

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN - TACNA

Facultad de Ciencias

Escuela Académico Profesional de Biología-Microbiología

“Degradación de cianuro en efluentes líquidos
cianurados por bacterias biorremediadoras
en condiciones de laboratorio”

TESIS

Presentada por:

Bach. Milena Carpio Mamani

Para optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO MICROBIÓLOGO

TACNA - PERÚ

2014

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE BIOLOGÍA – MICROBIOLOGÍA

Tesis N° 218

TÍTULO PROFESIONAL DE:
BIÓLOGO MICROBIÓLOGO

El secretario Académico de la Facultad de Ciencias, certifica que por resolución de Facultad N° 7821-2014-FACI-UNJBG, el consejo de facultad designó como jurado para la sustentación de tesis: **“Degradación de cianuro en efluentes líquidos cianurados por bacterias biorremediadoras en condiciones de laboratorio”**

El mismo que estuvo conformado por:

Presidente : MSc, César Efraín Rivasplata Cabanillas
Secretario : Dr. Cesar Julio Cáceda Quiroz
Vocal : Mblgo. Luis Lloja Lozano

Para examinar y calificar la sustentación del informe de tesis en acto público, en el auditorio de la Facultad de Ciencias de la UNJBG, el día 15 de Julio del 2014 a las 10:00 am.

Presentado por la Bachiller Milena Carpio Mamani de la Escuela Académico Profesional de Biología – Microbiología.

El jurado calificador en forma secreta e individual se pronunció acerca de su calificativo sobre el informe expuesto y procedió a emitir el siguiente veredicto: **APROBADO** por **UNANIMIDAD** con la nota de 16 (dieciséis), con el calificativo de bueno.

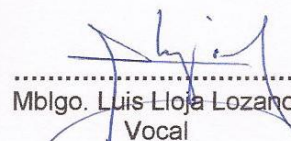
Para ratificar lo detallado firman:



.....
MSc. César Efraín Rivasplata Cabanillas
Presidente



.....
Dr. César Julio Cáceda Quiroz
Secretario



.....
Mblgo. Luis Lloja Lozano
Vocal

DEDICATORIA

A mi familia, que siempre me brindaron su apoyo y confianza, en toda mi formación académica.

AGRADECIMIENTOS

A mis Asesores Blgo. Daladier Castillo Cotrina de la Facultad de Ciencias y MSc. Ing. Tolomeo Raúl Soto Pérez de la Facultad de Metalurgia de la UNJBG, por el asesoramiento para la ejecución del presente trabajo.

Al Decano de Ingeniería de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, Ing. Dante Morales por ser el nexa para poder obtener el mineral aurífero proporcionado por la empresa minera MINSUR S.A.

Al Dr. Cesar Cáceda Quiroz por el asesoramiento brindado para poder realizar el aislamiento de *Pseudomonas* sp.

Al Ing. Pastrana y Blgo. Mtblgo Carlos Oblitas por haberme facilitado los ambientes del laboratorio de la Dirección Regional de Salud Ambiental.

Al los Mtblgos. Anaceli Varela y Edwin Obando por el apoyo técnico y favores brindados.

Al egresado en Metalurgia Daniel Limache.

CONTENIDO

	Pag.
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 OBJETIVOS	4
1.2 HIPÓTESIS	
1.3 ANTECEDENTES	5
1.3.1 Problema de investigación	5
1.3.2 Problemas medioambientales por derrame de cianuro	11
1.4 REVISION BIBLIOGRÁFICA	16
1.4.1 Contaminación por cianuro a nivel mundial	16
1.4.2 Industria minera aurífera a nivel nacional	18
1.4.3 Departamento de Tacna e industria minera aurífera	20
1.4.4 El cianuro y la salud	24
1.4.5 El cianuro en el medio ambiente	29
1.4.6 Biorremediación	37
1.4.7 Cianuro	50
1.4.8 Proceso de recuperación de oro	58
1.4.9 Tratamiento de los efluentes generados en un proceso de cianuración	61
II. MATERIALES Y MÉTODOS	74
2.1 Materiales y equipos	74
2.2 Lugar de experimentación	76

2.3 Material en estudio	76
2.4 Diseño de experimentación	76
2.5 Metodología	78
2.5.1 Procedencia de mineral aurífero	78
2.5.2 Obtención de efluente líquido cianurado - Lixiviación de mineral aurífero a nivel de laboratorio	79
2.5.3 Aislamiento de <i>Pseudomonas</i> sp. nativo	84
2.5.4 Identificación de <i>Pseudomonas</i> sp.	88
2.5.5 Activación y obtención del inóculo de <i>Pseudomonas</i> sp. para la experimentación	90
2.5.6 Diseño de biorreactores	90
2.5.7 Acondicionamiento de los biorreactores para la experimentación	93
2.5.8 Experimentación de la degradación de cianuro	96
2.5.9 Evaluación de la experimentación de la degradación de cianuro	97
Detección de cianuro libre según (SOTO, 2001)	98
2.5.10 Determinación de la capacidad degradadora de cianuro libre por <i>Pseudomonas</i> sp.	99
2.5.11 Cuantificación de la capacidad degradadora de cianuro por <i>Pseudomonas</i> sp.	99

III. RESULTADOS	101
V. DISCUSIÓN	116
V. CONCLUSIONES	122
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	124
XI. ANEXOS	132
ANEXO 01. Protocolo de lixiviación de oro a nivel de laboratorio	133
ANEXO 02. Protocolo de aislamiento de <i>Pseudomonas</i> sp.	135
ANEXO 03. Protocolo de identificación de <i>Pseudomonas</i> sp.	136
ANEXO 04. Características generales de especies de <i>Pseudomonas</i> – Bergey's manual of systematic bacteriology 2004	138
ANEXO 05. Activación de <i>Pseudomonas</i> sp.	140
ANEXO 06. Esquema de biodegradación de cianuro por <i>Pseudomonas</i> sp. en biorreactores aireados	141
ANEXO 07. Determinación de cianuro libre – Método titulación con nitrato de plata.	142
ANEXO 08. Panel fotográfico	143

LISTA DE CUADRO

Cuadro 01	Empresas mineras que se encargan a la extracción de oro a nivel nacional y en la región de Tacna.	23
Cuadro 02	Concentración de cianuro presente de manera natural en plantas	30
Cuadro 03	Organismos cianogénicos	31
Cuadro 04	Biodegradación de compuestos cianurados, especie responsable y la reacción que se lleva a cabo	48
Cuadro 05	Proceso más utilizado en el tratamiento de residuos cianurados	62
Cuadro 06	Concentración bacteriana y volúmenes de solución barren a utilizar	89
Cuadro 07	Concentración de cianuro libre determinados en los biorreactores (A, B, C) con sus repeticiones (R) en 168 horas de evaluación.	101
Cuadro 08	Concentración de cianuro libre degradado en los tratamientos A, B y C en 168 horas de evaluación	103
Cuadro 09	Promedio de concentración de cianuro libre degradado en los tratamiento A, B y C en 168 horas de evaluación	104
Cuadro 10	Análisis de varianza de degradación de cianuro libre (ppm)	106

Cuadro 11	Prueba de significancia de Tukey para el factor días de evaluación en la degradación de cianuro (ppm).	107
Cuadro 12	Prueba de significancia de Tukey para el factor concentración microbiana en la degradación de cianuro libre (ppm).	109
Cuadro 13	Porcentajes de degradación de cianuro libre en los tratamiento A, B y C por Pseudomonas sp. en 168 horas de horas de experimentación.	110
Cuadro 14	Concentración máxima de cianuro libre degradado en los tratamiento A, B y C a las 168 horas de evaluación	111
Cuadro 15	Análisis de varianza de máxima concentración de cianuro libre a las 168 horas de evaluación	112
Cuadro 16	Prueba de significación de Tukey de máxima concentración de cianuro libre.	113
Cuadro 17	Tasa de degradación de cianuro libre respecto a la concentración máxima de cianuro libre degradado en los tratamientos A, B y C y el respectivo tiempo en que fue alcanzado.	114
Cuadro 18	Análisis de varianza de la tasa de degradación	114
Cuadro 19	Prueba de significación de Tukey a las 48 horas de evaluación.	115

LISTA DE GRAFICOS

Figura 01	Producción mundial de cianuro utilizado en minería	16
Figura 02	Ubicación de la empresa minera MINSUR S.A.	21
Figura 03	Ubicación del campamento minero MINSUR S.A.	22
Figura 04	Vista general de la zona de explotación de la empresa minera MINSUR S.A.	22
Figura 05	Reacción de la degradación biológica de cianuro	39
Figura 06	Formas de cianuro	43
Figura 07	Relación entre el porcentaje de degradación de cianuro libre y el pH	56
Figura 08	Proceso general de extracción de oro	59
Figura 09	Proceso detallado de la extracción de oro	77
Figura 10	Degradación de cianuro de manera natural	65
Figura 11	Lixiviación a nivel de laboratorio para la obtención de efluente líquidos cianurados	83
Figura 12	Aislamiento de <i>Pseudomonas</i> sp.	87
Figura 13	Identificación de <i>Pseudomonas</i> sp.	89

Figura 14	Activación de <i>Pseudomonas</i> sp.	92
Figura 15	Esquemas de los biorreactores diseñados y construido	93
Figura 16	Curva de concentración de cianuro libre presentes en los biorreactores A, B, y C en 168 horas de evaluación	102
Figura 17	Curvas de cianuro libre degradado por <i>Pseudomonas</i> sp. En los tratamientos (A, B, C) en 168 horas de evaluación.	105
Figura 18	Interacción de la mayor degradación de cianuro libre en 168 horas de evaluación	108
Figura 19	Interacción de la biodegradación de cianuro libre en 168 horas de evaluación	109
Figura 20	Porcentaje de degradación de cianuro libre en los tratamientos A, B y C durante las 168 horas de experimentación..	111

LISTA DE FOTOS

Foto 01	Biorreactores aireados durante el proceso de degradación de cianuro libre por <i>Pseudomonas</i> sp.	95
Foto 02	Mineral aurífero	143
Foto 03	Chancadora de 2HP para trituración del mineral	143
Foto 04	Preparación para la molienda de mineral aurífero	143
Foto 05	Tamizado de mineral aurífero (malla 100)	143
Foto 06	Pesado de mineral para el proceso de lixiviación	144
Foto 07	Estabilización del pH en el efluente líquido cianurado	144
Foto 08	Efluente líquido cianurado con cinauro de sodio	144
Foto 09	Homogenización del efluente líquido cianurado por 24 horas	144
Foto 10	Muestras cianuradas	144
Foto 11	Solución cianurada con carbón activado a 305 rpm por 24 h	144
Foto 12	Solución cianurada antes del filtrado	145
Foto 13	Efluente líquido cianurado (Solución barren)	145

