



**Universidad Autónoma de San Luis Potosí**

**Facultad de Ingeniería**

**Centro de Investigación y Estudios de Posgrado**

**Biodegradación de cianuro empleando consorcios  
microbianos alcalófilos aislados de patios de lixiviación de  
oro y plata**

**T E S I S**

Que para obtener el grado de:

Maestría en Ingeniería de Minerales

Presenta:

I.A. Alonso De la Garza Varela

Asesor. Dr. Roberto Briones Gallardo

Co-Asesor. Dra. María de Lourdes Berenice Celis García

San Luis Potosí, S. L. P.

Mayo, 2018







Universidad Autónoma de San Luis Potosí  
Facultad de Ingeniería  
Centro de Investigación y Estudios de Posgrado

**Biodegradación de cianuro empleando consorcios  
microbianos alcalófilos aislados de patios de lixiviación de  
oro y plata**

**T E S I S**

Que para obtener el grado de:  
Maestría en Ingeniería de Minerales

Presenta:

I.A. Alonso De la Garza Varela

Asesor: Dr. Roberto Briones Gallardo

Co-Asesor: Dra. María de Lourdes Berenice Celis García

Sinodales

Dr. Roberto Briones Gallardo

\_\_\_\_\_

Dra. María de Lourdes Berenice Celis García

\_\_\_\_\_

Dra. María Isabel Lázaro Baéz

\_\_\_\_\_

M.C. Ana María González Amaro

\_\_\_\_\_

Dr. Javier Aguilar Carrillo de Albornoz

\_\_\_\_\_

San Luis Potosí, S. L. P.

Mayo, 2018









## **CRÉDITOS INSTITUCIONALES**

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Remediación Ambiental del Instituto de Metalurgia de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí en conjunto con el Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C. bajo la dirección del Dr. Roberto Briones Gallardo y la Dra. María de Lourdes Berenice Celis García.

El autor agradece especialmente al Laboratorio de Análisis Ambiental del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C. y al M.C. Guillermo Vidriales Escobar por el apoyo y las facilidades otorgadas para realizar las mediciones en el equipo de electroforesis capilar.

Finalmente, el autor agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico recibido durante el programa de posgrado bajo el número CVU/Becario: 662740





## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres por apoyarme en todo momento, por los valores que me han inculcado, y por haberme dado la oportunidad de tener educación en el transcurso de mi vida.

A la Universidad Autónoma de San Luis Potosí por darme la oportunidad de estudiar la licenciatura y maestría dentro de sus programas académicos.

A mis profesores durante toda mi carrera profesional y maestría, porque todos han contribuido a mi formación.

Al Dr. Roberto Briones Gallardo y a la Dra. María de Lourdes Berenice Celis García por todo el apoyo, asesoría y conocimiento brindado durante la realización de esta tesis.

A mis revisores de tesis por sus comentarios durante la revisión del presente trabajo.

A mis compañeros de trabajo y amigos que me brindaron su amistad y apoyo.

A todas las personas que de una forma u otra me apoyaron durante la realización de este trabajo.



27 de abril de 2017

**ING. ALONSO DE LA GARZA VARELA  
P R E S E N T E.**

En atención a su solicitud de Temario, presentada por los **Dres. Roberto Briones Gallardo y María de Lourdes Berenice Celis García**, Asesor y Co-asesora de la Tesis que desarrollará Usted con el objeto de obtener el Grado de **Maestro en Ingeniería de Minerales**, me es grato comunicarle que en la Sesión del H. Consejo Técnico Consultivo celebrada el día 27 de abril del presente, fue aprobado el Temario propuesto:

**TEMARIO:**

**"Biodegradación de cianuro empleando consorcios microbianos alcalófilos aislados de patios de lixiviación de oro y plata"**

Resumen.

Introducción.

1. Problemática ambiental de especies de cianuro: Aspectos fisicoquímicos y toxicológicos
2. Aspectos microbiológicos relacionados a la biodegradación de cianuro y a otras fuentes de nitrógeno
3. Materiales y métodos para evaluar las cinéticas de biodegradación de cianuro
4. Resultados y discusión sobre la biodegradación de cianuro

Conclusiones

Referencias

**"MODOS ET CUNCTARUM RERUM MENSURAS AUDEBO"**

**A T E N T A M E N T E**

**M. I. JORGE ALBERTO PÉREZ GONZÁLEZ  
DIRECTOR.**



DE SAN LUIS POTOSÍ  
FACULTAD DE INGENIERÍA  
DIRECCION



**FACULTAD DE  
INGENIERÍA**

Av. Manuel Nava 8  
Zona Universitaria • CP 78290  
San Luis Potosí, S.L.P.  
tel. (444) 826 2330 al39  
fax (444) 826 2336  
www.uaslp.mx

Copia. Archivo.  
\*etn.



## Resumen

Esta tesis consistió en evaluar la actividad biodegradadora de cianuro ( $\text{CN}^-$ ) mediante consorcios microbianos alcalófilos aislados de un patio de lixiviación de oro y plata, con la finalidad de presentar información para el posible diseño de una estrategia de bioremediación de cianuro “in situ” y explicar los procesos biológicos por los cuales existen pérdidas de cianuro y acidificación de las soluciones lixiviantes durante el proceso hidrometalúrgico de lixiviación de oro y plata.

Se realizaron estudios cinéticos de biodegradación de cianuro y de los aspectos metabólicos asociados a la utilización de carbono y nitrógeno. Los consorcios se cultivaron en modo lote bajo condiciones alcalinas ( $\text{pH}=10.5$ ), en condiciones aerobias y anóxicas, utilizando lactato de sodio como donador de electrones. La biodegradación de cianuro se estudió bajo los siguientes esquemas: 1) variación de la transferencia de oxígeno: anóxico (sin agitación), limitado por transferencia de oxígeno con sistemas sin agitación, y óxico con agitación orbital a 150 y 370 rpm; 2) variación del tipo de fuente de nitrógeno (individuales y combinadas equimolarmente) como: nitrógeno amoniacal ( $\text{N-NH}_3$ , de fácil asimilación), nitrógeno de cianuro ( $\text{N-CN}^-$ , de asimilación intermedia) y nitrógeno en nitratos ( $\text{N-NO}_3^-$ , de baja asimilación).

Las variaciones en el suministro de oxígeno permitieron establecer los coeficientes de transferencia de oxígeno donde se alcanza la biodegradación en el menor tiempo posible. Se encontró que la biodegradación de cianuro puede ocurrir bajo condiciones aerobias, hasta las concentraciones establecidas en la NOM-001-SEMARNAT-1996 ( $1 \text{ mg CN}^- \text{ L}^{-1}$ ), en los escenarios: 1) sin transferencia de oxígeno por medios convectivos en 166 horas; 2) con un coeficiente de transferencia de oxígeno de  $0.85 \text{ h}^{-1}$  en 46.5 h y 3) con un coeficiente de transferencia de oxígeno de  $5.2 \text{ h}^{-1}$  en 46.5 h. En condiciones anóxicas, la concentración mínima que se alcanzó en el sistema solamente fue de  $9.5 \text{ mg L}^{-1}$ .

La adición conjunta de una fuente de nitrógeno alterna al cianuro ( $\text{N-NH}_3$ , o  $\text{N-NO}_3^-$ ) se vio reflejada en: un mayor consumo de sustrato orgánico, mayores concentraciones de oxígeno consumido, ácidos orgánicos producidos (acidificación) y biomasa sintetizada. Un incremento en la concentración de biomasa dentro de los terreros de lixiviación se traduciría también en mayores concentraciones de cianuro consumido.

Los productos metabólicos de biodegradación de cianuro fueron formamida ( $\text{HCONH}_2$ ) y cianato ( $\text{CNO}^-$ ). La oxidación de cianuro a cianato se favoreció en los escenarios de mayor transferencia de oxígeno. El cianato es ~1000 veces menos tóxico que el cianuro.



# Índice

Resumen.....	vii
Índice.....	ix
Índice de Figuras.....	xiii
Índice de Tablas.....	xv
Nomenclatura.....	xvii
Introducción.....	1
Capítulo I. Problemática ambiental de especies de cianuro: Aspectos fisicoquímicos y toxicológicos.....	11
I.1 Cianuro: especiación y toxicidad.....	11
<b>I.1.1 Formas acuosas</b> .....	11
<b>I.1.2 Formas sólidas de cianuro</b> .....	14
Capítulo II. Aspectos microbiológicos relacionados a la biodegradación de cianuro y otras fuentes de nitrógeno.....	17
II.1 Aspectos básicos microbiológicos.....	17
<b>II.1.1 Composición típica de una célula procarionte</b> .....	17
<b>II.1.2 Metabolismo microbiano</b> .....	19
<b>II.1.3 Clasificación de microorganismos según el pH ambiental</b> .....	23
II.2. Microorganismos alcalófilos.....	23
<b>II.2.1 Catabolismo y particularidades metabólicas de los microorganismos alcalófilos</b> .....	25
II.3 Fases de crecimiento microbiano y ajustes al modelo de Gompertz.....	27
II.4 Biodegradación de cianuro y cianato.....	30
<b>II.4.1 Rutas metabólicas de biodegradación de cianuro</b> .....	31
<b>II.4.2 Biodegradación aerobia de cianuro</b> .....	35
<b>II.4.3 Biodegradación anóxica de cianuro</b> .....	39
<b>II.4.4 Biodegradación aerobia de cianato</b> .....	41
<b>II.4.5 Tecnologías de tratamiento microbiológico de cianuro</b> .....	44
Capítulo III. Materiales y métodos para evaluar las cinéticas de biodegradación de cianuro.....	47
III.1 Determinación de los coeficientes de transferencia de oxígeno disuelto (aire-agua). Sistemas abióticos.....	48
III.2 Aislamiento, cultivo y preservación de microorganismos aerobios degradadores de cianuro a escala laboratorio.....	49

III.3 Selección y modificación de medios de cultivo.....	51
III.4 Determinación de parámetros fisicoquímicos, compuestos asociados a la degradación bacteriana y cálculo de parámetros cinéticos.....	54
III.5 Biodegradación de cianuro como única fuente de nitrógeno.....	60
III.6 Biodegradación de nitrato ó amoniaco como única fuente de nitrógeno.....	62
III.7 Biodegradación de cianuro y amoniaco como fuentes alternas de nitrógeno .....	62
III.8 Biodegradación de cianuro y nitrato como fuentes alternas de nitrógeno.....	63
III.9 Ajustes al modelo de Gompertz.....	63
III.10 Equivalentes de electrones .....	64
III.11 Análisis estadístico .....	65
Capítulo IV. Resultados y discusión sobre la biodegradación de cianuro.....	67
IV.1 Cinéticas de saturación de oxígeno y cálculo de coeficientes volumétricos de transferencia de masa de oxígeno en sistemas abióticos .....	67
IV.2 Cinéticas de biodegradación de cianuro y evolución de parámetros asociados, utilizando ion cianuro como única fuente de nitrógeno.....	69
<b>IV.2.1 Biodegradación de cianuro y producción de biomasa .....</b>	<b>69</b>
<b>IV.2.2 Productos de biodegradación de cianuro y balance de nitrógeno .....</b>	<b>75</b>
<b>IV.2.3 Balance de carbono y control de pH.....</b>	<b>82</b>
<b>IV.2.4 Velocidades de utilización de oxígeno disuelto .....</b>	<b>89</b>
<b>IV.2.5 Discusión.....</b>	<b>91</b>
IV.3 Cinéticas de biodegradación y evolución de parámetros asociados empleando amoniaco y nitrato como fuentes únicas de nitrógeno, con agitación a 150 rpm.....	95
<b>IV.3.1 Biodegradación de amoniaco y nitrato y producciones de biomasa ajustados al modelo de Gompertz.....</b>	<b>95</b>
<b>IV.3.2 Balance de carbono y control de pH.....</b>	<b>98</b>
<b>IV.3.3 Velocidades de utilización de oxígeno disuelto (OUR) .....</b>	<b>100</b>
<b>IV.3.4 Discusión.....</b>	<b>102</b>
IV.4 Cinéticas de biodegradación y evolución de parámetros, utilizando amoniaco y nitrato como fuentes alternas de nitrógeno; efecto de la transferencia de oxígeno en la biodegradación ....	103
<b>IV.4.1 Biodegradación de amoniaco y cianuro como fuentes alternas de nitrógeno .....</b>	<b>103</b>
<b>IV.4.2 Biodegradación de nitrato y cianuro como fuentes alternas de nitrógeno .....</b>	<b>119</b>
<b>IV.4.3 Discusión.....</b>	<b>134</b>
IV.5 Equivalentes electroquímicos y correlaciones.....	136



IV.6 Análisis de resultados.....	140
Conclusiones .....	147
Perspectivas y recomendaciones .....	151
Referencias.....	153
Anexos.....	157
Anexo I. Equivalencia entre densidad óptica (a 600 nm) y biomasa (medida en términos de SSV) .....	157
Anexo II. Parámetros cinéticos generados con los ajustes del modelo Gompertz a las cinéticas de consumo de cianuro o producción de biomasa. ....	159
Anexo III. Semireacciones de síntesis celular por mol de cianuro de los experimentos correspondientes a las secciones IV.2 - IV4 .....	161



## Índice de Figuras

Figura 1. Diagrama $E_H$ -pH a 25°C del sistema $CN^-/H_2O$ . $[CN^-] = 300 \text{ mg L}^{-1}$ . Construido con datos termodinámicos de Bard et al. (1985) .....	13
Figura 2. Estructura típica de una célula procarionte (Modificada de Rittmann y McCarty,2001). 18	
Figura 3. Transferencia de energía por un acarreador, desde su generación hasta la síntesis celular o mantenimiento celular. Modificado de Rittmann y McCarty (2001) .....	20
Figura 4. Transporte de protones mediante los complejos de la cadena respiratoria. Modificado de Mathews et al. (2000).....	22
Figura 5. Fases típicas de crecimiento microbiano en escala semilogarítmica (Modificado de Barton, 2005). .....	28
Figura 6. Comportamiento diaúxico en el crecimiento microbiano medido a través de la densidad óptica (Adaptado de Barton, 2005). .....	30
Figura 7. Esquema del diseño experimental para obtención de biomasa en el precultivo, y del precultivo para las cinéticas de biodegradación de cianuro. Fuente: Elaboración propia. ....	51
Figura 8. Muestras biológicas con presencia de formamida. La mayor coloración rojiza-marrón corresponde a una mayor concentración de formamida. La coloración amarilla es típica de aquellas que presentan baja concentración o sin presencia de formamida.....	58
Figura 9. a) Cinéticas de saturación de oxígeno disuelto para la agitación orbital de 150 ( $\square$ ) y 370 rpm ( $\bullet$ ) a temperatura y presión barométrica de 30 °C y 810 mbar, respectivamente. La línea punteada corresponde al valor de saturación de oxígeno a 25°C y presión de 0.8 atm en la ciudad de San Luis Potosí; b) Respuesta semilogarítmica de la cinética de primer orden de saturación de $O_2$ disuelto en el medio líquido con agitación a 150 rpm.....	67
Figura 10. Cinéticas de consumo acumulado de cianuro ( $\bullet$ ) y producción neta de biomasa ( $\diamond$ ) con cianuro como única fuente de nitrógeno. (a) sin agitación, (b) a 150 rpm, (c) a 370 rpm y (d) en condiciones anóxicas. Las barras representan el error estándar de duplicados. Las líneas punteadas representan el ajuste al modelo Gompertz. La producción neta de biomasa es resultante de la diferencia entre la concentración inicial de preinóculo adicionada y la concentración de biomasa final, que fue sintetizada. El corte en el eje x de las Figuras se debe al uso de la función break del software Origin que permite hacer acercamientos en las horas de interés de la cinética pero conservando la escala original del eje. ....	70
Figura 11. Velocidades de utilización de oxígeno ( $\nabla$ ) y cinéticas de consumo de cianuro ( $\bullet$ ). a) experimentos sin agitación; b) agitación a 150 rpm; c) agitación a 370 rpm. Las barras representan el error estándar de duplicados.....	90
Figura 12. Cinéticas de consumo acumulado de amoníaco ( $\Delta$ ), nitrato ( $\square$ ) y producción neta de biomasa ( $\diamond$ ) con distinta fuente de nitrógeno. a) amoníaco como única fuente de nitrógeno; b) nitrato como única fuente de nitrógeno. Experimentos con agitación a 150 rpm. Las barras representan el error estándar de duplicados. Las líneas punteadas representan el ajuste con el modelo Gompertz. 96	
Figura 13. Velocidades de utilización de oxígeno ( $\nabla$ ) y perfiles de consumo de la fuente de nitrógeno. a) única fuente de nitrógeno amoníaco ( $\Delta$ ) y (b) única fuente de nitrógeno nitrato ( $\square$ ). Experimentos con agitación a 150 rpm. Las barras representan el error estándar de duplicados. ..	101
Figura 14. Cinética de consumo acumulado de cianuro ( $\bullet$ ), amoníaco ( $\Delta$ ) y producción neta de biomasa ( $\diamond$ ) con cianuro y amoníaco como fuentes alternas de nitrógeno. (a) sin agitación; (b) con	

agitación a 150 rpm; (c) con agitación a 370 rpm. Las barras representan el error estándar de duplicados. Las líneas punteadas representan el ajuste al modelo Gompertz. En el panel a y b las líneas continuas negras muestran el consumo de cianuro cuando se encuentra como única fuente de nitrógeno a la misma velocidad de agitación. Las líneas discontinuas negras (sin símbolo) muestran la producción de biomasa cuando se encuentra como única fuente de nitrógeno a la misma velocidad de agitación. .... 105

Figura 15. Velocidades de utilización de oxígeno (▼) y cinéticas de consumo de cianuro (●) y amoníaco (Δ). Experimentos (a) sin agitación; (b) con agitación a 150 rpm y (c) a 370 rpm. Las barras representan el error estándar de duplicados. .... 118

Figura 16. Cinéticas de consumo acumulado de cianuro (●), nitrato (□) y producción de biomasa (◇). Fuentes de nitrógeno: cianuro y nitrato. Experimentos: (a) sin agitación; (b) a 150 rpm; (c) a 370 rpm. Las barras representan el error estándar de duplicados. Las líneas punteadas representan el ajuste al modelo Gompertz. Las líneas continuas muestran el consumo de cianuro cuando se encuentra como única fuente de nitrógeno a la misma velocidad de agitación. .... 122

Figura 17. Velocidades de utilización de oxígeno en las Figuras 17.a (▼), 17.b y 17.c (▼) y cinéticas de consumo de cianuro (●) y nitrato (□). Experimentos: (a) sin agitación, (b) a 150 rpm y (c) a 370 rpm. Las barras representan el error estándar de duplicados. .... 133

Figura 18. (a) Correlación entre los miliequivalentes electrónicos donados y miliequivalentes electroquímicos aceptados, cuantificados experimentalmente ( $R^2=0.99$ ), (b) correlación de los miliequivalentes electrónicos donados y biomasa sintetizada ( $R^2=0.951$ ) y (c) correlación entre los miliequivalentes electrónicos aceptados por el oxígeno y biomasa sintetizada ( $R^2=0.68$ ). .... 138

Figura 19. Correlación entre la suma de concentraciones de ácidos orgánicos y la concentración de hidróxido de sodio adicionado  $[OH^-]$  para mantener el pH operacional de 10.5 ( $R^2=0.988$ ). .... 143

## Índice de Tablas

Tabla 1. Rutas metabólicas para la biodegradación de cianuro y tiocianato (Adaptado de Dzombak et al., 2006).....	32
Tabla 2. Microorganismos, pH, fuentes de carbono, medio y ruta metabólica reportados para la biodegradación de cianuro (Luque Almagro et al., 2005; Adjei et al., 1999; Chapatwala., 1998; Kunz et al., 1992; Annachhatre et al., 2000).....	43
Tabla 3. Composición del medio de cultivo empleado. ....	53
Tabla 4. Resumen de los experimentos de biodegradación de cianuro, se especifican las condiciones de agitación, concentración de la fuente de carbono (lactato), así como la concentración de cianuro como única fuente de nitrógeno o su combinación con fuentes alternas de nitrógeno (amoníaco ó nitrato). Todos los experimentos fueron realizados por duplicado. ....	54
Tabla 5. Coeficientes de transferencia de masa ( $k_{La}$ ) para el sistema con agitación orbital a pH 10.5 y 30°C. Valores promedio de dos determinaciones (n=2).....	69
Tabla 6. Velocidades máximas estimadas de acuerdo al modelo Gompertz y sus coeficientes de determinación ( $R^2$ ) para los experimentos con cianuro como única fuente de nitrógeno, sin agitación, con agitación a 150 y 370 rpm y en el sistema anóxico. ....	72
Tabla 7. Balance de nitrógeno para los experimentos sin agitación, con agitación a 150 y 370 rpm y anóxico, en distintos tiempos de la cinética. ....	77
Tabla 8. Balance de carbono para los experimentos con cianuro como única fuente de nitrógeno, sin agitación, a 150 y 370 rpm y anóxico. El superíndice A refiere a un consumo en vez de producción. El % de carbono se refiere al porcentaje de carbono recuperado relativo al carbono orgánico consumido del lactato.....	83
Tabla 9. Velocidades máximas estimadas de acuerdo al modelo Gompertz para los experimentos con amoníaco y nitrato como únicas fuentes de nitrógeno con agitación a 150 rpm, y sus coeficientes de determinación ( $R^2$ ).....	96
Tabla 10. Balance de carbono para los experimentos con amoníaco y nitrato como únicas fuentes de nitrógeno, con agitación a 150 rpm. El % de carbono se refiere al porcentaje de carbono recuperado relativo al carbono orgánico consumido del lactato. ....	98
Tabla 11. Velocidades máximas estimadas de acuerdo al modelo Gompertz para los experimentos con cianuro y amoníaco como fuentes alternas de nitrógeno, sin agitación, con agitación a 150 y 370 rpm y sus coeficientes de determinación ( $R^2$ ). ....	106
Tabla 12. Balance de nitrógeno en el experimento con amoníaco y cianuro como fuentes alternas de nitrógeno, con agitación a 150 y 370 rpm. ....	111
Tabla 13. Balance de carbono para los experimentos con amoníaco y cianuro como fuentes alternas de nitrógeno, sin agitación y con agitación a 150 y 370 rpm. El % de carbono se refiere al porcentaje de carbono recuperado relativo al carbono orgánico consumido del lactato. ....	114
Tabla 14. Velocidades máximas estimadas con el modelo Gompertz para los experimentos con cianuro y nitrato como fuentes alternas de nitrógeno, sin agitación, con agitación a 150 y 370 rpm con sus respectivos coeficientes de determinación. ....	123
Tabla 15. Balance de nitrógeno en el experimento con nitrato y cianuro como fuentes alternas de nitrógeno, con agitación a 150 y 370 rpm. ....	128

Tabla 16. Balance de carbono en los experimentos con cianuro y nitrato como fuentes alternas de nitrógeno, sin agitación y con agitación a 150 rpm y 370 rpm. El % de carbono se refiere al porcentaje de carbono recuperado relativo al carbono orgánico consumido del lactato. ....	130
Tabla 17. Balance de electrones donados y aceptados en los experimentos de la tesis .....	136
Tabla 18. Resumen de tiempos y parámetros de importancia en los estudios de biodegradación de cianuro.....	140
Tabla 19. Estructura de datos para el ANDEVA de dos factores.....	144
Tabla 20. Factores, parámetros y estadística de los ANDEVA de dos factores para los experimentos con cianuro como única fuente y como fuente alterna de N. ....	145

## Nomenclatura

Nombre/definición	Abreviatura/formula química	Unidades en el texto
Acetato	$\text{CH}_3\text{COO}^-$	$\text{mmol L}^{-1}$
Ácido cianhídrico	$\text{HCN}$	NA
Adenosin difosfato	$\text{ADP}$	NA
Amoniac	$\text{NH}_3$	$\mu\text{mol L}^{-1}$
Amonio	$\text{NH}_4^+$	NA
Adenosin trifosfato	$\text{ATP}$	NA
Cianato	$\text{CNO}^-$	$\mu\text{mol L}^{-1}$
Cianuro	$\text{CN}^-$	$\mu\text{mol L}^{-1}$
Cianuro libre	$\text{CN}^-$ , $\text{HCN}$	NA
Electrón	$e^-$	NA
Formamida	$\text{HCONH}_2$	$\mu\text{mol L}^{-1}$
Formiato	$\text{HCOO}^-$	$\text{mmol L}^{-1}$
Fórmula química de biomasa	$\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2\text{N}$	NA
Lactato	$\text{CH}_3\text{CHOHCOO}^-$	$\text{mmol L}^{-1}$
Miliequivalente electrónico	$\text{meq } e^-$	$\text{meq } e^-$
Nicotinamida adenina dinucleótido en su forma oxidada	$\text{NAD}^+$	NA
Nicotinamida adenina dinucleótido en su forma reducida	$\text{NADH}$	NA
Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma oxidada	$\text{NAD(P)}^+$	NA
Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma reducida	$\text{NAD(P)H}$	NA
Ion nitrato	$\text{NO}_3^-$	$\mu\text{mol L}^{-1}$
Ion nitrito	$\text{NO}_2^-$	NA
Nitrógeno como amoniac	$\text{N-NH}_3$	$\mu\text{mol L}^{-1}$

Nitrógeno como cianuro	$\text{N-CN}^-$	$\mu\text{mol L}^{-1}$
Nitrogeno como nitrato	$\text{N-NO}_3^-$	$\mu\text{mol L}^{-1}$
Velocidad de transferencia de oxígeno	OTR	$\mu\text{mol L}^{-1}\text{h}^{-1}$
Velocidad de utilización de oxígeno	OUR	$\mu\text{mol L}^{-1}\text{h}^{-1}$
Velocidad máxima de consumo o producción	$r_{\text{max}}$	$\mu\text{mol L}^{-1}\text{h}^{-1}$
Rendimiento celular con base a carbono	$Y_C$	$\text{g lactato g}^{-1}\text{N}$
Rendimiento celular con base a nitrógeno	$Y_N$	$\text{g SSV g}^{-1}\text{N}$
Sólidos suspendidos volátiles	SSV	$\mu\text{mol L}^{-1}$
Tiocianato	$\text{SCN}^-$	NA

*\*NA: No aplica*



## Introducción

El cianuro es un anión monovalente que contiene el grupo funcional nitrilo ( $C\equiv N$ ), el cual por sustitución del hidrógeno del ácido cianhídrico se une a compuestos orgánicos alquilo ( $R-C\equiv N$ ) (Fedel-Moen et al., 2000). Estos últimos han sido clasificados como compuestos altamente tóxicos para la salud humana y el medio ambiente, pero son indispensables en diversos tipos de industrias manufactureras, tales como la extracción hidrometalúrgica de oro, asociada a una de las industrias con mayores consumos de cianuro. El ion cianuro es un agente complejante de metales en solución acuosa altamente versátil y efectivo para extraer y concentrar oro de minerales con baja ley (Zagury y Oudjehani., 2004; Dzombak et al., 2006).

Existen regulaciones y normatividad aplicables al uso y disposición final de cianuro en la minería del oro y plata. El código internacional del cianuro especifica que la concentración máxima permitida de cianuro en descargas directas e indirectas en aguas superficiales deberá ser menor a  $0.022 \text{ mg L}^{-1}$  (International Cyanide Management Institute [ICMI], 2017). Dicha concentración forma parte de los Criterios de Calidad del Agua Nacional para el cianuro, establecidos por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de América, y representa una concentración a la que pueden exponerse brevemente los organismos del agua dulce sin sufrir efectos inaceptables (Dzombak et al., 2006). En México, la NOM-001-SEMARNAT-1996 (Diario Oficial de la Federación [DOF], 1997a, 1997b, 2003) establece los límites máximos permisibles de concentración de cianuros en  $1 \text{ mg L}^{-1}$  como promedio mensual en ríos y aguas costeras para usos en riego agrícola, público y de protección de vida acuática; y de  $2 \text{ mg L}^{-1}$  para embalses naturales y artificiales con los mismos usos .

Actualmente existen diversas tecnologías de tratamiento físicoquímico para cianuro que permiten alcanzar los criterios ambientales requeridos, tales como la precipitación/separación de ferrocianuros con sulfato de hierro en soluciones con cianuro; hidrólisis alcalina de cianuro a amoníaco y dióxido de carbono a temperaturas entre  $160$  y  $185 \text{ }^\circ\text{C}$  y presiones entre  $100$  y  $150 \text{ psi}$ ; oxidación química de cianuro a amoníaco con peróxido de hidrógeno u ozono bajo condiciones alcalinas (valores de pH superiores a

12.5); y tratamiento biológico con microorganismos (Dzombak et al., 2006). De forma general, el tratamiento biológico de cianuro representa una opción de mayor viabilidad económica en comparación con las tecnologías de tratamiento fisicoquímico, debido a que no es necesario utilizar presiones ni temperaturas elevadas o agentes oxidantes, y tiene como ventaja que no existe generación de residuos (como en el tratamiento con precipitación), ya que el cianuro es degradado a especies de menor toxicidad, por ejemplo: cianato, dióxido de carbono, formamida, amonio/amoniaco, entre otros. El fundamento del tratamiento biológico o biodegradación de cianuro se basa en la existencia de microorganismos capaces de asimilar al cianuro como fuente de nitrógeno y/o carbono para satisfacer sus necesidades metabólicas (Solomonson, 1981)

La efectividad de la aplicación de la tecnología de biodegradación de cianuro dependerá de que se cumplan todas las condiciones fisicoquímicas del medio que resultan favorables para el crecimiento de los microorganismos como son pH, temperatura, oxígeno disuelto, y disponibilidad de nutrientes (carbono, nitrógeno y fósforo, entre otros). Además, la efectividad dependerá de la previa aclimatación de los microorganismos al ambiente. En el caso específico que se aborda en esta tesis, el ambiente del cual provienen los microorganismos (terreros de lixiviación de oro y plata) se caracteriza por: altas concentraciones de metales, condiciones de pH superiores a 10.5 y gradientes de concentración de oxígeno en las diferentes zonas del terrero (Rittmann y McCarty, 2001; Dzombak et al., 2006).

Hasta la fecha, los reportes sobre biodegradación de cianuro son limitados y no existen estudios, para la biodegradación de cianuro en medio alcalino y con microorganismos que procedan de terreros de lixiviación de oro y plata, en donde se evalúen fuentes alternas de nitrógeno y que tomen en cuenta la disponibilidad de oxígeno.

En esta tesis se evaluaron cinéticas de biodegradación de cianuro utilizando microorganismos aislados de un terrero de lixiviación de oro y plata ubicado en el municipio de Cerro de San Pedro en el estado de San Luis Potosí. Las muestras minerales a partir de las cuales se aislaron los microorganismos fueron tomadas de un punto superficial (0 a 2 metros de profundidad) del terrero de lixiviación, y que al estar expuestas a la atmósfera, presentarían actividad aeróbica. Además, se evaluaron aspectos metabólicos de

los consorcios, al someterlos a distintas velocidades de transferencia de oxígeno, y a la presencia/ausencia de fuentes alternas de nitrógeno (nitrato o amoníaco). Los resultados incluyen, tiempos de biodegradación, concentraciones de sustrato y oxígeno consumido, concentración de hidróxido adicionada para control de pH 10.5, metabolitos de nitrógeno sintetizados, así como balances electrónicos de donadores y aceptores de electrones.

Todos los experimentos se realizaron en modo lote a pH 10.5, en matraces Erlenmeyer con tapa de algodón que permitió la difusión libre de oxígeno. La concentración inicial de biomasa fue  $200 \text{ mg SSV L}^{-1}$ , la concentración empleada de nitrato, amoníaco y cianuro fue  $2,000 \mu\text{mol L}^{-1}$  y la fuente de carbono orgánica utilizada fue lactato de sodio.

Los métodos hidrometalúrgicos/metalúrgicos de recuperación de oro y plata en el sitio estudiado consisten en 1) una etapa de riego por goteo y por aspersión de soluciones de cianuro (ajustadas a pH 10.5 con óxido de calcio) sobre el mineral apilado en los terreros para obtener un licor de lixiviación con cianocomplejos de oro y plata, 2) una planta tipo Merrill-Crowe, en donde se adiciona zinc para reducir a los cianocomplejos de oro y plata a su forma elemental y 3) una etapa final de tipo pirometalúrgica que incluye la fundición del precipitado de oro y plata obtenido en la planta Merrill-Crowe. El licor de lixiviación después de la precipitación de los metales preciosos es conocida como “solución estéril”. La “solución estéril” se recircula para iniciar nuevamente la etapa de riego y aspersión. Antes de la recirculación el pH se reajusta a 10.5 y se adiciona cianuro. En la operación minera de la cual se obtuvieron muestras sólidas del patio de lixiviación, se determinó que habían concentraciones de cianuro menores a las estimadas, así como bajo pH en la solución líquida. En la presente tesis, después de evaluar la biodegradación de cianuro en los distintos escenarios, se pudo encontrar una explicación para dichas pérdidas de cianuro y acidificación de la solución. Se propone que la presencia de microorganismos degradadores de cianuro en los patios de lixiviación, provienen de la adición de residuos minerales con contenidos no explotados de oro y plata del pasivo ambiental conocido como patio Victoria. Este pasivo ambiental se localizaba sobre una ladera del arroyo San Pedro, en el poblado Cerro de San Pedro.

Actualmente, los patios de lixiviación en Cerro de San Pedro se encuentran al final de su etapa de operación y la etapa de cierre de mina considera la aplicación de una tecnología de

biorremediación como parte de las actividades de descontaminación de las piletas de solución y terreros (Unidad Minera Cerro de San Pedro[UMCSP], 2010).

El patio de lixiviación del cual se aislaron los microorganismos degradadores de cianuro tiene una mineralogía asociada a un pórfido oxidado con alteración argílica moderada y propilítica (clorita) débil con presencia de óxidos de hierro cristalinos tipo hematita. El material depositado en los terreros contiene rocas calizas con un alto potencial de neutralización, lo cual asegura que en la etapa de cierre del patio de lixiviación existirá un balance de neutralización que no favorecerá la generación de efluentes tipo drenaje ácido de mina (por la oxidación de los minerales con contenido de sulfuro). Sin embargo, conforme ha avanzado la explotación del mineral en los patios de lixiviación, se ha observado el incremento en el consumo de óxido de calcio para mantener el pH operacional del terrero de lixiviación en 10.5, además, se ha observado el incremento de consumo de cianuro que no se ha podido explicar por la posible formación de cianocomplejos metálicos (UMCSP, 2010). Sin embargo, el uso de cianuro como fuente de nitrógeno por parte de microorganismos nativos del patio de lixiviación, que propician la acidificación del medio acuoso como resultado de sus procesos metabólicos podría explicar el comportamiento observado en la operación de los patios de lixiviación.

Es importante mencionar que además de cianuro como especie de nitrógeno, la manifestación de impacto ambiental de la empresa reporta los consumos anuales en etapas del proceso no especificadas de 250 L de ácido nítrico, 93 toneladas de nitrato de sodio, 7,848 toneladas de explosivo ANFO (mezcla de nitrato de amonio con diésel), y 200 L de hidróxido de amonio (UMCSP, 2010). De acuerdo con los resultados de esta tesis, la asimilación de cianuro, nitrato y amonio conlleva mayores consumos de óxido de calcio para compensar la acidificación producida por los procesos metabólicos.

La justificación de este estudio se basa en lo siguiente:

- 1) La información generada en el presente estudio será clave para el diseño de una estrategia de biorremediación de cianuro en el sitio del cual se aislaron los microorganismos, ya que se consideraron las necesidades de nutrientes, tiempos de retención y efecto de otras especies de nitrógeno para poder alcanzar los criterios

ambientales requeridos por la normativa mexicana aplicable, NOM-155-SEMARNAT-2007 y NOM-001-SEMARNAT-1996, que establecen como límite 1 mg L<sup>-1</sup> de cianuro en aguas residuales descargadas a embalses naturales y de uso público urbano.

- 2) Los microorganismos estudiados exhiben capacidad para biodegradar cianuro en las condiciones fisicoquímicas de los terreros, lo que permite visualizar un escenario favorable para la implementación de una tecnología de bioremediación “in situ” de los patios de lixiviación en la etapa de cierre.
- 3) Los resultados generados en esta tesis, asociados a la actividad degradadora de cianuro, nitrato y amoníaco, podrían explicar los elevados consumos de cianuro y óxido de calcio durante y establecer estrategias para su disminución en la etapa actual de operación en el sitio.
- 4) No existe información en la literatura disponible a la fecha concerniente al efecto del suministro de oxígeno en la biodegradación de cianuro, ni sobre el efecto de una fuente alterna de nitrógeno (amoníaco y nitrato) durante la biodegradación de cianuro.
- 5) El efecto del suministro de oxígeno podría explicar la biodegradación de cianuro en zonas aerobias y anóxicas dentro de un patio de lixiviación; mientras que la adición de una fuente alterna de nitrógeno permitirá conocer el efecto impuesto sobre la biodegradación de cianuro.



## **Hipótesis**

Las hipótesis de este estudio plantean:

- 1) La adición de una fuente alterna de nitrógeno a los sistemas experimentales puede inhibir la biodegradación de cianuro y/o su asimilación.
- 2) El empleo de consorcios microbianos aislados de patios de lixiviación de oro por medio de cianuración permitirá alcanzar los límites máximos permisibles de cianuro establecidos en la NOM-001-SEMARNAT-1996 a través de su biodegradación.

Con respecto a los objetivos planteados, el presente trabajo considera los siguientes:





### **Objetivo general**

Evaluar y comparar, a nivel laboratorio, la biodegradación de cianuro con diferentes velocidades de transferencia de oxígeno y adición de fuentes alternas de nitrógeno, empleando microorganismos nativos aislados de terreros de lixiviación de oro y plata, hasta concentraciones inferiores a los límites máximos permisibles estipulados en la Normativa Oficial Mexicana para una etapa de cierre de mina.

### **Objetivos específicos**

1. Evaluar la biodegradación de cianuro como única fuente de nitrógeno, empleando consorcios microbianos autóctonos en microcosmos a pH 10.5, en lote, aeróbicos y anaeróbicos.
2. Evaluar la biodegradación de cianuro y amoníaco, como fuentes alternas de nitrógeno, en concentraciones equimolares ( $2,000 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), empleando consorcios microbianos autóctonos en microcosmos a pH 10.5, en lote, aeróbicos y anaeróbicos.
3. Evaluar la biodegradación de cianuro y nitrato, como fuentes alternas de nitrógeno, a concentraciones equimolares ( $2,000 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), empleando consorcios microbianos autóctonos en microcosmos a pH 10.5, en lote, aeróbicos y anaeróbicos



# **Capítulo I. Problemática ambiental de especies de cianuro: Aspectos fisicoquímicos y toxicológicos**

## **I.1 Cianuro: especiación y toxicidad**

El cianuro se encuentra en distintas formas químicas en los sistemas acuáticos y suelos, incluyendo especies disueltas en agua, así como en distintas fases sólidas, y también en forma gaseosa. La forma específica de cianuro en el ambiente determina su transporte, destino final en el ambiente, así como su toxicidad (Kunz et al., 1992; Dzombak et al., 2006).

Químicamente, el cianuro puede clasificarse en formas orgánicas e inorgánicas. Las formas inorgánicas ocurren en estado sólido, líquido o gaseoso e incluyen al cianuro libre, cianocomplejos metálicos (débiles o fuertes), tiocianato ( $\text{SCN}^-$ ), complejos metálicos de tiocianato, cianato ( $\text{CNO}^-$ ), complejos metálicos de cianatos y haluros de cianuro (Oudjehani et al., 2002; Dzombak et al., 2006). Debido a la naturaleza de este estudio, en el cual fue seleccionado un medio de cultivo sin presencia de metales, poco se discutirá sobre las especies sólidas de cianuro y cianocomplejos metálicos.

Respecto a la toxicidad del cianuro libre en seres humanos, se reporta la exposición aguda (fatal) al mismo en adultos tras una ingesta de 200 mg de KCN lo cual tiene como consecuencia perdida de la conciencia al cabo de 5 minutos, así como asfixia y convulsiones anóxicas como eventos terminales (Dzombak et al., 2006).

### **I.1.1 Formas acuosas**

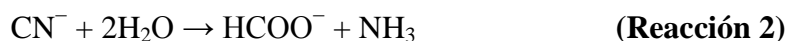
En solución, se pueden diferenciar cinco principales categorías: cianuro libre, cianocomplejos metálicos, cianato, tiocianato y formas orgánicas de cianuro (Dzombak et al., 2006). Las fórmulas químicas de estos compuestos así como de otros términos comúnmente utilizados en el presente trabajo pueden consultarse en la sección de Nomenclatura.

### ***1.1.1.1 Cianuro libre***

El cianuro libre representa la forma más tóxica de cianuro y se constituye por la suma del ácido cianhídrico (HCN) y su forma deprotonada (CN<sup>-</sup>). El HCN es volátil en condiciones ambientales y ocurre tanto en forma acuosa como en forma gaseosa, se clasifica como ácido débil y presenta un pKa de 9.24 a 25°C, por lo que el ácido cianhídrico puede disociarse a ion cianuro o viceversa, de acuerdo con la Reacción 1 (Gurbuz et al., 2004).



Existe un proceso en el que el cianuro libre puede reaccionar con agua en condiciones alcalinas y altas temperaturas para producir formiato (HCOO<sup>-</sup>) y amoniaco (Reacción 2).



Sin embargo, químicamente esta Reacción 2 solo se observa a temperaturas elevadas (165–180°C) y presiones entre 100 - 150 psi (Robuck y Luthy., 1988). La Reacción 2 puede ocurrir en condiciones ambientales gracias a la presencia de ciertos tipos de microorganismos (cf. Sección II.4).

### ***1.1.1.2 Cianocomplejos metálicos***

Diversos metales pueden unirse al ion cianuro y dar lugar a complejos metálicos disueltos. Éstos se clasifican en cianocomplejos metálicos débiles (poco estables en solución con valores típicos de pK entre 16 y 30) o fuertes (mayor estabilidad con valores típicos de pK entre 38 y 53) (Dzombak et al., 2006; Gurbuz et al., 2004; Oudjehani et al., 2002). Su toxicidad está relacionada con su estabilidad, puesto que los complejos débiles se disocian fácilmente a cianuro libre (especies altamente tóxicas), siendo el caso contrario los cianocomplejos fuertes (asociados a menor toxicidad por su mayor estabilidad) (Gurbuz et al., 2004; Oudjehani et al., 2002; Luque-Almagro et al., 2005).

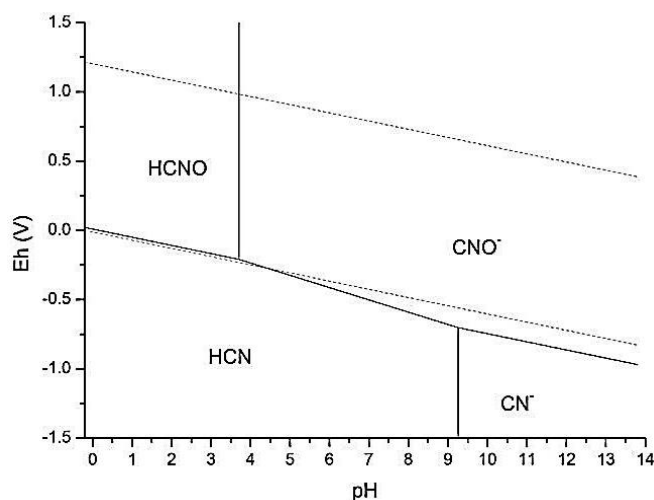
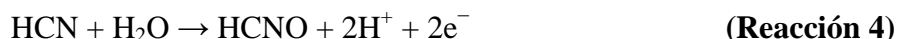
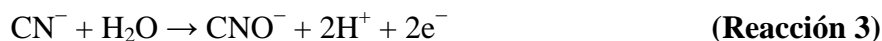
Los cianocomplejos metálicos débiles se disocian en condiciones ligeras de acidez (pH 4 - 6). Entre los cianocomplejos débiles más comunes se encuentra el cianuro de cobre (Cu(CN)<sub>3</sub><sup>2-</sup>), cianuro de zinc (Zn(CN)<sub>4</sub><sup>2-</sup>), cianuro de cadmio (Cd(CN)<sub>4</sub><sup>2-</sup>), cianuro de plata (Ag(CN)<sub>2</sub><sup>-</sup>), y cianuro de níquel (Ni(CN)<sub>4</sub><sup>2-</sup>) (Dzombak et al., 2006).

Por otro lado, los cianocomplejos metálicos fuertes incluyen aquellos relacionados con metales pesados de transición tales como: hierro, cobalto, platino, y oro; que para disociarse requieren condiciones de  $\text{pH} < 2$ . Entre los más comunes se encuentran el ferrocianuro ( $(\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-})$ ), ferricianuro ( $(\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-})$ ), cianuro de oro ( $(\text{Au}(\text{CN})_2^-)$ ), cianuro de cobalto ( $(\text{Co}(\text{CN})_6^{3-})$ ) y cianuro de platino ( $(\text{Pt}(\text{CN})_4^{2-})$ ) (Dzombak et al., 2006).

El medio de cultivo con el que se trabajó no contiene estos metales por lo que la formación de estas especies se descarta en el sistema de estudio.

### 1.1.1.3 Cianato y tiocianato

El cianuro libre puede oxidarse y formar cianato ( $\text{CNO}^-$ ), o su forma protonada  $\text{HCNO}$  ( $\text{pK}_a = 3.45$  a  $25^\circ\text{C}$ ; Reacción 3 y 4). En la Figura 1 se observa que el cianato es predominante a condiciones oxidantes en un amplio intervalo de  $\text{pH}$ , mientras su forma protonada solo es predominante a valores de  $\text{pH} < 3.45$ .



**Figura 1.** Diagrama  $E_{\text{H}}$ - $\text{pH}$  a  $25^\circ\text{C}$  del sistema  $\text{CN}^-/\text{H}_2\text{O}$ .  $[\text{CN}^-] = 300 \text{ mg L}^{-1}$ . Construido con datos termodinámicos de Bard et al. (1985)

La oxidación química del cianuro a cianato se favorece por la presencia de agentes oxidantes, tales como: cloro, hipoclorito, ozono o peróxido de hidrógeno (Schaefer, 1996). La oxidación biológica pueden dar lugar a la formación de cianato como producto intermediario o terminal (cf. Sección II.4). En el presente trabajo el cianato se encontró,

bajo ciertos escenarios, como producto intermediario en la biodegradación de cianuro. Es importante mencionar que el cianato es ~1000 veces menos tóxico que el cianuro libre (Dzombak et al., 2006; Lottermoser, 2010). Se reporta que la hidrólisis de cianato se favorece en condiciones ácidas y neutras, mientras que este proceso es desfavorecido en medio alcalino (Dzombak et al., 2006).

Wen et al. (1994) estudiaron las velocidades de reacción de la hidrólisis de cianato a 22 ° C, y observaron que ésta conlleva a la formación de urea (H<sub>2</sub>NCONH<sub>2</sub>) y carbamato (H<sub>2</sub>NCOO<sup>-</sup>) (Reacción 5). Los autores observaron que la hidrólisis de 2.48 M de cianato a pH 9 se completó en 117 h.



El cianuro libre puede reaccionar con diversas especies de azufre (incluyendo al azufre elemental) pero de manera particular las formas más reactivas presentes en el medio ambiente son los polisulfuros (S<sub>x</sub>S<sup>2-</sup>) y el tiosulfato (S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>). La oxidación con polisulfuros es lenta por lo que es común que la reacción del cianuro libre se vea más favorecida con el tiosulfato para formar tiocianato.

El tiocianato puede formarse en el ambiente y es significativamente menos tóxico que el cianuro y el cianato (Dzombak et al., 2006; Luque-Almagro et al., 2005).

El medio de cultivo seleccionado en el presente trabajo no contenía sulfuros por lo que se descartó la formación de tiocianato.

#### ***1.1.1.4 Cianocomplejos orgánicos***

Los cianuros orgánicos contienen un grupo funcional nitrilo unido a un átomo de carbono de un grupo alquilo. Algunos ejemplos incluyen a los nitrilos, como el acetonitrilo (CH<sub>3</sub>CN), o el cianobenceno ó benzonitrilo (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CN). Los nitrilos también pueden formarse tanto de forma sintética como de forma natural (Dzombak et al., 2006).

#### **1.1.2 Formas sólidas de cianuro**

En los sistemas con concentraciones de cianuro y cationes metálicos suficientemente altas, los cationes pueden unirse con el cianuro libre y formar cianocomplejos metálicos con

diferentes constantes de producto de solubilidad pudiendo generar diversos tipos de precipitados (Lottermoser, 2010). En general, estos precipitados, pueden agruparse en dos categorías: precipitados en donde el cianuro se encuentra unido a metales como sodio, potasio, calcio, los cuales son relativamente solubles, y precipitados en los que complejos de cianuro están unidos a metales como hierro, cobalto, oro, plata y cobre, y son poco solubles comparados con el primer tipo de cianocomplejos.

