



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA

Comunidad Educativa al servicio del Pueblo

**UNIDAD ACADÉMICA DE INGENIERÍA,
INDUSTRIA Y CONSTRUCCIÓN**

CARRERA DE INGENIERÍA AMBIENTAL

**BIODEGRADACIÓN DEL CIANURO EN AGUAS RESIDUALES
MINERAS, ESTUDIO DE CASO PLANTA POLECUA, DE LA
MINA BARRACO COLORADO DEL CANTÓN CAMILO PONCE
ENRÍQUEZ.**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE INGENIERO AMBIENTAL**

AUTOR: Ana Beatriz Zambrano Palacios

DIRECTOR: Ing. Augusto Polibio Martínez Vega

MATRIZ CUENCA

2018

DECLARACIÓN

Yo, ANA BEATRIZ ZAMBRANO PALACIOS, declaro bajo juramento que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento; y eximo expresamente a la Universidad Católica de Cuenca y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales.

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

Autor

Ana Beatriz Zambrano Palacios.

CC. 1314053230

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue desarrollado por ANA BEATRIZ ZAMBRANO PALACIOS, bajo mi supervisión.

Ing. Augusto Polibio Martínez Vega, Mgsc.
DIRECTOR

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Máster Ingeniero Augusto Polibio Martínez Vega, por ser el gestor de esta investigación experimental al apoyarme y darme las facilidades para el desarrollo de este trabajo.

A las Ing. Fabiola Uday e Ing. Digna Ortega por su amable asesoría en la realización de procedimientos de laboratorio.

A la Sra. Delia Pineda Espinoza y al Sr. Jean Piere Ordoñez y todas aquellas personas que de una u otra manera fueron parte del desarrollo de este trabajo prestando sus conocimientos, actividades y recomendaciones.

ANA BEATRIZ ZAMBRANO PALACIOS

DEDICATORIA

Este proyecto está dedicado a mis Padres y a la familia Martínez Abad, quienes han estado a mi lado con su apoyo incondicional y consejos, para cada día hacer de mí una persona mejor.

ANA BEATRIZ ZAMBRANO PALACIOS

ÍNDICE DE CONTENIDO

DECLARACIÓN	i
CERTIFICACIÓN	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
DEDICATORIA	iv
ÍNDICE DE CONTENIDO	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE TABLAS	viii
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiii
INTRODUCCIÓN	xiv
CAPÍTULO 1	1
GENERALIDADES	1
OBJETIVOS	1
General	1
Específicos	1
JUSTIFICACIÓN	1
CAPÍTULO 2	2
MARCO TEÓRICO	2
2.1 ANTECEDENTES	2
2.2 Procesos Minero	3
2.3 Minería del Oro	5
2.4 Minería de extracción del Oro con cianuro	9
2.5 Que son las Aguas residuales	11
2.6 Aguas Contaminadas con Cianuro y su Toxicidad	12
2.7 Tratamiento de Aguas Contaminadas	17
2.7.1 Tratamiento de aguas contaminadas con Cianuro	18
2.8 Identificación de Bacterias	19
2.9 Bacterias degradadoras de Cianuro	21
2.10 Creación de un consorcio de bacterias degradadoras	22
2.11 Métodos biológicos de biodegradación	24
2.12 Aspectos de la biorremediación	25
2.13 Degradación del Cianuro.	28
CAPÍTULO 3	30
MATERIALES Y MÉTODOS	30
3.1 Materiales, equipo, medio de cultivo y reactivos.	30
3.1.1 Materiales	30

3.1.2 Equipos	30
3.1.3 Medio de cultivo.	31
3.1.4 Reactivos.....	31
3.2 MÉTODO.....	31
3.2.1 Metodología	31
• Diseño experimental.....	31
3.3 DESARROLLO METODOLÓGICO	32
• Área de estudio.....	32
• Ubicación.....	32
• Muestreo	32
• Procedimientos de la toma de muestra y transporte de la muestra.....	32
• Determinación inicial de cianuro	35
• Cultivo de Bacterias presente en los tratamientos.....	36
• Preparación de un consorcio bacteriano.	40
• Preparación de un consorcio bacteriano con diferentes concentraciones	40
3.4 Biodegradación del Cianuro en los tratamientos con aguas residuales mineras	41
3.4.1 Aplicación de tratamientos a las muestras	41
CAPÍTULO 4	43
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
4.1 Resultados de la investigación	43
4.2 Análisis y evaluación de resultados.	47
4.3 EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS.....	50
• A los 5 días de la experimentación.....	50
• A los 19 días de la experimentación.	52
• A los 27 días del experimento.....	54
4.4 DISCUSIÓN.....	56
CONCLUSIONES.	59
RECOMENDACIONES.....	60
BIBLIOGRAFÍA.....	61
ANEXOS.....	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 . Diagrama de flujo del proceso minero.	
Figura 2. Proceso minero del oro (en proceso Figura base)	8
Figura 3. . Característica de la estructura de bacterias Gram negativas y Gram positivas (López-Jácome et al., 2014).....	
Figura 4. Bacterias Gram negativas a la izquierda y, Gram positivas a la derecha (aumento 100x). Tomado de www.medigraphic.com/rid (López-Jácome et al., 2014).....	20
Figura 5. Bacillus subtilis. Instituto de ciencia Weizmann, Israel. 2006. Recuperado de: https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=4487608	22
Figura 6. Bacillus subtilis. Tinción de Gram, ampliación: 1.000. Recuperado de: https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=49528	22
Figura: 7 Parámetros de la Biorremediación (Haas et al., 1997).....	26
Figura 8 Proceso de biorremediación (Sánchez Martín & Rodríguez Gallego, 2003).....	27
Figura 9 Zona de Estudio Mina Barraco Colorado.....	32

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Minerales que contienen oro	9
Tabla 2. Valores de límites permisibles de Cianuro en agua en el Ecuador	15
Tabla 3 Criterios de Calidad de agua admisibles en el Ecuador	16
Tabla 4. Factores indicativos de contaminación	16
Tabla 5 Concentración de Cianuro inicial y criterio de cumplimiento.	35
Tabla 6 Concentración inicial de cianuro en las aguas residuales.	43
Tabla 7 Concentración de Cianuro a los 5 días de aplicar el tratamiento	44
Tabla 9 Concentración de cianuro a los 27 días de haber aplicado el tratamiento.	44
Tabla 10 Concentraciones de cianuro en los 27 días de tratamiento	45
Tabla 11 Control del pH en los 27 días de la experimentación.	46
Tabla 12 Resultados de Cianuro inicial y su porcentaje sobre la norma.	47
Tabla 13 Porcentaje y promedio de la degradación del Cianuro de acuerdo a los tratamientos aplicados.	48

ÍNDICE DE FOTOS

Foto 1 Tanques de lixiviación de la Mina Barranco Colorado.	33
Foto 2 Medición del pH de las aguas residuales de la minera.	34
Foto 3 Adición del Hidróxido de Sodio, en las canecas.	34
Foto 4 Medición de pH una vez colocado el NaOH.	35
Foto 5 Cajas Petri esterilizadas por 1 hora.	36
Foto 6 Preparación del Agar para ser utilizado en la siembra.	37
Foto 7 Siembra de Bacterias	37
Foto 8 Bacterias obtenidas del Agua residual Minera.	38
Foto 9 Resiembra de las Bacterias para la obtención del consorcio bacteriano.	38
Foto 10 Identificación de Bacterias mediante la Tinción de Gram, obteniendo bacterias en forma de bacilos. Obtenida del lente del microscopio y con cámara de celular.	39
Foto 11 Preparación de 3 concentraciones diferentes	40
Foto 12 Preparación de las unidades experimentales.	41
Foto 13 Permiso de la Mina para la recolección de las muestras en las canecas	68
Foto 14 Tanques de Lixiviación de la Mina Barranco Colorado.	69
Foto 15 Medición del pH en las canecas.	69
Foto 16 Adición de Hidróxido de Sodio a 1N en las canecas para que el pH sea superior a 9,5	70
Foto 17 Toma del pH una vez Colocado el Hidróxido de Sodio a 1N.	70
Foto 18 Implementos para las siembras.	71
Foto 19 Colocación de las cajas Petri y Erlenmeyer para ser esterilizadas.	71
Foto 20 Esterilización de las cajas y Erlenmeyer	72
Foto 21 Preparación del Agar Nutritivo	72
Foto 22 Siembra con la muestra de agua residual de la mina	73
Foto 23 Bacterias obtenido después de la siembra.	73
Foto 24 Pesando el Agar para la resiembra de las bacterias	74
Foto 25 Preparando el Agar con agua destilada.	74
Foto 26 Agitando el Agar para una mayor cocción	75
Foto 27 Esterilización de las 24 cajas Petri.	75
Foto 28 Resiembras en las cajas Petri.	76
Foto 29 Estufa bacteriológica	76
Foto 30 Limpieza del porta objetos y el cubre objetos	77
Foto 31 Porta objetos y cubre objetos a utilizar	77
Foto 32 Colocando un Poco de la muestra en el porta objetos.	78
Foto 33 Implementos para realizar la Tinción de Gram, azul violeta, Lugol y aceite de inmersión	78
Foto 34 Colocación del azul violeta	79
Foto 35 Después de haber colocado el azul violeta por un minuto 1, se enjuaga.	79

Foto 36 Colocación de Lugol.....	80
Foto 37 Después de colocado el lugol por un minuto se enjuaga.....	80
Foto 38 por último la aplicación del aceite de inmersión	81
Foto 39 Se procedió a analizar la muestra en el microscopio	81
Foto 40 Tomando cámara fotográfica del lente del microscopio.....	82
Foto 41 Con el aumento del lente, se pudo observar mejor que las bacterias eran Gram positivas y en formas de bacilos	82
Foto 42 Conteo de colonias	83
Foto 43 Después realizada la tinción de gran se procedió a escoger las colonias bacterianas a ser aplicadas en los tratamientos.	83
Foto 44 Preparando la solución Patrón.....	84
Foto 45 las tres concentraciones a utilizaren el experimento	84
Foto 46 Colocación de las muestras en las unidades experimentales.....	85
Foto 47 Preparadas las unidades experimentales	85
Foto 48 las unidades experimentales con el testigo	86
Foto 49 Medición de pH.....	86
Foto 50 Agitando la Muestra para el control de Ph.....	87
Foto 51 Colocación de NaOH 1 N en los días que bajo el pH.	87
Foto 52 Recogida de muestra para el análisis de laboratorio.....	88
Foto 53 muestras listas para el análisis	88

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Comportamiento de las concentraciones de Cianuro en los 27 días de tratamiento...	49
Gráfico 2 Control de pH en el 27 día de la experimentación.	50
Gráfico 3 Degradación del Cianuro a los 5 días del experimento.....	52
Gráfico 4 Degradación del Cianuro a los 19 días de la experimentación	54
Gráfico 5 Degradación del Cianuro a los 27 días de la experimentación	55
Gráfico 6 Concentración de CN. R: bacteria roja, BR: blanca rugosa, B: bacteria blanca, C: bacteria cremosa, A: bacteria amarilla y RS: bacteria rosada. Recuperado de Giraldo, E. (2015), p. 41	56

RESUMEN

La presente investigación trata sobre la biodegradación del cianuro, mediante técnicas microbiológicas, se obtiene un consorcio bacteriano del medio contaminado, para luego ser aplicados a las unidades experimentales.

En primera instancia se obtuvo las bacterias del agua residual del proceso de enriquecimiento del oro de los tanques de lixiviación de la mina Barranco Colorado del Recinto Shumiral del Cantón Ponce Enríquez, y, luego se realizó una resiembra de las mismas para la obtención del consorcio bacteriano, en tres concentraciones diferentes denominados tratamientos T1, T2 y T3, teniendo un testigo (muestra) sin ninguna aplicación. Cada uno de los tratamientos se los realizó por triplicado obteniendo 12 unidades experimentales.

Para la determinación del cianuro se realizaron exámenes de laboratorios a los cero, cinco, diecinueve y veintisiete días, y con el software InfoStat, se realizó el análisis de varianza y el Test: LSD Fisher, con el fin de determinar si existe variación en los tratamientos una vez aplicado las diferentes concentraciones bacterianas para la degradación del cianuro.

Los resultados obtenidos demostraron que el T1 con la mayor concentración de bacterias degradó más el cianuro a los 27 días de comenzada la experimentación.

Palabras claves: AGUA RESIDUAL, LIXIVIACIÓN MINERA, CONSORCIO BACTERIANO, DEGRADACIÓN DEL CIANURO.

ABSTRACT

The present investigation treats on the biodegradation of the cyanide, by means of microbiological techniques, with a consortium of bacteria obtained of the contaminated, same that were applied to the experimental.

In the first instance, bacteria were obtained from the wastewater from the gold enrichment process of the leaching tanks at the Barranco Colorado mine in the Shumiral area of the Ponce Enríquez town, and then a reseeded was carried out to obtain the bacterial consortium and with this, three different concentrations called treatments T1, T2 and T3 were obtained, having a control (sample) without any application. Each of the treatments was performed in triplicate obtaining 12 experimental units.

For the determination of cyanide laboratory tests were conducted at zero, five, nineteen and twenty-seven days, and with the InfoStat software, the analysis of variance and the Test: LSD Fisher was performed, in order to determine if there is variation in the treatments once applied the different bacterial concentrations for the degradation of cyanide.

The results obtained showed that the T1 with the highest concentration of bacteria is the one that degraded the most cyanide 27 days after the beginning of the experiment.

Keywords: WATER RESIDUAL, MINING LEACHING, BACTERIAL CONSORTIUM, DEGRADATION OF CYANIDE.

INTRODUCCIÓN

En el Ecuador existen varios tipos de minería, entre ella la minería metálica, que se basa en la extracción del Oro, utilizando el CN (cianuro); químico que permite la concentración de este metal, para luego, mediante métodos químicos y mecánicos ser extraído, no sin antes dejar una vasta contaminación, en razón de las grandes cantidades de agua, utilizadas en el proceso de esta actividad, generando impactos ambientales negativos afectando a los recursos hídricos de la zona.

En el presente trabajo experimental pretende determinar el efecto que tiene las concentraciones bacterianas en cuanto a la degradación del cianuro en las aguas residuales mineras.

El experimento se basó en obtener bacterias del mismo medio contaminado, para ello se realizó una primera siembra en agar nutritivo y luego se escogieron las colonias de mayor tamaño, para resembrarlas y obtener colonias más puras y por último elaborar un consorcio de bacterias para que sea aplicado en las aguas obtenidas del proceso de enriquecimiento del oro.

Una vez obtenido el consorcio bacteriano con las colonias más puras, se prepara la concentración inicial que se la denomina solución patrón, luego se realizan disoluciones sucesivas de 1/10 y 1/100 obteniendo así tres concentraciones diferentes, las mismas que fueron aplicadas a las muestras de agua residual, con tres repeticiones de cada tratamiento.

Las muestras de agua residual fueron obtenidas de los relaves provenientes de los tanques de lixiviación del proceso de enriquecimiento del oro de la mina Barranco Colorado del Recinto Shumiral del Cantón Ponce Enríquez.

El presente trabajo se divide en cuatro capítulos, donde se explica lo realizado en la investigación.

El primer capítulo hace relación al objetivo del trabajo, la justificación y la hipótesis del mismo.

El segundo capítulo se refiere al marco teórico en el que se desenvuelve la investigación esto en relación a la contaminación de las aguas residuales mineras con cianuro, los métodos de biodegradación, legislación aplicable, tablas de los límites permisibles del cianuro en cuanto a la *norma de calidad ambiental y de descarga de efluentes: recurso agua, del Libro VI, Anexo 1, del TULSMA*.

En el tercer capítulo se establecen los materiales y el método a ser utilizado en el proceso de biodegradación del cianuro, se muestra los datos obtenidos mediante tablas.

Por último, en el capítulo cuatro se muestran los resultados obtenidos en la experimentación y se realiza el análisis para ver las diferencias entre los tratamientos, para luego hacer una comparación con otros estudios realizados sobre el tema.

Una vez concluida la experimentación se determinó que a los 27 días el tratamiento 1 tuvo una mayor degradación del cianuro en las aguas residuales. No se logra llegar a los límites permisibles establecidos por la norma, pero se comprueba que hubo una reducción del contaminante.

CAPÍTULO 1

GENERALIDADES

OBJETIVOS

General

Determinar el efecto que un consorcio de bacterias obtenidas de aguas contaminadas con cianuro puede generar en la biodegradación del mismo.

Específicos

- Caracterizar el agua residual de la planta tratamiento Polecua.
- Elaborar un consorcio bacteriano en tres concentraciones diferentes.
- Evaluar el efecto de un consorcio de bacteria en tres concentraciones, sobre la degradación del cianuro de las aguas contaminadas.

JUSTIFICACIÓN

La presente investigación tiene como fin contribuir en dar solución a uno de los mayores problemas de la actividad minera extractora de oro; en especial la contaminación del agua con el cianuro que se utiliza para la concentración del metal precioso, agua en la que se diluye el contaminante y luego para al proceso de enriquecimiento del metal.

La aplicación de bacterias del mismo medio evita introducir organismos extraños que no pertenecen al ecosistema afectado.

HIPÓTESIS

Las concentraciones de un consorcio bacteriano influyen en la disminución del cianuro presente en las aguas residuales del proceso de extracción de oro

CAPÍTULO 2

MARCO TEÓRICO

2.1 ANTECEDENTES

La minería es una actividad económica extractiva no renovable, que aplica la ciencia y técnicas para encontrar y explotar yacimientos de minerales, con fines comerciales. El Ecuador es un país con potencial minero y el gobierno decidió apoyar esta actividad y buscar los caminos para atraer capitales para su desarrollo. La minería es parte del sector estratégico del país, puesto que este tiene reservas de muchos productos mineros, entre ellos oro, plata y cobre («BCE», s. f.). Sin embargo, toda actividad humana tiene un impacto ambiental y las alteraciones en el medio natural provocados por la minería pueden ser significativas. Hoy la sociedad mira esta actividad con preocupación. Por lo tanto, se han establecido normas estrictas en cuanto al impacto. Así, estas reservas mineras del país se deberán explotar bajo los principios de “sostenibilidad, precaución y eficiencia”, según el Ministerio de Minería del Ecuador. Algunas de estas reglamentaciones se refieren a los líquidos vertidos y aguas residuales. En el procesamiento de los minerales se usan diferentes técnicas, una de ellas es la denominada “hidrometalurgia”, mediante cianuración, usada para la recuperación de oro. El compuesto utilizado en la lixiviación es principalmente cianuro de sodio (NaCN), el cual es altamente tóxico (Oyarzun, Higuera, & Lillo, 2011), entonces el riesgo es muy alto con graves consecuencias para ríos, lagos y aguas subterráneas, como también, daño para la flora y fauna acuática y extremadamente peligroso para las personas en contacto. Una persona puede entrar en contacto con el cianuro a través de la respiración, por absorción a través de la piel, o por consumir alimentos que fueron contaminados con cianuro. El contacto con cianuro puede dañar órganos y conducir a la muerte de la persona, luego de un cuadro de síntomas que pueden ser mareos, vómitos, ritmo cardíaco anormal, convulsiones, hasta la pérdida de la conciencia, por tanto, es imperativo evitar que aguas contaminadas fluyan en el ambiente. El agua residual del procesamiento de extracción de oro mediante lixiviación con cianuro de sodio debe ser tratada, para eliminar completamente este compuesto altamente tóxico. Con este antecedente iniciamos el presente trabajo, que trata sobre la biodegradación del cianuro presente en aguas residuales mineras.

2.2 Procesos Minero

La minería es básicamente la aplicación de la ciencia y la tecnología con el fin de descubrir, extraer y aprovechar los minerales, que están en la superficie de la Tierra y, es netamente una actividad comercial.

Se debe considerar que la minería tiene unas características que hacen de ella una actividad económica muy singular. Es una industria localizada, es decir que debe implantarse en donde se encuentran los minerales a ser extraídos. Es además temporal, porque una vez agotados los minerales, la mina debe cerrarse. Finalmente, se debe considerar que la cantidad de desechos que produce es mucho mayor que la cantidad de minerales que finalmente se extrae (Oyarzun et al., 2011). Se debe tener especial cuidado con estos desechos, ya que conllevan un alto riesgo de contaminación del aire, tierra y agua y, en consecuencia, también para la salud humana y la estabilidad del medioambiente.

