



Degradación de cianuro de sodio por *Pseudomonas* sp. a dos temperaturas y tres pH

Sodium cyanide degradation by *Pseudomonas* sp. at two temperatures and three pH

Jhonn Morillo Mendoza y Juan Guevara Gonzales

¹Tesista, Escuela AP de Microbiología y Parasitología. Universidad Nacional de Trujillo (UNT). Trujillo. Perú.

²Departamento de Microbiología y Parasitología. UNT

RESUMEN

Se determinó el efecto de las temperaturas de 32 y 36°C en combinación con los pH 9.5, 10, 10.5 sobre la degradación de cianuro de sodio por *Pseudomonas* sp. aislada a partir de lodos activos de la planta de tratamiento de aguas residuales de Covicorti-Trujillo (Perú). La muestra de lodo activo se recolectó mediante un muestreo por conveniencia y fue sometida a un enriquecimiento en un caldo mínimo de sales con 500 ppm de cianuro de sodio durante 4 días. Para los ensayos se tuvieron seis frascos de vidrio conteniendo 100 mL de caldo mínimo de sales con buffer carbonato, 1000 ppm de cianuro de sodio y 4mL de inóculo de *Pseudomonas* sp. (2.7×10^9 cel/mL) a las temperaturas de 32 y 36°C en combinación con los pH 9.5, 10 y 10.5 (diseño factorial); se usaron también otros seis frascos de vidrio como controles bajo las mismas condiciones pero sin inóculo. Cada ensayo se realizó por triplicado y durante seis días; la degradación de cianuro de sodio fue medida al tiempo cero y cada 24 horas mediante el método titulométrico. Los resultados muestran máxima degradación de cianuro por *Pseudomonas* sp. a 36°C/pH 9.5(655ppm) y 32°C/ pH9.5(648 ppm) pero mínima degradación a 36°C/ pH 10.5(203 ppm). Los análisis de confirman diferencia estadística significativa entre los controles y todos los tratamientos usados; también demuestran que no existe diferencia significativa entre aquellos tratamientos que usaron el mismo pH (9.5, 10 y 10.5). Se concluye que la combinación de las temperaturas 32 y 36°C con los pH 9.5, 10, 10.5 influyen sobre la degradación de cianuro de sodio por *Pseudomonas* ps siendo las combinaciones de 32 y 36°C con el pH 9.5 las que favorecen este proceso.

Palabras clave: Degradación, cianuro de sodio, *Pseudomonas*, método titulométrico

ABSTRACT

Effect of 32 and 36 °C temperatures in combination with the pH at 9.5, 10.0, and 10.5 on the degradation of sodium cyanide by *Pseudomonas* sp. isolated from activated sludge treatment plant wastewater COVICORTI-Trujillo (Peru) was determined. The activated sludge sample was collected using a convenience sample and was subjected to enrichment in minimal salts broth with 500 ppm of sodium cyanide for four days. For trials six glass bottles containing 100 mL were taken broth minimal salts buffer carbonate, 1000 ppm of sodium cyanide and 4 ml of inoculum of *Pseudomonas* sp. (2.7×10^9 cells/mL) at the temperatures of 32 and 36 °C in combination with the pH 9.5, 10 and 10.5 (factorial design); six were also used other glass bottles as controls under the same conditions but without inoculum. Each assay was performed in triplicate, for six days; Degradation of sodium cyanide was measured at time zero and every 24 hours through titulométric method. The results show high degradation of cyanide by *Pseudomonas* sp. at 36°C / pH 9.5 (655ppm) and 32 °C/pH 9.5 (648 ppm) but minimal degradation at 36 °C/pH 10.5 (203 ppm). Analysis to confirm static significant difference between controls and all treatment used; also show that there is no significant difference between treatments that used the same pH (9.5, 10 and 10.5). The paper concludes that the combination of the temperatures 32 and 36 ° C with pH 9.5, 10, 10.5 influence the degradation of sodium cyanide *Pseudomonas* sp. combinations being 32 to 36 ° C with the pH 9.5 which favors this process.

Keywords: Degradation, sodium cyanide, *Pseudomonas*, titulometric method

INTRODUCCIÓN

Los cianuros son considerados contaminantes debido a su alta toxicidad para todos los organismos aeróbicos, reaccionan con iones metálicos de enzimas tales como Fe, Zn y Cu, es un inhibidor irreversible de enzimas que participan en la cadena respiratoria a nivel mitocondrial, específicamente reacciona con la forma oxidada del citocromo a_3 ^{1,2}; la concentración entre 150 y 300 ppm es letal para el ser humano y a niveles de 50 ppm se puede percibir con el olfato, a pesar de que el cianuro es un compuesto altamente nocivo, se produce naturalmente por mecanismos como la cianogénesis y síntesis de etileno³, pero también es transformado por mecanismos de detoxificación biológica^{4,5}, alcanzándose así un equilibrio ambiental relativo.

Dentro de las formas más tóxicas se tiene el ion cianuro (CN⁻) y el cianuro de hidrogeno (HCN) el cual es letal con una dosis de 90 a 100 ppm y puede ser percibida desde los 20 a 30 ppm ^{3,6}. La vida media del cianuro de hidrógeno en la atmósfera es de aproximadamente 1 a 3 años, este se encuentra principalmente como cianuro de hidrógeno gaseoso; mientras que una pequeña cantidad como finas partículas de polvo. Los compuestos de cianuro se mueven con bastante facilidad en el suelo, formándose cianuro de hidrógeno que luego se evapora; otros compuestos de cianuro se transforman a otras formas químicas por la acción de microorganismos en el suelo. En concentraciones altas, el cianuro es tóxico a estos microorganismos ya que permanece sin ser cambiado a otras formas y atraviesa el suelo llegando hasta el agua subterránea⁷. Las distintas formas de exposición a este compuesto para algunos animales y humanos son: Al respirar aire cerca de sitios de desechos peligrosos que contienen cianuro; al beber agua, tocar tierra o comer alimentos que contienen cianuro de manera natural como algunos tipos de frijoles y almendras, el humo de cigarrillos y el humo proveniente de incendios, son fuentes importantes de cianuro^{3,8}.