A pesar de su diferente solubilidad, bajo condiciones alcalinas estos cianocomplejos metálicos se solubilizan y liberan a los cationes y cianuro libre (Dzombak et al., 2006). En el presente trabajo además de omitir la adición de iones metálicos, las condiciones de operación se llevaron a cabo a pH de 10.5.





## **Capítulo II. Aspectos microbiológicos relacionados a la biodegradación de cianuro y otras fuentes de nitrógeno**

### **II.1 Aspectos básicos microbiológicos**

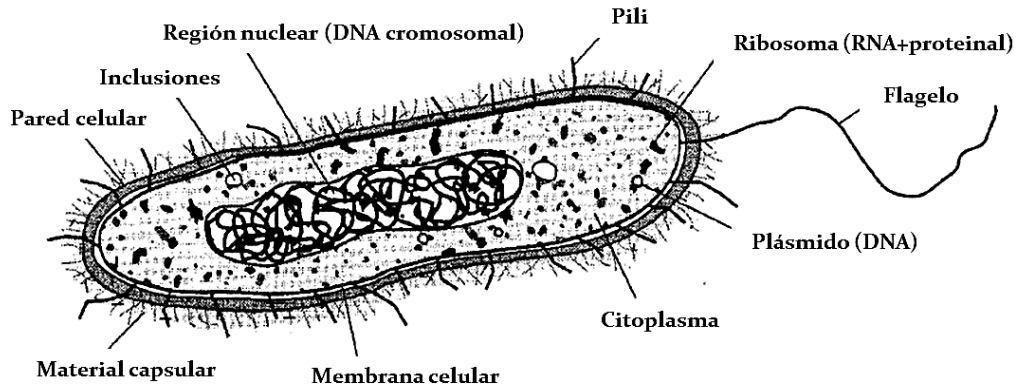
En esta sección se presenta información sobre algunos conceptos básicos microbiológicos, tales como la composición típica de la biomasa, fuentes y utilización de nitrógeno y carbono, conceptos metabólicos, donadores y aceptores de electrones y clasificación de microorganismos según el pH ambiental.

#### **II.1.1 Composición típica de una célula procarionte**

De acuerdo con Rittmann y McCarty (2001), la composición celular o fórmula empírica más comúnmente reportada para los microorganismos procariontes es  $C_5H_7O_2N$  con la relación molar C:N de 5:1. Esta fórmula empírica se usó para poder realizar los balances de nitrógeno y carbono. De estos macroelementos, el carbono y el nitrógeno deben adicionarse en formas reducidas ya que son de más fácil asimilación.

Las principales diferencias de las células procariontes con respecto a las células eucariontes son: un menor tamaño (1- 10  $\mu m$ ), la falta de un núcleo definido, y organelos internos delimitados por membranas, tales como: aparato de Golgi, vacuolas y mitocondria. En las células eucariontes, la mitocondria y los cloroplastos llevan a cabo diversos procesos metabólicos, mientras en las células procariontes los procesos metabólicos ocurren en el interior de la membrana citoplasmática.

La Figura 2 muestra la composición estructural de una célula procarionte. La membrana citoplasmática es semipermeable y conformada por una bicapa de fosfolípidos contenida dentro de la pared celular. Esta membrana controla el paso de nutrientes dentro y fuera de la célula, y es el lugar de alojamiento de diversas enzimas tales como los citocromos (enzimas involucradas en el transporte de electrones y conservación de energía) (Rittmann y McCarty, 2001).



**Figura 2.** Estructura típica de una célula procarionte (Modificada de Rittmann y McCarty, 2001).

El citoplasma es el material contenido dentro de la membrana citoplasmática compuesto por agua, nutrientes disueltos, proteínas, ácidos nucleicos (RNA y DNA) y enzimas (proteínas que permiten a la célula realizar ciertas reacciones químicas) (Barton, 2005).

Los plásmidos son moléculas circulares de tamaño pequeño, las cuales imparten características genéticas adicionales al organismo. Los ribosomas son partículas compuestas por RNA y proteínas que contienen enzimas para la síntesis de proteínas. Los flagelos son estructuras adheridas a la membrana citoplasmática que atraviesan la pared celular hasta llegar al medio, y los cuales sirven para movilidad de la célula. Los pili son similares en estructura pero su función es ayudar en la adhesión entre células y a superficies (Rittmann y McCarty, 2001).

Dependiendo de la fuente de carbono que usen, los microorganismos pueden ser autótrofos, capaces de sintetizar células a partir de carbono inorgánico ( $\text{CO}_2$ ), o pueden ser heterótrofos, aquellos capaces de asimilar carbono de una gran variedad de compuestos orgánicos y usarlos como donadores de electrones para obtener energía (Barton, 2005; Rittmann y McCarty, 2001). Los heterótrofos pueden usar compuestos de fácil asimilación (glucosa) o compuestos altamente recalcitrantes (hidrocarburos, fenoles, aromáticos policíclicos, etc). En la realización del presente trabajo se utilizó lactato ( $\text{CH}_3\text{CHOHCOO}^-$ ) como fuente de carbono orgánico y donador de electrones.

Respecto a la fuente de nitrógeno, dependiendo del tipo de microorganismos, éstos son capaces de utilizar una variedad de compuestos nitrogenados, siendo los más comunes el

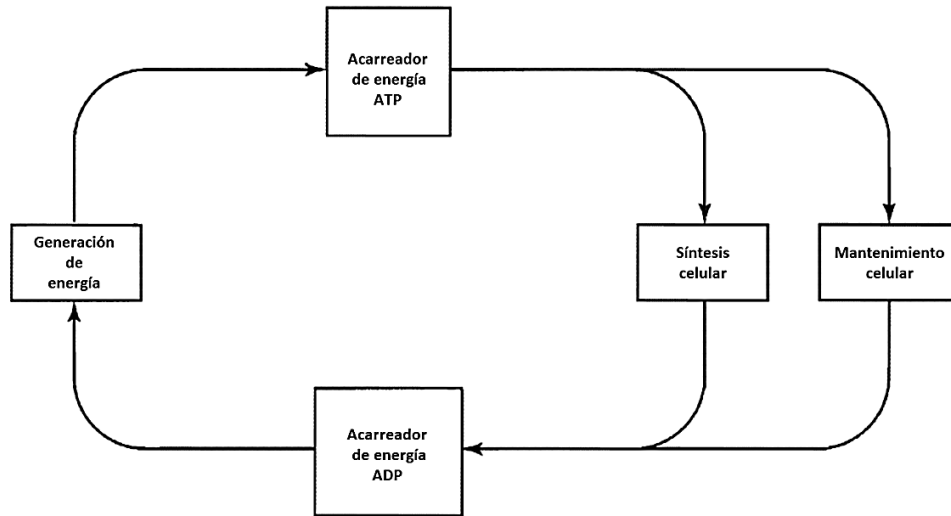
amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), y nitrógeno molecular atmosférico ( $\text{N}_2$ ). Cabe señalar que los microorganismos prefieren las fuentes de nitrógeno reducidas, siendo la fuente más reducida la de más fácil asimilación (e.g. el amonio con estado de oxidación de nitrógeno -3). La asimilación de otras fuentes como el nitrato, con nitrógeno en estado de oxidación +5, requiere la inversión de energía de 8 equivalentes de electrones (eq  $e^-$ ) para reducir el nitrógeno al estado de oxidación de más fácil asimilación (-3). La asimilación de nitrógeno a partir de  $\text{NO}_3^-$  consta de 3 etapas: 1) transporte de nitrato a la célula por una proteína específica; 2) reducción de nitrato a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) y, 3) reducción de nitrito a amonio (Luque Almagro et al., 2005; Barton, 2005).

En el presente trabajo, la fuente de nitrógeno de interés es el ion cianuro, donde el nitrógeno tiene estado de oxidación (-3), enlazado a una molécula de carbono con estado de oxidación (+2).

### **II.1.2 Metabolismo microbiano**

Para entender los mecanismos mediante los cuales los microorganismos son capaces de utilizar el nitrógeno y carbono para su crecimiento celular y funciones básicas, es necesario recurrir a los aspectos básicos del metabolismo microbiano.

El metabolismo es la suma de todos los procesos químicos en la célula y puede ser separado en anabolismo y catabolismo. El catabolismo consiste en aquellos procesos involucrados en la oxidación de sustratos para la obtención de energía mediante el transporte de electrones a través de acarreadores de electrones durante la fosforilación oxidativa, para la síntesis de adenosín trifosfato (ATP). El anabolismo involucra los procesos de síntesis celular a partir de las fuentes de carbono y nitrógeno consumidas mediante la utilización de ATP (Barton, 2005). La Figura 3 ilustra el proceso descrito, en el cual se observa de manera general que una vez realizada la fosforilación de ADP a ATP, este último es capaz de liberar energía para síntesis celular (anabolismo) o mantenimiento celular, liberando un grupo fosfato y regenerando así al acarreador ADP.



**Figura 3.** Transferencia de energía por un acarreador, desde su generación hasta la síntesis celular o mantenimiento celular. Modificado de Rittmann y McCarty (2001)

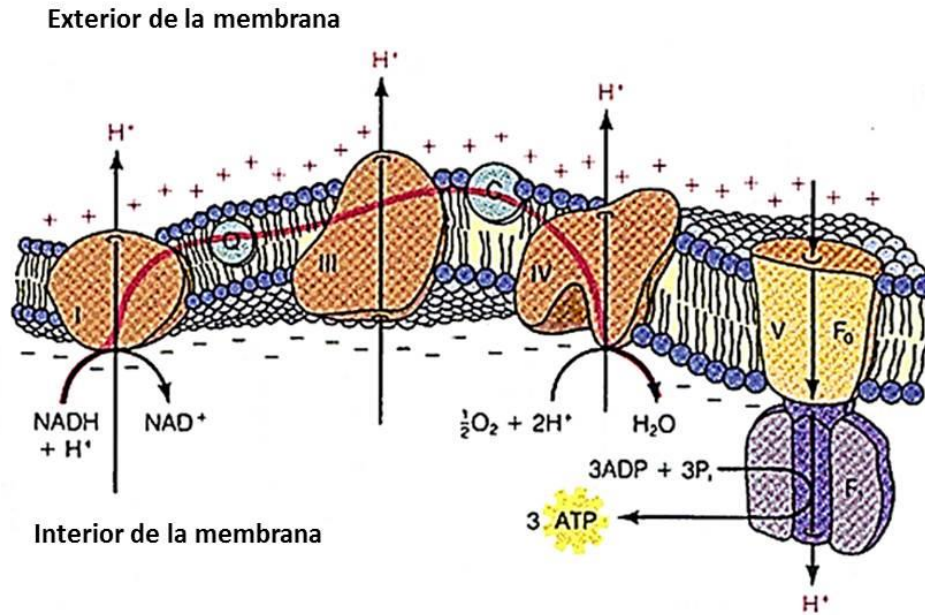
Respecto al catabolismo, es importante mencionar que la energía obtenida para la síntesis celular depende de reacciones de oxido-reducción, por lo que la presencia de un donador y un aceptor de electrones resulta indispensable. Aquellos microorganismos capaces de utilizar oxígeno como aceptor terminal de electrones se denominan aerobios, mientras otros microorganismos capaces de utilizar aceptores de electrones tales como nitrato y sulfato, se conocen como microorganismos anóxicos (Rittmann y McCarty, 2001).

Los microorganismos heterótrofos usan el mismo compuesto como donador de electrones y fuente de carbono, lo que les permite usar una amplia variedad de compuestos orgánicos como sustratos. La magnitud de la energía que se obtenga para poder sintetizar biomasa será la energía libre de Gibbs asociada a la reacción redox entre el aceptor y el donador de electrones. Las reacciones catabólicas con mayor rendimiento energético son aquellas en las que la glucosa es el donador de electrones y el oxígeno es el aceptor de electrones ya que la energía libre de Gibbs resultante es de  $-2,882 \text{ kJ mol}^{-1}$ , denotando el signo negativo liberación de energía y no inversión de la misma. Por consiguiente, y considerando que la energía libre de Gibbs necesaria para la síntesis de ATP es de  $32.72 \text{ kJ mol}^{-1}$ , se puede intuir que entre mayor sea la energía libre de Gibbs resultante entre el donador y aceptor de electrones, mayor será la energía destinada para sintetizar biomasa. Cabe aclarar que en los

sistemas microbianos existen pérdidas energéticas, siendo en promedio eficientes en un 50% de transferencia energética (Rittmann y McCarty, 2001; Barton, 2005).

Durante el catabolismo, la energía que se obtiene de los donadores de electrones es conservada mediante acarreadores específicos que pasan de su forma reducida a oxidada, dependiendo de si están conduciendo electrones o no, tal como el nicotin adenin dinucleótido NADH (en su forma reducida) y  $\text{NAD}^+$  (en su forma oxidada), el cual es una coenzima (cofactor orgánico) que funge como transportador de electrones y difunde libremente a través de la membrana citoplasmática involucrada en las reacciones biosintéticas anabólicas (generación de energía), y que además es responsable de catalizar la biodegradación de cianuro cuando el oxígeno es el aceptor terminal de electrones en presencia de una fuente de carbono (Dzombak et al., 2006; Rittmann y McCarty, 2001). Es así como los electrones llegan hasta la cadena de transporte de electrones, donde la energía almacenada en los acarreadores es transferida a través de un conjunto de citocromos y proteínas unidas a la membrana citoplasmática hasta llegar al aceptor terminal de electrones para la síntesis de ATP que es el proceso conocido como fosforilación oxidativa. De forma más específica, la fosforilación oxidativa es el proceso mediante el cual la respiración genera energía para la célula, esto se logra al generar un gradiente de protones entre el interior y el exterior de la membrana citoplasmática. Ese gradiente de protones creará una fuerza protomotriz que activará el mecanismo de la ATP sintetasa, generando energía para unir un grupo fosfato a una molécula de ADP y sintetizar así ATP. Este proceso se conoce como respiración (Rittmann y McCarty, 2001).

El proceso de respiración se esquematiza en la Figura 4, en donde los números romanos representan los complejos de la cadena respiratoria. El complejo I refiere al sistema NADH deshidrogenasa, el complejo II se omite en la ilustración, pero esta conformado por el sistema succinato deshidrogenasa, el complejo III se conoce como sistema citocromo bc, y el IV contiene los componentes citocromo oxidasa. La razón por la cual es omitido el complejo II es por que los complejos I, III y IV son los responsables de bombear protones hacia el exterior. El complejo V es conocido como ATP sintetasa, y es en donde los electrones bombeados por los complejos son translocados hacia el interior de la membrana por un gradiente electroquímico (mayor concentración de protones en el exterior que en el interior) (Mathews et al., 2000; Barton, 2005).



**Figura 4.** Transporte de protones mediante los complejos de la cadena respiratoria. Modificado de Mathews et al. (2000).

Contrariamente, existe un proceso en donde los microorganismos no utilizan aceptores terminales de electrones, ya que usan compuestos orgánicos como donadores y aceptores de electrones. Este proceso es conocido como fermentación y ocurre mediante un mecanismo conocido como fosforilación a nivel de sustrato en donde la formación de ATP ocurre directamente a través de la oxidación de un donador de electrones, en lugar de transferirse a través de una cascada de proteínas y citocromos (fosforilación oxidativa). Este proceso de fermentación involucra la producción de piruvato además de compuestos orgánicos, tales como etanol, propionato, acetato, formiato, los cuales funcionan como aceptores de electrones (al no existir aceptores terminales de electrones), y son indispensables en la regeneración del NAD<sup>+</sup> a partir del NADH (Rittmann y McCarty, 2001; Barton, 2005).

A diferencia del cálculo teórico de energía libre en presencia de un aceptor terminal de electrones, la energía libre en los procesos de fermentación debe ser estimada utilizando la energía libre neta asociada a los productos orgánicos, asignando a los mismos como aceptores de electrones. Este proceso se caracteriza por tener un menor rendimiento de ATP.

En todos los experimentos del presente trabajo (con excepción de un experimento en condiciones anóxicas), se trabajó con condiciones aerobias y se empleó lactato como

sustrato donador de electrones, y oxígeno como aceptor terminal de electrones por lo que como referencia la energía libre de Gibbs resultante teórica fue de  $-1326.12 \text{ kJ mol}^{-1}$  lactato. Es importante aclarar que el motivo por el cual no fue utilizada glucosa en la presente tesis, es porque su adición puede dar lugar a la reacción química de la glucosa con el cianuro, aumentando un átomo de carbono (proveniente del cianuro) en la estructura del monosacárido (Luque-Almagro et al., 2005).

En el caso de la fermentación de lactato a acetato (como aceptor de electrones), la energía libre de Gibbs resultante sería es de  $-58.68 \text{ kJmol}^{-1}$  lactato, energía considerablemente menor que la teórica considerando al oxígeno como aceptor terminal de electrones. Bajo esta lógica se espera que en los procesos de fermentación, la energía libre para síntesis de biomasa sea menor en comparación con aquellos de respiración aerobia.

### **II.1.3 Clasificación de microorganismos según el pH ambiental**

La clasificación de los microorganismos según el intervalo de pH óptimo para crecer es la siguiente: pH entre 1 y 5, acidófilos; entre 6 y 7, neutrófilos y ; entre 8 y 12, alcalófilos (Wolfe, 2005; Rittmann y McCarty, 2001; Barton, 2005).

Los microorganismos alcalófilos son el objeto de estudio en el presente trabajo y se discuten con mayor detalle en la siguiente sección (II.2).

### **II.2. Microorganismos alcalófilos**

Los microorganismos alcalófilos (al igual que los microorganismos acidófilos) son clasificados como extremófilos (Barton, 2005). Los microorganismos alcalófilos poseen una membrana citoplasmática con una carga externa resultante de la segregación de los protones e iones hidroxilo. Esta diferencia de cargas permite tener un gradiente electroquímico de protones, el cual es necesario para el óptimo funcionamiento y crecimiento celular (Barton,2005). Por otro lado, los microorganismos alcalófilos están expuestos a un medio alcalino, siendo en este caso más alcalino que el interior de la membrana citoplasmática, revirtiendo así la mecánica de cargas explicada previamente. Para regular la diferencia de cargas que existe entre el interior de la membrana (debido al pH más ácido) y el medio exterior, estos microorganismos llevan a cabo procesos de autoregulación conocidos como homeostasis de pH (Barton, 2005). Sin embargo, a la fecha,

las adaptaciones moleculares y bioquímicas en los microorganismos alcalófilos concernientes a la homeostasis de pH han sido poco estudiadas. Los mecanismos adaptativos y regulatorios encontrados en la especie *Bacillus* sp, en medio aerobio y a condiciones alcalófilas, mostró dos mecanismos de homeostasis, pasivos y activos (Borkar, 2015).

Dentro de los mecanismos pasivos, se reporta que las bacterias son capaces de cambiar los valores de pH externo a un valor de pH apto para su crecimiento, creando así su propio microambiente. Las bacterias alcalófilas poseen mayores capacidades de amortiguamiento externo y dentro del citoplasma en comparación con bacterias no alcalófilas. Se ha propuesto que esta capacidad está dada por altas concentraciones de proteínas básicas o poliaminas en las células. Los componentes de la pared celular de los alcalófilos juegan un papel clave para proteger a la célula de ambientes alcalinos. En un cultivo de *Bacillus* sp. se encontraron ácidos orgánicos como el ácido galacturónico ( $C_6H_{10}O_7$ ), ácido glucorónico ( $C_6H_{10}O_7$ ), ácido glutámico ( $C_5H_9NO_4$ ), ácido aspártico ( $C_4H_7NO_4$ ), ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ), los cuales al deprotonarse están cargados negativamente. Las cargas negativas de los compuestos en la pared celular adsorben sodio e iones hidronio y repelen iones hidróxido, ayudando a las células a crecer en ambientes alcalinos. De igual manera, se ha reportado que en *Bacillus* spp, los bacilos alcalófilos poseen un grupo diverso de ácidos grasos de cadena ramificada en sus lípidos membranales. Borkar. (2005) resume que una característica sobresaliente de los alcalófilos es el hecho de que su membrana citoplasmática contiene una alta concentración de componentes de la cadena respiratoria, tales como los citocromos de tipo a, b y c. Además, plantea que esta alta concentración de componentes de la cadena respiratoria es el mecanismo por el cual los alcalófilos maximizan la transmisión de transferencia de protones producidos entre los componentes de la cadena respiratoria y la ATPasa (Borkar, 2005).

Dentro de los mecanismos activos, se reporta que el pH citoplasmático en los microorganismos alcalófilos se mantiene hasta 2 unidades de pH por debajo del pH externo. Como resultado de esto, el gradiente de pH se revierte (ácido en el citoplasma) con respecto a una fuerza conductora quimiosmótica. Sin embargo, las células de los alcalófilos al igual que otras bacterias aerobias, extrusionan protones durante la respiración, acidificando así una región cercana a la membrana. Después del proceso de extrusión de protones, ocurre



una acumulación de protones dependientes del ion  $\text{Na}^+$ , resultando en un gradiente de protones, lo cual se traduce en una concentración de  $\text{H}^+$  mayor en el citoplasma que en el medio externo y un gradiente de  $\text{Na}^+$  interno menor que el externo. Esta función es realizada por un antiportador  $^+/\text{H}^+$  que intercambia el  $\text{Na}^+$  interno por los  $\text{H}^+$  externos, ambos iones son transportados contra su gradiente de concentración a pH elevados. Debido a esto, la mayoría de las bacterias alcalófilas requieren la presencia de  $\text{Na}^+$  no solo para su crecimiento, sino para su movilidad y coincide con que los ambientes alcalinos naturales contienen niveles elevados de sodio (Barton, 2005). En la presente tesis no se contempló dar seguimiento a la concentración de sodio, sin embargo, se aseguró la adición de este ion a los sistemas experimentales mediante lactato de sodio e hidróxido de sodio, con concentraciones variables entre 80 y 200  $\text{mmol L}^{-1}$  de  $\text{Na}^+$ . Todos los bacillus alcalófilos a pH alcalino poseen una ATPasa F1 F0 localizada dentro de la membrana citoplasmática, la cual ayuda a la traslocación de protones (Borkar, 2005).

### **II.2.1 Catabolismo y particularidades metabólicas de los microorganismos alcalófilos**

Una vez discutidos los mecanismos básicos que permiten el funcionamiento y crecimiento óptimo de las células alcalófilas, es importante discutir sobre la utilización de carbono orgánico y producción de ácidos grasos volátiles en este tipo de microorganismos.

La composición de los compuestos orgánicos excretados dependerá de los factores ambientales, así como del sustrato empleado y estado de oxidación del carbono contenido. Un factor clave que determina la composición de los productos excretados es el pH externo. A valores de pH de 7 o superiores a este, los productos predominantes serán acetato, etanol y formiato, con concentraciones moderadas de succinato. Cuando el pH es disminuido por debajo de 7, se promueve la excreción de lactato y la conversión de formiato a hidrógeno molecular y dióxido de carbono (Wolfe, 2005).

Al igual que los reportes sobre los mecanismos básicos de homeostasis de pH en los microorganismos alcalófilos, los reportes sobre la utilización y fraccionamiento de carbono orgánico en este tipo de microorganismos son limitados. Asimismo, en los reportes existentes las fuentes de carbono y nitrógeno más utilizadas son glucosa y amonio (debido al pH neutro del medio de cultivo), respectivamente y no se encuentra información sobre la utilización y fraccionamiento de carbono orgánico utilizando al lactato como fuente de

carbono y donador de electrones, ni al cianuro como fuente de nitrógeno, por lo que la realización de este trabajo contribuye de forma significativa al respecto.

Los hallazgos de Paavilainen et al. (1994, 1995) son de especial relevancia para esta tesis. Al estudiar el catabolismo de varias especies de *Bacillus* sp. alcalófilos cultivados a pH iniciales de 10.3, se encontró que a pH alcalinos y utilizando glucosa como fuente de carbono, los ácidos orgánicos producidos son en su mayoría acetato y en menor proporción formiato en comparación con otros compuestos como etanol y ácido isobutírico producidos a pH neutros (Paavilainen et al., 1994). Los autores concluyen que a pH alcalinos los microorganismos alcalófilos producen mayores concentraciones de ácidos orgánicos de bajo peso molecular (como acetato y formiato) con un número mínimo de protones en su estructura para ser deshidrogenados. Los autores también reportaron que a pH alcalinos, los protones formados debido a la formación de NAD(P) son excretados para acidificar el medio, en comparación a lo que sucede a pH ácido, donde se excretan hidroxiácidos para evitar la acidificación (Paavilainen et al., 1994).

En un trabajo posterior se estudió el catabolismo y la dinámica del pH asociados a cultivos aerobios, en lote, de la especie *Bacillus circulans* var. *alkalophilus*, utilizando glucosa como donador primario de electrones y fuente de carbono. Se reportó la recuperación casi estequiométrica de carbono consumido en los ácidos orgánicos, acetato y formiato. Además, se varió el suministro de oxígeno y se observó que a mayor suministro de oxígeno, la acidificación fue mayor, mientras la producción de ácido fórmico disminuyó entre 30 y 40 %, con respecto a los sistemas limitados en oxígeno. Además, se encontró que la acidificación producida mostró una relación con la suma de los ácidos orgánicos, acetato y formiato (Paavilainen et al., 1995).

El reporte de la formación de acetato y formiato a pH alcalino es sustentado por el trabajo de Graham y Lund. (1983), quienes estudiaron el catabolismo de la especie *Streptococcus* sp. en medio aerobio y pH alcalino utilizando como fuente de carbono glucosa, y en donde nuevamente encontraron los ácidos orgánicos formiato y acetato. También se reporta que una de las implicaciones de trabajar a pH alcalino (pH > 9) es la producción en mayores proporciones de formiato, y etanol comparado con la única producción de acetato. Otra de las implicaciones de trabajar a pH alcalino (pH de 10.5), es la disminución de la velocidad

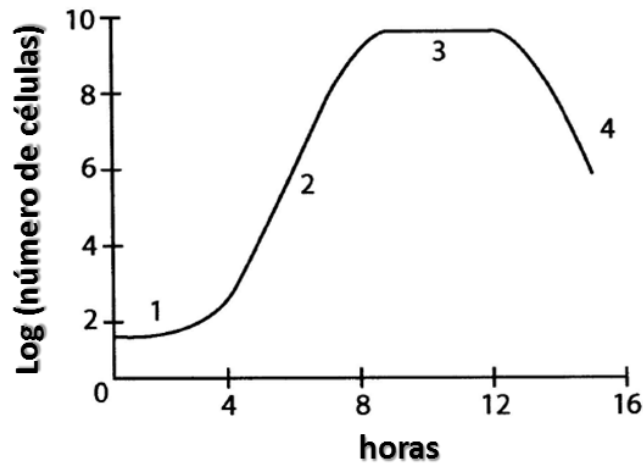
de crecimiento y la producción de biomasa a pesar de que el consumo de glucosa es similar al encontrado a menores valores de pH.

Finalmente, Wolfe (2005) abordó de forma general el metabolismo de asimilación y de excreción de acetato en las células microbianas. Este autor reporta que utilizando glucosa como fuente de carbono orgánico, y a pH cercano o superior a 7, los productos de fermentación son acetato, etanol y formiato, y que mientras disminuyen el pH, las células producen lactato en vez de acetato y formiato. La ruta metabólica en medio aerobio y anóxico que conlleva a la formación de formiato a partir de piruvato es mediada por la enzima piruvato formiato liasa, y produce además acetyl CoA (compuesto intermediario clave en el metabolismo celular que constituye un paso obligado para la entrada en el ciclo de Krebs) en medio anóxico. El artículo de Wolfe (2005) menciona además que en ausencia de un ciclo de Krebs, la regeneración del  $\text{NAD}^+$  se logra transfiriendo los equivalentes reducidos en intermediarios metabólicos parcialmente oxidados (formiato, lactato, succinato y etanol), los cuales son excretados junto con el acetato.

### **II.3 Fases de crecimiento microbiano y ajustes al modelo de Gompertz**

Una vez explicadas las cuestiones metabólicas relacionadas con el crecimiento celular, y teniendo claro que la síntesis celular consiste en incorporar elementos químicos como carbono y nitrógeno en forma reducida, en la presente sección se discute sobre las etapas típicas observadas durante el crecimiento microbiano, el cual puede ser determinado por medidas de densidad óptica y gravimetría. Además, se discute también sobre el modelo de crecimiento poblacional de Gompertz, para describir el crecimiento microbiano y algunas otras consideraciones de relevancia para la comprensión del tema.

Las fases típicas de crecimiento microbiano se ejemplifican en la Figura 5, las cuales ocurren en el orden: 1) fase lag o de retraso, 2) fase exponencial, 3) fase estacionaria, 4) fase de muerte o decaimiento. La duración de cada etapa depende de la especie microbiana y condiciones experimentales evaluadas.



**Figura 5.** Fases típicas de crecimiento microbiano en escala semilogarítmica (Modificado de Barton, 2005).

La fase de retraso es la fase inicial de la curva típica de crecimiento microbiano durante la cual este es nulo o limitado. La ocurrencia de esta fase se debe a la aclimatización del inóculo microbiano inicial a las fuentes de carbono, nitrógeno, pH y oxígeno disuelto. La fase de crecimiento exponencial o logarítmico es aquella en la que se alcanza la velocidad máxima de crecimiento. La velocidad máxima alcanzada será dependiente de la asimilación de las fuentes de nitrógeno y carbono (Barton, 2005).

Al iniciar una nueva cinética, es importante partir siempre de la misma fase de crecimiento del cultivo que se usa como inóculo o de la misma concentración de biomasa inicial, típicamente el inóculo se toma en la fase exponencial del cultivo. De esta forma se logra la reducción en la fase lag (Barton, 2005).

La fase estacionaria se caracteriza por ser un periodo en el cual la síntesis celular es constante, dicho de otra forma, existe un equilibrio entre la velocidad de síntesis celular y la velocidad de muerte celular. Finalmente, la fase de decaimiento celular ocurre una vez que la velocidad de muerte celular es mayor a la velocidad de síntesis de nuevas células (Barton, 2005).

Respecto al uso de un modelo ajustado a las fases típicas de crecimiento microbiano, en el presente trabajo se utilizó el modelo de crecimiento sigmoide de Gompertz. Dicho modelo ha sido empleado comúnmente para describir el crecimiento demográfico y crecimiento

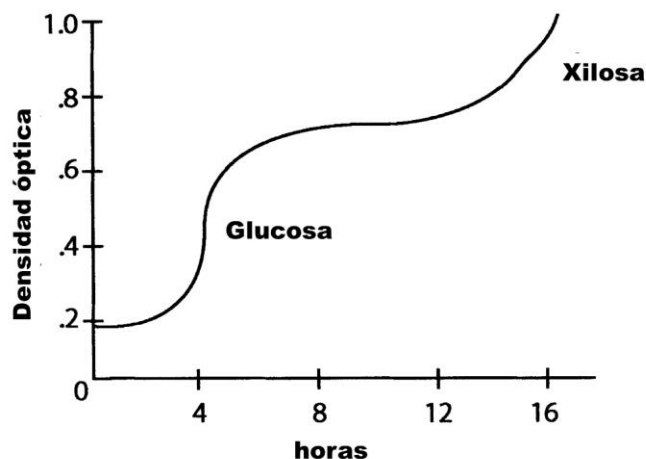
microbiano. Para sistemas homogéneos, el modelo es capaz de ajustar las fases de retraso, exponencial y estacionaria con factores de determinación superiores a 0.97, lo cual permite estimar las velocidades máximas de crecimiento microbiano o de consumo de diversos sustratos o fuentes de nitrógeno. Además, en el caso de las cinéticas microbianas, el modelo permite conocer las coordenadas del punto de inflexión de la fase exponencial, es decir, el tiempo al cual se presenta la velocidad máxima de producción o consumo, el tiempo máximo de retraso y el velocidades máximas de producción o consumo que se puede encontrar en el sistema modelado.

Las variables del modelo presentado en la Ecuación 1 corresponden a: “A” es la máxima concentración (unidades) del parámetro representado en el eje de la ordenada, “k” es la constante cinética (unidades) de primer orden que representa la velocidad de producción o consumo del parámetro evaluado, “t” es el tiempo (unidades), “y” es la concentración consumida o producida (unidades) del parámetro alimentado, “B” es es un parámetro adimensional definido por  $B = \exp(k tC)$  y “tC” es el punto de inflexión que determina el punto de la máxima velocidad de “y”.

$$y = A \cdot \exp[-B \exp(-kt)] \quad (\text{Ecuación 1})$$

Adicionalmente, existe un tipo de comportamiento en el crecimiento microbiano denominado diaúxico. Ocurre generalmente por la presencia de dos fuentes de carbono, una fuente de mayor y otra de menor afinidad. Un ejemplo ilustrativo para este comportamiento es el presentado en la Figura 6, para la cual la fuente preferida de los microorganismos del ejemplo es glucosa y la de menor afinidad xilosa. Se observa que cuando termina el consumo de glucosa se requiere un periodo de retraso para iniciar el consumo de la fuente de carbono menos afin, xilosa (Barton, 2005).

Además, se reporta que el comportamiento diaúxico también puede ocurrir cuando existen limitaciones de nitrógeno o cuando existen cambios en los aceptores terminales de electrones en el sistema. Un ejemplo claro de esto ocurre en la remoción de nitrógeno en aguas residuales, en donde en una primera etapa aerobia ocurre el proceso de nitrificación (oxidación de amonio (a pH de ligeramente alcalino a neutro) a nitrato) y posteriormente en una etapa anóxica ocurre la desnitrificación (reducción de nitrato a nitrógeno molecular) (Barton, 2005).



**Figura 6.** Comportamiento diauxico en el crecimiento microbiano medido a través de la densidad óptica (Adaptado de Barton, 2005).

#### II.4 Biodegradación de cianuro y cianato

En esta sección se discuten los reportes concernientes a los microorganismos capaces de convertir el ion cianuro en productos de biodegradación con menor toxicidad, o bien asimilarlo como fuente de nitrógeno para sintetizar células.

El cianuro es un compuesto ubicuo en la naturaleza, por lo tanto, puede ser convertido o utilizado por una gran variedad de microorganismos. Esta conversión, comúnmente denominada biodegradación, ocurre mayormente en organismos procariontes y consiste en la transformación de cianuro a moléculas orgánicas o inorgánicas de menor toxicidad que pueden ser posteriormente metabolizadas a amonio/amoniaco, nitrato y dióxido de carbono o metano (Luque-Almagro et al., 2005; Solomonson., 1981; Dzombak et al., 2006).

La biodegradación de cianuro libre y compuestos asociados puede ocurrir en presencia de una variedad de fuentes de carbono, como glucosa, acetato, fenol, etc. Sin embargo, también se reporta que el cianuro libre, tiocianato, y cianocomplejos metálicos pueden ser utilizados como única fuente de carbono y/o nitrógeno (Luque-Almagro et al., 2005; Karavaiko et al., 2000).

Además de las fuentes de carbono, nitrógeno, nutrientes y otros cofactores metabólicos, la biodegradación de cianuro depende de las condiciones fisicoquímicas (pH, temperatura, salinidad, entre otros), disponibilidad de aceptores y donadores de electrones.

La degradación de cianuro libre, ha sido observada bajo una amplia variedad de condiciones fisicoquímicas, siendo la más común a pH neutro (6-7). Sin embargo, en valores neutros de pH no es posible discernir si se debe a un proceso biológico intracelular o si corresponde a un proceso fisicoquímico, asociado a la modificación del medio circundante por la actividad microbiana o a la volatilización del cianuro libre por equilibrio químico entre la solución acuosa y la atmósfera. En este punto, es importante mencionar que, los reportes sobre la biodegradación de cianuro libre a pH alcalino (pH>9) son menos abundantes (Dumestre et al., 1997; Adjei et al., 1999; Akcil et al., 2003; Luque-Almagro et al., 2005). Las condiciones alcalinas son de interés en el presente estudio debido a que el aislamiento de los microorganismos y experimentos desarrollados se realizaron en condiciones alcalinas (pH  $\approx$  10.5), ya que el proceso de lixiviación para la obtención de oro y plata se realiza a pH entre 10 y 11.

#### **II.4.1 Rutas metabólicas de biodegradación de cianuro**

Existen tres rutas metabólicas generales para la degradación de cianuro (Tabla 1): (1) oxidativa, (2) reductiva, e (3) hidrolítica, en las cuales el cianuro se convierte a moléculas más simples, por ejemplo: formamida, ácido fórmico, y amonio/amoniaco, que pueden posteriormente ser asimiladas como fuentes de carbono o nitrógeno para crecimiento celular a expensas de energía metabólica (Dzombak et al., 2006).

**Tabla 1.** Rutas metabólicas para la biodegradación de cianuro y tiocianato (Adaptado de Dzombak et al., 2006)

Cianuro libre (CN <sup>-</sup> /HCN)	
<u>Reacciones oxidativas</u>	
Cianuro monooxigenasa	
$\text{HCN} + \text{O}_2 + \text{H}^+ + \text{NAD(P)H} \rightarrow \text{HCNO} + \text{NAD(P)}^+ + \text{H}_2\text{O}$	
Cianuro dioxigenasa	
$\text{HCN} + \text{O}_2 + 2\text{H}^+ + \text{NAD(P)H} \rightarrow \text{CO}_2 + \text{NH}_3 + \text{NAD(P)}^+$	
<u>Reacciones reductivas</u>	
$\text{HCN} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{CH}_2=\text{NH} \rightarrow \text{CH}_2=\text{NH} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_2=\text{O}$	
↓	
$\text{CH}_2=\text{NH} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{CH}_3-\text{NH} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{CH}_4 + \text{NH}_3$	
Tiocianato (SCN <sup>-</sup> )	
Ruta del carbonilo (tiocianato hidrolasa)	
$\text{SCN}^- + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{COS} + \text{NH}_3 + \text{OH}^-$	
Ruta del cianato (cianasa)	
$\text{CNO}^- + 3\text{H}^+ + \text{HCO}_3^- \rightarrow \text{NH}_4^+ + 2\text{CO}_2$	
<u>Reacciones hidrolíticas</u>	
Cianuro hidratasa	Cianidasa
$\text{HCN} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HCONH}_2$	$\text{HCN} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HCOOH} + \text{NH}_3$



Las reacciones oxidativas requieren nicotinamida adenina dinucleótido en su forma reducida (NAD(P)H), y se han propuesto dos posibles rutas metabólicas oxidativas. En la primera, la enzima cianuro monooxigenasa convierte el cianuro a cianato. Enseguida, la enzima cianasa cataboliza la reacción a los productos amonio y dióxido de carbono, siendo la reacción dependiente del anión bicarbonato y cuya estequiometría rinde 1 mol de dióxido de carbono y 1 mol de amonio por cada mol de cianuro consumido. La enzima cianuro monooxigenasa se ha encontrado en pocas especies microbianas, como *Pseudomonas fluorescens*, mientras la enzima cianasa es más común, al encontrarse en una gran variedad de especies microbianas, en hongos y plantas (Wang et al., 1996). La segunda ruta metabólica (mediada por la enzima cianuro dioxigenasa) se ha observado en *Pseudomonas spp*, *Escherichia. coli* y *Bacillus pumillius*. Involucra una sola reacción enzimática catalizada por la enzima cianuro dioxigenasa para producir amonio/amoniaco y dióxido de carbono (Kunz et al., 1992).

Adicionalmente, Fernández et al. (2003) reportaron la formación de formamida como producto final teniendo como intermediario al cianato, de acuerdo con la Reacción 6. Los autores proponen que la ruta metabólica es la mediada por la enzima cianuro monooxigenasa, sugiriendo así la reducción de cianato (carbono con estado de oxidación +4 a formamida con carbono con estado de oxidación +2).



La presente tesis difiere de los estudios anteriormente mencionados, en donde la formamida es producida directamente por hidrólisis del cianuro sin la formación de un intermediario.

La actividad de las rutas metabólicas oxidativas ocurre en valores de pH desde neutros hasta alcalinos, utilizando glucosa, cianuro y acetato como fuente de carbono utilizando oxígeno como aceptor terminal de electrones (Chapatwala., 1998, Kunz et al., 1992, Figueira et al., 1996), lo cual es descrito detalladamente en la sección II.4.2.

Respecto a las rutas reductivas para la degradación de cianuro libre, generalmente se considera que ocurren en medio anóxico y en hongos, sin embargo, se han observado también en medio aerobio en la especie *Pseudomonas fluorescens* (Kunz et al., 1992). La actividad de esta enzima ha sido estudiada en medio neutro utilizando como fuentes de carbono glucosa y cianuro (Kao et al., 2003; Dzombak et al., 2006).

Se reporta que las rutas reductivas derivan de la acción de la enzima nitrogenasa, enzima cuya mayor función es fijar nitrógeno atmosférico, pero puede utilizar cianuro como sustrato (con un sitio de unión en la enzima diferente al del N<sub>2</sub>) para su conversión final a CH<sub>4</sub> y amonio, teniendo intermediarios resultantes de la transferencia de pares de electrones, razón por la cual las reacciones mostradas en la Tabla 1 son de media celda. Las rutas reductivas se han reportado a pH 7, utilizando glucosa y cianuro como única fuente de nitrógeno (Kao et al., 2003; Kunz et al., 1992; Dzombak et al., 2006), y cuyas condiciones operacionales y tiempos de biodegradación se describen detalladamente en la sección II.4.3.

Finalmente, las rutas hidrolíticas para biodegradación de cianuro son catalizadas por la enzima cianuro hidratasa y por la enzima cianidasa. La reacción mediada por cianuro hidratasa conlleva a la formación de formamida, mientras la reacción mediada por la enzima cianidasa genera formiato y amonio (O'Reilly y Turner, 2003). Respecto a la generación de formamida, la enzima involucrada en su producción es comúnmente encontrada en hongos, siendo la excepción aquella encontrada en la cepa bacteriana *Pseudomonas fluorescens* (Kunz et al., 1992). La actividad de estas rutas se reporta desde pH neutros hasta alcalinos con glucosa, cianuro, extracto de levadura, manosa y fructosa, como fuentes de carbono.

A pesar de que en la mayoría de los microorganismos la biodegradación de cianuro ocurre bajo un único tipo de ruta metabólica, existen especies microbianas como *Pseudomonas fluorescens*, capaces de biodegradar cianuro al menos por 3 rutas metabólicas diferentes, en función de la concentración de cianuro y disponibilidad de oxígeno (Dzombak et al., 2006). Para *Pseudomonas fluorescens*, bajo condiciones aerobias y anóxicas, se ha observado la actividad de cianidasa y de cianuro hidratasa, así como la producción de formamida y formiato (Kunz et al., 1992). Sin embargo, los reportes de biodegradación aerobia son considerablemente más abundantes que aquellos realizados en medio anóxico.

Los reportes mencionados en esta sección son descritos detalladamente en las secciones II.4.2 y II.4.3.

#### II.4.2 Biodegradación aerobia de cianuro

A pesar de que existe una importante cantidad de reportes sobre biodegradación de cianuro en medio aerobio, la mayoría se han llevado a cabo a un valor de pH entre 7 y 8.6, siendo los más abundantes a pH 7 (Dzombak et al., 2006; Chapatwala., 1998; Kao et al., 2003; Kunz et al., 1992; Figueira et al., 1996; Quan et al., 2004).

Es importante mencionar que los estudios presentados en esta sección utilizan cepas puras de microorganismos, en lugar de consorcios microbianos. Además, su finalidad es presentar aspectos básicos sobre la biodegradación de cianuro y se han enfocado solo en las especies capaces de biodegradar cianuro, los tiempos de consumo y las actividades enzimáticas. Cabe destacar que estos estudios no presentan información que pueda ser utilizada directamente en algún proceso industrial, aún cuando algunos microorganismos han sido encontrados en sitios mineros, tales como los generos, *Bacillus*, *Alcaligenes*, y *Arthrobacter* (Dzombak et al., 2006; Akcil et al., 2003).

En la presente tesis no se llevo a cabo la identificación de los microorganismos o consorcios de microorganismos estudiados, sin embargo los resultados que se obtuvieron sientan la base para una posible aplicación industrial.

Entre algunos de los estudios evaluados a pH neutro, se encuentran los reportados por Chapatwala. (1998), Kao et al. (2003), Kunz et al. (1992), Figueira et al. (1996), Quan et al (2004), entre otros.

Por ejemplo, en el estudio de Chapatwala. (1998) se reportó la biodegradación aerobia de cianuro a concentraciones de 2,000 a 10,000  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , utilizando una cepa pura de *Pseudomonas putida* y cianuro como única fuente de carbono a pH de 7.5. Los autores observaron inhibición a concentraciones de cianuro superiores a 4,000  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Las concentraciones iniciales de cianuro de 2,000 y 4,000  $\mu\text{mol L}^{-1}$  fueron degradadas en un 80%, dónde solo 10 % del carbono proveniente de la degradación de cianuro fue utilizado para síntesis de biomasa, mientras los productos de biodegradación de cianuro fueron únicamente amonio y dióxido de carbono proponiéndose, en base a la obtención de estos productos, como posibles rutas de biodegradación las mediadas por la enzima cianuro dioxigenasa y cianuro oxigenasa. La biodegradación se completó al cabo de 120 h para las concentraciones de 2,000 y 4,000  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

El estudio de Kao et al. (2003) consistió en la biodegradación de una concentración de 900  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de cianuro como única fuente de nitrógeno a pH 7 y empleando glucosa como fuente de carbono, a partir de un preinóculo de microorganismos de la cepa pura *Klebsiella oxytoca*, y evaluar el efecto producido por la adición de amonio. La concentración de cianuro empleada fue degradada en 80 h. Por otro lado encontraron también que los microorganismos, cuando son acondicionados previamente con cianuro, son capaces de degradar el cianuro en solo 4 h. Los productos de biodegradación encontrados fueron amonio y dióxido de carbono en donde se determinó que la biodegradación de cianuro fue mediada por la enzima nitrogenasa. Por otro lado, se encontró que una concentración de amonio de 20,000  $\mu\text{mol L}^{-1}$  con respecto a 900  $\mu\text{mol L}^{-1}$  del mismo, inhibe casi por completo la biodegradación de cianuro.

Finalmente, el estudio de Kunz et al. (1992) consistió en la biodegradación de cianuro a pH 7 en medio aerobio y anóxico, utilizando una cepa pura de *Pseudomonas fluorescens NCIMB 11764*, para la cual se utilizó glucosa como fuente de carbono. Se encontró que la cepa fue capaz de biodegradar cianuro en medio aerobio y anóxico. En medio aerobio se propuso la biodegradación mediante la ruta metabólica oxidativa con cianuro dioxigenasa, en base a los productos obtenidos (amonio y dióxido de carbono). Se logró la degradación de 5,000  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de cianuro en tan solo 0.6 h.

En medio anóxico se encontró que la biodegradación ocurrió mediante las rutas hidrolíticas con cianuro hidratasa y cianidasa, basado en la obtención de los productos formamida, ácido fórmico y amonio. La degradación total de cianuro fue de 0.5  $\text{mmol L}^{-1}$  y 10  $\text{mmol L}^{-1}$  en 7 y 12.5 h respectivamente, teniendo cerca del 100% de recuperación distribuido entre formamida (55%) y amonio (45%), y observando que la concentración de dióxido de carbono producida fue mucho menor a aquella producida en medio aerobio. Los autores reportan que la cepa es capaz de cambiar su metabolismo de tal forma que en medio anóxico las rutas metabólicas son las hidrolíticas. Se encontró que la formamida producida no es consumida para sintetizar biomasa, y por tanto es acumulada en el medio.

Tanto en medio aerobio como en anóxico, la biomasa inicial con la que se trabajó fue de 400  $\text{mg L}^{-1}$  de biomasa aclimatada al cianuro, debido a que se encontró que las células

cultivadas con amonio como fuente de nitrógeno presentaban menores porcentajes de remoción de cianuro. Finalmente, los autores reportan su trabajo como el primer hallazgo de un cambio de ruta metabólica de tipo oxidativo (aerobio) a una ruta metabólica hidrolítica funcional en medio anóxico.

Los tres reportes descritos dan una idea sobre los tiempos de biodegradación total y diferentes rutas metabólicas en diferentes especies de microorganismos, sin embargo, difieren con respecto al trabajo de esta tesis en el pH operacional (pH 7), característico de microorganismos neutrófilos, siendo poco claros (con excepción del trabajo realizado por Kunz et al., 1992) sobre el control y cuantificación de la volatilización de HCN a ese pH. Es importante señalar que el pH operacional neutro es de alto riesgo en un escenario de biodegradación industrial debido a la toxicidad del ácido cianhídrico. Por otro lado, los reportes carecen de información sobre la producción de biomasa en los cultivos, y sobre el catabolismo a partir de la fuente orgánica de carbono y donador de electrones.

En comparación con los reportes en medio aerobio y pH neutro, los trabajos realizados en medio aerobio y en condiciones alcalinas son menos frecuentes, siendo de especial interés aquellos publicados por Adjei et al. (1999), Akcil et al. (2003) y Luque-Almagro et al. (2005) A pesar de que dichos trabajos no son tan recientes, resultan relevantes para la presente tesis debido a las condiciones experimentales similares (en cuanto pH se refiere) y destacan la necesidad de realizar más trabajos sobre este tema.