Para llevar a cabo la actividad minera se deben considerar algunos procesos, los cuales se describen brevemente en la figura 1:

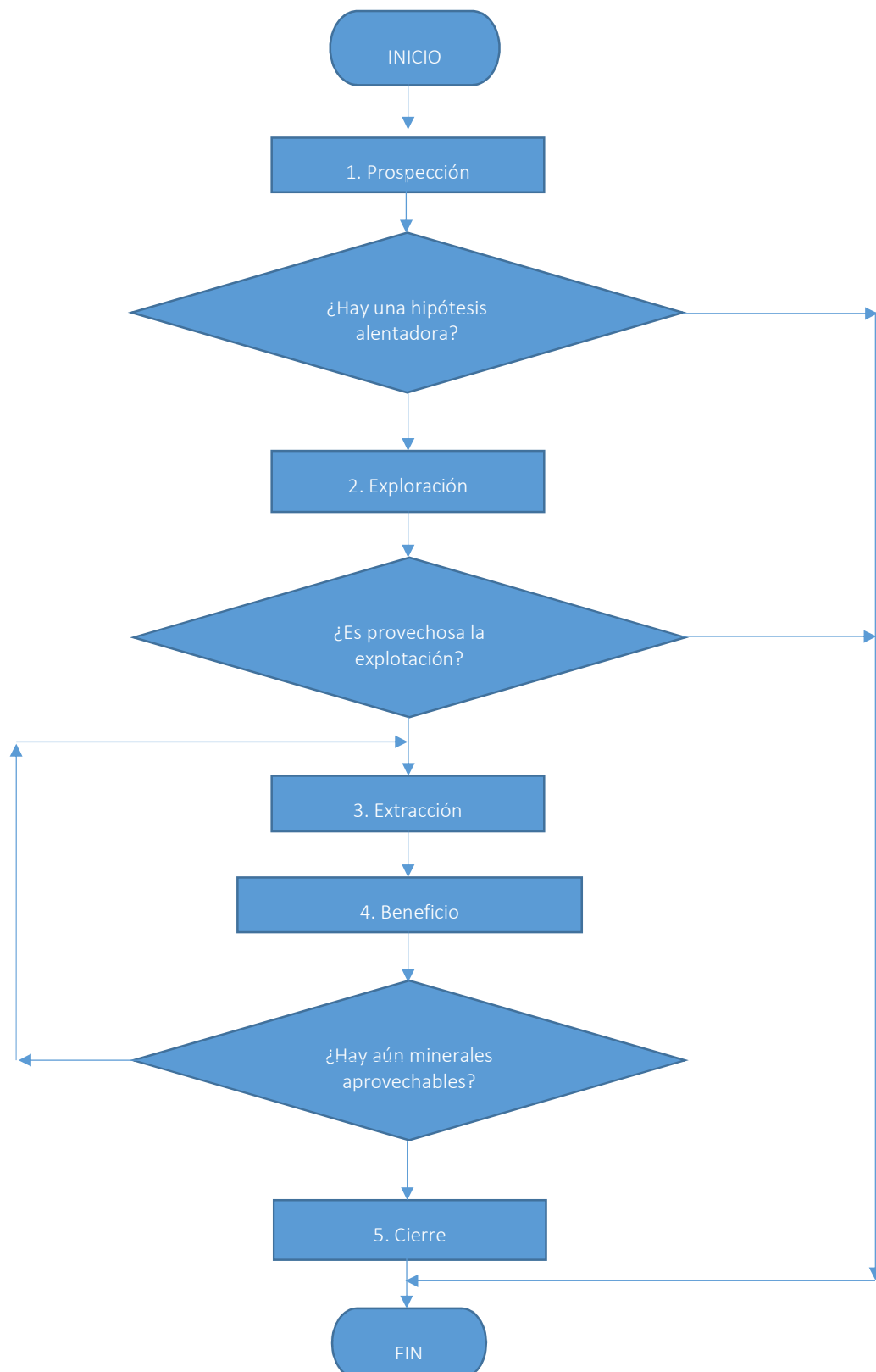


Figura 1 . Diagrama de flujo del proceso minero.

Elaboración por: Zambrano, 2018.

A continuación, se detalla cada uno de los procesos:

Prospección. - Primero se debe llevar a cabo la prospección, mediante la cual se establecen las particularidades de un yacimiento, es decir se buscan indicios de existencia de minerales aprovechables en un lugar determinado. En esta fase primero se establecen los tipos de producto o minerales que se buscan y, se lo hace en función de información geográfica diversa, fotografías, vistas de satélite, entre otros. Los antecedentes mineros brindan información muy valiosa. Los principales métodos por su uso son la prospección geológica, geoquímica y geofísica («BCE», s. f.).

Exploración. - En caso que la prospección nos dé resultados positivos, se procede a realizar la exploración, con la que se determina la extensión y forma del yacimiento, su contenido y la calidad de los minerales presentes. Es decir, se recoge información para hacer una evaluación de la factibilidad económica. En definitiva, la exploración asevera o niega la hipótesis obtenida como resultado de la prospección.

Extracción. - Seguidamente, en caso de confirmarse la hipótesis, se procede con la extracción, es decir, extraer el mineral de ese yacimiento. En esta fase se ejecutan operaciones de preparación del yacimiento, la extracción de los minerales y el transporte de éstos. Se debe prever la adecuación o construcción de vías, el emplazamiento de campamentos y la maquinaria. Se realiza la extracción propiamente dicha de los minerales, su trituración, su transporte y luego su concentración. También se establecen y se operan las escombreras.

Beneficio. - Después está el beneficio del mineral, lo cual corresponde a la transformación y uso del mineral. Se trata de incrementar el valor útil de los minerales extraídos a través de determinados procedimientos. Estos procedimientos incluyen la fundición, refinación y comercialización.

Cierre. - Finalmente se procede con el cierre de la mina, que se da cuando ya se han extraído todos los minerales aprovechables del yacimiento. (González Ramírez, s. f.). Desde el inicio de la actividad minera debe planearse el cierre del yacimiento, que consiste en preparar y llevar a cabo todas las actividades que conduzcan a la restauración de los espacios que han sufrido afectación por la extracción.

2.3 Minería del Oro

El oro es un metal noble y pesado, es blando y de color amarillo. Debe remarcarse, que entre los metales preciosos es el más común. Es muy interesante como se distribuye su uso en el mundo, ya que, de toda la producción mundial, la gran mayoría, aproximadamente un 75% se destina a la joyería, un 15% se utiliza en la industria,

siendo usado básicamente en la industria de la electrónica, y un restante 10% se reparte entre usos médicos, odontológicos y reservas económicas particulares y de países («BCE», s. f.).

La minería del oro, al ser este un metal, se basa lógicamente en el proceso de extracción de metales de los yacimientos. A más de ser una mercancía de mucho valor, esta actividad está directamente relacionada a los sucesos económicos, tanto de las naciones como del mundo entero (Millán, 2001). En el proceso de obtención de este mineral, el compuesto que más se usa es el cianuro sódico (NaCN), puesto que como ya fue mencionado, el oro está clasificado como metal pesado (Villas-Boas & Page, 2001). El cianuro sódico permite extraer el oro y otros minerales, que por sus condiciones no se pueden tratar por procesos físicos, como es la trituración y la separación por gravedad (Logsdon, Hagelstein, & Mudder, 2001). A esta operación de obtención de oro, la cual utiliza soluciones muy diluidas en cianuro, se denomina lixiviación. Para obtener el oro, se disuelve este compuesto en agua en condiciones tenuemente oxidantes (Logsdon et al., 2001). A continuación, se expone de manera resumida pero muy claramente un proceso específico de la minería del oro.

Proceso completo de la explotación del oro:

1. La exploración

Se trata de determinar áreas para extraer el oro, pero de manera rentable, para saber que minerales tiene una zona, se deben recolectar muestras del material pétreo, es decir, se analizan muchas muestras de las rocas que se encuentran en lo que sería la futura zona de explotación. Se procede a perforar (perforación), solo en el caso de que el resultado de la exploración sea positivo. Se procede a perforar a diferentes niveles de profundidad, de esta manera se obtiene información específica y valiosa sobre el mineral. Se debe prever el lugar y estructuras para depositar el material que no es adecuado para procesar, principalmente porque tiene muy bajo contenido de oro como para que sea rentable.

2. El minado

En esta fase se colocan explosivos en perforaciones que se hacen para este fin., el suelo queda fragmentado y está listo para el carguío. Este se debe transportar, generalmente en camiones muy grandes, al lugar donde se procesará para obtener el oro que contiene. Se lleva hacia las “pilas de lixiviación”, denominadas PAD. Las PAD deben ya estar acondicionadas con anticipación. Hoy en día, la maquinaria de carguío está identificada por un

sistema satelital que da información sobre su localización exacta, en todo momento, así el control de los trabajos es mucho más eficiente.

3. La lixiviación

Luego de que el material se ha descargado en las pilas de lixiviación, este se lava con un compuesto químico a base de cianuro. Entonces se obtiene una solución que es rica en oro, la cual se recolecta y conduce mediante tuberías a unos pozos diseñados para este fin. Mediante goteo se deja caer la solución sobre el PAD. Un valor típico para la solución es que por cada metro cúbico de agua se tengan 50 g de cianuro. Es decir, 50 ppm. Es importante mencionar, que el agua se vuelve a utilizar. Naturalmente, en un circuito cerrado se repone la proporción de cianuro.

Ahora, la solución que contiene oro, se somete a un proceso muy usado actualmente, este es el proceso "Merrill Crowe". La solución se limpia y se filtra, posteriormente se elimina el oxígeno de la solución y, luego se mezcla con zinc en polvo, de esta manera se precipita el metal y se hace sólido. El metal obtenido pasa a hornos de secado a 650 grados centígrados. Después este producto entra a un horno eléctrico a 1200 grados centígrados, donde se obtiene el producto final, denominado doré.

En la figura 2 se muestra el proceso minero del Oro.

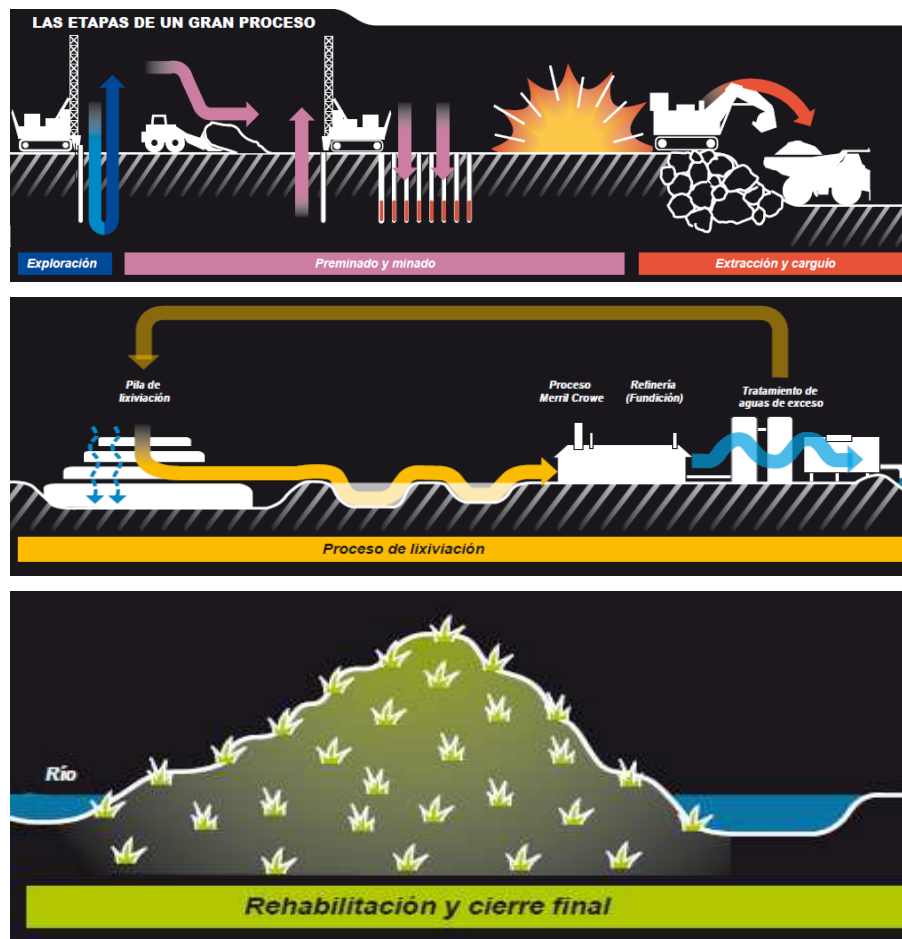


Figura 2. Proceso minero del oro (en proceso Figura base)

Fuente: Estudio de percepción minera Yanacocha. Recuperado de: http://www.yanacocha.com/wp-content/uploads/CSRM_EscuchandoaLaComunidad.pdf

En este proceso se utiliza gran cantidad de agua la misma que en exceso debe ser tratada antes de retornar al medioambiente. El tratamiento usual es el denominado de “Ósmosis Inversa”.

4. El restablecimiento y cierre

Las condiciones de la zona deben por lo menos ser iguales a las iniciales, antes de proceder con el cierre de la mina. Los puntos a considerar son el paisaje, la vegetación y los cauces de agua. Toda la zona donde se procedió a explotar el oro, debe ser rehabilitada.

Para que la vegetación pueda regenerarse, se cubre el PAD con una capa de tierra fértil y rica en nutrientes. Normalmente, antes de iniciar la explotación se retira la capa superficial, que es la tierra fértil, y se la almacena en lugar seguro, para al final devolverla a su lugar inicial.

En la figura 2 se puede apreciar un esquema que puede facilitar la comprensión del proceso minero del oro, a breves rasgos.

2.4 Minería de extracción del Oro con cianuro

Para el tratamiento del material que contiene oro, se han desarrollado muchos procedimientos. Las 4 técnicas principales son la amalgamación, la gravimetría, la flotación y la cianuración. En esta sección se mencionarán algunos aspectos de esta última técnica: la cianuración.

La cianuración, o bien la lixiviación por el cianuro, es la principal técnica para obtener el oro de los “minerales de oro”.

2.4.1 Algunas generalidades

Grandes cuerpos de oro, de más de 50 kg, se encuentran casi únicamente en las vetas de cuarzo. A más de los minerales mencionados en la tabla 1, también hay leves cantidades de oro en minerales que se asocian a sulfuros como son la pirrotina, la pirita, el mispiquel, etc. (SAC, s. f.).

Tabla 1 Minerales que contienen oro

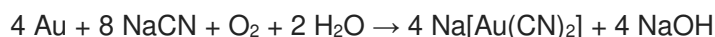
MINERAL	COMPOSICIÓN	CONTENIDO ORO	DUREZA	DENSIDAD
Oro Natural	Au	Mayor 75%	16-19	2.5-3
Electrum	(Au, Ag)	45%-75%	13-16	2-2.5
Calaverita	Au Te ₂	40%	9.2	2.5-3
Creannerita	AuTe ₂	31%-44%	8.6	2.5
Silvanita	AuAgTe ₄	34%-30%	8.2	1.5-2
Petzita	(Ag,Au) ₂ Te	19%-25%	9.1	2.5
Hessita	Ag ₂ Te	Menor 5%	8.4	2.5-3

Elaborado por: Zambrano, 2018.

El oro es soluble en soluciones de cianuro, por tanto, esta es la principal técnica utilizada en el tratamiento de los materiales extraídos con contenido de oro. La técnica también usa el oxígeno del aire para producir la oxidación.

2.4.2 La cianuración

Es una técnica desarrollada en el siglo 20, pero continuamente se está optimizando. Como ya se mencionó, es el procedimiento más empleado, y, en términos de la química su ecuación es la siguiente:



En este proceso se debe evitar la formación de HCN (ácido cianhídrico), por lo que, el medio de reacción es generalmente alcalino, lo cual se produce añadiendo cal, normalmente 1kg/t, de material. La solución de tratamiento tiene un pH que está entre 10 a 11.5. Si no se maneja adecuadamente la reacción y se vuelve ácida se forma ácido cianhídrico que produce un gas muy tóxico y, además, se pierden reactivos. Se usa cianuro de sodio en relaciones desde 200 ppm hasta 6000 ppm, quedando en la solución de tratamiento, después de la lixiviación del oro, concentraciones que varían desde 50 ppm hasta 500 ppm.

El "tiempo de ataque" varía de 16 a 40 horas, lo cual depende primeramente del mineral y de las medidas de las partículas de oro.

Preparación del concentrado:

Si el oro no está libre, es decir si el oro es del tipo refractario, se usa principalmente el método denominado "tostado" del concentrado, el tostado se hace con temperaturas desde 600°C hasta máximo y 750°C. También es útil para liberar arsénico o antimonio, y así volver más efectiva la cianuración. No se debe superar este máximo. Se denomina calcina al producto del tostado.

Cianuración en pila:

Se basa en amontonar el material extraído en pilas, es más económico que otros procesos de cianuración, además es más efectivo para yacimientos de menor porcentaje de contenido (1g/t). Este es un método muy simple. Primero se apila el material extraído del yacimiento, lo cual puede llegar a decenas o centenas de miles de toneladas. Después, mediante un sistema de goteo se riega todo este material con la solución con cianuro, de forma distribuida. La gravedad se encargará de que la solución atraviese la pila de material y llegue hasta una membrana impermeable, la cual puede ser de plástico, arcilla, asfalto o cualquier otro material que cumpla con este objetivo. Desde allí se colectarán las aguas y se envían a la planta de recuperación del oro. Esta planta usa generalmente zinc para producir el precipitado del metal. Las aguas luego de pasar por este proceso son nuevamente tratadas de la misma manera hasta que se evidencie que no hay más oro en las aguas, o es muy poco.

Debe aclararse que con la cianuración en pila no es posible dar un tratamiento de preparación al material que contiene oro, y que, los gránulos de oro deberán ser lo más pequeños posible, para que no demore mucho su disolución. Evidentemente, el oro debe tener contacto con la solución con cianuro y el material no debe contener elementos que perturben la acción de la solución, como sulfuros parcialmente oxidados de Sb, Zn, Cu y As. Tampoco debe contener elementos carbonatados, porque estos

absorben el oro. El material no debe ser tampoco muy fino, ni muy arcilloso, es decir, debe tener una muy buena característica de percolación. Si comparamos la obtención de oro entre cianuración en tina (en una cuba), y la cianuración en pila (amontonado), esta última obtiene el 75%, pero a un coste muy significativamente menor, lo cual lo hace una técnica mucho más atractiva.

2.5 Que son las Aguas residuales

Son aguas que contienen sustancias perjudiciales para el medio ambiente, que luego de procesos industriales, domésticos o agrícolas son desechadas sin recibir tratamiento alguno. Dentro de estas aguas también tenemos las que comúnmente se denominan aguas negras que contienen materia fecal y de aguas grises provenientes del uso doméstico en los procesos de cocina o limpieza (Barrantes et al., 2017).

Estas aguas están compuestas de elementos que alteran su condición inicial. Debido a la generación de nuevos productos químicos y su uso intensivo en actividades antrópicas, estas aguas están conduciendo a una mayor degradación de los recursos hídricos (Zacarías et al., 2017), teniendo como resultado la pérdida de sus propiedades, ya que estas aguas residuales (AR) al estar cargadas con una serie de contaminantes pueden afectar al ambiente y en particular a la salud pública (Barrantes et al., 2017).

La adición de materia orgánica, sales solubles, metales pesados y diversas sustancias con efectos tóxicos a la biota (Zacarías et al., 2017), al aguas se vuelve un peligro para el consumo.

En la norma de calidad ambiental y descargas de efluentes al Recurso Agua, considera a las aguas residuales como:

“Las aguas de composición variada provenientes de las descargas de usos municipales, industriales, comerciales, de servicios agrícolas, pecuarios, domésticos, incluyendo fraccionamientos y en general de cualquier otro uso, que hayan sufrido degradación en su calidad original”, («Reforma Anexo 28 feb 2014 FINAL.pdf», s. f.).

Tipos de aguas residuales:

Aguas residuales domésticas.

Son aguas que se producen luego del uso cotidiano de limpieza del hogar (F. C. Martínez, Silva, & Chávez, 2010), las mismas que contiene detergentes, jabones, aceites, ceras y más. Dentro de estas aguas se incluyen las heces y la orina.

Aguas residuales Industriales

Son aguas generadas luego de los procesos industriales, conteniendo una cantidad significativa de residuos orgánicos degradables, como grasas y proteínas, pero también una cantidad significativa de contaminantes inorgánicos y metales pesados (Ballén-Segura, Hernández Rodríguez, Parra Ospina, Vega Bolaños, & Pérez, 2016).

Aguas residuales agrícolas

Son aguas generadas en las actividades del sector agrícola luego de ser utilizadas en los cultivos.

2.6 Aguas Contaminadas con Cianuro y su Toxicidad

¿Qué es el cianuro?