En la actualidad, grandes cantidades de cianuro en sus distintas formas son descargados a diario en suelos, aguas y aire procedente de diferentes actividades industriales tales como la minería, en el proceso de recuperación de oro⁹, actividades de electrólisis de aluminio, que se realizan para recubrir la superficie del metal y protegerlo contra la corrosión¹⁰, carbonización de madera empleada para cocinar, llamada también pirolisis y gasificación de carbón o gasificación por pirolisis rápida¹¹, producciones farmacéuticas y producción de fibras sintéticas como plásticos¹².

En Perú, el 20 % de la producción minera aurífera es informal, lo cual hace que la problemática de la contaminación por cianuro, mercurio y otros desechos tóxicos se agudice aún más, debido al poco control del cumplimiento de las normas que regulen sus usos y emisiones al ambiente, contaminando el suelo, aire y agua. Entre los departamentos más afectados tenemos a Madre de Dios, La Libertad y Cajamarca, siendo Madre de Dios donde se centra el 96% de la minería informal¹³.

Existen métodos de tratamientos químicos para degradar el cianuro que generalmente se basan en la cloración alcalina¹⁴, pero no son muy recomendables, debido a que en ellos se utilizan reactivos que causan otro tipo de contaminación, es el caso de los tratamientos de cianuro mediante su oxidación con hipoclorito de calcio, produciéndose cianato de calcio y finalmente cloruro de cianógeno y organoclorados, liberándose al medio ambiente cloro residual y cloruros¹⁵. Entre los efectos que estos compuestos pueden causar a largo plazo, se pueden mencionar: carcinogénesis, mutagénesis, teratogénesis, enfermedades respiratorias y encefalopatías crónicas¹⁶; por lo tanto se hace necesario recurrir a otros tratamientos complementarios, que controlen la liberación de los nuevos contaminantes cuya acumulación llega a ser igual o más dañino que el mismo. También existen métodos biológicos para la degradación de cianuro, utilizando algunas especies de hongos, tales como *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Gliocladium virens* y *Trichoderma koningii*, sin embargo, las bacterias también son buenos degradadores de cianuro y dentro de ellos tenemos algunas especies de los generos *Bacillus* y *Pseudomonas*¹⁷, este último género es considerado entre los mejores para la degradación de cianuro debido a su versatilidad metabólica, ya que tiene una amplia capacidad oxidativa y una alta adaptabilidad para utilizar una gran variedad de sustancias químicas como fuente de carbono y nitrógeno; es también muy tolerante a ambientes alcalinos y con muy poca cantidad de nutrientes^{18,19}.

Los estudios realizados anteriormente demuestran la capacidad de un extracto celular de *Ps. putida* para utilizar el cianuro como única fuente de carbono y nitrógeno. En los ensayos las células crecieron en presencia de cianuro de sodio (NaCN) y se midió la habilidad enzimática para convertir el cianuro en amonio a pH 7.5 y pH 9.5²⁰. Asimismo, se hizo una propuesta de detoxificación de ambientes

mineros mediante métodos químicos y biológicos, para estos últimos propone condiciones de degradación hasta de 700 ppm de cianuro de sodio, realizando mediciones de la concentración residual de cianuro mediante los métodos titulométrico, colorimétrico y por conductividad iónica, aunque recomienda este último por ser más seguro para el operario, se considera muy útil el método titulométrico cuando las concentraciones de cianuro que se van a medir son tan altas²¹.

En el 2004 se aisló una cepa de *Ps. pseudoalcaligenes* CECT5344, utilizando un medio de cultivo mínimo preparado sin amonio y citrato, a pH 9.5 con 100ppm de NaCN y 50 mM de acetato como únicas fuentes de nitrógeno y carbono respectivamente, durante el proceso de degradación de cianuro, el microorganismo fue capaz de crecer en medios alcalinos, hasta pH de 11.5 siendo 9 el pH óptimo para la degradación de cianuro y tolerar concentraciones de 1400 ppm de cianuro libre; el crecimiento del microorganismo fue concomitante y proporcional a la degradación de cianuro, el cual fue estequiométricamente convertido en amonio, adicional al cianuro el microorganismo utilizó como fuente de carbono amonio, nitrato y cianato: todo el cianuro y amonio fueron asimilados, la actividad enzimática de la cianasa se indujo durante el crecimiento del microorganismo en presencia de cianuro o cianato, pero no con amonio o nitrato como fuente de carbono; los resultados sugieren que el cianato puede ser un intermediario en la ruta de degradación del cianuro, pero no se excluyen en este trabajo otras rutas alternas para la degradación del cianuro²².