Adjei et al. (1999) evaluaron la biodegradación de cianuro en una cepa pura de *Burkholderia cepacia* a concentraciones desde 2,000 hasta 25,000  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , utilizando glucosa como fuente de carbono a un pH de 9. Los tiempos de biodegradación fueron de 120 a 150 h para todos los casos, y la biodegradación de cianuro ocurrió solamente en presencia de glucosa, indicando que el cianuro no fungió como fuente de carbono. La ruta metabólica fue aquella mediada por la enzima cianidasa, al encontrar amoniaco (debido al pH alcalino) y formiato como productos de biodegradación. Respecto al catabolismo, los autores reportan la formación de acetato y formiato, para lo cual, el formiato fue proveniente tanto de la degradación de glucosa como de la degradación de cianuro, sin embargo, especifican que la detección del formiato fue de tipo cualitativo, al no contar con la concentración a la cual fue producido.

Por otro lado, Akcil et al. (2003) trabajaron con cepas puras, estudiaron la biodegradación de cianuro con un consorcio de *Pseudomonas sp* a un pH de 10.5 utilizando el medio de cultivo King B diferenciable para *Pseudomonas*, con cianuro como fuente de carbono y nitrógeno. Se estudió la biodegradación de cianuro a concentraciones entre 100 y 400 mg L<sup>-1</sup> con tiempos de biodegradación entre 50 y 120 h para las concentraciones menores y mayores, respectivamente. Los productos de biodegradación fueron amoníaco y carbonato, sin embargo, no se determinaron las rutas de biodegradación involucradas. Desafortunadamente, en este estudio tampoco fue estudiada la producción de biomasa.

Finalmente, en el trabajo de Luque-Almagro et al. (2005), se evaluó la biodegradación de cianuro, así como el efecto de las fuentes de nitrógeno (amoníaco y nitrato) sobre la biodegradación de cianuro con la cepa pura *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344, utilizando acetato como fuente orgánica de carbono en un medio de cultivo M9 (compuesto por Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O, CaCl<sub>2</sub>, NaCl y acetato como fuente de carbono), en matraces Erlenmeyer colocados en agitación orbital a 230 rpm. Se encontró que el pH óptimo para crecimiento celular fue de 9. Además, se encontró que la biodegradación de cianuro, empleando éste como única fuente de nitrógeno a 1,000 µmol L<sup>-1</sup>, se llevó a cabo en 5 h, mientras que un esquema mixto de fuentes de nitrógeno, con concentraciones equimolares (2,000 µmol L<sup>-1</sup>) de cianuro y amoníaco, la biodegradación de ambas especies se completó en un intervalo de 17 a 20 h, presentando un comportamiento muy similar en los perfiles de consumo de ambos iones. Por otro lado, se evaluó la biodegradación de cianuro utilizando una concentración de 1,000 µmol L<sup>-1</sup> del mismo y una concentración 1,800 µmol L<sup>-1</sup> de nitrato, observando el consumo cuasi-total de cianuro en las primeras 8 h (concentración residual de 300 µmol L<sup>-1</sup> de cianuro), y el consumo total de nitrato entre las 8 y 12 h, para lo cual es importante enfatizar que el consumo de nitrato ocurrió hasta que el cianuro fue consumido. Los autores mencionan que hasta la publicación de su trabajo no se había reportado la inhibición de la actividad de la enzima nitrato reductasa (responsables de la asimilación de nitrato) debido a la presencia de cianuro.

Luque-Almagro et al. (2005) sugieren que la ruta metabólica intermediaria fue aquella mediada por la enzima cianuro monooxigenasa, con base en que en las células cultivadas con cianuro como única fuente de nitrógeno se detectó una alta actividad de la enzima

cianasa (enzima que cataliza la degradación de cianato a dióxido de carbono y amoníaco). A pesar de esto, no se realizó la cuantificación del compuesto cianato. Se sugiere además, que la biodegradación de cianuro es un proceso asimilativo dado que los mayores consumos de cianuro y de oxígeno coincidieron con la fase exponencial de crecimiento.

Cabe destacar que existen pocos estudios en donde se reporta la caracterización de las comunidades microbianas de sitios mineros, los únicos estudios con respecto a microorganismos degradadores de cianuro en terreros de lixiviación de oro, son aquellos pertenecientes a Dzombak et al. (2006) y Akcil et al. (2003), los cuales reportan que en este tipo de sitios se han encontrado los géneros *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, y *Bacillus*. Dzombak et al. (2006), reportan además que se ha logrado indentificar a la especie *Pseudomonas paucimobilis* en un sitio de lixiviación de oro en Dakota del Sur, EUA.

#### **II.4.3 Biodegradación anóxica de cianuro**

Existen pocos estudios realizados con bacterias anaeróbicas y principalmente están relacionados con la biodegradación de cianuro con microorganismos reportados con actividad metanogénica y sulfatoreductora. Entre los reportes existentes destacan los publicados por Annachhatre et al. (2000), Fallon et al. (1991, 1992) y Quan et al. (2004).

El trabajo publicado de Annachhatre et al. (2000) evaluó la biodegradación de cianuro con un consorcio metanogénico, utilizando un reactor en lote, y glucosa como fuente de carbono a pH 7 ajustado con NaOH. La ruta metabólica reportada fue la hidrolítica, en donde se produjo formamida, que posteriormente en una etapa intermediaria fue convertida a ácido fórmico y amoníaco, para concluir con la transformación del ácido fórmico a dióxido de carbono. En el estudio se evaluaron concentraciones iniciales de 1, 10, 25, 50 y 100 mg L<sup>-1</sup>, para lo cual se encontró que la biodegradación de cianuro desde concentraciones iniciales de 50 y 100 mg L<sup>-1</sup>, son degradadas en 48 h hasta concentraciones de 14 y 26.48 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. La producción de metano en el reactor fue inhibida a mayores concentraciones iniciales de cianuro, observando dicha inhibición desde concentraciones de 10 mg L<sup>-1</sup>. Finalmente, los autores sugieren que es posible que los microorganismos utilicen al formiato como sustrato, al tratarse de microorganismos metanógenos.

Por otro lado, en el estudio de Gijzen et al. (1999) se evaluó la biodegradación de cianuro con un consorcio microbiano metanogénico en un agua residual sintética con contenidos de almidón, acetato, propionato y butirato a pH 7 ajustado con NaOH. En el estudio se observaron porcentajes de degradación de cianuro entre 91 y 93% a velocidades de alimentación de hasta  $250 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  y tiempos de residencia hidráulica de 12 h. A pesar de esto, al igual que en el reporte de Annachhatre et al. (2000), se observó inhibición de la producción de metano y degradación de las fuentes de carbono a partir de una concentración de  $5 \text{ mg L}^{-1}$ , sin embargo, este problema es resuelto al aclimatar a la biomasa al cianuro previo a los estudios de biodegradación.

Finalmente, en el estudio de Quan et al. (2004) se reporta la biodegradación de cianuro libre a pH neutro, desde una concentración inicial de  $200 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $5.2 \text{ mg L}^{-1}$ ) hasta una concentración final de  $50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $1.3 \text{ mg L}^{-1}$ ), en un periodo de 17 días bajo condiciones sulfato reductoras, empleando sulfato como aceptor de electrones y lactato de sodio como donador de electrones y fuente de carbono a pH 7 - 7.2 ajustado con HCl 2 M. Se encontró además que la presencia de cianuro en el consorcio de bacterias sulfato reductoras inhibe la producción de sulfuro de hidrógeno a partir de una concentración de  $1,000 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ . Es importante mencionar que el estudio no considera la posible formación de tiocianato, como una posible interacción del cianuro libre con las especies reducidas de azufre en el sistema.

Una vez presentados los estudios sobre biodegradación de cianuro en medio anóxico, es importante observar que aquellos concernientes al estudio de los microorganismos metanógenos presentan tiempos de degradación de cianuro relativamente cortos en comparación con lo reportado para microorganismos sulfato reductores (tiempos de degradación de hasta 17 días). Es importante mencionar que los estudios no especifican que los microorganismos fuesen capaces de utilizar otros aceptores de electrones, tal como el nitrato. Esta observación es importante para la discusión de resultados generados en este trabajo de tesis.

Contrariamente a los artículos mencionados, el artículo de Landkamer et al. (2015) estudió las transformaciones anóxicas de nitrato y cianuro de una muestra de residuos de lixiviación de oro con cianuro en contacto con agua de proceso (con cianuro, nitrato y sulfato) sin la adición de carbono orgánico (como sustrato) ni agitación. Los resultados del



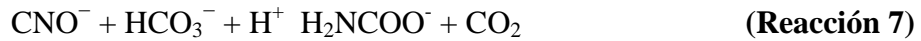
estudio indicaron que el cianuro fue hidrolizado a formiato y amoníaco (debido a que se trabajó a pH alcalino), para subsecuentemente consumir el formiato producido. El nitrato de la solución adicionada fue desnitrificado a nitrito, utilizando al formiato como donador de electrones. Se encontró además que el amoníaco y el nitrito fueron reducidos a nitrógeno molecular, ocurriendo para el caso del amoníaco el proceso denominado anammox (oxidación anóxica de amoníaco). El pH de inicio de la solución se ajustó entre 8.5 y 9.5 y no hubo necesidad de ajustar este parámetro durante todo el experimento. La temperatura del experimento fue 22°C y la biodegradación total de cianuro ( $27 \text{ mg L}^{-1}$ ) se llevó a cabo en 200 días.

Con excepción del artículo de Landkamer et al. (2015), los artículos que reportan la degradación de cianuro en medio anóxico son relativamente antiguos (entre 1991 y 2004), representando así un área de oportunidad para investigación, tal como se hizo en esta tesis.

#### **II.4.4 Biodegradación aerobia de cianato**

La degradación de cianato puede ocurrir de forma abiótica mediante reacciones de hidrólisis (cf. I.1.1.3) utilizando peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) como agente oxidante o sin agente oxidante (en agua pura), sin embargo, este proceso es lento (comparado con la biodegradación), especialmente en condiciones alcalinas. Utilizando  $\text{H}_2\text{O}_2$  a pH 9 y 25 °C, sin importar la concentración, la hidrólisis se completa entre 2 y 3 h, mientras que sin la presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  la degradación de 2.48 M de cianato se completa en 117 días (Dzombak et al., 2006; Wen et al., 1994), siendo esta última considerablemente mayor a la biodegradación que ocurre entre 1 y 2 días (Luque-Almagro et al., 2008; Anderson et al., 1990)

Por otro lado, se ha reportado la degradación biótica del cianato a pH neutro mediante la enzima cianasa. La enzima cianasa cataliza la descomposición del cianato a dióxido de carbono y amonio (o amoníaco en función del pH), produciendo carbamato como intermediario inestable. El proceso es dependiente del ion bicarbonato, el cual actúa como nucleófilo para degradar al cianato, tal como muestran las Reacciones 7 y 8. Se reporta que la conversión de carbamato a amonio/amoníaco y dióxido de carbono es instantánea, con unos pocos segundos de duración (Anderson et al., 1985; Luque-Almagro et al., 2008).



Anderson et al. (1990) sugieren que en cultivos de *E. Coli*, las bacterias cuentan con enzimas cianasa localizadas en el citoplasma capaces de realizar una desintoxicación de cianato asociado a eventos intracelulares, así como un sistema de permeasas las cuales permiten la desintoxicación del cianato extracelular, siendo el pH óptimo de 7. Los autores reportaron que los iones nitrato, nitrito, formiato y acetato son capaces de inhibir al cianato de forma competitiva por el sitio activo de la enzima. Es importante mencionar que dado que *E. coli* es una enterobacteria, es poco probable que se encuentre en sitios mineros. En este caso, *E. coli* fue empleada por los autores como un microorganismo modelo para llevar a cabo el estudio del operón de la cianasa y el metabolismo relacionado con la degradación de cianato, lo cual es clave para la discusión de los resultados generados en esta tesis.

Por otro lado, Luque-Almagro et al. (2008) estudiaron la actividad de la enzima cianasa en la especie *Pseudomonas pseudoalcaligenes* (CECT5344), encontrando que las células en presencia de amoníaco se ven afectadas en la producción de la enzima en comparación con aquellas cultivadas en presencia de cianuro y cianato. Además, se encontró que en experimentos con adición de cianato y amoníaco como fuentes alternas de nitrógeno, el consumo de cianato ocurrió hasta completar el consumo de amoníaco. Contrariamente, a pesar de no mostrar los datos ni las concentraciones utilizadas en el estudio, se menciona que cuando se adiciona nitrato al medio de cultivo como fuente de nitrógeno alterna al cianato, el consumo de nitrato ocurre hasta que se completa el consumo de cianato. Finalmente, se encontró que el pH óptimo para la actividad enzimática fue de 8.5.

Para ilustrar la variedad de fuentes de carbono y condiciones físicoquímicas, la Tabla 2 resume algunos datos de los diferentes reportes de biodegradación mencionados, así como sus condiciones físicoquímicas, fuentes de carbono y nutrientes.

**Tabla 2.** Microorganismos, pH, fuentes de carbono, medio y ruta metabólica reportados para la biodegradación de cianuro (Luque Almagro et al., 2005; Adjei et al., 1999; Chapatwala., 1998; Kunz et al., 1992; Annachhatre et al., 2000)

Especie	pH	Fuente de carbono	Composición del medio	Tipo de reactor	Ruta metabólica
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> CECT5344	7.5 – 11.5	Acetato	CaCl <sub>2</sub> , MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ,	Aerobio	Cianuro monoxigenasa y cianasa
<i>Burkholderia cepacia</i> cepa C3	8 - 10	Glucosa, fructosa, manosa	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; NaCl; MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O; FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	Aerobio	Hidrolítica a ácido fórmico y amoniac
<i>Pseudomonas putida</i>	7.5	Cianuro	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O; MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O; Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O; FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	Aerobio	Hidrolítica a amonio, formamida y dióxido de carbono
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	7	Glucosa	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; NaCl; MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O; FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	Aerobio/ Anerobio	Hidrolítica a amonio, formamida y ácido fórmico
Consortios metanogénicos (Especies no mencionadas)	6.48 – 8.66	Etanol, fenol y metanol	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ; Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O; MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O; FeCl <sub>3</sub> ; CoCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O; CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O; MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O; KCl; NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; NaHCO <sub>3</sub>	Anóxico	Hidrolítica a ácido fórmico

#### II.4.5 Tecnologías de tratamiento microbiológico de cianuro

Una vez discutidos los estudios de biodegradación de cianuro a escala laboratorio, cuyo propósito era contribuir al conocimiento básico sobre el metabolismo del cianuro, es importante mencionar que existen técnicas a escala industrial enfocadas a la aplicación de la biodegradación de cianuro para cumplir con las exigencias ambientales de cada país. A escala industrial, el mecanismo más utilizado en la biodestrucción del cianuro es la oxidación a dióxido de carbono y amonio. El amonio es utilizado como fuente de nitrógeno e incorporado al material celular, o bien, puede ser utilizado como donador de electrones para nitrificadores aerobios obligados. Se reporta que comúnmente los organismos degradadores de cianuro existen en conjunto con las bacterias nitrificantes. Los organismos nitrificantes, al ser aerobios obligados, utilizan al amonio como donador de electrones y al oxígeno como aceptor terminal de electrones (Dzombak et al., 2006).

Existen casos de tratamiento biológico de cianuro a escala industrial en terreros de lixiviación, los cuales han sido exitosos, tales como el de la mina Homestake y la compañía minera Hecla, cuyo seguimiento se encuentra documentado por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de América (Environmental Protection Agency [EPA], 1994).

En la mina Homestake, se implementó un sistema de tratamiento biológico para la degradación de cianuro, utilizando un arreglo en serie entre contactores biológicos rotatorios (RBC, por sus siglas en inglés) acoplados a biopelículas en dos etapas. En la primera etapa ocurría la biodegradación de cianuro a amonio utilizando 24 unidades de RBC con un total de 9290 m<sup>2</sup> de área superficial total y una hora de tiempo de retención, el exceso de biomasa era removido del reactor. En la segunda etapa se realizaba un proceso de nitrificación, utilizando 24 RBC con un área superficial total de 13 935 m<sup>2</sup> y 1.5 h de tiempo de retención. Los microorganismos predominantes eran *Pseudomonas paucimobilis* y se reportaron eficiencias de remoción entre 91 y 99.5 %, siendo las concentraciones de cianuro en el efluente tan bajas como 0.37 mg L<sup>-1</sup>. En esta etapa era posible precipitar metales y biomasa utilizando cloruro férrico, los cuales podían ser separados en un clarificador para ser dispuestos (EPA, 1994).

Respecto al caso de la compañía minera Hecla, en Yellow Pine Idaho, Estados Unidos, ésta completó sus operaciones de extracción de oro de un terrero de lixiviación. Como parte de la etapa de cierre de mina, utilizó un tratamiento biológico sobre el terrero. Se aplicó una solución bacteriana sobre el terrero, utilizando aspersores, en el cual percolaba la solución, degradando a su paso al cianuro. Al terminar la lixiviación de la solución bacteriana, ésta era recuperada y recirculada al terrero para repetirse el proceso de biodegradación.

Una vez completada la biodegradación de cianuro en los terreros, se aplicaron barreras vegetativas y materia orgánica sobre los terreros libres de cianuro para prevenir la erosión.

Las bacterias que fueron utilizadas para el tratamiento fueron nativas del terrero, y permitieron la biodegradación de cianuro hasta concentraciones menores a  $0.02 \text{ mg L}^{-1}$ . Desafortunadamente no se reporta el tipo de microorganismos ni los nutrientes utilizados (EPA, 1994).



### **Capítulo III. Materiales y métodos para evaluar las cinéticas de biodegradación de cianuro.**

En esta sección se describe la metodología que se utilizó en los experimentos de biodegradación de cianuro. También se describe la metodología para los experimentos relacionados indirectamente con la biodegradación de cianuro que corresponden a los sistemas abióticos de saturación de oxígeno de agua desionizada ajustada a pH 10.5 con NaOH (10 M). Dichos sistemas permitieron determinar los coeficientes de transferencia de masa de oxígeno ( $k_L \cdot a$ ), para calcular las velocidades de transferencia de oxígeno aire-agua (OTR, por sus siglas en inglés), y las velocidades de utilización de oxígeno (OUR por sus siglas en inglés) en los experimentos bióticos con agitación orbital.

Es importante mencionar que los consorcios microbianos evaluados en este estudio no fueron identificados por técnicas de biología molecular, ya que no era el objetivo principal de la presente tesis. Sin embargo, los microorganismos fueron observados por microscopía óptica (imágenes no recuperadas), observando fundamentalmente morfologías de bacilos y cocos.

Los experimentos bióticos directamente relacionados con la biodegradación de cianuro, empleando los consorcios microbianos alcalófilos estudiados, pueden ser agrupados en tres categorías: 1) experimentos con cianuro como única fuente de nitrógeno (cf. sección IV.2), 2) experimentos con nitrato o amoníaco como única fuente de nitrógeno (cf. sección IV.3) y 3) experimentos con ion cianuro y otra fuente alterna de nitrógeno (amoníaco o nitrato) (cf. secciones IV.4). A su vez, estos tres grupos de experimentos fueron subcategorizados en función de la transferencia de oxígeno al sistema en: 1) experimentos sin agitación, 2) con agitación a 150 rpm y, 3) con agitación a 370 rpm. Es importante mencionar que además, de forma exploratoria, se presenta un experimento en condiciones anóxicas sin agitación que empleó cianuro y nitrato como fuente de nitrógeno, y lactato como fuente de carbono y único donador de electrones, descrito a detalle al final de la sección III.5

Las tres velocidades de agitación seleccionadas se tomaron como referencia para estudiar la cinética de biodegradación de cianuro bajo escenarios extremos en donde: el oxígeno se presentó como reactivo limitante en un sistema controlado por difusión molecular de

oxígeno (escenario sin agitación); un escenario con la máxima tasa de transferencia de masa de oxígeno (escenario agitación a 370 rpm) y una condición intermedia de agitación a 150 rpm. Todos los valores de los parámetros cuantificados que se presentan en las Tablas y Figuras corresponden a promedios de duplicados con su correspondiente error estándar ( $\pm$  e.e). Tanto los experimentos de saturación de oxígeno (abióticos) como los experimentos de biodegradación de cianuro, fueron realizados por duplicado sin excepción alguna.

### **III.1 Determinación de los coeficientes de transferencia de oxígeno disuelto (aire-agua). Sistemas abióticos.**

Se realizaron cinéticas de saturación de oxígeno disuelto de 200 mL de una solución estéril de medio M9 modificado (descrito en la sección III.3) sin fuente de nitrógeno a un valor de pH de 10.5 y 30°C, empleando un agitador orbital a 150 y 370 rpm. La medición de oxígeno disuelto se realizó cada 10 y/o 20 minutos empleando un método electroquímico. Para lo cual se usó el electrodo de membrana de un medidor multiparámetro (Mca. Hanna Instruments, Mod. HI 9829). La calibración del electrodo de membrana para oxígeno disuelto se hizo mediante el porcentaje de saturación de oxígeno en la atmósfera en la ciudad de San Luis Potosí (a 1850 msnm). Antes de la calibración y mediciones en los experimentos, se verificó el óptimo estado de las membranas que rodean al electrodo, así como su correcto llenado con electrolito.

El análisis de las concentraciones de oxígeno en solución permite estimar los coeficientes volumétricos de transferencia de oxígeno disuelto de acuerdo a la Ecuación 2 (Santos et al., 2006).

$$\ln (C^*_{O_2} - C_{iO_2}) = -K_L a \cdot t + \ln (C^*) \quad \text{(Ecuación 2)}$$

Dónde:

$K_L \cdot a$  representa el coeficiente volumétrico de transferencia de masa de oxígeno (unidades) para la velocidad de agitación correspondiente;  $C^*$  es la concentración de saturación de oxígeno (unidades) en San Luis Potosí;  $C_i$  es la concentración de oxígeno disuelto (unidades) al tiempo de medición ( $t_i$ ).

La obtención del coeficiente volumétrico de transferencia de masa de oxígeno para los sistemas aerobios sin agitación se realizó a partir del cociente entre la difusividad de aire en



agua, reportado por Cussler (1997) e igual a  $D_{O_2, H_2O} = 2.1 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ , y el área de espejo en un matraz Erlenmeyer de 250 mL al contener 200 mL de solución e igual a  $6.157 \text{ cm}^2$ . Los resultados de estas pruebas se presentan y discuten en la sección IV.1.

### **III.2 Aislamiento, cultivo y preservación de microorganismos aerobios degradadores de cianuro a escala laboratorio**

Se obtuvo una muestra sólida extraída de núcleos de barreno proveniente de terreros de lixiviación, la cual fue tomada a una profundidad de 0 a 2 m. Para enriquecer los microorganismos nativos de dicha muestra, se pusieron en contacto 10 g de muestra sólida con 90 mL de medio de cultivo M9 modificado con cianuro como fuente de nitrógeno a una concentración  $2,000 \mu\text{mol L}^{-1}$  (cf. Sección III.3) y se ajustó a pH 10.5 con una solución 10 M de NaOH. Esto se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 250 mL almacenados en una cámara ambiental aislada de luz (para evitar la fotodegradación de cianuro) a  $30^\circ\text{C}$ , con un espacio de cabeza de aire aproximadamente de  $\frac{3}{4}$  del matraz. Todos los materiales y reactivos utilizados durante el cultivo (puntas de micropipeta, matraces, medio de cultivo, etc.) se esterilizaron previo a su uso en autoclave a una presión de 15 psi durante 15 minutos. Para asegurar la difusión libre de oxígeno y mantener condiciones óxicas se utilizó algodón envuelto con gasa comercial como tapa del matraz, ambos esterilizados en autoclave. El tapón de algodón con gasa permite la entrada de aire al cultivo sin que éste se contamine. La biomasa fue observable después de  $\sim 20$  días de contacto entre el sólido y el medio de cultivo.

Una vez que se observó crecimiento de los microorganismos nativos del terrero, identificado por la turbidez e incremento de la densidad óptica dentro de un intervalo determinado entre 0.45 y 0.55 a una longitud de onda de 600 nm (cf. III.4), se procedió a obtener un precultivo líquido del cual se obtuvo la biomasa inicial para todos los experimentos presentados en este trabajo. La obtención del precultivo consistió en tomar una alícuota de 20 mL de la columna de líquido, de la suspensión sólido de terrero + medio de cultivo + biomasa (producida después de  $\sim 20$  días de contacto). Se evitó recolectar material sólido del terrero y se trató de recuperar líquido con biomasa plantónica. Esta suspensión se colocó en un matraz Erlenmeyer de 500 mL y se adicionaron 180 mL de medio de cultivo M9 modificado (descrito en la sección III.3). El matraz se tapó

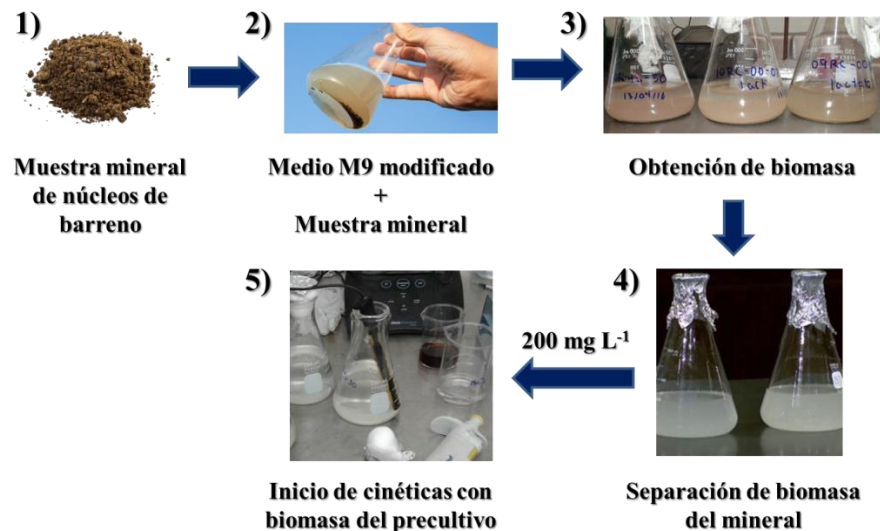
nuevamente con el tapón de algodón y gasa estéril. El objetivo del precultivo fue producir suficiente biomasa para todos los demás experimentos bióticos (mediante la toma de una alícuota de preinóculo). Para ello se requirió el mantenimiento del precultivo a través del cambio mensual de medio de cultivo M9, modificado con la adición de cianuro ( $2,000 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) como única fuente de nitrógeno de forma semanal, y regulación de pH a 10.5 con NaOH 10 M (adiciones típicas entre 300 - 600  $\mu\text{L}$  cada 7 días).

La metodología seleccionada se basa en lo reportado por Barton (2005), donde se especifica que el volúmen de inóculo dependerá de la especie cultivada. Dicho volumen debe ser el suficiente para obtener una lectura de densidad óptica. En el caso de esta tesis, la adición de  $180\text{-}200 \text{ mg L}^{-1}$  de sólidos suspendidos volátiles permitió iniciar en una fase lag que progresó exitosamente a la fase exponencial.

Además, es importante mencionar que la biomasa inactiva no pudo ser removida ya que no se usó un fermentador para realizar los experimentos. Sin embargo, al llevar a cabo cambios periódicos del medio de cultivo y biomasa (al mantener el preinóculo) se busca disminuir la proporción de biomasa inactiva en los precultivos.

Antes de tomar la alícuota del preinóculo que se usó como nuevo inóculo, para todos los experimentos del presente trabajo, se verificó que la concentración de cianuro en los precultivos fuese menor a  $5 \text{ mg L}^{-1}$ , y que la fase de crecimiento microbiano se encontrara en las últimas horas de la fase de crecimiento exponencial (típicamente entre las 100 y 150 h). Además se verificó que la concentración de sólidos suspendidos volátiles (SSV) en el preinóculo (metodología descrita en la sección III.3) fuera suficiente para permitir la adición de una concentración inicial de entre 180 y 220  $\text{mg SSV L}^{-1}$ , en los duplicados del experimento a estudiar. La metodología para la determinación de sólidos suspendidos volátiles se detalla en la sección III.4.

En la Figura 7 se presenta de forma esquemática la metodología aplicada, desde la obtención de la biomasa a partir de las muestras minerales de los núcleos de barreno, hasta la inoculación de biomasa del precultivo e inicio de los experimentos presentados en esta tesis.



**Figura 7.** Esquema del diseño experimental para obtención de biomasa en el precultivo, y del precultivo para las cinéticas de biodegradación de cianuro. Fuente: Elaboración propia.

Todos los experimentos se realizaron en matraces Erlenmeyer de 250 mL con un volumen de líquido de 200 mL. Este volumen se compuso por alícuotas de precultivo (adiciones típicas entre 20 y 50 mL de precultivo) con concentraciones de biomasa típicas entre 800 y 2000 mg SSV  $\text{L}^{-1}$ , y por aforo con medio de cultivo M9 modificado esterilizado en autoclave (típicamente entre 150 y 170 mL) para completar los 200 mL del volumen total en los matraces. El volumen del precultivo era de aproximadamente 400 mL y sus nutrientes, lactato y cianuro eran repuestos, por lo que obtener una alícuota de precultivo para los experimentos nunca fue una limitante.

De igual forma que con el precultivo, los matraces se taparon con algodón y gasa estéril y fueron cubiertos con aluminio (para evitar la fotodegradación del cianuro) y puestos a  $30^{\circ}\text{C}$  en una incubadora con agitación orbital. La fuente de carbono/donador de electrones fue lactato de sodio para todos los experimentos descritos en esta tesis.

### III.3 Selección y modificación de medios de cultivo

Basado en los trabajos de Luque-Almagro et al. (2005) y Kunz et al. (1992), un medio utilizado que permite la biodegradación de concentraciones de cianuro de hasta  $780 \text{ mg L}^{-1}$  es el medio mínimo M9, siendo este medio efectivo en condiciones aerobias y pH entre 7.5 y 11.5. La composición original de este medio incluye la adición de  $6 \text{ g L}^{-1} \text{ Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $3 \text{ g}$

$L^{-1}$   $KH_2PO_4$ ,  $0.5 g L^{-1}$   $NaCl$ . Se adiciona además  $0.246 g L^{-1}$  de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $0.011 g L^{-1}$   $CaCl_2$  y como fuente de carbono  $200 g L^{-1}$  de glucosa ( $C_6H_{12}O_6$ ), cambiado por  $4.1 g L^{-1}$  de acetato de sodio ( $C_2H_3NaO_2$ ) en el estudio de Luque-Almagro et al. (2005).

Al igual que en el trabajo de Luque-Almagro et al. (2005), en el cual la composición original del medio M9 se modificó dado que la fuente original de carbono (glucosa) se cambió por acetato y la fuente de nitrógeno original (amonio) se cambió por cianuro, en el presente trabajo de tesis la fuente de carbono se cambió por lactato de sodio y la fuente de nitrógeno por cianuro, amoniacó ó nitrato, dependiendo del experimento realizado, a una concentración  $2,000 \mu mol L^{-1}$ . Además, para evitar inconvenientes para la deteminación de SSV mediante densidad óptica, se disminuyó la concentración de sales de fosfato. La Tabla 3 muestra una comparación del medio utilizado por Luque-Almagro et al. (2005) y el medio utilizado en el presente trabajo. El pH del medio fue ajustado a 10.5 con  $NaOH 10 M$  para todos los experimentos realizados.

El propósito de la adición de las sales de fosfato en el medio M9 es el efecto amortiguador para mantener el pH neutro, por lo que la adición de estas sales en medio alcalino es innecesario. De acuerdo con la fórmula empírica de una célula  $C_5H_7O_2NP_{0.1}$ , propuesta por Rittmann y McCarty (2001), la cantidad de  $P-PO_4$  que se debe añadir como requerimiento celular es 10 % en relación molar con respecto al nitrógeno añadido al sistema. Por tanto, realizando los cálculos pertinentes, se obtuvo la concentración de fosfato adicionada en el sistema estudiado, con la cual se observó un crecimiento óptimo de los microorganismos y donde además no hubo formación de precipitados que interfirieran en la determinación de la biomasa por densidad óptica. Los resultados de experimentos previos realizados por el autor de esta tesis (datos no mostrados) demostraron que la utilización de lactato implica una mayor producción de biomasa (densidades ópticas mayores) con tiempos de biodegradación similares comparado con el uso de acetato, con lo que se justifica la utilización de lactato como fuente de carbono.

**Tabla 3.** Composición del medio de cultivo empleado.

Reactivo	Medio sin modificar (g L <sup>-1</sup> ) (Luque-Almagro et al. 2005)	Medio modificado y empleado en esta tesis. (g L <sup>-1</sup> )
Fosfato dibásico de sodio (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	6	0.13
Fosfato monobásico de sodio (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	3	/
Cloruro de sodio (NaCl)	0.5	0.5
Sulfato de magnesio heptahidratado (MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O)	0.246	0.246
Cloruro de calcio (CaCl <sub>2</sub> )	0.011	0.011
pH	7	10.5
Fuentes de carbono y nitrógeno		
Acetato de sodio (NaCH <sub>2</sub> COOH)	4.101	/
Lactato de sodio (NaCH <sub>3</sub> CHOHCOO)	/	6.163
Cloruro de amonio (NH <sub>4</sub> Cl)		0.107 (NH <sub>4</sub> Cl)
Cianuro de sodio (NaCN)	0.098 (NaCN)	0.098 (NaCN)
Nitrato de sodio (NaNO <sub>3</sub> )		0.17 (NaNO <sub>3</sub> )

Finalmente, es importante aclarar que en los experimentos con adición de una fuente alterna de nitrógeno a concentración equimolar al cianuro (2,000 μmol L<sup>-1</sup>), la concentración de lactato y Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> se duplicó. Esto debido a que al duplicar la concentración de nitrógeno

(4,000  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) se esperaría un consumo de aproximadamente el doble de lactato y fosfato que a una concentración 2,000  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

**Tabla 4.** Resumen de los experimentos de biodegradación de cianuro, se especifican las condiciones de agitación, concentración de la fuente de carbono (lactato), así como la concentración de cianuro como única fuente de nitrógeno o su combinación con fuentes alternas de nitrógeno (amoniaco ó nitrato). Todos los experimentos fueron realizados por duplicado.

Experimento	Velocidad de agitación (rpm)	Concentración adicionada ( $\text{mmol L}^{-1}$ )					Parámetros medidos
		Lactato	Fosfato dibásico de sodio	Cianuro	Amoniaco	Nitrato	
1	0	55	0.916	2	-	-	pH, oxígeno disuelto, densidad óptica, sólidos suspendidos volátiles, cianuro, amoniaco, nitrato, cianato, formamida, lactato, acetato, formiato
2	150	55	0.916	2	-	-	
3	370	55	0.916	2	-	-	
4	0	55	0.916	2	-	2	
5	150	55	0.916	-	2	-	
6	150	55	0.916	-	-	2	
7	0	110	1.83	2	2	-	
8	150	110	1.83	2	2	-	
9	370	110	1.83	2	2	-	
10	0	110	1.83	2	-	2	
11	150	110	1.83	2	-	2	
12	370	110	1.83	2	-	2	

La Tabla 4 muestra de forma resumida los experimentos realizados en esta tesis, los cuales son descritos detalladamente en las secciones III.5, III.6, III.7 y III.8.

#### **III.4 Determinación de parámetros fisicoquímicos, compuestos asociados a la degradación bacteriana y cálculo de parámetros cinéticos.**

Durante los experimentos realizados en el presente trabajo, se pudo dar seguimiento a los compuestos que sirvieron como fuente de nitrógeno, cianuro, amoniaco, y nitrato, así como de los parámetros físicos y químicos tales como, pH, oxígeno disuelto y densidad óptica (Tabla 4).

Para la cuantificación de las especies cianuro, amoníaco y nitrato se emplearon métodos electroquímicos empleando electrodos de ion selectivo (Marca Thermo Scientific: Modelos 9606BNWP, 9512HPBNWP y 9707BNWP respectivamente), para los intervalos de cuantificación de 0.2-260 mg L<sup>-1</sup> de cianuro, 0.01-17,000 mg L<sup>-1</sup> de amoníaco y 0.1-14,000 mg L<sup>-1</sup> de nitrato. La ventaja del uso de electrodos de ion selectivo es que permite realizar la cuantificación utilizando pequeños volúmenes de muestra.

La curva de calibración para la determinación de cianuro tuvo una coeficiente de correlación lineal ( $R^2$ ) de 0.996, con pendiente  $m = -54.153$  y ordenada al origen  $b = -523.93$ , ajustando el pH de la solución a 10.5 previo a su medición (mismo pH al cual se realizó la curva de calibración), y asegurándose periódicamente del correcto funcionamiento del electrodo mediante estándares de cianuro.

La curva de calibración para la determinación de amoníaco en un intervalo de detección 0.01-17,000 mg L<sup>-1</sup>, tuvo un  $R^2$  de 0.995 (con pendiente,  $m$  igual a  $-41.329$ , y ordenada  $b$  igual a  $-97.371$ ). El pH de la solución se ajustó a 10.5 previo a su medición (mismo pH al cual se realizó la curva de calibración). Se aseguró el correcto funcionamiento del electrodo mediante estándares de amoníaco.

El ion nitrato se cuantificó utilizando un electrodo de ion selectivo dentro del intervalo de cuantificación de 0.1-14,000 mg L<sup>-1</sup>, siendo importante mencionar que la medición del ion se realizó en una solución 50% v/v de muestra y solución supresora con pH 3 (ajustada con NaOH 0.1 N), cuya composición fue: 17.32 g L<sup>-1</sup> Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>18H<sub>2</sub>O, 3.43 g L<sup>-1</sup> Ag<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1.28 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, y 2.52 g L<sup>-1</sup> de ácido sulfámico (H<sub>2</sub>NSO<sub>3</sub>H). La curva de calibración tuvo un  $R^2$  de 0.98 (pendiente  $m$  de  $-40.074$  y ordenada  $b$  de  $-80.232$ ). La función de la solución supresora fue remover las interferencias, como cianuro (formando cianocomplejos con sulfato de plata) y la posible presencia de nitritos (con ácido sulfámico). Se aseguró el correcto funcionamiento del electrodo mediante estándares de nitrato.

Además, se realizaron muestreos y determinaciones en el tiempo inicial y final (consumo total), así como de puntos intermedios de la cinética en la mayoría de los experimentos. Se cuantificaron los consumos de la única fuente de carbono, lactato, y la producción de los ácidos grasos volátiles o metabolitos provenientes de carbono orgánico, formiato, acetato y butirato. De esta misma forma, se aplicó este mismo periodo de muestreo y cuantificación

para la determinación analítica de los productos de biodegradación de cianuro, cianato y formamida. Finalmente, en la parte de resultados se presentan dos parámetros indirectos medidos durante la cinética, siendo estos los SSV expresados en unidades de  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (al utilizar la fórmula química propuesta  $\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2\text{N}$ ) y la velocidad de utilización de oxígeno (OUR).

La medición del parámetro pH se realizó empleando un electrodo de pH de resina epóxica marca Thermo Scientific Orion ROSS (previamente calibrado con estándares de soluciones amortiguadoras a pH 4, 7 y 10). La medición de la densidad óptica, con la finalidad de seguir el crecimiento microbiano, se realizó a una longitud de onda de 600 nm utilizando un espectrofotómetro UV-Vis (Mca. Thermo Scientific), y empleando como blanco el medio de cultivo M9 modificado.

La cuantificación de la fuente de carbono y donador de electrones, lactato, así como los ácidos grasos volátiles: acetato, formiato y butirato, se realizó utilizando un equipo de electroforesis capilar (Mca. Agilent modelo G1600A), en el laboratorio analítico de la división de Ciencias Ambientales localizado en el Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT). Se utilizaron curvas de calibración de 50, 100, 250, 500 y 800  $\text{mg L}^{-1}$  de cada uno de los ácidos grasos volátiles mencionados. Se obtuvieron  $R^2$  superiores a 0.99 en todas las curvas de calibración realizadas para los ácidos grasos volátiles medidos.

La cuantificación de cianato se realizó mediante el método potenciométrico 4500-CN<sup>-</sup> L. Cyanate (Eaton et al, 2005), empleando el electrodo de ion selectivo de amoníaco. Al medirse indirectamente a través de la concentración de amoníaco, la confiabilidad para la medición de cianato depende del método empleado para cuantificar amoníaco previamente descrito. El principio del método se basa en la hidrólisis del cianato a amonio cuando se calienta en medio ácido, de acuerdo a la Reacción 9.



El procedimiento consistió en determinar la concentración inicial de amoníaco en la muestra previo a la digestión del cianato. La digestión del cianato se llevó a cabo tomando una alícuota 5 mL de solución, misma que fue acidificada a pH 2.5 con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 50% v/v, y calentada en Baño María a 90 °C por 30 min. La muestra se deja enfriar a temperatura



ambiente y se ajusta el pH a un intervalo entre 11 y 12 para poder determinar la concentración de amoníaco con el electrodo de ion selectivo. A la concentración medida se le resta la concentración inicial medida previo al procedimiento de digestión descrito, para expresar el resultado en términos de cianato por equivalencia estequiométrica de la Reacción 9. Respecto al riesgo que implica trabajar con cianuro a pH ácido, las muestras con mayor concentración de cianuro eran aquellas tomadas al tiempo cero de las cinéticas (concentraciones cercanas a  $50 \text{ mg L}^{-1}$ ). Sin embargo, el volumen tomado para la determinación de cianato fue de solo 5 ml, resultando así en una concentración neta de solo 0.25 mg de ácido cianhídrico. Las medidas de seguridad para evitar cualquier riesgo incluyeron trabajar en campana de extracción con mascarilla especial para gases.

La concentración de formamida se determinó con el método colorimétrico descrito por Kunz et al. (1992) y Kao et al. (2003), el cual consistió en su conversión a hidroxamato férrico. El procedimiento consistió en colocar 1 mL de muestra en tubos de ensaye con tapa, para después adicionar 1 mL de NaOH 3.5 N y 1 mL de clorhidrato de hidroxilamina 2.3 M, una vez realizado esto, los tubos de ensaye se calentaron a baño maría a  $60^\circ\text{C}$  por 10 min. Se dejó enfriar y se adicionó 1 mL de HCl 4 N y 1 mL  $\text{FeCl}_3$  1.23 M preparada en HCl 0.075 N. Después de 5 minutos de la adición de la solución de  $\text{FeCl}_3$  se midió la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro UV-Vis. El blanco siguió el mismo procedimiento descrito, solo que se sustituyó la muestra por 1 mL de agua desionizada. El cambio de color de la solución en los tubos de ensaye varía desde un color amarillo para las muestras menos concentradas o sin presencia de formamida hasta un color anaranjado-rojizo para las más concentradas, tal como se puede observar en la Figura 8. Se realizó una curva de calibración para la medición de esta especie, para la cual se obtuvo un valor de  $R^2$  de 0.992, con pendiente  $m= 0.0702$  y ordenada al origen  $b= -0.0114$ . El límite de detección de este método es  $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ .



**Figura 8.** Muestras biológicas con presencia de formamida. La mayor coloración rojiza-marrón corresponde a una mayor concentración de formamida. La coloración amarilla es típica de aquellas que presentan baja concentración o sin presencia de formamida.

Es importante mencionar que durante los balances de nitrógeno y de carbono en la sección de resultados, se hace referencia a los parámetros  $Y_N$  y  $Y_C$  (rendimientos de biomasa por masa de nitrógeno y por lactato consumidos, respectivamente), calculados mediante el cociente entre los gramos de sólidos suspendidos volátiles sintetizados y los gramos de nitrógeno o lactato consumidos. En este documento, los parámetros  $Y_N$  y  $Y_C$  se expresan en unidades de  $g\ SSV\ g^{-1}\ N$  y  $g\ SSV\ g^{-1}\ lactato$ , respectivamente.

Finalmente, se presenta la metodología con respecto a la velocidad de utilización de oxígeno (OUR) asociadas a las mediciones de oxígeno disuelto y la concentración de biomasa expresada como sólidos suspendidos volátiles (SSV).

La velocidad de utilización de oxígeno (OUR) se calculó empleando la Ecuación 3 (Santos et al., 2006). En donde el término diferencial esta asociada a la respuesta de la actividad microbiana y se estima como una diferencia finita entre la concentración de oxígeno en un intervalo finito de tiempo.

$$OUR = OTR - \frac{dCO_2}{dt} \quad \text{(Ecuación 3)}$$

El término OTR corresponde a la velocidad de transferencia de oxígeno y permite calcular el coeficiente de transferencia de oxígeno ( $k_L \cdot a$ ) a partir de la Ecuación 4, en función de la velocidad de agitación del sistema. El  $k_L \cdot a$  es determinado considerando los experimentos abióticos de saturación a las dos velocidades de agitación empleadas (150 y 370 rpm). Los valores de  $k_L \cdot a$  son calculados de forma independiente para los experimentos sin agitación,

con agitación a 150 rpm y con agitación a 370 rpm, y tal como se mencionó en la sección III.1, dependen del tiempo en que se alcanza la concentración de saturación para cada velocidad de agitación, con excepción del experimento sin agitación, el cual es calculado a través del coeficiente de difusividad del O<sub>2</sub> en agua, en la interfase aire-agua.

La concentración de saturación de oxígeno ( $C^*_{O_2}$ ) es igual a 6.1 mg L<sup>-1</sup> y es la que se presenta en San Luis Potosí a las condiciones barométricas correspondientes;  $C_{iO_2}$  corresponde a la concentración de oxígeno medida experimentalmente en un tiempo determinado, t(i):

$$OTR = k_L \cdot a (C^*_{O_2} - C_{iO_2}) \quad \text{(Ecuación 4)}$$

Por otro lado, la determinación de los sólidos suspendidos volátiles (SSV) a diferentes tiempos de las cinéticas microbianas de este documento se realizó a través de una regresión lineal entre la biomasa cuantificada de forma gravimétrica y la densidad óptica correspondiente, del medio de cultivo, medida a 600 nm. Ambas mediciones se obtuvieron a partir de los valores iniciales y finales de los experimentos descritos en este trabajo, con los cuales fue posible construir una curva de calibración con una R<sup>2</sup> de 0.985, la cual junto con los datos a partir de los cuales fue construida, se presenta en el Anexo I. Esto permitió que todos los experimentos de las cinéticas microbianas que inicialmente fueron descritas con la determinación de la densidad óptica, pudiesen ser representadas en términos de la concentración de SSV, y así obtener los consumos o producciones específicos. Durante el texto, la concentración de SSV se expresó en unidades milimolares y micromolares, empleando la fórmula C<sub>5</sub>H<sub>7</sub>O<sub>2</sub>N (Rittmann y McCarty, 2001). Es importante mencionar que los sólidos suspendidos volátiles, son aquellos sólidos constituidos por sólidos sedimentables, sólidos en suspensión y sólidos coloidales, capaces de volatizarse por el efecto de su combustión a 550°C en un tiempo de 15 a 20 minutos y que se asocian a la biomasa.

Las determinaciones de sólidos suspendidos volátiles se realizaron utilizando el método gravimétrico descrito por la NMX-AA-034-SCFI (Diario Oficial de la Federación [DOF], 2015). El método consistió primeramente en obtener pesos constantes de crisoles Gooch de porcelana con filtros de fibra de vidrio en una estufa a 105°C por 30 min, para

posteriormente ser colocados en un horno a temperatura de 105 °C por 30 min y pesados en una balanza analítica (Mca. OHAUS, modelo PA224) con precisión de 0.1 mg y capacidad hasta de 220 g. El procedimiento horno-deseCADador-pesado es repetido hasta obtener una variación en peso no mayor a los 0.5 mg entre los pesos obtenidos (usualmente de dos a tres ciclos). Una vez a peso constante los crisoles con el filtro, se filtró 4.5 mL de la muestra líquida con biomasa en suspensión empleando un matraz kitasato y una bomba de vacío. Los crisoles con la muestra sólida retenida en el filtro son transferidos a la estufa a 105 °C para su secado total por 1 h, hecho esto los crisoles son transferidos a un desecador por 20 min hasta ser enfriados a temperatura ambiente para su posterior pesado en balanza analítica y registro de su peso (G4). Finalmente, los crisoles son transferidos a una mufla a 550° C por 20 min y son transferidos a un desecador por 30 min para su enfriamiento y posterior pesaje (G2).

El valor de los sólidos suspendidos volátiles se estima con la Ecuación 5, donde V representa el volumen de muestra filtrada (en mL), G4 y G2, representan los pesos constantes del crisol+filtro+sólidos (en mg).

$$SSV (mg L^{-1}) = [(G4-G2)*1000]/V \quad \text{(Ecuación 5)}$$

La concentración de sólidos suspendidos volátiles además de servir como aproximación para cacular el fraccionamiento de nitrógeno a biomasa es útil para calcular los rendimientos con respecto al nitrógeno consumido de la fuente adicionada  $Y_N$  (g SSV g<sup>-1</sup> N), así como la fuente de carbono consumido  $Y_C$  (g SSV g<sup>-1</sup> lactato), en los tiempos intermedios y/o finales de las cinéticas.