Foto 14	Conservación de la solución barren para el proceso de biorremediación	145
Foto 15	Determinación de cianuro libre en la solución barren – método titulométrico	145
Foto 16	Titular la muestra hasta que observe el viraje característico	145
Foto 17	Vista general de los materiales a utilizar	145
Foto 18	Rípidos en agua destilada estéril	146
Foto 19	Siembra por agotamiento en agar glutamato	146
Foto 20	Crecimiento en agar glutamato (se observa una coloración verde amarillenta)	146
Foto 21	Selección de una colonia característica de <i>Pseudomonas</i> sp.	146
Foto 22	Crecimiento de la colonia seleccionada en Agar Glutamato	146
Foto 23	Crecimiento de <i>Pseudomonas</i> sp. en agar glutamato y agar <i>Pseudomonas</i> P	146
Foto 24	Prueba de motilidad para <i>Pseudomonas</i> sp.	147
Foto 25	Crecimiento de <i>Pseudomonas</i> sp. a 4, 36 y 41 °C	147
Foto 26	Crecimiento de <i>Pseudomonas</i> sp. en agar nutritivo	147

Foto 27	Conservación de <i>Pseudomonas</i> sp. en agar nutritivo	147
Foto 28	Activación de <i>Pseudomonas</i> sp. en caldo nutritivo	147
Foto 29	Instalación de biorreactores aireados	147
Foto 30	Solución barren e inóculos de <i>Pseudomonas</i> sp.	148
Foto 31	Toma de muestra en asepsia	148
Foto 32	5 ml de solución barren para la titulación con nitrato de plata	148
Foto 33	Medición de pH en cada tratamiento (pH=10)	148
Foto 34	Determinación de concentración de cianuro libre	148

RESUMEN

Se tuvo como objetivo evaluar a *Pseudomonas* sp. nativo como degradador de cianuro en efluentes líquidos cianurados en condiciones de laboratorio. Se aisló a *Pseudomonas* sp. Nativo de un efluente líquido cianurado (solución barren que tenía una concentración inicial de cianuro libre de 250 ppm) que procedió de un proceso de lixiviación de oro a nivel de laboratorio, la cual se introdujo en tres biorreactores aireados con un inóculo microbiano de $1,75 \times 10^8$ cél/ml en el primer biorreactor, $8,75 \times 10^7$ cél/ml en el segundo y $5,4 \times 10^6$ cél/ml para el tercer biorreactor que se incubaron a temperatura ambiente durante 168 horas. Se evaluó el cianuro libre de la solución contenida en los biorreactores cada 24 horas mediante el método titulométrico. Se determinó que *Pseudomonas* sp. nativo presentó capacidad degradadora sobre el cianuro; con una concentración de $1,75 \times 10^8$ cél/ml degradó en forma máxima en las 168 h de experimentación un total de 246,25 ppm (98,5%); $8,75 \times 10^7$ cél/ml con 240 ppm (96%) y para $5,47 \times 10^6$ cél/ml con un total de 237,5 ppm (95%) de cianuro libre, que estuvo en una concentración inicial de 250 ppm (100%), logrando así una tasa de degradación de cianuro en forma correspondiente a la concentración máxima de degradación de 1,46; 1,42; 1,42 ppm/h.

I. INTRODUCCIÓN

La industria moderna del oro utiliza el cianuro casi exclusivamente como agente lixiviador del oro, anteriormente se han utilizado otros agentes complejantes como la tiourea, los cloruros y otros haluros para extraer oro del mineral, pero generalmente no son rentables y presentan problemas particulares para el ambiente y la salud. Los complejos de cianuro son más estables y eficaces y no necesitan otras sustancias químicas agresivas para realizar la recuperación del oro; a pesar que el cianuro es menos tóxico que otros compuestos para lixiviar oro como el mercurio líquido, este sigue siendo un problema para el ambiente ya que es muy tóxico en sus tres formas líquida, sólida y gas. En la actualidad el cianuro es el compuesto lixivante más utilizado en la industria metalúrgica de metales preciosos por su gran afinidad con el oro y la plata. Este compuesto también está presente en sustancias químicas que se utilizan para el revelado de fotografías producción de papel, textiles y plásticos (Akcil et al, 2003).

Desde 1887, las soluciones de cianuro se han utilizado principalmente para extraer oro y plata. Además el cianuro se utiliza en

concentraciones bajas como un reactivo de flotación para ayudar a recuperar metales como el plomo, cobre y zinc (Álvarez, 2005).

Estas industrias además de ser grandes consumidores de CN, son fuente de contaminación ambiental por la utilización de este compuesto. Su alta toxicidad y su efecto inhibitorio en la respiración celular son conocidos desde la segunda década del siglo XX y están relacionados a su especiación fisicoquímica. La forma más tóxica de cianuro son las formas HCN, CN⁻, mientras que los complejos Fe (CN)₆³⁻, Fe(CN)₆⁴⁻, son relativamente menos tóxicos (Oudjehani et al., 2002). El cianuro es un compuesto inorgánico que usualmente se encuentra asociado con otros elementos, formando compuestos como cianuro de hidrógeno o ácido cianhídrico, cianuro de sodio y cianuro de potasio. Algunos de estos compuestos se encuentran en pequeñas cantidades en vegetales que son ingeridos por el hombre en su alimentación y que no llegan a alcanzar concentraciones dañinas para la salud (ATSDR, 2006).

Existe un riesgo que los residuos industriales sean descargados en la naturaleza sin ningún tipo de tratamiento sobrepasando la capacidad de auto regulación y auto recuperación de los ecosistemas, alterando su equilibrio dinámico, provocando grave alteraciones en sus componentes (físico, biológico, social) y por consiguiente una eminente contaminación ambiental (Oudjehani et al, 2002).

La degradación del cianuro se da por procesos químicos que se emplean actualmente para detoxificar desechos y/o efluentes contaminados, pero estos procesos generan altos costos para las industrias mineras por la utilización de productos químicos. Muchos estudios enfocados a la atenuación natural del CN, han concluido que la concentración de este compuesto disminuye con el tiempo debido a fenómenos de volatilización, precipitación, complejación, adsorción y biodegradación mediada por microorganismos nativos (Oudjehani et al, 2002).

Los tratamientos biológicos de fuentes contaminadas con cianuro se constituyen en una alternativa eficiente, económica y amigable con el ambiente (Akil, 2008). Muchos autores han documentado la habilidad de ciertos microorganismos para resistir y crecer en cianuro como fuente de nitrógeno y carbono (Kunz, 1998). La degradación microbiana de cianuro y compuestos cianurados es una de las biotecnologías emergentes más importantes de los dos últimos decenios para el proceso de tratamiento y soluciones al problema de desechos en operaciones mineras de metales preciosos. Cientos de especies de plantas y microorganismos (bacterias, hongos y algas) pueden detoxificar cianuro rápidamente hasta niveles ambientalmente aceptables (Akil, 2003).

1.1 HIPÓTESIS

- Las diferentes concentraciones de *Pseudomonas* sp. degradan más de un 50% de cianuro libre presente en efluentes líquidos cianurados en condiciones de laboratorio.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 GENERAL.

- Evaluar a *Pseudomonas* sp. nativo como biodegradador de cianuro de efluentes líquidos cianurados en condiciones de laboratorio.

1.2.2 ESPECÍFICOS

1. Establecer la capacidad degradadora de cianuro por *Pseudomonas* sp.
2. Cuantificar la capacidad degradadora de cianuro por *Pseudomonas* sp.

1.3 ANTECEDENTES

1.3.1 PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

A pesar de que el cianuro es un compuesto altamente nocivo, se produce naturalmente por mecanismos como la cianogénesis y síntesis de etileno (Raybuck, 1992), pero igualmente es transformado por mecanismos de detoxificación biológica, alcanzándose así un equilibrio ambiental relativo (Knowles, 1976).

El cianuro también puede producirse durante algunas prácticas industriales, tales como la minería, actividades de electrólisis de aluminio, gasificación de carbón, carbón para cocinar, producciones farmacéuticas, elaboración de fibras sintéticas como lycra y spandex, plásticos (Akcil et al, 2003), incineración de residuos con poliuretano, obtención del almidón de yuca. En consecuencia, el cianuro causa un desbalance ambiental en suelos, aguas o aire debido a que los procesos naturales de detoxificación no son suficientes y se sobrepasan los niveles de saturación (Barber et al., 2003).

Diariamente los seres humanos tienen contacto directo con el cianuro o sus derivados a través de los alimentos que consume o sus derivados a través de los alimentos que consume y productos que utiliza. La causa principal de muerte por cianuro involucra la plantas cianogénicas, cuyos elevados niveles de cianuro provocan una parálisis permanente de las extremidades (Guerrero, 2005). Porque el cianuro actúa a nivel tisular, actúa sobre el sistema respiratorio y es considerado un inhibidor irreversible enzimático, que reacciona con metaloenzimas dependientes de Fe, Zn, Cu; sus dianas primarias son las enzimas de la cadena respiratoria a nivel mitocondrial (citocromo a_3) (Mathews et al., 2002), por lo cual es tóxico para los organismos aerobios; en humanos se ha relacionado con algunas neuropatías luego de largos períodos de exposición (Gómez, 2002).

Visto los posibles problemas que causa el uso de cianuro a nivel industrial; los investigadores a lo largo del tiempo han buscado la manera de minimizar los impactos que causan al ambiente.

En 1992 Kunz y colaboradores realizaron ensayos de degradación de cianuro con *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764, el inóculo se obtuvo a partir de un cultivo de 36 horas de incubación, en un medio mínimo adicionado con glucosa (20,0 mM) y KCN (0,25 mM), las células fueron cosechadas y lavadas 2 veces con una solución buffer fosfato pH 7, se obtuvo un pellet de 200 mg ml⁻¹ y éste fue resuspendido en el mismo buffer y usado para los ensayos de biodegradación de KCN. Para esto se utilizaron medios líquidos con buffer carbonato a pH 7, adicionado con 50 mM de KCN e incubados a 30° C y realizando mediciones desde las 0 hasta las 60 horas de las concentraciones residuales de KCN y amonio, CO₂, formamidas y formatos generados. Con este trabajo se demostró la biodegradación de cianuro a CO₂, amonio, formamidas y formatos siendo la concentración de los dos últimos compuestos dependiente de la concentración inicial de KCN (Hernández, 2010).

Kunz y colaboradores el 2005 prepararon un inóculo de células correspondientes a *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764, con el fin de realizar la

extracción y purificación de la enzima cianuro oxigenasa, a partir de un medio mínimo con glucosa y amonio, la inducción enzimática se realizó adicionando al medio 0,1 mM de KCN, para la obtención del inóculo las células fueron lavadas y resuspendidas en una solución de buffer fosfato a pH 7 (Hernández, 2010).

Luque y colaboradores en el 2005, aislaron una cepa de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344, utilizando un medio de cultivo mínimo preparado sin amonio y citrato, a pH 9,5 con 2 mM de NaCN y 50 mM de acetato como únicas fuentes de nitrógeno y carbono respectivamente. En 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 30 mM 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, nitratato y cianato. En este trabajo se observó que

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 (Hernández, 2010).

En una investigación posterior realizada en el 2008, por Luque Almagro y colaboradores, se comprueba molecularmente que la cianasa de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 catalizó la descomposición del cianato a CO₂ y amonio, con el carbamato como un intermediario inestable. Esta enzima fue regulada negativamente por el amonio y positivamente regulada por el cianato y el cianuro. Nunca se detectó actividad enzimática en presencia de amonio, aún en presencia de cianato. Sin embargo se detectó una baja actividad enzimática en células con falencias de nitrógeno. La enzima mostró una actividad óptima a temperatura de 65° C y pH de 8,5. Mediante la generación de un mutante para la enzima cianasa, se comprobó que los cianatos no son un metabolito central en la asimilación del cianuro por parte

de la cepa *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 (Hernández, 2010).