El cianuro CN es un compuesto formado por un átomo de carbono y uno de nitrógeno mediante un enlace covalente triple formando el ion Cianuro, (Gaviria C. & Meza S., 2006). Es un compuesto utilizado, en la industria metalurgia para obtener oro por lixiviación química, en la industria del acero, en joyería, en laboratorios químicos y clínicos, en la industria de pegamentos y plásticos, en pinturas, como solvente y esmalte, como herbicida, plaguicida y fertilizante (Ramírez, 2010).

El CN es una especie química biológicamente activa y de nula o escasa presencia en aguas naturales, por lo cual no puede ser desechado directamente en cauces de agua o sistemas de alcantarillado, sin previo tratamiento (Martínez, Ferro, & de Pablos, 2016), ya que es altamente reactivo y tóxico .

¿Qué es la toxicidad?

Se determina por toxicidad generalmente la capacidad de una sustancia para tener un efecto adverso en un organismo y depende de las propiedades químicas del compuesto y su concentración (Ramírez, 2010), a la vez está determinada, por la duración y frecuencia de la exposición a la toxina y la relación de la sustancia con el ciclo de vida del organismo (Ziolo et al., 2016).

Química del Cianuro

El Cianuro puede clasificarse en:

Cianuro libre:

Es el término para describir al ion de cianuro (CN) en solución, (Gaviria C. & Meza S., 2006).

HCN Molécula:

El HCN molecular es una molécula neutra a la que se denomina ácido cianhídrico o cianuro de hidrógeno, es un líquido o gas incoloro, también es un ácido débil, altamente soluble en agua y volátil a partir de soluciones acuosas y sólo el CN^- tiene capacidad de formar complejos con distintos iones metálicos (Fernández Pérez, 2007).

Compuestos Simples de Cianuro:

Se trata de compuestos iónicos que se disocian directamente en el agua liberando un catión del metal y un ion cianuro (Fernández Pérez, 2007). Los cianuros simples se definen como las sales obtenidas en reacciones ácido – base como el ácido cianhídrico y cianuro de sodio (Gaviria C. & Meza S., 2006), luego de un proceso de oxidación, estos también pueden formar tiocianato por efecto de la reacción entre compuestos reducidos de azufre y cianuro (Fernández Pérez, 2007).

Compuestos Complejos de Cianuro:

Son compuestos que se disocian en el agua liberando un catión y un anión que contiene ion cianuro, el anión denominado complejo, puede seguir disociándose produciendo en última instancia un catión y varios iones cianuro, por ejemplo, el Cu $(\text{CN})_3^-$ - o triciano cuprito, (Fernández Pérez, 2007).

Cianuro Total:

Se denomina así a todos los compuestos de cianuro existentes en una solución acuosa, el cianuro total incluye el cianuro libre, los cianuros simples y todos los cianuros complejos (Gaviria C. & Meza S., 2006).

Cianato

El cianato (CNO^-) es un producto generado durante el procesamiento de minerales, debido a la reacción entre el ión cianuro libre y el ión metálico (Fernández Pérez, 2007). La oxidación del cianuro se puede realizar con oxidantes tales como el cloro, ozono, oxígeno y peróxido de hidrogeno para convertirlo a cianato a una temperatura ambiente (Gaviria C. & Meza S., 2006), este compuesto reaccionan lentamente con el agua para formar amoniaco y carbonato.

Tiocianato

La presencia de tiocianato, SCN^- en efluentes resulta de la reacción del cianuro con iones sulfuros desprendidos de los sulfuros metálicos durante la lixiviación (Gaviria C. & Meza S., 2006).

Toxicología del cianuro

Los seres humanos a diario tienen contacto directo con el cianuro o sus derivados a través de los alimentos que consume y productos que utiliza (Guerrero, 2005). Ya que se encuentra en forma natural como componente orgánico en algunas plantas o semillas de frutas -glucósidos cianogénicos y también es producido por ciertas bacterias, hongos y algas (Ramírez, 2010).

Se menciona que una de las causas principales de muerte por cianuro es la ingesta de plantas cianogénicas, cuyos elevados niveles de cianuro provocan una parálisis permanente de las extremidades (Guerrero, 2005).

El CN es un compuesto muy reactivo y tóxico siendo un peligro para la población, en algunos casos ha sido utilizado por su acción rápida y letal con fines homicidas o suicidas (Ramírez, 2010).

La toxicidad de este compuesto preocupa por las formas complejas que tiene y la posibilidad de romperse y generar cianuro libre en el nuevo sistema (C Gaviria & S, 2006).

El cianuro es un potente inhibidor del crecimiento y el metabolismo celular incluyendo la respiración, el metabolismo del nitrógeno y fósforo (Cardona Giraldo, 2015)

La forma más tóxica del cianuro es el gas HCN en concentraciones de 20 a 40 ppm se puede observar problemas respiratorios después de varias horas de exposición. (Cazar Almeida, 2015).

Como lo menciona (Cardona Giraldo, 2015) *En el estudio de Microorganismos Potenciales degradadores de Cianuro en residuos de minería de oro, el Cianuro ejerce sus efectos tóxicos a través de mecanismos que implican la formación de:*

- a) *Complejos con metales di ó tri-valentes en el sitio activo de metalo-enzimas tales como la citocromo-oxidasa.*
- b) *Los intermedios de base de Schiff que conducen a derivados de nitrilo estables durante la catálisis de la enzima.*
- c) *Cianhidrinas con grupos ceto metabólicos*

La industria minera y el cianuro

En la minería se utiliza el CN para los procesos de extracción del oro del yacimiento, ya que es el compuesto lixivante más utilizado por su gran afinidad con el oro y la plata (Restrepo, Montoya, & Muñoz, 2006), denominándose a este proceso cianuración que actualmente sustituye al método de amalgado con mercurio y es potencialmente

contaminante pues carece la asimilación natural en el ecosistema, esta es una característica del CN (Cazar Almeida, 2015).

La actividad minera tiene una vida útil limitada, una vez agotado el mineral comienza el cierre de esta actividad y es donde comienza una serie de problemas ambientales con los que se convivirá para siempre ya que los desperdicios perdurarán en las rocas, el agua y el aire (Espinoza, 2004), por lo que sus niveles de contaminación de las aguas es una preocupación permanente de las poblaciones cercanas a los asentamientos mineros (Olazo-Quispe & La Rosa-Toro Gómez, 2014).

Las tablas 2, 3 y 4 muestran los valores máximos permisibles de CN, Criterios Calidad y factores indicativos de contaminación del agua en el Ecuador según: *La norma de calidad ambiental y de descarga de efluentes: recurso agua, del Libro VI, Anexo 1, del TULSMA*.

Tabla 2. Valores de límites permisibles de Cianuro en agua en el Ecuador

Valores de límites permisibles de Cianuro en agua en el Ecuador			
Condiciones	Parámetro	Expresado como	Límite Máximo Permisible
Consumo Humano y Domestico, requieren tratamiento Convencional	Cianuro(Total)	CN^-	0,1 mg/l
Consumo Humano y Domestico que requieren desinfección.	Cianuro(Total)	CN^-	0,01 mg/l
Límites de descarga al sistema de alcantarillado público	Cianuro(Total)	CN^-	1,0 mg/l
Límites de descarga a un cuerpo de agua dulce	Cianuro(Total)	CN^-	0,1 mg/l
Límites de descarga a un cuerpo de agua marina	Cianuro(Total)	CN^-	0,2 mg/l

Elaborado por: Zambrano, 2018.

Tabla 3 Criterios de Calidad de agua admisibles en el Ecuador

Valores de límites permisibles de Cianuro en agua en el Ecuador				
Criterios de Calidad admisibles para la preservación de la flora y fauna en aguas dulces, frías o cálidas, y en aguas marinas y de estuario.				
Parámetro	Expresado como	Aguas frías dulce	Aguas cálidas dulce	Aguas marina y estuario
Cianuro(libre)	CN	0,01 mg/l	0,01 mg/l	0,01 mg/l
Criterios referenciales de calidad para aguas subterráneas, considerando un suelo con contenido de arcilla entre (0-25,0) % y de materia orgánica entre (0 - 10,0) %.				
		Límite Máximo Permisible		
Cianuro(Total)	CN	753 µg/l		
Criterios de calidad admisibles para aguas de uso agrícola				
Cianuro(total)	CN	0,2 mg/l		
Criterios de calidad para aguas de uso pecuario				
Cianuro(total)	CN	0,2 mg/l		

Elaborado por: Zambrano, 2018.

Tabla 4. Factores indicativos de contaminación

Factores indicativos de contaminación		
Factor de contaminación (Concentración presente/ valor de fondo)	Grado de perturbación.	Denominación
< 1,5	0	Cero o perturbación insignificante
1,5 – 3,0	1	Perturbación evidente.
3,0 – 10,0	2	Perturbación severa.
> 10,0	3	Perturbación muy severa.

Elaborado por: Zambrano, 2018.

2.7 Tratamiento de Aguas Contaminadas

La generación de aguas residuales con altos contenidos de químicos perjudiciales para los recursos hídricos se vuelve una problemática a tratar hoy en día, ya que la necesidad de preservar el medio ambiente conlleva a estudiar tratamientos de contaminantes (Garcés Giraldo, Mejía Franco, & Santamaría Arango, 2004).

La contaminación del agua es un hecho de gran importancia ya que los contaminantes pueden acumularse y transportarse tanto por las aguas superficiales como subterráneas para las cuales la fuente principal de daño son las aguas residuales municipales e industriales (Garcés Giraldo et al., 2004), generando así aguas residuales altamente contaminadas llamadas lixiviado (Cardona et al., 2017).

Los tratamientos de aguas residuales incorporan tratamientos físicos, químicos y biológicos, cumpliendo con la remoción del contaminante del agua.

Los tratamientos de contaminantes en el agua pueden clasificarse en:

a) Tratamiento primario

Son tratamientos para eliminar de las aguas residuales los sólidos en suspensión. Entre estos se encuentran los métodos de tratamientos como:

- Rejas
- Homogenización
- Coagulación – Flocculación
- Sedimentación
- Flotación
- Aireación
- Filtración
- Membranas
- Precipitación
- Adsorción
- Cambio Iónico
- Oxidación – Desinsectación

b) Tratamientos secundarios

Estos tratamientos cumplen la función de eliminar materia orgánica soluble y sedimento presente en el agua residual que no puede eliminarse en el tratamiento

primario. Los métodos utilizados en estos tratamientos son los químicos y los biológicos de los cuales se presenta a continuación.

Químicos

- Neutralización
- Precipitación química
- Coagulación
- Oxidación química
- Intercambio iónico
- Desinfección

Biológicos

- Fagos activados
- Lagunas aireadas
- sistemas de lagunaje
- Biodiscos
- Filtros verdes
- Digestión anaerobia
- Eliminación biológica

c) Tratamientos terciarios

Son tratamientos utilizados para eliminar sustancias tóxicas o compuestos no biodegradables, también pueden ayudar a eliminar contaminantes que no fueron removidos en su totalidad en los tratamientos secundarios. Los métodos utilizados son los siguientes:

- Adsorción por carbón
- Ozonización terciaria
- Tratamientos con ozono y radiación ultravioleta.

2.7.1 Tratamiento de aguas contaminadas con Cianuro

Las formas para tratar aguas contaminadas con cianuro se pueden dar mediante destrucción, recuperación y adsorción, siendo estas, técnicas utilizadas para este tipo de compuesto.

El cianuro es un compuesto que está formado por carbono y nitrógeno, para la desintegración de este compuesto se utiliza la técnica de destrucción utilizando

reacciones de oxidación y reacciones biológicas, logrando que se pueda destruir por completo el compuesto o llegar a transformarlo en sustancias menos tóxicas.

La técnica de recuperación del CN, consiste en recuperar ese compuesto para luego ser utilizada en los procesos de lixiviación del Oro. El objetivo de esta técnica es transformar el cianuro soluble en sales sódicas o potásicas para emplearlo nuevamente en la lixiviación (Gaviria López, s. f.). En estos procesos las normas de seguridad deben ser estrictas ya que se deben emplear ácidos y bases fuertes (Gaviria López, s. f.).

En la adsorción se utilizan materiales adsorbentes para cambiar la fase de cianuro soluble, pero esta técnica se requieren etapas de tratamiento adicionales si se desea eliminar el cianuro completamente (Gaviria López, s. f.).

2.8 Identificación de Bacterias

Las bacterias, según sea su género y especie reaccionan de forma diferente a reactivos diferentes. Se deberá conocer su morfología individual y colonial, cómo reacciona su metabolismo a las diferentes pruebas, cuáles son sus características en el proceso de oxidación y fermentación. Entonces, si un tipo específico de bacteria, aislado en un cultivo puro, responde según lo que la ciencia ya ha determinado experimentalmente, se podrá identificar el género y especie de las bacterias analizadas. Las pruebas que se hacen a un cultivo de bacterias pueden ser pruebas primarias, pruebas secundarias y pruebas complementarias. Aquellas que son importantes en el presente trabajo de investigación son las pruebas primarias. Los siguientes puntos las definen.

Tinción de Gram

Es imprescindible conocer muy bien la tinción de Gram (López-Jácome et al., 2014) (López-Jácome et al., 2014). Recuérdese que una tinción es una coloración, para tener más contraste en el análisis bajo microscopio. Así, se usan colorantes, los cuales dan color a las células, etc. La tinción básica para evaluar muestras de cultivos de bacteria es la denominada Tinción de Gram. Se la conoce como “diferencial” porque usa dos diferentes colorantes, clasifica a las bacterias en dos grupos, las Gram positivas y las Gram negativas. Fue el científico Hans Christian Gram, de origen danés, quien en 1884 lo desarrolló. Esta tinción nos indicará la morfología individual y colonial, así como su taxonomía. Es una prueba sencilla y económica, pero sobre todo eficaz, por eso es la más utilizada. La figura 3 muestra algunas diferencias estructurales que tienen las bacterias clasificadas como Gram negativas y Gram positivas.

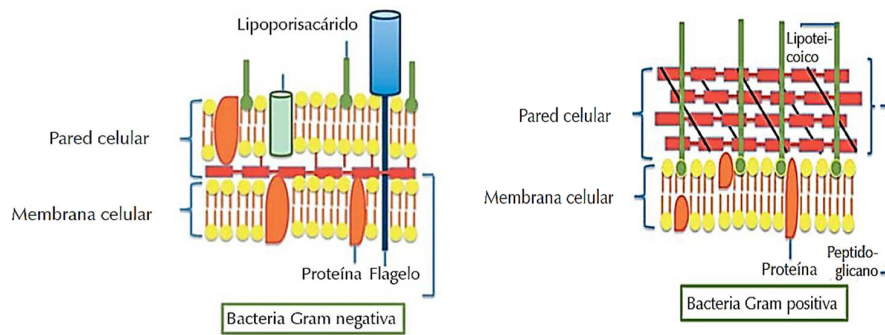


Figura 3. . Característica de la estructura de bacterias Gram negativas y Gram positivas (López-Jácome et al., 2014).

Según la pared celular, las bacterias adquieren propiedades definidas, así, si las bacterias poseen una membrana celular externa y su pared celular posee una capa fina de peptidoglicano, están clasificadas como Gram negativas. En cambio, las Gram positivas tienen una capa gruesa de peptidoglicano y no tienen membrana celular externa. El tinte de las paredes bacterianas está relacionado con la cantidad de peptidoglicano contenida en ellas. Se coloca un colorante primario cristal violeta, que tiene afinidad con el peptidoglicano. Luego se adiciona lugol, para impedir la salida del cristal violeta. Así, se forma un complejo cristal-violeta-yodo. Posteriormente, para cerrar los poros de la pared se adiciona alcohol-acetona. Mientras más peptidoglicano posea la pared, más retiene el complejo formado. Es decir, las bacterias Gram positivas retienen más fuertemente el mencionado complejo. Finalmente, con safranina se tiñen las bacterias que no han podido retener el complejo mencionado anteriormente (cristal-violeta-yodo). Como resultado, las Gram positivas se tiñen de color entre azulado a morado (complejo cristal-violeta-yodo), mientras que las Gram negativas se tiñen de color entre rosa a rojo (safranina). Ver la figura 4.

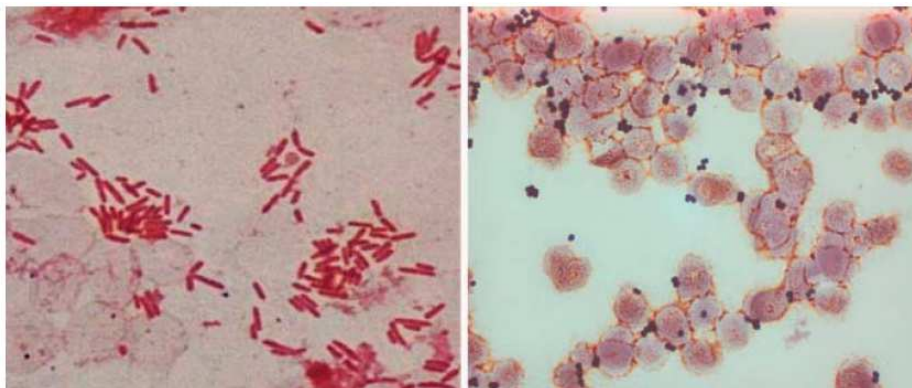


Figura 4. Bacterias Gram negativas a la izquierda y, Gram positivas a la derecha (aumento 100x). Tomado de www.medigraphic.com/rid (López-Jácome et al., 2014).

2.9 Bacterias degradadoras de Cianuro

Con el fin de reducir al mínimo los efectos adversos que origina el cianuro, se han desarrollado, diversas estrategias y se ha evaluado la eficacia de cada uno de ellos. Se emplean mucho los procesos físicos donde tiene lugar el tratamiento químico y la recuperación del cianuro (Cardona Giraldo, s. f.). A más de los procesos químicos, los rayos ultra violeta también pueden degradar el cianuro (es un proceso físico). Los métodos químicos son más rápidos, pero también más caros. Sin embargo, el método más idóneo para conservar el ambiente es el tratamiento biológico y también es el más económico.

Cuando se trata de degradar cianuro, los tratamientos biológicos son alternativas altamente factibles, ya que cubren un rango muy amplio de microorganismos. Se puede alcanzar una descontaminación total de cianuro mediante la metabolización bacteriana en las aguas residuales de las minas de oro, y además, de manera muy económica (Thompson, Jones, & Atiyah, 1994). Las bacterias son reconocidas como las principales responsables de la degradación del cianuro (Akcil, Karahan, Ciftci, & Sagdic, 2003). Al exhibir las bacterias un metabolismo de amplio espectro, estas son capaces inclusive de degradar enlaces químicos, como del cianuro y es por esto, que ha tenido éxito el tratamiento de las aguas residuales en la industria.

Las bacterias necesitan nitrógeno y carbono para su metabolismo, elementos que lo toman de los compuestos de cianuro. Así es como se logra la degradación del cianuro. Sin embargo, cabe señalar que cuando el nivel de contaminación es muy alto, las bacterias pierden la capacidad de metabolizar el compuesto cianurado. Es decir, a altas concentraciones de cianuro, las bacterias ya no pueden usarlo para su propio metabolismo (Patil & Paknikar, 1999). En definitiva, compuestos como KCN y el NaCN, entre otros compuestos cianurados, se transformarán en compuestos menos tóxicos o nada tóxicos por la presencia de las bacterias. Se pueden transformar en CO_2 , NO_2 , NH_3 y NH_4 . Los géneros de bacterias más reconocidas en la degradación del cianuro son *Bacillus subtilis*, *E-coli*, *Citrobacter*, *Pseudomonas fluorescens*, las cuales usan el cianuro como su fuente de nitrógeno y carbono. Hay otras bacterias que degradan el cianuro de otras maneras, asimilando el cianuro o produciendo compuestos menos perjudiciales (fumarato, amoniaco, etc.), este es el caso de bacterias como *Ferrobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans* y *Acidithiobacillus thiooxidans*, por citar solo algunos ejemplos. En definitiva, los géneros de bacterias principales en la degradación de cianuro son *Bacillus*, *Aeromonas*, *Exiguobacterium*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y *Escherichia*. Estos géneros muestran un muy alto nivel de degradación, de hasta el 96 por ciento según Ingvorsen et al. (1991).

En las figuras 5 y 6 se muestran bacterias de géneros bacillus que degradan el cianuro.

