleccionan como soportes sólidos a estudiar la inmovilización de la biomasa, zeolita y carbón activado. De los materiales seleccionados, se determinan sus características: densidad real y aparente, pH, granulometría composición química y mineralógica por difracción de rayos X en el caso de la zeolita.

##### **7.1.4.1. Preparación del soporte**

Los soportes seleccionados antes de ser puestos en contacto con el cultivo adaptado a 500 mg/l de NaCN son lavados con una solución de NaOH hasta que el líquido en contacto con el soporte presente un pH de 10,5.

Una vez alcanzado este pH, el soporte es esterilizado en autoclave a 1,5 Bar de presión, manteniendo una relación de peso de soporte a volumen de líquido de 1 a 2, aproximadamente.

Luego se añade NaCN a temperatura ambiente, de tal modo que se obtenga una concentración de 500 mg/l en el líquido, previo control de pH. Se agita por cinco horas, se ajusta la concentración de NaCN a 500 mg/l y se añade el cultivo para iniciar la inmovilización.

### 7.1.4.2. Parámetros de operación y control para inmovilización de biomasa

Para la inmovilización de los microorganismos en soporte sólido se mantiene las siguientes relaciones de peso de soporte a volumen de cultivo:

**Tabla 28: Relación sólido/cultivo para adsorción de biomasa**

Soporte	Peso Soporte g	Volumen de cultivo adaptado a 500mg/l NaCN ml
Zeolita	1	100
Carbón Activado	4	100

- Se realiza el control de pH, que debe mantenerse en 10,5 con adición de NaOH 0,1 N.
- Los controles de crecimiento de microorganismos se efectúan tanto para el cultivo líquido como para la biomasa inmovilizada en el soporte sólido, como se describe en el anexo 1.
- Si el cultivo muestra un conteo menor a  $1 \cdot 10^5$  ufc/ml, se retira líquido del reactor y se repone este volumen con cultivo de tercera etapa de adaptación en relación en volumen de 1/1 y caldo de cultivo fresco que contiene  $1 \cdot 10^6$  ufc/ml.
- Durante toda la etapa de adsorción se mantiene control de NaCN libre en el medio de cultivo, si esta concentración es menor a 500mg/l, se hace adiciones directas de cianuro sólido.

### **7.1.4.3. Adaptación de la biomasa inmovilizada a mayores concentraciones de NaCN**

Se realizan ensayos para determinar la resistencia de la biomasa inmovilizada a concentraciones de cianuro mayores que la concentración a la cual se hace la inmovilización.

El procedimiento seguido consiste en los siguientes pasos:

- Se toma alrededor de 50 g de soporte, carbón activado o zeolita, que contiene microorganismos inmovilizados y se coloca en un erlenmeyer que contiene 150 ml solución de NaCN y 50 ml de caldo nutritivo de la tercera fase de adaptación.
- Previamente se esteriliza el erlenmeyer y la concentración de NaCN se ajusta a 650 mg/l para el primer ensayo y a 700 para el segundo ensayo, manteniendo siempre un pH mínimo de 10,5.
- Se realiza conteo de microorganismos en el soporte y en solución durante la inmovilización.
- Los controles de concentración de NaCN, en intervalos de tres o cinco días, se realiza por titulación del cianuro con  $\text{AgNO}_3$ . La concentración se mantiene en los valores definidos para el ensayo, entre 650 y 700 mg/l.
- El ajuste de concentración de cianuro se hace por adición de este compuesto al momento del control.

### **7.1.5. Pruebas de cinética de degradación de cianuro en reactores de lecho agitado con biomasa inmovilizada**

Las pruebas de degradación de NaCN con biomasa inmovilizada en los diferentes soportes son efectuadas en lecho agitado, el contaje mínimo de microorganismos en el sólido debe ser  $1 \cdot 10^6$  ufc/g.

Se trabaja con una relación de soporte/solución de NaCN de 100 g/300 ml

Los parámetros de operación y control para esta prueba son:

- Relación masa de soporte sólido con microorganismos inmovilizados a solución a tratar de 100g/300ml.
- Rango de temperatura 30 – 35 °C.
- Velocidad de agitación 80 – 100 rpm, en shaker.
- Concentración de soluciones a tratar 650 mg/l de NaCN.

Se controla:

- pH, que es regulado con NaOH, y no debe ser menor a 10,5.
- Concentración de NaCN libre en el reactor por titulación con  $\text{AgNO}_3$  y por diferencia de la concentración inicial se tendrá el % de cianuro degradado.
- Contaje de microorganismos en el líquido y en el sólido por contaje en placa con agar PCA según método en el Anexo 1.



- Paralelamente se hacen pruebas en blanco para determinar la degradación que presenta el soporte sin microorganismos inmovilizados.

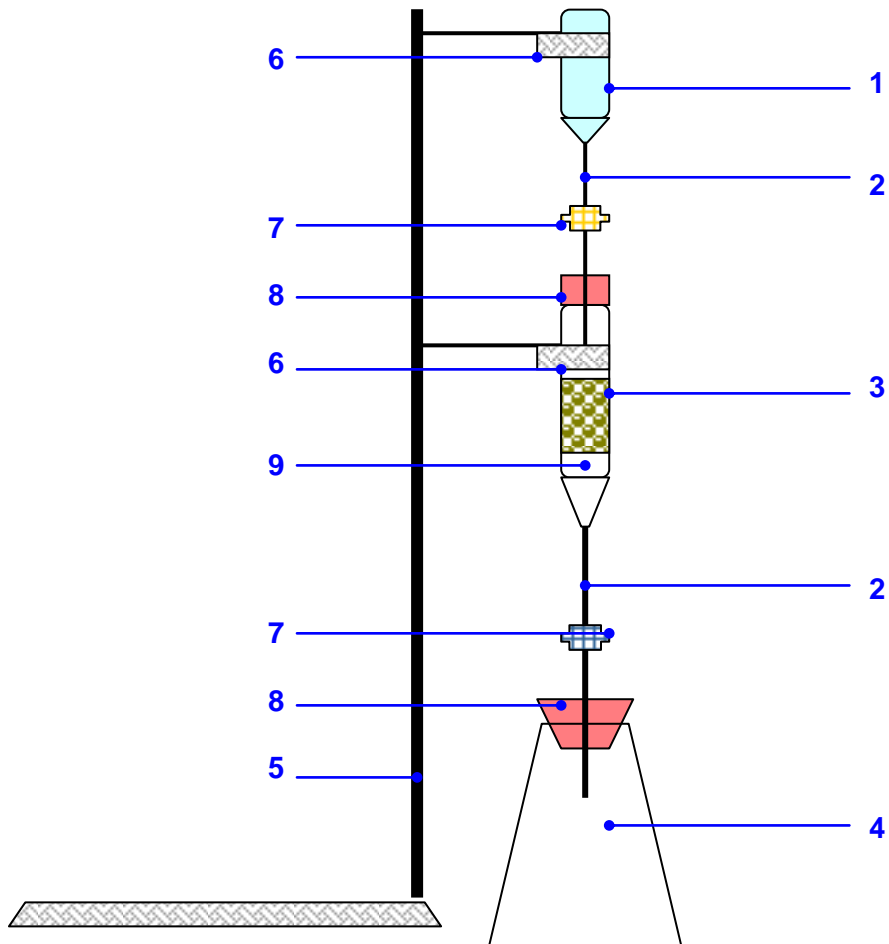
### **7.1.6. Pruebas de degradación de cianuro en reactores de lecho fijo con la biomasa inmovilizada**

Con la biomasa inmovilizada en los soportes sólidos en la etapa de inmovilización se realiza un estudio para determinar los parámetros de diseño de un biofiltro para degradación de cianuro en solución.

Se estudian las siguientes variables:

- Altura de lecho de soporte con biomasa inmovilizada (zeolita y carbón activado)
- Velocidad de flujo de alimentación de solución de NaCN a tratar

El esquema del equipo utilizado para la realización de estas pruebas se muestra a continuación en la figura 6, este es montado de tal forma que permita una operación con ingreso de aire (para mantener condiciones aeróbicas).



**Figura 34 Esquema de Columna para filtración de solución preparada de NaCN con biomasa inmovilizada**

1. Recipiente para solución de alimentación a la columna
2. Flujo de alimentación y salida de la columna
3. Biofiltro con biomasa inmovilizada en material sólido
4. Recipiente para recoger solución de salida de la columna
5. Soporte
6. Pinzas
7. Llaves para regular los flujos de entrada y salida
8. Tapones de algodón para evitar contaminación
9. Base para el soporte de relleno

### 7.1.6.1. Condiciones de operación

Se emplea el soporte con biomasa inmovilizada conteniendo  $1 \cdot 10^6$  ufc/g, la solución de alimentación con concentración de cianuro de 650 mg/l y un pH no menor a 10,5; se tratan 400 ml de solución en cada prueba.

La columna empleada para el biofiltro previamente debe ser esterilizada en autoclave a presión de 1,5 Bar durante 15 min.

Las demás conexiones que se emplean son limpiadas con alcohol o una solución de hipoclorito de sodio, a fin de evitar contaminación, luego son lavadas con una solución alcalina también esterilizada.

Las condiciones para cada tipo de prueba se indican en Tabla 29

**Tabla 29: Variables y condiciones de operación para pruebas de biofiltros**

Variable de operación		Condiciones de operación	
Variable	Valores	Parámetro	Valor
Altura de lecho	2, 4, 8 cm	Flujo [NaCN]	0,4 ml/min/cm <sup>2</sup> 650 mg/l
Flujo de alimentación	0,1 a 2,5 ml/min/cm <sup>2</sup>	Altura de lecho [NaCN]	4 cm 650 mg/l
[NaCN]	650	Altura de lecho Flujo (zeolita) Flujo (carbón activado)	4 cm 0,4 ml/min/cm <sup>2</sup> 1,4 ml/min/cm <sup>2</sup>
Diámetro	5 cm	Diámetro	5 cm

### **7.1.6.2. Controles en la degradación de NaCN en lecho fijo**

- Antes y después del ensayo se hace un conteo de microorganismos en el sólido para determinar si estos disminuyen por efecto de la circulación de la solución de alimentación.
- De igual manera antes y después se titula la solución de NaCN para determinar el porcentaje de degradación.
- Para cada prueba se realizan los blancos respectivos que consisten en columnas con relleno de zeolita o carbón activado sin biomasa inmovilizada y bajo las mismas condiciones de operación descritas en la Tabla 5.

### **7.1.7. Caracterización de la biomasa inmovilizada**

Dentro de los parámetros para caracterizar la biomasa inmovilizada se tiene:

- Tiempo de vida útil de biofiltro
- Estabilidad de los microorganismos inmovilizados en los soportes estudiados
- Capacidad de degradación del NaCN en efluente

Para determinar el tiempo de vida útil se realiza una prueba en la cual se determina el volumen máximo de solución de 600 mg/l de NaCN que puede tratarse en el biofiltro, con los datos de porcentaje de degradación respecto a tiempo se obtendrá la curva de agotamiento para los parámetros estudiados.

Con los parámetros óptimos de las pruebas de degradación de NaCN en soluciones preparadas, se estudiará la degradación de NaCN de una solución proveniente de un proceso de cianuración, de la cual se sabrá su contenido inicial de cianuro libre.

La prueba anterior sirve también para determinar la estabilidad de los microorganismos en cada uno de los sólidos estudiados mediante el conteo de microorganismos presentes en el sólido en función del volumen de solución pasada.

## 7.2. Resultados de la experimentación

### 7.2.1. Preparación de la biomasa

#### 7.2.1.1. Crecimiento de bacterias autótrofas

En la figura 7 se puede observar que los microorganismos presentes en las arenas relave de cianuración requieren un periodo de adaptación de 26 días para después de este, iniciar un periodo de crecimiento exponencial y al cabo de once días llegar a su máxima población que es alrededor de  $5,4 \cdot 10^7$  ufc/ml.