### **III.5 Biodegradación de cianuro como única fuente de nitrógeno**

En esta sección se describe la metodología seguida para aquellos experimentos cuya única fuente de nitrógeno adicionada fue el ion cianuro (adicionado como cianuro de sodio), a una concentración 2,000 µmol L<sup>-1</sup>. Se describen 4 experimentos con distintos escenarios de transferencia de oxígeno: 1) sin agitación, 2) agitación orbital a 150 rpm, 3) agitación orbital a 370 rpm y 4) experimento anóxico (exploratorio), todos a una temperatura de 30°C. Es importante mencionar que tanto el medio de cultivo como la concentración inicial

de biomasa ( $200 \text{ mg SSV L}^{-1} = 1,770 \text{ } \mu\text{mol SSV L}^{-1}$ ) obtenida por medio de una alícuota extraída del preinóculo descrito en la sección III.2, así como el arreglo del matraz aerobio con tapa de gasa - algodón (cf. Sección III.2) es exactamente igual para los escenarios 1, 2 y 3.

Por otro lado, con respecto al experimento exploratorio en condiciones anóxicas, las únicas dos diferencias concernientes a los experimentos aerobios descrito, fueron: 1) la adición de una concentración equimolar de nitrato de sodio ( $2,000 \text{ } \mu\text{mol NO}_3^- \text{ L}^{-1}$ ), además de la concentración  $2,000 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  de cianuro adicionada, y 2) matraces Erlenmeyer de 500 mL cubiertos con tapa de caucho hermética para asegurar condiciones anóxicas, siendo importante mencionar que previo a colocar dicha tapa, el sistema se burbujó con  $\text{N}_2$  por 10 minutos para eliminar el oxígeno disuelto por desplazamiento del gas. La adición de nitrato se realizó con el propósito de que el ion fungiera como aceptor terminal del electrones, dado que el experimento se configuró para condiciones anóxicas (ausencia de oxígeno).

La toma de muestras para la medición de parámetros en este experimento consistió en la extracción de 5 mL de solución desde la tapa hermética de caucho utilizando jeringas estériles, en una atmósfera estéril con mecheros Bunsen.

Los diferentes compuestos y parámetros fisicoquímicos que se evaluaron en estos experimentos fueron: cianuro, cianato, formamida, consumo de la fuente de carbono y donador de electrones, lactato, así como producción de los ácidos grasos volátiles, formiato y acetato. Finalmente, se dio seguimiento al pH (para mantener al sistema a un valor de pH de 10.5), oxígeno disuelto, densidad óptica, concentración de sólidos suspendidos volátiles a diferentes puntos de la cinética, respectivamente. La estimación de la velocidad de utilización de oxígeno en aquellos experimentos sin agitación correspondiente a esta sección, así como a los del resto del documento, se encontraron en el orden de  $10^{-6}$  y  $10^{-4} \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , lo cuales resultaron de emplear el valor del coeficiente de difusividad de  $\text{O}_2$  en agua.

Finalmente, se realizó la cuantificación de las concentraciones de amoníaco y nitrato, sin embargo, al encontrarse por debajo del límite de cuantificación, éstas no se presentan en la sección de resultados. Esto es aplicable a todos los experimentos de la sección, y se asume que no se encontró amoníaco y/o nitrato como productos de biodegradación de cianuro.

### **III.6 Biodegradación de nitrato ó amoniaco como única fuente de nitrógeno**

Para aquellos experimentos cuya única fuente de nitrógeno adicionada fue amonio (adicionado como  $\text{NH}_4\text{Cl}$  pero convertido a  $\text{NH}_3$  a pH alcalino) o nitrato ( $\text{NaNO}_3$ ), a una concentración  $2,000 \mu\text{mol L}^{-1}$  y pH 10.5, se siguió el mismo procedimiento que para la degradación de cianuro en condición aerobia. La concentración de biomasa inoculada fue la misma, pero solamente se evaluó el escenario a 150 rpm (cf.sección IV.3).

Los diferentes compuestos y parámetros fisicoquímicos cuantificados fueron: nitrato, amoniaco, consumo de la fuente de carbono y donador de electrones lactato, así como producción de los ácidos grasos volátiles, formiato y acetato, pH, oxígeno disuelto, densidad óptica, y concentración de sólidos suspendidos volátiles.

### **III.7 Biodegradación de cianuro y amoniaco como fuentes alternas de nitrógeno**

Los experimentos descritos en esta sección se realizaron siguiendo la misma metodología de biodegradación de cianuro como única fuente de nitrógeno (sección III.5), pero en este caso se adicionó amoniaco ( $2,000 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) como fuente alterna de nitrógeno. Además, no se realizaron experimentos en condiciones anóxicas en este caso. Los compuestos y parámetros fisicoquímicos medidos son los mismos que en la sección anterior, adicionando en este caso las mediciones de amoniaco.

Se trabajó con tres escenarios de transferencia de oxígeno: 1) sin agitación, 2) agitación orbital a 150 rpm y, 3) agitación orbital a 370 rpm. Es importante mencionar que, tanto el medio de cultivo utilizado (medio M9 modificado) como la concentración inicial de biomasa ( $200 \text{ mg L}^{-1}$ ) obtenida del preinóculo, fue la misma para los tres escenarios de agitación. A pesar de esto, las diferencias con respecto al medio de cultivo descrito, en la sección anterior, fue que en los experimentos descritos en la presente sección se duplicaron las concentraciones de donador de electrones (lactato) y fosfato. En estos ensayos, además de la concentración de cianuro ( $2,000 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) se adicionó una concentración equimolar ( $2,000 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) de amoniaco, teniendo así una concentración total de  $4,000 \mu\text{mol L}^{-1}$  de nitrógeno en el sistema.

### **III.8 Biodegradación de cianuro y nitrato como fuentes alternas de nitrógeno**

Los experimentos descritos en esta sección se realizaron siguiendo la misma metodología de los experimentos descritos en la sección anterior, siendo idéntica la concentración de lactato, la concentración inicial de biomasa, y los mismos escenarios de transferencia de oxígeno: 1) sin agitación, 2) agitación orbital a 150 rpm, 3) agitación orbital a 370 rpm. En este caso, la fuente alterna de nitrógeno fue el nitrato a una concentración equimolar de cianuro ( $2,000 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), que implicó una concentración total de  $4,000 \mu\text{mol L}^{-1}$  de nitrógeno en el sistema. En este caso se omitió también la realización de experimentos en condiciones anóxicas. Finalmente, la medición de compuestos y parámetros fisicoquímicos fue igual a la presentada en las secciones anteriores, siendo reemplazada la medición de amoníaco por la de nitrato.

### **III.9 Ajustes al modelo de Gompertz**

El empleo del modelo de Gompertz se justificó debido a que un buen coeficiente de determinación ( $R^2 > 0.95$ ) indica un buen ajuste a las fases típicas de crecimiento microbiano descritas en la sección II.3. Además los ajustes a este modelo permiten calcular velocidades máximas de biodegradación de las fuentes de nitrógeno y producción de biomasa en las fases de crecimiento exponencial de cada experimento, con el fin de realizar comparaciones y obtener conclusiones.

Los ajustes al modelo de Gompertz se realizaron empleando el software Origin Pro 8.0 ® al graficar las concentraciones de cianuro y biomasa para los experimentos de la sección IV.2, las concentraciones de nitrato, amoníaco y biomasa para la sección IV.3 y las concentraciones de amoníaco, cianuro, biomasa, nitrato para la sección IV.4. Todos los datos alimentados al software fueron expresados como diferencias finitas acumulativas, los cuales son resultantes de sustraer las concentraciones correspondientes al tiempo inicial menos la concentración al tiempo referido para los casos de los consumos de cianuro, amoníaco y nitrato, mientras los deltas de concentración de biomasa fueron calculados al sustraer la concentración al tiempo referido menos la concentración inicial de biomasa. Las Tablas con los datos experimentales empleados para realizar los ajustes con el modelo de Gompertz, se presentan en el Anexo II.

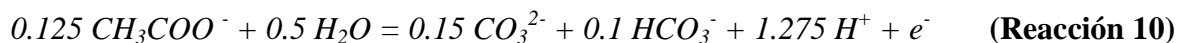
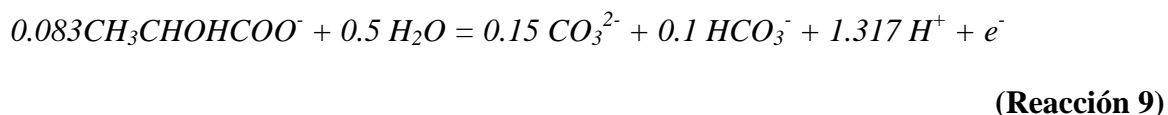
Dentro de las secciones de resultados se presentan las velocidades máximas de consumo de las fuentes de nitrógeno y producción de biomasa calculadas con base en la Ecuación 6 (Ortiz, 2004).

$$r_{max} = 0.386Ak \quad \text{(Ecuación 6)}$$

Donde A representa el valor máximo de la fuente de nitrógeno o biomasa ( $\mu\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1}$ ),  $k$  es la constante cinética de primer orden que representa la velocidad de producción o consumo del parámetro evaluado ( $\text{h}^{-1}$ ). Los parámetros A y k son calculados por el software Origin, al realizar el ajuste de los perfiles de consumo y producción, y que son presentados en el Anexo II.

### III.10 Equivalentes de electrones

La metodología seguida para el balance de equivalentes electrónicos es la descrita por Rittmann y McCarty (2001), y consistió en multiplicar el número de equivalentes de electrones de las reacciones normalizadas por mol de donador/aceptor, de lactato, acetato, formiato, y oxígeno (Reacciones 9-12) y las reacciones de síntesis celular (Anexo III) por la concentración neta producida/consumida de cada especie. La concentración total de oxígeno consumida fue calculada a través de las velocidades de utilización de oxígeno (OUR) multiplicadas por los tiempos de la cinética para cada uno de los experimentos.



Las reacciones de síntesis celular correspondientes a cada experimento presentadas en el Anexo III se construyeron a partir de las fuentes de nitrógeno empleadas en el presente trabajo.



### III.11 Análisis estadístico

Se realizaron ANDEVA de dos factores en todos aquellos experimentos con cianuro, independientemente si este fungió como fuente única o fuente alterna de nitrógeno en los escenarios sin agitación, agitación a 150 rpm y agitación a 370 rpm. Los parámetros analizados fueron: 1) velocidades de consumo de cianuro, 2) concentración final de cianato, 3) rendimiento de nitrógeno ( $Y_N$ ), y 4) rendimiento de carbono ( $Y_C$ ).

El nivel significativo elegido para la realización de este análisis de varianza fue de 5%,  $\alpha=0.05$  para todos los experimentos, con excepción del parámetro concentración final de cianato, cuya hipótesis alternativa es aceptada con un  $\alpha=0.1$  como se discute en la sección IV.5. Las hipótesis planteadas para la realización del ANDEVA, se dividen en 2 bloques, de acuerdo a cada uno de los 2 factores; 1) fuente de nitrógeno y 2) velocidad de agitación.

Las hipótesis originales ( $H_0$ ) para el factor 1 (fuente de nitrógeno) plantearon que las medias de los 4 parámetros mencionados para los experimentos con cianuro como única fuente de nitrógeno, con cianuro y amoníaco como fuente alterna de nitrógeno y con cianuro y nitrato como fuente alterna de nitrógeno son estadísticamente iguales entre sí (ver Ecuación 7).

$$H_0: \mu_{CN^-} = \mu_{CN^- + NH_3} = \mu_{CN^- + NO_3^-} \quad \text{(Ecuación 7)}$$

Las hipótesis alternativas ( $H_i$ ) para el factor 1 (fuente de nitrógeno) plantearon que al menos una de la medias para cada uno de los 4 parámetros en los experimentos con cianuro como única fuente de nitrógeno, con cianuro y amoníaco como fuentes alternas de nitrógeno, con cianuro y nitrato como fuentes alternas de nitrógeno, son estadísticamente diferentes entre sí (Ecuación 8).

$$H_1: \mu_{CN^-} \neq \mu_{CN^- + NH_3} = \mu_{CN^- + NO_3^-} \quad \text{(Ecuación 8)}$$

Para el factor 2 (velocidad de agitación), las hipótesis originales ( $H_0$ ) plantearon que las medias de los parámetros evaluados en los experimentos sin agitación, con agitación a 150 rpm y a 370 rpm, son estadísticamente iguales entre sí (ver Ecuación 9).

$$H_0: \mu_{\text{sin agitación}} = \mu_{\text{agitación a 150 rpm}} = \mu_{\text{agitación a 370 rpm}} \quad \text{(Ecuación 9)}$$

Las hipótesis alternativas ( $H_1$ ) para este factor plantearon que al menos una de las medias de los parámetros evaluados en los experimentos sin agitación, con agitación a 150 rpm y con agitación a 370 rpm, es estadísticamente diferente respecto a las demás (ver Ecuación 10).

$$H_1: \mu_{\text{sin agitación}} \neq \mu_{\text{agitación a 150 rpm}} = \mu_{\text{agitación a 370 rpm}} \quad \text{(Ecuación 10)}$$

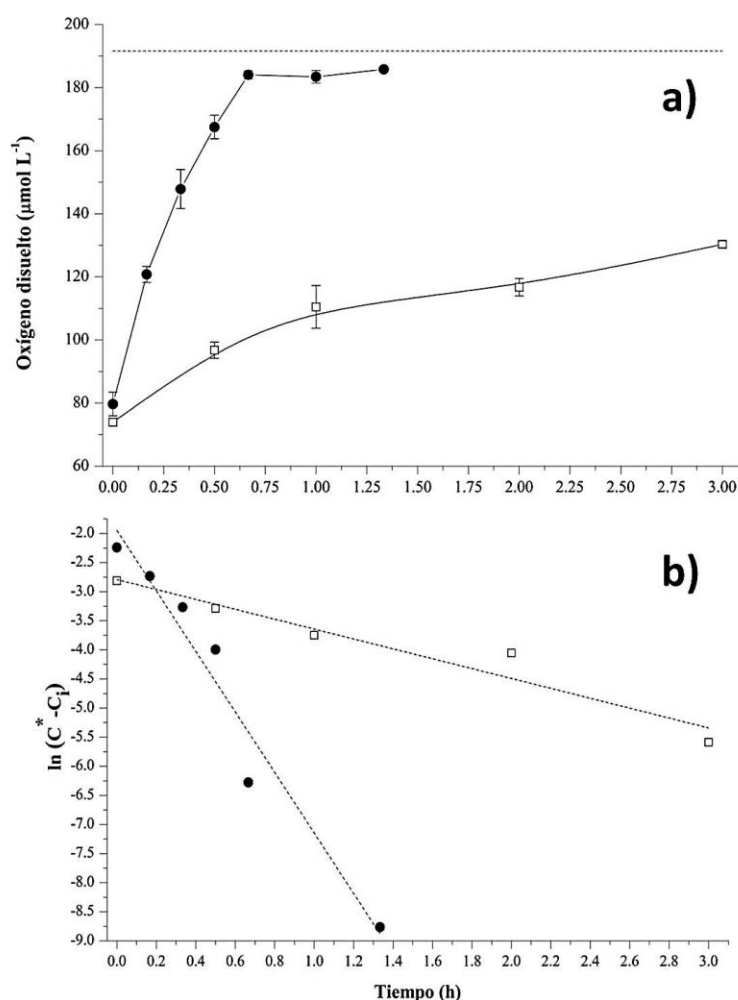
La obtención de los resultados del análisis de varianza, permitió determinar si la diferencia obtenida con respecto a los rendimientos celulares en las determinaciones experimentales fueron estadísticamente significativas al adicionar una fuente alterna de nitrógeno, y al variar la velocidad de agitación mecánica.

Adicionalmente, para determinar similitudes o diferencias puntuales durante el documento se realizaron ANDEVA de un factor, de igual forma con un nivel de significancia 0.05.

## Capítulo IV. Resultados y discusión sobre la biodegradación de cianuro

### IV.1 Cinéticas de saturación de oxígeno y cálculo de coeficientes volumétricos de transferencia de masa de oxígeno en sistemas abióticos

En el presente apartado se presentan y discuten las cinéticas de saturación de oxígeno y los coeficientes volumétricos de transferencia de oxígeno ( $k_L \cdot a$ ) calculados en las agitaciones orbitales a 150 y 370 rpm que serán empleados para los experimentos bióticos correspondientes. Adicionalmente, se presenta el valor aparente de  $k_L \cdot a$  de los experimentos sin agitación obtenidos a partir de la difusividad de oxígeno en agua.



**Figura 9.** a) Cinéticas de saturación de oxígeno disuelto para la agitación orbital de 150 (□) y 370 rpm (●) a temperatura y presión barométrica de 30 °C y 810 mbar, respectivamente. La línea punteada corresponde al valor de saturación de oxígeno a 25°C y presión de 0.8 atm en la ciudad de San Luis Potosí; b) Respuesta semilogarítmica de la cinética de primer orden de saturación de  $\text{O}_2$  disuelto en el medio líquido con agitación a 150 rpm.

En la Figura 9.a es posible observar que la concentración de saturación de oxígeno disuelto a 150 rpm es  $130 \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $4.16 \text{ mg L}^{-1}$ ) y se alcanza a las 3 h. A 370 rpm, la concentración de saturación de oxígeno fue  $190 \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $5.95 \text{ mg L}^{-1}$ ) en un tiempo de 1.33 h. La concentración de saturación a 370 rpm fue 1.4 veces superior a la obtenida a 150 rpm y muy similar a la concentración de saturación de oxígeno que se puede alcanzar en la ciudad de San Luis Potosí e igual a  $6.1 \text{ mg L}^{-1}$ . La línea punteada de la Figura 9.a representa la concentración teórica de saturación de oxígeno en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P, México.

En la Figura 9.b se muestran la respuesta del logaritmo natural de la diferencia entre la concentración de saturación de oxígeno y la concentración medida de oxígeno disuelto a 150 y 370 rpm. El valor negativo de su pendiente equivale al coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ( $K_L \cdot a$ ), los resultados para los experimentos con agitación a 150 rpm y a 370 rpm, fueron  $0.85 \text{ h}^{-1}$  y  $5.2 \text{ h}^{-1}$ , respectivamente. Los valores de saturación máximos utilizados para la realización de la gráfica en los experimentos con agitación orbital a 150 rpm y 370 rpm fueron  $4.29$  y  $5.9 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente, que fueron los valores máximos registrados en las mediciones de dichos experimentos. Para la agitación a 150 rpm ( $\square$ ) se obtuvo un coeficiente  $R^2$  de 0.94, una pendiente (m) de -0.8493 y una ordenada (b) de -2.793; mientras que para la agitación a 370 rpm ( $\bullet$ ) se obtuvo un  $R^2$  de 0.957, con una pendiente (m) de -5.197 y ordenada (b) de -1.948. Las líneas punteadas representan los ajustes lineales de los datos experimentales de la función semilogarítmica de concentración de saturación de oxígeno disuelto menos la concentración de oxígeno medida al tiempo referido. Por lo tanto, una mayor velocidad de agitación de tipo orbital implica que la concentración de saturación de oxígeno se logra en un menor número de horas, debido a una mayor velocidad de transferencia de oxígeno atmosférico a la solución. Este hecho es clave para el cálculo de las velocidades de utilización de oxígeno (OUR) en los experimentos, y por tanto también para las cinéticas de biodegradación y aspectos metabólicos, discutidos en las secciones posteriores.

La Tabla 5 resume los valores estimados de los coeficientes de transferencia de masa de oxígeno en agua a pH de 10.5 y  $30^\circ\text{C}$ , calculados a partir de las mediciones de oxígeno disuelto a diferentes velocidades de agitación orbital evaluadas a 150, 250, 300 y 370 rpm.

En base a este comportamiento, los experimentos bióticos de biodegradación de cianuro se definieron para tres casos extremos de saturación de oxígeno que fueron a 0, 150 y 370 rpm, que correspondieron a 69 y 317 veces la velocidad de transferencia de masa de oxígeno al seno de la solución con respecto a 0 rpm.

**Tabla 5.** Coeficientes de transferencia de masa ( $k_{La}$ ) para el sistema con agitación orbital a pH 10.5 y 30°C. Valores promedio de dos determinaciones (n=2).

Velocidad de agitación (rpm)	$k_{La}$ ( $h^{-1}$ )	$R^2$	# Veces del $k_{La}$ sin agitación
0	0.01	-	1
150	0.85	0.94	69
250	2.62	0.99	213
300	3.62	0.98	295
370	5.2	0.95	317

El valor de difusividad molecular de oxígeno en agua permitió calcular el coeficiente de transferencia de oxígeno ( $K_L$ ) en los sistemas sin agitación considerando el área de transferencia de la interfase aire-agua del matraz Erlenmeyer utilizado ( $6.1575 \text{ cm}^2$ ), lo que da como resultado un  $K_L = 0.01227 \text{ h}^{-1}$ .

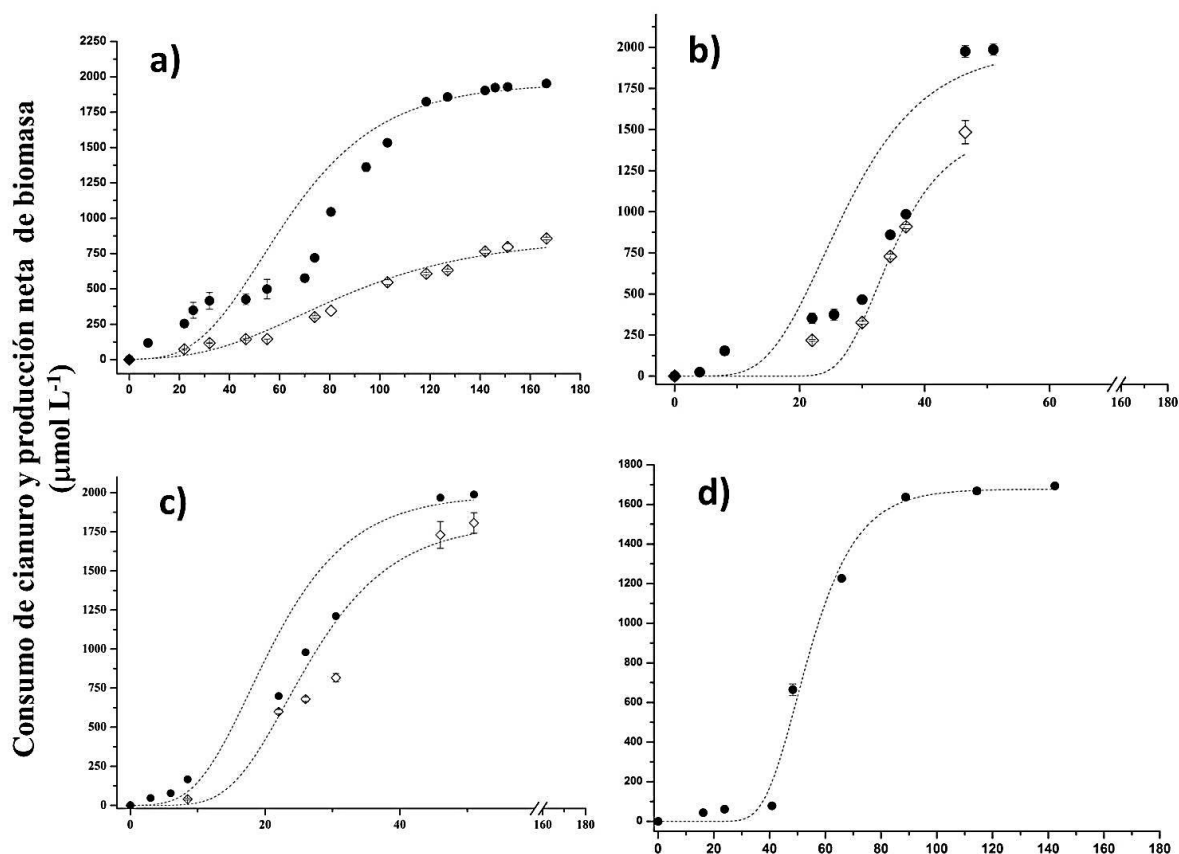
## **IV.2 Cinéticas de biodegradación de cianuro y evolución de parámetros asociados, utilizando ion cianuro como única fuente de nitrógeno**

Los resultados de esta sección permiten evaluar el efecto de la variación en la velocidad de transferencia de oxígeno sobre la biodegradación de cianuro y sus parámetros asociados, utilizando cianuro como única fuente de nitrógeno. Estos experimentos servirán como punto de comparación para los experimentos de las secciones IV.3 y IV.4 .

### **IV.2.1 Biodegradación de cianuro y producción de biomasa**

La Figura 10 ilustra las cinéticas de consumo acumulado de cianuro y producción de biomasa (medida en términos de densidad óptica y expresada en equivalentes de concentración de sólidos suspendidos volátiles), para las condiciones sin agitación (Figura

10.a), con agitación a 150 rpm (Figura 10.b), con agitación a 370 rpm (Figura 10.c), y el sistema anóxico (Figura 10.d). En el experimento en condiciones anóxicas se omitió la agitación y la cinética de biomasa debido a que el crecimiento celular se dio de forma discreta y no distribuida uniformemente en el medio como se observó en los experimentos aeróbicos, por lo que no fue posible medir el cambio de la densidad óptica, sin embargo, existió crecimiento observable en forma de agregados celulares color blanco-transparente.



**Figura 10.** Cinéticas de consumo acumulado de cianuro (●) y producción neta de biomasa (◇) con cianuro como única fuente de nitrógeno. (a) sin agitación, (b) a 150 rpm, (c) a 370 rpm y (d) en condiciones anóxicas. Las barras representan el error estándar de duplicados. Las líneas punteadas representan el ajuste al modelo Gompertz. La producción neta de biomasa es resultante de la diferencia entre la concentración inicial de preinóculo adicionada y la concentración de biomasa final, que fue sintetizada. El corte en el eje x de las Figuras se debe al uso de la función break del software Origin que permite hacer acercamientos en las horas de interés de la cinética pero conservando la escala original del eje.

Con respecto al experimento sin agitación (Figura 10.a), el consumo neto de cianuro fue de  $1,950 \pm 20 \mu\text{mol L}^{-1}$  en 166.5 h equivalente a  $27.3 \text{ mg L}^{-1}$  de N consumido. La producción neta de biomasa ( $\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2\text{N}$ ) fue  $860 \mu\text{mol L}^{-1}$ , equivalente a  $96.73 \text{ mg SSV L}^{-1}$ , la cual resulta de la diferencia entre la concentración de biomasa adicionada al tiempo cero de la cinética ( $1,610 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) y la concentración final fue  $2,470 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Es importante mencionar que entre las 22 y 70 h se puede observar una etapa de estado cuasi-estacionaria para el consumo de cianuro, así como para el caso de síntesis celular, cuya velocidad de producción se incrementa 3.4 veces con respecto a los tiempos menores, hasta 60 h. Esta observación puede ser atribuida a una “fase de retardo” en la que los microorganismos provenientes del preinóculo se aclimatan o generan nuevos componentes celulares para el nuevo medio de cultivo a partir del cual sintetizarán nuevo material celular.

Es posible observar que a partir de las 127 h se alcanzó 95% del consumo máximo de cianuro esperado. Sin embargo, la producción de la biomasa no estuvo asociada al consumo de cianuro, de tal forma que los resultados sugieren dos hipótesis: (1) que el N-CN- se transformó en compuestos intermediarios solubles que pueden ser empleados posteriormente para la síntesis celular, o (2) que el nitrógeno del cianuro ha sido desgasificado del sistema en forma de  $\text{N}_2$ . El análisis de compuestos intermediarios y el destino final del nitrógeno se discute en la siguiente sección y se concluye sobre una de las dos hipótesis propuestas.

El coeficiente de determinación ( $R^2$ ) del modelo Gompertz con los datos experimentales para el consumo de cianuro y la síntesis celular fue de 0.965 y 0.993 respectivamente. Las velocidades máximas ( $r_{\text{max}}$ ) de consumo de cianuro y de síntesis celular fueron de  $18.7 \mu\text{mol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  de cianuro ( $0.47 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) y  $7.3 \mu\text{mol SSV L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  ( $0.82 \text{ mg SSV L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ), respectivamente. Lo que permite establecer que el proceso de consumo de cianuro es aproximadamente 2.6 veces más rápido que el proceso de síntesis celular para el sistema aeróbico sin agitación.

Las velocidades máximas calculadas por ajuste de los datos experimentales con el modelo Gompertz de este y los demás experimentos discutidos en esta sección se presentan en la Tabla 6. Los parámetros A, k, y n (número de puntos introducidos al modelo) se presentan en el Anexo II.

**Tabla 6.** Velocidades máximas estimadas de acuerdo al modelo Gompertz y sus coeficientes de determinación ( $R^2$ ) para los experimentos con cianuro como única fuente de nitrógeno, sin agitación, con agitación a 150 y 370 rpm y en el sistema anóxico.

Experimento	Parámetro	$r_{\max}$ ( $\mu\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1}$ )	$R^2$
Sin agitación	Cianuro	$18.7 \pm 1.2$	0.965
	SSV	$7.3 \pm 0.2$	0.993
Agitación a 150 rpm	Cianuro	$83.4 \pm 11.2$	0.970
	SSV	$71.3 \pm 0.1$	0.973
Agitación a 370 rpm	Cianuro	$61.56 \pm 0.1$	0.997
	SSV	$53.83 \pm 0.2$	0.986
Anóxico	Cianuro	$55 \pm 0.8$	0.988

Concerniente al experimento con agitación a 150 rpm, se ilustran las cinéticas de consumo de cianuro y producción de biomasa (Figura 10.b). El cianuro es consumido de  $2,020 \mu\text{mol L}^{-1}$  a  $30 \mu\text{mol L}^{-1}$  en un lapso de 51 h, siendo el consumo neto de  $1,980 \mu\text{mol L}^{-1}$ . La producción neta de biomasa (SSV) fue de  $1,484 \mu\text{mol L}^{-1}$  (concentración de biomasa inicial y final,  $1,580 \mu\text{mol L}^{-1}$  y  $3,060 \mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente).

De forma similar al experimento sin agitación, existe un intervalo de 22 h (entre las 8 y 30 h) en donde el consumo de cianuro y producción de biomasa es bajo, atribuido a la fase típica de condicionamiento que presenta el crecimiento microbiano (fase lag o de retardo). Sin embargo, esta fase es de 22 h, tiempo considerablemente menor al observado en el experimento sin agitación (48 h).

El incremento en la velocidad de agitación del sistema a 150 rpm se reflejó en una mayor velocidad de transferencia de oxígeno, y en consecuencia en el incremento de la concentración de biomasa sintetizada y la reducción en el tiempo de biodegradación de cianuro, completándose el proceso 120 h antes que el experimento sin agitación.

La velocidad máxima de consumo de cianuro, estimada con el modelo Gompertz, fue de  $r_{\max} = 83.4 \mu\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1} = 2.17 \text{ mg L}^{-1} \text{h}^{-1}$  ( $R^2 = 0.97$ ). Esta velocidad es 4.6 veces superior a la obtenida en el experimento sin agitación. Por otro lado, la velocidad máxima de



producción de biomasa, estimada con el mismo modelo, fue de  $r_{\max} = 71.3 \mu\text{mol SSV L}^{-1} \text{ h}^{-1} = 8 \text{ mg SSV L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  ( $R^2$  0.973). Esta velocidad es prácticamente 10 veces superior a la velocidad de biomasa sintetizada en el experimento sin agitación.

Por otro lado, en la Figura 10.b se observa una clara similitud entre los perfiles de consumo de cianuro y la producción neta de biomasa durante las primeras 37 h, tiempo en el cual se consumieron  $980 \mu\text{mol L}^{-1}$  de cianuro equivalentes a 49.5% del cianuro total consumido. Entre las 37 y 46 h la similitud en sus perfiles de concentración se reduce significativamente, asociado probablemente al uso de N-CN<sup>-</sup> para la síntesis de productos de biodegradación (c.f. sección IV.2.2.6). La similitud entre los perfiles observados en este experimento difiere considerablemente de lo observado en el caso sin agitación

En la Figura 10.c se muestran las cinéticas de biodegradación de cianuro y de producción de biomasa a 370 rpm y su ajuste con el modelo de Gompertz. El consumo neto de cianuro fue de  $1,990 \mu\text{mol L}^{-1}$  en un lapso de 51 h, con una producción neta de biomasa de  $1,810 \mu\text{mol L}^{-1}$ .

A esta velocidad de agitación no se observó una fase de retraso como en los casos de 0 y 150 rpm. El tiempo empleado para la biodegradación de 95% del cianuro a 370 rpm fue 3 veces menor al experimento sin agitación y prácticamente similar a los experimentos llevados a cabo a 150 rpm. En este caso, la producción neta de biomasa ( $1,806 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) es 2.1 y 1.22 veces mayor a la sintetizada a 0 y 150 rpm, respectivamente.

Se encontró que los datos experimentales del consumo de cianuro se ajustan al modelo con un  $R^2$  de 0.997, lo cual permite estimar una velocidad máxima de consumo de cianuro, de  $61.56 \pm 0.1 \mu\text{mol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  ( $1.6 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ). De igual forma, la velocidad máxima de síntesis celular estimada fue de  $53.8 \pm 0.2 \mu\text{mol SSV L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  ( $6.08 \text{ mg SSV L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) con una  $R^2$  de 0.986.

Comparando con los dos primeros experimentos, la velocidad máxima de consumo de cianuro a 370 rpm es 3.42 veces superior a la del sistema sin agitación, y 1.35 veces menor al realizado a 150 rpm. De acuerdo con un análisis de varianza de un factor para estas 3 velocidades, las velocidades de los experimentos sin agitación 150 y 370 rpm son estadísticamente diferentes entre sí.

La velocidad máxima de producción de biomasa a 370 rpm es 7.65 veces mayor a la obtenida a 0 rpm. Contrariamente, la velocidad alcanzada a 150 rpm es 1.32 veces mayor a la alcanzada a 370 rpm. Es importante mencionar que la velocidad máxima en el experimento a 150 rpm ocurre en la segunda etapa del comportamiento diáuxica (últimas horas de la biodegradación de cianuro).

Finalmente, es importante mencionar que los perfiles de consumo de cianuro y de producción de biomasa presentan similitud durante todo el proceso en este experimento, contrario a lo observado en los experimentos a 150 rpm, y sin agitación, para los cuales existieron tiempos de la cinética en donde el consumo de cianuro no se destinó a producción de biomasa.

La Figura 10.d muestra el perfil de consumo de cianuro en condiciones anóxicas utilizando nitrato como aceptor de electrones y/o fuente de nitrógeno. En este experimento la biomasa producida se presentó en forma de agregados por lo que no fue posible dispersarla en el medio para tomar una muestra homogénea, contrario a lo ocurrido en los casos aerobios en donde la biomasa se encontró distribuida uniformemente y fue posible tomar una muestra representativa de su concentración en el medio líquido. Consecuentemente, no fue posible en estos experimentos la determinación de la densidad óptica ni la de los SSV.

Las concentraciones inicial y final de cianuro fueron de 2,050 y 370  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente. La biodegradación duró 88.8 h con un consumo total de cianuro de 1,680  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . En este caso, el consumo de cianuro corresponde a 82 % de la concentración inicial. Es posible observar una fase de retardo de 48 h en el crecimiento microbiano y podría asociarse con el cambio de condiciones aerobias a anóxicas.

Respecto al nitrato en solución, solo se consumieron 210  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , confirmando que éste no fungió como un aceptor terminal de los electrones transferidos del consumo de lactato y a diferencia del cianuro, no puede utilizarse como fuente de nitrógeno en condiciones anóxicas. A pesar de esto, en la sección IV.3 y IV.4 se discute cómo el nitrato puede ser asimilado en condiciones aerobias al ser una fuente de nitrógeno para síntesis celular.

La velocidad máxima de consumo de cianuro fue de  $r_{\text{max}} = 55 \mu\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1}$  ( $R^2 = 0.99$ ). Esta velocidad resulta ser 2.9 veces mayor a la observada sin agitación y equiparable a las

velocidades máximas obtenidas a 370 rpm ( $61.6 \mu\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) y 150 rpm ( $83.4 \mu\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1}$ ), constatando que la biodegradación de cianuro por el consorcio microbiano empleado bajo condiciones anóxicas es factible.

#### **IV.2.2 Productos de biodegradación de cianuro y balance de nitrógeno**

En la presente sección se discute la distribución del nitrógeno consumido (proveniente de la degradación de cianuro) en productos de biodegradación y en utilización para síntesis celular a diferentes tiempos de la cinética para los experimentos a 0, 150 y 370 rpm y anóxico. El criterio para definir los tiempos de cuantificación en esta serie de experimentos, así como en los demás experimentos presentados en esta tesis, fue obtener un punto inicial y un punto final de la concentración de las especies, con la finalidad de realizar un balance global de su consumo o producción, y además calcular rendimientos globales de nitrógeno ( $Y_N$ ) y carbono ( $Y_C$ ), y electrones donados/aceptados durante la toda la duración de las cinéticas. Tal como se verá a continuación, a diferencia de los experimentos a 150 rpm, en los experimentos sin agitación y con agitación a 370 rpm se presentan puntos intermedios de medición, los cuales fueron tomados para comparar la acumulación de metabolitos de nitrógeno en el escenario de mayor (370 rpm) y menor (150 rpm) transferencia de oxígeno.

En la Tabla 7, se resume las concentraciones de los compuestos de nitrógeno productos de la biodegradación de cianuro. Estos compuestos fueron cianato, formamida y biomasa (SSV) cuantificados puntualmente a diferentes tiempos de las cinéticas.

Con respecto al experimento a 0 rpm, se encontró que entre las 0 y 103 h el cianato presentó un incremento de 140 a  $680 \mu\text{mol L}^{-1}$  de cianato, disminuyendo posteriormente hasta  $290 \mu\text{mol L}^{-1}$  de cianato al cabo de 166.5 h. Esto sugiere que la ruta metabólica que involucra a la enzima cianuro monooxigenasa (cf. Sección II.4.1) se llevó a cabo. Existiendo además un consumo neto durante las últimas 63.5 h de  $240 \mu\text{mol L}^{-1}$  del cianato producido.

Además, se cuantificó la especie formamida, de la cual se observó un incremento gradual en los 3 tiempos de muestreo, cuantificando 230, 600 y  $630 \mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente. Esto permite sugerir también una ruta metabólica hidrolítica, mediada por la enzima cianuro hidratasa que puede estar presente en el consorcio microbiano empleado. Es

importante señalar que a diferencia de lo observado para el ion cianato, la formamida tiende a acumularse al final de la cinética, sugiriendo que esta especie no es una fuente de nitrógeno asimilable para la síntesis celular.

Por lo tanto, el resultado sugiere que la producción de biomasa se debe a la utilización del cianato como fuente de nitrógeno para síntesis celular. Debido a esto y a la acumulación de cianato durante las primeras 103 h, se sugiere que el cianato es acumulado durante las primeras 70 h de las etapas de síntesis celular para finalmente ser consumido una vez agotada, o al ser muy baja, la concentración de cianuro.

**Tabla 7.** Balance de nitrógeno para los experimentos sin agitación, con agitación a 150 y 370 rpm y anóxico, en distintos tiempos de la cinética.

	Sin agitación			Agitación a 150 rpm		Agitación a 370 rpm			Anóxico	
	t (h)									
	0	103	166.5	0	46.5	0	22	51	0	142.3
[Cianuro] ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	1,970 $\pm$ 12	440 $\pm$ 13	20 $\pm$ 8	2,020 $\pm$ 80	33 $\pm$ 70	2,050 $\pm$ 3	1,350 $\pm$ 13	70 $\pm$ 4	2,050 $\pm$ 20	370 $\pm$ 10
Consumo de cianuro ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	0	1,530	1,950	0	1,990	0	700	1,990	0	1,680
[Cianato] ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	143 $\pm$ 3	674 $\pm$ 1	289 $\pm$ 1	162 $\pm$ 2	283 $\pm$ 9	150 $\pm$ 6	320 $\pm$ 9	77 $\pm$ 3	160 $\pm$ 0	255 $\pm$ 2
Diferencia finita de cianato ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	0	532	385.8	0	121	0	168	241	0	100
[Formamida] ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	234 $\pm$ 10	597 $\pm$ 5	632 $\pm$ 10	0	0	0	0	0	250 $\pm$ 10	782 $\pm$ 35
Diferencia finita de formamida ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	0	363	36	0	0	0	0	0	0	513
[ Sólidos suspendidos volátiles ] ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	1,610 $\pm$ 60	2,157 $\pm$ 40	2,470 $\pm$ 23	1,580 $\pm$ 3	3,060 $\pm$ 70	1,620 $\pm$ 6	2,220 $\pm$ 9	3,430 $\pm$ 60	1,670 $\pm$ 70	2,850 $\pm$ 70
Producción de SSV ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	0	547	857	0	1,484	0	600	1,810	0	1,177
[Nitrato] ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	/	/	/	/	/	/	/	/	2,160 $\pm$ 4	1,950 $\pm$ 20
Consumo de nitrato ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	/	/	/	/	/	/	/	/	0	210

A continuación se discuten los dos intervalos presentados en la Tabla 7 (0 a 103 h y 103 a 166.5 h), junto con los rendimientos de nitrógeno a los tiempos mencionados, así como el rendimiento global de nitrógeno, o dicho de otra forma aquel que considera la producción de biomasa y consumo de nitrógeno durante todo el proceso (tiempo inicial y tiempo final).

En el intervalo de tiempo de 0 a 103 h en el experimento sin agitación, el consumo de cianuro fue de  $1,530 \mu\text{mol L}^{-1}$  y la producción de biomasa de  $547 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Las concentraciones producidas de cianato y formamida en este intervalo de tiempo fueron 533.5 y 363.4, respectivamente, lo cual suma un total de  $1,440 \mu\text{mol L}^{-1}$  de nitrógeno. Es decir, 35.7% del nitrógeno utilizado fue utilizado para síntesis celular, mientras que 58.6% se mantuvo en los compuestos intermediarios de nitrógeno analizados: cianato (34.9%) y formamida (23.75%). Se concluye que hasta ese momento se pudo recuperar 94.4% de nitrógeno introducido al sistema y que existe 5.62% de compuestos intermediarios de nitrógeno sin identificar ni cuantificar, tales como nitrógeno molecular, nitrito, o aminoácidos/ácidos orgánicos con contenido de nitrógeno, lo cual puede ser consistente con lo reportado en medio anóxico por Landkamer et al. (2015). El rendimiento celular con respecto a la fuente de nitrógeno  $Y_N$  en este intervalo fue de  $2.89 \text{ g SSV g N-CN}^{-1}$ .

Para el intervalo entre las 103 y las 166.5 h se consumieron los  $420 \mu\text{mol L}^{-1}$  del cianuro restante. Considerando que hubo una producción de  $40 \mu\text{mol L}^{-1}$  de nitrógeno correspondiente a la formamida sintetizada (8.6 % del nitrógeno del cianuro), restando una concentración  $340 \mu\text{mol L}^{-1}$  de nitrógeno disponible para síntesis celular, recordando que la producción de biomasa fue  $310 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Puesto que existió también un consumo de  $385 \mu\text{mol L}^{-1}$  de cianato, es posible que tanto el consumo de cianuro como el de cianato contribuyan a la síntesis de biomasa en este intervalo, considerando además que el fraccionamiento de nitrógeno a biomasa en las primeras 103 h es solo de 35.7%. De esta forma el rendimiento celular con respecto al nitrógeno en el tiempo 166.5 h (considerando la suma de cianuro y cianato consumidos) es de  $Y_N = 3.1 \text{ g SSV g}^{-1} \text{ N}$ . Este rendimiento es 2.6 veces superior al observado en el primer intervalo de tiempo y corresponde al tiempo en donde se presenta el punto de inflexión de la etapa exponencial de crecimiento que es caracterizado por el momento en el que se alcanza la máxima velocidad de síntesis celular.

Un balance global de nitrógeno en este experimento resume que a las 166.5 h se consumió  $1,950 \mu\text{mol L}^{-1}$  de cianuro, con acumulación de biomasa y productos intermedarios de nitrógeno identificables como cianato y formamida, los cuales se presentaron en concentraciones de  $860 \mu\text{mol SSV L}^{-1}$ ,  $290 \mu\text{mol L}^{-1}$  de cianato y  $630 \mu\text{mol L}^{-1}$  de formamida, respectivamente. La suma del nitrógeno contenido en los metabolitos y biomasa mencionados es de  $1,780 \mu\text{mol L}^{-1}$ , por tanto de forma global, 44% del nitrógeno consumido fue utilizado para sintetizar biomasa, 47.28% del nitrógeno consumido se distribuyó en productos intermedarios de biodegradación identificados como cianato y formamida, y el 8.72% del nitrógeno consumido no pudo ser cuantificado en los productos metabólicos de nitrógeno medidos, por lo que no se descarta la síntesis de una o varias especies de nitrógeno no cuantificadas que sean redituables para la síntesis de biomasa, o bien, la pérdida de nitrógeno soluble en nitrógeno molecular. El rendimiento celular global con respecto al nitrógeno consumido ( $Y_N$ ) resulta ser de  $3.54 \text{ g SSV g}^{-1} \text{ N}$ . Este rendimiento promedio resulta ser mayor al observado durante las primeras 103 h pero menor al cuantificado en el segundo intervalo de tiempo. Esto debido a que el cianato es un intermedario en la ruta de síntesis celular a partir de la biodegradación de cianuro, siendo así uno de los dos mecanismos de biodegradación/desintoxicación de cianuro observados en los experimentos. El segundo mecanismo de biodegradación/desintoxicación identificado en este experimento es el asociado a la acumulación de formamida. Este mecanismo hidrolítico contribuye con 32.3% del nitrógeno consumido durante la biodegradación de cianuro.

Respecto al experimento con agitación a 150 rpm, se encontró solamente la especie cianato (no se detectó formamida como en el experimento sin agitación). La concentración de cianato al tiempo cero de la cinética fue de  $160 \mu\text{mol L}^{-1}$ , mientras que a las 46.5 h se cuantificó una concentración final de  $283 \mu\text{mol L}^{-1}$ . La producción neta de biomasa (SSV) fue  $1,480 \mu\text{mol L}^{-1}$ , con respecto a  $1,990 \mu\text{mol L}^{-1}$  de nitrógeno consumido proveniente del cianuro. Es importante mencionar que la existencia de una concentración inicial de cianato mayor que 0, en este y los demás experimentos de esta tesis, se debe al efecto de la dilución de una mayor concentración de cianato presente en el preinóculo del cual partieron los experimentos y no debe confundirse con su formación inmediata al tiempo cero de la cinética.

En resumen, 75% del nitrógeno fue utilizado para síntesis celular, mientras que 14.3% terminó como cianato. Del nitrógeno restante que se usó, no pudo cuantificarse 11% en subproductos con contenido de nitrógeno. El rendimiento celular global con respecto al N-cianuro consumido fue de  $Y_N = 6.05 \text{ g SSV/ g N}$ . Dicho rendimiento es 1.7 veces mayor al rendimiento global obtenido en el experimento sin agitación, lo cual puede ser explicado considerando una mayor producción de biomasa en estas condiciones de operación.

Es importante notar que la concentración de cianato cuantificado al final de la cinética ( $283 \pm 9 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) es similar (tomando en cuenta las desviaciones estándar) al determinado en el experimento sin agitación ( $290 \mu\text{mol L}^{-1} \pm 1$ ).

Por otro lado, en el experimento a 370 rpm se encontró que aproximadamente 81% del nitrógeno del cianuro consumido es utilizado para sintetizar biomasa. La Tabla 7 presenta la distribución de nitrógeno al tiempo inicial y final de la cinética, considerando además un tiempo intermedio a las 22 h.

Al igual que el experimento a 150 rpm, solamente fue encontrado cianato como producto de biodegradación de cianuro. Se cuantificaron las concentraciones de cianato a los tiempos 0, 22 y 51 h, encontrando concentraciones de 150, 320 y  $80 \mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente.

A 370 rpm, la especie cianato es detectada a concentraciones considerables en el tiempo intermedio, al igual que en el experimento sin agitación. Esto representa una evidencia indirecta sobre la ruta metabólica de biodegradación asociada a la **enzima cianuro monooxigenasa**, así como la misma tendencia observada en el experimento sin agitación al acumular cianato (aún a una concentración menor que el experimento sin agitación). A pesar de ser un sistema asociado a un alto coeficiente de transferencia de oxígeno, los resultados sugieren que el cianato es el principal compuesto intermediario antes de la asimilación del nitrógeno en la síntesis celular.

A 370 rpm, la concentración de cianato al final del experimento es muy cercana a cero, lo cual contrasta con lo observado a tiempos finales en los experimentos sin agitación y a 150 rpm ( $290 \mu\text{mol L}^{-1}$  y  $280 \mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente). Lo que lleva a suponer una mayor eficiencia en el consumo de cianato hacia la síntesis celular.