Montoya y colaboradores en el 2001 realizó una propuesta de detoxificación de ambientes mineros mediante métodos químicos y biológicos, para estos últimos propuso 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 altas (Hernández, 2010).

En el 2006 Gaviria y Meza propusieron el método volumétrico para la medición de cianuro residual después de diferentes procesos químicos de degradación. En este estudio cuentan con muestras líquidas y sólidas procedentes de efluentes de los municipios de Segovia y Marmato Caldas, donde las concentraciones de cianuro superan las 5 500 ppm (Hernández, 2010).

1.3.2 PROBLEMAS MEDIOAMBIENTALES POR DERRAMES DE CIANURO (Fernández, 2007).

El 30 de enero del 2000 se rompió un dique de contención en la fundición Aurul de Sasar (Rumanía), donde se trataban los residuos de la mina de oro de Baia Mare. Se calcula que unos 100 000 m³ de barro y aguas residuales (con una concentraciones de 126 mg de cianuro por litro) se vertieron por los canales de desagüe al río Lapus, un efluente del Somes (Szamos), a través del cual alcanzaron el río Tisza y el curso superior del Danubio a su paso por Belgrado que desembocaron finalmente en el mar Negro. Las mediciones realizadas el 1 de febrero de 2000 en la localidad de Satu Mare, a orillas del Somes, revelaron que la concentración máxima de cianurados era de 7,8 mg por litro (el límite máximo aplicable a las aguas superficiales es de 0,01 mg por litro).

En la mina de Homestake, Suth Dakota, USA, 1998: entre 6 y 7 Tn de desechos cianurados fueron derramados en la quebrada Whitewood provocando la muerte de un gran número de peces.

En la mina de Kumtor, Kyrgyzstan, 1998: un camión de transportes con dirección a la mina de Kumtor cayó de un puente derramando 1762 de cianuro de sodio en el Río Barskoon. Los informes indican que dos personas murieron envenenadas por cianuro, casi 100 personas fueron hospitalizadas y mil habitantes necesitaron ayuda médica. El gobierno solicitó una compensación económica de 8,4 millones de dólares por daños al medio ambiente (Fernández, 2007).

En la mina de oro Omai, Guyana, 1995: el desplome de la mina permitió que se descargaran más de 3,2 billones de litros de desperdicios contaminados con cianuro en el Río Omai, afluente de Essequibo. Un estudio realizado por la Organización Panamericana de la Salud (OPS), mostró que la catástrofe ocasionó la destrucción de toda la vida acuática en la quebrada, de 4 kilómetros de longitud, que corre entre la mina y el Río Essequibo. Finalmente, el cianuro se diluyó rápidamente en el río Essequibo, hasta alcanzar niveles no dañinos (Fernández, 2007).

En la mina de Harmoy, South África, 1 994: El fallo de una represa minera abandonada provocó la inundación de un complejo de apartamentos con lodo contaminando con cianuro. Murieron 10 mineros (Fernández, 2007).

En Rumania 18 De Marzo Del 2 004: El río Siret, un afluente del Danubio, fue reportado como contaminado por cianuro. Los químicos involucrados en el derrame y fuga de la planta de procesos químicos desactivados, donde las condiciones de almacenamiento no pueden haber estado en los estándares internacionales. Las estimaciones son que 10 toneladas de sustancias tóxicas se derramaron en el río”, de acuerdo a IoanJeleu, del ministerio del medio ambiente de Rumania. Un incidente similar ocurrió en el 2001 en el mismo lugar, envenenando a los peces (Fernández, 2007).

En Colombia el 31 de agosto del 2008, caen al río de Magdalena 96 tanques de cianuro que contenían aproximadamente 50 kilos de cianuro granulado, estos camiones tenían como destino las minas de oro de Santa rosa (Fernández, 2007).

En Perú también se tienen registros de accidentes ocasionados por derrames de líquidos cianurados. Por ejemplo en Marzo del 2010 Colapsan Pozas de Cianuro en la Mina Arasi de Puno, contaminando así los ríos y causando muerte a millares de truchas.

Al contrario de algunos tecnólogos que defienden la degradación natural de cianuro de sodio en los pozos de tratamiento, se sabe que niveles de 150 a 300 ppm son letales al ser humano, y se pueden percibir desde los 20 a 30 ppm. Según Investigaciones indica que el cianuro de hidrógeno es líquido, incoloro, de olor característico a almendras amargas o castañas (Rendueles, 2001). Básicamente el riesgo medio ambiental reside en los pozos de tratamiento, ya que filtraciones o roturas pueden producir una catástrofe. Es recomendable por normas ambientales internacionales disminuir el nivel de cianuro en los efluentes mineros a 1ppm de cianuro total, valor muy cercano a la norma para el agua potable que es de 0,5 a 0,2 ppm (Logsdon, 2001). En el aire, el cianuro se encuentra principalmente como cianuro de hidrógeno gaseoso mientras que una pequeña cantidad se encuentra como finas partículas

de polvo. La vida media del cianuro de hidrógeno en la atmósfera es de aproximadamente 1 a 3 años. Los compuestos de cianuro se mueven con bastante facilidad en el suelo, allí se puede formar cianuro de hidrógeno que luego se evapora mientras que 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 por lo que el cianuro permanece sin ser cambiado a otras formas y atraviesa el suelo llegando hasta el agua subterránea (DINAMA, 2009).

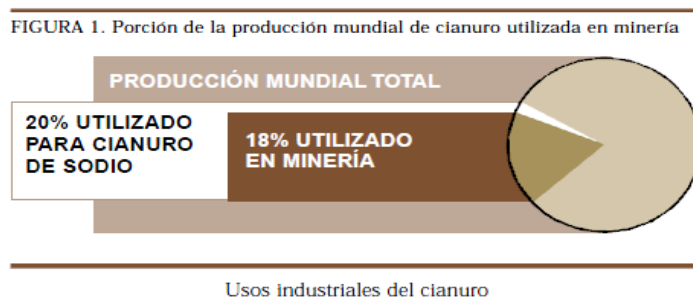
El problema con el uso de cianuro es que es un compuesto altamente tóxico para los seres vivos y la exposición a este puede ocurrir de diferentes formas: al beber agua, tocar tierra o comer alimentos que contienen cianuro o cuando se inhala aire en lugares que contengan residuos cianurados; como el agua es la principal fuente de vida de todos los seres vivos, se debe buscar alternativas biológicas para la degradación de cianuro a compuestos menos tóxicos. (ATSDR, 2006).

1.3 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.3.1 CONTAMINACIÓN POR CIANURO A NIVEL MUNDIAL

A nivel mundial, la minería es una actividad industrial que utiliza una cantidad significativa de cianuro, aproximadamente un 20% de la producción total; Desde 1887, las soluciones de cianuro se han utilizado principalmente para extraer oro y plata de material mineral, que de otro modo no podrían extraerse eficazmente.

Un 20% de la producción de cianuro se utiliza para fabricar cianuro de sodio, y el 18% de la producción total, se utiliza en minería en todo el mundo, mayormente para la recuperación de oro (Álvarez, 2005).



FUENTE: GURRERO 2009

Figura 01. Producción mundial de cianuro utilizado en minería.

Por ende grandes cantidades de cianuro son descargados a diario en suelos, aguas y aire procedente de diferentes actividades industriales como; la minería, en el proceso de recuperación de oro (González y Pulido, 2005), actividades de electrólisis de aluminio, que se realizan para recubrir la superficie del metal y protegerlo contra la corrosión), carbonización de madera empleada para cocinar, llamada también pirolisis y gasificación de carbón o gasificación por pirolisis rápida, producciones farmacéuticas y producción de fibras sintéticas como plásticos (Dumestre et al., 1997); (Raybuck, 1992); (Akcil et al., 2003).

El cianuro es considerado un contaminante debido a su alta toxicidad para todos los organismos aeróbicos, reacciona con iones metálicos de enzimas tales como Fe, Zn y Cu. Es un inhibidor irreversible de las enzimas que participan en la cadena respiratoria a nivel mitocondrial, específicamente reacciona con la forma oxidada del citocromo objetivo (citocromo a_3) (Mathews y col., 2002).

Algunos ejemplos de compuestos cianurados son el cianuro de hidrógeno, el cianuro de sodio y el cianuro de potasio, estos se mueven con bastante facilidad en el suelo, una vez que se encuentran allí el ión cianuro puede ser removido a través de varios procesos. Algunos de los compuestos de cianuro pueden formar cianuro de hidrógeno que luego se evapora mientras que 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 para estos microorganismos por lo que permanece sin ser cambiado a otras formas y atraviesa el suelo llegando hasta el agua subterránea (DINAMA, 2009).

1.3.2 INDUSTRIA MINERA AURIFERA A NIVEL NACIONAL

En el Perú, la industria minera aurífera, viene usando el cianuro de sodio en sus procesos productivos durante varias décadas, en estos últimos años las preocupaciones y reclamos de las población de importantes zonas mineras se han acentuado debido a la contaminación que hay en sus localidades, la escasez de agua que va sufriendo, el deterioro

de la salud todo esto junto a la indiferencia de sus autoridades (Álvarez, 1997), (GRUFIDES, 2007).

En la región La Libertad, varias provincias atraviesan el problema de contaminación con cianuro. En el caserío El Toro (Huamachuco) se hace evidente la contaminación a que está expuesta la población. Dichas zonas de extracción aurífera, son explotadas por empresas y mineros artesanales con alto nivel de riesgo, informalidad y tráfico del uso de cianuro que expone a grave riesgo la vida humana, fauna y flora de la región (NIMA, 2006).

En la región Cajamarca, (Pulán y Santa Cruz, entre otros) existe la creencia, cada vez más difundida, que la minería contamina el agua de la región y que arrasará sus recursos. No existe estudio técnico, pero para las comunidades es una verdad irrefutable. Se menciona que los relaves de las minas de Hualgayoc afectaron la vida en los ríos Llaucano y Maygasbamba (Miranda, 2004).