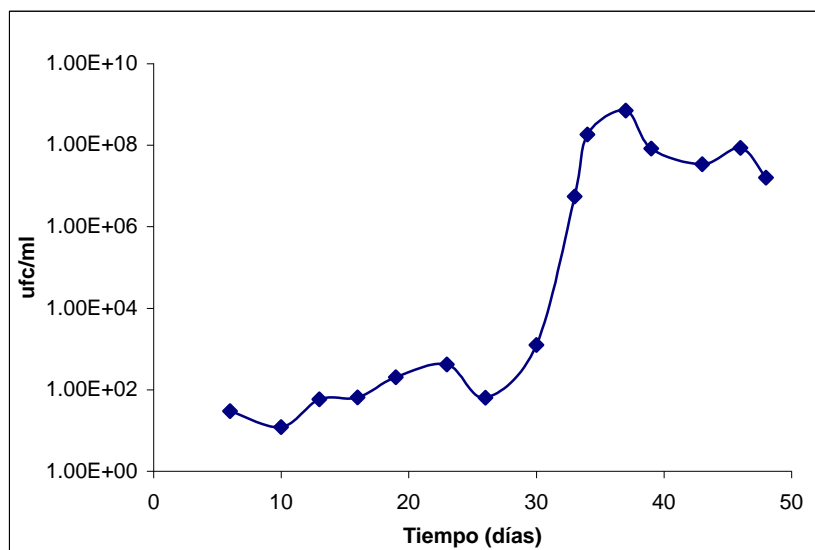


Figura 35 Crecimiento de microorganismos autótrofos

### 7.2.1.2. Adaptación de la biomasa al NaCN

Los resultados obtenidos en las tres etapas de adaptación muestran que conforme se incrementa la concentración de cianuro en el sistema, el periodo de adaptación disminuye; en la primera etapa se alcanza el crecimiento máximo en 25 días ( $8,0 \cdot 10^6$  ufc/ml), en la segunda en 17 días ( $9,5 \cdot 10^6$  ufc/ml) y la tercera en 11 días ( $7,4 \cdot 10^6$  ufc/ml), como se puede apreciar en la figura 8.

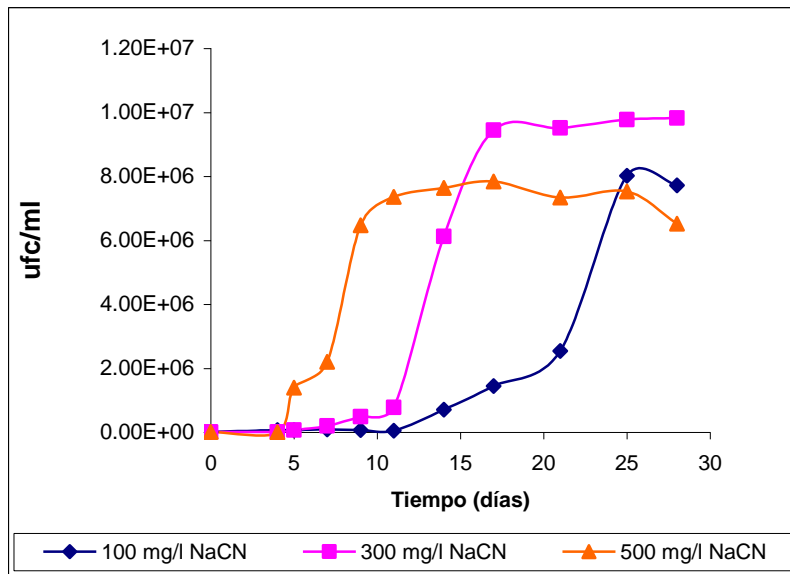


Figura 36 Adaptación de microorganismos al NaCN

### 7.2.1.3. Caracterización de microorganismos

De las pruebas de identificación (API 50) y caracterización se obtuvieron los resultados que se muestran en la Tabla 30.

**Tabla 30: Caracterización de cultivos fijados en soportes para biofiltro**

Microorganismo	Gram	Motilidad en citrato	Fermentación		
			Sacarosa	Glucosa	Lactosa
Bacillus cereus	Bacilos Gram positivos esporulados	negativo	positiva	positiva	Negativa
Bacillus sphaericus	Bacilos Gram positivos esporulados	negativo	negativa	negativa	Negativa
Bacillus lentus	Bacilos Gram positivos esporulados	negativo	positiva	positiva	Positiva
Staphylococcus epidermidis	Cocos Gram positivos	negativo	positiva	positiva	Positiva
Bacillus subtilis	Bacilos Gram positivos	-	-	positiva	Positiva

Los microorganismos obtenidos de la tercera fase de adaptación al cianuro casi en su mayoría son bacilos Gram Positivos a excepción del Staphylococcus epidermidis que se trata de un coco, también gram positivo.

### 7.2.1.4. Resultados de la evaluación de las pruebas de degradación de NaCN con biomasa adaptada

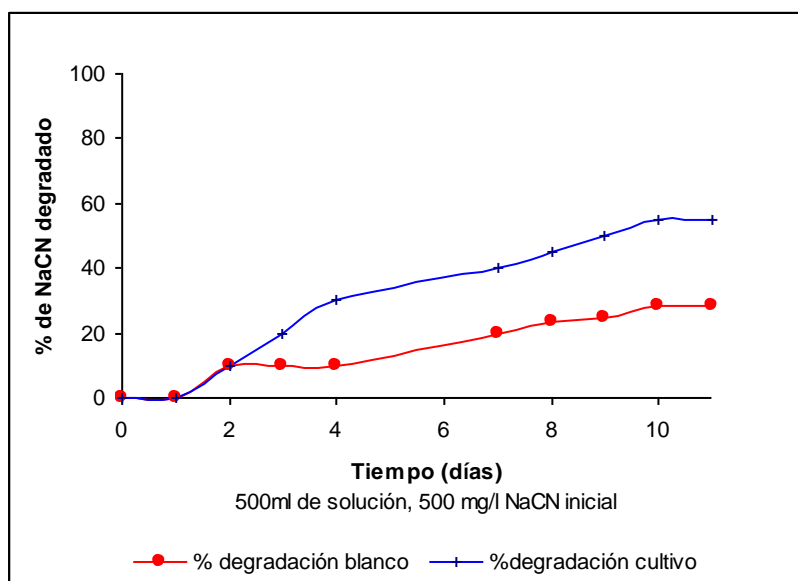
En los primeros días de contacto de la solución con la biomasa, la degradación es baja, lo cual muestra que los microorganismos requieren un tiempo de adaptación al nuevo sistema en que se encuentran.

En la figura 9 se muestra que la degradación de NaCN con biomasa, en forma general es mayor que el blanco (solución de cianuro sin biomasa). Esta

diferencia es notoria a partir del segundo día y en el día 10, alcanza el 55% comparado con el 30% del blanco; a partir de este día, en los dos casos, aparentemente se detiene la degradación.

El porcentaje de degradación en el blanco indica que hay descomposición del cianuro por el aire del ambiente e influencia de la luz que recibe del sistema para mantener la temperatura.

Pese a que el porcentaje de degradación en el reactor con biomasa es mayor que el blanco, la cinética con la que se produce esta degradación es pequeña.



**Figura 37 Degradación de NaCN con biomasa adaptada**

Con los datos obtenidos se establece un modelo matemático de la cinética de degradación de cianuro, este es la ecuación de una recta donde la pendiente de la recta representa la velocidad con la cual se degrada el NaCN por acción



de la biomasa, el valor obtenido es de 14,2 mg NaCN/día y para este caso el coeficiente de correlación ( $R^2$ ) es 0,9721.

$$NaCN_{\text{degradado}} = -14,2t + 250$$

Ecuación 4

En donde:

NaCN en mg  
t: tiempo en días  
 $R^2$ : 0,9721

La Figura 38 muestra los datos de degradación de NaCN con biomasa adaptada, indicando la curva de tendencia que corresponde a la ecuación 4

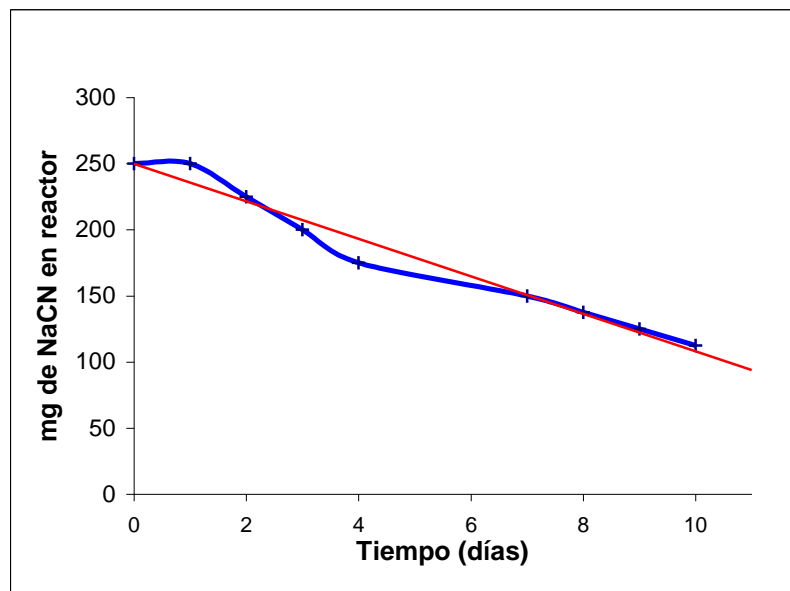


Figura 38 Degradación de NaCN con biomasa adaptada

De igual modo con los datos obtenidos para el blanco, solución de NaCN sin biomasa, se obtiene un modelo matemático, siendo este también la ecuación de una recta, siendo el coeficiente de correlación para este caso 0,9486.

$$NaCN_{degradado} = -6,4t + 248 \quad \text{Ecuación 5}$$

En donde:

NaCN en mg  
t: tiempo en días  
R2 = 0,9486

La velocidad de degradación de cianuro es de 6,4mg/día esto es casi la mitad comparada con la velocidad de degradación con biomasa. En la figura 11 los datos de degradación del blanco con curva de tendencia que corresponde a la ecuación 5.

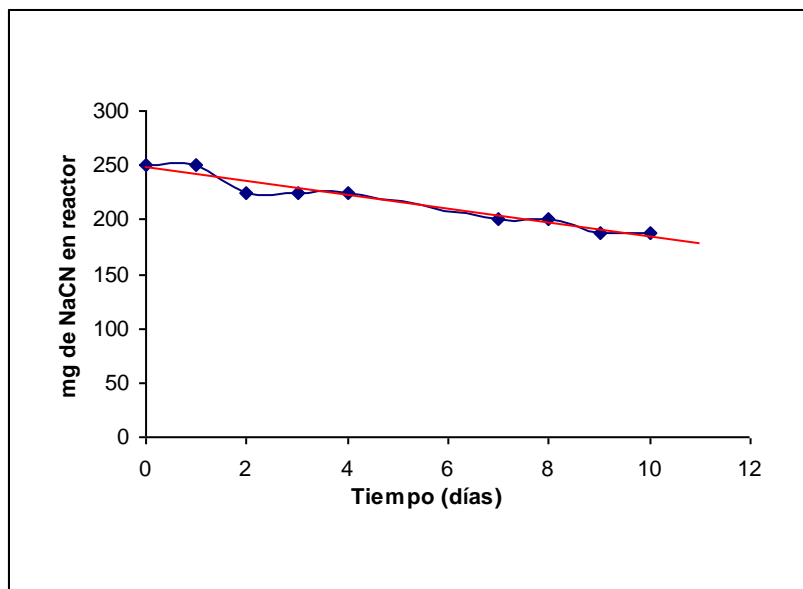


Figura 39 Degradación de NaCN sin biomasa

## 7.2.2. Resultados de la inmovilización de biomasa

### 7.2.2.1. Caracterización de los soportes sólidos para uso en inmovilización de biomasa

**Tabla 31: Caracterización físicas, químicas y mineralógicas de Zeolita**

Densidad real	1.715 g/cc	Determinada mediante picnómetro	
Densidad aparente	0.850 g/cc	Determinado en probeta 50 ml, graduación 1 ml.	
Tamaño de partícula	1190 x 840 $\mu\text{m}$	Granulometría entre mallas # 20 y # 16	
pH (sólido – líquido: 100 g – 100 ml agua)	8,5	Medición con pHmeter Orion 720	
<b>Composición mineralógica (%) Análisis difracción de rayos X</b>		<b>Composición química Análisis absorción atómica</b>	
Cuarzo $\text{SiO}_2$	43,0	Na	1,7%
Mordenita $(\text{Na}_2\text{CaK}_2)\text{Al}_2\text{S}_{10}\text{O}_{24} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	46,0	K	3,4%
Dickita $\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5 (\text{OH})_4$	11,0	Ca	1,5%
		Al	4,7%