Respecto al balance global de nitrógeno, durante la cinética se consumieron  $1,980 \mu\text{mol L}^{-1}$  de cianuro. La concentración final de biomasa calculada mediante la curva de calibración del Anexo I fue de 1.806, mientras la concentración de cianato al final de la cinética fue de  $76.6 \mu\text{mol L}^{-1}$ . La suma de ambos productos fue de  $1,882 \mu\text{mol N L}^{-1}$ , lo cual representa 95% del nitrógeno consumido. El rendimiento global de biomasa con respecto al nitrógeno del cianuro consumido fue de  $Y_N = 7.3625 \text{ g SSV g N}^{-1}$ . Este rendimiento es 2.08 y 1.22 veces mayor al observado a 0 y 150 rpm, respectivamente.

Finalmente, con respecto al sistema anóxico, en la Tabla 7 es posible apreciar que los productos de biodegradación detectados fueron las especies cianato, formamida, cuantificados en los tiempos 0, 103 y 166.5 h. Asimismo, se presenta las concentraciones de cianuro consumida y de biomasa neta producida.

La especie formamida fue producida hasta alcanzar una concentración final de  $780 \mu\text{mol L}^{-1}$ . La producción de esta especie es concordante con el tipo de sistema (anóxico) en el cual son limitadas las rutas metabólicas de biodegradación de cianuro. Por otro lado, la producción de cianato en el sistema es baja y su producción podría estar asociada con una concentración residual de oxígeno en el sistema que permitiera la oxidación de cianuro a este producto.

En este caso el balance de nitrógeno resulta en un 111.3 % al sumar las concentraciones de formamida, biomasa y cianato producido, las cuales son 780, 1,180 y  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente, con respecto a los  $1,650$  y  $200 \mu\text{mol L}^{-1}$  consumidos del cianuro y nitrato. El exceso de nitrógeno en el balance podría explicarse por la asimilación (síntesis celular) de especies de nitrógeno no cuantificadas en solución, provenientes del preinóculo de biomasa del cual partieron los experimentos.

El rendimiento de biomasa por nitrógeno consumido fue de  $5.05 \text{ g SSV g}^{-1} \text{ N}$ , mayor que el rendimiento del experimento sin agitación. Este hecho es inesperado debido a que los sistemas anóxicos se asocian a menores producciones de biomasa que los aerobios, de acuerdo con Rittmann y McCarty (2001). Sin embargo, lo anterior puede explicarse debido a que la concentración de cianato producida es menor en el experimento anóxico ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) comparada a la producida en el experimento sin agitación durante las primeras 103 h

(530  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), lo cual implica una mayor utilización de nitrógeno para síntesis de productos metabólicos.

#### **IV.2.3 Balance de carbono y control de pH**

En la Tabla 8 se observa el consumo de lactato, la producción de ácidos orgánicos (acetato y formiato) y la concentración de hidróxido de sodio adicionada para mantener el sistema a un valor de pH de 10.5, en los tiempos referidos en los experimentos sin agitación, con agitación a 150 y 370 rpm y anóxico. La fila del porcentaje de carbono relativo (%C-relativo) refiere al porcentaje de carbono al que corresponde cada especie producida con respecto al carbono equivalente del lactato consumido, mientras el superíndice *A* refiere a un consumo en vez de producción observado en el experimento anóxico.

**Tabla 8.** Balance de carbono para los experimentos con cianuro como única fuente de nitrógeno, sin agitación, a 150 y 370 rpm y anóxico. El superíndice A refiere a un consumo en vez de producción. El % de carbono se refiere al porcentaje de carbono recuperado relativo al carbono orgánico consumido del lactato.

	Sin agitación			Agitación a 150 rpm		Agitación a 370 rpm			Anóxico	
	t (h)									
	0	103	166.5	0	46.5	0	22	51	0	142.33
[Lactato] (mmol L <sup>-1</sup> )	47.14 ± 1.1	37.9 ± 1.2	35.1 ± 0.3	54.17 ± 0.80	39.84 ± 0.62	37.9 ± 0.86	30.70 ± 0.06	13.36 ± 1.44	79.5 ± 0.5	37.87 ± 1.2
Consumo	0	9.27	12.1	0	14.33	0	7.22	24.56	0	11.95
[Formiato] (mmol L <sup>-1</sup> )	13.13 ± 2.2	30.4 ± 0.32	41.2 ± 2.55	13.1 ± 0	48.91 ± 2.05	15.4 ± 0.44	28.82 ± 0.11	56.57 ± 1.1	8.06 ± 2.2	0
Producción	0	17.28	28.06	0	35.82	0	13.4	41.17	0	-8.06 <sup>A</sup>
% Carbono producido	0	62.1	77.5	0	83.32	0	61.9	55.88	/	/
[Acetato] (mmol L <sup>-1</sup> )	0	0	0.65 ± 0.08	1.35 ± 0.02	3.41 ± 0.02	0	0	0	/	/
Producción	0	0	0.65	0	2.06	0	0	0	/	/
% Carbono producido	0	0	3.59	0	9.57	0	0	0	/	/
[Sólidos Suspendidos Volátiles ] (μmol L <sup>-1</sup> )	1,610 ± 60	2,157 ± 40	2,470 ± 23	1,580 ± 3	3,060 ± 70	1,620 ± 6	2,220 ± 9	3,430 ± 60	1,670 ± 70	2,850 ± 70
Producción (μmol L <sup>-1</sup> )	0	547	857	0	1,484	0	600	1,810	0	1,177
% Carbono producido	/	9.71	11.83	/	17.26	/	13.85	12.25	/	16.42
Consumo hidróxido (mmol L <sup>-1</sup> )	/	/	38.6 ± 0.29	/	34.47 ± 0.57	/	/	47.22 ± 0.41	/	0

Con respecto al experimento sin agitación se realizaron mediciones en dos cortes de tiempo: a 103 y 166.5 h de la cinética. En el intervalo de 0 a 103 h, el consumo de lactato fue de  $9.27 \text{ mmol L}^{-1}$ , equivalente a una concentración de carbono de  $27.82 \text{ mmol L}^{-1}$ . Se detectó también la presencia de formiato a una concentración de  $17.28 \text{ mmol L}^{-1}$ , equivalente a una concentración equimolar de carbono ( $17.28 \text{ mmol L}^{-1}$ ), lo cual corresponde a 62.1% del carbono consumido. La concentración de biomasa fue de  $0.55 \text{ mmol SSV L}^{-1}$ , equivalente a una concentración de carbono de  $2.73 \text{ mmol L}^{-1}$  que representa solo 9.83% del carbono asociado al lactato consumido. Por lo tanto, en las primeras 103 h, 71.83% del carbono orgánico consumido es utilizado mayormente para síntesis de ácidos orgánicos y, en menor cuantía, para la producción de biomasa. Por último,  $7.8 \text{ mmol L}^{-1}$  ó 28% del carbono asociado al lactato consumido, no se detectó como algún ácido orgánico, por lo que se presume que esta concentración es oxidada completamente a dióxido de carbono, el cual debido al pH cercano a 10.5 es fraccionado a iones carbonatos ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) (60 %) y bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) (40 %) (cf. sección III.9). El rendimiento celular con base al carbono,  $Y_C$ , resulta de dividir los gramos de biomasa sintetizada ( $0.062 \text{ g SSV L}^{-1}$ ) a las 103 h con respecto a los gramos de lactato consumido ( $0.826 \text{ g lactato L}^{-1}$ ), y es igual a  $0.075 \text{ g SSV g}^{-1} \text{ lactato}$ .

Por otro lado, en el intervalo de 103 a 166.5 h, el consumo de lactato fue de solamente  $2.80 \text{ mmol L}^{-1}$ , equivalente a  $8.38 \text{ mmol L}^{-1}$  de carbono orgánico. Es preciso recordar que en comparación con el intervalo de las primeras 103 h (en donde existió consumo de  $1,530 \mu\text{mol L}^{-1}$  de cianuro), entre 103 y 166,5 h se consumieron solamente  $420 \mu\text{mol L}^{-1}$  ó 21.54 % restante del cianuro total consumido, pudiendo ser esta la explicación para el consumo considerablemente menor de lactato, recordando además que tal como se discutió en la sección anterior, las primeras 103 h de la cinética se caracterizaron por la biodegradación de cianuro a compuestos intermediarios de nitrógeno (cianato y formiato), mientras que el intervalo de las 103 a las 166.5 h se caracterizó por una producción muy baja de formamida y un mayor consumo de cianato para síntesis celular, explicando así el bajo consumo de lactato. El rendimiento celular de las 103 a las 166 h fue de  $Y_C = 0.14 \text{ g SSV/g lactato}$ , resultante de dividir los gramos de biomasa sintetizada ( $0.035 \text{ g SSV L}^{-1}$ ) entre los gramos de lactato consumido ( $0.25 \text{ g lactato L}^{-1}$ ).

El rendimiento durante las últimas 63 h es 1.55 veces mayor al observado durante las primeras 103 h y podría ser nuevamente explicado debido a que los procesos metabólicos predominantes en las fases tempranas de la cinética microbiana son de tipo catabólico, al caracterizarse por utilizar la mayoría de los equivalentes de electrones donados para reacciones de oxidación, tal como son las de cianuro a cianato, en donde el carbono contenido en la molécula de cianuro dona 2 equivalentes de electrones al carbono contenido en la molécula de cianato. Por otro lado, de las 103 a las 166.5 h, parecen dominar los procesos de tipo anabólico en donde es utilizado el cianuro y cianato como fuente de nitrógeno en mayor proporción a lo observado en las primeras 103 h, asociado a menores requerimientos energéticos que en el primer intervalo.

En la Tabla 8 puede observarse la distribución global de carbono al final de la cinética (166.5 h). El consumo total de lactato fue de  $12.07 \text{ mmol L}^{-1}$ , equivalente a una concentración de carbono de  $36.20 \text{ mmol L}^{-1}$ . Se encontró una concentración de formiato de  $28.06 \text{ mmol L}^{-1}$ , equivalente a  $28.06 \text{ mmol L}^{-1}$  de carbono orgánico ó 77.5% del carbono asociado al lactato consumido, una concentración de acetato de  $0.65 \text{ mmol L}^{-1}$ , equivalente a  $1.29 \text{ mmol L}^{-1}$  ó 3.6% de carbono consumido. Con respecto a la concentración de biomasa, la concentración final de  $0.86 \text{ mmol L}^{-1}$ , equivale a una concentración de carbono de  $4.28 \text{ mmol L}^{-1}$  u 11.83% del carbono asociado al consumo de lactato. Por último, la concentración residual, posiblemente asociada a oxidación completa es de  $2.56 \text{ mmol L}^{-1}$  ó 7.07 % de la concentración de carbono orgánica consumida.

Tal como se observa de forma global, los porcentajes de carbono utilizado para la síntesis de ácidos orgánicos son altos, siendo estos de 81.02% (a formiato y acetato). Por otro lado, el rendimiento global de la cinética (0 a 166.5 h) es  $Y_C = 0.09 \text{ g SSV g}^{-1} \text{ lactato}$ .

Finalmente, se presenta la concentración de hidróxido de sodio adicionada durante la cinética con la finalidad de mantener el pH del sistema fijo a 10.5. Se observa que el intervalo entre las 0 y las 103 h la concentración de hidróxido adicionado es  $23 \text{ mmol L}^{-1}$ , mientras la concentración adicionada de las 103 a las 166.5 h es  $15.6 \text{ mmol L}^{-1}$ . Esto resulta en una concentración total de hidróxido  $38.6 \text{ mmol L}^{-1}$  adicionada durante la cinética, sobre la cual puede contribuir la suma de los ácidos orgánicos, formiato y acetato ( $28.71 \text{ mmol L}^{-1}$ ) y otros procesos bioquímicos no considerados que puedan contribuir al  $9.89 \text{ mmol L}^{-1}$

restante de hidróxido adicionado. Esto es concordante con lo encontrado por Paavilainen et al. (1995) para lo cual, la concentración de acidez neutralizada en su estudio presenta similitud con la concentración de ácidos orgánicos producidos a pH alcalinos (cf. Sección II.2).

Respecto al escenario con agitación a 150 rpm, en la Tabla 8 puede observarse la distribución del balance de carbono proveniente del lactato consumido al tiempo inicial y final (46.5 h) de la cinética. En este intervalo de tiempo, el consumo de lactato fue de  $14.33 \text{ mmol L}^{-1}$ , equivalente a una concentración de carbono de  $42.99 \text{ mmol L}^{-1}$ , y se cuantificaron  $35.82 \text{ mmol L}^{-1}$  de formiato, equivalente a una concentración equimolar de carbono ( $35.82 \text{ mmol L}^{-1}$ ), que corresponde al 83.32 % del carbono asociado al lactato consumido. Además, se detectaron  $2.06 \text{ mmol L}^{-1}$  de acetato, equivalente a  $4.11 \text{ mmol L}^{-1}$  ó 9.5 % de carbono consumido. Por último, la biomasa cuantificada fue de  $1.48 \text{ mmol SSV L}^{-1}$ , equivalente a una concentración de carbono de  $7.42 \text{ mmol L}^{-1}$  equivalente a 17.26% del carbono asociado al lactato consumido. La sumatoria de los porcentajes obtenidos de la biomasa y ácidos orgánicos cuantificados representa 110% del carbono orgánico consumido. Debido a que más del 110% de carbono orgánico es cuantificado en la suma de ácidos orgánicos y biomasa producida, es posible que hayan existido especies de carbono orgánico no cuantificadas por electroforesis capilar y/o de nitrógeno no cuantificadas, provenientes del precultivo y por tanto adicionadas desde el tiempo cero, que conllevaran a la formación de ácidos grasos y biomasa.

El rendimiento global calculado es  $Y_C = 0.13 \text{ g SSV g}^{-1} \text{ lactato}$ , muy similar al global calculado en el experimento sin agitación ( $Y_C = 0.09 \text{ g SSV g}^{-1} \text{ lactato}$ ), y que de hecho, de acuerdo con el análisis estadístico presentado en la sección IV.5 y corroborado con un ANDEVA de un factor, no existen diferencias significativas entre ambos rendimientos.

Es importante mencionar que a pesar de las diferencias en los tiempos y velocidades de biodegradación con respecto al experimento sin agitación, se encontraron ciertas similitudes con éste, siendo: la concentración de lactato consumido (solo  $2.26 \text{ mmol L}^{-1}$  mayor) y la alta producción de ácidos orgánicos. Cuantificándose además una mayor concentración de formiato con respecto al acetato producido, posiblemente atribuido en ambos casos a limitaciones en la transferencia y consumo de oxígeno.

La concentración total de hidróxido adicionada para mantener el pH del sistema cercano a 10.5 fue  $34.47 \pm 0.57 \text{ mmol L}^{-1}$ , concentración similar a la suma de las concentraciones cuantificadas de los ácidos orgánicos formiato ( $35.82 \text{ mmol L}^{-1}$ ) y acetato ( $2.06 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e igual a  $37.9 \pm 2 \text{ mmol L}^{-1}$ . Según el resultado de ANDEVA de un factor, no existen diferencias significativas entre ambos valores.

Para el sistema con agitación a 370 rpm, la Tabla 8 muestra el consumo de lactato, y su distribución a ácidos orgánicos en los tiempos de 22 y 51 h (tiempo final), así como la concentración de hidróxido de sodio adicionada a los tiempos mencionados con el fin de mantener la cinética a un valor de pH de 10.5.

A las 22 h, el consumo de lactato fue de  $7.22 \pm 0.8 \text{ mmol L}^{-1}$ , equivalente a una concentración de carbono de  $21.67 \pm 2.4 \text{ mmol L}^{-1}$ . A este mismo tiempo la concentración de formiato fue de  $13.43 \pm 0.54 \text{ mmol L}^{-1}$ , equivalente a una concentración equimolar de carbono ( $13.43 \text{ mmol L}^{-1}$ ), la cual corresponde a 61.97% del carbono asociado al lactato consumido. Respecto a la concentración de biomasa se cuantificaron  $0.6 \text{ mmol L}^{-1}$ , equivalente a una concentración de carbono de  $3 \text{ mmol L}^{-1}$  o bien, 13.84 % del carbono asociado al lactato consumido. Por tanto, 24.19% del carbono asociado al lactato consumido, no se detectó como algún ácido orgánico o biomasa, por lo que se presume que esta concentración es llevada a oxidación completa. En este punto el rendimiento celular con respecto al consumo de lactato es de  $Y_C = 0.1 \text{ g SSV /g lactato}$ .

Con respecto a los consumos y rendimientos, en el intervalo entre las 22 y 51 h, el consumo de lactato fue de  $17.34 \text{ mmol L}^{-1}$  (equivalente a una concentración de  $52 \text{ mmol L}^{-1}$  de carbono), y la producción de biomasa fue de  $1.21 \text{ mmol L}^{-1}$ , resultando en un rendimiento de  $Y_C=0.089 \text{ g SSV g lactato}^{-1}$ ; rendimiento ligeramente menor al obtenido durante las primeras 22 h, sugiriendo así una mayor homogeneidad en los consumos de lactato. Respecto a la producción de formiato, en el intervalo fue producida una concentración de  $27.75 \text{ mmol L}^{-1}$ , lo cual representa 53.36 % del carbono consumido.

Respecto a la distribución global de carbono durante la cinética, el consumo total de lactato fue  $24.56 \text{ mmol L}^{-1}$ , equivalente a una concentración de carbono de  $73.69 \text{ mmol L}^{-1}$ , concentración considerablemente mayor a la consumida en los experimentos sin agitar y con agitación a 150 rpm, en los cuales, además, se detectó acetato, mientras en el

experimento con agitación a 370 rpm no se detectó acetato, siendo el formiato el único ácido graso volátil cuantificado a una concentración de  $41.17 \text{ mmol L}^{-1}$ , equivalente a una concentración equimolar de carbono de  $41.17 \text{ mmol L}^{-1}$ , que representa 55.88% del carbono asociado al lactato consumido. Por otro lado, la concentración total de biomasa producida al final de la cinética fue  $1.81 \text{ mmol L}^{-1}$ , equivalente a una concentración de carbono de  $9.03 \text{ mmol L}^{-1}$ , ó 12.25% del carbono consumido. Por tanto, 68.05% del carbono orgánico es utilizado para producción de formiato y síntesis celular, mientras que 31.95 % del carbono consumido es oxidado completamente. El rendimiento celular global con respecto al consumo de lactato es de  $Y_C = 0.093 \text{ g SSV g}^{-1} \text{ lactato}$ .

Finalmente, la concentración total de hidróxido de sodio adicionada durante la cinética para mantener el pH de 10.5 fue de  $47.2 \text{ mmol L}^{-1}$ , siendo mayor la necesidad de adición a partir de las 22 h. De igual manera que para los dos primeros experimentos anteriores, la concentración total de hidróxido adicionada ( $47.2 \pm 0.41 \text{ mmol L}^{-1}$ ) es similar a la concentración de ácidos orgánicos producidos, siendo en este caso únicamente formiato a una concentración de  $41.17 \pm 0.57 \text{ mmol L}^{-1}$ .

En el experimento en condiciones anóxicas solamente se realizaron mediciones al tiempo inicial y final de la cinética. La Tabla 8 muestra que el consumo de lactato fue de  $11.95 \text{ mmol L}^{-1}$ , equivalente a una concentración  $35.85 \text{ mmol L}^{-1}$  de carbono. Por otro lado, a diferencia de los experimentos aerobios no existió producción de compuestos orgánicos, observándose además que existió un consumo total de una concentración  $8.06 \text{ mmol L}^{-1}$  de formiato (proveniente del inóculo). Esto debido a que las condiciones anóxicas favorecen rutas metabólicas diferentes, para las cuales posiblemente el formiato fungió como fuente de carbono y donador de electrones (al igual que el lactato). El rendimiento global de lactato consumido es  $Y_C = 0.129 \text{ g SSV g}^{-1} \text{ lactato}$ .

Además, a diferencia de los sistemas aerobios, en el anaeróbico no se requiere ajuste del pH lo cual es acorde a que no se producen ácidos orgánicos, de tal forma que el pH del sistema solamente se incrementó en 0.2 unidades (de 10.41 a 10.61) de forma autónoma (no se requirió la adición de NaOH).

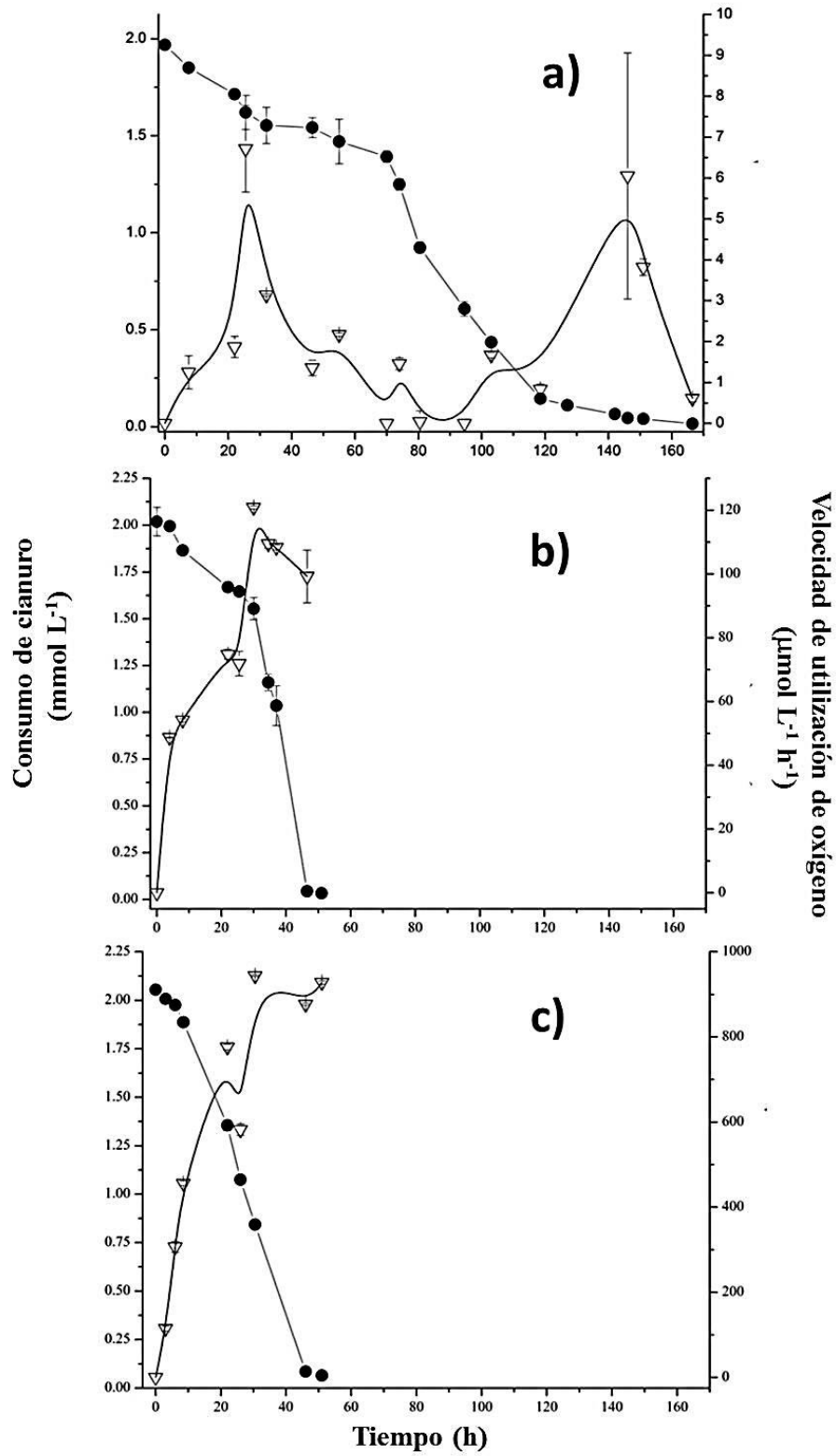


#### IV.2.4 Velocidades de utilización de oxígeno disuelto

En la Figura 11 se muestran las velocidades de utilización de oxígeno disuelto para los experimentos sin agitación y con agitación a 150 y 370 rpm, en unidades de  $\mu\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1}$ . En el experimento sin agitación (Figura 11.a) las velocidades de utilización varían entre 0 y  $3 \mu\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1}$  en las primeras 7.5 h y entre las 46.5 y 118.5 h, estos intervalos de tiempo estuvieron asociados a menores velocidades de utilización. Las mayores velocidades de utilización (alrededor de  $6 \mu\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) se presentan a las 25.5 y 146 h, posiblemente asociadas a tiempos de mayor utilización del donador primario de electrones. Es evidente que a diferencia de las Figuras 11.b y 11.c, no existe una clara tendencia de consumo de oxígeno en dependencia con el consumo de cianuro, particularidad que puede explicarse debido a la producción de formamida, cuya ruta metabólica es independiente del oxígeno para su formación. La concentración total de oxígeno consumida en el experimento es  $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ .

Por otro lado, en los experimentos con agitación a 150 y 370 rpm (Figura 11.b y c), los perfiles cinéticos entre consumo de la fuente de nitrógeno (cianuro) y la velocidad de consumo de oxígeno presentan una clara relación.

En el escenario con agitación a 150 rpm se observan tres etapas en el perfil de la velocidad de utilización de  $\text{O}_2$ , la primera etapa se puede delimitar entre 0 a 25 h, asociada a consumos iniciales de cianuro los cuales implican incrementos en la velocidad de utilización de oxígeno, la segunda etapa de 25 a 32 h en la que el consumo de cianuro tiende a ser estacionario ocasiona menores requerimientos de oxígeno, y la tercer etapa (32 a 48 h) en las cuales existe consumo del 75% del cianuro adicionado inicialmente al sistema y en la cual se presentó la fase de crecimiento exponencial de biomasa y en donde se alcanzan las velocidades máximas de utilización de oxígeno (alrededor de  $120 \mu\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1}$ ). La concentración total de oxígeno consumida fue de  $3,960 \mu\text{mol L}^{-1}$ .



**Figura 11.** Velocidades de utilización de oxígeno (▽) y cinéticas de consumo de cianuro (●). a) experimentos sin agitación; b) agitación a 150 rpm; c) agitación a 370 rpm. Las barras representan el error estándar de duplicados.

Con respecto al escenario con agitación a 370 rpm, éste se caracterizó por no presentar etapas de retraso en el consumo de cianuro y por lo tanto el perfil de utilización de oxígeno tampoco presenta etapas de retraso, mostrando sus mayores incrementos en la velocidad de utilización de oxígeno en el intervalo entre las 30.5 y 51 h (alrededor de  $940 \mu\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1}$ ), asociado a los mayores consumos de la fuente de nitrógeno y de síntesis (ver Figura 10). Finalmente, es posible observar que en el intervalo entre las 22 y 26 h, la velocidad de utilización de oxígeno se ve disminuida, lo cual es concordante con la nula producción de biomasa en este mismo intervalo (Figura 10). La concentración total de oxígeno consumida en el experimento es  $37,690 \mu\text{mol L}^{-1}$ , concentración 9.5 y 188 veces mayor que a 150 rpm y sin agitación, respectivamente.

Es posible concluir que mayores velocidades de utilización de oxígeno son traducidas en mayores concentraciones de biomasa sintetizada, teniendo así el siguiente orden (agitación a 370 rpm > agitación a 150 rpm > sin agitación).

#### **IV.2.5 Discusión**

Se encontró que en el escenario de biodegradación de cianuro sin agitación, cuyas velocidades de oxígeno son considerablemente bajas (entre 0 y  $3 \mu\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1}$ ), tiene como principales implicaciones con respecto a los experimentos con agitación a 150 rpm y 370 rpm (asociados a mayores transferencias y velocidades de utilización) tiempos de biodegradación prolongados, así como un mayor fraccionamiento del cianuro consumido a productos de biodegradación, particularmente cianato y formamida, teniendo como consecuencia un menor fraccionamiento de nitrógeno para síntesis de biomasa. En el experimento sin agitación la producción de biomasa, velocidad de producción de biomasa y velocidad de consumo de cianuro fueron relativamente bajas con respecto a los experimentos con agitación a 150 y 370 rpm.

Es importante recordar que en los experimentos con agitación a 370 rpm (experimento con la mayor concentración de oxígeno utilizado) y experimento en condiciones anóxicas no se observó una fase diaúxica, a diferencia de los experimentos sin agitación y con agitación a 150 rpm. Esto podría ser explicado porque en el experimento a la mayor velocidad de agitación no existió una limitación de aceptor de electrones (oxígeno) que indujera un

cambio de aceptores de electrones. Similarmente, el no observar una fase diaúxica en el experimento anóxico es explicado porque las rutas metabólicas encontradas fueron estrictamente anóxicas, por lo que no pudo existir una transición para utilizar al aceptor de electrones oxígeno. La explicación con base en los aceptores electrones concuerda con lo reportado por Barton (2005) mencionada en el capítulo II.3.

Se determinó que la especie formamida solamente pudo ser detectada en el experimento sin agitación, siendo esto concordante con la detección de la especie como producto de una ruta de biodegradación comúnmente observada en medio anóxico (sección II.4), solamente observada en medio aerobio por Kunz et al. (1992) y Fernández et al. (2003) a condiciones de pH neutro. En la presente tesis, el sistema en el que fue detectada la presencia de esta especie no es anóxico, sino solamente limitado en la transferencia de oxígeno. Finalmente se observó que al final de la cinética la especie formamida fue acumulada, sugiriendo que la misma no fungió como fuente de nitrógeno, siendo este hallazgo también reportado por Kunz et al. (1992) para un cultivo de la cepa pura *Pseudomonas fluorescens NCIMB 11764*, por lo que posiblemente se asocie a una ruta de desintoxicación.

La producción de cianato es catalizada por la enzima cianuro monooxigenasa. Esta especie fue cuantificada en todos los casos. Aun cuando sus concentraciones difieren entre cada uno de los experimentos, su tendencia es acumularse en los tiempos intermedios durante la biodegradación de cianuro para después ser consumido al final de la cinética de biodegradación, sugiriendo que este producto es un intermediario durante el proceso de asimilación de nitrógeno para síntesis celular.

En el experimento a 370 rpm el cianato fue consumido prácticamente en su totalidad a diferencia de los experimentos a 0 y 150 rpm. Esto permite sugerir dos hipótesis: 1) una mayor transferencia de oxígeno ocasiona una mayor velocidad de utilización del compuesto, y 2) al ser un sistema abierto a la atmósfera, la mayor transferencia de dióxido de carbono (compuesto no cuantificado) cataliza el consumo de cianato (dependiente de la especie bicarbonato) a amoníaco y favorece la síntesis celular.

Anderson et al. (1990) sugieren que algunas bacterias cuentan en el citoplasma con la enzima cianasa capaz de realizar la desintoxicación de cianato de forma intracelular, lo cual explica el hecho de no haber observado amoníaco en solución en todos los experimentos.

En el escenario sin agitación se observó que el cianato es acumulado en las etapas tempranas de la cinética para posteriormente ser consumido en las etapas tardías de las mismas una vez que la concentración de cianuro disminuye (menor a  $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), sugiriendo así una clara preferencia por el consumo de cianuro con respecto al consumo de cianato en los escenarios sin agitación. Retomando lo mencionado por Fernández et al. (2003) sobre la producción de cianato como intermediario en la síntesis de formamida, en esta tesis este hecho podría ocurrir en los escenarios de baja transferencia de oxígeno, mientras el cianato es utilizado para síntesis celular en escenarios con alta transferencia de oxígeno, complementando la teoría de Fernández et al. (2003) con respecto a un efecto dependiente del oxígeno.

Se observó que los tiempos de biodegradación de cianuro a 150 y 370 rpm son iguales (46 horas), concluyendo que un coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ( $K_L a$ ) igual a  $0.85 \text{ h}^{-1}$  es suficiente para lograr la biodegradación total de  $2,000 \mu\text{mol L}^{-1}$  de cianuro, mismo que a 0 rpm tomaría casi 166.5 h.

A pesar de la similitud en el tiempo máximo para alcanzar la biodegradación a 150 y 370 rpm (Figuras 10.b y 10.c), a 370 rpm no se observó una fase de retraso previo al consumo de cianuro asociado a la fase exponencial de crecimiento microbiano, además a esta velocidad de agitación se favorece la producción de biomasa, asociado a un mayor consumo de cianato.

El experimento con agitación a 370 rpm está asociado a un menor porcentaje de ácidos orgánicos producidos del carbono consumido proveniente de la utilización de lactato, mientras que los experimentos sin agitación y con agitación orbital a 150 rpm, se asocian a un fraccionamiento cercano de 90% del carbono orgánico consumido hacia ácidos orgánicos: acetato y formiato. Es importante recordar que en el experimento con agitación a 370 rpm no se detectó acetato, sugiriendo así que este compuesto es producido, en los experimentos sin agitación y con agitación a 150 rpm, debido a la limitación de oxígeno en el sistema, puesto que la carga neta del carbono en el acetato se encuentra en forma reducida (estado de oxidación cero, resultante de los estados de oxidación del carbono -3 y +3 de los grupos metilo y carboxilo, respectivamente), mientras la carga neta del carbono contenido en el formiato se asocia a un estado de oxidación +2. La presencia de estos

ácidos orgánicos (formiato y acetato) es consistente con lo observado por Paavilainen et al. (1994) y Adjei et al. (1999) en medio alcalino, sin embargo, la dinámica de su producción según la transferencia de oxígeno al sistema no es reportada por dichos autores.

A pesar de las diferencias encontradas sobre los aspectos catabólicos de carbono orgánico, todos los experimentos aerobios presentan rendimientos celulares cercanos a  $Y_N = 0.1 \text{ g SSV g}^{-1} \text{ N}$ .

Por otro lado, respecto al experimento anóxico se encontró que la concentración final de cianuro fue de  $9.62 \text{ mg L}^{-1}$ , esta concentración es 9.7 veces superior al promedio de las concentraciones finales obtenidas en los experimentos en condiciones aeróbicas ( $0.99 \text{ mg L}^{-1}$ ). Otra diferencia encontrada con respecto a los experimentos aerobios es la nula producción de los ácidos orgánicos, tales como: acetato y formiato, observándose inclusive un consumo de la concentración inicial de formiato en el sistema ( $8 \text{ mmol L}^{-1}$ ).

El consumo de formiato es acorde con lo mencionado por Annachhatre et al. (2000), quienes afirman que los microorganismos degradadores de cianuro por rutas anóxicas metanógenicas pueden ser capaces de consumir formiato como sustrato, promoviendo así termodinámicamente la reacción de hidrólisis de cianuro. En este sentido, a pesar de que no se determinó la presencia de metano en los experimentos anóxicos, la limitación de dióxido de carbono como precursor para la formación de metano (al tener un sistema cerrado a la atmósfera) podría explicar la razón por la cual no se biodegradó el cianuro en su totalidad.

Es importante recordar que en los terreros de lixiviación de los cuales fue aislado el consorcio estudiado es posible tener zonas con distintas concentraciones de oxígeno, por lo cual no es de sorprender que los microorganismos estudiados fueran capaces de cambiar entre rutas metabólica aerobias y anóxicas, para lo cual además se observó un consumo de formiato en medio anóxico, y acumulado (no consumido) en medio aerobio.

Es importante mencionar que el cambio de biodegradación de condiciones aerobias a anóxicas solo había sido reportado por Kunz et al. (1992), a pH neutro, utilizando una cepa pura de *Pseudomonas fluorescens NCIMB 11764* y glucosa como fuente de carbono, por lo que los hallazgos descritos en esta sección son únicos en este sentido. Además, las rutas de biodegradación bajo condiciones aerobias y anóxicas encontradas por Kunz et al. (1992) fueron aquellas con la producción de amoníaco y formamida, mientras en este estudio las

rutas metabólicas encontradas fueron aquellas asociadas a la producción de cianato y formamida, lo cuales son hallazgos inéditos para estos escenarios evaluados con el tipo de consorcio recolectado de las pilas de lixiviación de terreros para la recuperación de oro. Por tanto, los microorganismos estudiados en la presente tesis pueden identificarse como aerobios facultativos, al ser capaces de realizar fermentación al agotarse el oxígeno disponible.

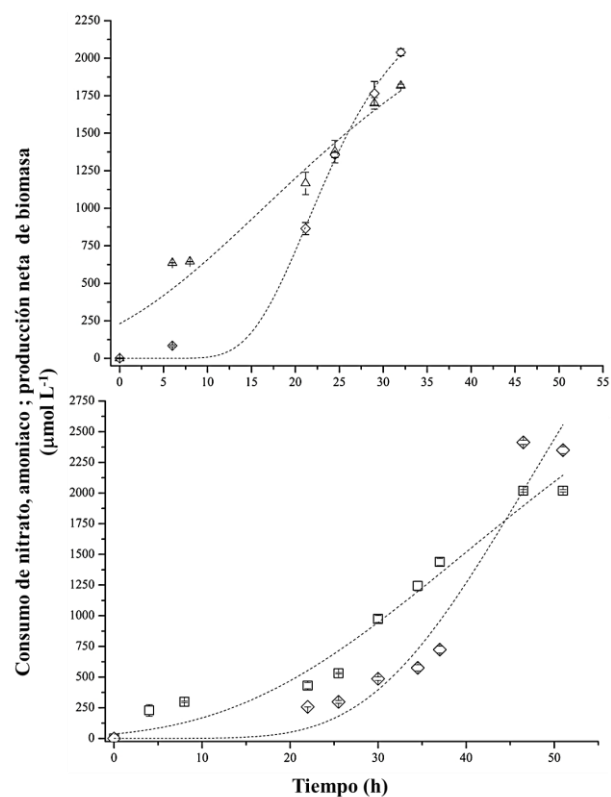
### **IV.3 Cinéticas de biodegradación y evolución de parámetros asociados empleando amoníaco y nitrato como fuentes únicas de nitrógeno, con agitación a 150 rpm**

Debido a que el amoníaco representa una fuente de nitrógeno de mayor asimilación en comparación con el cianuro o el nitrato, en esta sección se presentan las cinéticas de biodegradación de la fuente de nitrógeno y producción de biomasa a 150 rpm, utilizando  $2,000 \mu\text{mol L}^{-1}$  de amoníaco ó nitrato, como única fuente de nitrógeno y el mismo preinóculo aclimatado a cianuro.

#### **IV.3.1 Biodegradación de amoníaco y nitrato y producciones de biomasa ajustados al modelo de Gompertz**

En la Figura 12 se ilustran las cinéticas de consumo (expresadas en términos de producción) de amoníaco y de síntesis celular (Figura 12.a), así como de nitrato y síntesis celular (Figura 12.b). La Tabla 9 presenta los coeficientes de determinación y velocidades máximas estimadas

Para el escenario con amoníaco como única fuente de nitrógeno, el consumo total de amoníaco fue de  $1,820 \mu\text{mol L}^{-1}$  en 32 h, siendo importante mencionar que a partir de las 29 h ya se había removido del sistema 93.4 % del nitrógeno total consumido. La concentración inicial y final de biomasa fue de  $1,640 \pm 3 \mu\text{mol L}^{-1}$  y  $3,680 \pm 23 \mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente. Lo cual corresponde a una producción neta de biomasa de  $2,040 \mu\text{mol L}^{-1} \pm 26$ , concentración ligeramente superior al consumo de nitrógeno en el sistema ( $1,820 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). El rendimiento de biomasa con respecto al N-NH<sub>3</sub> consumido es de  $Y_N = 9.04 \pm 0.088 \text{ g SSV g}^{-1} \text{ N-NH}_3$ .



**Figura 12.** Cinéticas de consumo acumulado de amoniaco ( $\Delta$ ), nitrato ( $\square$ ) y producción neta de biomasa ( $\diamond$ ) con distinta fuente de nitrógeno. a) amoniaco como única fuente de nitrógeno; b) nitrato como única fuente de nitrógeno. Experimentos con agitación a 150 rpm. Las barras representan el error estándar de duplicados. Las líneas punteadas representan el ajuste con el modelo Gompertz.

**Tabla 9.** Velocidades máximas estimadas de acuerdo al modelo Gompertz para los experimentos con amoniaco y nitrato como únicas fuentes de nitrógeno con agitación a 150 rpm, y sus coeficientes de determinación ( $R^2$ ).

Experimento	Parámetro	$r_{\max}$ ( $\mu\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1}$ )	$R^2$
Amoniaco; agitación a 150 rpm	Amoniaco	$58 \pm 10$	0.951
	SSV	$145.5 \pm 7.2$	0.995
Nitrato; agitación a 150 rpm	Nitrato	$61.6 \pm 0.4$	0.961
	SSV	$125.6 \pm 1.4$	0.93



Es posible observar 3 etapas en el consumo de N-NH<sub>3</sub>, con una primera etapa caracterizada por una caída en la concentración de 1,840 μmol L<sup>-1</sup> a 1,200 μmol L<sup>-1</sup> durante las primeras 3 h (consumo de N-NH<sub>3</sub> igual a 640 μmol L<sup>-1</sup>), una segunda etapa en la que es posible observar un valor constante en la concentración de amoníaco en solución entre las 3 y 8 h, etapa que fue posible identificar también en los experimentos con cianuro pero con una duración promedio de ~ 22 h y una tercera etapa que corresponde a un decaimiento progresivo de la concentración de N-NH<sub>3</sub> durante 24 h hasta la remoción total de N-NH<sub>3</sub> a las 32 h, que resulta en una reducción de 14 h comparado con aquellos experimentos en donde la fuente de nitrógeno era el cianuro, lo cual concuerda con que el N-NH<sub>3</sub> es una fuente de nitrógeno de mayor asimilación para la síntesis celular. Las velocidades máximas estimadas de amoníaco y biomasa fueron de 58 ± 10 μmol L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (R<sup>2</sup>= 0.96) y 145.5 ± 7.2 μmol L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (R<sup>2</sup>= 0.995), respectivamente (ver Tabla 9).

La velocidad máxima de consumo de amoníaco (o nitrito) fueron 0.7 (o 0.73) veces la velocidad correspondiente al consumo de cianuro como única fuente de nitrógeno con agitación a 150 rpm (cf. sección IV.2), y la velocidad de producción de biomasa es 1.76 veces mayor en este experimento que en el equivalente con cianuro como única fuente de nitrógeno.

Respecto a las cinéticas de biodegradación de nitrato como única fuente de nitrógeno (Figura 12.b), se observa que el consumo total de nitrato fue 2,010 ± 90 μmol L<sup>-1</sup> en un lapso de 46.5 h, con concentraciones iniciales y finales de 2,070 ± 8 y 50 ± 01 mmol L<sup>-1</sup>. La producción neta de biomasa fue 2,340 μmol L<sup>-1</sup> en el mismo intervalo de tiempo con un R<sup>2</sup>= 0.94. Las velocidades máximas encontradas para el consumo de nitrato y la producción de biomasa son estadísticamente distintas entre sí según un ANDEVA de un factor.

El rendimiento de biomasa por N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> consumido fue de 9.4 g SSV/ g N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, prácticamente igual al obtenido cuando se utiliza N-NH<sub>3</sub>.

Es importante mencionar que con respecto al perfil de concentración de nitrato, en el presente experimento se muestra un consumo inicial considerablemente menor al experimento en el que se usó amoníaco como única fuente de nitrógeno con agitación a 150 rpm, y que contrariamente presenta similitud al consumo inicial observado en el experimento de cianuro como única fuente de nitrógeno con agitación a 150 rpm. Otras

similitudes con respecto al experimento con cianuro, como única fuente de nitrógeno a 150 rpm, es el tiempo neto de biodegradación de la fuente de nitrógeno y el cambio de pendiente en la concentración de la fuente de nitrógeno en la segunda etapa (primeras 25.5 h).

### IV.3.2 Balance de carbono y control de pH

En la Tabla 10 se muestra el consumo de sustrato y producción de ácidos orgánicos en los experimentos con amoníaco o con nitrato como única fuente de nitrógeno, con agitación a 150 rpm.

**Tabla 10.** Balance de carbono para los experimentos con amoníaco y nitrato como únicas fuentes de nitrógeno, con agitación a 150 rpm. El % de carbono se refiere al porcentaje de carbono recuperado relativo al carbono orgánico consumido del lactato.

	Amoníaco a 150 rpm		Nitrato a 150 rpm	
	t (h)		t (h)	
	0	32	0	51
[Lactato] (mmol L <sup>-1</sup> )	60.35 ± 0.25	45.07 ± 0.18	53.31 ± 0.13	31.67 ± 0.82
Consumo	0	15.28	0	21.65
[Formiato] (mmol L <sup>-1</sup> )	16.01 ± 0.26	31.65 ± 0.65	16.16 ± 0.27	67.45 ± 0.64
Producción	0	15.64	0	51.29
% Carbono	0	34.12	0	79
[Acetato] (mmol L <sup>-1</sup> )	2.16 ± 0.09	3.16 ± 0	1.54 ± 0.2	4.04 ± 0.03
Producción	0	1.0	0	2.5
% Carbono	0	13.04	0	7.7
[Sólidos suspendidos volátiles] (μmol L <sup>-1</sup> )	1,640 ± 3	3,680 ± 23	1,600 ± 40	3,940 ± 80
Producción (μmol L <sup>-1</sup> )	0	2,040	0	2,340
% Carbono producido	/	22.24	/	18.01
Consumo hidróxido (mmol L <sup>-1</sup> )	/	17.69 ± 0.39	/	31.25 ± 0.9

En el escenario con amoníaco, se consumieron  $15.28 \text{ mmol L}^{-1}$  de lactato, equivalente a una concentración de carbono de  $45.85 \text{ mmol L}^{-1}$ . La concentración producida de formiato fue de  $15.64 \text{ mmol L}^{-1}$ . En este experimento, al igual que el observado a 150 rpm utilizando cianuro como única fuente de nitrógeno, la producción de acetato fue de  $1 \text{ mmol L}^{-1}$ , equivalente a una concentración  $2 \text{ mmol L}^{-1}$  de carbono. El porcentaje relativo de carbono orgánico consumido de lactato a los productos, formiato, acetato y biomasa es 34.12%, 4.34%, y 22.24 %, respectivamente. Por tanto 39.3% fue oxidado completamente.

En este punto es importante notar que al igual que en los experimentos presentados en la sección IV.2, el porcentaje relativo de carbono orgánico en formiato es considerablemente mayor al asociado al acetato. A pesar de esto, el porcentaje recuperado en los ácidos orgánicos formiato y acetato (38.46 %) es considerablemente menor al observado en todos los experimentos de la sección IV.2. Esto es traducido en una menor concentración total de hidróxido adicionada, siendo esta de  $17.69 \text{ mmol L}^{-1}$ , concentración muy similar a la suma de los ácidos orgánicos producida en el sistema ( $16.64 \text{ mmol L}^{-1}$ ). El rendimiento celular global con respecto al consumo de lactato es  $Y_C=0.169 \text{ g SSV g}^{-1} \text{ lactato}$ , rendimiento considerablemente mayor a los rendimientos cercanos a  $Y_C= 0.1$  en los experimentos con cianuro como única fuente de nitrógeno.

En el escenario con nitrato como fuente de nitrógeno, el consumo de lactato fue  $21.65 \text{ mmol L}^{-1}$ , equivalente a una concentración de carbono  $64.94 \text{ mmol L}^{-1}$ , mientras la concentración producida de formiato y de acetato fue  $51.29 \text{ mmol L}^{-1}$  (equivalente a una concentración equimolar de carbono consumido) y  $2.50$  (equivalente a una concentración  $5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ C- lactato}$ ), respectivamente. El porcentaje relativo de carbono orgánico a los ácidos orgánicos formiato y acetato es 78.97% y 7.69% y sumadas a la concentración de carbono orgánico correspondiente a la biomasa ( $11.7 \text{ mmol L}^{-1}$  o 18% del carbono orgánico total consumido) resulta en un 104.67% del carbono orgánico consumido. El rendimiento de producción de biomasa por sustrato consumido es  $Y_C= 0.1376 \text{ g SSV g}^{-1} \text{ lactato}$ .

A pesar de que en el experimento con nitrato (como única fuente de N) existe una gran similitud en términos de producción de biomasa, rendimiento celular por consumo de nitrógeno ( $Y_N$ ), y rendimiento celular por sustrato consumido ( $Y_C$ ), con respecto al

experimento con amoníaco, el porcentaje relativo de carbono para síntesis de ácidos orgánicos determinado es considerablemente mayor con nitratos que con amoníaco.

Finalmente, la concentración de hidróxido adicionada fue  $31.25 \text{ mmol L}^{-1}$ , y a diferencia de lo observado hasta ahora, esta concentración fue considerablemente menor a la suma de los ácidos orgánicos producidos ( $53.79 \text{ mmol L}^{-1}$ ). A pesar de esto, la concentración de hidróxido adicionada en este experimento fue casi el doble de la adicionada en el experimento con amoníaco como única fuente de nitrógeno, lo cual puede justificarse por la mayor concentración de formiato y acetato producida al utilizar nitrato.