La biotecnología microbiana es una opción que cada vez impacta más el campo de la producción limpia, ofreciendo de esta forma otra solución al problema de acumulación de cianuro en el medio ambiente ⁶. Sin embargo en el Perú no se toma importancia al estudio e investigación de técnicas y procesos, que con ayuda de microorganismos aporten a la degradación de este compuesto de manera no tóxica, tampoco se ha encontrado antecedentes acerca de la influencia que tienen la combinación de temperaturas y pH en la degradación de cianuro por *Pseudomonas* sp. La presente investigación tuvo como objetivo determinar el efecto de las temperaturas de 32 y 36°C en combinación con los pH 9.5, 10, y 10.5 sobre la degradación de cianuro de sodio por *Pseudomonas* sp.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material biológico:

- Cultivo de *Pseudomonas* sp. aislado a partir de lodos activos de la planta de tratamiento de aguas residuales de Covicorti, Trujillo.
- Cianuro de sodio (20 g) procedente de la mina San Luis S.R.L. de la provincia de Patate, región La Libertad, Perú.

Recolección de la muestra

Se recolectaron aproximadamente 200 ml de lodo activo en tres frascos estériles, de 3 puntos referenciales de las pozas de oxidación de la planta de tratamiento de aguas residuales de Covicorti-Trujillo (Perú), los cuales fueron transportados posteriormente en un cooler hacia el Laboratorio de Microbiología Ambiental en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional De Trujillo donde se mezclaron homogéneamente y enriquecieron para finalmente aislar un cultivo puro de *Pseudomonas* sp.

Enriquecimiento de la muestra con cianuro de sodio

En este enriquecimiento se empleó 100 ml de caldo un medio mínimo de sales (0.005 % de K₂HPO₄, 0.2% de Na₂SO₄, 0.003% de NaCl, 0.1% de MgSO₄) y buffer carbonato a pH 9, a este caldo se le adicionó 500 ppm de cianuro de sodio como fuente de carbono y nitrógeno, finalmente se añadió 10 ml de la muestra de lodo activo. Se homogenizó por 5 minutos y fue incubado a temperatura ambiente por 3 días ^{4,6}.

Aislamiento e identificación de *Pseudomonas* sp:

Para el aislamiento de *Pseudomonas* sp. se utilizó: Agar Cetrimide (medio selectivo) el cual una vez sembrado fue incubado a 42°C x 48 horas. La comprobación de la pureza del cultivo de *Pseudomonas* sp. se realizó mediante crecimiento en agar MacConkey e identificación bioquímica usando pruebas tales como: TSI, LIA, SIM, citrato, indol, oxidasa y catalasa; adicionalmente se realizó también una coloración Gram y observación microscópica de la bacteria con lo que se corroboró su morfología y clasificación Gram.

Preparación del inóculo y estandarización

El inóculo utilizado estuvo dado por una población celular en 24 ml de solución buffer carbonato a pH 9, el que se comparó con el tubo N°3 del Nefelómetro de Mac-Farland. Adicionalmente para corroborar la cantidad real de bacterias ingresadas se realizó una siembra del inóculo en agar cetrimide a diluciones 10^{-6} y 10^{-7} y luego de 24 horas de incubación a 36°C se procedió al recuento respectivo²⁶.

Ejecución del bioensayo.

Se agregó 4 ml de inóculo de *Pseudomonas* sp. (1.3×10^9) en 6 matraces Erlenmeyer, cada uno con un volumen de 100 ml de un caldo mínimo de sales con buffer carbonato y cianuro de sodio (NaCN) a 1000 ppm. Como controles, se usaron 6 matraces adicionales, con las mismas condiciones pero sin inóculo y se realizaron mediciones de la concentración residual de cianuro cada 24 horas, durante un periodo de 6 días, tanto en los matraces inoculados como en los controles.)

Las condiciones que se utilizarán para cada bioensayo se describen a continuación:

- Dos matraces Erlenmeyer conteniendo 100 ml del caldo mínimo de sales (K_2HPO_4 0.005%, NaH_2PO_4 0.2%, NaCl 0.003%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%, y buffer carbonato) mas 1000 ppm de cianuro de sodio a pH 9.5 se inocularon con *Pseudomonas* sp.; uno de ellos se mantuvo a 32°C y el otro a 36°C durante 6 días. Como control se tuvo dos matraces Erlenmeyer con las mismas condiciones pero sin inóculo bacteriano.
- Dos matraces Erlenmeyer conteniendo 100 ml del caldo mínimo de sales (K_2HPO_4 0.005%, NaH_2PO_4 0.2%, NaCl 0.003%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%, y buffer carbonato) mas 1000 ppm de cianuro de sodio a pH 10 se inocularon con *Pseudomonas* sp.; uno de ellos se mantuvo a 32°C y el otro a 36°C durante 6 días. Como control se tuvo dos matraces Erlenmeyer con las mismas condiciones pero sin inóculo bacteriano.
- Dos matraces Erlenmeyer conteniendo 100 ml del caldo mínimo de sales (K_2HPO_4 0.005%, NaH_2PO_4 0.2%, NaCl 0.003%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%, y buffer carbonato) mas 1000 ppm de cianuro de sodio a pH 10.5 se inocularon con *Pseudomonas* sp.; uno de ellos se mantuvo a 32°C y el otro a 36°C durante 6 días. Como control se tuvo dos matraces Erlenmeyer con las mismas condiciones pero sin inóculo bacteriano.

Los ensayos se realizaron en condiciones aeróbicas sólo con la boca de los matraces Erlenmeyer cubierta por tapones de algodón. Se realizaron 3 repeticiones de cada uno de los ensayos.

Medición de la biodegradación de cianuro de sodio por *Pseudomonas* sp:

La concentración de cianuro residual fue medida por el método titulométrico, cada 24 horas durante 6 días, tanto en los matraces inoculados como en los controles²⁶.