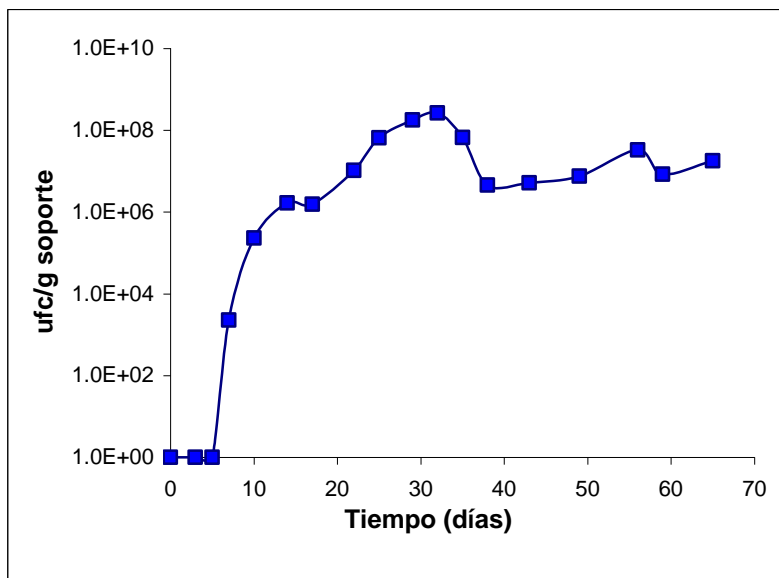
Por estequiometría con los datos del análisis mineralógico se puede determinar que el contenido de azufre es de 14 %

**Tabla 32: Caracterización físicas y químicas del carbón activado<sup>61</sup>**

Nombre Comercial	Quimicarb
pH (sólido – líquido: 100 g – 100 ml agua)	7,5
Densidad aparente	0,63 g/cc
Superficie específica	850 $\text{m}^2/\text{g}$
Número de yodo	893 $\text{mg I}_2/\text{g}$

### 7.2.2.2. Inmovilización de biomasa

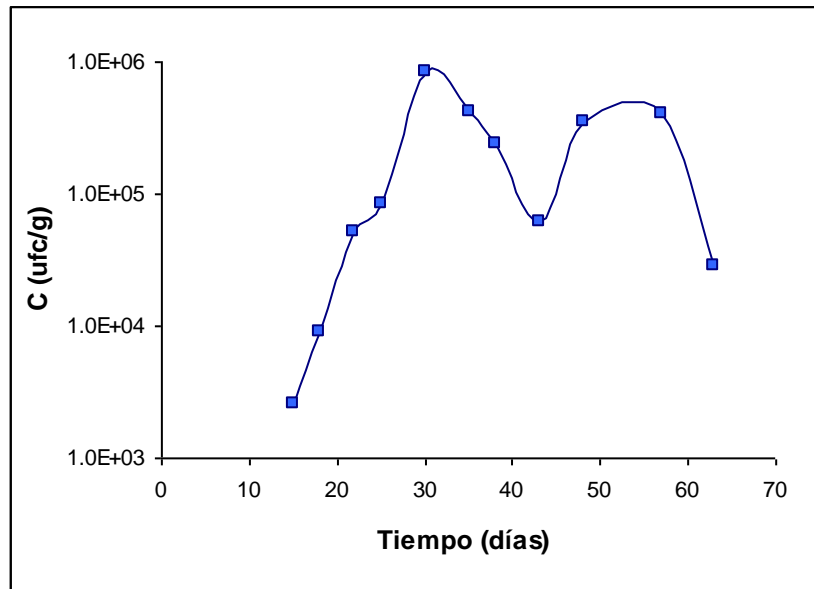
En las figuras 12 y 13 se representan los resultados obtenidos de las pruebas de inmovilización de biomasa en el carbón activado y zeolita respectivamente. Para el caso del carbón activado, en la figura 12 se puede apreciar que la fijación por absorción se produce a partir del quinto día, llegando a su número máximo de biomasa inmovilizada de  $1 \cdot 10^8$  ufc/g en el día 32, conteo que se mantiene durante los 60 días de la prueba.



**Figura 40 Inmovilización de biomasa en carbón activado**  
100 ml de solución, 500 mg/l NaCN y 4 g de carbón activado

Cuando se utiliza zeolita, en la figura 13 se evidencia que la fijación empieza después del día 10. La biomasa requiere mayor tiempo de adaptación respecto al carbón activado

El conteo máximo alcanzado es de  $1 \cdot 10^6$  ufc/g, pero este valor no es estable, se produce descenso en el conteo. Esto indica que la inmovilización no muestra ser estable en función del tiempo.



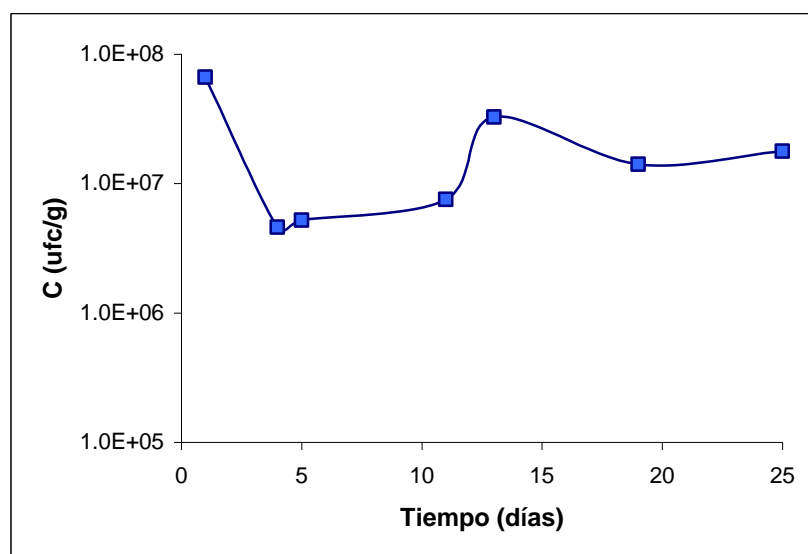
**Figura 41 Inmovilización de biomasa en zeolita**  
100 ml de solución, 500 g/l NaCN y 1g de zeolita

### **7.2.2.3. Adaptación de la biomasa inmovilizada a mayores concentraciones de NaCN**

En vista que la inmovilización se realiza con concentraciones de cianuro de 500 mg/l, se analiza el comportamiento de la biomasa inmovilizada a mayor concentración de cianuro, esto es de 650 y 700 mg/l.

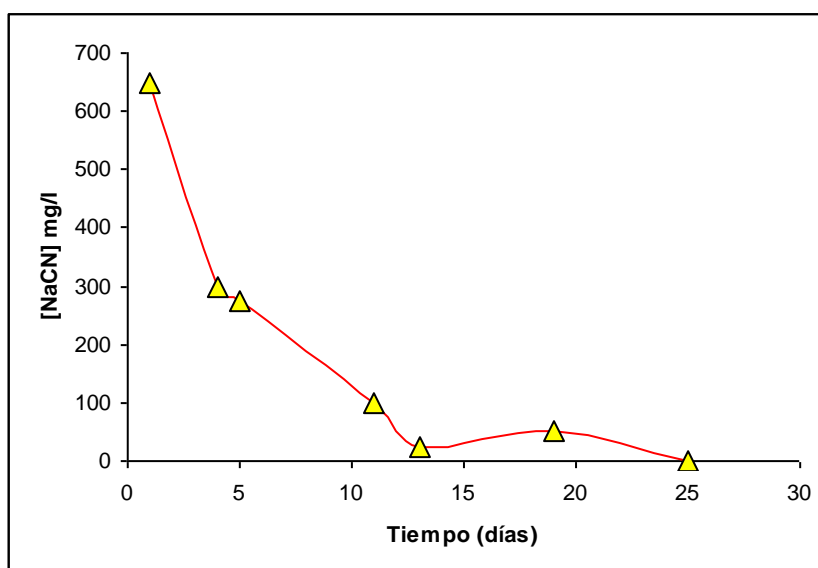
#### 7.2.2.4. Adaptación de biomasa inmovilizada en carbón activado a 650 y 700 mg/l de NaCN

Al poner en contacto la biomasa fijada al carbón activado con una solución conteniendo 650 mg/l de NaCN, inicialmente se tiene un descenso brusco del conteo de los microorganismos fijados en el soporte, sin embargo a partir del día quinto se incrementa este número, llegando a mantenerse un conteo de alrededor de  $1 \cdot 10^7$  ufc/g, como se puede apreciar en la figura 14.



**Figura 42 Adaptación a 650 mg/l de NaCN de la biomasa inmovilizada en carbón activado**  
50 g de carbón activado, 200 ml de solución

Al medir la degradación de NaCN durante la adaptación de la biomasa inmovilizada en carbón activado, se evidencia que va incrementando con el tiempo su capacidad de degradar cianuro, tomando en cuenta que en cada intervalo de control se ajustó la concentración de NaCN a 650 mg/l. En la figura 15 se puede observar lo expuesto.



**Figura 43 Concentración de NaCN en reactor agitado con biomasa inmovilizada en carbón activado.**

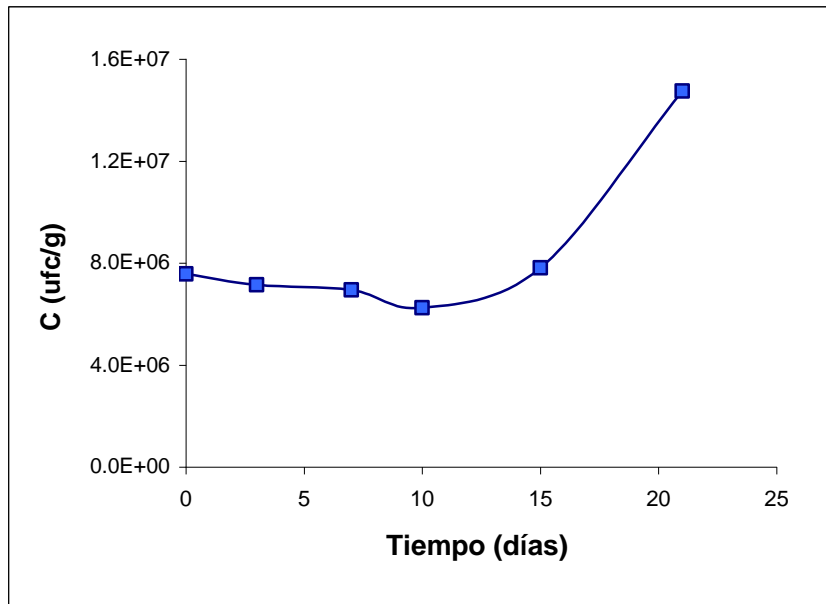
650 mg/l NaCN, 50 g de carbón activado, 200 ml de solución

Para intervalos de tiempo indicados en la Tabla 33 se calculan las velocidades de degradación de cianuro.