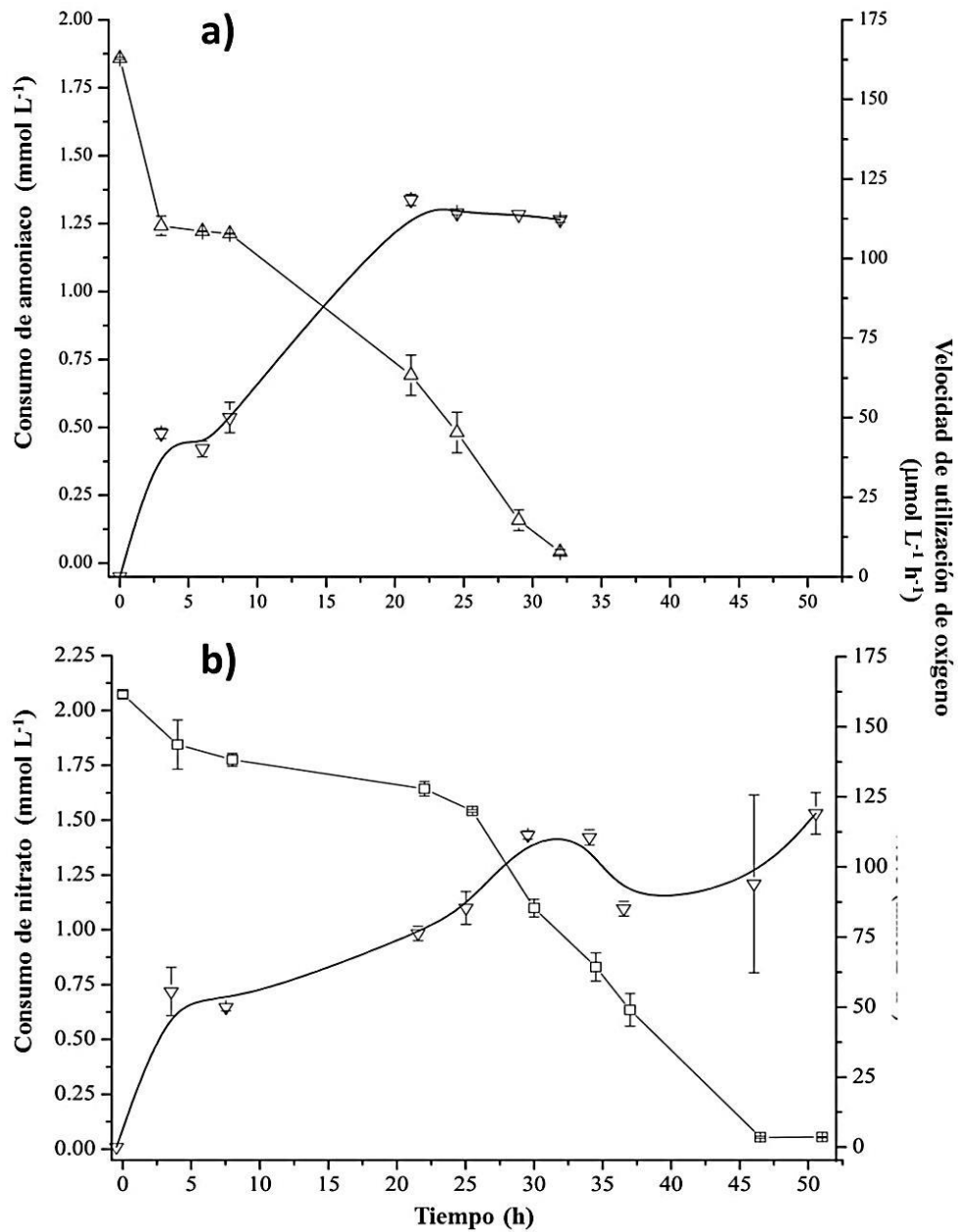
### **IV.3.3 Velocidades de utilización de oxígeno disuelto (OUR)**

La Figura 13 ilustra los perfiles de velocidad de utilización de oxígeno y de consumo de amoníaco (Figura 13.a), así como la velocidad de utilización de oxígeno y perfiles de consumo de nitrato (Figura 13.b). Es posible observar que en ambos casos (al igual que en los experimentos con cianuro como única fuente de nitrógeno) el perfil de utilización de oxígeno sigue la misma tendencia a incrementar de acuerdo con el consumo de la fuente de nitrógeno.

El consumo de amoníaco presenta sus valores máximos en la fase de crecimiento exponencial del experimento con amoníaco en los tiempos 21.17 a 32 h, a velocidades cercanas a  $110 \mu\text{mol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . La concentración de oxígeno consumida fue  $3,140 \mu\text{mol L}^{-1}$ .

Para el nitrato las velocidades máximas son cercanas a  $120 \mu\text{mol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  a partir de las 30 h hasta el final de la cinética, lo que coincide con la última fase de consumo de nitrato. La concentración total de oxígeno consumida en el experimento fue  $4,430 \mu\text{mol L}^{-1}$ .

Las velocidades de utilización de oxígeno de los experimentos con amoníaco y nitrato son muy similares a la velocidad de utilización de oxígeno en el experimento con cianuro con agitación a 150 rpm (sección IV.2.2), ya que en todos los casos la agitación fue la misma (150 rpm) al igual que el coeficiente de transferencia de oxígeno.



**Figura 13.** Velocidades de utilización de oxígeno (∇) y perfiles de consumo de la fuente de nitrógeno. a) única fuente de nitrógeno amoniaco (Δ) y (b) única fuente de nitrógeno nitrato (□). Experimentos con agitación a 150 rpm. Las barras representan el error estándar de duplicados.

#### IV.3.4 Discusión

Para los mismos consorcios microbianos aclimatados al cianuro, se encontró que, a 150 rpm, la fuente de nitrógeno con mayor capacidad de asimilación es  $\text{N-NH}_4^+$ , lo cual conlleva un menor tiempo para la síntesis celular (32 h) comparado con las otras fuentes de nitrógeno, nitrato y cianuro (ca. 45 h). Además, el análisis de varianza de dos factores para los rendimientos celulares ( $Y_N$ ) indicó que a pesar del estado de oxidación (+5) del nitrógeno contenido en el nitrato ( $Y_N=9.4 \text{ g SSV g}^{-1} \text{ N-NO}_3^- \pm 0.07$ ) no existen diferencias significativas con respecto al rendimiento con amoníaco como fuente de nitrógeno ( $9.04 \pm 0.087 \text{ g SSV g}^{-1} \text{ N-NH}_4^+$ ), pero sí existen diferencias significativas cuando la fuente de nitrógeno es cianuro ( $6.05 \pm 0.184 \text{ g SSV g}^{-1} \text{ N-CN}$ ). Consecuentemente, la síntesis celular en los experimentos fue mayor utilizando amoníaco y nitrato como únicas fuentes de nitrógeno en comparación con la obtenida al utilizar cianuro.

Las mayores concentraciones de biomasa sintetizada se explican por que estas fuentes de nitrógeno pueden ser asimiladas directamente. En contraste, cuando se usa cianuro como fuente de nitrógeno, existe una fracción importante del ion que es convertida a productos metabólicos de nitrógeno y no a biomasa directamente.

Es importante notar que en estos experimentos ocurrió una fase de retraso intermedia, de las cuales la del ion nitrato fue la de mayor duración, comparada con la del amoníaco. El hecho de que existan fases de retraso intermedias sugiere que las fases diaúxicas observadas en los experimentos con cianuro como única fuente de nitrógeno no son debido a una limitación por nitrógeno (que podría ser causada por una limitación de cianato), sino que pueden deberse a limitaciones de un aceptor de electrones para posteriormente utilizar un segundo aceptor de electrones.

Con respecto a los aspectos catabólicos asociados a la utilización y fraccionamiento de carbono orgánico, la adición de amoníaco como fuente de nitrógeno con respecto al experimento con cianuro a 150 rpm (presentado en la sección IV.2.2), se asocia a un consumo muy similar de lactato (solo  $0.95 \text{ mmol L}^{-1}$  mayor que utilizando amoníaco), pero a una menor producción de ácidos orgánicos y a una menor concentración de hidróxido adicionado para neutralizar la acidez producida por dichos compuestos. El rendimiento

celular con respecto al lactato consumido cuando se emplea cianuro como única fuente de nitrógeno fue de  $Y_C=0.13 \pm 0.0063 \text{ g SSV g}^{-1} \text{ lactato}$ .

De forma análoga a lo mencionado en el párrafo anterior, la adición de nitrato con respecto al experimento con cianuro a 150 rpm (presentado en la sección IV.2), se encontró que la adición de nitrato se asocia a un mayor consumo de lactato, siendo  $7 \text{ mmol L}^{-1}$  mayor. Además de esto, la adición de nitrato tiene como implicación una mayor producción de ácidos orgánicos y por tanto es asociado a una mayor concentración de hidróxido adicionado para neutralizar la acidez producida por dichos compuestos, siendo 1.42 veces mayor la concentración de ácidos orgánicos producidos con respecto al experimento con cianuro como única fuente de nitrógeno y cerca de 3.23 veces la concentración de ácidos orgánicos producidos en el experimento con amoníaco como única fuente de nitrógeno. El rendimiento celular con respecto al lactato consumido calculado para el experimento con nitrato como única fuente de nitrógeno de  $Y_C=0.137 \text{ g SSV g}^{-1} \text{ lactato}$  fue muy similar con respecto al rendimiento observado para el experimento con cianuro como única fuente de nitrógeno.

#### **IV.4 Cinéticas de biodegradación y evolución de parámetros, utilizando amoníaco y nitrato como fuentes alternas de nitrógeno; efecto de la transferencia de oxígeno en la biodegradación**

En la presente sección se evalúan los efectos sobre la biodegradación de cianuro en presencia de otras fuentes de nitrógeno (amoníaco ó nitrato) a concentraciones equimolares con respecto al cianuro, en los tres escenarios de agitación: sin agitar, con agitación a 150 rpm y a 370 rpm.. Adicionalmente, se discute el efecto que impone el cianuro sobre la biodegradación de las fuentes alternas amoníaco y nitrato.

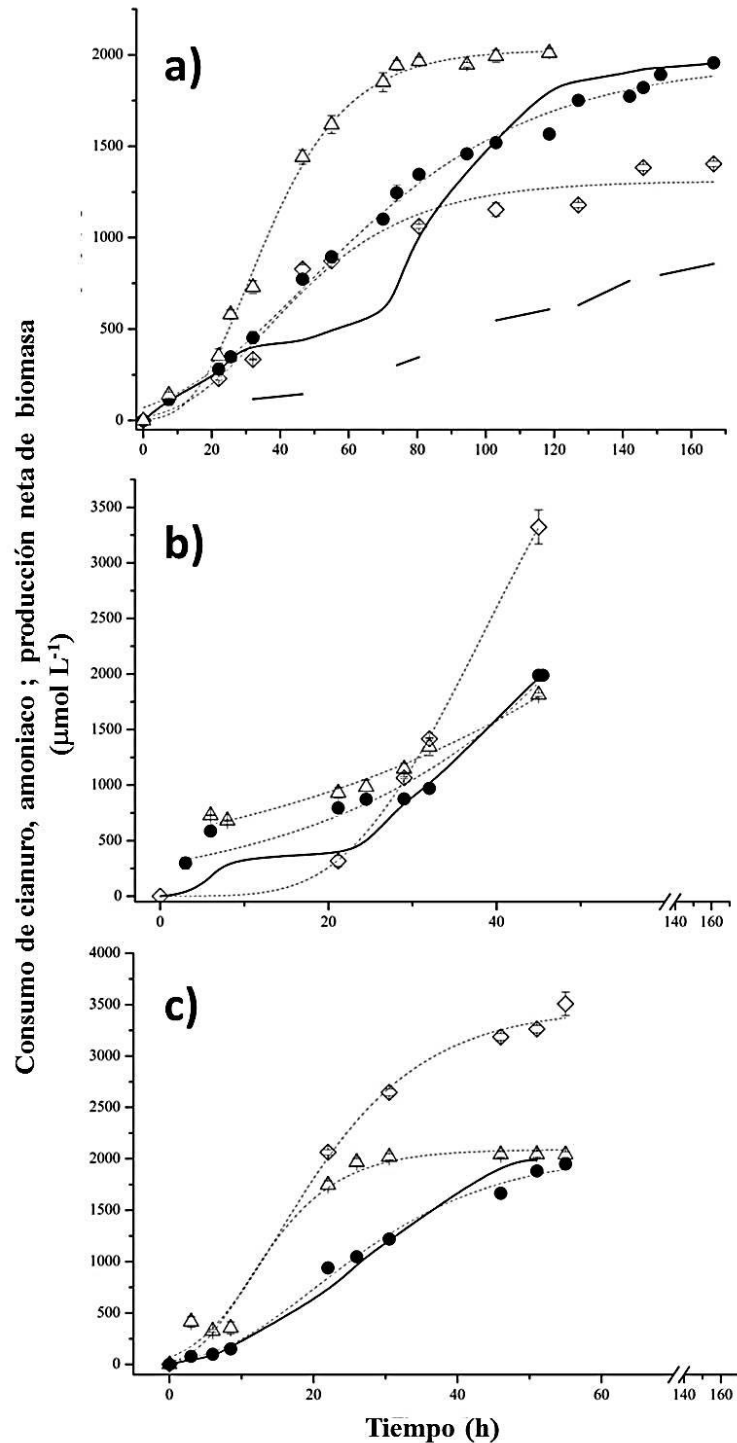
##### **IV.4.1 Biodegradación de amoníaco y cianuro como fuentes alternas de nitrógeno**

En la Figura 14 se presentan las cinéticas de consumo de cianuro, amoníaco y producción de biomasa en los experimentos con cianuro y amoníaco como fuentes alternas de nitrógeno a concentraciones equimolares, sin agitación (Figura 14 a), con agitación a 150 rpm (Figura 14.b) y agitación a 370 rpm (Figura 14.c), ajustados al modelo de Gompertz.

Adicionalmente, a modo de comparación se presentan los perfiles de consumo de cianuro como única fuente de nitrógeno correspondientes al mismo tipo de agitación, los cuales fueron mostrados en la sección IV.2 (Figura 10).

La Tabla 11, muestra los parámetros cinéticos obtenidos con el ajuste de los datos experimentales al modelo Gompertz para los tres experimentos mencionados.





**Figura 14.** Cinética de consumo acumulado de cianuro (●), amoniaco (Δ) y producción neta de biomasa (◇) con cianuro y amoniaco como fuentes alternas de nitrógeno. (a) sin agitación; (b) con agitación a 150 rpm; (c) con agitación a 370 rpm. Las barras representan el error estándar de duplicados. Las líneas punteadas representan el ajuste al modelo Gompertz. En el panel a y b las líneas continuas negras muestran el consumo de cianuro cuando se encuentra como única fuente de nitrógeno a la misma velocidad de agitación. Las líneas discontinuas negras (sin símbolo) muestran la producción de biomasa cuando se encuentra como única fuente de nitrógeno a la misma velocidad de agitación.

**Tabla 11.** Velocidades máximas estimadas de acuerdo al modelo Gompertz para los experimentos con cianuro y amoniacó como fuentes alternas de nítrógeno, sin agitación, con agitación a 150 y 370 rpm y sus coeficientes de determinación ( $R^2$ ).

	Parámetro	$r_{\max}$ ( $\mu\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1}$ )	$R^2$
Sin agitación	Cianuro	$19.6 \pm 0.1$	0.994
	Amoniaco	$48.1 \pm 1.4$	0.995
	SSV	$21.1 \pm 1.4$	0.963
Agitación a 150 rpm	Cianuro	$7.1 \pm 0.4$	0.95
	Amoniaco	$4.7 \pm 1.6$	0.97
	SSV	$15.7 \pm 1.4$	0.997
Agitación a 370 rpm	Cianuro	$57 \pm 1.5$	0.993
	Amoniaco	$114.9 \pm 0.4$	0.973
	SSV	$119.8 \pm 11$	0.993

Con respecto al **experimento sin agitación**, es posible observar que la biodegradación de amoniacó concluye a las 80.5 h, con un consumo total de  $2,010 \pm 20 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Por otro lado, la biodegradación de cianuro es completada en 166.5 h, que corresponde al doble de tiempo con respecto al amoniacó, y equivale a un consumo total de  $1,960 \mu\text{mol L}^{-1} \pm 3$  de nítrógeno. Se observa además que ambas fuentes de nítrógeno se consumieron simultáneamente.

Al comparar el perfil de consumo de cianuro de este experimento, con el perfil de consumo cuando el cianuro fue la única fuente de nítrógeno, se observa un ligero incremento en la velocidad de consumo en el intervalo entre las 32 y 94.5 h (Fig 9.a). No se observó la fase estacionaria entre las 32 y 70 h que si se observó en el experimento con cianuro como única fuente de nítrógeno (ver línea negra continua de la Fig 9.a). Las velocidades máximas estimadas fueron  $19.6 \mu\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1}$  de cianuro ( $0.51 \text{ mg L}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) y  $48.1 \mu\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1}$  de amoniacó ( $0.817 \text{ mg L}^{-1} \text{h}^{-1}$ ), con  $R^2$  para cianuro y amoniacó de 0.994 y 0.995, respectivamente.

Con respecto a la biomasa, la producción neta fue de solo  $1,400 \mu\text{mol L}^{-1}$ , iniciando con una concentración de  $1,590 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Al igual que en el experimento con cianuro sin agitación (cf. sección IV.2.1), es posible observar que el nitrógeno consumido ( $3,970 \mu\text{mol L}^{-1}$ , consumo total de nitrógeno en el sistema, considerando el consumo de cianuro+amoniac) no fue destinado en su totalidad a los  $1,400 \mu\text{mol L}^{-1}$  producidos de biomasa. La velocidad máxima de producción de biomasa fue  $21.1 \mu\text{mol SSV L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  ( $R^2=0.963$ ).

Ademas, existe una mayor producción de biomasa durante las primeras 80.5 h (intervalo en el que se completa la biodegradación de amoniac), en comparación con el incremento en biomasa asociada al consumo de cianuro de las 80.5 a las 166.5 h. Es importante observar la similitud que existe entre la tendencia de producción de biomasa y su velocidad máxima con respecto al la tendencia de consumo y velocidad máxima de consumo de cianuro.

El rendimiento promedio de biomasa sintetizada por consumo de nitrógeno (suma de los aportes por consumo de amoniac y cianuro) es de  $Y_N=2.85 \text{ g SSV g}^{-1} \text{ N}$ .

Con respecto al **escenario con agitación a 150 rpm**, se observa que el consumo de amoniac y cianuro ocurre simultáneamente, y que el tiempo final de consumo de ambas especies ocurre a las 45 h. La velocidad máxima de consumo de amoniac fue de  $47.7 \mu\text{mol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  ( $R^2=0.97$ ) mientras para el consumo de cianuro la velocidad máxima fue  $71.1 \mu\text{mol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  ( $R^2=0.95$ ).

Es posible observar tendencias similares en las cinéticas de biodegradación de ambas especies, especialmente en la segunda etapa (estado estacionario), la cual presenta duración de 3 a 8 h para el amoniac, y de 8 a 28 h para el cianuro. El consumo neto de amoniac y cianuro al término de la cinética fue de  $1,810$  y  $1,990 \mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente.

Los resultados permiten concluir que el consumo de cianuro se favorece por la presencia de amoniac, lo cual se puede atribuir a un incremento en la velocidad de síntesis celular en el sistema, que permite una respuesta más rápida para la biodegradación de cianuro en sistemas equimolares con amoniac, a 150 rpm. Además, la adición de cianuro conlleva a un retraso en el tiempo de consumo de amoniac pasando de 32 a 46 h, para su consumo

total cuando es comparado con el sistema que tenía amoníaco como única fuente de nitrógeno (Fig 7.a).

En este caso, debido a la agitación a 150 rpm, no es posible observar un comportamiento diauxico o fase de retraso tan prolongada de consumo de cianuro y producción de biomasa como en el escenario sin agitación (ver Fig 9.a), lo anterior podría deberse a que los procesos sin agitación se ralentizan y permiten observar a detalle la evolución de los diferentes mecanismo biológicos que están presentes en los sistemas equimolares, cianuro + amoníaco.

Con respecto a la biomasa, la producción neta fue de  $3,320 \mu\text{mol L}^{-1}$ . El rendimiento global de biomasa sintetizada por consumo de nitrógeno calculado fue de  $Y_N=7.04 \text{ g SSV g}^{-1} \text{ N}$ , rendimiento menor (sin embargo estadísticamente igual de acuerdo al análisis estadístico ANDEVA de un factor) que el experimento con amoníaco como única fuente de nitrógeno ( $Y_N=9.04 \text{ g SSV g}^{-1} \text{ N}$ ), y un poco mayor que el rendimiento de biomasa en el experimento con cianuro como única fuente de nitrógeno ( $Y_N=6.05 \text{ g SSV g}^{-1} \text{ N}$ ). La producción de biomasa es mayor en las últimas horas de la cinética como se ha observado en todos los casos anteriores, asociado al mayor consumo simultáneo de cianuro y amoníaco observado a partir de las 20 h. Para este caso, la velocidad máxima de producción de biomasa fue de  $15.7 \mu\text{mol SSV L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  ( $R^2= 0.997$ ), velocidad mayor al de las fuentes individuales por el consumo simultáneo de estas.

Respecto al **escenario con agitación a 370 rpm** con cianuro y amoníaco (Figura 14.c), la biodegradación de amoníaco se completa antes que la biodegradación de cianuro, nuevamente (igual que en el escenario sin agitación) en un tiempo (26 h) que corresponde a la mitad del tiempo en el que se concluye la biodegradación de cianuro (55 h). El consumo de ambos iones es menor durante las primeras 8.5 h, con respecto al consumo del intervalo entre las 8.5 h y el tiempo final de la cinética. El consumo neto de amoníaco y cianuro al término de la cinética fue de 2,040 y 1,950  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente. Las velocidades máximas de consumo de amoníaco y cianuro fueron de  $114.9 \mu\text{mol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  de amoníaco que equivale a  $1.953 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  ( $R^2=0.973$ ) y de  $57 \mu\text{mol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  de cianuro equivalente a  $1.48 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  ( $R^2=0.993$ ), respectivamente.

Además, tal como es posible observar, la biodegradación de cianuro en el experimento con cianuro como única fuente de nitrógeno a 370 rpm (mostrado con línea negra continua en la Figura 14.c) es muy similar al obtenido en condiciones equimolares con amoníaco, sugiriendo así que la transferencia de oxígeno al sistema para degradar ambos iones es suficiente, sin afectar el comportamiento del consumo de cianuro cuando funge como única fuente de nitrógeno.

La producción neta de biomasa fue de  $3,500 \mu\text{mol L}^{-1}$ , partiendo de una concentración inicial de  $1,620 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Esto se asocia a una velocidad máxima de producción de  $119.8 \mu\text{mol SSV L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  ( $R^2=0.993$ ), velocidad mayor que las velocidades de consumo de amoníaco y cianuro.

Se observa que la concentración de biomasa aumenta considerablemente desde el inicio de la cinética sin la existencia de fases de retraso, tal como fue observado en el experimento con cianuro como única fuente de nitrógeno (c.f.IV.2.3), sugiriendo así una mayor asimilación de nitrógeno y una baja producción o acumulación de intermediarios desde los tiempos iniciales de la cinética.

El rendimiento global de biomasa sintetizada por consumo de nitrógeno es de  $Y_N=7.09 \text{ g SSV g}^{-1} \text{ N}$ , mientras los rendimientos en los intervalos de 0-22 h y 22-55 h son 6.2 y 8.97  $\text{g SSV g}^{-1} \text{ N}$ , respectivamente.

La concentración de biomasa sintetizada en este experimento es considerablemente mayor a la sintetizada en el experimento sin agitación y sólo ligeramente mayor a aquella con agitación a 150 rpm. La razón por la que ocurre esto es la misma que cuando se incrementa la velocidad de transferencia de oxígeno en los escenarios con cianuro como única fuente de nitrógeno, ya que al tener oxígeno como aceptor terminal de electrones incrementa la energía disponible para sintetizar biomasa. Además, de acuerdo con lo observado se favorece la síntesis/asimilación de cianato, con respecto a la especie formamida, recordando que la primera especie mencionada es un intermediario de la síntesis celular, mientras el nitrógeno contenido en la formamida no es asimilable.

Es posible determinar además que la respuesta para síntesis celular se da en un tiempo más corto, que los experimentos cuando las fuentes de nitrógeno son únicas, y su incremento es

típico de una curva con crecimiento celular exponencial sin fase de retardo, que parece incrementar al final del consumo de cianuro en el sistema.

#### **IV.4.1.1 Productos de biodegradación de cianuro y balance de nitrógeno**

La Tabla 12 muestra los metabolitos de nitrógeno producidos por la biodegradación de cianuro en los experimentos sin agitación, con agitación a 150 rpm y con agitación a 370 rpm, en presencia conjunta de amoníaco y cianuro.

En el experimento sin agitación, se logró la cuantificación de cianato y formamida a los tiempos inicial, final y un tiempo intermedio de 103 h. En la Tabla 12 es posible observar que la relativamente alta concentración de las especies formamida y cianato acumuladas hasta las 103 h (productos de biodegradación de cianuro) explica la similitud observada entre el perfil de producción de biomasa y el perfil de consumo de amoníaco discutida en la sección anterior. De hecho, la concentración relativamente alta de formamida (cf. sección IV.2.1) podría explicarse por el agotamiento de oxígeno ocasionado por la degradación de la primera fuente de nitrógeno en ser consumida (amoníaco), lo cual conllevaría a una ruta de biodegradación de cianuro independiente del oxígeno. Además, es importante mencionar que con respecto al experimento con cianuro como única fuente de nitrógeno sin agitación (cf. sección IV.2.1), la concentración final de cianato cuantificada en el presente experimento es casi el doble de la concentración final de dicho experimento. Respecto a la formamida, la concentración final cuantificada en el presente trabajo fue  $260 \mu\text{mol L}^{-1}$  mayor.

A 0 rpm, la concentración de biomasa sintetizada al final de la cinética fue  $1,400 \mu\text{mol L}^{-1}$ , mientras la concentración total biodegradada de nitrógeno fue  $3,970 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Sumando las concentraciones finales de los productos de biodegradación de cianuro, formamida y cianato ( $2,840 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), se observa que existe una concentración  $1,120 \mu\text{mol L}^{-1}$  de nitrógeno no cuantificada (28.5% del nitrógeno consumido) en los productos de biodegradación, ni en la biomasa producida.

**Tabla 12.** Balance de nitrógeno en el experimento con amoníaco y cianuro como fuentes alternas de nitrógeno, con agitación a 150 y 370 rpm.

	Sin agitación			Agitación a 150 rpm		Agitación a 370 rpm			
	t (h)								
	0	103	166.5	0	45	0	22	30.5	55
[Cianuro] ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	2,060 $\pm$ 12	54 $\pm$ 16	110 $\pm$ 19	2,000 $\pm$ 30	10 $\pm$ 0	2,070 $\pm$ 60	1,140 $\pm$ 20	850 $\pm$ 24	120 $\pm$ 18
Consumo ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	0	1,520	1,960	0	1,990	0	940	1,220	1,950
[Amoníaco] ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	2.014 $\pm$ 0.04	22 $\pm$ 2	3 $\pm$ 2	1,820 $\pm$ 16	0	2,050 $\pm$ 28	300 $\pm$ 12	30 $\pm$ 3	0
Consumo ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	0	1,990	2,010	0	1,820	0	1,750	2,020	2,050
[Cianato] ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	138 $\pm$ 2	686 $\pm$ 3	553 $\pm$ 9	150 $\pm$ 10	340 $\pm$ 5	145.7 $\pm$ 4	891 $\pm$ 20	728 $\pm$ 3	520 $\pm$ 6
Diferencia finita ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	0	548	133	0	190	0	745.3	163	210
[Formamida] ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	269 $\pm$ 5	1,060 $\pm$ 20	889 $\pm$ 10	0	0	0	0	0	0
Diferencia finita ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	0	791	171	0	0	0	0	0	0
[Sólidos suspendidos volátiles] ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	1,600 $\pm$ 10	2,750 $\pm$ 30	3,000 $\pm$ 10	1,620 $\pm$ 3	4,940 $\pm$ 160	1,620 $\pm$ 90	3,680 $\pm$ 170	4,260 $\pm$ 260	5,130 $\pm$ 120
Producción ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	0	1,150	1,400	0	3,320	0	2,060	2,650	3,510

Por otro lado, en el experimento con agitación a 150 rpm se midió la especie cianato a los tiempos inicial y final de la cinética, cuantificándose 150 y 340  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente. En este experimento no fue detectada la presencia de formamida. Es preciso recordar que la concentración de biomasa sintetizada fue de 3,320  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , sumando así 3,660  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de nitrógeno o 96.2 % de la concentración de nitrógeno consumida en el sistema (3,800  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ).

Finalmente, en el experimento con agitación a 370 rpm, se realizaron cuatro mediciones de la especie cianato, a las 0, 22, 30.5 y 55 h, cuantificándose concentraciones de 0.1457, 0.89, 728, y 520  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente. Es posible observar que hasta las 22 h, la concentración medida de cianato podría provenir del consumo de 940  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de cianuro hasta ese punto. Esta observación tiene sentido ya que tal como se mencionó, la producción de biomasa de las 0 a las 22 h es de 2.06  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , que concuerda con el consumo de una concentración 1,750  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de amoníaco.

Por otro lado, de las 22 a las 55 h, existe un consumo de 370  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de la especie cianato, a la par con el consumo 1,000  $\mu\text{mol L}^{-1}$  del cianuro restante, lo cual podría satisfacer la producción de biomasa (1,440  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) en este intervalo.

El balance global de N cierra el 99 % del nitrógeno consumido entre el cianato producido (5 %) y la biomasa sintetizada (94 %)

Es importante notar que las concentraciones finales de cianato en los experimentos de esta sección son mayores que en los experimentos análogos (en cuanto a velocidad de agitación se refiere) con cianuro como única fuente de nitrógeno. El mejor ejemplo es el consumo de cianato hasta una concentración final de 70  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (Tabla 7) que se observó en el experimento con cianuro como única fuente de nitrógeno y con agitación a 370 rpm. En contraste con la concentración de 520  $\mu\text{mol L}^{-1}$  cuando se usó cianuro y amoníaco con agitación a 370 rpm. Esto sugiere que la asimilación de cianato se inhibió cuando se adicionaron amoníaco y cianuro, ya que no se logró que la utilización de cianato alcanzara concentraciones menores a 500  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , independientemente del incremento en la transferencia de oxígeno al sistema, posiblemente debido a la adición de la especie



amoníaco. El análisis estadístico que se muestra más adelante soporta la validez de esta observación (cf. sección IV.5).

#### **IV.4.1.2 Balance de carbono y control de pH**

La Tabla 13 muestra la distribución de carbono orgánico en el experimento sin agitación, a 150 y a 370 rpm.

En el experimento sin agitación, además de la medición inicial y final, se realizó una medición intermedia, a las 80.5 h. Es posible observar que de las 0 a 80.5 h el consumo de lactato es  $11.58 \text{ mmol L}^{-1}$ , equivalente a una concentración  $34.73 \text{ mmol L}^{-1}$  de carbono. La producción de formiato en este punto es de  $31.14 \text{ mmol L}^{-1}$ , equivalente a 89.67 % del carbono orgánico utilizado, mientras el consumo de carbono atribuido a la biomasa sintetizada en este punto es  $5.31 \text{ mmol L}^{-1}$  ó 15 % de la concentración de biomasa, sumando un porcentaje acumulado de 104.67 %. Es importante recordar que en este tiempo fue consumido en su totalidad el amoníaco presente en el sistema y  $1.35 \text{ mmol L}^{-1}$  ó 66.95% del cianuro consumido en el sistema. En este intervalo de tiempo no fue detectado acetato. Esto es asociado a un rendimiento de biomasa por lactato consumido de  $0.116 \text{ g SSV g}^{-1}$  lactato.

**Tabla 13.** Balance de carbono para los experimentos con amoníaco y cianuro como fuentes alternas de nitrógeno, sin agitación y con agitación a 150 y 370 rpm. El % de carbono se refiere al porcentaje de carbono recuperado relativo al carbono orgánico consumido del lactato.

	Sin agitación			Agitación a 150 rpm		Agitación a 370 rpm			
	t (h)								
	0	80.5	166.5	0	45	0	22	55	
[Lactato] (mmol L <sup>-1</sup> )	77.49 ± 1.76	65.91 ± 0.35	53.12 ± 0.92	99.84 ± 1.16	57.21 ± 2.27	63.94 ± 1.02	44.59 ± 0.66	16.96 ± 2.88	
Consumo (mmol L <sup>-1</sup> )	0	11.58	24.37	0	42.63	0	19.35	46.98	
[Formiato] (mmol L <sup>-1</sup> )	15.91 ± 1.18	47.05 ± 0.48	70.02 ± 0.06	22.83 ± 0.46	61.26 ± 3.8	19.88 ± 0.13	30.72 ± 0.37	53.01 ± 4.08	
Producción (mmol L <sup>-1</sup> )	0	31.14	54.11	0	38.44	0	10.84	33.13	
% Carbono	0	89.67	73.99	0	30.05	0	18.7	23.5	
[Acetato] (mmol L <sup>-1</sup> )	0	0	5.51 ± 0.06	3.68 ± 0.13	5.69 ± 0.55	0	0	0	
Producción (mmol L <sup>-1</sup> )	0	0	5.51	0	2.01	0	0	0	
% Carbono	0	0	15	0	3.14	0	0	0	
[Sólidos suspendidos Volátiles] (mmol L <sup>-1</sup> )	1.6 ± 0.01	2.75 ± 0.03	3 ± 0.01	1.62 ± 0.003	4.94 ± 0.16	1.62 ± 0.009	3.68 ± 0.017	5.13 ± 0.12	
Producción (mmol L <sup>-1</sup> )	0	1.15	1.40	0	3.32	0	2.06	3.51	
% Carbono	/	16.55	9.57	/	12.98	/	17.74	12.45	
Consumo hidróxido (mmol L <sup>-1</sup> )	/		65.87 ± 2.2	/	47.06 ± 1.39	/		60.75 ± 0.13	

Por otro lado, entre las 80.5 y 166.5 h, el consumo de lactato fue de  $12.80 \text{ mmol L}^{-1}$ , equivalente a una concentración  $38.4 \text{ mmol L}^{-1}$  de carbono, concentración muy similar a la consumida a las 80.5 h, con la excepción que en este intervalo existió un menor consumo de nitrógeno total introducido al sistema, siendo el consumo de cianuro  $0.61 \text{ mmol L}^{-1}$  ó  $30.38 \%$  del cianuro consumido y la producción de biomasa,  $0.34 \text{ mmol L}^{-1}$ , equivalente a  $1.71 \text{ mmol L}^{-1}$  de carbono orgánico o  $4.45\%$  de la concentración de carbono orgánico consumido. Con respecto a la producción de ácidos orgánicos, en este intervalo fue posible detectar acetato (a diferencia de lo observado a las 80.5 h), siendo la concentración de ácidos orgánicos, formiato y acetato, de  $22.96 \text{ mmol L}^{-1}$  y  $5.51 \text{ mmol L}^{-1}$ , respectivamente. Para lo cual, el formiato equivale a una concentración equimolar de carbono y el acetato equivale a una concentración  $11.01 \text{ mmol L}^{-1}$  de carbono. Por tanto, la producción de los ácidos orgánicos formiato y acetato representan  $59.8 \%$  y  $28.68 \%$  del carbono orgánico consumido, sumando junto con el  $4.45 \%$  proveniente de la síntesis de biomasa, el  $92.93\%$  del carbono orgánico consumido. Esto es asociado a un rendimiento de biomasa por lactato consumido de  $0.033 \text{ g SSV g}^{-1}$  lactato, rendimiento considerablemente menor al observado en las primeras 80.5 h.

El consumo total de lactato durante la cinética fue de  $24.37 \text{ mmol L}^{-1}$ , equivalente a  $73.11 \text{ mmol L}^{-1}$  de carbono. La producción de formiato, acetato y biomasa fue  $54.11 \text{ mmol L}^{-1}$ ,  $5.51 \text{ mmol L}^{-1}$ , y  $1.4038$ , equivalente a una concentración de carbono y porcentaje relativo de  $54.11 \text{ mmol L}^{-1}$  ( $73.99 \%$ ),  $11.01 \text{ mmol L}^{-1}$  ( $15.06 \%$ ),  $7.09 \text{ mmol L}^{-1}$  ( $9.6 \%$ ), respectivamente, sumando un porcentaje acumulado de  $98.65\%$ . Esto es asociado a un rendimiento de biomasa por lactato consumido de  $0.073 \text{ g SSV g}^{-1}$  lactato.

Para el experimento con agitación a 150 rpm, a diferencia del experimento sin agitación, solo se realizaron mediciones de consumo de sustrato y producción de ácidos orgánicos al tiempo inicial y final de la cinética.

El consumo total de lactato en el experimento fue de  $42.63 \text{ mmol L}^{-1}$ , equivalente a una concentración de carbono  $127.9 \text{ mmol L}^{-1}$ . La producción de formiato, acetato y biomasa fue  $38.44 \text{ mmol L}^{-1}$ ,  $2.01 \text{ mmol L}^{-1}$ , y  $3.32$ , respectivamente, equivalente a una concentración de carbono y porcentaje relativo de  $38.44 \text{ mmol L}^{-1}$  ( $30.05 \%$ ),  $4.01 \text{ mmol L}^{-1}$  ( $3.14 \%$ ),  $16.61 \text{ mmol L}^{-1}$  ( $13 \%$ ), respectivamente, sumando así un porcentaje acumulado

de 50.67 %. Esto es asociado a un rendimiento de biomasa por lactato consumido de 0.098 g SSV g<sup>-1</sup> lactato. El porcentaje acumulado de ácidos orgánicos en el presente experimento es considerablemente más bajo que el obtenido en el experimento sin agitación y que aquellos discutidos en la sección IV.2, sugiriendo un efecto positivo sobre la utilización de oxígeno al adicionar amoniaco, posiblemente debido a la existencia de una mayor concentración de biomasa desde las fases tempranas de la cinética que promueve la utilización de sustrato.

Respecto al experimento con agitación orbital a 370 rpm, al igual que en el experimento sin agitación, se realizó una medición intermedia, a las 22 h además de las mediciones iniciales y finales de la cinética.

De las 0 a las 22 h de la cinética el consumo de lactato fue de 19.35 mmol L<sup>-1</sup>, equivalente a una concentración 58.95 mmol L<sup>-1</sup> de carbono. El único ácido orgánico encontrado en este intervalo de tiempo y durante todo el proceso fue formiato, a una concentración 10.84 mmol L<sup>-1</sup>, el cual representa el 18.68 % del carbono orgánico consumido. En este tiempo la concentración consumida de cianuro y amoniaco fue de 0.94 y 1.75 mmol L<sup>-1</sup>, respectivamente, mientras la concentración de biomasa sintetizada fue de 2.06 mmol L<sup>-1</sup>, equivalente a una concentración 10.32 mmol L<sup>-1</sup>, representando así el 17.77 % del carbono orgánico consumido. Por tanto, el porcentaje acumulado debido a la producción de formiato y biomasa es de 36.45 % del carbono orgánico consumido. El rendimiento de carbono en este intervalo de tiempo es  $Y_C=0.1352$  g SSV g<sup>-1</sup> lactato.

En el intervalo de tiempo entre las 22 y las 55 h, el consumo de lactato fue de 27.63, equivalente a 82.89 mmol L<sup>-1</sup> de carbono, mientras la concentración producida de formiato y biomasa fue 22.29 mmol L<sup>-1</sup> (22.29 mmol L<sup>-1</sup> de carbono) y 1.44 mmol L<sup>-1</sup> (7.22 mmol L<sup>-1</sup> de carbono), respectivamente. El porcentaje relativo de carbono orgánico en formiato y biomasa es de 26.89 % y 8.7%, sumando así un porcentaje acumulado de 35.59 %, porcentaje muy similar al obtenido durante las primeras 22 h. A pesar de la similitud en el porcentaje de carbono orgánico en ambos intervalos de tiempo, el rendimiento de carbono calculado en este intervalo es considerablemente menor,  $Y_C=0.066$  g SSV g<sup>-1</sup> lactato, debido a una menor producción de biomasa y mayor consumo de lactato en comparación con el primer intervalo discutido.

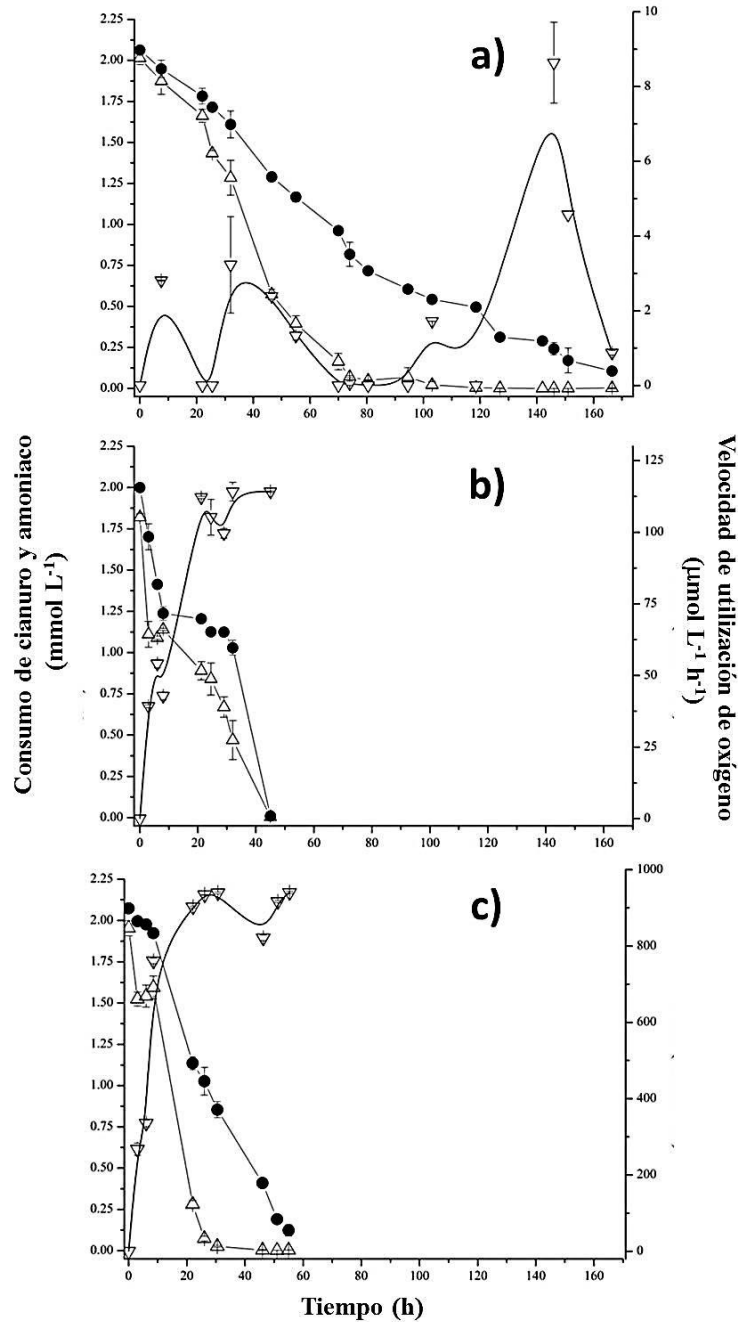
El consumo total de lactato en el experimento fue de  $46.98 \text{ mmol L}^{-1}$ , equivalente a una concentración de carbono  $140.94 \text{ mmol L}^{-1}$ . La producción total de formiato y biomasa fue  $33.13 \text{ mmol L}^{-1}$  y  $3.51 \text{ mmol L}^{-1}$ , equivalente a una concentración de carbono y porcentaje relativo de  $33.1 \text{ mmol L}^{-1}$  (23.5 %), y  $17.54 \text{ mmol L}^{-1}$  (12.4%), respectivamente, sumando un porcentaje acumulado de 35.9% y que por tanto 64% es oxidado completamente. Esto es asociado a un rendimiento de biomasa por lactato consumido de  $0.095 \text{ g SSV g}^{-1} \text{ lactato}$ . El porcentaje acumulado de ácidos orgánicos en el presente experimento es considerablemente más bajo que en los experimentos con cianuro como única fuente de nitrógeno discutidos en la sección IV.2, y que en los experimentos con cianuro y amoníaco sin agitación y con agitación a 150 rpm, discutidos en esta sección.

Finalmente, la concentración de hidróxido adicionada para mantener el sistema a pH 10.5 durante y al término de la cinética en los experimentos sin agitación, con agitación a 150 y a 370 rpm fueron  $65.87$ ,  $47.06$ , y  $60.75 \text{ mmol L}^{-1}$ , respectivamente. En este mismo orden la concentración de ácidos orgánicos fue  $59.62$ ,  $40.45 \text{ mmol L}^{-1}$  y  $33.13 \text{ mmol L}^{-1}$ , respectivamente. Con la excepción del experimento con agitación a 370 rpm, la concentración de hidróxido adicionada es similar a la concentración de los ácidos orgánicos producidos, particularidad observada en todos los experimentos de las secciones anteriores.

#### **IV.4.1.4 Velocidades de utilización de oxígeno disuelto**

En la Figura 15 se muestran los perfiles de velocidad de utilización de oxígeno junto con los perfiles de consumo de cianuro y amoníaco correspondientes al experimento sin agitación (Figura 15.a), con agitación a 150 rpm (Figura 15.b) y a 370 rpm (Figura 15.c).

Respecto al experimento sin agitación, los valores de OUR varían de 0 a  $2.8 \mu\text{mol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , durante las primeras 80.5 horas, intervalo de tiempo donde es consumido en su totalidad el amoníaco, restando solamente el cianuro en solución. De las 80.5 a las 166.5 h se completa el consumo de cianuro, lo cual explica la mayor velocidad de utilización de oxígeno en el sistema ( $8.6 \mu\text{mol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) a las 146 h. La concentración de oxígeno consumida fue  $190 \mu\text{mol L}^{-1}$ .



**Figura 15.** Velocidades de utilización de oxígeno (▽) y cinéticas de consumo de cianuro (●) y amoníaco (Δ). Experimentos (a) sin agitación; (b) con agitación a 150 rpm y (c) a 370 rpm. Las barras representan el error estándar de duplicados.

Para el experimento con agitación a 370 rpm, es posible observar que la velocidad de utilización de oxígeno incrementa desde las primeras horas de la cinética y no se observó una fase de retraso en su consumo, comparado con los perfiles de consumo de cianuro y amoníaco mostrados en la misma figura. Por tanto, la velocidad de utilización de oxígeno

aumenta desde el tiempo inicial de la cinética, y obedeciendo al consumo de las fuentes de nitrógeno hasta alcanzar velocidades cercanas a  $940 \mu\text{mol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  en el tiempo en que es consumido en su totalidad el amoníaco en solución (26 a 30.5 h). La concentración de oxígeno consumida fue  $44,940 \mu\text{mol L}^{-1}$ .

De las 30 a las 46 h la velocidad de utilización de oxígeno disminuye ligeramente una vez que el cianuro es la única fuente de nitrógeno. Esto último es congruente con la menor síntesis de biomasa obtenida en este mismo intervalo de tiempo, y nuevamente sugiere que la adición de amoníaco a los cultivos bacterianos ejerce un efecto negativo sobre la biodegradación de cianuro. Esta observación resulta relevante a escala industrial, ya que la adición de una fuente alterna de nitrógeno en los patios de lixiviación de oro podría ayudar a disminuir las pérdidas de cianuro, que llegan a ocurrir, y que muy probablemente se deben a procesos biológicos.

#### **IV.4.2 Biodegradación de nitrato y cianuro como fuentes alternas de nitrógeno**

En la Figura 16 se presentan las cinéticas de consumo de cianuro, nitrato y producción de biomasa en los experimentos con cianuro y nitrato como fuentes alternas de nitrógeno, a concentraciones equimolares y en las tres condiciones de agitación, 0 (Figura 16.a), 150 rpm (Figura 16.b) y 370 rpm (Figura 16.c), así como el ajuste con el modelo Gompertz. Adicionalmente, a modo de comparación, se presentan con líneas continuas las cinéticas de consumo de cianuro correspondientes para cuando se emplea cianuro como única fuente de nitrógeno (cf. Sección IV.2). La Tabla 14 muestra las velocidades máximas de consumo de las fuentes de nitrógeno y de producción de biomasa.

Es importante recordar que el consumo de nitrato en esta sección es dependiente del oxígeno (funge como fuente de nitrógeno) y no debe confundirse a la especie como un aceptor terminal de electrones (lo cual ocurre solamente en medio anóxico). En el Anexo III para esta sección se reportan  $0.260 \text{ eq e}^-$  donados por el lactato, mientras los equivalentes de electrones aceptados por el nitrato para síntesis celular son solo  $0.0658$ , dejando claro la imposibilidad del nitrato como aceptor terminal de electrones.

Respecto al experimento sin agitación, es posible observar que el consumo de nitrato ocurre una vez consumido casi 90% de cianuro inicial en solución ( $210 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) a las 127 h. Esto es opuesto a lo encontrado en el experimento con cianuro y amoníaco sin agitación de la sección IV.4.1 (Figura 14.a), en donde el consumo de amoníaco era consumido desde los tiempos iniciales de la cinética y era paralelo al consumo de cianuro.