Análisis estadístico.

Los datos obtenidos de la cantidad de cianuro residual en el sexto día de evaluación fueron evaluado mediante Análisis de Varianza (ANAVA) y la prueba de TUKEY para determinar el grado de significancia entre cada una de las combinaciones de temperatura y pH. Esto se realizó con el programa estadístico IBM SPSS statistics versión 20.

RESULTADOS

Se aisló e identificó un cultivo de *Pseudomonas* sp. procedente de las pozas de oxidación de Covicorti-Trujillo (Perú), con capacidad de degradar concentraciones de 1000 ppm de cianuro de sodio y tolerar un pH hasta de 10.5.

En la tabla 1, se muestra que la concentración media residual de cianuro de sodio en caldo mínimo de sales con buffer carbonato durante seis días de tratamiento con *Pseudomonas* sp. a temperaturas de 32 y 36°C en combinación con los pH 9.5, 10 y 10.5 fue realmente distinta ($p < 0,05$)

En la tabla 2, se muestra la degradación media acumulada de cianuro de sodio en caldo mínimo de sales con buffer carbonato por *Pseudomonas* sp. a lo largo de seis días de tratamiento con temperaturas de 32 y 36°C en combinación con los pH 9.5, 10 y 10.5; observándose máxima degradación sp. a $36^{\circ}\text{C}/\text{pH}$ 9.5 (655ppm) y $32^{\circ}\text{C}/\text{pH}$ 9.5 (648 ppm) pero mínima degradación a $36^{\circ}\text{C}/\text{pH}$ 10.5(203 ppm).

En la Fig. 1 se muestra los porcentajes de degradación total de cianuro de sodio en caldo mínimo de sales con buffer carbonato a 1000 ppm por *Pseudomonas* sp. después de 6 días de tratamiento a temperaturas de 32°C y 36°C en combinación con los pH 9.5, 10, 10.5 .

Tabla 1. Concentración media residual de cianuro de sodio en caldo mínimo de sales con buffer carbonato inoculado con *Pseudomonas* sp. durante seis días a temperaturas de 32 y 36°C en combinación con los pH 9.5, 10 y 10.5.

Concentración media residual (ppm)							
Tratamiento	Días						
	0	1	2	3	4	5	6
Control	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000 ^a
32°C / 9.5	1000	849	697	524	442	379	352 ^b
32°C / 10	1000	898	783	702	663	627	594 ^c
32°C / 10.5	1000	961	930	887	848	825	788 ^d
36°C / 9.5	1000	837	669	513	437	386	345 ^b
36°C / 10	1000	906	814	724	656	602	580 ^c
36°C / 10.5	1000	957	906	865	835	812	797 ^d

(a,b,c,d) Letras distintas presentan diferencia significativa (p <0.005)

Tabla 2. Degradación media acumulada de cianuro de sodio en caldo mínimo de sales con buffer carbonato por *Pseudomonas* sp. a lo largo de seis días de tratamiento a temperaturas de 32 y 36°C en combinación con los pH 9.5, 10 y 10.5.

Degradación media acumulada (ppm)							
Tratamiento	Días						
	0	1	2	3	4	5	6
Control	0	0	0	0	0	0	0
32°C / 9.5	0	151	303	476	558	621	648
32°C / 10	0	102	217	298	337	373	406
32°C / 10.5	0	39	70	113	152	175	212
36°C / 9.5	0	163	331	487	563	614	655
36°C / 10	0	94	186	276	344	398	420
36°C / 10.5	0	43	94	135	165	188	203