**Tabla 33: Velocidades de degradación de cianuro en reactor de lecho agitado con biomasa inmovilizada en soporte de carbón (650 mg/l NaCN)**

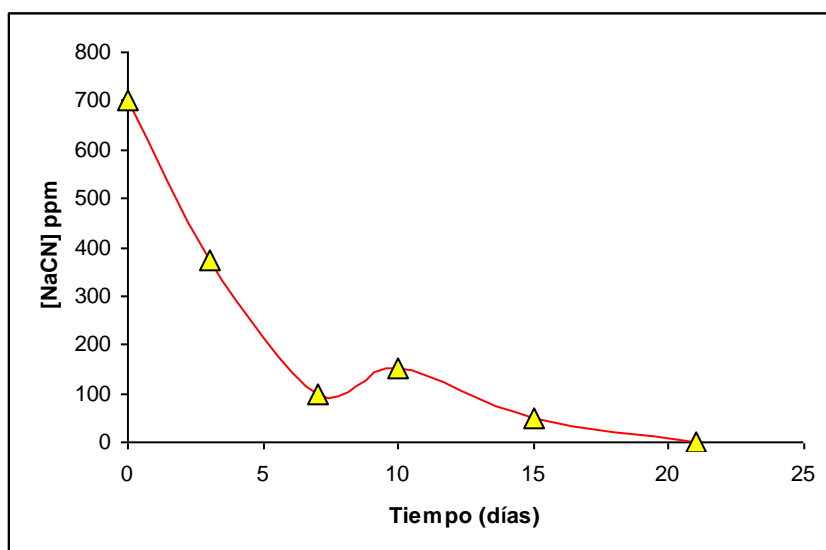
Días	Intervalo tiempo días	[NaCN] mg/l	% NaCN degradado	mg NaCN/día
0 - 5	5	275	57,7	15,0
5 - 11	6	100	84,6	18,3
11 - 14	3	25	96,2	41,7
14 - 19	5	50	92,3	24,0
<b>Velocidad media</b>		<b>24,8 mg NaCN/día</b>		

Al incrementar la concentración de NaCN a 700 mg/l, se tiene que el conteo en el soporte inicialmente  $8 \cdot 10^6$  ufc/g, asciende a partir del día décimo hasta llegar a  $1,6 \cdot 10^7$  ufc/g luego de haber pasado un periodo de adaptación entre el día inicial y el día diez como se puede observar en la figura 16.



**Figura 44 Adaptación a 700 mg/l de NaCN de biomasa inmovilizada en carbón activado**  
50 g de carbón activado, 200 ml de solución

La tendencia al descenso de la concentración de cianuro sigue siendo marcada, como se puede apreciar en la figura 17, demostrándose de este modo que tanto la población de microorganismos en el sólido al igual que su capacidad de degradación de cianuro, no se ven afectadas por incremento de las concentraciones de cianuro a los niveles estudiados.



**Figura 45 Concentración de NaCN en reactor agitado con biomasa inmovilizada en carbón activado.**  
700 mg/l NaCN, 50 g de carbón activado, 200 ml de solución



Haciendo el cálculo de la velocidad de degradación por intervalo de tiempo se tiene los resultados presentados en la Tabla 34

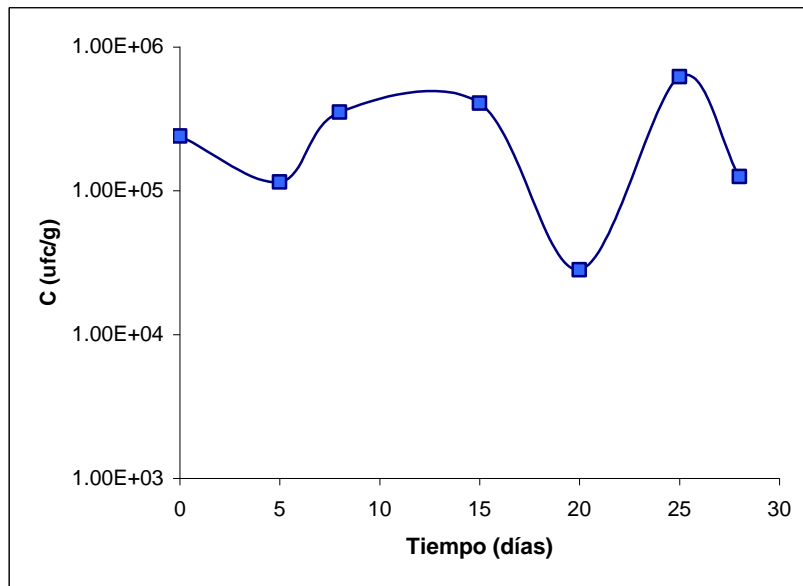
**Tabla 34: Velocidades de degradación de NaCN en reactor con biomasa inmovilizada en soporte de carbón (700 mg/l NaCN)**

Días	Intervalo tiempo días	[NaCN] mg/l	% NaCN degradado	mg NaCN /día
0-3	3	375	46,4	21,7
3-7	4	100	85,7	59,9
7-10	3	150	78,6	36,7
10-15	5	50	92,9	26,0
<b>Velocidad media</b>		<b>36,1 mg NaCN/día</b>		

Comparando la velocidad media obtenida en el caso de 650 mg/l de NaCN, la velocidad media en el caso de los 700 mg/l NaCN se tiene un ligero incremento de 24,8 a 31,6 mg de NaCN/día; mientras mayor es la concentración de cianuro la cinética de degradación es también mayor.

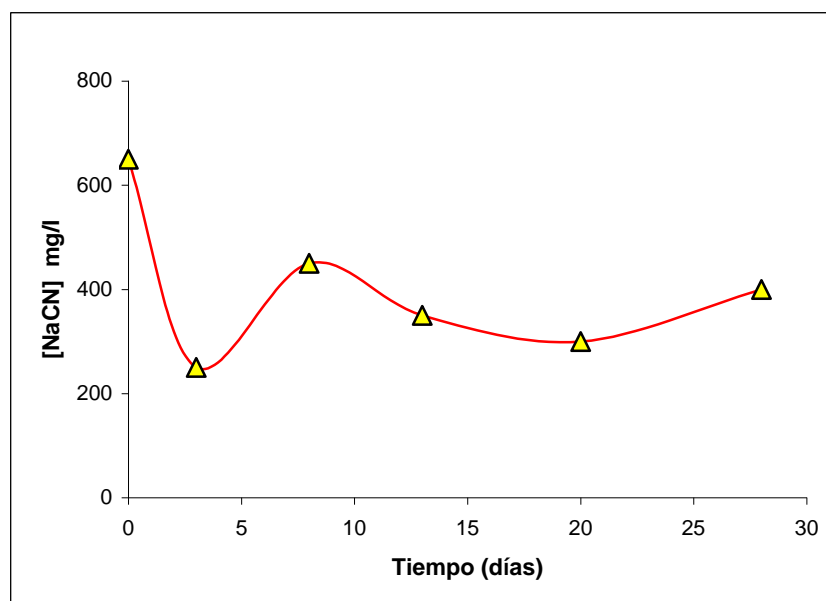
#### **7.2.2.5. Adaptación de biomasa inmovilizada en zeolita a 650 y 700 mg/l de NaCN**

En el caso de la zeolita como soporte, no se produce una disminución drástica del número de microorganismos presentes en el sólido, pero se tiene una gran variación en el conteo en función del tiempo, el cual oscila alrededor de  $1 \cdot 10^5$  ufc/g como se puede observar en la figura 18.



**Figura 46 Adaptación a 650 mg/l de NaCN de biomasa inmovilizada en zeolita**  
200 ml de solución y 50 g de zeolita

Analizando la degradación de cianuro durante el proceso de inmovilización, se puede ver que hay un descenso de la concentración de cianuro en el reactor, la concentración baja de 650 mg/l hasta 250 mg/l de NaCN como punto mínimo durante los tres primeros días, luego de esto el valor de concentración se mantiene alrededor de 350 mg/l de NaCN. La velocidad media degradación de cianuro es de 13,0 mg de NaCN /día, el resultado es expuesto en la Tabla 35.

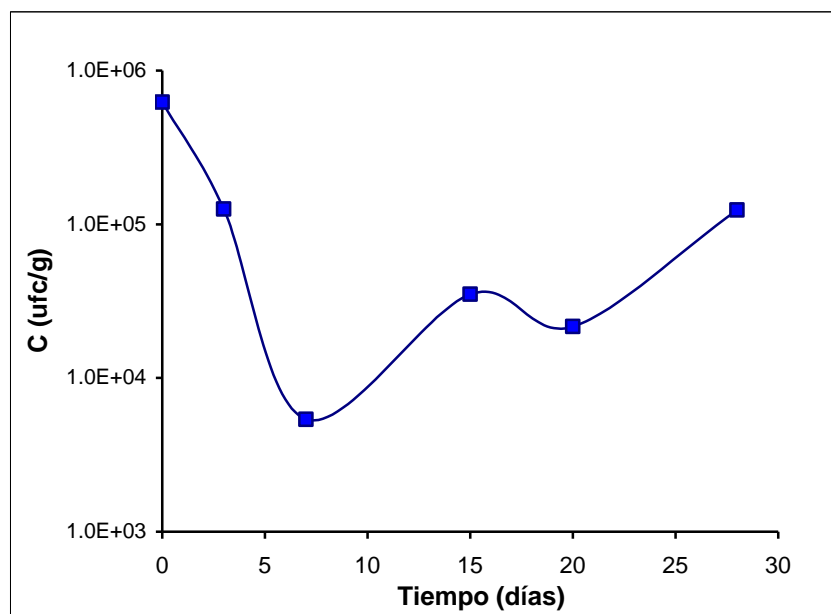


**Figura 47 Concentración de NaCN en reactor agitado con biomasa inmovilizada en zeolita**  
650 mg/l de NaCN, 200 ml de solución y 50 g de zeolita

**Tabla 35: Velocidades de degradación de NaCN en reactor con biomasa inmovilizada en soporte de zeolita (650 mg/l de NaCN)**

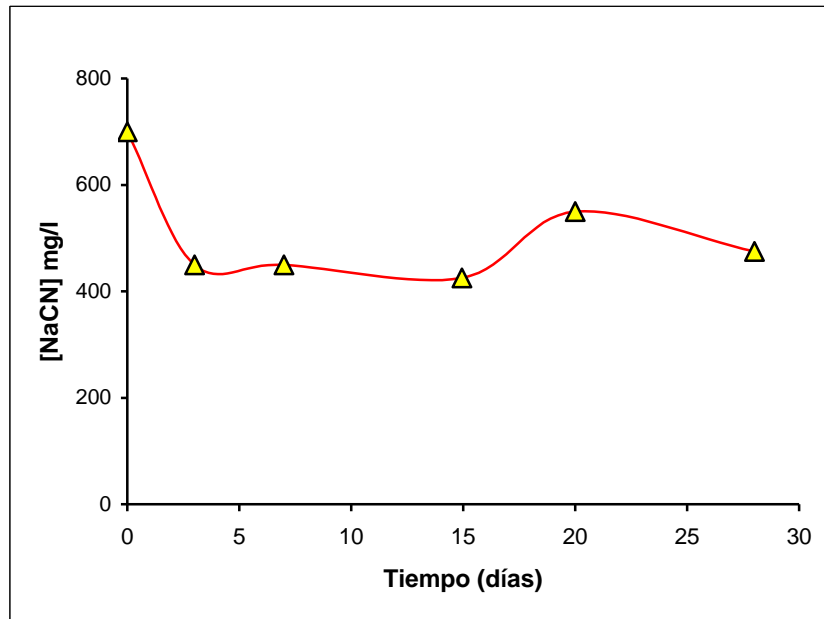
Días	Intervalo tiempo días	[NaCN] mg/l	% NaCN degradado	mg NaCN/día
0-3	3	250	61,5	26,6
3-8	5	450	30,8	8,0
8-13	5	350	46,2	12,0
13-20	7	300	53,8	10,0
20-25	5	400	38,5	8,3
<b>Velocidad media</b>		<b>13,0 mg NaCN/día</b>		

La figura 20 muestra que al incrementar la concentración a 700 mg/l se produce un descenso de la concentración de biomasa fijada en la zeolita, valor menor de  $1 \cdot 10^4$  ufc/g, alcanzado alrededor del día sexto luego de lo cual nuevamente se tiene incremento en el conteaje.