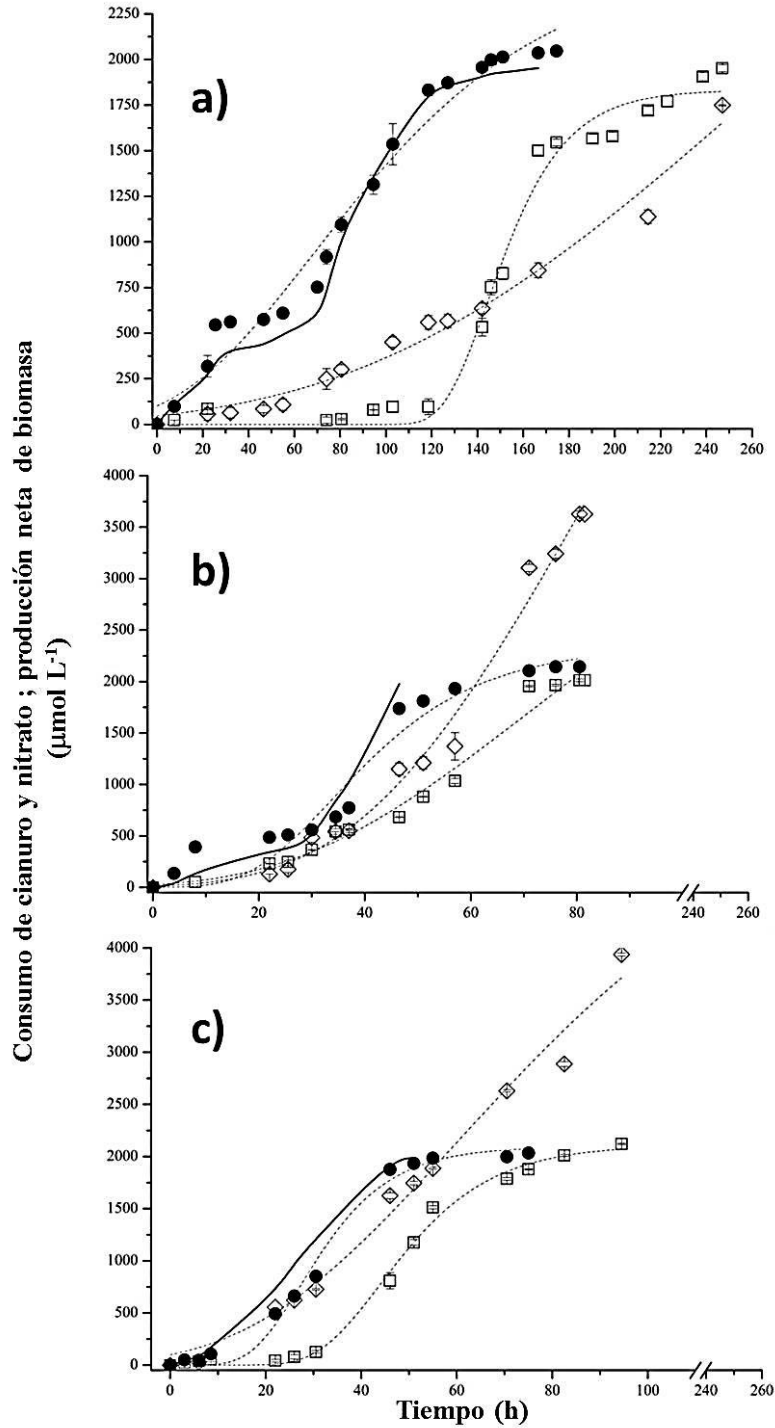
En el intervalo entre las 127 y las 166.5 h (intervalo de 40 h) se consumen  $1,500 \mu\text{mol L}^{-1}$  de nitrato. La biodegradación de cianuro se completa a las 166.5 h. Entre las 120 y 160 h, se observa la máxima velocidad de consumo de nitrato, y entre 160 y 247 h se observa un claro cambio de pendiente en el consumo nitrato, asociado a una menor velocidad de consumo de nitrato. El consumo total de cianuro es de  $2,050 \mu\text{mol L}^{-1}$  en 166.5 h, mientras el consumo total de nitrato es de  $1,950 \mu\text{mol L}^{-1}$  en 247 h. Para el consumo de ion cianuro se obtuvo una velocidad máxima de consumo,  $r_{\text{max}} = 16.7 \mu\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1} = 0.434 \text{ mg L}^{-1} \text{h}^{-1}$  ( $R^2=0.9724$ ), mientras que para el ion nitrato la velocidad máxima de consumo fue cerca del doble que para el consumo de cianuro,  $37.1 \mu\text{mol NO}_3^- \text{L}^{-1} \text{h}^{-1} = 2.3 \text{ mg NO}_3^- \text{L}^{-1} \text{h}^{-1}$  ( $R^2 0.99$ ). Esto es explicado debido a que el consumo de nitrato no ocurre gradualmente como el cianuro, causando así una velocidad máxima mayor.

Adicionalmente, tal como se observa en la línea continua, la cinética de consumo de cianuro en el experimento con cianuro como única fuente de nitrógeno sin agitación (sección IV.2) presenta una alta similitud con la cinética de consumo de cianuro del presente experimento. Es decir, el consumo de cianuro en este experimento se comportó como si no existiera una fuente de nitrógeno alternativa. Además, la alta similitud entre las cinéticas de biodegradación de cianuro sugiere que aun cuando hay una fuente de nitrógeno que no es tóxica como el nitrato, el consorcio microbiano prefiere al ion cianuro. Posiblemente debido a que el nitrógeno en el cianuro posee el mismo estado de oxidación (-III) que en el amoníaco (la fuente de nitrógeno de más fácil asimilación para los microorganismos).

Por otro lado, la producción neta de biomasa fue de  $1,750 \mu\text{mol L}^{-1}$ , siendo las concentraciones iniciales y finales,  $1,570$  y  $3,320 \mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente. El rendimiento global de biomasa sintetizada por consumo de nitrógeno (suma de los aportes por consumo de nitrato y cianuro) durante la cinética es  $Y_N=3.5 \text{ g SSV g}^{-1} \text{ N}$  (Figura 16.a).



La biomasa incrementa su producción a partir de las 46 h hasta el final de la cinética (247 h) (Figura 16.a). Contrariamente a lo observado en los experimentos de la sección IV.4.1 (cianuro y amoníaco como fuentes alternas de nitrógeno), en el presente experimento el aumento en la producción de biomasa ocurre hasta las 46 h debido a que como se mostró en la sección IV.2.2 (nitrato como única fuente de nitrógeno), el nitrato es una especie de nitrógeno menos asimilable que el amoníaco. Otra diferencia encontrada con respecto al experimento sin agitación con amoníaco y cianuro, es el comportamiento de la pendiente de producción de biomasa la cual parece tener la misma tendencia una vez consumida la primera fuente de nitrógeno (cianuro), a diferencia del claro cambio observado en el experimento con amoníaco y cianuro (sección IV.4.1.1). En el intervalo entre las 0 y 118.5 h, el incremento en la producción de biomasa es atribuido principalmente a la asimilación de cianuro, mientras en el intervalo entre las 118.5 h y las 247 h el incremento en la producción de biomasa es atribuido a la asimilación de nitrato. Al igual que en los experimentos sin agitación con cianuro como única fuente de N (sección IV.2) y con cianuro y amoníaco como fuentes alternas de nitrógeno (sección IV.4.1), se observa que el valor que teóricamente debió de alcanzar la producción de biomasa en este caso era de  $4,030 \mu\text{mol L}^{-1}$ , el cual es considerablemente mayor al producido experimentalmente ( $1,750 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). La velocidad de producción de biomasa experimental fue de  $11.6 \mu\text{mol SSV L}^{-1} \text{h}^{-1}$  ( $R^2=0.976$ ), similar a la velocidad de consumo de cianuro.



**Figura 16.** Cinéticas de consumo acumulado de cianuro (●), nitrato (□) y producción de biomasa (◇). Fuentes de nitrógeno: cianuro y nitrato. Experimentos: (a) sin agitación; (b) a 150 rpm; (c) a 370 rpm. Las barras representan el error estándar de duplicados. Las líneas punteadas representan el ajuste al modelo Gompertz. Las líneas continuas muestran el consumo de cianuro cuando se encuentra como única fuente de nitrógeno a la misma velocidad de agitación.

**Tabla 14.** Velocidades máximas estimadas con el modelo Gompertz para los experimentos con cianuro y nitrato como fuentes alternas de nitrógeno, sin agitación, con agitación a 150 y 370 rpm con sus respectivos coeficientes de determinación.

	Parámetro	$r_{\max}$ ( $\mu\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1}$ )	$R^2$
Sin agitación	Cianuro	$16.7 \pm 0.7$	0.972
	Nitrato	$37.1 \pm 0$	0.987
	SSV	$11.6 \pm 0.9$	0.976
Agitación a 150 rpm	Cianuro	$57.6 \pm 2.8$	0.95
	Nitrato	$41.3 \pm 0.7$	0.98
	SSV	$95.2 \pm 31$	0.987
Agitación a 370 rpm	Cianuro	$77.8 \pm 0.3$	0.99
	Nitrato	$62.8 \pm 1.7$	0.995
	SSV	$52.3 \pm 0.2$	0.982

Por otro lado, en el experimento con agitación a 150 rpm (Figura 16.b), es posible observar una gran similitud en las cinéticas de consumo de cianuro y nitrato durante las primeras 37 h. Contrariamente, a partir de las 37 h hasta el final de la cinética (80 h), el consumo de cianuro se realiza a una mayor velocidad en comparación al consumo de nitrato, siendo evidente este hecho desde las 37 a las 46.5 h, intervalo de tiempo en el que ocurre un consumo cercano a 50% del cianuro total consumido. Este hecho vuelve a mostrar la tendencia de los microorganismos por usar el ion cianuro con mayor facilidad que el ion nitrato. El consumo neto de cianuro a las 33 h, fue de  $2,140 \mu\text{mol L}^{-1}$ , con una velocidad máxima de consumo,  $r_{\max} = 57.6 \mu\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1} = 1.498 \text{mg L}^{-1} \text{h}^{-1}$  ( $R^2=0.9426$ ). Para el caso del nitrato, el consumo neto al tiempo 70.9 h fue  $2,010 \mu\text{mol L}^{-1}$ , asociado a  $r_{\max} = 41.3 \mu\text{mol nitrato L}^{-1} \text{h}^{-1} = 2.56 \text{mg L}^{-1} \text{h}^{-1}$  ( $R^2=0.9805$ ). La velocidad máxima de consumo nitrato es 0.72 veces la del cianuro.

Con respecto a la comparación del presente experimento con el experimento con cianuro como única fuente de nitrógeno con agitación orbital a 150 rpm (línea continua Fig 11.b), es posible observar una gran similitud en los perfiles de consumo durante las primeras 46 h,

tiempo en el cual es completada la biodegradación de cianuro como única fuente de nitrógeno. La razón por la que el consumo de cianuro en el presente experimento no pudo completarse al mismo tiempo que en el experimento con cianuro como única fuente de nitrógeno, es atribuida probablemente a una limitación de oxígeno ocasionado por el consumo de nitrato desde las 46 h hasta el final de la cinética. Esto debido a que ambas fuentes necesitan oxígeno como aceptor de electrones para ser degradadas y asimiladas. De forma similar, respecto a la comparación del consumo de nitrato en el presente experimento (línea punteada con cuadrados negros) y el experimento con nitrato como única fuente de nitrógeno (sección IV.3), se observó que el nitrato en el presente caso tardó 24 horas más en biodegradarse.

A pesar de lo mencionado en el párrafo anterior, los resultados indican que la transferencia de oxígeno es suficiente para degradar en su totalidad ambas fuentes de forma simultánea.

Respecto a la producción de biomasa, su incremento durante todo el proceso es atribuido al consumo simultáneo de las dos fuentes de nitrógeno, resultando en una producción neta de  $3,630 \mu\text{mol L}^{-1}$  (concentración inicial y final de  $1,600$  y  $5,200 \mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente), y una velocidad de producción de  $95.2 \mu\text{mol SSV L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  ( $R^2 = 0.987$ ), velocidad máxima de producción considerablemente mayor a las de cianuro y nitrato de este mismo experimento como únicas fuentes de N, teniendo como explicación a lo mencionado el aporte simultáneo de ambas fuentes de nitrógeno, cianuro y nitrato.

La producción de biomasa corresponde a 87.32% del nitrógeno consumido. Es posible observar que la producción de biomasa incrementó considerablemente a partir de las 30 h, además, nuevamente la producción de biomasa no es disminuida considerablemente al agotarse la fuente de nitrógeno de mayor asimilación (cianuro en este caso). Contrariamente, la producción de biomasa en el intervalo de las 71 a las 80.5 h no es explicada por el consumo de cianuro y/o nitrato, debido a las bajas concentraciones de los iones. Tal como se ha comprobado en experimentos anteriores, esta particularidad podría explicarse por consumo de productos de biodegradación, tales como el cianato, lo cual es discutido en la sección IV.4.2.3 El rendimiento de biomasa sintetizada por consumo de nitrógeno de nitrato y cianuro, es de  $Y_N = 7.048 \text{ g SSV g}^{-1} \text{ N}$ .

Para el experimento con agitación a 370 rpm (Figura 16.c) es posible observar que al igual que en el experimento sin agitación con cianuro y nitrato como fuentes alternas, la biodegradación de cianuro ocurre primero que la biodegradación de nitrato. Sin embargo, a diferencia de dicho experimento, el consumo de nitrato ocurrió cuando en el sistema había una concentración de cianuro de  $1,180 \mu\text{mol L}^{-1}$  a las 30 h, a diferencia de lo observado en el experimento sin agitación en donde la degradación del nitrato ocurrió, una vez consumido todo el cianuro. A pesar de esto, la biodegradación de nitrato se completa en un tiempo considerablemente menor (152.5 horas menos) al observado en el experimento sin agitación.

Respecto a la biodegradación de cianuro, esta es completada en un tiempo considerablemente menor al observado en los escenarios sin agitación y con agitación a 150 rpm. Además, el perfil de cianuro en el presente experimento es muy similar al perfil de cianuro del experimento con cianuro como única fuente de nitrógeno con agitación a 370 rpm (ver línea continua Fig 11.c) sugiriendo, al igual que en el experimento sin agitación, un nulo o mínimo efecto del ion nitrato sobre la biodegradación de cianuro. Finalmente, es preciso mencionar que el consumo neto de cianuro y nitrato durante todo el proceso es de  $2,030$  y  $2,120 \mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente.

Con respecto al consumo del ion cianuro la velocidad máxima de consumo fue de  $r_{\text{max}} = 77.8 \mu\text{mol L}^{-1} \text{ h}^{-1} = 2.023 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  ( $R^2=0.991$ ), mientras que para el nitrato, la velocidad máxima de consumo fue 0.81 veces la obtenida para el cianuro,  $r_{\text{max}} = 62.8 \mu\text{mol NO}_3^- \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1} = 3.89 \text{ mg NO}_3^- \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  ( $R^2=0.995$ ).

Respecto a la biomasa en el sistema, su producción total es  $3,940 \mu\text{mol L}^{-1}$  (con concentraciones iniciales y finales de  $1,610$  y  $5,550 \mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente), que corresponde a 94.7 % del nitrógeno total consumido ( $4,160 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). El rendimiento de biomasa sintetizada por consumo de nitrógeno es de  $Y_N = 7.65 \text{ g SSV g}^{-1}\text{N}$ . La concentración de biomasa sintetizada en este experimento es 2.25 veces mayor a la sintetizada en el experimento sin agitación, y 1.09 mayor al experimento con agitación a 150 rpm. La velocidad de consumo de biomasa fue  $52.3 \mu\text{mol SSV L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  ( $R^2=0.9823$ ), velocidad menor a la velocidad de consumo de cianuro y nitrato.

Se observa que durante las primeras 55 h, la cinética de producción de biomasa es similar a la cinética de consumo de cianuro, a pesar de que de las 30 a las 55 h existe un consumo considerable de nitrato, lo cual podría ser explicado por la formación de algún intermediario necesario en la asimilación de nitrógeno. En el intervalo entre las 55 y las 94.5 h, la producción de biomasa ocurre mayormente por el consumo de nitrato, al ser la única especie de nitrógeno. Es evidente que la producción de biomasa excede la concentración de nitrato consumida debido al consumo de cianato, un intermediario en la biodegradación de cianuro, tal como es presentado en la siguiente sección y posiblemente debido al consumo del ion nitrito (no cuantificado). Es importante mencionar que la producción de biomasa en el presente experimento es significativamente mayor a la producida en el experimento sin agitación de la presente sección (agitación a 150 rpm).

#### *IV.4.2.1 Productos de biodegradación de cianuro y balance de nitrógeno*

La Tabla 15 muestra resultados de los experimentos con cianuro y nitrato como fuentes alternas de nitrógeno sin agitación, y con agitación a 150 y a 370 rpm. En el experimento sin agitación se cuantificó cianato y formamida en el tiempo inicial, 103 h, y el tiempo final 247 h. Las concentraciones de cianato en estos tiempos fueron 140, 370 y 450  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente. Las concentraciones de formamida cuantificadas a los mismos tiempos fueron: 248, 575 y 930  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente. Puede confirmarse que la baja producción de biomasa (450  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) se asocia a la producción de 230 y 330  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de cianato y formamida, respectivamente, a partir de 1,530  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de cianuro consumido.

Por otro lado, de las 103 a las 247 h la producción de biomasa es de 1,300  $\mu\text{mol L}^{-1}$  y se atribuye a la asimilación de nitrato. Esto es apoyado por el hecho de que, a diferencia del experimento sin agitación con cianuro como única fuente de nitrógeno, no existe un consumo de cianato, sino que por el contrario la concentración de la especie aumenta ligeramente su concentración, además que en este mismo intervalo, la concentración de formamida incrementa considerablemente sugiriendo que el cianuro no es asimilado para síntesis celular una vez iniciado el consumo del nitrato. En este experimento la concentración total biodegradada de nitrógeno fue 4,030  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , mientras la suma de la concentración de biomasa sintetizada al final de la cinética (1,750  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) y la suma de

los productos de biodegradación al tiempo final ( $1,380 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) es de  $3,130 \mu\text{mol L}^{-1}$ , quedando  $900 \mu\text{mol L}^{-1}$  de concentración de nitrógeno sin cuantificar.

Por otro lado, en el experimento con agitación a 150 rpm se realizaron mediciones de cianato al tiempo inicial y final de la cinética, cuantificándose  $160 \mu\text{mol L}^{-1}$  al inicio de la cinética y  $330 \mu\text{mol L}^{-1}$  al final de la misma. Es importante recordar que la concentración de biomasa sintetizada fue de  $3,630 \mu\text{mol L}^{-1}$ , sumando así junto con la concentración final medida de cianato  $3,960 \mu\text{mol L}^{-1}$  de nitrógeno o 95.3 % de la concentración de nitrógeno consumida en el sistema ( $4,160 \mu\text{mol L}^{-1}$ ).

Finalmente, en el experimento con agitación a 370 rpm, se realizaron cuatro mediciones de la especie cianato, a las 0 h, 22, 55 y 94.5 h, cuantificándose concentraciones de 145.7, 412, 150, y  $180 \mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente. Es importante recordar que la concentración consumida de cianato de las 22 a las 70.5 h pudo aportar al incremento en la producción de biomasa observado de las 55 a las 94.5 h.

Las concentraciones de cianato en los tres experimentos resultaron ser mayores con respecto a la velocidad de agitación en el orden: sin agitación > agitación a 150 rpm > agitación a 370 rpm, lo que coincide con lo que se observó en los experimentos con cianuro y amoníaco. Sin embargo, las concentraciones de cianato fueron considerablemente menores, tanto aquellas cuantificadas en los tiempos intermedios como las cuantificadas al tiempo final de la cinética. Esto sugiere una mayor asimilación de cianato con respecto a cuando existe amoníaco como fuente alterna.

**Tabla 15.** Balance de nitrógeno en el experimento con nitrato y cianuro como fuentes alternas de nitrógeno, con agitación a 150 y 370 rpm.

	Sin agitación			Agitación a 150 rpm		Agitación a 370 rpm			
	t (h)								
	0	103	247	0	80.5	0	22	55	94.5
[Cianuro] ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	2,080 $\pm$ 13	540 $\pm$ 10	0	2,140 $\pm$ 15	0	2,030 $\pm$ 11	1,540 $\pm$ 13	50 $\pm$ 1	0
Consumo ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	0	1,540	2,080	0	2,140	0	490	1,980	2,030
[Nitrato] ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	2,032 $\pm$ 21	1,935 $\pm$ 8	80 $\pm$ 1	2,085 $\pm$ 9	70 $\pm$ 5	2,160 $\pm$ 40	2,120 $\pm$ 20	650 $\pm$ 10	40 $\pm$ 0
Consumo ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	0	100	1,950	0	2,010	0	40	1,510	2,120
[Cianato] ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	141 $\pm$ 8	371 $\pm$ 3.5	450 $\pm$ 60	160 $\pm$ 10	350 $\pm$ 40	146 $\pm$ 40	412 $\pm$ 50	152 $\pm$ 7	180 $\pm$ 5
Diferencia finita ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	0	230	80	0	190	0	745.3	163	210
[Formamida ] ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	248 $\pm$ 20	575 $\pm$ 20	932 $\pm$ 10	0	0	0	0	0	0
Diferencia finita ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	0	328	356	0	0	0	0	0	0
[Sólidos suspendidos volátiles ] ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	1,600 $\pm$ 17	2,050 $\pm$ 11	3,350 $\pm$ 14	1,600 $\pm$ 60	5,230 $\pm$ 20	1,614 $\pm$ 6	2,170 $\pm$ 60	3,500 $\pm$ 14	5,550 $\pm$ 20
Producción ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	0	450	1,750	0	3,630	0	550	1,890	3,940



#### IV.4.2.2 Balance de carbono y control de pH

La Tabla 16 muestra la distribución de carbono orgánico en los experimentos con nitrato y cianuro como fuentes alternas de nitrógeno, sin agitación, con agitación a 150 rpm y 370 rpm. Con respecto al experimento sin agitación, además de la medición inicial y final para determinar el consumo de sustrato y producción de ácidos orgánicos, se realizó una medición intermedia a las 103 h. Durante las primeras 103 h de la cinética ocurrió un consumo de lactato de  $6.58 \text{ mmol L}^{-1}$ , equivalente a una concentración  $19.75 \text{ mmol L}^{-1}$  de carbono. La producción de formiato en este punto es  $17.68 \text{ mmol L}^{-1}$ , equivalente a una concentración equimolar de carbono orgánico ( $17.68 \text{ mmol L}^{-1}$ ) y a 89.52% del carbono orgánico utilizado, mientras el consumo de carbono atribuido a la biomasa sintetizada en este punto fue de  $0.45 \text{ mmol L}^{-1}$  u 11% de carbono consumido, siendo importante mencionar que en este intervalo fue consumido menos de 50 % del nitrógeno total, el cual proviene mayormente del cianuro consumido. La suma de los porcentajes acumulados en los diferentes subproductos de carbono es de 100.5%. Esto es asociado a un rendimiento celular por consumo de lactato consumido de  $0.087 \text{ g SSV g}^{-1}$  lactato.

Por otro lado, en el intervalo de las 103 y 247 h (intervalo en el que ocurrieron consumos de cianuro y nitrato de  $0.54$  y  $1.85 \text{ mmol L}^{-1}$ , respectivamente), existió un consumo de nitrógeno total de  $2.40 \text{ mmol L}^{-1}$  o 59 % del de nitrógeno total consumido. En este mismo intervalo el consumo de lactato fue de  $12.38 \text{ mmol L}^{-1}$ , equivalente a una concentración  $37.13 \text{ mmol L}^{-1}$  de carbono. La producción de los ácidos orgánicos formiato y acetato en este intervalo fue de  $15.29 \text{ mmol L}^{-1}$  (equivalente a  $15.29 \text{ mmol L}^{-1}$  de carbono orgánico) y  $8.05 \text{ mmol L}^{-1}$  (equivalente a  $16.11 \text{ mmol L}^{-1}$  de carbono), respectivamente. La producción de biomasa fue de  $1.3 \text{ mmol L}^{-1}$ , equivalente a  $6.5 \text{ mmol L}^{-1}$  de carbono orgánico, lo cual representa el 17.5% del carbono orgánico consumido. Este porcentaje junto con el porcentaje de carbono orgánico en el formiato (41.17 %) y acetato (43.38 %), representa el 102.05 % del carbono orgánico consumido proveniente del lactato. Esto es asociado a un rendimiento de biomasa por lactato consumido de  $0.133 \text{ g SSV g}^{-1}$  lactato, rendimiento considerablemente mayor al observado en las primeras 103 h y contrario a los descrito en la sección IV.4.1, referente la biodegradación de amoníaco y cianuro como fuentes alternas de nitrógeno.

**Tabla 16.** Balance de carbono en los experimentos con cianuro y nitrato como fuentes alternas de nitrógeno, sin agitación y con agitación a 150 rpm y 370 rpm. El % de carbono se refiere al porcentaje de carbono recuperado relativo al carbono orgánico consumido del lactato.

	Sin agitación			Agitación a 150 rpm		Agitación a 370 rpm			
	t (h)								
	0	103	247	0	80.5	0	22	94.5	
[Lactato] (mmol L <sup>-1</sup> )	79.29 ± 0.26	72.71 ± 2.1	60.33 ± 0.73	86.37 ± 1.17	44.17 ± 1.08	71.58 ± 1.89	59 ± 0.19	13.62 ± 0.53	
Consumo (mmol L <sup>-1</sup> )	0	6.58	18.96	0	42.21	0	12.6	57.97	
[Formiato] (mmol L <sup>-1</sup> )	16.29 ± 0.8	33.97 ± 2.32	49.26 ± 2.7	15.37 ± 0.05	113.67 ± 1.9	20.27 ± 1.88	34.63 ± 2.22	143.73 ± 2.15	
Producción (mmol L <sup>-1</sup> )	0	17.68	32.97	0	98.3	0	14.36	123.46	
% Carbono	0	89.52	57.96	0	77	0	18.7	23.5	
[Acetato] (mmol L <sup>-1</sup> )	0	0	8.05 ± 0.81	1.62 ± 0.24	4.14 ± 0.25	0	0	0	
Producción (mmol L <sup>-1</sup> )	0	0	8.05	0	2.52	0	0	0	
% Carbono	0	0	28.32	0	3.97	0	0	0	
[Sólidos Suspendidos Volátiles] (μmol L <sup>-1</sup> )	1,600 ± 17	2,050 ± 11	3,350 ± 14	1,600 ± 60	5,230 ± 20	1,614 ± 6	2,170 ± 60	5,550 ± 20	
Producción (μmol L <sup>-1</sup> )	0	450	1,750	0	3,630	0	550	3,940	
% Carbono	/	11.4	15.38	/	14.33	/	7.28	11.33	
Consumo hidróxido (mmol L <sup>-1</sup> )	/	/	67.49 ± 0.85	/	84.85 ± 2.71	/	/	144.65 ± 2.25	

Para el experimento con agitación a 150 rpm, se realizaron mediciones al tiempo inicial y final de la cinética. El consumo total de lactato en el experimento fue de 42.21 mmol L<sup>-1</sup>, equivalente a una concentración de carbono 126.62 mmol L<sup>-1</sup>. La producción de formiato, acetato y biomasa fue 98.30 mmol L<sup>-1</sup>, 2.52 mmol L<sup>-1</sup>, y 3.628 mmol L<sup>-1</sup>, equivalente a una concentración de carbono y porcentaje relativo acumulado de 98.30 mmol L<sup>-1</sup> (77.63%), 5.03 mmol L<sup>-1</sup> (3.97 %), 18.14 mmol L<sup>-1</sup> (14.33 %) respectivamente. Esto resulta en una concentración total acumulada de carbono en los productos de 121.47 mmol L<sup>-1</sup>, equivalente a un 95.93 % del C- lactato consumido, dando ~ 4% de carbono en productos no cuantificados como podría ser el dióxido de carbono no cuantificado y asociado a la mineralización completa del C-lactato. El rendimiento de biomasa por lactato consumido fue de 0.109 g SSV g<sup>-1</sup> lactato.

Finalmente, con respecto al experimento con agitación orbital a 370 rpm, el consumo total de lactato en el experimento fue de 57.97 mmol L<sup>-1</sup>, equivalente a una concentración de carbono 173.90 mmol L<sup>-1</sup>. La producción total de formiato fue 123.46 mmol L<sup>-1</sup>, equivalente a una concentración de carbono de 123.46 mmol L<sup>-1</sup> (porcentaje relativo 71 %), mientras la biomasa producida fue 3.94 mmol L<sup>-1</sup>, equivalente a 19.69 mmol L<sup>-1</sup> de carbono, el cual representa 11.33 % de porcentaje relativo del carbono orgánico total consumido. Los aportes de formiato y biomasa corresponden a una concentración acumulada de carbono de 143.15 mmol L<sup>-1</sup> equivalente al 82.32 % del carbono total, lo cual significa que ~18.3% de carbono se encuentra en productos no determinados como podría ser el dióxido de carbono, asociado a la mineralización completa del lactato, acorde a un sistema sin déficit de O<sub>2</sub>.

Lo anterior se asocia a un rendimiento de biomasa por lactato consumido de 0.086 g SSV g<sup>-1</sup> lactato. A pesar de que el porcentaje relativo de carbono orgánico para producción de ácidos orgánicos es similar que aquellos experimentos con cianuro como única fuente de nitrógeno sin agitación y con agitación a 150 rpm, la concentración de ácidos orgánicos producida en el presente experimento es la más alta de todos los experimentos descritos en este trabajo, siendo 4.3 veces más alta que en el experimento con cianuro como única fuente de nitrógeno sin agitación.

Las concentraciones de hidróxido adicionadas para mantener el pH del sistema cercanas a un valor de pH de 10.5, fueron: para el experimento sin agitación fue de 67.49 mmol L<sup>-1</sup> para el cual la suma de los ácidos orgánicos fue de 41.02 mmol L<sup>-1</sup>; para el sistema con agitación a 150 rpm fue de 84.85 mmol L<sup>-1</sup> con una concentración de ácidos orgánicos de 100.82 mmol L<sup>-1</sup>; y para el experimento con agitación a 370 rpm, fue de 144.65 mmol L<sup>-1</sup> con una concentración de ácidos orgánicos, 123.46 mmol L<sup>-1</sup>.

#### *IV.4.2.4 Velocidades de utilización de oxígeno disuelto*

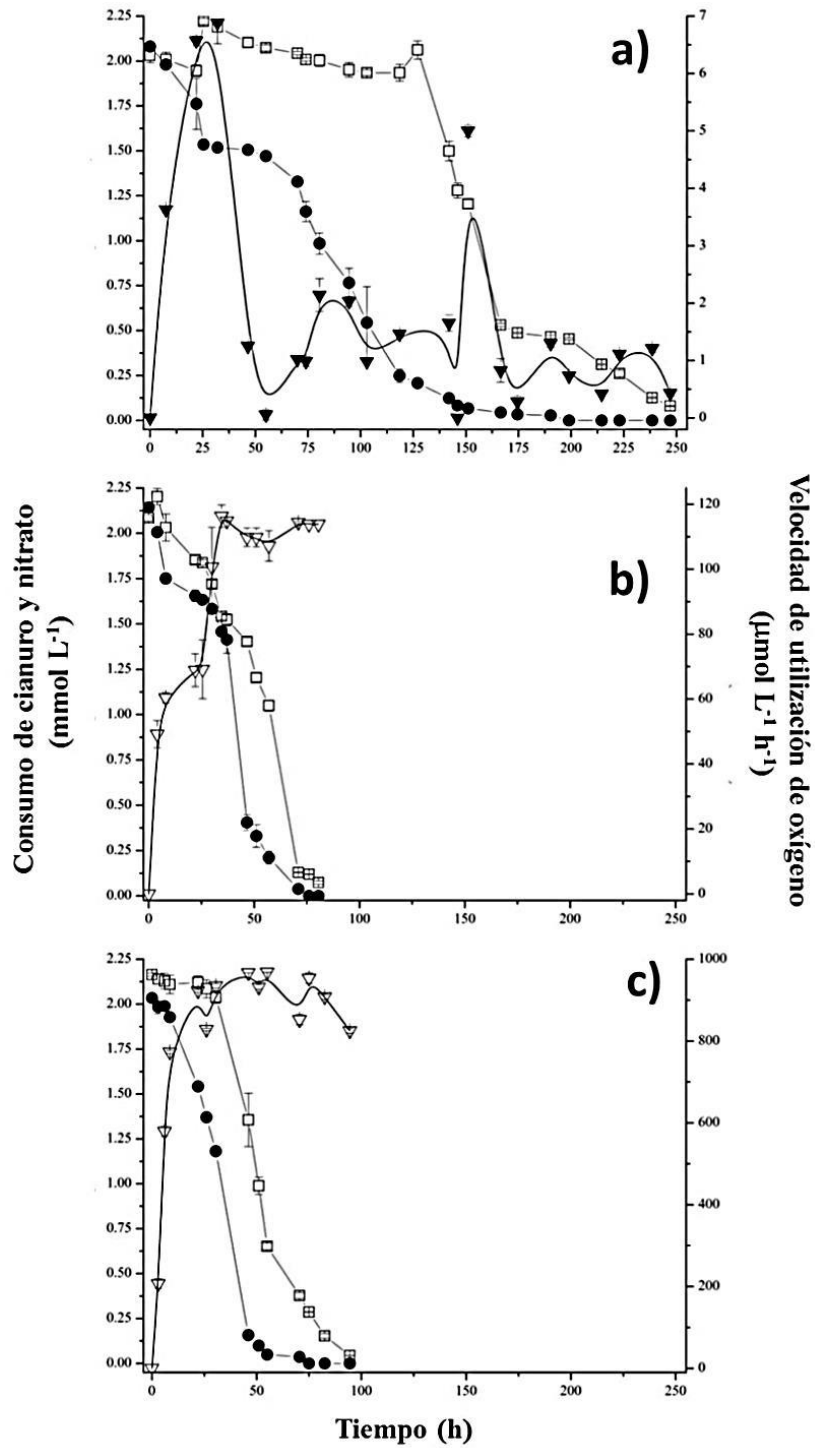
En la Figura 17 se muestran las velocidades de utilización de oxígeno, así como los perfiles de consumo de cianuro y nitrato correspondientes al experimento sin agitación (Figura 17.a), con agitación a 150 rpm (Figura 17.b) y 370 rpm (Figura 17.c).

Respecto al experimento sin agitación, es posible observar que las mayores velocidades de utilización ocurren al inicio del consumo del ion cianuro (entre las 22 y 32 horas a 6.4 μmol L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) y durante el consumo del 35 % del nitrato (consumido entre las 151 y 166.5 h). La concentración de oxígeno consumida fue 410 μmol L<sup>-1</sup>.

Por otro lado, en el experimento con agitación a 150 rpm es posible apreciar que la OUR incrementa con una tendencia muy similar a los consumos de ambas fuentes de nitrógeno, siendo ralentizadas entre las 8 y 37 h. Se alcanzan las velocidades máximas entre 100 y 115 μmol L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, en la fase de crecimiento exponencial. La concentración de oxígeno consumida fue 7,770 μmol L<sup>-1</sup>.

Finalmente, para el escenario con agitación a 370 rpm, las velocidades de utilización de oxígeno llegan a sus valores máximos desde las 8.5 h hasta el final de la cinética, con velocidades de 700 hasta 950 μmol L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. La concentración de oxígeno consumida fue 82,010 μmol L<sup>-1</sup>.

Al igual que en el experimento con cianuro como única fuente de nitrógeno con agitación a 370 rpm, el experimento análogo de esta sección coincide con la ausencia de una fase intermedia diaúxica.



**Figura 17.** Velocidades de utilización de oxígeno en las Figuras 17.a (▼), 17.b y 17.c (▽) y cinéticas de consumo de cianuro (●) y nitrato (□). Experimentos: (a) sin agitación, (b) a 150 rpm (c) a 370 rpm. Las barras representan el error estándar de duplicados.

#### IV.4.3 Discusión

Se encontró que el amoníaco ejerce un efecto positivo en las primeras horas de la cinética sobre la biodegradación de cianuro, posiblemente debido a una mayor producción de biomasa desde horas tempranas de la cinética capaz de acelerar la biodegradación del ion, o como parte de un mecanismo de desintoxicación de cianuro para poder asimilar la fuente de más fácil asimilación, amoníaco, de la cual se observó que independientemente de la agitación, esta fue la primera en ser consumida en todos los escenarios.

Se observó además que para el cianato, en los experimentos con cianuro y amoníaco como fuentes alternas de nitrógeno, las concentraciones finales de esta especie fueron considerablemente más altas (en promedio  $530 \mu\text{mol L}^{-1}$ , exceptuando el experimento con agitación a 150 rpm) que en los experimentos con cianuro como única fuente de nitrógeno. Esta observación es congruente con el reporte de Luque-Almagro et al. (2008), en el cual se estudió la enzima cianasa (cataliza la degradación de cianato) en la especie *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344, encontrando que las células en presencia de amoníaco se ven afectadas en la producción de la enzima. Además, debido a que la concentración de formiato fue mayor en estos experimentos (con fuentes alternas de nitrógeno), es posible que la enzima cianasa sea inhibida en su sitio activo por la especie formiato, tal como reporta Anderson et al. (1990)

Respecto a la especie formamida (únicamente encontrada en los escenarios sin agitación), se encontró que la adición de amoníaco indujo una mayor acumulación de esta especie (concentración final de  $890 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) en comparación con la concentración final encontrada en ausencia de amoníaco (experimento con cianuro como única fuente de nitrógeno).

Por otro lado, se observó también que una vez consumida la especie amoníaco en los sistemas, se induce una baja capacidad de biodegradar el cianuro restante, o al menos la velocidad con la que se consume es reducida con respecto a aquellos experimentos en los que el cianuro es la única fuente de nitrógeno.

Finalmente, se observó que la adición de amoníaco ejerce también un efecto positivo sobre la menor producción de ácidos orgánicos. Esto es congruente con lo observado en la sección IV.3 (amoníaco como única fuente de nitrógeno) donde existe una menor

producción de ácidos orgánicos y por en consecuencia se requiere una menor adición de hidróxido de sodio al sistema, en comparación con lo observado en los experimentos con cianuro y nitrato, como únicas fuentes de nitrógeno .

Por otro lado, respecto al efecto impuesto sobre la biodegradación de ion nitrato al adicionar cianuro como fuente alterna de nitrógeno y con concentración equimolar al nitrato ( $2,000 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), se determinó que su biodegradación ocurre una vez completada la biodegradación de cianuro, contrario al caso con cianuro y amoníaco como fuentes alternas en que existe un consumo simultáneo de ambas fuentes. Contrariamente se observó que la adición de nitrato parecería no ejercer efecto alguno sobre la biodegradación de cianuro, al ser los perfiles de biodegradación muy similares a aquellos experimentos en los que el cianuro fue la única fuente de nitrógeno.

Con respecto a los productos de biodegradación de cianuro, cianato y formamida, se encontró que para el cianato, la adición de nitrato y amoníaco ocasiona una mayor concentración final de cianato acumulado en comparación a los escenarios de agitación análogos utilizando cianuro como única fuente de nitrógeno, sin embargo, al igual que en estos, la concentración final de cianato a mayor agitación se ve disminuida, siendo esto evidente en el caso de agitación a 370 rpm donde su concentración final es  $170 \mu\text{mol L}^{-1}$ , en comparación con la concentración de  $450 \mu\text{mol L}^{-1}$  observada en el escenario sin agitación. Es importante comparar esto último mencionado con las concentraciones de cianato muy similares observadas en los escenarios con cianuro y amoníaco como fuentes alternas, independientemente de la velocidad de agitación, sugiriendo una inhibición de consumo del cianato independiente del oxígeno.

Finalmente, la producción de ácidos orgánicos así como la cantidad de hidróxido de sodio adicionada se incrementó considerablemente al adicionar nitrato (además de cianuro), observándose en estos escenarios las mayores producciones de ácidos orgánicos, siendo las más altas de  $123.5 \text{ mmol L}^{-1}$  para el escenario con agitación a 370 rpm. A pesar de lo anterior, en estos escenarios se observaron las mayores producciones de biomasa y por tanto los mejores rendimientos de biomasa respecto al nitrógeno.

#### IV.5 Equivalentes electroquímicos y correlaciones

En la Tabla 17 se presenta el balance de electrones de todos los experimentos realizados en esta tesis (con excepción del experimento anóxico, del cual no se pudieron cuantificar ácidos grasos volátiles). El balance resume los aportes de todos los compuestos cuantificados que donaron o aceptaron electrones (formiato, acetato, síntesis de biomasa y oxígeno), así como el porcentaje de recuperación de electrones en los compuestos cuantificados.

**Tabla 17.** Balance de electrones donados y aceptados en los experimentos de la tesis

Experimento	Electrones donados (meq)	Electrones aceptados (meq e-)				Electrones aceptados cuantificados (meq e-)	Electrones aceptados cuantificados (%)	Electrones aceptados no cuantificados (meq e-)	Electrones aceptados no cuantificados (%)
	Lactato	Formiato	Acetato	Biomasa	Oxígeno				
<b>Cianuro como única fuente de nitrógeno</b>									
Sin agitación	144.8	56.1	5.2	14.5	0.8	76.6	52.9	68.2	47.1
Agitación a 150 rpm	171.9	71.6	16.4	25.7	15.8	129.7	75.4	42.3	24.6
Agitación a 370 rpm	294.8	82.3	0.0	32.1	150.8	265.3	90.0	180.3	10.0
<b>Amoniaco y nitrato como única fuente de nitrógeno</b>									
Amoniaco – 150 rpm	183.4	31.3	16.0	40.8	12.6	100.6	54.8	82.8	45.1
Nitrato - 150 rpm	259.8	102.6	20.0	65.8	17.7	206.0	79.3	53.7	20.7
<b>Cianuro y amoniaco como fuentes de nitrógeno</b>									
Cianuro+amoniaco – sin agitación	292.5	108.2	44.0	25.9	0.7	178.9	61.2	113.5	38.8
Cianuro+amoniaco – a 150 rpm	511.6	76.9	16.0	62.5	11.9	167.3	32.7	344.3	67.3
Cianuro+amoniaco – a 370 rpm	563.8	66.3	0.0	66.2	179.7	312.2	55.4	251.5	44.6
<b>Cianuro y nitrato como fuentes de nitrógeno</b>									
Cianuro+nitrato – sin agitación	227.5	65.9	64.4	48.3	1.6	180.3	79.2	47.2	20.8
Cianuro+nitrato – a 150 rpm	506.5	196.6	20.1	84.4	31.1	332.2	65.6	174.3	34.4
Cianuro+nitrato – a 370 rpm	695.6	246.9	0.0	91.7	328.0	666.6	95.8	29.0	4.2

En los experimentos con cianuro como única fuente de nitrógeno, tanto el número de electrones donados por el lactato, así como el número de electrones aceptados por el oxígeno y el porcentaje de electrones totales aceptados, fue mayor conforme se aumentó la



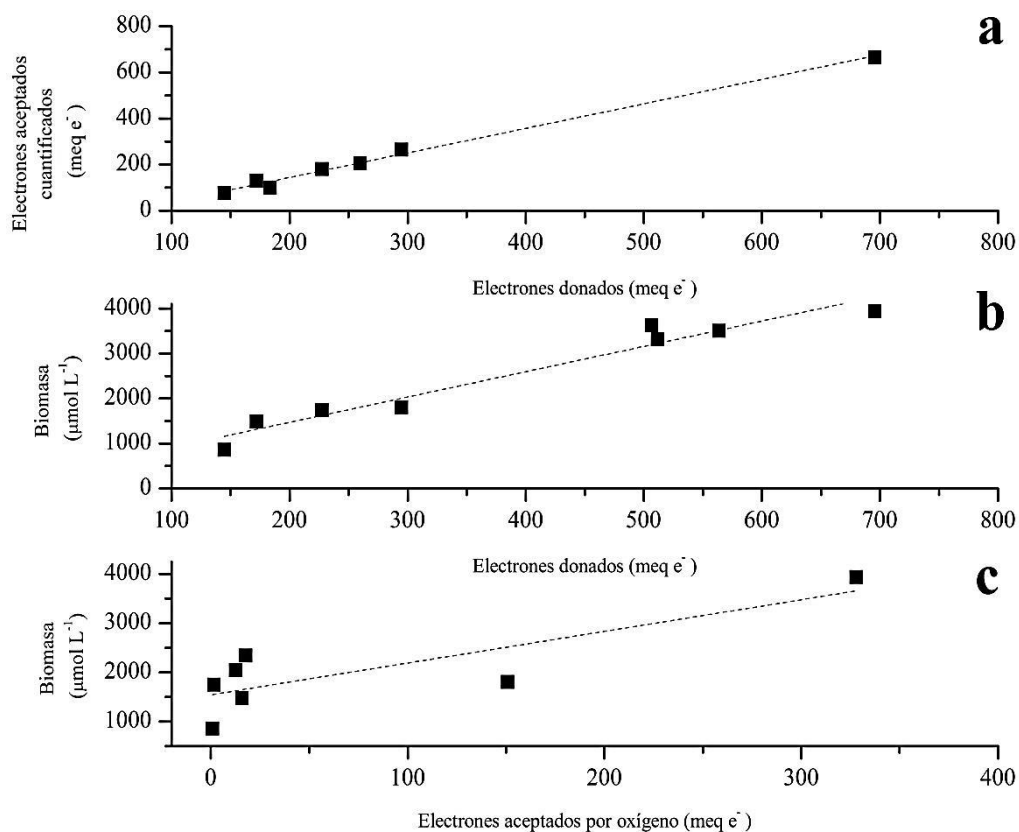
velocidad de transferencia de oxígeno (cianuro a 370 rpm > cianuro a 150 rpm > cianuro sin agitación). En el escenario con mayor agitación (370 rpm), solo 10% de los electrones corresponden a aceptores de electrones no cuantificados. Por otro lado, en los escenarios con menor transferencia de oxígeno (agitación a 150 rpm y sin agitación) los resultados indican un mayor porcentaje de aceptores de electrones no cuantificados por electroforesis capilar.

La misma tendencia es observada en la serie de experimentos con cianuro y nitrato como fuentes alternas de nitrógeno. Sin embargo, el número de electrones donados y aceptados en esta serie de experimentos es mayor que al utilizar cianuro como única fuente de nitrógeno. Esto es concordante ya que en las secciones IV.4.1 y IV.4.2 se observó que adicionar una fuente de nitrógeno alterna (en especial nitrato), ocasiona un mayor consumo de lactato.

En el experimento con cianuro y amoníaco como fuentes alternas de nitrógeno, se encontró un mayor número de electrones donados con respecto a la adición de cianuro como única fuente de nitrógeno (de igual forma que cuando se adicionó nitrato como fuente alterna). Con respecto a los electrones aceptados, en la Tabla 17 se observa que incluso en los escenarios con mayor velocidad de agitación (a 150 y 370 rpm), los porcentajes de electrones aceptados son menores que en los experimentos con cianuro como única fuente de nitrógeno y en los experimentos con cianuro y nitrato como fuentes alternas de nitrógeno. Esto sugiere que la adición de amoníaco favorece la presencia de aceptores de electrones no detectados por electroforesis capilar. Es importante mencionar que esto ocurre también en el experimento con amoníaco como única fuente de nitrógeno con agitación a 150 rpm, en donde el porcentaje de electrones aceptados es menor que los experimentos con agitación análoga con cianuro como única fuente de nitrógeno y nitrato como única fuente de nitrógeno.

La Figura 18.a muestra que en los experimentos presentados en la Tabla 17, exceptuando los experimentos con cianuro y amoníaco como fuentes alternas de nitrógeno, existe una correlación lineal ( $R^2=0.99$ ) entre el número de electrones donados y el número total de electrones recuperados o cuantificados. Se concluye que el número de electrones aceptados incrementa de forma similar al número de electrones que son donados. Esto significa que

cuando existe un mayor número de electrones donados, los sistemas microbianos tienden a aceptar estos electrones en oxígeno, ácidos orgánicos y síntesis de biomasa. Contrariamente, la adición de amoníaco favorecería a otros aceptores de electrones, adicionales a los mencionados, lo que disminuye la correlación  $R^2$  a 0.69.



**Figura 18.** (a) Correlación entre los miliequivalentes electrónicos donados y miliequivalentes electroquímicos aceptados, cuantificados experimentalmente ( $R^2= 0.99$ ), (b) correlación de los miliequivalentes electrónicos donados y biomasa sintetizada ( $R^2=0.951$ ) y (c) correlación entre los miliequivalentes electrónicos aceptados por el oxígeno y biomasa sintetizada ( $R^2=0.68$ ).