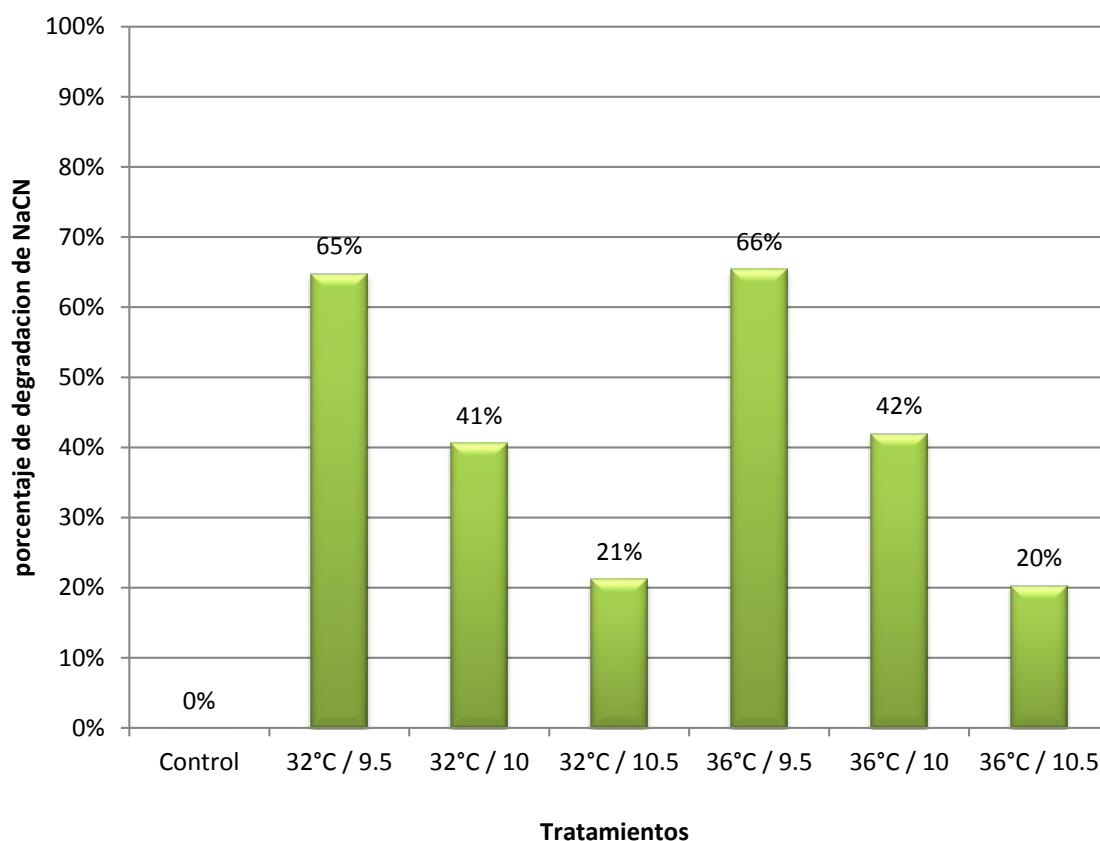


Fig. 1. Porcentajes de degradación total de cianuro de sodio en caldo mínimo de sales con buffer carbonato por *Pseudomonas* sp. después de 6 días de tratamiento a temperaturas de 32 y 36°C en combinación con los pH 9.5, 10 y 10.5.

DISCUSIÓN

El trabajo se inició con un enriquecimiento de la muestra recolectada (lodo activo); con la finalidad de contribuir a que las *Pseudomonas* presentes en la muestra encuentren una ruta degradativa para el cianuro de sodio y puedan usarlo como fuente de carbono y nitrógeno, seleccionando de esta manera *Pseudomonas* que sean capaces de degradarlo y también de tolerar un pH alcalino en donde el cianuro no se volatilice¹⁴.

Para el aislamiento de *Pseudomonas* sp se utilizó un medio selectivo que fue agar cetrimide, el cual está compuesto de amonio cuaternario que es un inhibidor de gran variedad de especies bacterianas incluyendo muchas especies del genero *Pseudomonas*, lo que permite obtener un cultivo de este género más selectivo; la producción del pigmento piocianina se ve estimulada por el magnesio, cloruro de potasio y sulfato presentes en el medio. La tinción Gram, crecimiento en agar Mac Conkey y pruebas bioquímicas confirman que efectivamente el cultivo aislado fué *Pseudomonas* sp.^{1,18}.

Una de las pruebas de confirmación para asumir que el cultivo aislado fue *Pseudomonas* sp es el crecimiento en agar Mac Conkey que es un medio selectivo para bacterias Gram negativas, en este medio el viraje del color del indicador de pH (rojo neutro) se produce por fermentación de la lactosa presente en el medio ocasionando la disminución del pH alrededor de la colonia. Los microorganismos no fermentadores de lactosa como *Pseudomonas* sp. producen colonias incoloras o amarillas, esto también se evidencio en el crecimiento obtenido en Mac Conkey durante esta investigación^{18,24}.

Pseudomonas sp. es una bacteria que no degrada sacarosa, lactosa ni glucosa con formación de ácidos y que tampoco elimina ácido sulfhídrico luego de degradar el tiosulfato, esto se hace evidente en la prueba bioquímica que usa el medio agar hierro tres azucares (TSI) el cual manifiesta alcalinidad tanto para la degradación de lactosa y sacarosa como para glucosa con la usencia de ácido sulfhídrico (K/K-); otra prueba bioquímica realizada fue la descarboxilación de la lisina cuyo resultado es negativo para *Pseudomonas* sp. esto se evidenció con un color violeta del medio agar lisina hierro (LIA) donde fue sembrado el cultivo aislado. El crecimiento en medio SIM que se utiliza para

observar la motilidad de los microorganismos, *Pseudomonas* sp. presenta una motilidad negativa en este medio lo cual también sucedió con el cultivo aislado²⁴. La última prueba bioquímica realizada en medios sólidos fue la del uso del citrato como única fuente de carbono donde el cultivo aislado dio positivo, lo cual es compatible con la bacteria *Pseudomonas* sp.²².

Pruebas como la catalasa, oxidasa e indol también fueron realizadas al medio de cultivo aislado para determinar la presencia de enzimas que confirmen que este cultivo es *Pseudomonas* sp. Los resultados obtenidos en estas pruebas fueron los esperados ya que dieron positivo para las pruebas de catalasa y oxidasa, pero negativo para la prueba de indol¹⁸.

Las bacterias del género *Pseudomonas* tienen requerimientos nutricionales muy simples, ya que pueden utilizar más de 100 compuestos como fuente de carbono y energía, entre ellos el cianuro y poseen también una variedad de operones inducibles por lo cual nutricionalmente son un género muy versátil, esto hace que varias especies de este género sean muy importantes en procesos de biorremediación²¹.

La biodegradación del cianuro podría ser una opción a los procedimientos industriales. Los métodos biológicos y particularmente los microbiológicos, se constituyen en alternativas eficientes, porque son específicos, respecto a los focos en los que se pretende que actúen y luego de estandarizarse, pueden resultar muy económicos, respecto a los procesos químicos. Otra ventaja de estos procesos es su diseño simple y el control que se posee del proceso operativo, los bajos costos de las sustancias químicas y la capacidad de tratar por este método todas las formas de cianuro y subproductos^{12,22,23}.