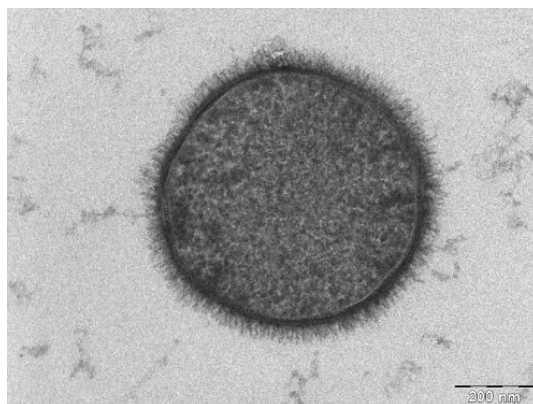


Figura 5. *Bacillus subtilis*. Instituto de ciencia Weizmann, Israel. 2006. Recuperado de: <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=4487608>

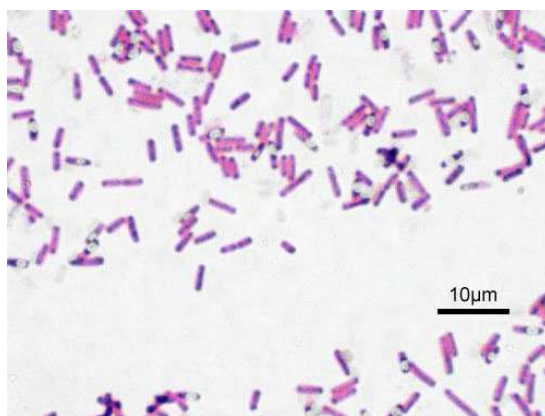


Figura 6. *Bacillus subtilis*. Tinción de Gram, ampliación: 1.000. Recuperado de: <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=49528>

También hay bacterias que producen enzimas, las cuales se encargan de la degradación del cianuro. Un ejemplo es *Chromobacterium violaceum*. Por otra parte, se encuentran además algunos hongos que pueden degradar el cianuro. Como ejemplo se menciona a *Gloeocercospora sorghi*. Por último, también se reportan desintoxicaciones de aguas mediante algas, tal es el caso de la *Arthrospira* máxima, por citar un ejemplo (Gurbuz, Ciftci, Akcil, & Karahan, 2004).

2.10 Creación de un consorcio de bacterias degradadoras

Primero aclaremos lo que es un consorcio bacteriano. Se refiere a la agrupación natural de dos o más especies de bacterias, las cuales interactúan en beneficio mutuo de su desarrollo. Pueden pertenecer al mismo género o a distintos. Lo importante es

que llevan una coexistencia benéfica para todas las bacterias contenidas. Las bacterias están presentes en infinidad de lugares, y a menudo son varias especies la que cohabitan un medio cualquiera. Las bacterias normalmente usan compuestos para su desarrollo y metabolismo y, de esta manera, degradan compuestos que pueden ser contaminantes. Por eso, se pueden usar consorcios de bacterias para remediar ambientes contaminados. Esto se conoce como biorremediación.

Los consorcios presentan ventajas sobre poblaciones de una sola bacteria, porque cada especie puede tener una función dentro de la comunidad bacteriana. Así, los consorcios tienen lo que se conoce como una mayor “robustez”. Esto se refiere, por ejemplo, a que la comunidad bacteriana es capaz de soportar períodos más largos sin nutrientes, o que puede hacer frente a la invasión de otras especies. Así, la combinación natural de bacterias es una fortaleza para toda la comunidad bacteriana. A más de la robustez, el consorcio de bacterias puede realizar labores mucho más complejas, que serían difíciles y aún imposibles para las bacterias por separado. Cada grupo de bacterias se “encarga” solo de una tarea específica, la cual es necesaria para la supervivencia o para lograr un producto más complejo. De esta manera, el consorcio de bacterias se puede construir de infinidad de maneras, juntando las características deseadas para realizar una labor particular deseada. Esta es una técnica de biorremediación que puede ser muy eficiente a la hora de degradar compuestos tóxicos en ambientes contaminados, por ejemplo, con cianuro. A continuación, se esboza a muy breves rasgos lo que sería el desarrollo de un consorcio de bacterias, por ejemplo, para degradar cianuro de manera más efectiva.

Se toma muestras de aguas residuales contaminadas con cianuro, provenientes de la lixiviación en minas de oro. A continuación, se identifican y aíslan las bacterias contenidas en las muestras, que para un caso práctico podrían ser de un mismo género y de diferentes especies, es decir, un consorcio de bacterias. Luego se alimenta a las bacterias con desecho de cianuro, con un plan previamente diseñado con cantidades específicas de cianuro y en períodos también controlados. Este cianuro de desecho es la única fuente de carbono y nitrógeno para el consorcio de bacterias aisladas. Se añaden además micronutrientes y progresivamente se incrementa la concentración de cianuro, siempre en rangos previamente establecidos con base en argumentos técnicos. Existen condiciones *in vitro* que deben cumplirse rigurosamente. Por ejemplo, los rangos de temperatura, los micronutrientes y sus cantidades, el grado de pH, aireación y niveles de oxígeno. Debe transcurrir el tiempo (alrededor de 70 días), bajo las condiciones fijadas. Luego se seleccionan y separan los consorcios bacterianos, generalmente por centrifugación, y se ponen a incubar unas 48 horas a temperatura ambiente y otras

condiciones de laboratorio específicas totalmente establecidas. Se añaden los micronutrientes, se incrementa la concentración de cianuro y se mantienen todas las demás condiciones *in vitro*. Se vuelven a inocular cada vez los consorcios bacterianos obtenidos por centrifugación. Este proceso se repite, por ejemplo, hasta la tercera generación. Las nuevas cepas obtenidas, cada vez están mejor adaptadas al medio contaminado con cada vez mayores concentraciones de cianuro. Estas cepas de la tercera generación, se las puede liofilizar y utilizar en el campo posteriormente, inclusive años después. La eficiencia en degradación de cianuro debería ser muy superior, en teoría da valores del 95 al 98% de eficiencia (A. D. Martínez, 2012).

2.11 Métodos biológicos de biodegradación

Conceptos básicos de la biorremediación

Según el método empleado se pueden concretar tres conceptos básicos para llevar a cabo una biorremediación (Sánchez Martín & Rodríguez Gallego, 2003):

- Atenuación natural. También se le denomina biorremediación intrínseca. La degradación del compuesto contaminante se lleva a cabo por microorganismos propios del sistema. Son los llamados microorganismos autóctonos. En la mayoría de los casos se trata de bacterias propias del medio perturbado.
- Bioestimulación. Se trata de modificar el medio contaminado aportando nutrientes, oxígeno, y aplicando procesos para estimular la degradación del compuesto contaminante.
- Bioaugmentación. En este caso se introducen microorganismos aclimatados, llegando inclusive a modificarlos genéticamente, para obtener propiedades de degradación superiores, y así optimizar la degradación.

Métodos biológicos

A continuación, se menciona los métodos biológicos.

1. La microremediación. La descontaminación se hace mediante el uso de hongos.
2. La fitorremediación. Se utilizan plantas para el tratamiento del problema de contaminación. No hay impacto por maquinaria y transporte de compuestos peligrosos.
3. La bioventilación. El agua contaminada es tratada con adición de microorganismos para descomponer las sustancias tóxicas. Se trata de estimular a las bacterias autóctonas mediante oxígeno y nutrientes.
4. Los biorreactores. En esencia es un compostador, pero de escala industrial. En un recipiente se mantiene un ambiente biológico activo.

5. El compostaje. Usa estiércol para convertir residuos orgánicos en fertilizante.
6. La bioaumentación, trata de insertar microorganismos modificados. Así se pretende estimular la degradación del compuesto contaminante. Los microorganismos se suelen obtener en el mismo medio contaminado.
7. La bioestimulación. Aquí se hacen cambios al entorno. Con esto se consigue optimizar el metabolismo de las bacterias autóctonas, favoreciendo así la degradación del compuesto contaminante.

Bioaumentación

Este método consiste en elevar la población bacteriana y de esta forma mejorar las condiciones de degradación, mediante la introducción de microorganismos aclimatados o modificados genéticamente en laboratorios o bioreactor. Ya que con la adición de microorganismos vivos y la capacidad de degradar el contaminante promueve la biodegradación o la biotransformación (Quiroga & Alejandra, 2016). En este punto se tiene en cuenta que el *“tamaño del inóculo a utilizar depende de la zona contaminada, de la dispersión de los contaminantes y de la velocidad de crecimiento de los microorganismos degradadores”* según (Rodríguez Lovera & Ruíz Guamán, 2016).

2.12 Aspectos de la biorremediación

La biorremediación es una interesante tecnología, la cual usa el propio metabolismo de las bacterias o microorganismos en general para disminuir la contaminación de suelos, agua y aire. Fundamentalmente, se aprovecha la acción metabólica de las bacterias, sin embargo, se pueden usar también hongos y levaduras. Los microorganismos transforman los contaminantes orgánicos en otros compuestos menos contaminantes o simplemente que ya no son contaminantes. El campo de aplicación es sumamente amplio, abarcando los tres estados de la materia. En cuanto al estado sólido, se puede tratar el suelo contaminado. En cuanto al estado líquido se pueden tratar las aguas de la superficie en ríos, lagos y mares, y las aguas subterráneas. En lo gaseoso, se pueden tratar las emisiones industriales principalmente. También se pueden clasificar los contaminantes con los cuales se puede usar esta tecnología. Por ejemplo, con hidrocarburos de todo tipo, con compuestos nitro-aromáticos, metales pesados, y otros compuestos organofosforados, cianuros, fenoles, entre otros.

En las figuras 7 y 8 se muestra un diagrama explicativo de los procesos y parámetros que debe cumplir un tratamiento de biorremediación.

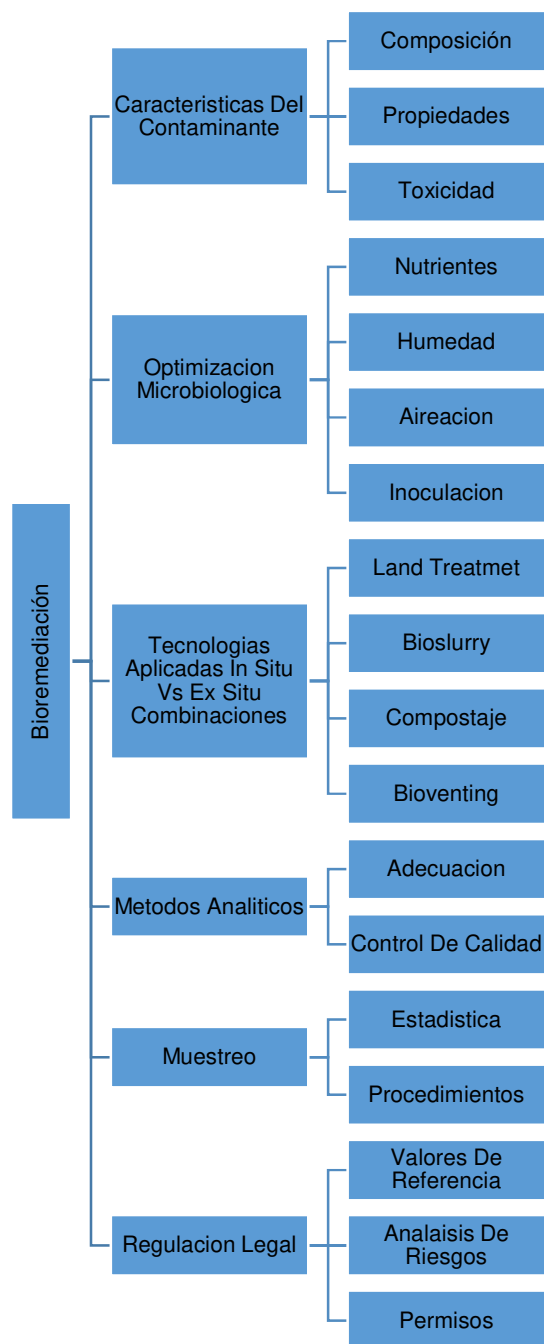


Figura: 7 Parámetros de la Biorremediación (Haas et al., 1997)

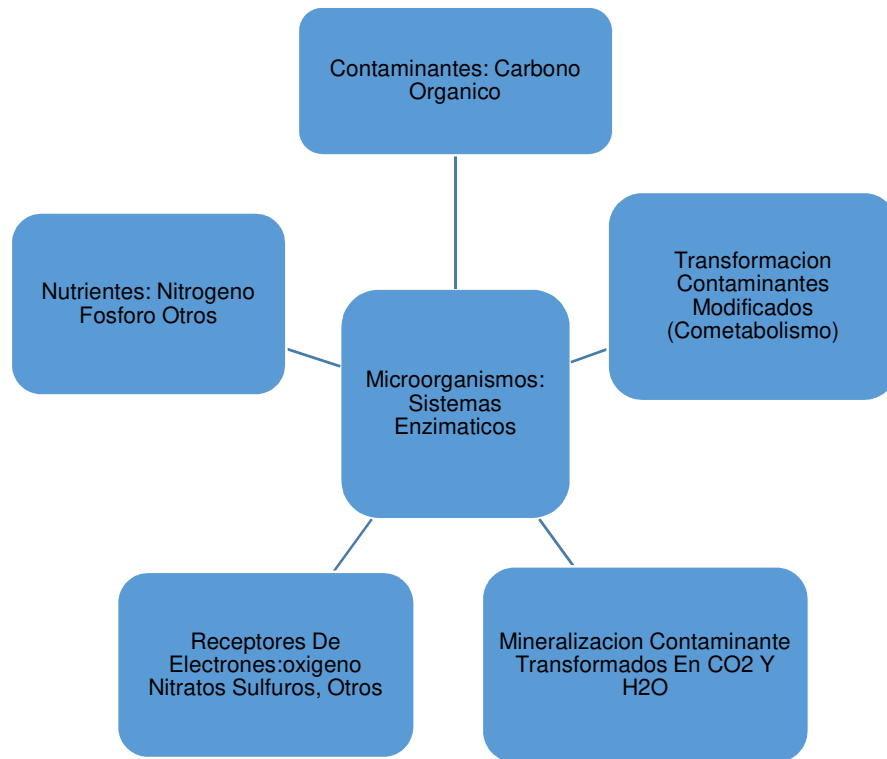


Figura 8 Proceso de biorremediación (Sánchez Martín & Rodríguez Gallego, 2003).

Ventajas de la biorremediación

- La principal ventaja de la biorremediación es, que no se transfiere la contaminación de un medio a otro, o esta transferencia es reducida, comparada con otras tecnologías de remediación.
- También se debe mencionar que es poco intrusiva, es decir no afecta al medio como otros métodos.
- Es económica relativamente.
- Al ser un proceso natural, tiene mayor aceptación pública.

Inconvenientes y limitaciones.

- En caso de darse una biodegradación incompleta se pueden generar contaminantes más agresivos que el inicial.
- No todos los compuestos favorecen la biorremediación, algunos inclusive la inhiben.
- No es fácil calcular el tiempo de remediación.
- Esta técnica tendrá mayor o menor efectividad dependiendo de múltiples factores. Algunos de ellos son:
 - La biodegradabilidad del contaminante.

- La presencia de comunidades microbianas idóneas. Aquí se pueden tener microorganismos propios del sistema (biorremediación intrínseca o atenuación), o pueden ser añadidos (bioaumentación).
- Entorno del ambiente contaminado.

2.13 Degradación del Cianuro.

La degradación del cianuro se puede dar por factores físicos, por medio de los rayos ultravioleta, también por tratamientos químicos y biológicos siendo este último el más sano para el ambiente según (Kuyucak & Akcil, 2013).

Los tratamiento químico para eliminar cianuro es generalmente más costosa, pero permite una desintoxicación rápida, mientras que la utilización de métodos biológicos mediante tratamiento de cianuro con microorganismos para relaves y aguas residuales es una alternativa comprobada y viable a los procesos químicos (Gurbuz, Ciftci, & Akcil, 2009). Ya que mediante microorganismos se llega a degradar el cianuro en las aguas residuales de minas, a la vez que el tratamiento in situ, la desintoxicación completa y productos no tóxicos naturales tiene una ventaja sobre los métodos químicos convencionales debido a su bajo costo, (Thompson et al., 1994).

El tratamiento bacteriano de cianuro ha sido muy investigado durante las últimas décadas por diversos autores (Atkinson, s. f.), (Knowles & Bunch, 1986), (Young, Twidwell, & Anderson, 2001), (Kuyucak & Akcil, 2013); (Novak et al., 2013); (Kebeish, Aboelmy, El-Naggar, El-Ayouty, & Peterhansel, 2015) según (Cardona Giraldo, s. f.) En su estudio de “Microorganismos potenciales degradadores de Cianuro en residuos de minería de oro”,

Métodos biológicos.

Se ha llegado a determinar que los métodos biológicos son efectivos en cuando a la degradación del cianuro en aguas residuales mineras, y en el estudio de “Microorganismos potenciales degradadores de Cianuro en residuos de minería de oro” de (Cardona Giraldo, s. f.), menciona que estas metodologías se han empleado con éxito en el tratamiento de diferentes residuos líquidos industriales, como lo menciona(Kuyucak & Akcil, 2013)), debido a que las bacterias son las principales responsables de la degradación biológica según (Akci et al., 2003), estas exhiben una amplia gama de funciones metabólicas y son capaces de degradar estructuras químicas como el cianuro (Botz, 2001), por la capacidad de ciertos grupos de microorganismos (en su mayoría bacterias) para utilizar compuestos cianurados como fuente de carbono y nitrógeno según (Oudjehani, Zagury, & Deschênes, 2002)este tipo de estrategia biológica se puede aplicar in situ, en medios aeróbicos y anaeróbicos, crecimientos en

suspensión de forma activa y pasiva. Las especies microbianas pueden crecer en múltiples entornos que permitan la captación, el tratamiento, la adsorción y precipitación de cianuro, sus compuestos y metales, tomado de (Cardona Giraldo, s. f.).

Existen microorganismos conocidos como hongos del género *Fusarium*, *Hasenula*, y las bacterias de los géneros *E.coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Citrobacter*, *Bacillus subtilis*, estos están involucrados en la degradación de efluentes mineros y que poseen sistemas enzimáticos específicos que les permite su adaptación en ambientes con altas concentraciones de cianuro, estos microorganismos asimilan este compuesto usándolos como fuente de nitrógeno y /o carbono. (Akcil et al., 2003).

Se tiene en cuenta que la toxicidad del cianuro en altas concentraciones puede limitar la capacidad de los microorganismos para utilizarlo como sustrato para su crecimiento como lo menciona (Patol & Paknikar, 1999). Compuestos de cianuro (NaCN, KCN, entre otros), se transforman a otras formas químicas (NH₃, NH₄, NO₂, CO₂), por la acción microorganismos en el suelo, (Kuyucak & Akcil, 2013).

Existen microorganismos como *Ferrobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans* y *Acidithiobacillus thiooxidans* que tienen la capacidad de asimilar el mineral y eliminar el cianuro a transformarlo amoníaco, fumaratos y otros compuestos menos peligroso para el ambiente. (Asmah et al., 1999); *las Pseudomonas aeruginosa también lo elimina con niveles adecuados de aireación entre 100 y 120 rpm (Castric, Farnden, & Conn, 1972).. Pseudomonas paucimobilis emplea moderadamente fuertes complejos metálicos de cianuro como el [K, Ni (CN)] para transformar este químico en sustancias menos contaminantes según (Barclay, Hart, Knowles, Meeussen, & Tett, 1998).*

Se han identificados microorganismos con alto potencial de degradación del contaminante hasta de un 96% de remoción (Watanabe, Yano, Ikebukuro, & Karube, 1998), tales como: *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, y *Alcaligenes* (Ingvorsen, Højer-Pedersen, & Godtfredsen, 1991).

Dentro de los microorganismos que eliminar o degrada el cianuro, existen generos de enzimas de conversión de este compuesto como: *Chromobacterium*, (S. D. Ebbs et al., 2008) *violaceum Klebsiella oxytoca* (S. Ebbs, 2004), *Burkholderia cepacia* (Adjei & Ohta, 2000). *Otras especies identificadas previamente y que se destacan por su capacidad para degradar cianuro son Ifrobacter freundii, Bacillus subtilis, Cifrobacfer freundii y Enterobacter. Existen reportes de cepas de Cifrobacfer fiemdii y Enferobacfer aerogenes, las cuales juegan un papel muy importante en la desintoxicación del cianuro de efluentes de minería (Porter & Knowles, 1979).*

CAPÍTULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales, equipo, medio de cultivo y reactivos.

3.1.1 Materiales

Materiales utilizados para la toma de muestras fueron:

- 5 canecas de 20 galones c/u.
- pH-metro.
- Termómetro.
- Hidróxido de Sodio (NaOH), 1N.
- 1 galón de agua destilada.
- Botella Ámbar esterilizada y rotulada.
- Guantes.
- Mascarilla.
- Cámara.
- Libreta y esfero.