Por otro lado, tal como se ha discutido a lo largo del documento, el incremento en la velocidad de transferencia de oxígeno (lo cual conlleva a un mayor número de electrones donados por utilización de lactato) se traduce en mayores concentraciones de biomasa sintetizada. Esto puede ser confirmado con su correlación lineal ( $R^2=0.95$ ) en función del número de electrones donados por la utilización de lactato (Figura 18.b). El valor de la pendiente fue  $(m) = 0.0056$ . Los datos empleados para la construcción de la gráfica fueron los experimentos con cianuro como única fuente de nitrógeno, cianuro y amoníaco como fuentes alternas de nitrógeno y cianuro y nitrato como fuentes alternas de nitrógeno. El

único experimento no ajustado a la correlación fue el experimento con cianuro y amoníaco como fuentes alternas de nitrógeno en un escenario sin agitación.

Finalmente, la Figura 18.c muestra la correlación encontrada ( $R^2=0.68$ ) entre la biomasa sintetizada y el número de electrones aceptados por el oxígeno. El valor de la pendiente fue ( $m$ ) = 6.44. El coeficiente de determinación considerablemente mas bajo que el de la Figura 18.b, sugiere que la síntesis de biomasa no está correlacionada con el oxígeno como aceptor terminal de electrones, sino solamente con los electrones donados sin importar cual sea el aceptor de los mismos. Este hecho, puede explicar lo encontrado en los escenarios con amoníaco y cianuro como fuentes alternas de nitrógeno, en donde existen bajos porcentajes de electrones recuperados en el oxígeno pero altas concentraciones de biomasa sintetizada.

Esta correlación podría explicar también lo encontrado en los experimentos con cianuro y nitrato como fuentes alternas de nitrógeno, ya que a pesar de producirse una concentración hasta de  $123.5 \text{ mmol L}^{-1}$  de ácidos orgánicos (experimento con agitación a 370 rpm), la concentración de biomasa sintetizada fue incluso mayor que en los casos en donde el amoníaco se adicionó como fuente alterna con respecto al cianuro.

## IV.6 Análisis de resultados

La Tabla 18 resume los parámetros clave que permiten diferenciar el efecto de otras fuentes de nitrógeno y velocidades de agitación sobre la biodegradación de cianuro. Además, en la sección se presentan también correlaciones y ANDEVA de dos factores que permitieron obtener conclusiones sobre los resultados.

**Tabla 18.** Resumen de tiempos y parámetros de importancia en los estudios de biodegradación de cianuro.

Experimento	Tiempo final de biodegradación de cianuro (h)	Duración de la fase intermedia de retraso (cianuro)	Velocidad máxima de consumo de la fuente de N ( $\mu\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1}$ )	Rendimiento base nitrógeno $Y_N$ (g biomasa $\text{g}^{-1}$ N consumido)	$Y_C$ (g biomasa $\text{g}^{-1}$ lactato consumido)	[OH <sup>-</sup> ] adicionado ( $\text{mmol L}^{-1}$ )
<b>Cianuro como única fuente de nitrógeno</b>						
Sin agitación	166.5	48	18.7	3.5	0.09	38.6
Agitación a 150 rpm	46.5	22	83.4	6.05	0.13	34.47
Agitación a 370 rpm	51	0	61.6	7.33	0.09	47.22
<b>Amoníaco y nitrato como única fuente de nitrógeno</b>						
Amoníaco – 150 rpm	32	*5	* 58	9.04	0.17	17.69
Nitrato - 150 rpm	46.5	**18	**61.6	9.4	0.14	31.25
<b>Cianuro y amoníaco como fuentes de nitrógeno</b>						
Cianuro+amoníaco – sin agitación	166.5	0	19.6	2.8	0.073	65.87
Cianuro+amoníaco – a 150 rpm	45	21	71.1	7.05	0.01	47.06
Cianuro+amoníaco – a 370 rpm	55	0	57	7.09	0.09	60.75
<b>Cianuro y nitrato como fuentes de nitrógeno</b>						
Cianuro+nitrato – sin agitación	166.5	44.5	16.7	3.5	0.12	67.49
Cianuro+nitrato – a 150 rpm	80	22	57.6	7.05	0.11	84.85
Cianuro+nitrato – a 370 rpm	55	0	77.8	7.65	0.09	144.65

\* Se refiere a la velocidad de consumo y duración de fase de retraso intermedia de amoníaco.

\*\* Se refiere a la velocidad de consumo y duración de fase de retraso intermedia de nitrato.

Con respecto a los experimentos con amoníaco y nitrato como únicas fuentes de nitrógeno con agitación a 150 rpm, se observa que los rendimientos de biomasa sintetizada por nitrógeno ( $Y_N$ ) son mayores que en el experimento con cianuro con agitación a 150 rpm. El

uso de nitrato o amoníaco como fuente de nitrógeno (sin adicionar cianuro) implica en promedio un incremento de 3.2 g SSV g<sup>-1</sup> N con respecto a los obtenidos al utilizar cianuro como fuente de nitrógeno ( $Y_N=6.05$  g SSV g<sup>-1</sup> N). Esto ocurrió a pesar de que el precultivo a partir del cual se realizaron estos experimentos estaba previamente adaptado al consumo de cianuro, y lo cual es explicado por la formación de productos de biodegradación de cianuro, tal como el cianato residual (que no es asimilado en su totalidad al fin de la cinética).

Respecto a la existencia de una fase de retraso intermedia, la asociada al experimento con nitrato es de mayor duración que la asociada al amoníaco, pero ambas menores a la obtenida en el experimento con cianuro agitado a 150 rpm. Esta discusión es importante para explicar la naturaleza del comportamiento diaúxico en los experimentos con cianuro como única fuente de nitrógeno. El hecho de que exista una fase intermedia en estos experimentos, sugiere que la fase dióxica observada en los experimentos con cianuro no es debida (al menos en su totalidad) a limitaciones por nitrógeno, si no que es posible que se deba al cambio de aceptores de electrones en el sistema al agotarse la concentración de oxígeno disuelto en el sistema, o bien, al ser menor la velocidad de consumo de oxígeno que su velocidad de incorporación. Esto apoyado por el hecho de que en el experimento anóxico no se observó una fase intermedia de retraso, debido a que sus condiciones fueron estrictamente anóxicas.

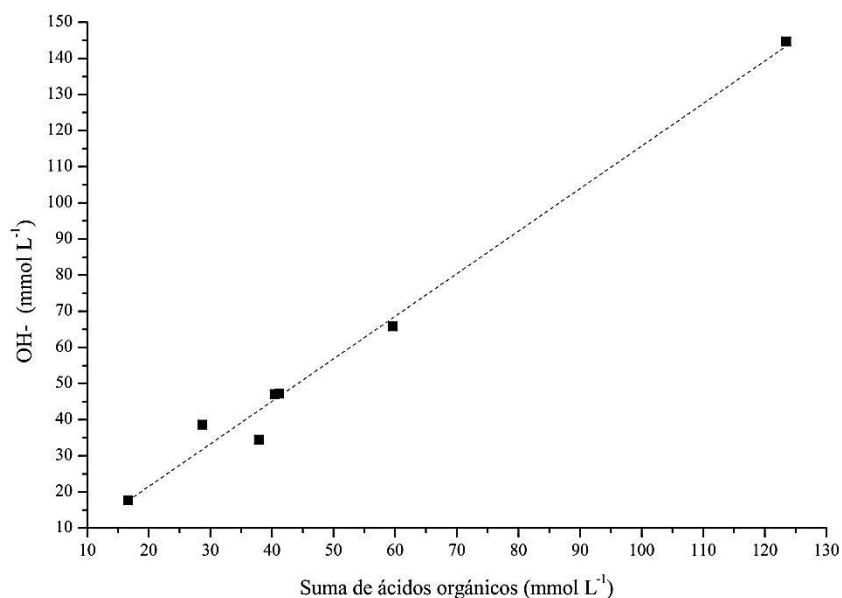
Una vez discutido el efecto de los iones sin la adición de cianuro, se discute el efecto impuesto sobre la biodegradación de cianuro por una fuente de nitrógeno alterna (amoníaco o nitrato). En los experimentos con la adición de amoníaco a pesar de que los tiempos finales de biodegradación no son modificados (con respecto a los experimentos análogos con cianuro como única fuente de nitrógeno), se observó que en el experimento sin agitación la adición de amoníaco ocasionó la eliminación de una fase intermedia de retraso. Esto puede ser explicado debido a una mayor concentración de biomasa sintetizada desde el inicio de la cinética, la cual promovió la biodegradación de cianuro de forma continua durante la cinética.

Similarmente, en los experimentos con la adición de nitrato como fuente alterna los tiempos finales de biodegradación no son modificados (con respecto a los experimentos

análogos con cianuro como única fuente de nitrógeno), con excepción del experimento con agitación a 150 rpm en el cual el consumo de nitrato ocurre de manera simultánea al del cianuro y posiblemente exista competencia por el oxígeno. Contrariamente, en el experimento sin agitación, el consumo de nitrato ocurrió hasta consumido el 90 % del cianuro, mientras en el experimento con agitación a 370 rpm ocurre hasta consumido el 50% del cianuro.

De forma general, la adición de una fuente de nitrógeno alterna al cianuro demanda mayores consumos de lactato (ver Tabla 17 de equivalentes electrónicos), especialmente cuando se adiciona nitrato. Es necesario recordar que los mayores consumos de lactato o electrones donados (exceptuando los casos en que se adiciona amoníaco) implican una mayor concentración de aceptores electrones, incluidos ácidos orgánicos. Como se sugirió durante el documento, la concentración de ácidos orgánicos implicó incrementos en la adición de hidróxido de sodio para mantener el pH operacional (pH de 10.5). La Figura 19 muestra la correlación lineal entre ambos factores.

Para la construcción de la Figura 19 se omitieron los experimentos con cianuro y amoníaco como fuentes alternas de nitrógeno con agitación a 370 rpm los experimentos con cianuro y nitrato como fuentes alternas de nitrógeno sin agitación y con agitación a 150 rpm, y el experimento con cianuro en condiciones anóxicas (debido a la nula producción de ácidos orgánicos y por tanto nula necesidad de adicionar pH). Se obtuvo un  $R^2$  de 0.988, comprobando la relación que existe entre la concentración adicionada de hidróxido para mantener el pH operacional y la concentración de producida de ácidos orgánicos.



**Figura 19.** Correlación entre la suma de concentraciones de ácidos orgánicos y la concentración de hidróxido de sodio adicionado [OH<sup>-</sup>] para mantener el pH operacional de 10.5 ( $R^2=0.988$ ).

Respecto a los análisis de varianza de dos factores encontrados para los experimentos discutidos en el documento con base en las similitudes y tendencias observadas, se realizaron los siguientes: 1) velocidades de consumo de cianuro, 2) concentraciones finales de cianato, 3) rendimientos de biomasa con respecto al nitrógeno ( $Y_N$ ), y 4) rendimientos de biomasa con respecto al carbono ( $Y_C$ ), lo cuales son estadísticamente iguales ( $H_0$ ) o diferentes ( $H_1$ ) entre sí, en función de la velocidad de agitación y en presencia de una fuente alterna de nitrógeno.

La Tabla 19 presenta los datos utilizados para realizar el análisis de varianza de dos factores para los cuatro parámetros evaluados.

Por otro lado, en la Tabla 20, se muestran los resultados de los parámetros estadísticos  $F$  calculada y  $F$  crítica, obtenidos del análisis de varianza para los dos factores y los 4 parámetros evaluados. Respecto a los parámetros rendimiento celular con respecto al nitrógeno y velocidad de consumo de cianuro, para el factor fuente de nitrógeno se obtuvo que  $F$  calculada <  $F$  crítica, mientras el factor velocidad de agitación se obtuvo que  $F$  calculada >  $F$  crítica. Por tanto, se concluye que estadísticamente la fuente de nitrógeno no tiene un efecto sobre las velocidades de consumo de cianuro y rendimientos biomasa con respecto al nitrógeno. Contrariamente al ser mayor la  $F$  calculada con respecto al factor

velocidad de agitación, se concluye que a un nivel de significancia del 95%, las velocidades de consumo de cianuro y rendimientos de nitrógeno correspondientes a todas las fuentes de nitrógeno son estadísticamente diferentes entre sí según la velocidad de agitación (Hipótesis alternativas aceptadas). Estos resultados sugieren que tal como se discutió anteriormente, una mayor velocidad de agitación induce una mayor velocidad de consumo de cianuro, así como una mayor concentración de biomasa sintetizada por concentración de nitrógeno consumido, independientemente de la fuente o fuentes de nitrógeno en el sistema.

**Tabla 19.** Estructura de datos para el ANDEVA de dos factores.

Velocidades máximas de consumo de cianuro ( $\mu\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1}$ )			
Fuente de nitrógeno	Sin agitación	Agitación a 150 rpm	Agitación a 370 rpm
Cianuro	18.7	83.4	61
Cianuro y amoníaco	19.6	71	57
Cianuro y nitrato	16.7	57.6	77.8
Concentración final de cianato ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )			
Fuente de nitrógeno	Sin agitación	Agitación a 150 rpm	Agitación a 370 rpm
Cianuro	290	280	76
Cianuro y amoníaco	550	350	520
Cianuro y nitrato	450	350	180
Rendimiento celular de nitrógeno ( $\text{g SSV g}^{-1} \text{N}$ )			
Fuente de nitrógeno	Sin agitación	Agitación a 150 rpm	Agitación a 370 rpm
Cianuro	3.55	6.05	7.33
Cianuro y amoníaco	2.85	7.05	7.09
Cianuro y nitrato	3.5	7.05	7.65
Rendimiento celular de carbono ( $\text{g SSV g}^{-1} \text{lactato}$ )			
Fuente de nitrógeno	Sin agitación	Agitación a 150 rpm	Agitación a 370 rpm
Cianuro	0.09	0.131	0.093
Cianuro y amoníaco	0.073	0.099	0.095
Cianuro y nitrato	0.12	0.11	0.086



**Tabla 20.** Factores, parámetros y estadística de los ANDEVA de dos factores para los experimentos con cianuro como única fuente y como fuente alterna de N.

Parámetro	Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico para F
Velocidades máximas de consumo de cianuro	Fuente de Nitrógeno	0.0000	2	0.0000	0.16	6.9
	Velocidad de agitación	0.0050	2	0.0025	18.46	6.9
	Error	0.0005	4	0.0001	1.00	6.4
Concentración final de cianato	Fuente de Nitrógeno	0.101	2	0.050	4.47	4.32
	Velocidad de agitación	0.044	2	0.022	1.97	4.32
	Error	0.045	4	0.011	1.00	4.11
Rendimiento celular de nitrógeno	Fuente de Nitrógeno	0.3	2	0.2	0.9	6.9
	Velocidad de agitación	28.5	2	14.3	72.4	6.9
	Error	0.8	4	0.2	1.0	6.4
Rendimiento celular de carbono	Fuente de Nitrógeno	0.0005	2	0.0003	0.9	6.9
	Velocidad de agitación	0.0009	2	0.0004	1.4	6.9
	Error	0.0012	4	0.0003	1.0	6.4

De forma similar, respecto al parámetro concentración final de cianato para el factor fuente de nitrógeno se obtuvo que  $F$  calculada  $>$   $F$  crítica, mientras el factor velocidad de agitación se obtuvo que  $F$  calculada  $<$   $F$  crítica. Por tanto, se concluye que estadísticamente la velocidad de agitación no tiene un efecto sobre la concentración final o residual de cianato en los sistemas. Contrariamente al ser mayor la  $F$  calculada con respecto al factor fuente de nitrógeno, se concluye que a un nivel de significancia del 90%, las concentraciones residuales de cianato en los experimentos son diferentes en dependencia de la presencia/ausencia de una fuente de nitrógeno adicional. Esto sugiere que tal como se discutió anteriormente, la adición de amoníaco o nitrato (como fuentes adicionales al cianuro) inducen una mayor concentración de cianato residual, teniendo las mayores

concentraciones cuando se utiliza amoníaco como fuente alterna. Este hallazgo no ha sido reportado a la fecha y es importante realizar experimentos adicionales para confirmarlo. Por otro lado, para los rendimientos de biomasa con respecto al lactato consumido ( $Y_C$ ), los valores de  $F$  son menores que los valores de  $F$  calculada respecto a los dos factores, por lo cual es posible concluir que de forma global (para todos los experimentos) ni la presencia de una fuente alterna de N, ni tampoco la velocidad de agitación, tienen efecto alguno sobre los rendimientos de biomasa con respecto al lactato consumido ( $Y_C$ ).

## Conclusiones

Los consorcios microbianos aislados de los terreros de lixiviación de oro y plata estudiados en el presente trabajo son capaces de tolerar y biodegradar concentraciones de cianuro de hasta  $2,000 \mu\text{mol L}^{-1}$  ó  $52 \text{ mg L}^{-1}$ , en medio aerobio ó anóxico. En medio aerobio las concentraciones finales hasta las cuales los sistemas microbianos son capaces de degradar el cianuro son menores a  $1 \text{ mg L}^{-1}$ , por lo que se acepta la hipótesis que plantea que el uso de consorcios microbianos en las condiciones del estudio (condiciones aerobias en modo lote) pueden permitir degradar el cianuro libre y dar cumplimiento a lo que establece la NOM-001-SEMARNAT-1996.

Por otro lado, en medio anóxico se encontró que utilizando la misma composición del medio de cultivo que en medio aerobio, así como el mismo sustrato (lactato de sodio), los microorganismos son capaces de degradar el cianuro hasta concentraciones finales de  $370 \mu\text{mol L}^{-1}$  ó  $9.5 \text{ mg L}^{-1}$ .

Los resultados generados en esta tesis podrían ayudar a disminuir costos de operación en el proceso de lixiviación de oro y plata del cual fueron aislados estos microorganismos, así como en el diseño de un esquema de biodegradación. De acuerdo con los resultados obtenidos, la adición de una fuente adicional de nitrógeno en los terreros de lixiviación sería traducida en una mayor concentración de sustrato orgánico consumido, y por tanto en mayores consumos de oxígeno, hidróxido de sodio (debido a la alta producción de ácidos orgánicos) y biomasa sintetizada. Esto podría explicar los altos consumos de cianuro y acidificación que no corresponden al proceso hidrometalúrgico en los terreros, ya que la adición de nitratos junto con el cianuro genera una alta concentración de biomasa, que promueve mayor consumo de cianuro y mayor concentración de ácidos grasos volátiles que generan acidificación. Por tanto, debe evitarse la adición de una fuente adicional de cianuro para llevar a cabo de forma costeable el proceso hidrometalúrgico y un posible proceso de biorremediación de cianuro, considerando que la concentración de nitrógeno total permitida (amonio/amoniaco, nitratos, nitritos) en la NOM-001-SEMARNAT-1996 es más flexible que para el cianuro (hasta  $40 \text{ mg L}^{-1}$  como promedio mensual). Haciendo caso omiso a esta recomendación, el consorcio microbiano estudiado es una alternativa atractiva debido a la posibilidad de consumo de las fuentes amoniaco, nitrato y cianuro en un solo diseño.

Con respecto al efecto de la velocidad de transferencia de oxígeno sobre la biodegradación de cianuro, y que podría aplicarse en un terrero de lixiviación, el tiempo más corto al que se completó la biodegradación fueron 46 h, utilizando coeficientes de transferencia de oxígeno,  $0.85 \text{ h}^{-1}$  (en agitación orbital a 150 rpm) y de  $5.2 \text{ h}^{-1}$  (en agitación orbital a 370 rpm). Evidentemente, utilizar el coeficiente de transferencia de oxígeno más bajo resultaría más costeable en el proceso, teniendo como ventajas asociadas a esta transferencia de oxígeno, un menor consumo de sustrato/fuente de carbono orgánico y menores consumos de hidróxido de sodio para mantener el pH operacional. Sin embargo, la desventaja de operar con un coeficiente de transferencia más bajo es un mayor fraccionamiento y/o menor asimilación de la especie cianato comparado con lo que se observó en el mayor coeficiente de transferencia de oxígeno, asociado a una alta producción de biomasa. Sin embargo, el cianato es alrededor de 1000 veces menos tóxico que el cianuro, y además no está regulado en la normativa mexicana aplicable.

Por otro lado, en el experimento en el que no existió transferencia de oxígeno por medios convectivos (experimento sin agitación) también es posible alcanzar la biodegradación de cianuro hasta concentraciones inferiores a  $1 \text{ mg L}^{-1}$ . Sin embargo, el proceso es considerablemente más lento (tiempos finales de 166 horas) y además del producto de biodegradación cianato (generado en las mayores transferencias de oxígeno), se obtiene formamida. Sin embargo, al igual que el cianato, la formamida es una especie de menor toxicidad que tampoco está regulada en la normativa mexicana aplicable.

La biodegradación de cianuro sin adición de oxígeno por medios convectivos podría resultar atractiva para la aplicación de un proceso de atenuación natural en los terreros de lixiviación. Esto podría lograrse asegurando que el pH del sitio se mantenga siempre por encima de pH 10.5, y teniendo disponibilidad de fuentes de carbono orgánicas y otros nutrientes como cloruros y fosfatos.

Por otro lado, se rechaza la hipótesis que plantea que la adición al sistema de una fuente alterna de nitrógeno puede inhibir la biodegradación de cianuro y/o su asimilación. Similarmente, se encontró que adicionar nitrato o amoníaco como fuente alterna de nitrógeno ocasiona concentraciones residuales de cianato mayores al final de la cinética, independientemente de la velocidad de transferencia de oxígeno.

Una de las contribuciones importantes de este trabajo, y que no ha sido reportada previamente, es que cuando se adicionó cianuro y nitrato en las condiciones del estudio, la presencia de cianuro en concentraciones de  $2,000 \mu\text{mol L}^{-1}$  inhibe el consumo de nitrato hasta que se completa el consumo de cianuro en escenarios sin agitación, y en escenarios con alta transferencia de oxígeno (agitación a 370 rpm) hasta que se consume 50% de cianuro. Este es el primer trabajo que demuestra la competencia entre cianuro y nitrato y puede ser relevante en sistemas de biodegradación en donde se encuentren ambas fuentes, y que además permite biodegradar selectivamente al cianuro con respecto al nitrato, mediante el control de la concentración de oxígeno disponible.

Otra contribución importante es que, en el sistema aerobio sin agitación caracterizado por bajas velocidades de biodegradación, se observó que en las fases tempranas de la cinética de biodegradación de cianuro existe producción y acumulación del ion cianato, el cual se asimiló una vez consumido el ion cianuro. En el escenario con mayor agitación también se encontró cianato como producto de biodegradación, sin embargo, se encontró que en este escenario de alta transferencia de oxígeno, fue asimilado hasta  $3 \text{ mg L}^{-1}$ , lo cual sugiere que el cianato es un intermediario en la síntesis celular, y no solo un producto de biodegradación de cianuro, hasta ahora esto no ha sido reportado. Respecto al metabolito formamida, debido a que solo fue detectado en condiciones de baja transferencia de oxígeno, su presencia en pilas de lixiviación (por ejemplo, en un proyecto de bioremediación) sería un indicador de biodegradación de cianuro en condiciones limitadas de oxígeno, por lo cual debería incrementarse la transferencia de oxígeno, con la finalidad de completar la biodegradación a tiempos menores y con menores concentraciones de metabolitos de nitrógeno.

Los resultados del ANDEVA sobre las velocidades de consumo de cianuro y los rendimientos celulares con respecto al nitrógeno consumido indican que estos incrementan en función de la velocidad de agitación o transferencia de oxígeno a los sistemas y estadísticamente no son influenciados por la la fuente de nitrógeno o combinación de fuentes de nitrógeno adicionadas. Nuevamente, estos hallazgos no han sido reportados previamente.



## Perspectivas y recomendaciones

Aunque en el presente trabajo se dilucidaron aspectos metabólicos del uso de cianuro como fuente de nitrógeno teniendo como variables la transferencia de oxígeno y el efecto de otras fuentes de nitrógeno (nitrato y amoníaco), es necesario:

- 1) Evaluar diferentes concentraciones de cianuro con la finalidad de dilucidar la tolerancia al ion cianuro característica del consorcio estudiado, así como el grado de inhibición que ejerce sobre el propio cultivo.
- 2) Realizar análisis elementales de la biomasa sintetizada en los experimentos, con el propósito de realizar balances de C y N con una base de cálculo más representativa de las condiciones de cultivo del consorcio, en lugar de hacerlo con la fórmula genérica  $C_5H_7O_2N$ .
- 3) Identificar a las especies microbianas que componen los consorcios microbianos mediante técnicas de biología molecular.
- 4) Evaluar la biodegradación de cianocomplejos metálicos, siendo estos abundantes en los terreros de lixiviación al existir concentraciones de iones metálicos.
- 5) Evaluar la biodegradación del ion cianuro a diferentes condiciones de pH alcalinas (pH=10-13).
- 6) Evaluar diferentes concentraciones de amoníaco, especie para la cual se observó que al ser consumida en su totalidad, inhibe la capacidad de las células de consumir el cianuro residual. La finalidad de esto es encontrar una concentración de amoníaco a la cual se pueda inhibir la biodegradación de cianuro.
- 7) A pesar de haber cuantificado a la especie cianato y formamida, la frecuencia con la que se cuantificaron fueron limitadas, por lo que no fue posible conocer sus cinéticas y velocidades de producción y/o consumo, por lo que es necesario realizar cinéticas que permitan obtener las cinéticas de estas especies.

- 8) Es importante realizar ensayos para determinar las actividades enzimáticas de las enzimas cianuro monooxigenasa (producción de cianato), cianuro hidratasa (producción de formamida) y cianasa (degradación de cianato).
- 9) Evaluar la posible utilización del cianuro como fuente de carbono para síntesis celular, así como su cinética asociada
- 10) Es recomendable también evaluar las cinéticas de biodegradación de cianuro y cianato adicionando carbonato/bicarbonato al medio de cultivo, debido a que de acuerdo con lo reportado en la bibliografía, la biodegradación de cianato es catalizada por el ion bicarbonato. La adición de bicarbonato en medio anóxico permitiría evaluar a este ion como precursor en la metanogénesis, que además puede ser fuente de carbono para microorganismos autótrofos.
- 11) Evaluar el consumo de formiato, el cual es un producto de la utilización de lactato en medio aerobio y del cual existió un consumo en medio anóxico. Estudiar la utilización de lactato para la producción de formiato y acetato que podrían ser consumidos en medio anóxico, logrando esto mediante columnas de lecho empacado con condiciones anóxicas. Esto podría ser importante para entender las dinámicas de los microorganismos degradadores de cianuro nativos de terreros de lixiviación.



## Referencias

- Adjei, M.D. y Ohta, Y. (1999). Isolation and characterization of a cyanide-utilizing Burkholderia cepacia strain, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 15, 699.
- Akcil, A., Karahan., A.G., Ciftci, H., y Sagdic, O. (2003). Biological treatment of cyanide by natural isolated bacteria (*Pseudomonas* sp.), *Miner. Eng.*, 16, 643.
- Anderson, P.M., Sung, Y.C., y Fuchs J.A. (1990). The cyanase operon and cyanate metabolism, *FEMS Microbiol.*, 247-252.
- Eaton, A.D., Clesceri L.S., Rice W.E. y Greenberg A.E. (2005). Standard methods for the examination of water and wastewater., eds., APHA American Public Health Association, USA.
- Barton, L. (2005). Structural and functional relationships in prokaryotes. Springer Science & Business Media.
- Borkar, S. (2015). Bioprospects of Coastal Eubacteria., eds.. Springer International Publishing: Springer.
- Chapatwala, K.D. (1998). Biodegradation of cyanides, cyanates and thiocyanates to ammonia and carbon-dioxide by immobilized cells of *pseudomonas-putida*, *J Ind Microbiol Biotechnol.*, 28-33.
- Cussler, E.L. (1997). Diffusion: Mass Transfer in Fluid Systems.,eds., Cambridge University Press, New York.
- Diario Oficial de la Federación (1997a) Norma Oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996, Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. Secretaria de medio ambiente, recursos naturales y pesca. (6/01/1997) p 68-75.
- Diario Oficial de la Federación (1997b) Aclaración a la Norma Oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996, Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales, publicada el 6 de enero de 1997. Secretaria de medio ambiente, recursos naturales y pesca. Primera Sección. (30/04/1997). p 38-41.
- Diario Oficial de la Federación (2015) Norma Mexicana NMX-AA-034-SCFI-2015, Análisis de agua, medición de sólidos y sales disueltas en aguas naturales, residuales y residuales tratadas, publicada el mes de octubre de 2016. Secretaria de Economía. (10/16). p 2-16.

Dumestre, A., Chone, T., Portal, J.M., Gerard, M., y Berthelin, J. (1997). Cyanide degradation under alkaline conditions by a strain of *Fusarium solani* isolated from contaminated soil, *Appl. Biochem. Microbiol.*, 63, 2729.

Dzombak, D.A., Ghosh, R.S., y Wong-Chong, G.M. (2006). Cyanide in Water and Soil: Chemistry, Risk, and Management., eds., CRC Press/Lewis Publishers, Boca Raton, FL.

Environmental Protection Agency (1994). Treatment of Cyanide Heap Leaches and Tailings, Technical Report, U.S.Washington, DC,.

Fallon, R.D. (1992). Evidence of a hydrolytic route for anaerobic cyanide degradation, *Appl. Biochem. Microbiol.*, 58, 3163.

Fedel-Moen, R., Ragusa, S.R., Kimber, R.W.L., y Williams, B.D. (2000). Degradation of metal cyanide complexes by microorganisms, *Miner. Metall. Proc.*, 69-76.

Fernández, R.F., Dolgih, E., y Kunz, D.A. (2003). Enzymatic assimilation of cyanide via pterin-dependent oxygenolytic cleavage to ammonia and formate in *Pseudomonas fluorescens* NCIB 11764, *Appl. Environ. Microbiol.*, 121-128.

Figueira, M.M., Cinimnelli, V.S.T., de Andrade, M.C., y Linardi, V.R. (1996). Cyanide degradation by an *Escherichia coli* strain, *Can. J. Microbiol.*, 42, 519.

Gijzen, H.J., Bernal, E., y Ferrer, H. (2000). Cyanide toxicity and cyanide degradation in anaerobic wastewater treatment, *Water Res.*, 2447-2454.

Graham, A. F., y Lund, B.M. (1983). The effect of alkaline pH on growth and metabolic products of a motile, yellowpigmented *Streptococcus* sp, *J. Gen. Microbiol.*, 2429-2435.

Gurbuz, F., Ciftci, H., Akcil, A., y Karahan, A. (2004). Microbial detoxification of cyanide solutions: a new biotechnological approach using algae, *Hydrometallurgy.*, 167-176.

International Cyanide Management Institute (2017). International Cyanide Management Code For The Manufacture, Transport and Use of Cyanide In The Production of Gold. Recuperado de: <https://www.cyanidecode.org/> [Accedido en Mayo. 2017].

Kao, C.M., Liu, J.K., Lou, H.R., Lin, C.S., y Chen, S.C. (2003). Biotransformation of cyanide to methane and ammonia by *Klebsiella oxytoca*, *Chemosphere.*, 1055.

Karavaiko, G.I., Kondrat'eva, T.F., Savari, E.E., y Grigor'eva, N.V. (2000). Microbial degradation of cyanide and thiocyanate, *Mikrobiologiya.*

Kunz, D.A., Nagappan, O., Silva-Avalos, J., y Delong, G.T. (1992). Utilization of cyanide as a nitrogenous substrate by *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764: evidence for multiple pathways of metabolic conversion, *Appl. Biochem. Microbiol.*, 58, 2022.

Landkamer, L.L., Bucknam, C.H., Figueroa, L. (2015). Anaerobic nitrogen transformations in a gold-cyanide leach residue, *Environ. Sci Technol*, 2(12), 357–361.

Lottermoser, B.G. (2010). *Mine Wastes: Characterization, Treatment and Environmental Impacts*, Third Edition. Springer, Berlin, Heidelberg.

Luque-Almagro, V.M., Huertas, M.J., Martínez-Luque, M., Moreno-Vivián, C., Roldán, M.D., García-Gil, J., Castillo, F., y Blasco R. (2005). Bacterial degradation of cyanide and its metal complexes under alkaline conditions, *Appl. Environ. Microbiol.*, 940–947.

Luque-Almagro V.M. (2008). Characterization of the *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 cyanase, an enzyme that is not essential for cyanide assimilation, *Appl Environ Microb.*, 6280–6288.

Environmental Protection Agency (1994). *Treatment of Cyanide Heap Leaches and Tailings*, Technical Report, U.S.Washington, DC.

Unidad Minera Cerro de San Pedro (2010). *Manifestación de Impacto Ambiental Modalidad Regional. Proyecto de optimización de la operación, consolidación de reservas y cierre, Reporte técnico, San Luis Potosí. Recuperado de: <http://sinat.semarnat.gob.mx/dgiraDocs/documentos/slp/estudios/2011/24SL2011M0006.pdf>*

Mathews, C., Van Holde, K., Ahern, K. (2000). *Biochemistry*, eds., Addison Wesley Longman, San Francisco.

Mudder, T., Miller, S., Russell, L., Cox, A., y McWharther, D. (1998). Introduction to the Biopass system, an alternative treatment process closure of spent heap leach pads, in *Cyanide Monograph*, T. Mudder, Ed., *Mining Journal Books*, Ltd, London.

O'Reilly, C. y Turner, P.D. (2003). The nitrilase family of CN hydrolysing enzymes — a comparative study, *J. Appl. Microbiol.*, 95, 1161.

Ortiz I. (2004). *Biodegradación de hidrocarburos en suelos: Efecto de la adición de cosubstratos gaseosos*, Tesis de Doctorado, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, México.

Oudjehani, K., Zagury, G.J. y Deschênes L. (2002). Natural Attenuation Potential of Cyanide via Microbial Activity in Mine Tailings, *Appl Microbiol Biotechnol.*, 409-415.

Paavilainen, S., Heliö, P., y Korpela, T. (1994). Conversion of carbohydrates to organic acids by alkaliphilic bacilli, *J Ferment Bioeng.*, 217-222.

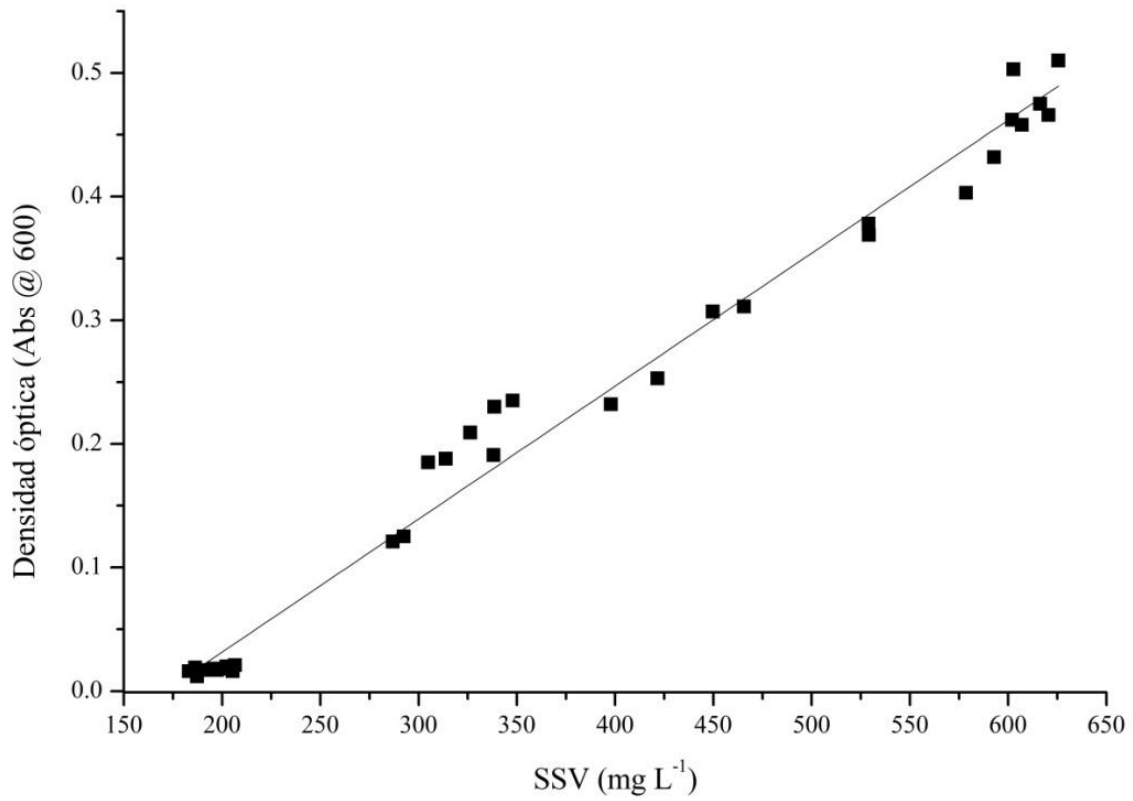
- Paavilainen, S., Makela, M., y T. Korpela. (1995). Proton and carbon inventory during the growth of an alkaliphilic *Bacillus* indicates that protons are independent from acid anions *J Ferment Bioeng*, 80 429–433.
- Rittmann, B.E. y McCarty, P.L. (2001). *Environmental Biotechnology: Principles and Applications*, McGraw-Hill, New York.
- Robuck, S.J., y Luthy, R.G. (1988). Destruction of iron–complexed cyanide by alkaline hydrolysis, *Wat. Sci. Tech.*, 21, 547.
- Santos, V.E., Galdeano, C., Gomez, E., Alcon, A. y Garcia - Ochoa, F. (2006). Oxygen uptake rate measurements both by the dynamic method and during the process growth of *Rhodococcus erythropolis* IGTS8: Modelling and difference in results, *Biochem. Eng J*, 32(3):198–204.
- Silva-Avalos, J., Richmond, M.G., Nagappan, O., y Kunz, D.A. (1990). Degradation of the metal–cyanocomplex tetracyanonickelate(II) by cyanide-utilizing bacterial isolated, *Appl. Biochem. Microbiol.*, 56,3664.
- Solomonson, L.P. (1981). Cyanide as a metabolic inhibitor, in *Cyanide in Biology.*, eds., Academic Press, London.
- Wang, C.S., Kunz, D., y Venables, B.J. (1996). Incorporation of molecular oxygen and water during enzymatic oxidation of cyanide by *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764, *Appl. Biochem. Microbiol.*, 62, 2195.
- Wen N.y Brooker, M.H. (1994). Rate constants for cyanate hydrolysis to urea: A Raman study, *Can. J. Chem.*, 1099-1106.
- Wolfe, A.J. (2005). The acetate switch, *Mol. Biol. Rev*, 12-50.
- Zagury, G.J.,y Oudjehani, K. (2004). Characterization and availability of cyanide in solid mine tailings from gold extraction plants, *Sci. Total Environ.*, 211-224.

## Anexos

### Anexo I. Equivalencia entre densidad óptica (a 600 nm) y biomasa (medida en términos de SSV)

**Tabla A.1 Datos para la construcción de la curva de calibración de SSV vs densidad óptica a 600 nm.**

SSV (mg L <sup>-1</sup> )	Densidad óptica @ 600 nm	SSV (mg L <sup>-1</sup> )	Densidad óptica @ 600 nm
182	0.013	287	0.121
183	0.012	292	0.125
183	0.016	305	0.185
186	0.019	314	0.188
187	0.012	326	0.209
188	0.016	338	0.191
189	0.016	339	0.23
189	0.016	348	0.235
193	0.019	398	0.232
193	0.017	422	0.253
193	0.019	450	0.307
196	0.017	466	0.311
196	0.018	529	0.378
197	0.017	529	0.369
198	0.016	579	0.403
202	0.014	593	0.432
202	0.018	602	0.462
202	0.018	603	0.503
202	0.02	607	0.458
205	0.016	616	0.475
205	0.02	621	0.466
207	0.021	626	0.51



**Figura A.1.** Curva de calibración de sólidos suspendidos volátiles versus densidad óptica, para la cual la Ecuación de regresión lineal obtenida es  $y=0.0011x-0.1836$ .

**Anexo II. Parámetros cinéticos generados con los ajustes del modelo Gompertz a las cinéticas de consumo de cianuro o producción de biomasa.**

**Tabla A.2. Parámetros de ajuste al modelo Gompertz para las cinéticas de consumos de cianuro, amoníaco, nitratos y producción de biomasa para todos los experimentos presentados.**

Donde: A, k y  $r_{\max}$  representan la concentración máxima de la variable, constante cinética de primer orden y velocidad máxima de consumo de cianuro o producción de biomasa, respectivamente. La columna n representa el número de puntos usados para el modelo.

<b>Cianuro como única fuente de N</b>						
Experimento	Parámetro	A	k (h <sup>-1</sup> )	n	$r_{\max}$ ( $\mu\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1}$ )	R <sup>2</sup>
Sin agitación	Cianuro	2.45 ± 0.09	0.0198±0.002	18	18.7 ± 1.2	0.965
	SSV	1.16 ± 0.02	0.0162±0	13	7.3 ± 0.2	0.993
Agitación a 150 rpm	Cianuro	4.99 ± 2.4	0.0433 ± 0.011	10	83.4 ± 11.2	0.97
	SSV	3.15 ± 1.24	0.05868 ± 0.013	6	71.3 ± 0.1	0.973
Agitación a 370 rpm	Cianuro	2.45 ± 0.014	0.06505 ± 0.001	9	61.6 ± 0.1	0.997
	SSV	2.69 ± 0.03	0.0518 ± 0	7	53.8 ± 0.2	0.986
Anóxico	Cianuro	1.68 ± 0.02	0.085 ± 0.002	9	55 ± 0.8	0.988
<b>Amoníaco y nitrato con agitación a 150 rpm</b>						
Experimento	Parámetro	A	k (h <sup>-1</sup> )	n	$r_{\max}$ ( $\mu\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1}$ )	R <sup>2</sup>
Amoníaco; agitación a 150 rpm	Amoníaco	2.7 ± 3.26	0.05561 ± 0.015	7	58 ± 10	0.951
	SSV	2.46 ± 0.014	0.1535 ± 0.008	6	145.5 ± 7.2	0.995
Nitrato; agitación a 150 rpm	Nitrato	4.09 ± 0.374	0.039 ± 0.003	10	61.6 ± 0.4	0.961
	SSV	5.68 ± 0.6	0.0573 ± 0.005	8	125.6 ± 1.4	0.93
<b>Amoníaco y cianuro como fuentes alternas de nitrógeno</b>						
	Parámetro	A	k (h <sup>-1</sup> )	n	$r_{\max}$ ( $\mu\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1}$ )	R <sup>2</sup>
Sin agitación	Cianuro	1.97 ± 0.16	0.0257 ± 0.0003	18	19.6 ± 0.1	0.994
	Amoníaco	2.03 ± 0.020	0.0615 ± 0.001	13	48.1 ± 1.4	0.995
	SSV	1.31 ± 0.03	0.0418 ± 0.0037	9	21.1 ± 1.4	0.963

Agitación a 150 rpm	Cianuro	7.10 ± 0.26	0.0026 ± 0.00014	8	7.1 ± 0.4	0.95
	Amoniaco	7.7 ± 0.91	0.0016 ± 0.0007	7	4.7 ± 1.6	0.97
	SSV	6.43 ± 1.99	0.0632 ± 0.012	5	15.7 ± 1.4	0.997
Agitación a 370 rpm	Cianuro	2.07 ± 0.05	0.0714 ± 0.0035	10	57 ± 1.5	0.993
	Amoniaco	2.09 ± 0.03	0.1424 ± 0.00163	10	114.9 ± 0.4	0.973
	SSV	3.47 ± 0.04	0.0895 ± 0.01	6	119.8 ± 11	0.993

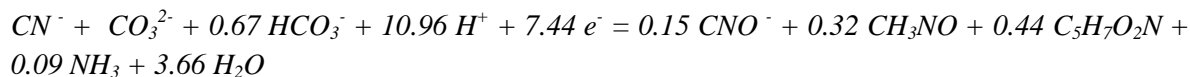
**Cianuro y nitrato como fuentes alternas de nitrógeno**

	Parámetro	A	k (h <sup>-1</sup> )	n	rmax (μmol L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
Sin agitación	Cianuro	2.55 ± 0.06	0.017 ± 0.001	19	16.7 ± 0.7	0.972
	Nitrato	1.83 ± 0.02	0.05245 ± 0.0008	18	37.1 ± 0	0.987
	SSV	5.39 ± 0.43	0.0056 ± 0.00002	14	11.6 ± 0.9	0.976
Agitación a 150 rpm	Cianuro	2.34 ± 0.4	0.0638 ± 0.0041	14	57.6 ± 2.8	0.95
	Nitrato	4.61 ± 0.1713	0.0232 ± 0.00026	14	41.3 ± 0.7	0.98
	SSV	10.77 ± 0.38	0.0229 ± 0.0046	11	95.2 ± 31	0.987
Agitación a 370 rpm	Cianuro	2.1 ± 0.016	0.0962 ± 0.001	12	77.8 ± 0.3	0.99
	Nitrato	2.1 ± 0.0118	0.077 ± 0.0025	13	62.8 ± 1.7	0.995
	SSV	5.79 ± 0.0301	0.0234 ± 0.00001	11	52.3 ± 0.2	0.982

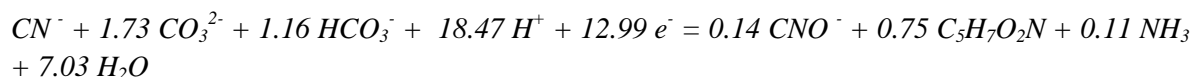


### **Anexo III. Semireacciones de síntesis celular por mol de cianuro de los experimentos correspondientes a las secciones IV.2 - IV4**

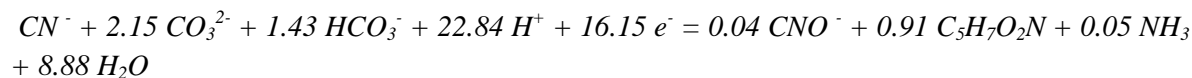
**a) Cianuro como única fuente de nitrógeno en un escenario sin agitación (correspondiente a sección IV.2.1)**



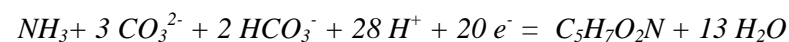
**b) Cianuro como única fuente de nitrógeno en un escenario con agitación a 150 rpm (correspondiente a sección IV.2.2)**



**c) Cianuro como única fuente de nitrógeno en un escenario con agitación a 370 rpm (correspondiente a sección IV.2.3)**



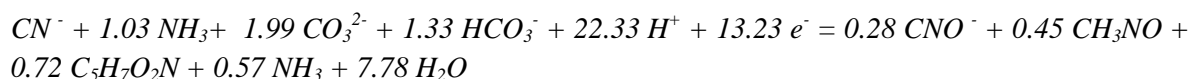
**d) Amoníaco como única fuente de nitrógeno en un escenario con agitación a 150 rpm (correspondiente a sección IV.3.1)**



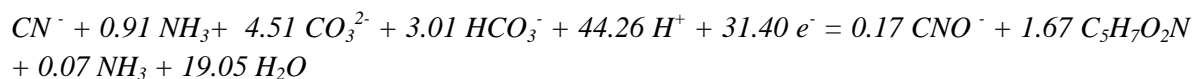
**d) Nitrato como única fuente de nitrógeno en un escenario con agitación a 150 rpm (correspondiente a sección IV.3.2)**



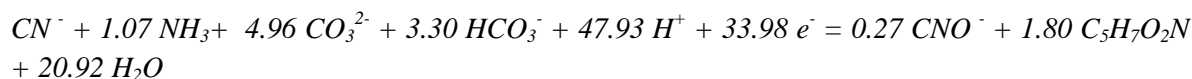
**e) Cianuro y amoníaco como fuentes alternas de nitrógeno en un escenario sin agitación (correspondiente a sección IV.4.1)**



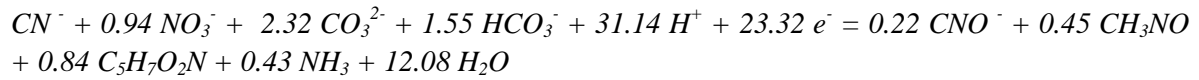
**f) Cianuro y amoníaco como fuentes alternas de nitrógeno en un escenario con agitación a 150 rpm (correspondiente a sección IV.4.1)**



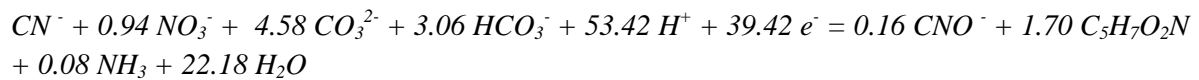
**g) Cianuro y amoníaco como fuentes alternas de nitrógeno en un escenario con agitación a 370 rpm (correspondiente a sección IV.4.1)**



**h) Cianuro y nitrato como fuentes alternas de nitrógeno en un escenario sin agitación (correspondiente a sección IV.4.2)**



**i) Cianuro y nitrato como fuentes alternas de nitrógeno en un escenario con agitación a 150 rpm (correspondiente a sección IV.4.2)**



**j) Cianuro y amoníaco como fuentes alternas de nitrógeno en un escenario con agitación a 370 rpm (correspondiente a sección IV.4.2)**