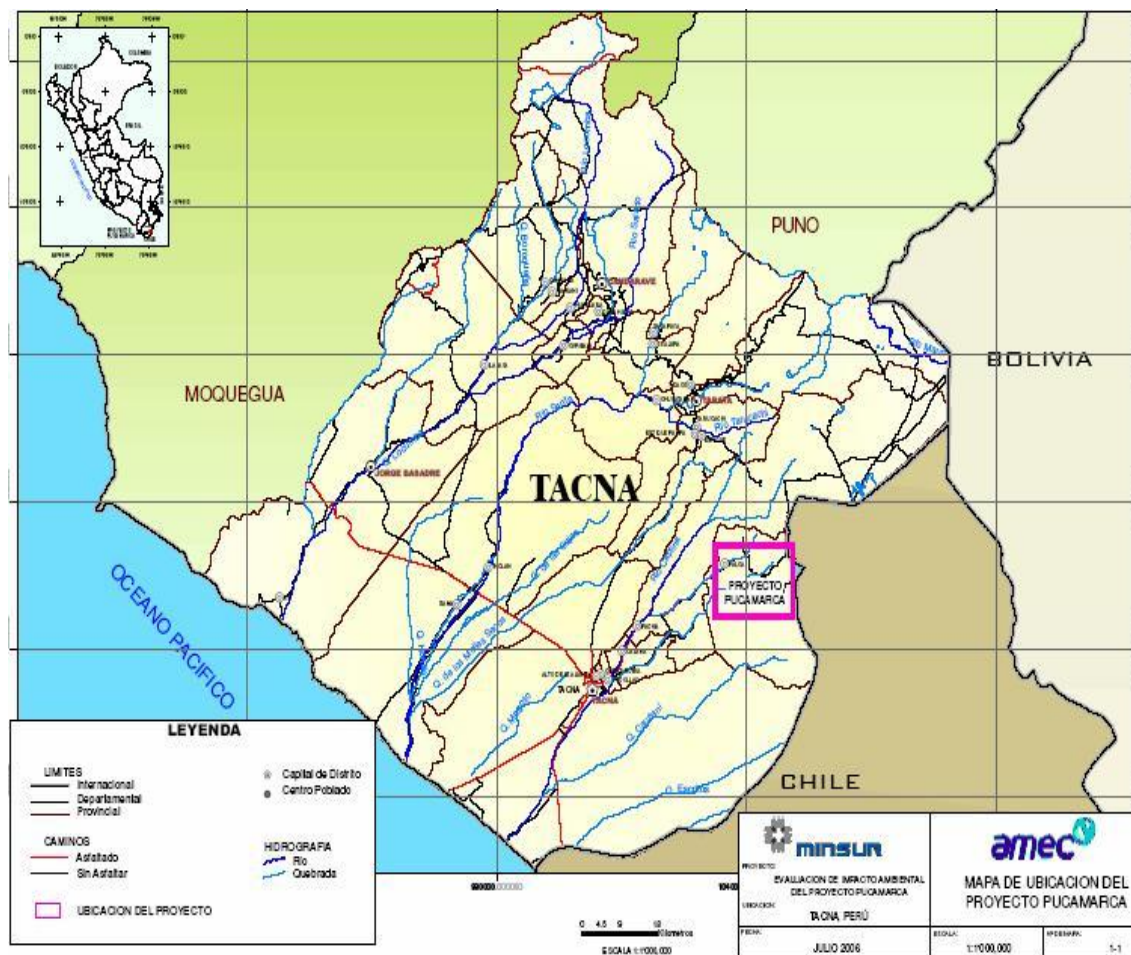
En el valle Chancay-Lambayeque, la principal preocupación de las comunidades es que la extracción del mineral por lixiviación con cianuro, contamina las aguas que

nacen alrededor del proyecto La Zanja. Dichas aguas desembocan en el río Cañete, que abastece el reservaría de Tinajones y riega 118 mil hectáreas de cultivos de agroexportación (Miranda, 2004).

1.3.3 DEPARTAMENTO DE TACNA E INDUSTRIA MINERA AURÍFERA

Tacna es una región que actualmente tiene más de 1200 concesiones mineras tituladas y en trámite, ocupando el 53% de su territorio, según información de la Dirección Regional de Energía y Minas.

Actualmente la empresa MINSUR viene desarrollando el proyecto minero Pucamarca, el cual es un yacimiento a tajo abierto ubicado cerca al hito 52 de la frontera Peruano-Chilena, al este del Cerro Checocollo, en la Comunidad de Vilavilani, Distrito de Palca, Provincia de Tacna, Departamento de Tacna (AMEC, 2006).



Fuente: AMEC, 2006

Figura 02. Ubicación de la empresa minera MINSUR S.A.



FUENTE: Google Earth, 2014

Figura 03: Ubicación del campamento minero MINSUR S.A.



FUENTE: Google Earth, 2014

**Figura 04: Vista general de la zona de explotación de la empresa
minera MINSUR S.A.**

El total de recursos explotables en Pucamarca se ha estimado en aproximadamente 34.24 Mt de mineral con una ley promedio de 0.72 g/t de oro y 6.97 g/t de plata, para un total de 787,000 oz de oro de las cuales 500,000 oz se calculan como extraíbles (AMEC, 2006).

Cuadro 01. Empresas mineras que se encargan a la extracción de oro a nivel nacional y en la región de Tacna.

EJEMPLO DE MINAS QUE SE ENCRAGAN DE LA EXTRACCION DE ORO Y PLATA		
EN EL PERU	REGIÓN TACNA	PROVINCIA TACNA
Compañía Minera Aurífera Santa rosa	Empresa minera MINSUR S.A.	Ninguna
Minera la Zanja S.R.L. (Aurífera)		
Minera Aurífera Retamas-marsa		
Empresa minera Oro Vega C.R.L		
Empresa minera Arasi S.A.C.		
Consorcio minero horizonte S.A.		

Fuente: Elaboración Propia - 2012

1.3.4 EL CIANURO Y LA SALUD

Existe una justificable preocupación por el uso de cianuro en ambientes industriales ya que el cianuro es considerado una sustancia tóxica que puede ser letal si se la ingiere o se la inhala en cantidades superiores a los LMP. Al igual que miles de otras sustancias químicas que se utilizan en los procesos industriales modernos; el conocimiento, los procedimientos adecuados de manipulación y una actitud responsable son fundamentales para el uso seguro y beneficioso del cianuro. El cianuro es un veneno de acción rápida capaz de matar a una persona en cuestión de minutos si está expuesta a una dosis suficientemente elevada. (Logsdon y col., 2001).

Los seres humanos pueden estar expuestos al cianuro mediante inhalación, ingestión o absorción por la piel. El cianuro impide que las células utilicen el oxígeno, lo cual causa hipoxia de los tejidos, acumulándose lactato en la sangre y cianosis. El efecto conjunto de la hipoxia y la acidosis láctica, provoca una depresión en el Sistema Nervioso Central que puede causar paro respiratorio y resultar mortal. En concentraciones más altas, el

envenenamiento por cianuro puede afectar otros órganos y sistemas del cuerpo como el corazón (González, 2004).

Aunque hay muchas fuentes diarias de exposición al cianuro (escapes de los automóviles, humo de tabaco, incendios), el cianuro no se acumula en los tejidos porque el cuerpo transforma esas pequeñas cantidades en un compuesto menos tóxico llamado tiocianato, que luego se excreta. No es conocido que el cianuro cause cáncer o defectos congénitos o que pueda afectar adversamente la reproducción (Logsdon y col., 2001).

La forma más tóxica del cianuro es el HCN gaseoso. La conferencia Norteamericana de Higienistas Industriales Gubernamentales establece el límite de umbral tope de HCN en 4,7 ppm. En concentraciones de 20 a 40 ppm de HCN en el aire, se puede observar cierto malestar respiratorio después de varias horas. La muerte ocurre en pocos minutos con concentraciones de HCN por encima de aproximadamente 250 ppm en el aire. El grado de toxicidad del cianuro de hidrógeno (HCN) para los humanos depende del tipo de exposición. Como el cuerpo humano reacciona de formas diversas a una misma dosis, se considera que la

toxicidad de una sustancia está expresada como la concentración o dosis que resulta letal para el 50% de los individuos expuestos. (LC_{50} o LD_{50}). La concentración letal de cianuro de hidrógeno gaseoso (LC_{50}) es de 100-300 partes por millón. La inhalación de esos niveles de cianuro causa la muerte en 10 a 60 minutos, teniendo en cuenta que mientras más alta es la concentración más rápido se produce la muerte. La inhalación de 2000 partes por millón de cianuro hidrogenado puede ser fatal en tan solo un minuto. El valor LD_{50} por ingestión del cianuro de hidrógeno es de 50-200 miligramos, o de 1-3 miligramos por kilogramo de peso. En contacto con la piel normal, el valor LD_{50} es de 100 miligramos por kilogramo de peso (Logsdon y col., 2001).

Para el cianuro libre, la dosis letal en humanos por ingestión o inhalación varía entre 50 y 200 mg (1 a 3 mg de cianuro libre por kg de masa corporal). La dosis letal por absorción dérmica es considerablemente mayor, alrededor de 100 mg por kg de peso corporal (Logsdon y col., 2001).

Exposición de los Trabajadores

Las evaluaciones de riesgos incluyen no sólo los impactos sobre la población en general, sino también los impactos sobre quienes tienen mayor probabilidad de estar expuestos al peligro, como quienes trabajan en un sitio específico. La posibilidad de que un trabajador entre en contacto con cianuro en las minas tiene lugar durante la recepción, descarga, manipulación y almacenamiento de briquetas sólidas de cianuro de sodio. (Logsdon y col., 2001).

Las causas de intoxicación con los cianuros son muy variados debido al gran uso que se le ha dado; puede ser de forma inhalatoria, dérmica, conjuntival, tracto gastrointestinal y parenteral; cabe indicar también, que el cianuro es un inhibidor enzimático que bloquea la producción de ATP (AdenosínTrifosfato) induciendo a la hipoxia celular. La ingestión de 200 mg de cianuro de potasio o de sodio puede ser letal. La inhalación de cianuro de hidrógeno (HCN) a una concentración tan baja como 150 ppm puede ser fatal. Es muy rápido el inicio de los signos y síntomas luego de una exposición e incluyen cefaleas, náuseas, olor a almendras amargas, disnea, confusión, síncope, convulsiones, coma,

depresión respiratoria, colapso cardiaco. En caso que sobreviva el paciente puede presentar secuelas neurológicas crónicas (Gómez, 2002).

El cuerpo posee diversos mecanismos para expulsar el cianuro de forma efectiva. El cianuro reacciona con el tiosulfato y produce tiocianato en reacciones catalizadas por enzimas de azufre como la rodanasa. El tiocianato es liberado por la orina en cuestión de días. Si bien el tiocianato es siete veces menos tóxico que el cianuro, en concentraciones altas provenientes de una exposición crónica al cianuro puede afectar la glándula tiroides. El cianuro tiene más afinidad por la metahemoglobina que por la citocromo oxidasa, y juntos forman cianometahemoglobina. Si éstos u otros mecanismos de desintoxicación no son superados por la concentración de cianuro y el tiempo de exposición a la que el cuerpo estuvo expuesto, se puede evitar que el envenenamiento por cianuro sea fatal (CAEM, 2004).

El cianuro no se acumula ni se biomagnifica, por lo que exposiciones prolongadas a concentraciones subletales de cianuro no necesariamente causarán intoxicación. Sin

embargo, se ha detectado envenenamiento crónico en individuos que consumen cantidades importantes de plantas que contienen cianuro como en la *Manihot esculenta*. La exposición prolongada al cianuro provoca lesiones en el nervio óptico, ataxia, hipertensión, desmielinización, neuropatía óptica de Leber, bocio y bajas en la función tiroidea. No existen evidencias de que la exposición prolongada al cianuro tenga efectos teratogénicos, mutagénicos o cancerígenos en los seres vivos (Logsdon et al., 2001).