**Figura 48 Adaptación a 700 mg/l de NaCN de biomasa inmovilizada en zeolita**  
200 ml de solución y 50 g de zeolita

En la figura 21 se puede observar que la capacidad de degradación de los microorganismos a estas condiciones se sigue manteniendo, aunque la velocidad disminuye, 9,5 mg/ día; en la Tabla 36 se exponen los porcentajes de degradación, evidenciándose que estos también disminuyen.



**Figura 49 Concentración de NaCN en reactor agitado con biomasa inmovilizada en zeolita.**  
200 ml de solución y 50 g de zeolita

**Tabla 36 Velocidades de degradación de NaCN en reactor con con biomasa inmovilizada en soporte de zeolita (700 mg/l NaCN)**

Días	Intervalo tiempo días	[NaCN] mg/l	% NaCN degradado	mg NaCN/día
0-3	3	450	35,7	16,7
3-7	4	450	35,7	12,5
7-15	8	425	39,3	6,9
15-20	5	550	21,4	6,0
20-28	8	475	32,1	5,6
<b>Velocidad media</b>		<b>9,5 mg NaCN/día</b>		

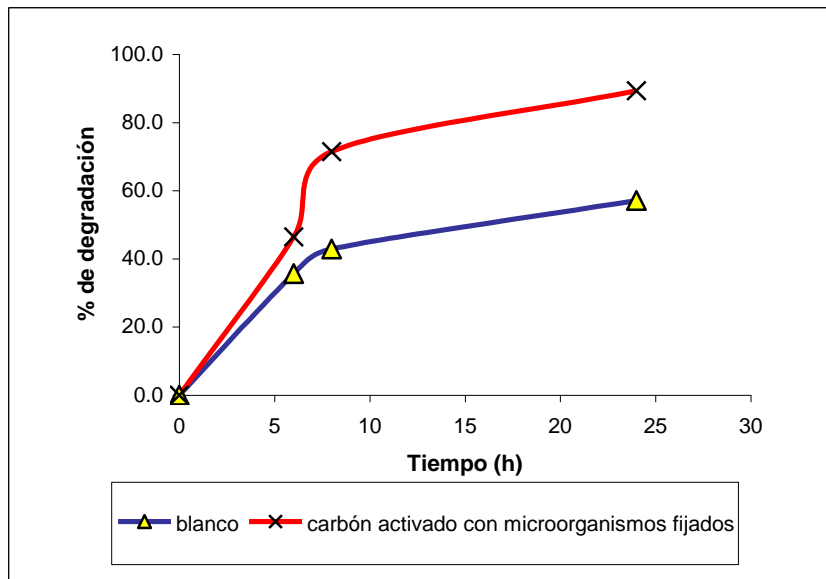
Los resultados obtenidos en lo referente a degradación de NaCN con la zeolita respecto al carbón activado son bajos, comprando las velocidades medias de degradación, se puede observar que el carbón activado logra una degradación del doble respecto al reactor con zeolita en el caso de 650 mg/l de NaCN y de casi tres veces para el caso de los 700 mg/l de NaCN.

**Tabla 37: Comparación de velocidades medias de degradación. Reactores agitados con biomasa inmovilizada (650 y 700 mg/l NaCN)**

	<b>Carbón Activado</b>	<b>Zeolita</b>
	<b>Velocidad Media de Degradación NaCN mg NaCN/día</b>	
<b>650 mg/l NaCN</b>	24,8	13,0
<b>700 mg/l NaCN</b>	31,6	9,5

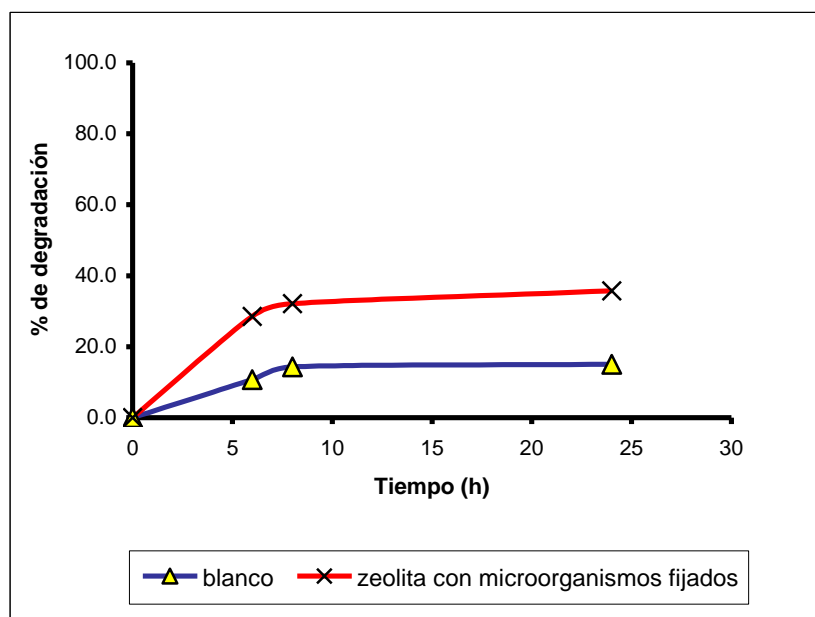
### **7.2.3. Cinética degradación de NaCN en lecho agitado con biomasa inmovilizada en carbón activado y zeolita**

De las pruebas realizadas para degradación de cianuro se obtuvieron los siguientes resultados mostrados en las figuras 22 y 23, donde la curva nombrada como blanco hace referencia a la degradación que se genera solo con los soportes sólidos sin biomasa fijada.



**Figura 50 Degradación de NaCN con biomasa inmovilizada en carbón activado. Sistema en lecho agitado**

300 ml de solución, 650 mg/l NaCN, 100g de soporte



**Figura 51 Degradación de NaCN con biomasa inmovilizada en zeolita. Sistema de lecho agitado**

300 ml de solución, 650 mg/l NaCN, 100g de soporte

Al trabajar con biomasa inmovilizada se tiene un incremento de la degradación de cianuro respecto a la que se produce en el blanco, siendo en el caso de biomasa en carbón activado donde se tiene la mayor degradación de cianuro, 89,3% en 24 hrs. La zeolita en cambio alcanza el 35,7% de degradación al mismo tiempo. Lo expuesto se puede ver en las figuras 22 y 23.

En la figura 22 se pueden distinguir dos etapas tanto en el blanco como en el reactor con biomasa inmovilizada; haciendo un cálculo de las velocidades de degradación para cada etapa se obtienen los resultados expuestos en la Tabla 38.

**Tabla 38 Resultados de ensayo de degradación de NaCN con biomasa inmovilizada en carbón activado**

Etapa		Reactor con biomasa inmovilizada	Blanco
	Período horas	Velocidad de degradación mg NaCN/h	
A	0 – 8	17,4	10,5
B	8 – 24	2,2	1,7
Relación carbón/líquido: 100g /300ml		Concentración inicial de NaCN: 650mg/l NaCN	

De esto modo se puede observar que en la degradación del NaCN existe el aporte tanto del soporte sólido, blanco, como de la biomasa inmovilizada para las etapas A y B.

**Tabla 39 Acción de los biomasa inmovilizada en carbón activado en la degradación de NaCN en lecho agitado**

Etapa		Degradación de biomasa fijada
	Período horas	Velocidad mg NaCN/h
A	0 – 8	6,9
B	8 – 24	0,5

Igualmente para el caso de la zeolita expuesto en la Tabla 40, se pueden distinguir dos etapas tanto en el blanco como en reactor con microorganismos inmovilizados, obteniéndose los siguientes resultados en lo referente a velocidad de degradación de cianuro.

**Tabla 40: Resultados de ensayo de degradación de NaCN con biomasa inmovilizada en zeolita**

Etapa		Reactor con biomasa inmovilizada	Blanco
	Período horas	Velocidad mg NaCN/h	
A	0 – 8	7,8	3,5
B	8 – 24	0,44	0,08

Relación zeolita/líquido: 100g/300 ml  
 Concentración inicial de NaCN: 650mg/l NaCN

De estos resultados se puede observar que hay un mayor aporte de la biomasa inmovilizada para degradación de cianuro respecto a la degradación producida solo por el soporte.

**Tabla 41: Acción de biomasa fijada en carbón activado en la degradación de NaCN en lecho agitado**

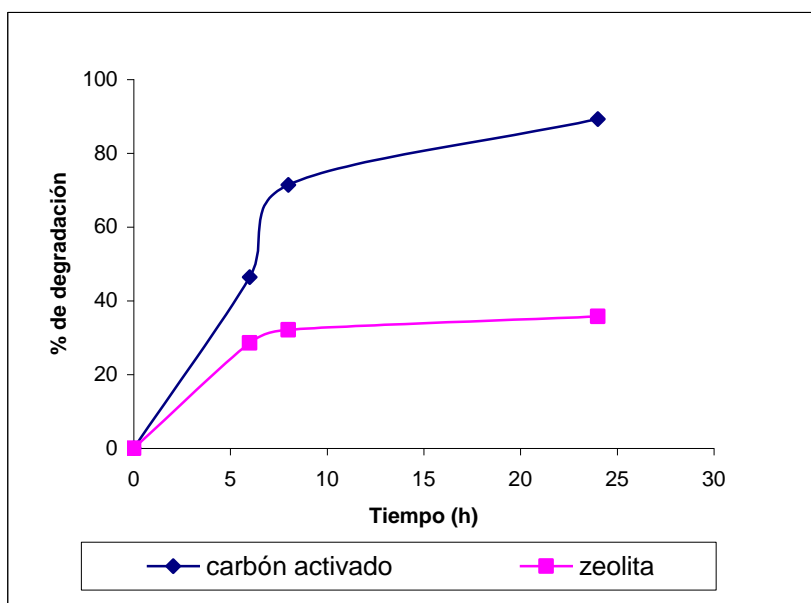
Etapa		Degradación de biomasa fijada
	Período horas	Velocidad mg NaCN/h
A	0 – 8	3,2
B	8 – 24	0,2

Al comparar la acción de la biomasa para degradar cianuro cuando está inmovilizada en carbón y en zeolita se puede observar que la velocidad de degradación de cianuro presenta valores de velocidad casi iguales en as dos etapas identificadas, de manera especial en la etapa a partir del día octavo; los valores constan en la Tabla 42. Sin embargo, si se analiza el efecto global de soporte y microorganismos, se tiene mejores resultados en el caso de carbón activado como se puede observar en la figura 24.



**Tabla 42: Comparación de la acción de la biomasa en carbón activado y zeolita en la degradación de NaCN**

Etapa		Velocidad	
		% NaCN degradado/h	
	Período horas	Carbón activado	Zeolita
A	0 – 8	3,57	2,23
B	8 – 24	0,22	0,18



**Figura 52 Comparación de la biodegradación con biomasa fijada en carbón activado y zeolita**

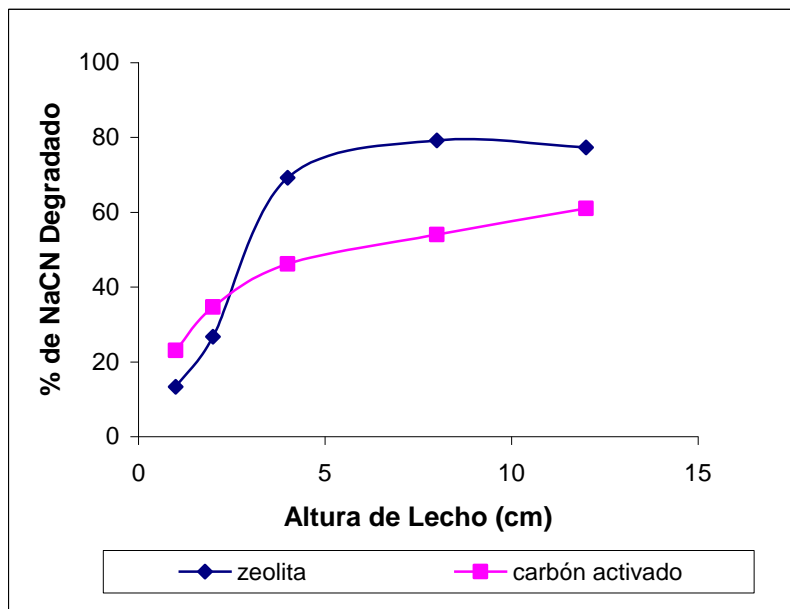
## **7.2.4. Evaluación de parámetros de operación para degradación de cianuro en sistemas en lecho fijo**

### **7.2.4.1. Influencia de altura de lecho en la degradación de cianuro**

Las variaciones de altura de lecho se realizan manteniendo un flujo de alimentación de 0,4 ml/min/cm<sup>2</sup>, diámetro de columna de 5 cm. y una concentración inicial de cianuro de 650 mg/l; el volumen tratado es de 400 ml.