Existen en la naturaleza organismos capaces de crecer en presencia de cianuro, tal es el caso de *boleophthalmus boddaerti*, una especie de pez que tolera ciertas concentraciones de cianuro en el ambiente, esta tolerancia no envuelve la capacidad de degradarlo, como es el caso de algunas especies del género *Pseudomonas*³⁰, las cuales poseen las herramientas enzimáticas necesarias para sobrevivir en ambientes altamente contaminados con cianuro y tienen la capacidad de degradarlo utilizándolo como fuente de carbono^{14,20} y de nitrógeno^{26,27}, este poder de degradación está reflejado en los resultados obtenidos en la presente investigación: la concentración media y la degradación media de cianuro de sodio en un medio de cultivo inoculado con *Pseudomonas* sp. a lo largo de 6 días a temperaturas de 32 y 36°C en combinación con los pH 9.5, 10 y 10.5; se observa también que en todos los tratamientos establecidos *Pseudomonas* sp. redujo la concentración de cianuro inicial en todos los caldos de cultivo donde se inoculó dando una diferencia significativa entre estos ($p < 0.05$).

de sodio en medio mínimo de sales con buffer carbonato después de 6 días de tratamiento a temperaturas 32°C y 36°C en combinación con los pH 9.5, 10, 10.5; observándose que a los rangos de temperatura y pH usados en el presente estudio, la degradación de cianuro de sodio por *Pseudomonas* sp. es inversamente proporcionales al aumento del pH y que la temperatura no ejerce efecto sobre este proceso. En el análisis estadístico realizado por la prueba de tukey no existe diferencia significativa entre los datos de degradación obtenidos bajo el mismo pH tanto para la temperatura de 32 y 36°C, pero si evidencia diferencia significativa entre los datos obtenidos bajo pH diferentes. Esto evidencia que la temperatura no ejerce efecto significativo respecto a la capacidad de degradar cianuro de sodio por *Pseudomonas* sp.; sin embargo, los pH evaluados de 9.5, 10, 10.5 tiene una gran influencia en la capacidad degradadora de la bacteria sobre el cianuro sodio. Dichos resultados se debe a que en los rangos de temperatura y pH evaluados para la degradación de cianuro, el pH ejerce un mayor afecto sobre los procesos de transporte a través de la membrana celular, ya que *Pseudomonas* sp. es una bacteria que crece preferentemente a pH neutro y con rangos de temperatura mesófilos^{21,29}.

En estudios realizados determinan que algunas especies de *Pseudomonas* poseen oxidasas insensibles al cianuro, las cuales pueden seguir funcionando con altas concentraciones del mismo. Además cuando se produce estrés se activaban una serie de mecanismos de seguridad que incluían a la alquil hidropéroxido reductasa, la cual sustituye a la catalasa en las funciones de protección frente al estrés oxidativo. También se producen HSP (proteínas de choque térmico) estas moléculas no sólo defienden a las proteínas de las altas temperaturas, también lo hacen contra otros fenómenos que provocan desnaturalización, tales como como el pH. Esto pudo haberse dado en el proceso de degradación de cianuro de sodio por el cultivo de *Pseudomonas* sp. aislado ya que fue resistente a una concentración alta de cianuro (1000 ppm) y a pH de hasta 10.5²⁴.

Luque en el 2005, establece que en condiciones fuertemente alcalinas y utilizando el cianuro como única fuente de carbono para la cepa *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344, los compuestos como el hierro y algunas sustancias orgánicas reaccionan químicamente con el cianuro, afectando el

crecimiento de los microorganismos, esto debido a que el cianuro se asocia con estos elementos formando complejos, de los cuales el microorganismo no puede obtener carbono ni nitrógeno fácilmente. Sin embargo la limitación de hierro en el medio de cultivo sugieren la producción de sideróforos por parte del aislado bacteriano, aunque este metabolito no fue medido en el medio residual, es importante considerar esta variable para trabajos futuros ya que estos metabolitos son de gran interés en la agricultura para el control de algunas bacterias y hongos fitopatógenos^{28,29}.

Durante la evaluación de la degradación de cianuro de sodio se observa que los días 1, 2 y 3 a comparación de los posteriores, se presentó un mayor porcentaje de biodegradación de cianuro de sodio en todos los tratamientos evaluados; estos resultados coinciden con otros trabajos donde se demuestra que las formas de cianuro libre, CN⁻ provenientes de las formas NaCN, KCN, etc., se biodegradan más rápidamente que las formas de cianuro asociadas a complejos metálicos tales como (K₂Ni(CN)₄) y (K₃Fe(CN)₆)³⁰. también se encontró que la limitación de nutrientes como el fosforo incrementa la toma de carbono por parte de las células, lo cual pudo haber favorecido que *Pseudomonas* sp. degrade el cianuro utilizándolo como fuente de carbono³⁶. Es por esto que la composición del caldo mínimo de sales utilizado en los tratamientos presenta muy poco porcentaje de fosforo y potasio (0.005%). Otro motivo por el cual la biodegradación d cianuro de sodio es más rápida en los 3 primeros días y se estabiliza a partir del 4 día sería por el aumento en la concentración de amonio ya que el microorganismo tomaría el amonio como fuente de nitrógeno dejando la toma del cianuro de sodio para cuando la concentración de amonio vuelva a descender^{5,18,19}.

La proporción HCN/ CN⁻ depende fundamentalmente del pH. El elevado pKa del cianuro (9), implica que a pH neutro o ácido, este compuesto se volatilice en forma de HCN. Desde el punto de vista químico la eliminación biológica del cianuro requiere condiciones alcalinas y una fuente de carbono incapaz de reaccionar químicamente con el cianuro como lo es el buffer carbonato a pH 9.6²⁹.