1.3.5 EL CIANURO EN EL MEDIO AMBIENTE

Existen ciertas bacterias, algas y hongos que producen cianuro en forma natural. También muchas especies del mundo vegetal, como los granos (*Coffea arabica*, *Cicer arietinum*), las frutas (semillas, pepitas y huesos de *Pyrus malus*, *Prunus avium*, *Pyrus communis*, *Prunus armeniaca*, *Prunus persica* y *Prunus domestica*), las almendras y nueces de cajú, los vegetales de la familia de las coles, los cereales (mijo, sorgo), las raíces (*Manihot esculenta*, *Solanum tuberosum*, *Raphanus sativus* y *Brassica*

rapa var. Rapa), los tréboles blancos y los brotes de bambú (Logsdon et al., 2001).

Los procesos de combustión incompleta en los incendios forestales son una fuente importante de cianuro, así como también de los artículos que contienen nylon, que producen cianuro a través de la despolimerización. (Logsdon et al., 2001).

Cuadro 02. Concentración de cianuro presente de manera natural en plantas

CONCENTRACIÓN DE CIANURO EN PLANTAS	
ESPECIES DE PLANTAS	CONCENTRACIÓN (mg/kg)
<i>Manihot esculenta</i> (Variedades dulces)	
HOJAS	377 – 500
RAICES	138
RAICES DESECADAS	46 - < 100
PURE	81
PUNTA DE BAMBÚ Var.	Máx. 8000
<i>Phaseolus vulgaris</i>	2 100
<i>Prunus amygdalus var.amara.</i>	280 – 2 500
<i>Sorghum bicolor</i> (Planta joven, integral)	Máx. 2 500

FUENTE: Luque 2005

En el reino animal la síntesis biológica de cianuro está restringida a los artrópodos, algunos centípedos, milípedos e insectos (coleópteros, heterópteros, lepidópteros) son capaces de producir cianuro (Nahrstedt, 1988).

Cuadro 03: Organismos cianogénicos

Bacterias	<i>Chormobacterium violaceum</i>
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	<i>Pseudomonas chloraphilis</i>
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Algas	<i>Chlorella vulgaris</i>
	<i>Nostoc muscorum</i>
	<i>Anacystis nidulans</i>
Hongos	<i>Marasmius oreades</i>
	<i>Stemphyllium loti</i>
	<i>Gloeocercospora sorghii</i>
Plantas	<i>Prunus amygdalus var.amara</i>
	<i>Pyrus malus</i>
	<i>Pyrus communis</i>
	<i>Prunus avium</i>
	<i>Prunus domestica</i>
	<i>Prunus persica</i>
Animales	Centípedos
	Milipedos
	Insectos (lepidepteros)

Fuente: Eisler, 1991.

EFFECTOS SOBRE LA FAUNA

Si bien el cianuro reacciona con rapidez en el medio ambiente y se degrada o forma complejos y sales de estabilidades variables, es tóxico para muchos organismos vivientes, incluso en concentraciones muy bajas (CAEM, 2004).

ORGANISMOS Y ANIMALES MARINOS

Los peces y los invertebrados marinos son especialmente sensibles a la exposición al cianuro.

Concentraciones de cianuro libre en el ambiente marino que oscilan entre 5,0 y 7,2 microgramos por litro reducen la capacidad nadadora e inhiben la reproducción de muchas especies de peces.

Otros efectos adversos pueden ser mortalidad retardada, patologías, respiración entrecortada, alteraciones osmorregulatorias y alteraciones del crecimiento. En concentraciones de 20 a 76 microgramos por litro, el cianuro es mortal para una gran cantidad de especies, y en concentraciones que superen los 200 microgramos por litro el efecto tóxico es rápido para la mayoría de las especies

marinas. Los invertebrados experimentan efectos no letales adversos si son expuestos a concentraciones de entre 18 y 43 microgramos por litro de cianuro libre, y efectos letales entre 30 y 100 microgramos por litro (CAEM, 2004).

Las algas y las macrófitas son capaces de tolerar concentraciones de cianuro aún más altas que las que toleran los peces y los invertebrados, y no demuestran efectos adversos a 160 microgramos por litro o más. Las plantas acuáticas parecen inmunes al cianuro incluso en concentraciones que resultan mortales para la mayor parte de los peces marinos, de agua dulce e invertebrados. Por otro lado, el cianuro puede llegar a afectar la estructura de las plantas. El efecto tóxico del cianuro para la vida marina es probablemente causado por el cianuro de hidrógeno que ha sido ionizado, disociado o descompuesto fotoquímicamente por compuestos que contienen cianuro. Los efectos tóxicos de los iones de cianuro para los organismos acuáticos no resultan significantes, así como tampoco lo son las reacciones de la fotodisociación del ferrocianuro y del ferricianuro. Son los efectos de la concentración de cianuro de hidrógeno del agua y no la concentración total de cianuro, los que resultan

de suma importancia a fin de determinar el grado de toxicidad para la vida marina (CAEM, 2004). La sensibilidad de los organismos marinos al cianuro es específica de cada especie y se ve afectada por el pH, la temperatura y los niveles de oxígeno del agua, así como también por la etapa de vida y la condición del organismo.

AVES

El valor LD₅₀ para las aves oscila entre 0,8 miligramos por kilogramo de peso (palomas mensajeras americanas) y 11,1 miligramos por kilogramo de peso (pollos de corral). La mayoría de las especies más sensibles tuvieron alguno de los síntomas (agitación, parpadeo, salivación y letargo), entre medio minuto y cinco minutos después de haber ingerido la sustancia, mientras que las especies más resistentes tardaron hasta diez minutos en sufrir alguno de los síntomas. Todas las especies expuestas a dosis altas experimentaron respiración forzada y profunda seguida de agitación y respiración cada vez más superficial. Si bien en la mayoría de los casos la muerte ocurrió entre 15 y 30 minutos, las aves que sobrevivieron por más de una hora a los efectos del cianuro

se recuperaron, posiblemente gracias a la metabolización del cianuro a tiocianato y su consiguiente excreción (Logsdon y col., 2001).

La ingestión de soluciones de cianuro WAD puede provocar mortalidad retardada en las aves. Puede suceder que aunque las aves beban agua que contiene cianuro WAD no mueran inmediatamente, pero puede haber una descomposición en el medio ácido del estómago y producirse cantidades suficientes de cianuro que resultan tóxicas. Los efectos subletales por exposición al cianuro en las aves, como susceptibilidad a los predadores, no han sido totalmente investigados o informados (Logsdon y col., 2001).

MAMÍFEROS

Los efectos tóxicos del cianuro en los mamíferos son relativamente comunes debido a la vasta cantidad de plantas de forraje que contienen cianuro, como el sorgo, la hierba del Sudán y el maíz. Los niveles de cianuro que poseen estas plantas suelen aumentar en épocas de florecimiento. Las zonas áridas y el aumento en el uso de estas plantas como

forraje favorecen la acumulación de glucósidos cianogénicos en ciertos vegetales corporal (Logsdon y col., 2001).

El valor LD₅₀ para los mamíferos oscila entre 2,1 miligramos por kilogramo de peso (coyote) y 6,0-10,0 miligramos por kilogramo de peso (ratones blancos de laboratorio). Entre los diez primeros minutos luego de la ingestión se comienzan a detectar los síntomas de envenenamiento: excitación acompañada por temblores musculares, salivación, lagrimeo, defecación, micción, respiración dificultosa seguidos de descoordinación muscular, agitación y convulsiones. En general, los efectos del cianuro descienden del ganado vacuno a ganado ovino a caballos y luego a ganado porcino, siendo el ganado vacuno el que más sufre los efectos del cianuro; los ciervos y los alces suelen ser relativamente resistentes a los efectos. Si bien el cianuro está presente en el medio ambiente y en varias plantas, su toxicidad no se ha extendido debido a varios factores: El cianuro no persiste por mucho tiempo en el medio ambiente y no se acumula en el organismo de los animales que han sido estudiados corporal (Logsdon y col., 2001).

No se han encontrado evidencias acerca de la biomagnificación del cianuro en la cadena alimenticia. Si bien la intoxicación crónica por cianuro existe, su toxicidad es baja. Las dosis subletales reiteradas rara vez tienen efectos acumulativos adversos. Muchas especies son capaces de tolerar dosis altas e intermitentes de cianuro por largos períodos (Logsdon y col., 2001).

1.3.6 BIORREMEDIACIÓN:

La biorremediación es una tecnología emergente que utiliza organismos vivos (plantas, algas, hongos y bacterias) para absorber, degradar o transformar los contaminantes y retirarlos, inactivarlos o atenuar su efecto en suelo, agua y aire, para retornar un medio ambiente alterado por contaminantes a su condición natural. La biorremediación puede ser empleada para atacar contaminantes específicos del suelo, por ejemplo en la degradación bacteriana de compuestos organoclorados o de hidrocarburos. Un ejemplo de un tratamiento más generalizado es el de la limpieza de derrames de petróleo por medio de la adición de fertilizantes con nitratos o sulfatos para estimular la reproducción de

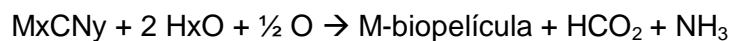
bacterias nativas o exógenas (introducidas) y de esta forma facilitar la descomposición del petróleo crudo (Guerrero, 2005).

La degradación biológica de cianuro aprovecha de la capacidad de ciertos grupos de microorganismos, mayormente bacterias, de utilizar compuestos cianurados como fuente de carbono y nitrógeno convirtiendo el compuesto tóxico en sustancias inocuas. La biodegradación de cianuro, como también se le conoce, resulta en la formación de amonio. Los microorganismos involucrados poseen varios sistemas enzimáticos específicos que les permite desarrollar en ambientes con alta concentración de cianuro (Guerrero, 2005).

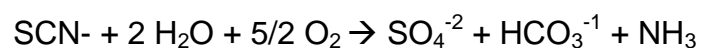
Entre los microorganismos se conoce de la capacidad degradadora de muchos hongos (*Fusarium*, *Hasenula*) y bacterias (*E. coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Citrobacter*, *Bacillus subtilis* y otros) quienes asimilan cianuro y lo usan como fuente de nitrógeno y/o carbono, teniendo como intermediario NH_3 (Dumestre *et al.*, 1997).

transforman directamente cianuro en CO₂ y NH₃ por medio de la **cianurodioxigenasa**, sin la formación de cianato como intermediario. Los tratamientos biológicos se han convertido en una alternativa interesante para la industria minera debidos principalmente al éxito obtenido por *Homestake Miningen* en su planta de Lead, South Dakota, Estados Unidos. En esta planta, un proceso aeróbico es empleado para remover cianuro, tiocianato, cianato, amonio y metales provenientes de soluciones cianuradas. En una segunda etapa, el amonio, altamente tóxico para la vida acuática, es transformado en nitrato. El principal microorganismo involucrado en la aplicación de la tecnología es *Pseudomonas* sp. (Atsushi et al., 1998), (Guerrero, 2005)

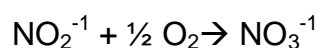
Primera Etapa:



(Me: Fe, Cu, Zn)



Segunda Etapa:



Los microorganismos involucrados en el tratamiento biológico de cianuro y tiocianato incluyen una mezcla heterogénea de bacterias indígenas del suelo que se han adaptado a vivir en ambientes de cianuro luego de una constante y continúa exposición. Aunque el cianuro es fácilmente degradado por las bacterias aeróbicas, lo mismo no ocurre con el tiocianato que no puede ser removido fácilmente mediante procesos anaeróbicos (en ausencia de oxígeno). En suma, el tratamiento biológico anaeróbico es un proceso más lento y más susceptible a la presencia de productos tóxicos resultantes de la exposición a otros constituyentes en el efluente (Guerrero, 2005).