Adicionalmente el soporte utilizado contiene biomasa inmovilizada, alrededor de  $10^6$  ufc/g.

De las pruebas realizadas con variación de altura de lecho se puede observar que tanto para la zeolita como para el carbón activado conteniendo biomasa inmovilizada, al aumentar la altura de lecho, aumenta el porcentaje de degradación de cianuro, corroborando el comportamiento propio de reactores de lecho fijo.



**Figura 53** Degradación de NaCN en función de altura de lecho del biofiltro

Se puede además apreciar que el aumento de la altura de lecho en el caso de biomasa inmovilizada en la zeolita permite un incremento en el porcentaje de degradación de cianuro mayor comparado con el biofiltro con carbón activado como soporte de la biomasa, así pues, cuando la altura de lecho es de 8 cm en el filtro de zeolita se tiene una degradación cercana al 80%, mientras que para el filtro de carbón activado con la misma altura se obtiene apenas un 54%.

Sin embargo, el aumento de altura de lecho, en el caso de zeolita tiene un límite, pues a partir de los 8 cm de altura, el porcentaje de degradación se mantiene aparentemente constante alrededor del 80%; esto en cambio no se puede observar para el carbón activado puesto que el porcentaje de degradación se incrementa proporcionalmente a la altura del lecho, llegando al a 61% con 12 cm de altura de lecho.

A las pruebas realizadas con soporte sólido sin biomasa inmovilizada se los denomina blancos, y se puede observar que para la zeolita y para el carbón activado con una altura de 4 cm, la degradación de cianuro es de 9% y del 20,7% respectivamente; con lo que se puede observar que para el caso de biomasa en zeolita en la Tabla 43.

**Tabla 43: Comparación de degradación de NaCN en biofiltros con soportes de zeolita y carbón activado**

Altura de lecho cm	% de Remoción NaCN		Velocidad de degradación mg/min	
	Zeolita	carbón activado	zeolita	carbón activado
1	13,3	23,0	0,7	1,2
2	26,7	34,6	1,4	1,8
4	69,2	46,2	3,5	2,4
<b>8</b>	<b>79,0</b>	<b>54,0</b>	4,0	2,8
12	76,4	61,0	3,9	3,1
Blanco: 4 cm	9,0	20,7	0,5	1,1
Flujo de alimentación: 0,4 ml/min/cm <sup>2</sup>				

En la Tabla 44 se puede observar que el descenso de biomasa inmovilizada es más acentuado en el caso del soporte de zeolita, en cambio para el caso de carbón activado, prácticamente se mantiene constante el conteo, incluso cuando el lecho sea de mayor altura. Esto nos indica que el carbón activado constituye un mejor soporte para la inmovilización de este tipo de biomasa.

**Tabla 44: Contaje en los soportes sólidos antes y después de la biofiltración**

Altura de lecho cm	Contaje en soporte ufc/g			
	Zeolita		carbón activado	
	Inicial	Final	inicial	Final
1	$6,0 \cdot 10^6$	$4,5 \cdot 10^4$	$1,67 \cdot 10^7$	$9,5 \cdot 10^6$
2	$2,8 \cdot 10^7$	$7,4 \cdot 10^5$	$1,6 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^6$
4	$6,8 \cdot 10^6$	$1,6 \times 10^5$	$5,3 \cdot 10^7$	$2,1 \cdot 10^6$
8	$3,0 \cdot 10^6$	$3,5 \cdot 10^4$	$8,9 \cdot 10^7$	$9,5 \cdot 10^7$
12	$7,3 \cdot 10^6$	$4,4 \cdot 10^4$	$4,1 \cdot 10^6$	$2,4 \cdot 10^6$

#### **7.2.4.2. Influencia del flujo de alimentación de la solución en la degradación de cianuro**

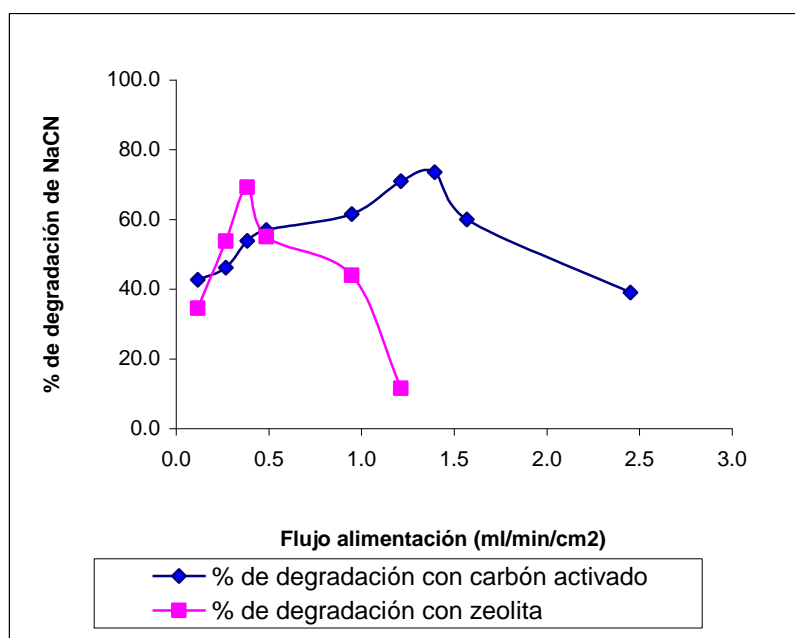
El volumen de solución con NaCN tratado en estas pruebas tanto para zeolita como para carbón activado fue de 400 ml, manteniendo una altura de lecho en los biofiltros de 4 cm y la concentración inicial de 650 mg/l de NaCN. Los resultados obtenidos de este estudio son expuestos en la

Tabla 45 y figura 26, donde se observa que con el biofiltro de carbón activado como soporte, se logra trabajar bien con flujos de alimentación mayores respecto a los flujos alcanzados con el biofiltro de zeolita.

Para el biofiltro de lecho con soporte de zeolita, el flujo máximo que se puede alcanzar es de  $0,4 \text{ ml/min/cm}^2$ , con este flujo el porcentaje de degradación de NaCN es de 69,2%, si se supera este valor de flujo a 0,5 disminuye el porcentaje de degradación al 55%. En cambio para el biofiltro de soporte de carbón activado se puede llegar a un flujo  $1,4 \text{ ml/min/cm}^2$  y alcanzar una degradación del 73,5%. En la figura 26 se puede observar de forma más clara la ubicación de estos puntos máximos para cada tipo de soporte.

**Tabla 45: Comparación de degradación de NaCN y conteo de microorganismos para biofiltros con carbón activado y zeolita con variación en el flujo de alimentación**

Flujo de alimentación	Biofiltro soporte carbón activado	Biofiltro soporte zeolita	Biofiltro de carbón activado		Biofiltro de zeolita	
ml/min/cm <sup>2</sup> 4cm de lecho	% degradación de NaCN		Contaje de microorganismo en el sólido ufc/g			
			inicial	final	inicial	final
0,1	42,7	34,5	1,65·10 <sup>8</sup>	2,24·10 <sup>5</sup>	6,16·10 <sup>5</sup>	9,77·10 <sup>7</sup>
0,3	46,2	53,8	8,45·10 <sup>6</sup>	6,56·10 <sup>5</sup>	5,26·10 <sup>7</sup>	2,08·10 <sup>6</sup>
<b>0,4</b>	53,9	<b>69,2</b>	6,80·10 <sup>6</sup>	1,60·10 <sup>5</sup>	5,30·10 <sup>7</sup>	2,10·10 <sup>6</sup>
0,5	57,0	55,0	9,30·10 <sup>6</sup>	3,95·10 <sup>5</sup>	2,21·10 <sup>5</sup>	5,87·10 <sup>5</sup>
0,9	61,5	44,0	3,02·10 <sup>5</sup>	3,45·10 <sup>3</sup>	5,87·10 <sup>5</sup>	3,14·10 <sup>3</sup>
1,2	71,0	11,5	7,80·10 <sup>7</sup>	2,40·10 <sup>3</sup>	3,14·10 <sup>5</sup>	2,01·10 <sup>3</sup>
<b>1,4</b>	<b>73,5</b>	-			2,60·10 <sup>5</sup>	6,92·10 <sup>5</sup>
1,6	60,0	-			3,51·10 <sup>7</sup>	1,20·10 <sup>4</sup>
2,5	39,0	-			7,14·10 <sup>5</sup>	8,30·10 <sup>3</sup>



**Figura 54 Degradación de NaCN en función de flujo de alimentación**

Considerando los flujos óptimos para cada soporte, se calcula la velocidad de degradación, los resultados son presentados en Tabla 46 y se puede observar claramente que la velocidad de degradación con biomasa inmovilizada en carbón activado es mucho más grande que en el caso de biomasa inmovilizada en zeolita.

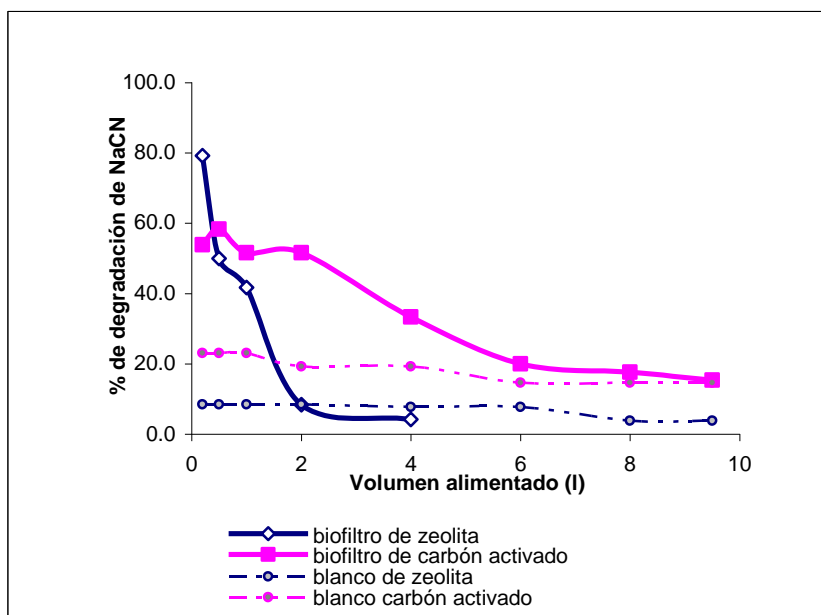
**Tabla 46: Velocidad de degradación en sistemas de lecho fijo con los flujos óptimos de alimentación**

Columna	Flujo óptimo ml/min/cm <sup>2</sup>	Velocidad de degradación
Carbón Activado	1,4	13,1
Zeolita	0,4	3,5

#### **7.2.4.3. Estabilidad de biomasa inmovilizada operando en el biofiltro**

Para estas pruebas se fija como flujo de alimentación los valores óptimos obtenidos para cada tipo de soporte, esto es: 0,4 ml/min/cm<sup>2</sup> para la zeolita y 1,4 ml/min/cm<sup>2</sup> para el carbón activado; en los dos casos se emplean columnas de 4 cm de altura de lecho y concentración de cianuro de 600 mg/l en la solución.