Materiales utilizados en la experimentación en laboratorio fueron:

- Cajas Petri en un número de 24 unidades para la siembra de bacterias.
- 3 Erlenmeyer de 500 ml y 10 de 1000 ml.
- Una pipeta de 6 ml.
- Tres mecheros de bunsen
- Una probeta de 50ml.
- Una espátula.
- Un agitador.
- Una Asa metálica de 0,5 ml.
- 3 tubos de ensayos con un contenido de 10 ml.
- Un vaso de precipitación de 250ml.
- Cuatro cubre objetos y portaobjetos.
- Una malla de asbesto.

3.1.2 Equipos

Los equipos utilizados fueron:

- Una Balanza electrónica de precisión.

- Una Cocineta.
- Un Autoclave.
- Una incubadora bacteriológica.
- Un contador de Colonias.
- Un medidor de pH.
- Un computador para el almacenamiento de información.

3.1.3 Medio de cultivo.

- Agar nutritivo.

3.1.4 Reactivos.

Los reactivos utilizados fueron:

- Agua destilada.
- Tinción de Gram.
- Hidróxido de Sodio (NaOH), 1N.

3.2 MÉTODO

3.2.1 Metodología

La metodología utilizada es una adaptación de la metodología utilizada por (Cardona Giraldo, 2015), en su estudio “Microorganismos potenciales degradadores de Cianuro en residuos de minería de oro”, en el cual reproduce las bacterias utilizando como medio al Agar Nutritivo, y prepara varias concentraciones de bacterias a ser aplicadas en el medio contaminado, metodología que también es aplicada por (Day & Döbereiner, 1976).

- **Diseño experimental**

La metodología aplicada es un diseño experimental de bloques al azar de cuatro por tres, que consiste en 4 tratamientos con tres repeticiones cada uno. El primer tratamiento es considerado como testigo y no recibió la inoculación de bacterias. Estos tratamientos se los realizo en las muestras de las aguas residuales del proceso de obtención del oro por cianuración de la Mina Barraco Colorado, durante un tiempo aproximado de 1 mes, obteniendo datos de la concentración del Cianuro presente en cada una de las unidades experimentales, mediante exámenes de laboratorio certificado a los 5, 19 y 27 días. En este modelo experimental se trabajaron con 12 unidades experimentales, los factores estudiados fueron:

- Tres concentraciones de un consorcio de colonias Bacterianas.
- Tres repeticiones.
- Un testigo con tres repeticiones

3.3 DESARROLLO METODOLÓGICO

- **Área de estudio**

Planta de procesamiento POLECUA, en los tanques de Lixiviados del proceso de enriquecimiento del oro de la Mina Barranco Colorado, del cantón Camilo Ponce Enríquez.

- **Ubicación**

El estudio se realizó en la mina Barranco Colorado, ubicado en el Recinto Shumiral, Cantón Camilo Ponce Enríquez de la provincia del Azuay. Sus coordenadas latitud 9668445.00, longitud 645444.00, altura 43 m.s.n.m. Como se muestra en la figura 9.



Figura 9 Zona de Estudio Mina Barranco Colorado.

Elaborado por: Zambrano, 2018.

- **Muestreo**

Las muestras fueron tomadas del proceso de enriquecimiento del Oro luego de pasar por los tanques de lixiviación de la planta POLECUA de la Mina Barranco Colorado, en 5 canecas de 20 litros cada una y llevadas al laboratorio de química de la carrera de Ingeniería Ambiental de la Universidad Católica de Cuenca.

- **Procedimientos de la toma de muestra y transporte de la muestra**

1. Se recogió las muestras de los tanques de Lixiviados, de la planta de tratamiento Polecua de la Mina Barranco Colorado.

2. Luego se colocó con un embudo y cerca del tanque de lixiviado, estas aguas en las canecas de 20 litros en una cantidad de 5 canecas.
3. Se midió el pH y T° a cada una las muestras en las canecas.
4. Se estabilizó el pH colocando en cada una de las canecas 150 ml de NaOH 1N.
5. Después que se realizó el proceso de estabilización del pH, se midió nuevamente pH para confirmar que este sobre 9,5.
6. En cada uno de los procedimientos de la medición de pH y T°, se lavó los instrumentos con agua destilada.
7. Luego de estos procesos las canecas fueron tapadas y transportadas al laboratorio de química de la carrera de Ingeniería Ambiental.

En la foto 1 se muestra los tanques de Lixiviación de la planta POLECUA de la Mina Barranco Colorado.



Foto 1 Tanques de lixiviación de la Mina Barranco Colorado.

Fuente: Zambrano, 2018.}

En la foto 2 se muestra la medición del pH y temperatura, una vez captada el agua de los tanques de lixiviación de la Mina.

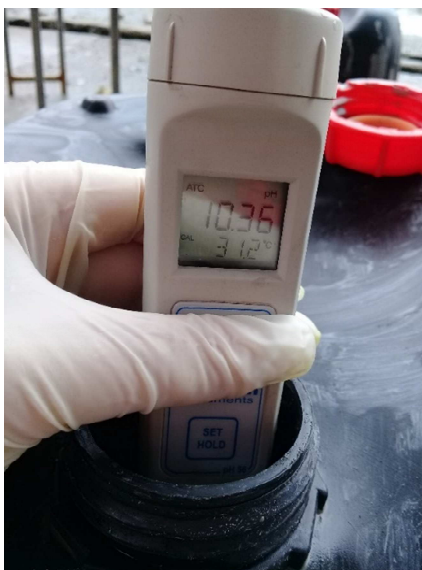


Foto 2 Medición del pH de las aguas residuales de la minera.

Fuente: Zambrano, 2018.

En la Foto 3, se adiciona 7,5 ml de NaOH ,1 N por cada litro de agua obtenida del proceso de enriquecimiento de oro, como medida para garantizar un pH superior a 9.5 y evitar la evaporación del cianuro.



Foto 3 Adición del Hidróxido de Sodio, en las canecas.

Fuente: Zambrano, 2018.

En la foto 4 se muestra la medición del pH luego de la adición del Hidróxido de Sodio (NaOH), 1N.



Foto 4 Medición de pH una vez colocado el NaOH.
Fuente: Zambrano, 2018.

Caracterización de agua

La caracterización del agua, se realizó en base al objetivo de la investigación por lo que se determina la concentración del cianuro y el pH inicial de la muestra como medida de control ya que las muestra para el posterior tratamiento deben tener un pH mayor a 9,5 y evitar su evaporación.

- **Determinación inicial de cianuro**

Para el inicio de la investigación se determinó la concentración inicial de cianuro de las aguas del proceso del enriquecimiento del oro, mediante examen de laboratorio y se compara los datos con los valores establecidos con la Norma de Calidad Ambiental y de Descarga de Efluentes: Recurso Agua, del Libro VI, Anexo 1, del TULSMA, datos que se muestran en la tabla 5.

Tabla 5 Concentración de Cianuro inicial y criterio de cumplimiento.

MUESTRA	CONCENTRACIÓN mg/L	FECHA	LIBRO VI ANEXO 1. Límites de descarga a un cuerpo de agua dulce	Criterio de Cumplimiento SI/NO
TRATAMIENTO 1	394	18/01/2018	0,1 mg/L	NO
TRATAMIENTO 2	394	18/01/2018	0,1 mg/L	NO
TRATAMIENTO 3	394	18/01/2018	0,1 mg/L	NO
TESTIGO	394	18/01/2018	0,1 mg/L	NO

Elaborado por: Zambrano, 2018.

En la tabla 5 se muestra las concentraciones de cianuro en mg/L, en los tratamientos y el testigo, luego se compara con los criterios de la Norma de Calidad Ambiental y de Descarga de Efluentes: Recurso Agua, determinándose que no se cumple con lo establecido en la Norma.

- **Cultivo de Bacterias presente en los tratamientos.**

Para la obtención de los microorganismos se realizó una siembra en 15 cajas Petri sembradas en medio Agar nutritivo, con un tiempo de incubación de 48 horas y con una temperatura de 37 °C.

Se comenzó preparando el medio de cultivo esterilizando un erlenmeyer de 500 ml durante una hora a 121° C, luego se disolvió 11,5 gr de Agar Nutritivo (AN) en 500 ml de agua destilada agitando por 15 min y calentando en la cocineta con el objetivo que se disuelva y cocine bien el Agar, posteriormente el agar preparado fue colocado en 15 cajas Petri en 3 ml por caja, que luego fueron sembradas con muestras de agua proveniente de los tanques de lixiviado del proceso de enriquecimiento del oro. En la foto 5 se observa las cajas Petri, en proceso de esterilización por una hora a 121°C.



Foto 5 Cajas Petri esterilizadas por 1 hora.

Fuente: Zambrano, 2018.

En la foto 6 se observa la preparación de la solución de agar que se utilizó, para la siembra de bacterias.



Foto 6 Preparación del Agar para ser utilizado en la siembra.
Fuente: Zambrano, 2018.

En la foto 7 se observa a la investigadora realizando la siembra de bacterias en las cajas Petri.



Foto 7 Siembra de Bacterias
Fuente: Zambrano, 2018.

La foto 8 se observa las bacterias obtenidas de la siembra en las cajas Petri.



Foto 8 Bacterias obtenidas del Agua residual Minera.
Fuente: Zambrano, 2018.

Luego de haber obteniendo las colonias de bacterias del medio contaminado, se realizó una resiembra de estas bacterias en 24 cajas Petri para obtener un mayor volumen de estas. Posteriormente las bacterias fueron identificadas mediante la tinción de Gram y por microscopia.



Foto 9 Resiembra de las Bacterias para la obtención del consorcio bacteriano.
Fuente: Zambrano, 2018.

Una vez realizada la resiembra y en un tiempo de 48 horas en la incubadora a 37 °C, la identificación microbiana se realizó mediante la tinción de Gram, teniendo presente los siguientes procedimientos:

1. En un portaobjetos previamente esterilizado con metanol a 1 min de en la flama, se colocó un poco de la muestra.
2. Luego se procedió a colocar una gota de Azul violeta por un minuto y se enjuago con agua.
3. Después se colocó una gota de Lugol, se esperó por un minuto y se enjuago con agua.
4. Se agregó alcohol y se esperó 30 segundos y se enjuago nuevamente con agua.
5. Para terminar los procesos se vertió una gota de aceite de inmersión y se observó al microscopio.

En la foto 10 se muestra que en la prueba Gram las bacterias dieron positivo, ya que de acuerdo a la teoría se menciona que las Gram positivas se tiñen de color entre azulado a morado (complejo cristal-violeta-yodo), mientras que las Gram negativas se tiñen de color entre rosa a rojo (safranina). Luego se observó en el microscopio donde se observó que dichas bacterias tenían formas de bacilos (bastones).

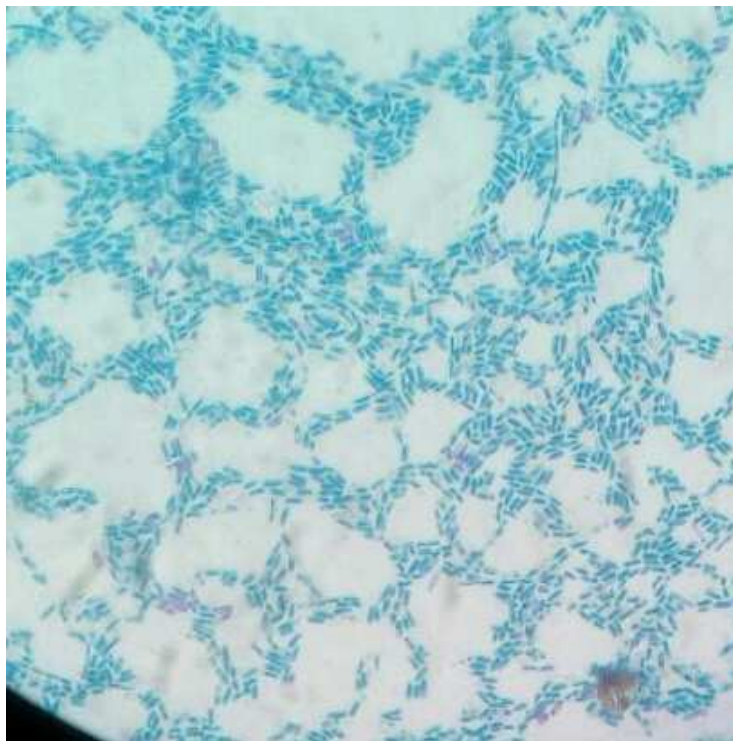


Foto 10 Identificación de Bacterias mediante la Tinción de Gram, obteniendo bacterias en forma de bacilos. Obtenida del lente del microscopio y con cámara de celular.
Fuente: Zambrano, 2018.

- **Preparación de un consorcio bacteriano.**

El consorcio bacteriano se preparó mediante la obtención de 7,100, 000 UFC/ml, de 24 cajas Petri, que fueron sembradas con una aza de 0,5 ml, se escogieron las colonias de mayor tamaño.

Luego se preparó en un Erlenmeyer una solución de 1000 ml de agua destilada, con 0,5 gramos de Agar nutritivo (para garantizar su permanencia vital), en donde se colocó las mismas. A esta primera concentración se la denominó solución patrón.

- **Preparación de un consorcio bacteriano con diferentes concentraciones**

Mediante disoluciones se prepara las diferentes concentraciones, partiendo de la solución patrón, se aplicó la técnica de disoluciones decimales seriados.

Para el segundo tratamiento, se toma 100 ml de la solución patrón y se diluyó en 1000 ml con agua destilada con 0,5 de agar nutritivo se lo agito por 10 min y se obtuvo el segundo tratamiento con una concentración de 1/10, es decir este tratamiento quedó con una cantidad de bacterias de 710,000 UFC/ml.

Para el tercer tratamiento, se tomó del segundo tratamiento 100 ml, que se colocó en 1000 ml de agua destilada con 0,5 de agar nutritivo, dando como resultado la concentración de 1/100, con una cantidad de bacterias de 71,000 UFC/ml.

En la foto 11 se muestran las preparaciones de las concentraciones bacterianas utilizadas en el experimento.



Foto 11 Preparación de 3 concentraciones diferentes
Fuente: Zambrano, 2018.

Se realizó tres repeticiones de cada una de las concentraciones ya preparadas que se muestran en la foto 11 y un testigo que nos sirvió para verificación, como se muestra en la foto 12.



Foto 12 Preparación de las unidades experimentales.

Fuente: Zambrano, 2018.

3.4 Biodegradación del Cianuro en los tratamientos con aguas residuales mineras

Para la degradación del Cianuro se utilizó la técnica de biodegradación mediante microorganismos autóctonos, es decir que fueron obtenidos del mismo medio contaminado, mediante la aplicación de un consorcio de bacterias obtenidas en tres concentraciones diferentes y manteniendo un tratamiento como testigo (sin aplicación del consorcio bacteriano). El medio contaminado fueron las aguas residuales provenientes del proceso de enriquecimiento del oro de la planta Polecua de la Mina Barranco Colorado. La biodegradación del cianuro se realizó mediante el siguiente procedimiento.

3.4.1 Aplicación de tratamientos a las muestras

Para dar inicio con la investigación se determinó la concentración inicial de cianuro presente en las muestras de agua residual, sin aplicación de los consorcios bacterianos, tomando estos datos como punto de partida de la concentración de cianuro, datos que se muestran en la tabla 6.

Luego de la aplicación de los tratamientos las muestras fueron aireadas, con el fin de proporcionar una cantidad de oxígeno para el mantenimiento vital de las bacterias y

también se mantuvieron destapadas con el ánimo de que las bacterias puedan absorber el oxígeno del ambiente. Se midió el pH y T° de las unidades experimentales, para controlar las muestras y verificar que el pH no se encuentre bajo 9,5 y se provoque la evaporación del cianuro.

Luego, de transcurrido los primeros 5 días del tratamiento, se determinó la concentración de cianuro presente en las unidades experimentales tanto del testigo como de los que se les aplicó los consorcios bacterianos en tres diferentes concentraciones, datos que se muestran en la tabla 7.

A los 19 días de aplicado el tratamiento se determinó nuevamente la concentración de cianuro presente en cada una de las muestras, datos que constan en la tabla 8.

Por último, a los 27 días de aplicados los tratamientos se determinó la concentración final de cianuro presente en las aguas. Ver tabla 9.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Resultados de la investigación

El agua residual se caracterizó de acuerdo a los objetivos de la investigación que fue la concentración de cianuro inicial y el pH que nos dio como resultado 10,36, misma que sirvió para el manejo posterior de la muestra ya que estas deben estar por encima de un pH de 9,5 para evitar la evaporación.

Los resultados de la experimentación representan las concentraciones de cianuro desde el inicio de la investigación presente en cada una de las unidades experimentales.

En la tabla 6 se muestran los resultados de la concentración de cianuro al inicio de la experimentación, tomando estos como punto de inicio de la experimentación, además de estar expresados según el tipo de tratamiento y repetición respectiva.

Tabla 6 Concentración inicial de cianuro en las aguas residuales.

DÍA 0		
FECHA	MUESTRA	CONCENTRACIÓN mg/L
18/01/2018	TRATAMIENTO 1	394
18/01/2018	TRATAMIENTO 2	394
18/01/2018	TRATAMIENTO 3	394
18/01/2018	TESTIGO	394

Elaborado por: Zambrano, 2018.

Una vez que se determinó la concentración inicial del cianuro presente en el agua residual de la planta de tratamiento Polecua, se procedió a realizar las preparaciones de los consorcios bacterianos, que se utilizó en la experimentación teniendo como resultados:

- Solución Patrón Tratamiento 1, con 7, 100,000 UFC/ml.
- Concentración 1/10, Tratamiento 2, con 710,000 UFC/ml.
- Concentración 1/100, Tratamiento 3, con 71,000. UFC/ml.

Para evaluar el efecto de los consorcios bacterianos, se realizaron exámenes de laboratorios a los 5, 19 y 27 días de investigación para determinar la concentración de cianuro y su posterior degradación.

A continuación se muestran las tablas de la concentración del cianuro:

En la tabla 7 se muestran las concentraciones de cianuro a los 5 días de tratamiento.

Tabla 7 Concentración de Cianuro a los 5 días de aplicar el tratamiento

5 DÍAS		
FECHA	MUESTRA	CONCENTRACIÓN mg/L
23/01/2018	T1.1	139
23/01/2018	T1.2	188
23/01/2018	T1.3	161
23/01/2018	T2.1	176
23/01/2018	T2.2	151
23/01/2018	T2.3	182
23/01/2018	T3.1	191
23/01/2018	T3.2	208
23/01/2018	T3.3	155
23/01/2018	TESTIGO 1	174
23/01/2018	TESTIGO 2	206
23/01/2018	TESTIGO 3	209

Elaborado por: Zambrano, 2018.

En la tabla 9 se muestran las concentraciones finales a las cuales llegaron cada uno de los tratamientos, lo que correspondería a la concentración final de cianuro a los 27 días de tratamiento.

Tabla 8 Concentración de cianuro a los 27 días de haber aplicado el tratamiento.

27 DÍAS		
FECHA	MUESTRA	CONCENTRACIÓN mg/L
20/02/2018	T1.1	143
20/02/2018	T1.2	155
20/02/2018	T1.3	121
20/02/2018	T2.1	199
20/02/2018	T2.2	160
20/02/2018	T2.3	160,5
20/02/2018	T3.1	185
20/02/2018	T3.2	166
20/02/2018	T3.3	168
20/02/2018	TESTIGO 1	207
20/02/2018	TESTIGO 2	209
20/02/2018	TESTIGO 3	206

Elaborado por: Zambrano, 2018.

En la tabla 10 se muestra un compendio de los datos obtenidos por tipo de tratamiento realizado, por repetición de cada uno de ellos y con la referencia de días de experimentación transcurridos.

Tabla 9 Concentraciones de cianuro en los 27 días de tratamiento

DÍAS		T1	T2	T3	TESTIGO
0	↑	394	↑ 394	↑ 394	↑ 394
0	↑	394	↑ 394	↑ 394	↑ 394
0	↑	394	↑ 394	↑ 394	↑ 394
5	↓	139	↓ 176	↓ 191	↓ 174
5	↓	188	↓ 151	↓ 208	↓ 206
5	↓	161	↓ 182	↓ 155	↓ 209
19	↓	192	↓ 158,5	↓ 210	↓ 205
19	↓	190	↓ 184	↓ 184	↓ 197
19	↓	173	↓ 169	↓ 208	↓ 203
27	↓	143	↓ 199	↓ 185	↓ 207
27	↓	155	↓ 160	↓ 166	↓ 209
27	↓	121	↓ 160,5	↓ 168	↓ 206

Elaborado por: Zambrano, 2018.

Como mecanismo de control de la investigación y de cada una de las unidades experimentales, en la tabla 11 se muestra los datos del pH en los días de la experimentación.