Como en todo sistema biológico, los factores ambientales más críticos para una buena eficacia del tratamiento biológico incluyen al pH, temperatura, niveles de oxígeno y la disponibilidad de nutrientes. (Guerrero, 2005)

Microorganismos en la biodegradación de cianuro

El tratamiento biológico se basa en la adaptación y el mejoramiento de los microorganismos indígenas tales como las bacterias, pero la mayoría de las veces las condiciones

ambientales, principalmente la composición química, deberá ser previamente modificados (Logsdon y col 2001). El tratamiento biológico de cianuro es un fenómeno relativamente nuevo en la industria de la minería de oro y ha sido utiliza sólo en algunos casos (Logsdon y col., 2001).

El cianuro puede ser metabolizado por organismos tales como, hongos y bacterias, que lo emplean como fuente de carbono y nitrógeno, por ejemplo *Bacillus ipeeaterium* transforma cianuro de potasio en ácido aspártico, asparagina y el dióxido de carbono libre o unido al cianuro en carbonato y amoníaco, (Adams, 2006) *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT534, bajo condiciones alcalinas, consumen el cianuro y lo transforman en amoníaco (Luque V., 2005) y *Fusarium solani* IHEM 8026 degrada el cianuro a ácido fórmico (Dumestre et al, 1997).

El cianuro es un compuesto altamente tóxico, y actualmente son descargados aproximadamente entre 40 ppm a 100 ppm de cianuro en suelos, aguas y aire procedentes de diferentes actividades industriales. (Gonzales, 2004) y se también se encuentra en la naturaleza en gran variedad de formas. La gran diversidad y compleja naturaleza

de los diferentes compuestos cianurados se puede explicar en función de las características químicas del grupo ciano ($-\text{C}\equiv\text{N}$). Los cianuros libres se definen como las formas de cianuro molecular (HCN) e iónica (CN^-) liberados en disolución acuosa por la disociación de compuestos cianurados simples o complejos (Luque, 2005).

Clasificación	Compuestos
1. Cianuros inorgánicos	
1.1. Cianuro libre	CN^- , HCN
1.2. Cianuros simples	
a) solubles	NaCN , KCN , $\text{Ca}(\text{CN})_2$, $\text{Hg}(\text{CN})_2$
b) sales neutras insolubles	$\text{Zn}(\text{CN})_2$, $\text{Cd}(\text{CN})_2$, $\text{Ni}(\text{CN})_2$, CuCN , AgCN
1.3. Complejos de cianuro débiles	$\text{Zn}(\text{CN})_4^{2-}$, $\text{Cd}(\text{CN})_3^-$, $\text{Cd}(\text{CN})_4^{2-}$
1.4. Complejos de cianuro moderadamente fuertes	$\text{Cu}(\text{CN})_2^-$, $\text{Cu}(\text{CN})_3^{2-}$, $\text{Ni}(\text{CN})_4^{2-}$, $\text{Ag}(\text{CN})_2^-$
1.5. Complejos de cianuro fuertes	$\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$, $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$, $\text{Fe}(\text{CN})_5^{2-}\text{NO}$, $\text{Co}(\text{CN})_6^{4-}$
2. Cianuros orgánicos (nitrilos)	
2.1. Alifáticos	Propionitrilo, acetonitrilo, acrilonitrilo, etc.
2.2. Aromáticos	Benzonitrilo, cianopiridina, etc.
2.3. Glucósidos cianogénicos	Linamarina, amigdalina, durrin, etc.
2.4. Cianolípidos	

Fuente: Luque Almagro 2005

Figura 06: Formas de cianuro

Existen diferentes métodos químicos, físicos y biológicos para la degradación de cianuro a compuestos menos tóxicos. En el caso de la degradación biológica se han descrito tres tipos de reacciones enzimáticas para el metabolismo del cianuro por parte de microorganismos (Huertas, 2009).

a. **Substitución/transferencia**

- Rhodanasa descrita para *Thiobacillus denitrificans*, *Bacillus subtilis*, *B. stearothermophilus*,
- Ciancalina Sintasa, descrita para *B. megaterium*;

b. **Hidrolíticas,**

- Nitrilo hidratasa, descrita para *Pseudomonas* sp., *Corynebacterium*, *Brevibacterium*,
- Nitrilasa descrita para *Pseudomonas aeruginosa*),

c. **Oxidativa**

- Cianuro mono-oxigenasa, descrito para *Pseudomonas* sp.

Género *Pseudomonas*

Es un género de bacilos rectos o ligeramente curvados, Gram negativos, oxidasas positivas, aeróbios estrictos aunque en algunos casos pueden utilizar el nitrato como aceptor de electrones. Algunos miembros del género son psicrófilos, mientras que otros sintetizan sideróforos fluorescentes de color amarillo-verdoso con gran valor taxonómico. Es común la presencia de plásmidos y no forman esporas. Las *Pseudomonas* son los microorganismos más comúnmente reportados como degradadores de cianuro pues lo pueden convertir a amoníaco y fumarato bajo condiciones aerobias y anaerobias. Usualmente crecen en el suelo o en superficies de aguas. Por ejemplo *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas fluorescens* pueden emplear el cianuro como fuente de nitrógeno y metabolizarlo hasta amoníaco (Kao , et al. 2002).

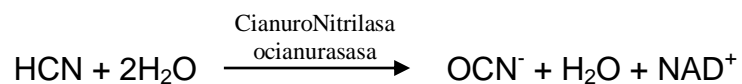
Una cepa bacteriana capaz de utilizar el cianuro como la única fuente de nitrógeno bajo condiciones alcalinas y acetato como fuente de carbono ha sido aislada y clasificada como *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, además, esta bacteria tolera hasta 30 mM de cianuro libre y también pueden usar

varios complejos de metal-cianurado incluso en presencia de amonio o nitrato. El consumo de cianuro es un proceso de asimilación, ya que el crecimiento de bacterias fue concomitante y proporcional a la degradación del cianuro y la bacteria convierte estequiométricamente cianuro en amonio en presencia de L-metionina-D, L-sulfoximina, un inhibidor de la sintetasa de glutamina. La bacteria fue capaz de crecer en medios alcalinos, hasta un pH inicial de 11,5, y se tolera de cianuro libre concentraciones de hasta 30 mM, lo que hace un buen candidato para el tratamiento biológico de residuos cianurados. (Luque, 2005).

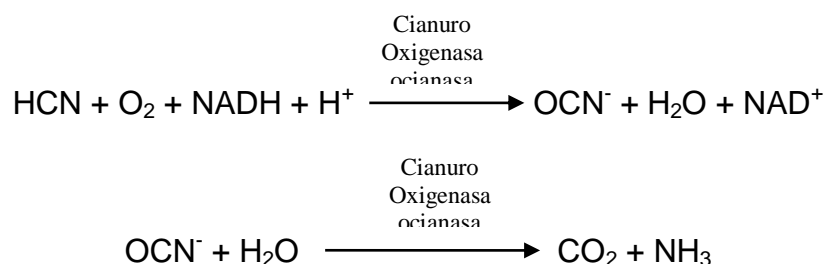
Se han reportado enzimas producidas por el género *Pseudomonas* que intervienen en el metabolismo del cianuro, tales como la fumarasa, aconitasa y la Malato quinona Oxidoreductasa (Atsushi et al, 1988). También hay reportes de actividad metabólica de cianuro nitrilasas y cianuro oxigenasas (Kunz et al., 1992) siendo estas la base de la biodegradación del cianuro por parte del género:

- Las cianurasas o cianuro nitrilasas catalizan la hidrólisis del ácido cianhídrico, hasta ácido fórmico y amoníaco. Esta biodegradación se ha reportado

para *Pseudomonas stutzeri* (Atsushi et al., 1998), *Pseudomonas fluorescens* (Kunz, 1992), *Pseudomonas aureoginosa* y *Pseudomonas* sp. *Alcaligenes xylosooxidans* ssp. *denitrificans*. También se ha encontrado en otros géneros como *Bacillus pumilus* (Meyers et al., 1993), *Fusarium solani* y en algunas plantas como *Pisum sativum* (Dumestre et al., 1997) y algas como *Scenedesmus obliquus* (Gurbuz et al., 2004).



- Las cianuro oxigenasas o cianasas catalizan la oxidación completa hasta dióxido de carbono y amoníaco. Estas enzimas se han reportado para *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764 (Kunz, 2005) y para *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 (Luque, 2005).



Las *Pseudomonas* spp. son organismos heterótrofos, utilizan parte de las sustancias metabolizadas ya sean orgánicas o inorgánicas, para obtener energía, que luego necesitarán para convertir la otra parte de materia orgánica en células. Los procesos de síntesis se dan gracias a los donantes de electrones que son necesarios para obtener energía (Gurbuz et al., 2004).

Cuadro 04: Degradación de compuestos cianurados, especie responsable y la reacción que se lleva a cabo.

CONDICIÓN	COMPUESTO DEGRADADO	MICROORGANISMO	REACCIÓN	REFERENCIA
AEROBIA	HCN	<i>Stemphylium loti</i>	$\text{HCN} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HCONH}_2$	Knowles, 1988
	HCN	<i>Alcaligenes xylooxidans</i>	Indefinida en la literatura	Ingvorsen et al, 1991
	HCN	<i>P. putida</i>	Indefinida en la literatura	Chapatwala et al, 1995
	HCN	<i>Pseudomonas stutzeri</i> AK61	Indefinida en la literatura	Watanabe et al, 1998
	HCN	<i>Bacillus pumillas C1</i>	Indefinida en la literatura	Meyers et al, 1993
	CIANURO ORGÁNICO	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Indefinida en la literatura	Nawaz et al, 1991
	HCN vía HCNO	<i>P. fluorescens</i>	$\text{NADH} + \text{H}^+ + \text{HCN} + \text{O}_2 \leftrightarrow \text{HNCO} + \text{H}_2\text{O} + \text{NAD}^+$; $\text{HCNO} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{CO}_2 + \text{NH}_3$	Raybuck, 1992
ANAEROBIA	HCN	Cultivos mixtos	$\text{HCN} + 2 \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HCOO}^- + \text{NH}_4^+$	Fallon, 1992

Fuente: Guerrero, 2005

Degradación biológica de cianuro

La degradación biológica, junto con la adsorción de compuestos tóxicos por la biomasa, ha demostrado ser capaz de eliminar el 92 % del cianuro total, más del 99 % del cianuro WAD y más de un 95 % de cobre y otros metales tóxicos. Además, los costos de establecimiento y operación del sistema son competitivos con los de los métodos de oxidación química (Kunz et al., 1992).