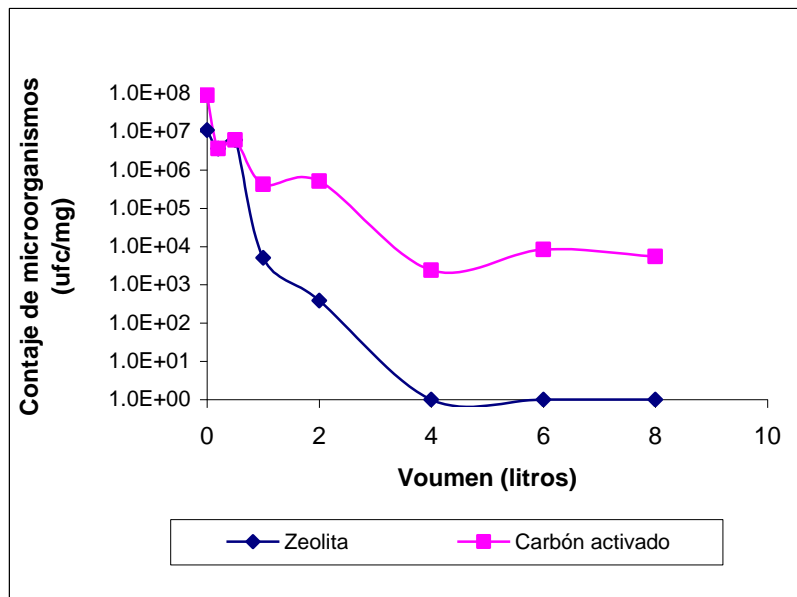
De los resultados obtenidos, se observa que para los dos tipos de soporte se tiene una disminución de la degradación de cianuro; siendo más drástica para el caso del biofiltro con soporte de zeolita, en el cual para tratar cuatro litros de solución, la degradación es prácticamente nula, como se puede observar en la Figura 55.



**Figura 55 Curva de agotamiento para biofiltros de zeolita y carbón activado**  
 Concentración de NaCN: 600 mg/l

En el caso del biofiltro con soporte de carbón activado la disminución de la eficiencia es menor, soportando el paso de cuatro litros con una degradación de 33,3%, con el blanco en este caso tiene una degradación del 20,7%.

Si se analiza la estabilidad de la fijación de la biomasa mediante el conteo de microorganismos se puede ver en la Figura 56, que con soporte de zeolita al pasar los cuatro litros de solución prácticamente se ha desprendido toda la biomasa, mientras que en el caso de carbón activado como soporte luego de pasar 9,5 litros de solución aún hay presencia de microorganismos, los contajes de microorganismos en el sólido presentan valores entre  $1 \cdot 10^2$  y  $1 \cdot 10^3$  ufc/g.



**Figura 56 Contaje de microorganismos respecto al volumen de solución tratada**

### **7.2.5. Degradación de cianuro en una solución procedente de proceso de cianuración**

Para estas pruebas de biodegradación se tomó solución resultante de un proceso de cianuración de mineral de Pacto, la cual contenía 650 mg/l de cianuro libre.

Dado que el soporte de carbón presentó mayor estabilidad en la fijación de microorganismos, se utilizó este con las condiciones óptimas de operación: flujo óptimo 1,4 m l/min/cm<sup>2</sup> y altura de lecho de 8 cm.



**Tabla 47 Resultados de tratamiento de efluente de cianuración con biofiltro de carbón activado**

	Concentración mg/l			% de Degradación NaCN	
	Inicial	Final en biofiltro carbón	Final en blanco		
				Biofiltro carbón	Blanco
NaCN libre	650	450	555	30,8	14,6

Se puede observar que el efecto de la presencia de otros elementos baja de manera considerable el porcentaje de degradación de cianuro, pues cuando se tiene solución preparada se alcanzan niveles de 70% de degradación en este caso se tiene en cambio un 30,8%, de los cuales el 14,6% corresponden a la acción del soporte y 16,2% a la acción microbiana.

## 8. Diseño de biofiltro

### 8.1. Selección de soporte

Los resultados de las pruebas de degradación de cianuro con los biofiltros de zeolita y carbón activado muestran que se pueden alcanzar porcentajes de degradación similares pero a condiciones diferentes de operación. Así, empleando zeolita se logra una degradación del 69,2% con un flujo de 0,4 ml/min/cm<sup>2</sup> y empleando carbón activado se alcanza el 73,5% de degradación con un flujo de 1,4 ml/min/cm<sup>2</sup>.

El incremento de flujo de alimentación en el caso del lecho con carbón activado con biomasa inmovilizada permite trabajar con una altura menor de lecho. La Tabla 48 muestra los resultados obtenidos en las pruebas realizadas en biofiltros de carbón activado y zeolita considerando variación en el flujo de alimentación.

**Tabla 48: Comparación de la degradación de cianuro en biofiltros de zeolita y carbón activado al variar el flujo de alimentación**

<b>Soporte</b>	<b>Altura de Lecho cm</b>	<b>Flujo ml/min/cm<sup>2</sup></b>	<b>% degradación NaCN</b>
Zeolita	4	0,4	69,2
	4	1,4	< 11,5
Carbón Activado	4	0,4	53,9
	4	1,4	73,5
Volumen tratado: 400 ml			

Adicionalmente, la capacidad de degradación que muestran los microorganismos inmovilizados en zeolita no es estable, puesto que la alcanzada a las condiciones óptimas de flujo, con 4 cm de altura de lecho y 0,4 ml/min/cm<sup>2</sup>, al tratar dos litros de solución ya no se tiene acción de los microorganismos porque el conteo baja a menos de  $1 \cdot 10^3$  ufc/g según la figura 28.

En cambio el volumen que se puede tratar con el biofiltro de carbón activado es de 6 litros, prácticamente tres veces el volumen tratado con el biofiltro de zeolita, manteniéndose la biomasa fijada en un valor alrededor de  $1 \cdot 10^4$  ufc/g según se constata en la figura 28.

Por todo lo expuesto, el material adecuado para trabajar en los biofiltros para degradación de NaCN es el carbón activado cuando el flujo es alto, en cambio para flujos bajos es preferible la zeolita.

## 8.2. Parámetros de operación de biofiltro

**Tabla 49 Parámetro de operación para biofiltro**

Parámetro	Carbón activado	Zeolita
Diámetro de columna (cm)	5	5
Altura de Lecho (cm)	> 4	> 4
Flujo de Alimentación (ml/min/cm <sup>2</sup> )	1, 4	0,4
Concentración de microorganismos en soporte (ufc/g)	1•10 <sup>8</sup>	1•10 <sup>6</sup>
Masa de soporte (para altura de 4 cm) (g)	42,7	57.6
pH	10,5	10.5
Concentración máx de NaCN (650 mg/l)	650	650
% de degradación máximo	73.5	69.2
Volumen máximo de solución a tratar (40% de degradación) en litros	1	3.3

El volumen máximo de solución a tratar se obtiene de interpolación de los datos de la curva de agotamiento para biofiltros de zeolita y carbón activado, presentados en la figura 27.

## 9. Conclusiones

En las condiciones estudiadas, fue posible aislar microorganismos autótrofos a partir de relaves de cianuración de la planta de Liga de Oro zona minera de Ponce Enríquez, biomasa que fue adaptada en medio acuoso con concentraciones de cianuro hasta 500 mg/l.

Al evaluarse la capacidad degradadora de la biomasa adaptada a cianuro en lecho agitado se obtiene que en 10 días se degrada un 55% del cianuro contenido en 500 ml de solución de 500 mg/l, es decir que tiene una tasa de degradación de 14,2 mg de NaCN/día, comparado con el blanco que es de 6,4 mg de NaCN/día, lo que nos muestra que los 7,8 mg de NaCN/día son degradados por los microorganismos.

Al utilizar el proceso de inmovilización por contacto de soporte sólido con la biomasa en medio de cultivo líquido, se obtiene la fijación de población de hasta  $1 \cdot 10^8$  ufc/gr en soporte de carbón activado y en zeolita  $8,4 \cdot 10^5$  ufc/g.

Los microorganismos fijados en los soportes sólidos presentan buenos resultados de adaptación a mayores concentraciones de cianuro en la solución, esto es 650 y 700 mg/l que como se puede ver en el caso del carbón activado su presencia es estable, llegando incluso hasta  $1,4 \cdot 10^7$  ufc/g en los 20 días analizados en concentración de NaCN de 700 mg/l

En el caso de la zeolita como soporte, el incremento en la concentración de cianuro de la solución influye negativamente, puesto que su número disminuye hasta alrededor de  $2,8 \cdot 10^4 - 5,4 \cdot 10^3$  ufc/g.

Las pruebas de estabilidad de la fijación de microorganismos en los soportes estudiados, mediante paso continuo de una solución de 650 mg/l de cianuro,

muestran que la biomasa fijada en el carbón activado es mucho más estable que la fijada en zeolita.

En carbón activado luego de pasar 9,5 litros de solución todavía contiene alrededor de  $1 \cdot 10^2$  ufc/g, en cambio en zeolita al pasar 2 litros se tienen  $1 \cdot 10^3$  ufc/g.

La estabilidad de la biomasa en los soportes influye directamente sobre el porcentaje de degradación, siendo notorio en la zeolita que al pasar 2 litros de solución la degradación es alrededor de 8,3%, valor muy similar al del blanco.

La velocidad de degradación con microorganismos inmovilizados en carbón activado en un sistema de lecho agitado con soluciones de 650 mg/l de cianuro en carbón activado es de 24,8 mg NaCN/día, y de 36,1 mg NaCN/día en soluciones de 700 mg/l, cuando se utiliza microorganismos inmovilizados en zeolita la velocidad de degradación es de 13,0 mg NaCN/día y 9,5 mg NaCN/día a 650 y 700 mg/l respectivamente valores que son mayores a la velocidad de degradación de la biomasa libre. Esto se explica por la mayor cantidad de microorganismos que se inmovilizan en el carbón activado y la mejor estabilidad que presentan en este soporte.

El uso de columnas empacadas con los soportes conteniendo microorganismos inmovilizados incrementa considerablemente la eficiencia de degradación del cianuro presente en la solución tratada, comparado con procesos en lecho agitado sea con biomasa libre o inmovilizada.

Para el caso de columnas con lecho de zeolita con biomasa inmovilizada, al aumentar la velocidad de flujo de alimentación se produce una disminución del porcentaje de cianuro degradado como consecuencia de la disminución de biomasa en el sólido al emplear flujos altos. En cambio para el carbón activado el incremento del flujo de alimentación incrementa el porcentaje de degradación,

hasta un valor máximo, el mismo que puede ser mejorado con incremento de la altura de lecho.

Los mejores resultados con cada uno de los dos soportes se obtienen en las siguientes condiciones:

- Columnas con un lecho de zeolita de 8 cm de altura, 5 cm de diámetro conteniendo microorganismos fijados, al pasar 250 ml de solución conteniendo 650 mg/l de cianuro con un flujo de  $0,4 \text{ ml/min/cm}^2$  se degrada el 79% del mismo, restando la degradación producida por acción de la zeolita pura (9%) representa una rata degradación de 3,6 mg/min.
- Para el caso de columnas con lecho de carbón activado de 4 cm de altura conteniendo microorganismos fijados, al pasar 250 ml de solución conteniendo 650 mg/l de cianuro con un flujo de  $1,4 \text{ ml/min/cm}^2$ , se degrada el 73,5 % del mismo, restando la degradación producida por acción del carbón activado puro (23,1%) representa una rata de degradación de 9,0 mg/min.

Estos resultados muestran que cuando se utiliza como soporte el carbón activado, la degradación del cianuro es mas eficiente que al utilizar zeolita como soporte, debido especialmente a la posibilidad que este material presta para una mejor fijación de la biomasa estudiada.

El uso de la biomasa fijada en carbón activado como soporte, para la degradación de efluentes provenientes de un proceso de cianuración muestra que la presencia de varios elementos, baja considerablemente la eficiencia de la degradación de cianuro, se debe tener en cuenta que especialmente la presencia de metales pesados como cobre, plomo y zinc pueden influir notablemente en el comportamiento de la biomasa.