En los controles con caldo mínimo de sales y buffer carbonato a los pH de 9.5, 10, 10.5 en combinación con las temperatura 32 y 36°C, se observa una retención del el 100% de cianuro después de 6 días de tratamiento, observar lo que evidencia la no volatilización del cianuro del medio y el poder de degradación de *Pseudomonas* sp. sobre el cianuro de sodio, ya que en dichos controles no se inoculó la bacteria. La retención del cianuro de sodio es debido a que el pH es el factor determinante para mantener al cianuro en una forma estable no volátil y que la temperatura no ejerce efecto sobre la retención de cianuro en el medio, a esta conclusión también se ha llegado en otros trabajos donde se ha demostrado que el pH es factor clave en estos procesos^{30,31}.

Se eligió usar Buffer carbonato para realizar los bioensayos, pues no reacciona con el cianuro formando complejos u otras sustancias toxicas y porcentaje de recuperación de cianuro es aceptable y se garantiza la estabilidad del pH durante el tiempo de los bioensayos. En trabajos con células neuronales de gatos se ha verificado que el buffer carbonato es un medio eficiente en conservar el pH estable a través del tiempo y mantener las concentraciones de cianuro constante. También es importante resaltar que el cultivo aislado de *Pseudomonas* sp., se ajusta a las condiciones de pH requeridas para la biorremediación de compuestos cianurados, pues toleró los medios con pH 9.5, 10,10.5, sobrepasando la tolerancia de aislados pertenecientes a la misma especie evaluados en otros estudios, a pH de 7.0, 7.5 y 9.5^{5,33}.

Investigaciones como la realizada por Kunz encontraron que *P. fluorescens* NCIMB11764 fue eficaz en la remoción de formas simples de CN⁻ (KCN) en las primeras 72 horas, utilizando el compuesto cianurado como único inductor enzimático. En este caso el cianuro induce la producción de cianuro oxigenasa y se obtiene como productos de conversión enzimática CO₂, NH₃ y α-cetoácidos como coproductos⁵. Esta podría ser una de las vías que utiliza la bacteria durante la degradación del cianuro de sodio sin embargo dichos productos no fueron medidos en esta investigación. Cabe resaltar también que es posible que la biodegradación no haya sido totalmente completa y en el medio permanezcan compuestos intermedios entre cianuro y amonio, como cianatos, tiocianatos y formatos^{31,34}. Por el contrario, todo el cianuro pudo ser convertido a amonio y éste, por procesos de nitrificación pasar a nitritos y nitratos o por procesos de regeneración a α-cetoácidos, en presencia de CO₂^{33,34}.

CONCLUSIONES

- Se aisló *Pseudomonas* sp. a partir de lodos activos de la planta de tratamiento de aguas residuales de Covicorti, Trujillo (Perú) capaces de degradar cianuro de sodio y tolerar un pH de 10.5.
- La combinación de las temperaturas 32 y 36°C con los pH 9.5, 10, 10.5 influyen sobre la degradación de cianuro de sodio por *Pseudomonas* sp. observándose máxima degradación al combinar las temperaturas 32 y 36°C con el pH 9.5, con valores de 648 y 655 ppm de cianuro de sodio degradado para cada combinación respectivamente; Por otro lado la mínima degradación de cianuro de sodio se obtuvo bajo el pH 10.5 con un valor de 312 ppm a 32°C y 203 ppm a 36°C.
- Se encontró diferencia significativa entre los controles y todos los tratamientos utilizados para degradar cianuro de sodio por *Pseudomonas* sp. en el presente estudio.
- No se encontró diferencia significativa entre aquellos tratamientos que usaron el mismo pH, sin importar la temperatura con las que se combinaron; es así que no se encontró diferencia significativa entre los tratamientos de 32°C/pH 9.5 con 36°C/pH 9.5, 32°C/ pH 10 con 36°C/ pH 10 y 32°C/pH 10.5 con 36°C/ pH 10.5.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Terri C, Jeffrey R. Direct determination of free cyanide in drinking water by ion chromatography with pulsed amperometric detection. *J Chromatography A*. 2007; 46: 31-39
2. Knowles C. Cyanide utilization and degradation by microorganisms. En: Ciba Foundation Symposium. 140: 1988, p.3-15
3. Kunz D, Chen J, Guangliang P. Accumulation of α -Keto Acids as Essential Components in Cyanide Assimilation by *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764. *Applied and Environmental Microbiology*. 1998;64(11): 4452-4459
4. Restrepo O, Montoya C, Muñoz N. Degradación microbiana de cianuro procedente de plantas de beneficio de oro mediante una cepa nativa de *P. fluorescens*. Universidad Nacional de Medellín. 2006;73(149): 45-51
5. Quiroga P, Olmos. Revisión de la toxicocinética y la toxicodinamia del ácido cianhídrico y los cianuros. *Acta Toxicol. Argent.* 2009; 17 (1): 20-32
6. Sancho J, Fernández B, Alaya J, García M, Lavandeira A. Aplicación del permanganato potásico para la eliminación de cianuros de cobre en aguas residuales de una planta de lixiviación en una mina de oro (II): ensayos en planta piloto. *Rev. met.* 2011; 47 (3): 224-233.
7. Quispe L, Arteaga M, Cardenas E, Lopez L, Santelices C, Palanque E, Cabrera S. Eliminación de cianuro mediante sistema combinado UV/H₂O₂/TiO₂. *Revista Boliviana de química*. 2011;28 (2): 113-118
8. Akcil A, Mudder T. Microbial destruction of cyanide wastes in gold mining: process review. *Biotechnology Letters*. 2003; 25(6): 445-50.
9. Chung B. Control de los contaminantes químicos en el Perú. *Rev Peru Med Salud Pública*. 2008; 25(4): 413-418.
10. Gaviria A. Análisis de alternativas para la degradación de cianuro en efluentes líquidos y sólidos del municipio de Segovia, Antioquia en la planta de beneficio de la empresa mineros nacionales, municipio de Marmato, redalyc. 2006; 73(149): 31-34.
11. Burbano D, Fajardo A, Burbano D, Burbano E, Apraiz N, Moreano M. estudio de métodos químicos de remoción de cianuro presente en residuos de cianuración provenientes del proceso de extracción de oro de venta en el departamento de Nariño. *revista.luna.azul*. 2010; 31: 8-16
12. Aguldelo R, Betancur J, Jaramillo C. Biotratamiento de residuos cianurados y su relación con la salud pública. *Rev. Fac. Nac. Salud Publica*. 2010; 28(1): 7-20
13. Blas J. aislamiento y selección de bacterias degradadoras de cianuro a partir de relaves mineros, procedentes de la sierra del departamento de la libertad. Tesis de Biólogo Microbiólogo. Ciencias biológicas: Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú. 2008
14. Kunz D, Nagappan O, Avalos S, Delong G. Utilization of cyanide as nitrogenous substrate by *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764: evidence for multiple pathways of metabolic conversion. *App Environ Microbiol* 1992; 58(6): 2022-2029.
15. Fernandez R, Kunz D. Bacterial Cyanide Oxygenase Is a Suite of Enzymes Catalyzing the Scavenging and Adventitious Utilization of Cyanide as a Nitrogenous Growth of Substrate. *J Bacteriol* 2005; 187(18): 6396-6402.