Una vez extraído el oro por medio de procesos hidrometalúrgicos, pueden estar presentes tres tipos principales de compuestos cianurados en los efluentes residuales, lodos o en las soluciones de los procesos: cianuro libre, cianuro débilmente complejo y cianuro fuertemente complejo. Juntos, los tres compuestos de cianuro constituyen el cianuro total, de los cuales, la forma más tóxica es el cianuro libre (Guerrero, 2005).

En el momento de diseñar un sistema biológico para el tratamiento de ambientes contaminados, se deben conocer todas las transformaciones que tienen lugar en el proceso de oxidación de sustancias inorgánicas y orgánicas por parte del

microorganismo con el fin de obtener energía para su desarrollo, lo que hace importante conocer que parte de los donantes de electrones se convierte en energía para determinar la cantidad de oxígeno, nitratos requeridos y producidos, que parte se convierte en células microbianas, asegurando de esta manera la disponibilidad de nutrientes como nitrógeno y carbono para los microorganismos dentro del sistema, esta información se obtiene realizando un balance de masas (Gurbuz et al., 2004).

1.3.7 CIANURO

El término cianuro encierra todos los grupos Carbono-Nitrógeno presentes en compuestos cianurados que se puedan determinar, como ión cianuro CN^- . Estos compuestos se clasifican en cianuros simples y complejos (Smit y Mudder 1996). “Cianuro” es el término general con el que se designa a toda una familia de compuestos químicos inorgánicos que se caracterizan por la presencia de un átomo de carbono enlazado a un átomo de nitrógeno mediante un enlace triple ($\text{C}\equiv\text{N}^-$). En el caso de compuestos orgánicos que contienen este grupo se les

denomina nitrilos. El carbono y el nitrógeno, los dos elementos que forman el cianuro, se encuentran omnipresentes en nuestro entorno. Juntos forman casi el 80% del aire que respiramos y ambos están presentes en las moléculas orgánicas que son la base de todas las formas de vida. El cianuro también se forma naturalmente: algunas plantas y animales lo producen y utilizan como un mecanismo de protección que los convierte en una fuente alimenticia poco atractiva. Muchos organismos pueden adaptarse, en cierta medida, a la presencia del cianuro y/o eliminar su toxicidad (Guerrero, 2005).

El cianuro en la minería

El cianuro se utiliza en minería para extraer oro y plata del mineral, en particular mineral de baja ley y mineral que no puede tratarse fácilmente mediante procesos físicos simples como la trituración y la separación por gravedad (Smith y Mudder 1996). Las operaciones de minería del oro utilizan soluciones muy diluidas de cianuro de sodio (NaCN), típicamente entre 0,01% y 0,05% de cianuro (100 a 500 ppm). El cianuro de sodio se disuelve en agua donde, en

condiciones ligeramente oxidantes, disuelve el oro contenido en el mineral. La solución resultante se denomina “solución cargada”. Luego se agrega zinc o carbón activado a la solución cargada para recuperar el oro extrayéndolo de la solución, la solución residual o “estéril” (es decir, carente de oro) puede recircularse para extraer más oro o enviarse a una instalación para el tratamiento del residuo (Logsdon y col, 2001).

El cianuro en soluciones

Después de haber extraído el oro por medio de procesos hidrometalúrgicos, pueden estar presentes tres tipos principales de compuestos de cianuro en los efluentes residuales o en las soluciones de los procesos: cianuro libre, cianuro débilmente complejado y cianuro fuertemente complejado. Juntos, los tres compuestos de cianuro constituyen el “cianuro total”. Al conocer la química de estos tres tipos de cianuro se puede comprender su comportamiento respecto de la seguridad y el ambiente. (Logsdon, 2001).

Cianuro libre

“Cianuro libre” es el término utilizado para describir tanto el ion de cianuro (CN^-) que se disuelve en el agua del proceso como cualquier cianuro de hidrógeno (HCN) que se forma en la solución. Las briquetas sólidas de cianuro de sodio se disuelven en el agua para formar el ion de sodio y el anión de cianuro (CN^-). El anión de cianuro se combina luego con el ion de hidrógeno para formar HCN molecular. La concentración del ion de hidrógeno en el agua del proceso se expresa mediante el conocido parámetro pH 3, casi todo el cianuro libre está presente como HCN cuando hay abundantes iones de hidrógeno presentes, es decir, a un valor de pH de 8 o menos. Este HCN, entonces, puede volatilizarse y dispersarse en el aire. Cuando el pH es superior a 10,5; hay pocos iones de hidrógeno presentes y casi todo el cianuro libre está presente como CN^- . En condiciones normales de temperatura y presión, las concentraciones de HCN y CN^- son iguales a un valor de pH de aproximadamente 9,4 (Logsdon, 2001).

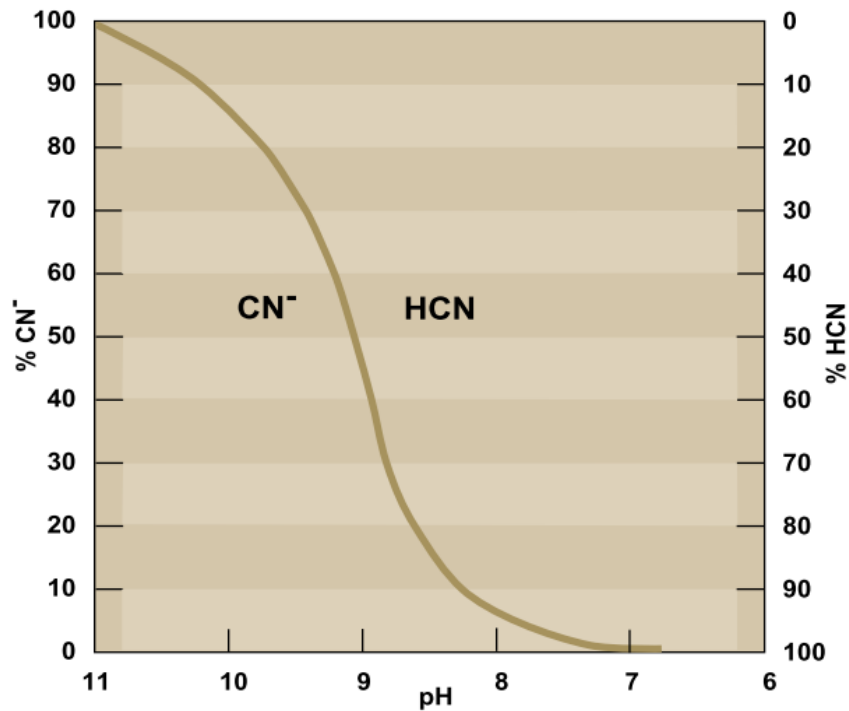
Estas formas de cianuro libre son importantes porque se consideran como los cianuros más tóxicos. Sin embargo, también son las formas que se eliminan más fácilmente de las soluciones mediante elaborados procesos de tratamiento y mecanismos naturales de atenuación. Los procesos biológicos, químicos y físicos que afectan a las concentraciones de cianuro en el agua, el suelo y el aire han sido extensamente estudiados durante las dos décadas pasadas, de modo que su comportamiento en el ambiente es bien conocido (Logsdon, 2001).

Una de las reacciones más importantes que afectan a la concentración de cianuro libre es la volatilización de HCN, que, al igual que la mayoría de los gases, se separa del agua y escapa al aire. El cianuro libre no es persistente en la mayoría de las aguas superficiales porque el pH de dichas aguas generalmente es de 8, de modo que el HCN se volatiliza y dispersa. La volatilidad del cianuro de hidrógeno y su posterior transformación en compuestos benignos en el aire son importantes porque actúan como un mecanismo natural que controla las concentraciones de cianuro libre en

los efluentes residuales y de los procesos en las minas (Logsdon, 2001).

Los procesos naturales pueden reducir por sí solos a valores muy bajos la concentración de cianuro libre de las soluciones en lugares al aire libre en las instalaciones de producción de oro, tales como estanques para procesamientos y depósitos de relaves, a menudo a niveles por debajo de lo establecido en los reglamentos o incluso por debajo de los límites de detección (Logsdon, 2001).

Sin embargo, en la planta de extracción de oro, los operadores mantienen el pH de la solución a valores cercanos a 10,5 con el fin de impedir la volatilización. Esto preserva el cianuro en el sistema de extracción de oro, donde es necesario y, al mismo tiempo, limita el riesgo de inhalación por parte de los trabajadores de altas concentraciones de HCN gaseoso en un espacio cerrado (Logsdon, 2001).



Fuente: Gonzales y Pulido, 2005

Gráfica 07. Relación entre el porcentaje de degradación de cianuro libre y el pH

Compuestos Simples de Cianuro

Los cianuros simples se definen como las sales del ácido cianhídrico (KCN y NaCN, etc.) los cuales se disuelven completamente en solución produciendo cationes alcalinotérreos libres y aniones cianuros (Logsdon, 2001).

Compuestos Complejos de Cianuro

El cianuro de hierro, está reducido con la valencia (+2) y en Ferricianuro, en el hierro está oxidado con valencia (+ 3). El ferrocianuro es la forma usual presente en solución a potenciales redox ambientales, esta rápidamente se puede oxidar a ferricianuro (Logsdon, 2001).

Los cianuros de hierro desde el punto de vista ambiental requieren especial atención debido a su gran estabilidad en ausencia de luz y su tendencia a disociarse en su presencia. Aunque esos complejos resisten la degradación natural hasta la disipación total del cianuro libre y de los complejos de cianuro metálico más rápidamente degradables, los ferricianuros son capaces de desprender niveles tóxicos de ácido cianhídrico cuando se exponen a intensa radiación ultravioleta (Logsdon, 2001).

Cianuro Disociable con Ácido Débil (Wad CN)

Es un término analítico utilizado para designar a los compuestos de cianuro que se disocian bajo reflujo con un ácido débil, normalmente a pH 4,5 (Logsdon, 2001).

Otros Compuestos Derivados del Cianuro:

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 (Logsdon, 2001).

Cianato y Amoniac: La oxidación del cianuro se puede realizar con oxidantes tales como el cloro, ozono, oxígeno y peróxido de hidrogeno para convertirlo a cianato. A temperatura ambiente, el cianato y tiocianato reaccionan lentamente con el agua para formar amoniaco, ión formato, y/o carbonato (Logsdon, 2001).