Tabla 10 Control del pH en los 27 días de la experimentación.

FECHAS	T1.1	T1.2	T1.3	T2.1	T2.2	T2.3	T3.1	T3.2	T3.3	TESTIGO 1	TESTIGO 2	TESTIGO 3
22/01/2018	11,23	11,35	11,24	11,19	11,56	11,44	11,32	11,23	11,18	11,54	11,45	11,32
23/01/2018	10,63	10,67	10,68	10,57	10,61	10,59	10,59	10,58	10,78	10,67	10,58	10,65
24/01/2018	10,32	10,34	10,4	10,37	10,38	10,32	10,43	10,44	10,44	10,53	10,39	10,41
25/01/2018	11,94	11,05	11,03	11,09	11,12	11,55	11,18	11,24	11,22	11,04	11,04	11,23
26/01/2018	10,67	10,76	10,74	10,75	10,76	10,62	10,74	10,64	10,75	10,56	11,49	10,57
29/01/2018	11,01	11,21	11,01	11,35	11,11	11,15	11,21	11,23	11,14	11,25	11,17	11,12
30/01/2018	10,87	10,91	10,81	11,01	10,94	10,93	10,89	10,96	10,86	10,99	10,92	10,87
31/01/2018	10,56	10,63	10,63	10,62	10,62	10,6	10,63	10,72	10,61	10,63	10,64	10,61
01/02/2018	10,44	10,41	10,44	10,46	10,47	10,44	10,41	10,55	10,42	10,51	10,5	10,49
02/02/2018	10,35	10,38	10,35	10,36	10,34	10,31	10,34	10,4	10,32	10,35	10,44	10,42
02/02/2018	11,08	11,11	11,02	11,13	11,11	11,15	11,14	11,11	11,2	11,17	11,18	11,2
05/02/2018	10,44	10,31	10,3	10,6	10,41	10,3	10,32	10,31	10,33	10,44	10,35	10,4
05/02/2018	10,89	10,89	10,91	10,9	10,76	10,94	10,91	10,93	10,9	10,87	10,92	10,86
06/02/2018	10,76	10,69	10,81	10,76	10,61	10,76	10,81	10,8	10,76	10,7	10,82	10,76
07/02/2018	10,51	10,4	10,55	10,61	10,52	10,65	10,69	10,71	10,68	10,59	10,65	10,62
08/02/2018	11,47	10,37	10,47	10,5	10,47	10,51	10,44	10,5	10,53	10,44	10,49	10,54
09/02/2018	10,38	10,32	10,35	10,44	10,34	10,45	10,37	10,47	10,45	10,36	10,32	10,36
09/02/2018	11,16	11,17	11,09	11,15	11,11	11,17	11,18	11,17	11,21	11,27	11,2	11,2
12/02/2018	10,55	10,56	10,55	10,57	10,58	10,52	10,61	10,59	10,6	10,54	10,61	10,58
15/02/2018	10,43	10,44	10,39	10,42	10,38	10,42	10,46	10,48	10,49	10,45	10,5	10,45
16/02/2018	10,32	10,35	10,31	10,33	10,32	10,3	10,34	10,32	10,37	10,38	10,44	10,34

Fuente: Zambrano, 2018.

4.2 Análisis y evaluación de resultados.

Las muestras de aguas proveniente del enriquecimiento del oro de la mina Barranco Colorado, contenían concentraciones de Cianuro en el orden del 394 mg/L. las mismas que superaban los límites permisibles establecidos por la Norma de Calidad Ambiental y de Descarga de Efluentes: Recurso Agua, del Libro VI, Anexo 1, del TULSMA, Tabla 2, que nos dice que la concentración de cianuro en el agua dulce debe estar por debajo de los 0,1 mg/L, parámetros que se muestran en la tabla 12.

Tabla 11 Resultados de Cianuro inicial y su porcentaje sobre la norma.

Datos de la muestra inicial en los tratamientos				
MUESTRA	LIBRO VI ANEXO 1. Límites de descarga a un cuerpo de agua dulce	CONCENTRACIÓN mg/L	% Sobre la Norma	Criterio de Cumplimiento SI/NO
TRATAMIENTO 1	0,1 mg/L	394	394000	NO
TRATAMIENTO 2	0,1 mg/L	394	394000	NO
TRATAMIENTO 3	0,1 mg/L	394	394000	NO
TESTIGO	0,1 mg/L	394	394000	NO

Elaborado por: Zambrano 2018.

De acuerdo en la tabla 12, las concentraciones de cianuro superan la norma con un 394000%.

Las muestras para el experimento, se las obtuvieron de los tanques de lixiviación del proceso de enriquecimiento del oro de la Mina Barranco Colorado, que luego fueron llevadas al laboratorio para la experimentación.

El consorcio de bacteriano se lo obtuvo del agua residual de los tanques de lixiviación y se prepararon tres concentraciones diferentes, siendo estas: solución patrón la primera y denominada T1, la segunda concentración 1/10 denominándose T2, la tercera concentración 1/100 denominándose T3 y el testigo que nos servirá como verificación.

La degradación del cianuro se evidencia por la disminución de la concentración misma que fue determinada a los 0, 5, 19 y 27 días del experimento.

De acuerdo a los análisis de laboratorio, tenemos como resultado que la aplicación de bacterias en el tratamiento 1, denominado como solución patrón con una concentración bacteriana de 7, 100,000 UFC/ml, degrada con mayor rapidez el cianuro

presente en el agua, y que, a menor concentración bacteriana, disminuye la degradación.

En la tabla 13 se muestra el porcentaje de reducción del cianuro a los 27 días de la experimentación.

Tabla 12 Porcentaje y promedio de la degradación del Cianuro de acuerdo a los tratamientos aplicados.

MUESTRA	CIANURO inicial mg/l	CIANURO a los 27 días mg/l	Cianuro degradado a los 27 días	% de Reducción	PROMEDIO DEL % DE CIANURO DEGRADADO
T1.1	394	143	251	63,71	64,55
T1.2	394	155	239	60,66	
T1.3	394	121	273	69,29	
T2.1	394	199	195	49,49	56,05
T2.2	394	160	234	59,39	
T2.3	394	160,5	233,5	59,26	
T3.1	394	185	209	53,04	56,02
T3.2	394	166	228	57,67	
T3.3	394	168	226	57,36	
TESTIGO 1	394	207	187	47,46	47,38
TESTIGO 2	394	209	185	46,95	
TESTIGO 3	394	206	188	47,72	

Elaborado por: Zambrano, 2018.

En la Tabla 13 se muestra que el tratamiento 2 y 3 tuvo menor porcentaje de degradación que el tratamiento 1, viéndose claramente que a mayor aumento de concentración de bacterias mayor es el porcentaje de degradación. Se tiene en cuenta que el testigo presenta una disminución y sus posibles causas pueden ser que mantiene una concentración de bacterias y por lo que se produce una degradación en esta unidad experimental, teniendo presente que en esta unidad no se realizó el bioaumento bacteriano como se lo hizo en los tratamientos 1, 2 y 3. Se puede mencionar una volatilización del cianuro, pero el ácido cianhídrico se produce en pH menores a 9 y en la experimentación se mantuvo el control del pH y estos eran superior a 10.3.

En el gráfico 1 se muestra el comportamiento de las concentraciones de cianuro a los 27 días del experimento. Aquí podemos apreciar que el tratamiento 1, con la mayor concentración del consorcio de bacterias, es el que más degradación produce. Se

observa que el testigo también presenta disminución por lo que se llega a concluir que el testigo mantiene una concentración bacteriana que está produciendo esta disminución, ya que el tratamiento 1 que recibió el mayor bioaumento de bacterias degrada más.

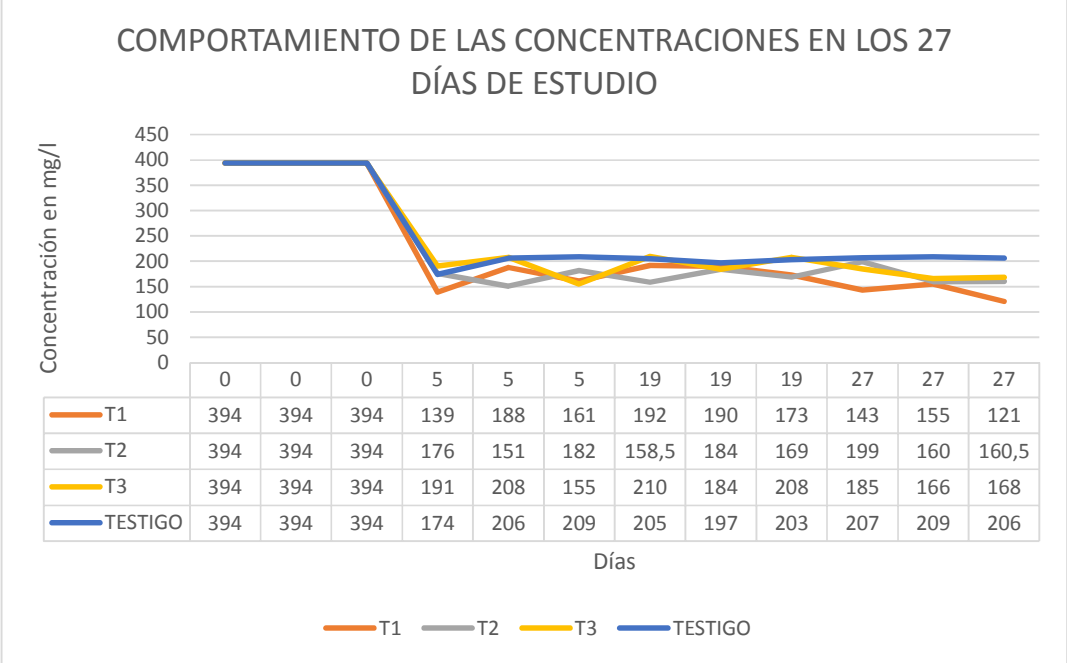


Gráfico 1 Comportamiento de las concentraciones de Cianuro en los 27 días de tratamiento.

Elaborado por: Zambrano, 2018.

En la gráfica 2 se muestra el control del pH en los 27 días de la experimentación, encontrándose una tendencia de un Ph DE 10,5.

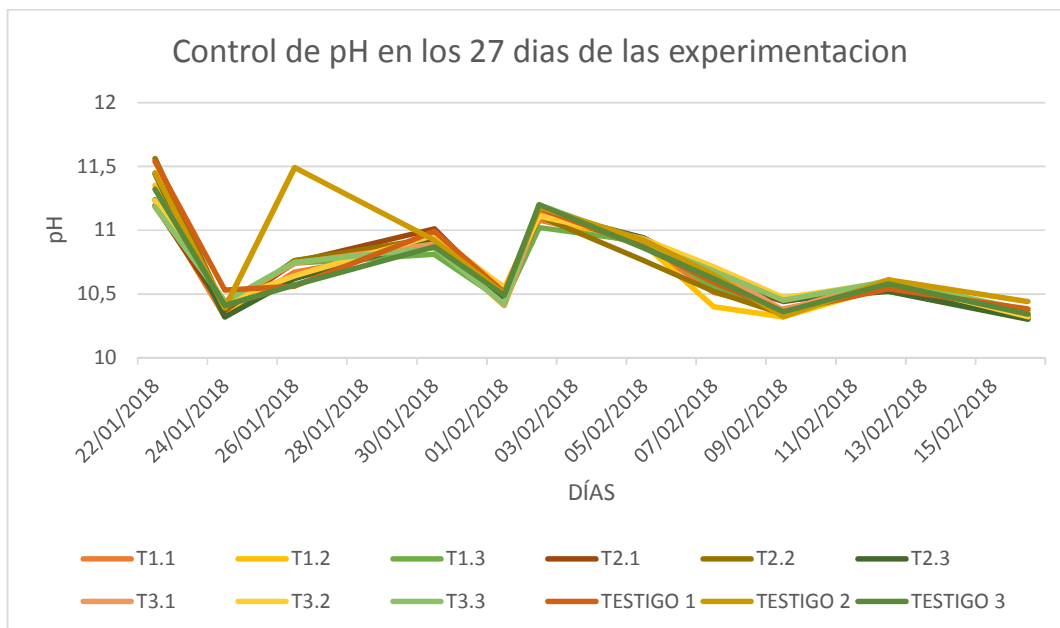


Gráfico 2 Control de pH en el 27 día de la experimentación.

Elaborado por: Zambrano, 2018.

4.3 EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS

Para la evaluación de los resultados se procesaron los datos en el software para análisis estadístico InfoStat utilizando el modelo lineal mixto.

A continuación, se muestran los resultados del efecto de tres concentraciones de microorganismos en la degradación de cianuro

- **A los 5 días de la experimentación.**

Mediante el software Infesta se realizó el análisis de varianza, para determinar si hay diferencias significativas a los 5 días entre los tratamientos, en cuanto a la degradación

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	Aj	CV
Respuesta	12	0,34	0,09	12,48

Se debe tener en cuenta que el valor de R² nos indica el porcentaje de varianza y este deberá ser mayor a 0,70 y el CV y el CMError lo menor posible. El modelo no se ajusta ya que los valores de R² son menores y el CV mayor.

Para el cuadro de análisis de la varianza nos indican que el valor p, es significativo cuando es $\leq 0,05$ y sugiere el rechazo de la hipótesis de igualdad cuando el valor p=

0.0014, que nos indica que existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo.	2054,00	3	684,67	1,38	0,3166
Tratamiento	2054,00	3	684,67	1,38	0,3166
Error	3962,67	8	495,33		
Total	6016,67	11			

De acuerdo al cuadro nos indica que no hay una diferencia significativa en cuanto a los tratamientos a los 5 días de la experimentación.

Con el Test: LSD Fisher nos muestra un rango de valores ordenados de menor a mayor, acompañados con una letra, si las medias tienen la misma letra no muestran diferencias estadísticas significativas entre ellas, según el nivel de significación propuesto ($\alpha=0.05$) y la DMS= 41,90474 (Diferencia Mínima Significativa).

Test: LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=41,90474

Error: 495,3333 gl: 8

<u>Tratamiento</u>	<u>Medias</u>	<u>n</u>	<u>E.E.</u>
T1	162,67	3	12,85 A
T2	169,67	3	12,85 A
T3	184,67	3	12,85 A
Testigo	196,33	3	12,85 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

De acuerdo al Test: LSD Fisher nos muestra que los tratamientos tienen la misma letra, por lo tanto, no existe diferencias significativas entre ellas.

En el grafico 3 se muestra la degradación del cianuro a los 5 días iniciados el tratamiento, teniendo como resultado que no hay una diferencia significativa en los tratamientos.

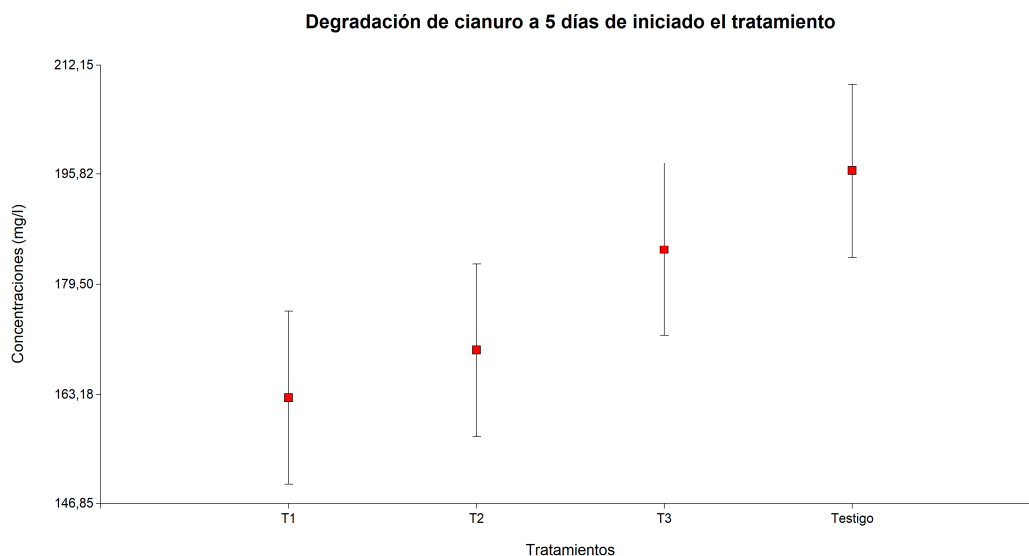


Gráfico 3 Degradación del Cianuro a los 5 días del experimento

Elaborado por: Zambrano, 2018.

- **A los 19 días de la experimentación.**

El valor R^2 debe ser mayor a 0,70 y el CV y el CMEError lo menor posible.

Análisis de la varianza

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
Respuesta	12	0,66	0,54	5,90

El modelo nos indica que existe una pequeña variación ya que el valor de R^2 trata de ajustarse y Cv es menor.

El valor de p, que es significativo cuando es $\leq 0,05$ y 0.0014, que indica que existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1961,90	3	653,97	5,23	0,0273
Tratamiento	1961,90	3	653,97	5,23	0,0273
Error	999,83	8	124,98		
Total	2961,73	11			

Con los datos expuestos en el cuadro nos indica que los valores son no significativos, pero comparando con los datos a los 5 días del experimento, hay una variación en los tratamientos.

Para el Test: LSD Fisher según el nivel de significación propuesto ($\alpha=0.05$) y la DMS= 21,04908 (Diferencia Mínima Significativa).

Test: LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=21,04908

Error: 124,9792 gl: 8

Tratamiento	Medias	n	E.E.
T2	170,50 3	6,45	A
T1	185,00 3	6,45	A B
T3	200,67 3	6,45	B
Testigo	201,67 3	6,45	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

En el Test: LSD Fisher a los 19 días nos muestra una diferencia en los tratamientos ya que el T1 muestra diferencia con el T2, por lo tanto, se determina que existe una diferencia entre ellas.

El grafico 4, muestra la degradación del cianuro a los 19 días iniciados el tratamiento, teniendo como resultado que él, T1 y el T2 tienen diferencias entre los tratamientos, mientras el T3 y el testigo no existen diferencia entre ellas.

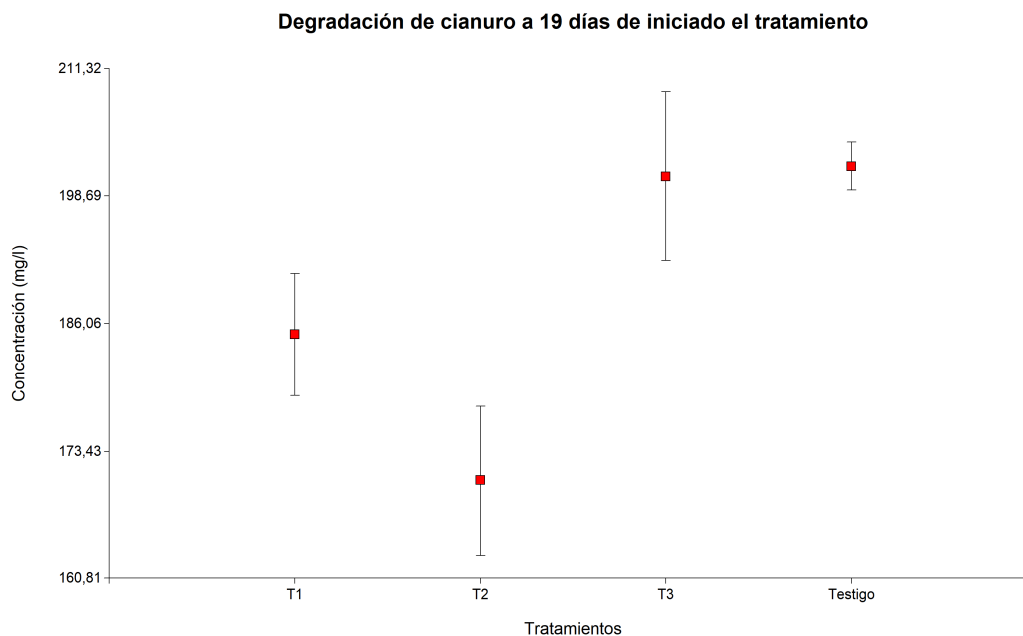


Gráfico 4 Degradación del Cianuro a los 19 días de la experimentación

Elaborado por: Zambrano, 2018.

- **A los 27 días del experimento.**

El valor R^2 debe ser mayor a 0,70 y el CV y el CMError lo menor posible.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Respuesta	12	0,79	0,71	8,70

El modelo nos indica que existe variación entre los tratamientos y Cv es menor.