16. Babu G, Vijaya O, Ross V, Wolfran J, Chapatuala K. Cell-free extract(s) of *Pseudomonas putida* catalyzes the conversion of cyanides, cyanatos, thiocyanates, formamide, and cyanide containing mine waters into ammonia. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1996; 45 (1-2): 273-277.
17. Montoya C. Cianuro, oro y medio ambiente en la minería del nordeste antioqueño. *Rev Facultad de Ingeniería*. 2001; 5 (22): 43-49.
18. Luque V. Characterization of the cyanase from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344, an enzyme that is not essential for cyanide assimilation. *Environmental Microbiology*.2004; 15(1): 253–270.
19. Mac Faddin, Jean F. *Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica*. Tercera edición. Madrid. Panamericana. 2003; P.632-634.
20. Dimitry Y, et al. Microbial Thiocyanate Utilization under Highly Alkaline Conditions. *Appl Environ Microbiol*, 2001; 67(2): 528-538
21. Reyes I, Samillan C, Ñique W. tecnología enzimática para la eliminación de cianuro y xantano etílico de potasio en relaves de la minera en función de pH del medio, concentración de reactivo FPL, tiempo y velocidad de agitación. *SCIENDO*. 1998; 1(1): 35-40.
22. Chew S. Comparative Physiology and Biochemistry Cyanide detoxification in the mudskipper, *Boleophthalmus boddarti*. *Journal of Experimental Zoology*,2005; 15(2): 1-8
23. Knowles C. Cyanide utilization and degradation by microorganisms. *Ciba Foundation Symposium*. 1988;140: 3-15
24. Dhillon J K, Shivaraman N. Biodegradation of cyanide compounds by a *Pseudomonas* species. *Canadian Journal Of Microbiology*.1999; 45 (3): 201-208
25. Quentin M y Weiser R. *Bacteriología y Micología Médica*. 2º ed. México: Interamericana Mac Graw – Hill; 1991
26. Chen J, Kunz D. Cyanide utilization in *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764 involves a putative siderophore. *FEMS Microbiology Letters* .2006; 156:61-67.
27. Díaz M, Villa P; Frías A. Evaluation of the siderophores production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Latinoamer Microbiol*. 2002; 44(3) :112-117.
28. Anders M, Persson D; Goran L. Physiological and Morphological Changes Induced by Nutrient Limitation of *Pseudomonas fluorescens* 378 in Continuous Culture. *Applied and Environmental Microbiology*.1990; 56(3): 686-692
29. Marder L, Guilherme O, Bernardes A. Removal of Cadmium and Cyanide from Aqueous Solutions through Electrodialysis. *Rev. Latinoamer Microbiol*. 2003; 14(4): 610-615.
30. Luque V. Metabolismo del cianuro y del cianato en *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. *Aplicaciones biotecnológicas*. Andalucía. *Analistas económicos*. 2005:187-189.
31. Riani J, Leao V. The elution of metal cyanocomplexes from polyacrylic – and polystyrene – based ion exchange resins using nitrate and thiocyanate eluants. *Brazilian J Chemical Engin*. 2007; 24(3): 421-431.
32. Wang C, Kunz D, Venables B. Incorporation of Molecular Oxygen and Water during Enzymatic Oxidation of Cyanide by *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764. *Applied Environmental and Microbiology*. 1996; 62(6): 2195–2197.
33. Figueira M, Ciminelli V, Andrade M. Cyanide degradation by an *Escherichia coli* strain. *Canadian Journal of Microbiology*. 1996; 42(5): 519-23.
34. Akcil A, Mudder T. Microbial destruction of cyanide wastes in gold mining. *Biotechnol Letters*.2003; 25(6): 445-50.