## 10. Bibliografía



## BIBLIOGRAFÍA

---

- <sup>1</sup> Guerrero J., 2004, *Cianuro: Toxicidad y Destrucción Biológica Consultoría en Biotecnología Minera y Ambiental Minera*, consultado noviembre 2005.
- <sup>2</sup> Tulas, Libro VI Anexo 1, *Norma de Calidad Ambiental y de Descarga de Efluentes : Recurso Agua, Tabla 2*, Ley de Gestión Ambiental Distrito Metropolitano de Quito.
- <sup>3</sup> Tulas, Libro VI Anexo 1, *Norma de calidad ambiental y de descarga de efluentes: Recurso agua, Tabla 3*, Ley de Gestión Ambiental Distrito Metropolitano de Quito.
- <sup>4</sup> Marsden J., 1992, *The Chemistry of gold extraction*, Series in Metals and Associated Materials, England.
- <sup>5</sup> Diaz Y., 1999, *Estudio de la bidegradación de soluciones cianuradas*, Escuela Politécnica de Chimborazo, Tesis de Maestría, Riobamba – Ecuador.
- <sup>6</sup> Caizaguano R., 1999, *Bio-Remediación de efluentes y relaves cianurados*, Escuela Politécnica Nacional, Tesis de Ingeniería, Quito – Ecuador.
- <sup>7</sup> Compendio Artículos, 2002, *Enzimología industrial*, Paper Biotecnología de las Enzimas, DECAB, Escuela Politécnica Nacional, Quito – Ecuador.
- <sup>8</sup> Arroyo M., 2002, *Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones*, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid 28040 Madrid.
- <sup>9</sup> Torres D., et. al., 2003, *Avances en biotecnología ambiental: Tratamiento de residuos Líquidos y sólidos*, Archivos de Ingeniería Bioquímica, Volumen II,

---

Ediciones Universitarias de Valparaíso Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Chile.

- <sup>10</sup> Rivera S., Martínez J., 2002, *Biorremediación: un camino en la prevención y atención al daño del ambiente*, Instituto De Investigaciones Biológicas, Universidad Veracruzana, Méjico
- <sup>11</sup> Smith A., Mudder T., 1991, *Chemistry and treatment of cyanidation wastes*, Mining Journal Books, London.
- <sup>12</sup> Ávila M, 2000, *Biodegradación de contaminantes*, Departamento de Metalurgia Extractiva, Escuela Politécnica Nacional, Quito – Ecuador.
- <sup>13</sup> Ávila M., 1991, *Guías de prácticas de boirremediación*, Demex- Escuela Politécnica Nacional, Quito - Ecuador .
- <sup>14</sup> <http://www.gestion-ambiental.com/article>, 2006, Ecomei, división medio ambiente.
- <sup>15</sup> Rolf M., 2006, *Compuestos orgánicos manjar de microbios*, [www.eez.csic.es](http://www.eez.csic.es)
- <sup>16</sup> Sinisterra J., et al., 2004, *¿Qué es la biofiltración?*, Instituto Nacional de Ecología, Méjico, [www.estrucplan.com](http://www.estrucplan.com).
- <sup>17</sup> Levin M., Morris A., 1987, *Biotratamiento de residuos tóxicos y peligrosos: selección, estimación, modificación de microorganismos y aplicaciones*, Gealt, Escuela Militar de Ingeniería, BV-MAJ, Madrid – España.
- <sup>18</sup> Alvarez M., 1995, *Manual de técnicas en microbiología*, Graficart Cia. Ltda., Quito Ecuador.
- <sup>19</sup> Rivera S., Martínez J., 2002, *Biorremediación: un camino en la prevención y atención al daño del ambiente*, Instituto De Investigaciones Biológicas, Universidad Veracruzana, Méjico.

- 
- <sup>20</sup> Steciow M., 2006, *Biorremediación*, [www.cricyt.edu.ar/enciclopedia/](http://www.cricyt.edu.ar/enciclopedia/)
- <sup>21</sup> Guerrero J, 2004, El Ingeniero de Minas, *Consultoría en biotecnología minera y ambiental minera cianuro: toxicidad y destrucción biológica*, Año X, N° 35.
- <sup>22</sup> Kunz D., et al., 1996, *Generation of a proton motive force by the anaerobic oxalate – degrading bacterium oxolobacter formigenes*, App-Environ – Microbiology
- <sup>23</sup> Harris et al., 1993, *Microbiology letters, the conversion of cyanide to ammonia by extracts of pseudomonas fluorescens that utilizes cyanide as a source of nitrogen for growth*, FEMS, Vol. 20.
- <sup>24</sup> Harris R., Knowles C., 1993, *Isolation and growth of a pseudomonas sp that utilizes cyanide as a source of nitrogen*, Journal General Microbiology, Vol 129.
- <sup>25</sup> Jorge L. Castillo T., 2001, *Tinciones, Bacillus cereus, características*, Chile, monografias/biologia/.
- <sup>26</sup> Hocking A., Arnold G., Jenson, I., Newton, 2004, *Bacillus cereus and other bacillus species. in: foodborne microorganisms of public health importance*, 5th Edition, [www.nzfsa.govt.nz/science/ data-sheets/bacillus-cereus.pdf](http://www.nzfsa.govt.nz/science/data-sheets/bacillus-cereus.pdf).
- <sup>27</sup> Oscáriz J., 2002, *Biochemical and genetic characterization of cerein 7 and cerein 8, two novel bacteriocins produced by bacillus cereus bc7, isolated from a soil*, Universidad Pública de Navarra, España, [www.unavarra.es](http://www.unavarra.es).
- <sup>28</sup> Jorge L. Castillo T., 2001, *Tinciones, bacillus subtilis, características*, Chile, monografias/biologia.com.
- <sup>29</sup> [www.pubmed.gov](http://www.pubmed.gov), 2006, *Crystal structure of the alkaline proteinase Savinase from Bacillus lentus*, at 1.4 Å resolution.

- 
- <sup>30</sup> Compendio Artículos, 2002, *Enzimología industrial, paper biotecnología de las enzimas*, DECAB, Escuela Politécnica Nacional, Quito – Ecuador.
- <sup>31</sup> Alvarez M., 1995, *Manual de técnicas en microbiología*, Graficart Cia. Ltda., Quito Ecuador.
- <sup>32</sup> Compendio Artículos, 2002, *Biotecnología de las enzimas, principios de la inmovilización de enzimas*, DECAB, Escuela Politécnica Nacional, Quito – Ecuador.
- <sup>33</sup> Perry J., *Manual del ingeniero químico, cinética de las reacciones y diseño de Reactores*, capítulo 4 – 22.
- <sup>34</sup> Arboleda J., Rendon A., 2000, *Teoría y práctica de la purificación del agua*, Tomo II, Tercera edición, Mc Graw Hill.
- <sup>35</sup> Serrano C., Ruiz A, 2005-02006, *Utilización de hidrogeles para inmovilización de microorganismos para mejorar el desempeño de las plantas de tratamiento de aguas residuales*, Escuela de Ingenierías, Universidad Iberoamericana, Ciudad de Mexico.
- <sup>36</sup> Chamy R., et al., 2003, *Avances en biotecnología ambiental: tratamiento de residuos líquidos y sólidos*, Ediciones Universitarias de Valparaíso. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, [www.euv.cl](http://www.euv.cl).
- <sup>37</sup> Cheetham P, 2001, *Physical Studies on Cell Immobilization Using Calcium Alginate Gels*, Compendio Artículos DECAB, Escuela Politécnica Nacional, Quito – Ecuador.
- <sup>38</sup> Díaz F., Giraldo E., 2005, *Optimización de los sistemas de humedales artificiales de flujo vertical por medio de biofiltros*, Centro de Investigaciones en Ingeniería Ambiental, Universidad de los Andes, Bogotá – Colombia.

- 
- <sup>39</sup>Thalasso F., Pineda R., 1999, *Biofiltración: tratamiento biológico de aire contaminado*, XXX Aniversario de Biotecnología y Bioingeniería, Avance y Perspectiva, vol. 21.
- <sup>40</sup> Ferraz,N., Manta, C., Batista-Viera, 2005, *Biotransformación de esteroides por catálisis enzimática en fase sólida*, Cátedra de Bioquímica, Facultad de Química. Universidad de la República. Montevideo, Uruguay
- <sup>41</sup> Subas B., Karkare, 2003, *Immobilized microbial and animal cells as enzyme reactors*, Biotecnología, Universidad de Oviedo – España, <http://www10.uniovi.es/prestige/>.
- <sup>42</sup>Compendio Artículos, 2002, *Células INmovilizadas*, DECAB, Escuela Politécnica Nacional, Quito – Ecuador.
- <sup>43</sup>Kart S., et al, *Biodegradation of phenol and cresol isomer mixtures by arthorobacter*, World Journal of Microbiology & Biotechnology. Vol 13
- <sup>44</sup>Heras A., , 2005 – 2006, *Inmovilización de microorganismos*, Departamento de Química y Farmacia, OTRI, Universidad Complutense de Madrid, [www.ucm.es/info/otri/complutecno/](http://www.ucm.es/info/otri/complutecno/).
- <sup>45</sup>Memorias, 2000, *curso teórico práctico beneficio del oro y tratamiento de efluentes*, Departamento de Metalurgia Extractiva, Escuela Politécnica Nacional, Quito - Ecuador
- <sup>46</sup>Fiestas J.,1990, *Procedimiento de inmovilización de microorganismos acuáticos en presencia de silicatos fibrosos y laminares*, Consejo Superior Investigaciones Científicas, Serrano 117, 28006 Madrid, España.
- <sup>47</sup>Llama M., 2006, *Inmovilización de microorganismos degradadores de hidrocarburos en soportes poliméricos adhesivos y biodegradables*, Programa

---

de Intervención Científica Universidad de Vigo y Ministerio de Educación y Ciencia, España.

<sup>48</sup>Martín M., 2006, *Sistemas biológicos de descontaminación de suelos y aguas*, Medio Ambiente, OTRI, Universidad Complutense de Madrid.

<sup>49</sup>Said N., Barrios S., Et. al, 2005, *Módulos experimentales interactivos en biotecnología*, Enseñanza de las Ciencias VII Congreso, Universidad Metropolitana de Ciencias de la Educación, Santiago -Chile.

<sup>50</sup>Instituto Nacional De Ecología, 2004, *Biofiltración de gases*, artículo, Biofiltración, Tema: Efluentes, Méjico, [www.estrucplan.com.ar](http://www.estrucplan.com.ar).

<sup>51</sup> Arboleda J., Rendon A., 2000, *Teoría y práctica de la purificación del agua*, Tomo II, Tercera edición, Mc Graw Hill.

<sup>52</sup>Fernández D., et. al, 2001, *Inmovilización de bacterias depuradoras de contaminantes en hidrogeles obtenidos por radiaciones ionizantes*, Comisión Nacional de Energía Atómica, Argentina.

<sup>53</sup>Adsorción/Carbón activo, Lenntech, 2006, [www.lenntech.com/espanol/adsorcion.htm](http://www.lenntech.com/espanol/adsorcion.htm)

<sup>54</sup> Menéndez J, 2006, *El carbón activado en la vida cotidiana* <http://www.oviedo.es/personales/carbon/index.htm>

<sup>55</sup>*El carbón activo como adsorbente*, 2006, <http://www.textoscientificos.com/quimica/carbon-activo/adsorbente>

<sup>56</sup>*Activated Carbon From Coconut*, 2005, <http://usuarios.lycos.es/activatedcarbon/>

---

<sup>57</sup> Durán A, 2005, *Depuración de efluentes industriales acuosos con sistemas de carbón activado asistidos biológicamente*, PEMEX Gas y Petroquímica, DF Mexico

<sup>58</sup> Zeolitas, Inorgánica - APQ119C, 2006, [www.fisicanet.com](http://www.fisicanet.com)

<sup>59</sup> Higuera P., Oyarzun R., 2006, *Mineralogía y geoquímica ambiental: España, Introducción al curso*, [http://www.uclm.es/users/higuera/MGA/Tema00\\_Intro.htm](http://www.uclm.es/users/higuera/MGA/Tema00_Intro.htm)

<sup>60</sup> Ávila M., 2000, *Hojas Guías de Prácticas de Microbiología*, Escuela Politécnica Nacional, Quito – Ecuador.

<sup>61</sup> León C.; 1968, EPN