El de valor p, que es significativo cuando es $\leq 0,05$ y 0.0014, que indica que existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	6868,73	3	2289,58	10,07	0,0043
Tratamiento	6868,73	3	2289,58	10,07	0,0043
Error	1818,50	8	227,31		
Total	8687,23	11			

De acuerdo al análisis a los 27 días de la experimentación muestra que hay una variación en el modelo y el tratamiento significativos, en cuando a los datos a los 19 días.

Para el Test: LSD Fisher según el nivel de significación propuesto ($\alpha=0.05$) y la DMS= 28,38743 (Diferencia Mínima Significativa).

Test: LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=28,38743

Error: 227,3125 gl: 8

Tratamiento	Medias	n	E.E.
T1	139,67 3	8,70	A
T3	173,00 3	8,70	B
T2	173,17 3	8,70	B
Testigo	207,33 3	8,70	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

El Test: LSD Fisher, muestra diferencia en los tratamientos. El T1 es diferente al T2, T3 y el testigo, por lo tanto, se determina que existe una diferencia entre los tratamientos.

El grafico 5, muestra la degradación del cianuro a los 27 días iniciados el tratamiento, teniendo como resultado que él, T1 con la mayor concentración de bacterias es el que degrada más el cianuro, mientras el T2 y T3 no existe diferencia significativa entre ellas

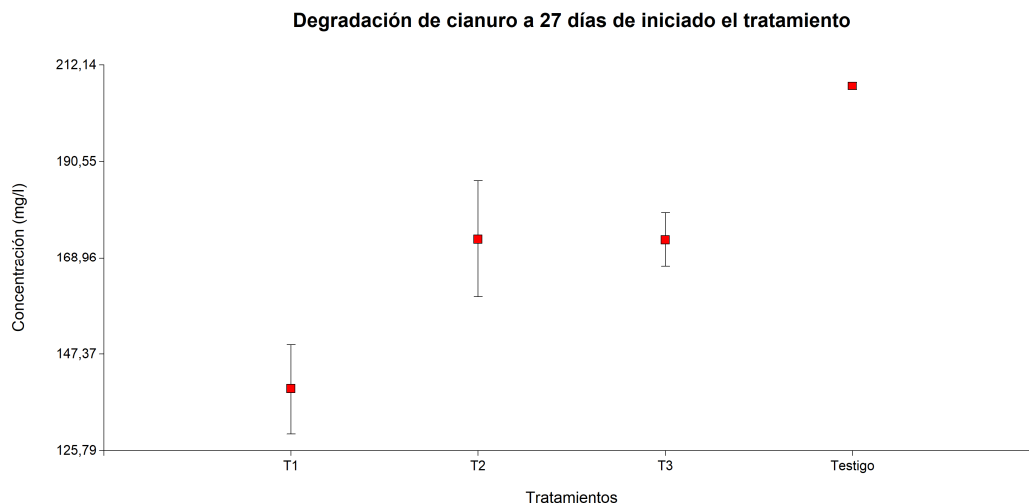


Gráfico 5 Degradación del Cianuro a los 27 días de la experimentación

Elaborado por: Zambrano, 2018.

4.4 DISCUSIÓN

Con la premisa de, que el cianuro está siendo ampliamente usado para la extracción de oro y, que este compuesto es altamente contaminante de suelos y aguas, ya que el cianuro forma complejos con metales tales como Cu^{+2} , Mn^{+2} o Fe^{+3} , los cuales son sumamente tóxicos (Gaviria C. & Meza S., 2006), se presentará a continuación una experiencia particular sobre la degradación del cianuro desarrollada por (Cardona Giraldo, 2015).

Primero, se han identificado las bacterias, que están presentes en las aguas residuales de la lixiviación con compuesto de cianuro del material apilado, para extraer el oro. Estas bacterias han sido aisladas y, bajo condiciones in vitro y también bajo condiciones de invernadero, se han controlado los niveles de degradación del cianuro. El resultado es, que seis morfotipos de bacterias autóctonas pueden metabolizar y por ende tienen la capacidad de degradar concentraciones de cianuro que van desde 100 a 400 ppm. Comparado con la muestra de control, se pudo apreciar que todas las bacterias son capaces de disminuir significativamente la cantidad de cianuro CN. Además, dos de ellas han sido identificadas como las de mayor rendimiento, pero todo esto bajo condiciones in vitro. Ver el gráfico 6.

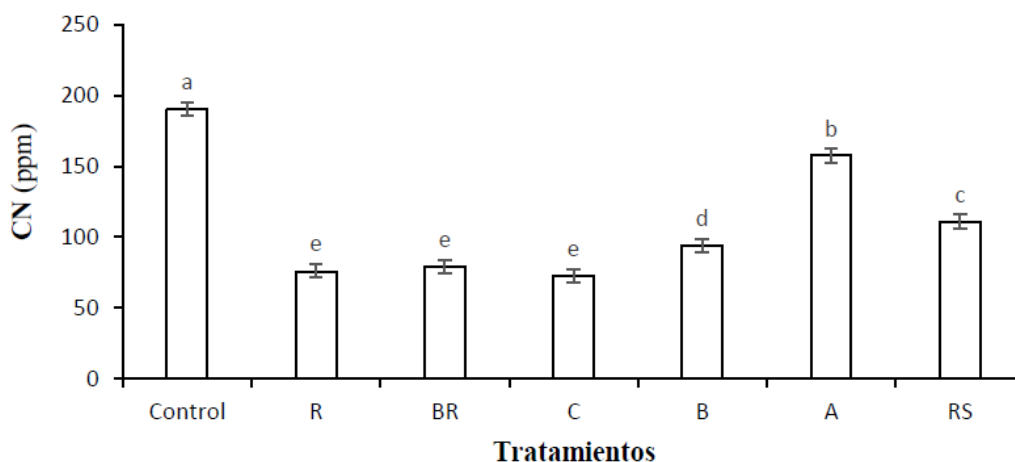


Gráfico 6 Concentración de CN. R: bacteria roja, BR: blanca rugosa, B: bacteria blanca, C: bacteria cremosa, A: bacteria amarilla y RS: bacteria rosada. Recuperado de Giraldo, E. (2015), p. 41

Estas bacterias procedentes de las aguas residuales de la minería del oro por lixiviación, crecieron en ambientes de laboratorio controlados, cuya única fuente de nitrógeno fue el cianuro. Recuérdese que las bacterias requieren de nitrógeno para su proceso metabólico. Esta experiencia tenía el objetivo de aislar las bacterias con el fin de usarlas para descomponer el cianuro procedente de las aguas residuales de la

minería del oro y, de esta manera estimar su valor como alternativa en la biorremediación de ambientes contaminados por la minería, puesto que, como menciona (Das & Santra, 2011), el método biológico que usa bacterias para metabolizar el cianuro, es una alternativa viable. Baxter & Cummings, (2006), van más allá y mencionan que además de ser amigable con el ambiente, es rentable y de fácil operación. En efecto se ha comprobado que las bacterias, bajo ciertas circunstancias, pueden tolerar ambientes contaminados de cianuro y hasta pueden degradarlo, ya que toman el nitrógeno del cianuro y lo usan para su desarrollo. Las bacterias pueden soportar contaminación por CN de hasta 400 ppm, dependiendo del tipo de bacteria. Este caso particular encontró que las mejores concentraciones para que se dé la degradación del CN son de 100 y 200 ppm, con un pH alrededor de 11.

Finalmente, es importante que se identifiquen a las bacterias autóctonas que soportan mayores concentraciones de CN, y posteriormente caracterizarlas para poder usarlas en el campo con mayor precisión (Cardona Giraldo, 2015).

En la experimentación realizada se obtuvo un consorcio de bacterias que fueron obtenidas del mismo medio, pues los consorcios presentan ventajas sobre poblaciones de una sola bacteria, ya que cada especie puede cumplir funciones diferentes dentro de la comunidad bacteriana y llevan una coexistencia benéfica para todas las bacterias contenidas y así, la combinación natural de bacterias es una fortaleza para toda la comunidad bacteriana, que serían difíciles y aún imposibles para las bacterias por separado. Cada grupo de bacterias se “encarga” solo de una tarea específica, la cual es necesaria para la supervivencia o para lograr un producto más complejo.

Se obtuvo bacterias Gram positivas y en formas de bacilos en el consorcio bacteriano, con una concentración de 7, 100,000 UFC/ml.

Una vez obtenido el consorcio mediante disoluciones sucesivas, se preparó las 3 concentraciones, denominadas T1 solución patrón, T2 1/10 y T3 1/100. Luego se realizó tres repeticiones de cada tratamiento y el testigo, obteniendo así 12 unidades experimentales, que fueron analizadas por 27 días.

Con una concentración inicial de 394 mg/l de cianuro y con un pH alrededor de 11, se determinó, que en el proceso de biodegradación del cianuro el tratamiento 1 observó una variación importante de la concentración, ya que bajaron los niveles de la concentración inicial ya mencionado, a una concentración a los 27 días de T1.1, de 143 mg/l; T1.2, de 155 mg/l; y, T1.3, de 121 mg/l. No se llegó a los límites permisibles establecidos por la norma de calidad ambiental que menciona que es de 0,1 mg/l. Pero se logró degradar una cantidad importante de cianuro presente en el agua. Sin dejar a

lado que existen factores que restaron en el proceso de biodegradación que no fueron tomados en cuenta, por factor tiempo y conocimientos más amplios sobre biodegradación.

Finalmente se obtuvo que a mayor concentración de bacterias mayor la degradación del cianuro, teniendo en cuenta las condiciones de laboratorio, pH y temperatura.

CONCLUSIONES.

Se concluye que:

- La caracterización inicial del agua de acuerdo a los parámetros establecidos nos da que la concentración inicial de cianuro fue 394 mg/l y con un pH de 10,36.
- El consorcio bacteriano fue preparado en tres contracciones diferentes siendo la primera T1 con 7, 100,000 UFC/ml, T2 con una concentración de 1/10 con 710,000 UFC/ml y T3 con una concentración de 1/100, con 71,000 UFC/ml.
- El mejor resultado que se obtuvo para la degradación del cianuro con un porcentaje de 64,55 % fue del tratamiento T1 con un concentración de bacterias de 7, 100,000 UFC/ml, resultando el mejor, después el segundo mejor tratamiento fue el T2 con una concentración de 1/10 con 710,000 UFC/ml provocando una degradación del 56,05 % de Cianuro.
- La metodología utilizada es adecuada para determinar la degradación mediante bioaumentación de bacterias, ya que el proceso generó una disminución del Cianuro.

RECOMENDACIONES

Con la experimentación realizada se puede recomendar el uso de este procedimiento para la biodegradación de aguas contaminadas con cianuro mediante el bioaumento bacteriano, ya que del mismo medio se obtienen bacterias para realizar este proceso, siendo un método amigable con el medio ambiente.

Se recomienda continuar con este tipo de experimentación estudiando el efecto de la variación de temperatura y concentración de oxígeno en las muestras, para determinar el tiempo requerido para la degradación del cianuro y que se llegue a cumplir los criterios establecidos por los límites permisibles de la Norma.

BIBLIOGRAFÍA

- Adjei, M. D., & Ohta, Y. (2000). Factors affecting the biodegradation of cyanide by Burkholderia cepacia strain C-3. *Journal of bioscience and bioengineering*, 89(3), 274–277.
- Akcil, A., Karahan, A. G., Ciftci, H., & Sagdic, O. (2003). Biological treatment of cyanide by natural isolated bacteria (Pseudomonas sp.). *Minerals engineering*, 16(7), 643–649.
- Asmah, R. H., Bosompem, K. M., Osei, Y. D., Rodrigues, F. K., Addy, M. E., Clement, C., & Wilson, M. D. (1999). Isolation and characterization of mineral oxidizing bacteria from the Obuasi gold mining site, Ghana. En *Process Metallurgy* (Vol. 9, pp. 657–662). Elsevier.
- Atkinson, A. (s. f.). Bacterial cyanide detoxification. *Biotechnology and Bioengineering*, 17(3), 457-460. <https://doi.org/10.1002/bit.260170316>
- Ballén-Segura, M., Hernández Rodríguez, L., Parra Ospina, D., Vega Bolaños, A., & Pérez, K. (2016). Using Scenedesmus sp. for the Phycoremediation of Tannery Wastewater. *Tecciencia*, 11(21), 69-75. <https://doi.org/10.18180/tecciencia.2016.21.11>
- Barclay, M., Hart, A., Knowles, C. J., Meeussen, J. C., & Tett, V. A. (1998). Biodegradation of metal cyanides by mixed and pure cultures of fungi. *Enzyme and Microbial Technology*, 22(4), 223–231.
- Barrantes, B., Alberto, E., Cartín Nuñez, M., Barrantes, B., Alberto, E., & Cartín Nuñez, M. (2017). Efficacy of wastewater treatment of the University of Costa Rica Western Campus, San Ramón, Costa Rica. *Cuadernos de Investigación UNED*, 9(1), 193-197.

- Baxter, J., & Cummings, S. P. (2006). The impact of bioaugmentation on metal cyanide degradation and soil bacteria community structure. *Biodegradation*, 17(3), 207–217.
- BCE. (s. f.). Recuperado de <https://contenido.bce.fin.ec/documentos/Estadisticas/Hidrocarburos/ReporteMinero072016.pdf>
- Botz, M. M. (2001). Overview of cyanide treatment methods. *Mining Environmental Management, Mining Journal Ltd., London, UK*, 28–30.
- C Gaviria, & S, M. (2006). ANALYSIS OF ALTERNATIVES FOR THE DEGRADATION OF THE CYANIDE IN LIQUIDS AND SOLIDS EFLUENTES OF THE COUNTY OF SEGOVIA, ANTIOQUIA AND IN THE ORE DRESSING MILL OF THE MINEROS NACIONALES, COUNTY OF MARMATO, CALDAS. *DYNA*, 73(149), 31-44.
- Cardona Giraldo, E. A. (2015). *Microorganismos potenciales degradadores de cianuro en residuos de minería de oro* (PhD Thesis). Universidad Nacional de Colombia-Sede Medellín.
- Cardona Giraldo, E. A. (s. f.). *Microorganismos potenciales degradadores de cianuro en residuos de minería de oro*. Universidad Nacional de Colombia-Sede Medellín.
- Cardona, M., Fernando, V., Buitrago, M., Andrea, P., Acosta, A., Haid, D., ... Haid, D. (2017). LANDFILL LEACHATE TREATMENT BY BATCH SUPERCRITICAL WATER OXIDATION. *Ciencia e Ingeniería Neogranadina*, 27(2), 5-26. <https://doi.org/10.18359/rcin.2305>
- Castric, P. A., Farnden, K. J., & Conn, E. E. (1972). Cyanide metabolism in higher plants: V. The formation of asparagine from β -cyanoalanine. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 152(1), 62–69.

- Cazar Almeida, A. P. (2015). *Recuperación de compuestos de cianuro de aguas residuales proveniente de la extracción del oro utilizadas como aguas de riego en la zona minera Zaruma-Portovelo* (B.S. thesis). Quito: UCE.
- Das, S., & Santra, S. C. (2011). Cyanide degradation by *Aspergillus niger* strain isolated from steel-plant wastewater. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural & Food Chemistry*, 10(8).
- Day, J. M., & Döbereiner, J. (1976). Physiological aspects of N₂-fixation by a *Spirillum* from *Digitaria* roots. *Soil Biology and Biochemistry*, 8(1), 45-50.
[https://doi.org/10.1016/0038-0717\(76\)90020-1](https://doi.org/10.1016/0038-0717(76)90020-1)
- Ebbs, S. (2004). Biological degradation of cyanide compounds. *Current opinion in Biotechnology*, 15(3), 231–236.
- Ebbs, S. D., Piccinin, R. C., Goodger, J. Q., Kolev, S. D., Woodrow, I. E., & Baker, A. J. (2008). Transport of ferrocyanide by two eucalypt species and sorghum. *International journal of phytoremediation*, 10(4), 343–357.
- Espinoza, C. G. (2004). ¿Más valor que el oro? Los movimientos populares en oposición a la minería con cianuro. *Theomai*, (9). Recuperado de <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=12400912>
- Fernández Pérez, B. (2007). *Desarrollo de un nuevo método para la eliminación de cianuro de aguas residuales de mina* (Ph.D. Thesis). Universidad de Oviedo. Recuperado de <http://www.tdx.cat/handle/10803/31849>
- Garcés Giraldo, L. F., Mejía Franco, E. A., & Santamaría Arango, J. J. (2004). La fotocatalisis como alternativa para el tratamiento de aguas residuales. *Revista Lasallista de Investigación*, 1(1). Recuperado de <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=69511013>
- Gaviria C., A. C., & Meza S., L. A. (2006). Análisis de alternativas para la degradación del cianuro en efluentes líquidos y sólidos del municipio de Segovia, Antioquia

y en la planta de beneficio de la empresa mineros nacionales, municipio de Marmato, Caldas. *Dyna*, 73(149). Recuperado de <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=49614904>

Gaviria López, G. H. (s. f.). *Tratamiento de aguas residuales del proceso de lixiviación de oro con cianuro a través de oxidación electroquímica* (PhD Thesis). Universidad Nacional de Colombia-Sede Manizales.

González Ramírez, A. M. (s. f.). *Diseño de metodología para la identificación de pasivos ambientales mineros en Colombia/Design of methodology for the identification of mining environmental liabilities in Colombia* (PhD Thesis). Universidad Nacional de Colombia.

Guerrero, J. (2005). Cianuro: Toxicidad y destrucción biológica. *El Ingeniero de minas*, 10, 22–25.

Gurbuz, F., Ciftci, H., & Akcil, A. (2009). Biodegradation of cyanide containing effluents by *Scenedesmus obliquus*. *Journal of Hazardous Materials*, 162(1), 74-79. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.05.008>

Gurbuz, F., Ciftci, H., Akcil, A., & Karahan, A. G. (2004). Microbial detoxification of cyanide solutions: a new biotechnological approach using algae. *Hydrometallurgy*, 72(1), 167–176.

Ingvorsen, K., Højer-Pedersen, B., & Godtfredsen, S. E. (1991). Novel cyanide-hydrolyzing enzyme from *Alcaligenes xylosoxidans* subsp. *denitrificans*. *Applied and environmental microbiology*, 57(6), 1783–1789.

Kebeish, R., Aboelmy, M., El-Naggar, A., El-Ayouty, Y., & Peterhansel, C. (2015). Simultaneous overexpression of cyanidase and formate dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana* chloroplasts enhanced cyanide metabolism and cyanide tolerance. *Environmental and Experimental Botany*, 110, 19-26. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2014.09.004>

- Knowles, C. J., & Bunch, A. W. (1986). Microbial cyanide metabolism. *Adv Microb Physiol*, 27(27), 73–111.
- Kuyucak, N., & Akcil, A. (2013). Cyanide and removal options from effluents in gold mining and metallurgical processes. *Minerals Engineering*, 50-51, 13-29.
<https://doi.org/10.1016/j.mineng.2013.05.027>
- Logsdon, M. J., Hagelstein, K., & Mudder, T. (2001). *El manejo del cianuro en la extracción de oro*. International Council on Metals and the Environment.
- López-Jácome, L. E., Hernández-Durán, M., Colín-Castro, C. A., Ortega-Peña, S., Cerón-González, G., & Franco-Cendejas, R. (2014). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Obtenido de [http://www. medigraphic.com/pdfs/invd/ir-2014/ir141b. pdf](http://www.medigraphic.com/pdfs/invd/ir-2014/ir141b.pdf)*.
- Martínez, A. D. (2012). Tratamiento de desechos del cianuro por biorremediación. *Tecnología en marcha*, 25(2), 61–72.
- Martínez, F. C., Silva, F. B., & Chávez, J. F. M. (2010). Control Inicial en la Descarga de Aguas Residuales Industriales y Comerciales. *Conciencia Tecnológica*, (39), 43-49.
- Martinez, M., Ferro, E., & de Pablos, F. (2016). Evaluación de cianuro libre en aguas superficiales del río Paraguay cercanas a una industria del acero. *Revista Boliviana de Química*, 33(2), 88-94.
- Millán, A. (2001). *Historia de la minería del oro en Chile*. Editorial Universitaria.
- Novak, D., Franke-Whittle, I. H., Pirc, E. T., Jerman, V., Insam, H., Logar, R. M., & Stres, B. (2013). Biotic and abiotic processes contribute to successful anaerobic degradation of cyanide by UASB reactor biomass treating brewery waste water. *Water Research*, 47(11), 3644-3653.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.04.027>

- Olazo-Quispe, R., & La Rosa-Toro Gómez, A. (2014). Micropartículas de Ag/Ag₂S tipo core-shell como sensor potenciométrico para la detección de cianuro. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 80(1), 51-64.
- Oudjehani, K., Zagury, G., & Deschênes, L. (2002). Natural attenuation potential of cyanide via microbial activity in mine tailings. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58(3), 409-415. <https://doi.org/10.1007/s00253-001-0887-2>
- Oyarzun, R., Higuera, P., & Lillo, J. (2011). *Minería Ambiental: Una introducción a los Impactos y su remediación*. Ediciones GEMM-Aula2punto.net.
- Patil, Y. B., & Paknikar, K. M. (1999). Removal and recovery of metal cyanides using a combination of biosorption and biodegradation processes. *Biotechnology Letters*, 21(10), 913-919.
- Porter, N., & Knowles, C. J. (1979). Cyanide-resistant growth in *Citrobacter freundii* and other Enterobacteriaceae. *FEMS Microbiology Letters*, 5(5), 323-326.
- Quiroga, A., & Alejandra, L. (2016). Análisis comparativo de la eficiencia de productos para la biorremediación de suelos contaminados con diesel (UN 1202) utilizando métodos de bioestimulación y bioaumentación a escala piloto. Recuperado de <http://repository.lasalle.edu.co/handle/10185/20403>
- Ramírez, A. V. (2010). Toxicidad del cianuro: Investigación bibliográfica de sus efectos en animales y en el hombre. *Anales de la Facultad de Medicina*, 71(1), 54-61.
- Reforma Anexo 28 feb 2014 FINAL.pdf. (s. f.). Recuperado de <http://www.industrias.ec/archivos/CIG/file/CARTELERA/Reforma%20Anexo%2028%20feb%202014%20FINAL.pdf>
- Restrepo, O. J., Montoya, C. A., & Muñoz, N. A. (2006). MICROBIAL DEGRADATION OF CYANIDE FROM GOLD METALLURGICAL PLANTS UTILIZING *P.fluorecens*. *DYNA*, 73(149), 45-51.

- Rodríguez Lovera, J. N., & Ruíz Guamán, F. J. (2016). Propuesta metodológica para el monitoreo, control y recuperación del suelo mediante bioaumentación de microorganismos para sitios de disposición final de residuos sólidos.
- SAC, E. M. D. P. (s. f.). Manual de Minería. *Recuperado de: http://www.estudiosmineros.com/ManualMineria/Manual_Mineria.pdf*.
- Sánchez Martín, J., & Rodríguez Gallego, J. Luis. (2003). Biorremediación. Fundamentos y aspectos microbiológicos. *Industria y minería*, (351), 12–16.
- Thompson, L. J., Jones, E., & Atiyah, R. (1994). Biotreatment processes for cyanide detox in heaps and process solutions—case studies of field treatments. En *Proceedings of AIME/SME Annual Meeting and Exhibit, Albuquerque. Society for Mining, Metallurgy, and Exploration, Warrendale, PA*.
- Villas-Boas, R. C., & Page, R. (2001). La minería en el contexto de la ordenación del territorio. *Rio de Janeiro: Editorial Cooperación Iberoamericana*.
- Watanabe, A., Yano, K., Ikebukuro, K., & Karube, I. (1998). Cloning and expression of a gene encoding cyanidase from *Pseudomonas stutzeri* AK61. *Applied microbiology and biotechnology*, 50(1), 93–97.
- Young, C. A., Twidwell, L. G., & Anderson, C. G. (2001). *Cyanide: Social, Industrial, and Economic Aspects*. TMS (The Minerals, Metals & Materials Society).
- Zacarías, R., Hugo, V., Machuca, V., Alicia, M., Soto, M., Luis, J., ... Venegas González, J. (2017). HIDROQUÍMICA Y CONTAMINANTES EMERGENTES EN AGUAS RESIDUALES URBANO INDUSTRIALES DE MORELIA, MICHOACÁN, MÉXICO. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 33(2), 221-235. <https://doi.org/10.20937/rica.2017.33.02.04>
- Ziolo, B., Fabio, L., Restrepo, G., Fernanda, L., Agudelo, E. A., Gallo, C., & Alonso, S. (2016). STUDY OF TOXICITY ASSOCIATED TO DUMPING OF

WASTEWATER CONTAINING DYES AND PIGMENTS IN THE ABURRÁ
VALLEY METROPOLITAN AREA. *Revista EIA*, (26), 61-74.

ANEXOS.

Anexos fotográficos

Fotos del proceso de la recolección de las muestras de la mina barranco Colorado

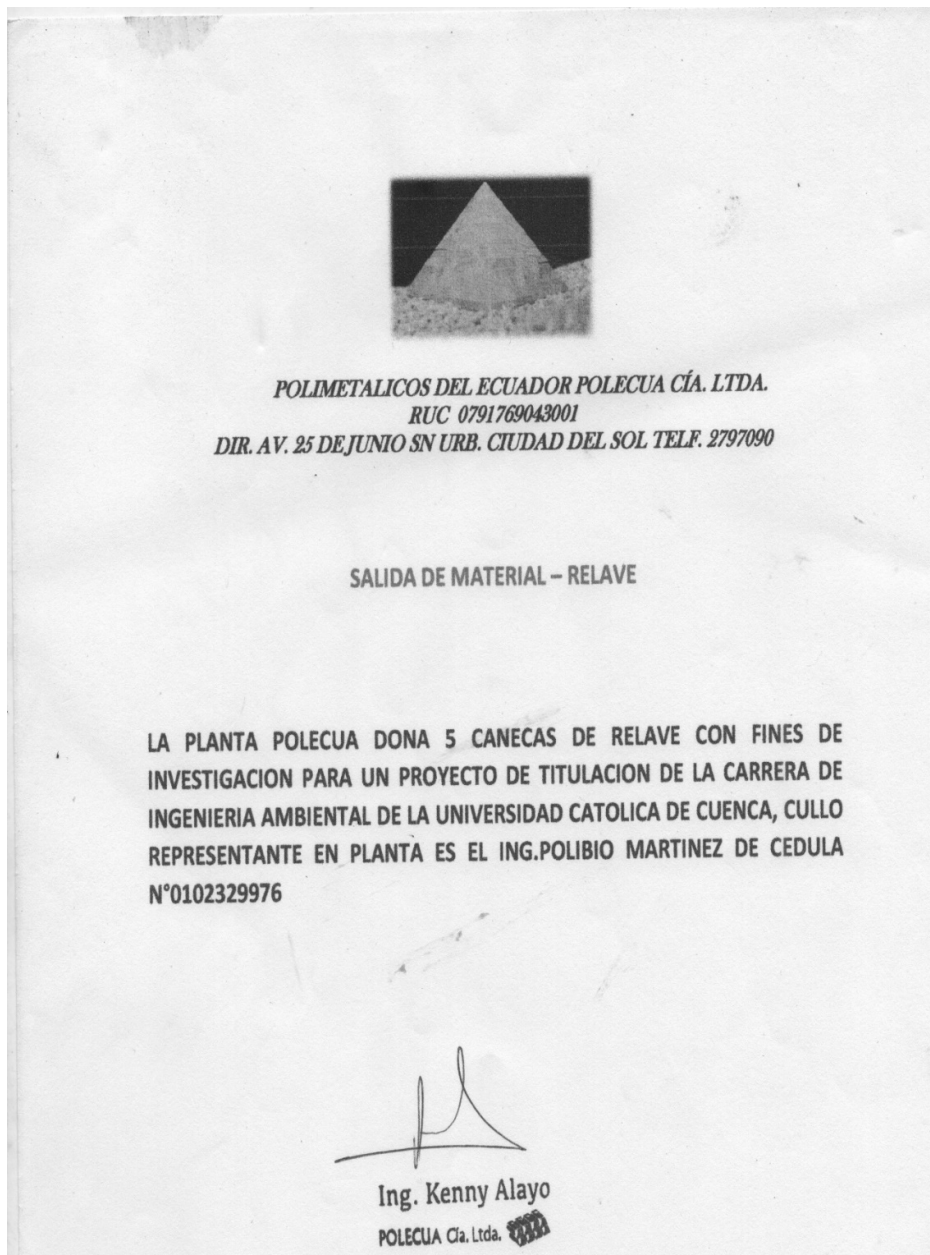


Foto 13 Permiso de la Mina para la recolección de las muestras en las canecas

Fuente: Zambrano, 2018.



Foto 14 Tanques de Lixiviación de la Mina Barranco Colorado.

Fuente: Zambrano, 2018.



Foto 15 Medición del pH en las canecas.

Fuente: Zambrano, 2018.



Foto 16 Adición de Hidróxido de Sodio a 1N en las canecas para que el pH sea superior a 9,5

Fuente: Zambrano, 2018.



Foto 17 Toma del pH una vez Colocado el Hidróxido de Sodio a 1N

Fuente: Zambrano, 2018.



Foto 18 Implementos para las siembras.

Fuente: Zambrano, 2018.



Foto 19 Colocación de las cajas Petri y Erlenmeyer para ser esterilizadas

Fuente: Zambrano, 2018.



Foto 20 Esterilización de las cajas y Erlenmeyer

Fuente: Zambrano, 2018.

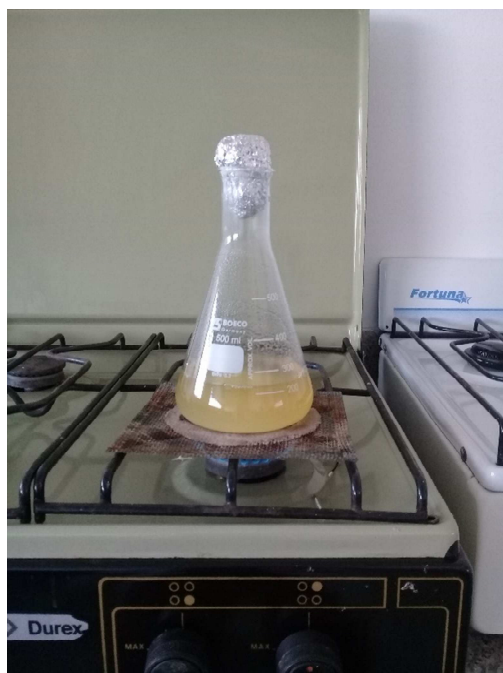


Foto 21 Prepara ración del Agar Nutritivo

Fuente: Zambrano, 2018.



Foto 22 Siembra con la muestra de agua residual de la mina

Fuente: Zambrano, 2018.



Foto 23 Bacterias obtenido después de la siembra.

Fuente: Zambrano, 2018.



Foto 24 Pesando el Agar para la resiembra de las bacterias

Fuente: Zambrano, 2018.



Foto 25 Preparando el Agar con agua destilada.

Fuente: Zambrano, 2018.



Foto 26 Agitando el Agar para una mayor cocción

Fuente: Zambrano, 2018.



Foto 27 Esterilización de las 24 cajas Petri.

Fuente: Zambrano, 2018.



Foto 28 Resiembras en las cajas Petri.

Fuente: Zambrano, 2018.



Foto 29 Estufa bacteriológica

Fuente: Zambrano, 2018.



Foto 30 Limpieza del porta objetos y el cubre objetos

Fuente: Zambrano, 2018.

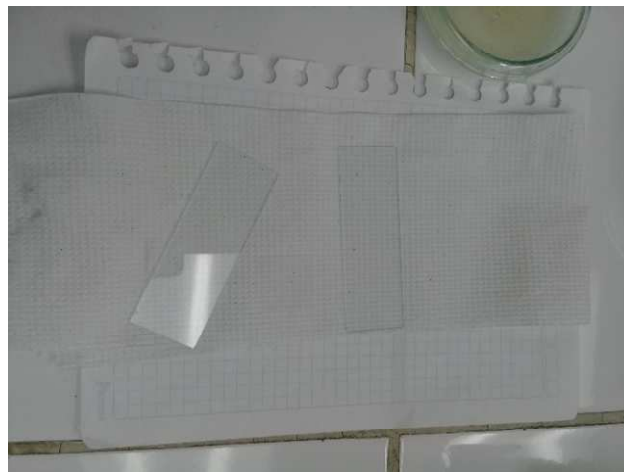


Foto 31 Porta objetos y cubre objetos a utilizar

Fuente: Zambrano, 2018.



Foto 32 Colocando un Poco de la muestra en el porta objetos

Fuente: Zambrano, 2018.

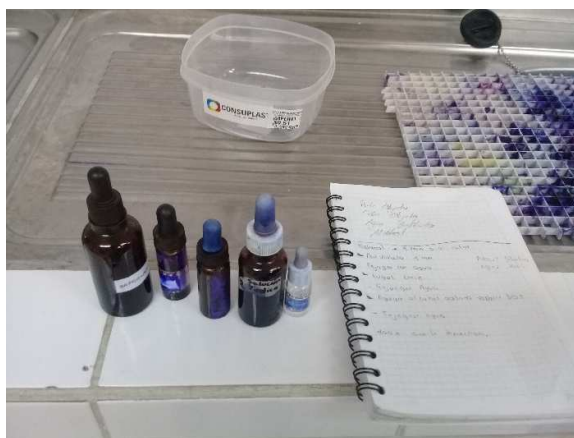


Foto 33 Implementos para realizar la Tinción de Gram, azul violeta, Lugol y aceite de inmersión

Fuente: Zambrano, 2018.

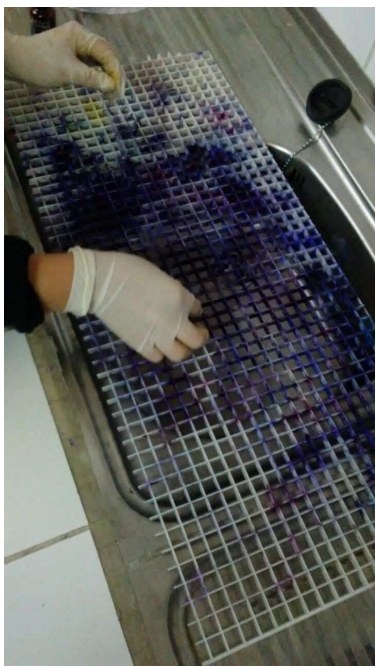


Foto 34 Colocación del azul violeta

Fuente: Zambrano, 2018.



Foto 35 Después de haber colocado el azul violeta por un minuto 1, se enjuaga.

Fuente: Zambrano, 2018.



Foto 36 Colocación de Lugol.

Fuente: Zambrano, 2018.

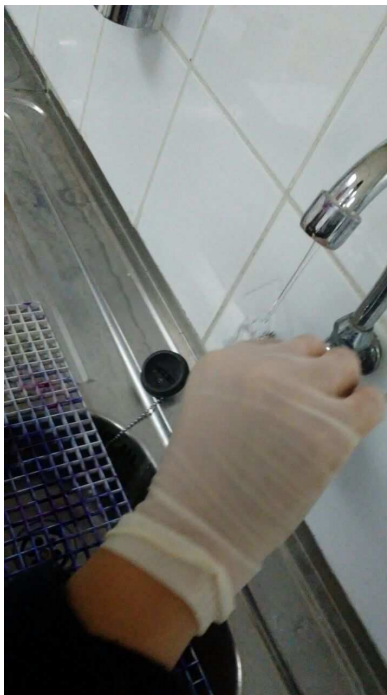


Foto 37 Después de colocado el lugol por un minuto se enjuaga

Fuente: Zambrano, 2018.



Foto 38 Por último la aplicación del aceite de inmersión

Fuente: Zambrano, 2018.



Foto 39 Se procedió a analizar la muestra en el microscopio

Fuente: Zambrano, 2018.

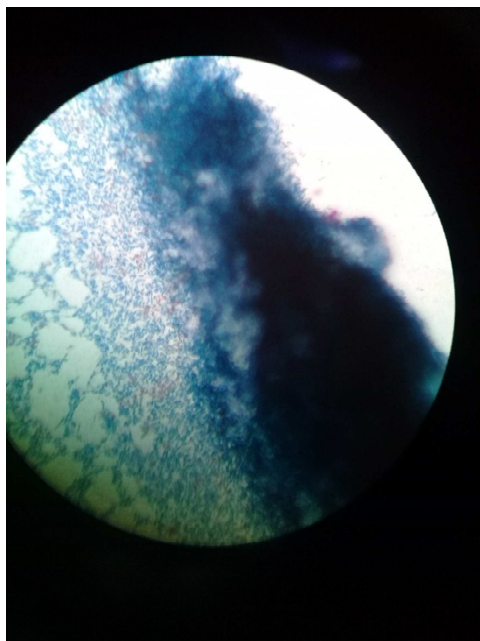


Foto 40 Tomando cámara fotográfica del lente del microscopio

Fuente: Zambrano, 2018.

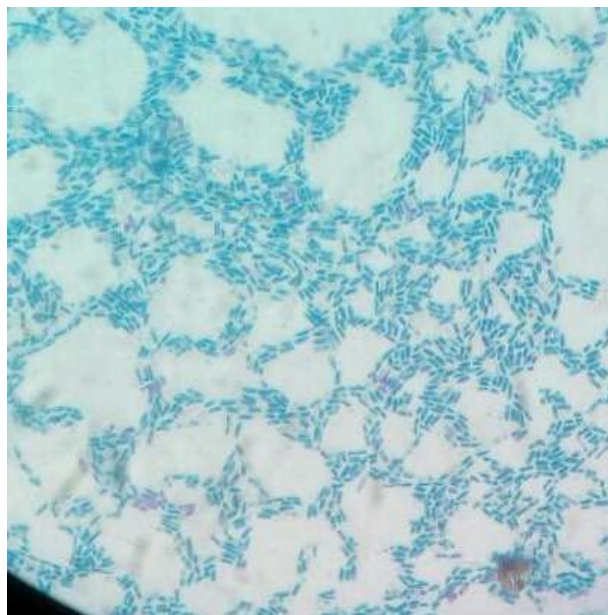


Foto 41 Con el aumento del lente, se pudo observar mejor que las bacterias eran Gram positivas y en formas de bacilos

Fuente: Zambrano, 2018.



Foto 42 Conteo de colonias

Fuente: Zambrano, 2018.

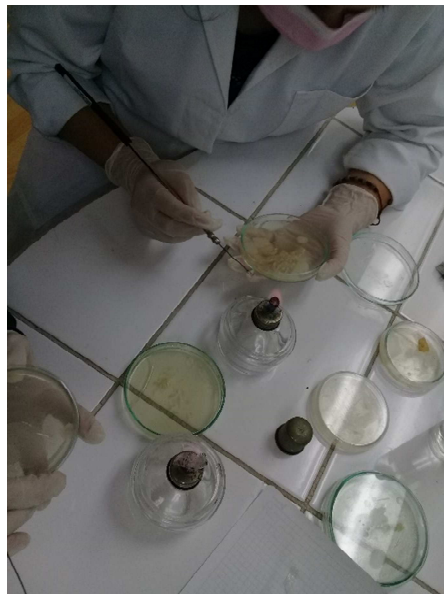


Foto 43 Después realizada la tinción de gran se procedió a escoger las colonias bacterianas a ser aplicadas en los tratamientos.

Fuente: Zambrano, 2018.



Foto 44 Preparando la solución Patrón.

Fuente: Zambrano, 2018.



Foto 45 las tres concentraciones a utilizaren el experimento

Fuente: Zambrano, 2018.



Foto 46 Colocación de las muestras en las unidades experimentales

Fuente: Zambrano, 2018.



Foto 47 Preparadas las unidades experimentales

Fuente: Zambrano, 2018.



Foto 48 las unidades experimentales con el testigo

Fuente: Zambrano, 2018.



Foto 49 Medición de pH

Fuente: Zambrano, 2018.



Foto 50 Agitando la Muestra para el control de Ph.

Fuente: Zambrano, 2018.

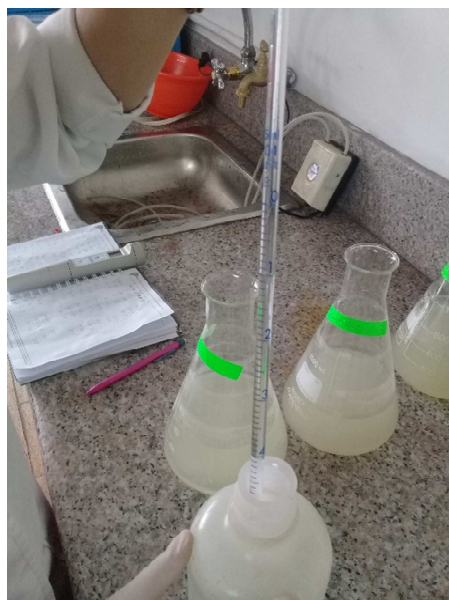


Foto 51 Colocación de NaOH 1 N en los días que bajo el pH.

Fuente: Zambrano, 2018.



Foto 52 Recogida de muestra para el análisis de laboratorio

Fuente: Zambrano, 2018.



Foto 53 Muestras listas para el análisis

Fuente: Zambrano, 2018.