1.3.8 PROCESO DE RECUPERACIÓN DE ORO

El tratamiento se realiza en diferentes áreas o secciones de la planta, según el siguiente orden (Logsdon, 2001):

- Trituración
- Molienda
- Gravimetría
- Flotación
- Lixiviación

- Desorción del carbón
- Fundición del oro

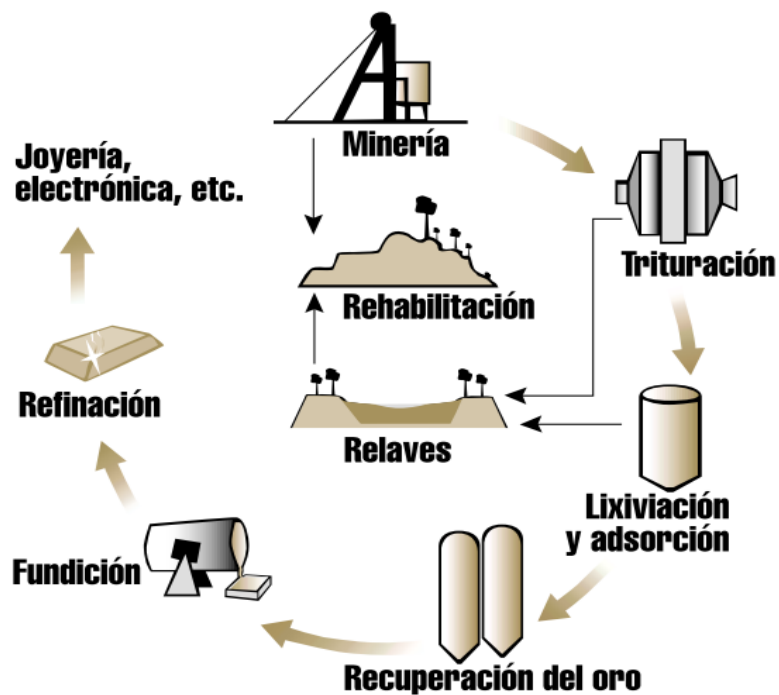
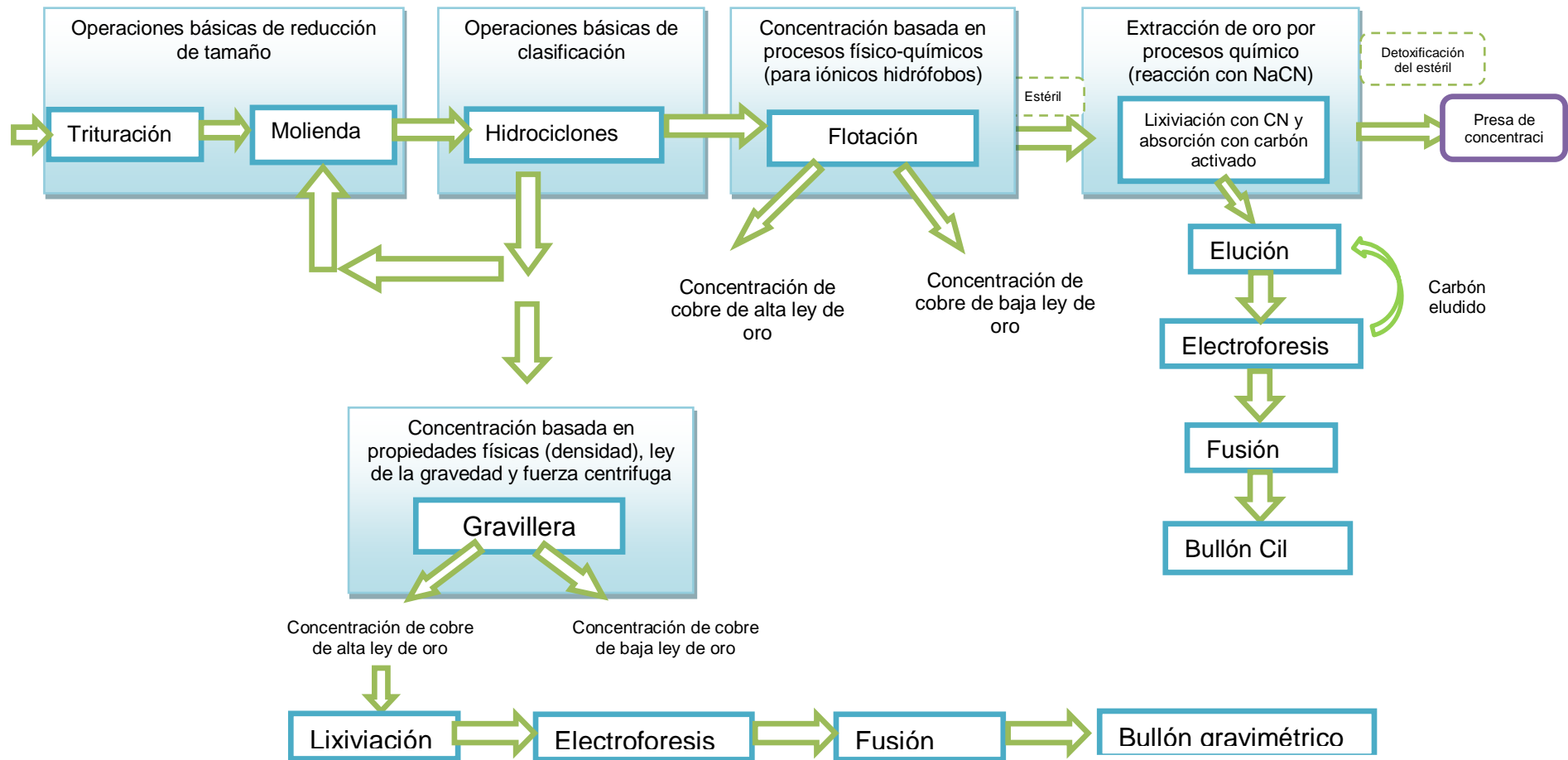


Figura 08. Proceso general de la extracción de oro

Factores que influyen en el proceso de cianuración (Fernández, 2007)

- Aireación y suministro de oxígeno
- Cianuro en los tanques
- Dilución de la pulpa
- El pH



FUENTE: Procesos de tratamiento del oro (planta del valle)

Figura 09: Proceso detallado de la extracción de oro

1.3.9 TRATAMIENTO DE EFLUENTES GENERADOS EN UN PROCESO DE CIANURACIÓN.

Una vez que se ha recuperado el oro de la solución cianurada, ésta queda desprovista de metal, pero sigue conteniendo cianuro. Durante las dos décadas pasadas, las industrias química y minera lograron grandes avances en la manipulación de estas soluciones residuales cargadas de cianuro de manera que no perjudiquen a la salud pública o al medioambiente. Una vez extraído el oro de la solución, los residuos del proceso presentan cianuro residual en proporciones que pueden variar entre 400 y 600 mg/l de cianuro disociable en ácido débil, y que es necesario descontaminar antes de su envío a la Presa de Residuos, ya que el límite máximo permitido en caso de un hipotético vertido es de 0,5 mg/l de cianuro total (Logsdon, 2001).

Existen varios tratamientos químicos para la descontaminación de este cianuro, todos basados en la oxidación del cianuro a cianato, diez mil veces menos tóxico y posteriormente disociable en dióxido de carbono y

nitrógeno (Logsdon, 2001). La volatilización de HCN, que reduce la concentración de cianuro libre en solución, es el principal proceso de atenuación natural. En el siguiente cuadro se presenta una comparación de los procesos más utilizados para el tratamiento de los residuos cianurados.

Cuadro 05. Proceso más utilizados en el tratamiento de residuos cianurados.

PROCESOS DE TRATAMIENTO	ELIMINACIÓN DE CIANURO DE HIERRO	ELIMINACIÓN DE CIANURO WAD	APLICACIÓN DE LODOS	APLICACIÓN A SOLUCIONES
SO ₂ /AIRE	X	X	X	X
PERÓXIDO DE HIDRÓGENO	X	X		X
CLORACIÓN ALCALINA	X	X		X
PRECIPITACIÓN CON HIERRO	X	X	X	X
CARBÓN ACTIVADO	X	X		X
BIOLÓGICO	X	X		X
RECUPERACION DE CIANURO		X	X	X
ATENUACIÓN NATURAL	X	X	X	X

FUENTE: FERNANDEZ 2007

Tratamientos de soluciones de cianuro:

Se emplean cuatro formas generales de tratamiento de la solución de cianuro (Logsdon y col, 2001).

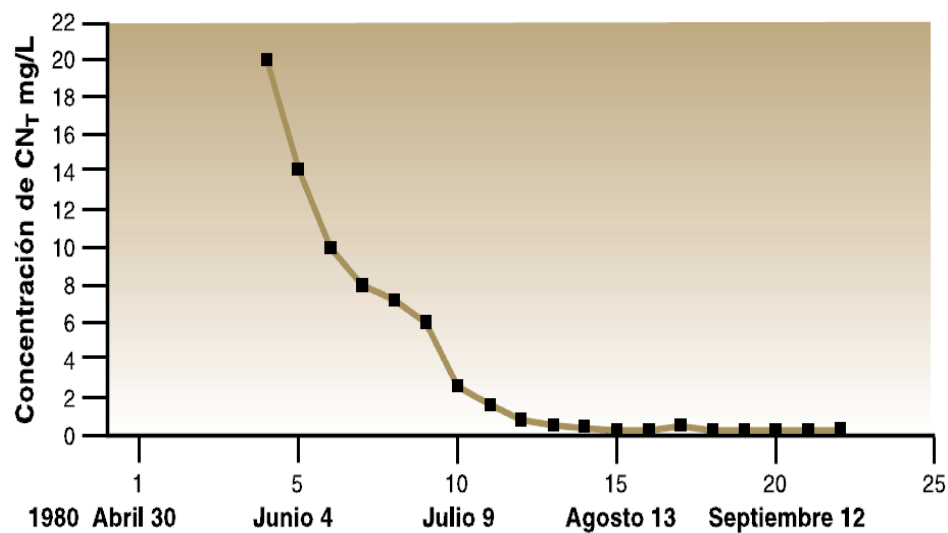
- Degradación natural
- Oxidación química
- Precipitación
- Biodegradación
- Otros

Degradación natural

Los procesos de degradación natural reducen la toxicidad de los compuestos cianurados a lo largo del tiempo. El principal mecanismo responsable de esta transformación es la volatilización con posteriores transformaciones atmosféricas a sustancias químicas menos tóxicas, la oxidación natural, la adsorción en superficies minerales, las reacciones de hidrólisis, la biodegradación (bacteriana) y la precipitación de compuestos insolubles (Logsdon, 2001).

A pesar de que todos estos procesos son efectivos, presentan el inconveniente de tener una cinética demasiado lenta como para poder ser considerados útiles a nivel industrial. Dependen, además, de la localización geográfica de las instalaciones, pues este parámetro condiciona las condiciones climáticas en las que se produce la degradación (Álvarez, 2005).

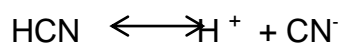
Los porcentajes de degradación varían según las especies presentes, y según los parámetros físico-químicos de la solución, con lo cual, la evaluación de la medida en que tendrá lugar una detoxificación natural de un efluente dado (y en unas determinadas condiciones) es algo muy complejo, y no se puede tomar su valor como medida para realizar un control riguroso del efluente (al menos, no exclusivamente). De todas formas, la degradación natural tiene lugar en mayor o menor medida tanto en las balsas de estériles, en las pilas de lixiviación o en los tanques de lixiviación y en los sistemas de adsorción con carbón activado (Álvarez, 2005).



Fuente: Álvarez, 2005

Figura 10: Degradación de cianuro de manera natural

Volatilización: Como ya se ha indicado, el cianuro libre existe en solución acuosa en equilibrio con el ácido cianhídrico. Así, debido a su baja temperatura de volatilización (en torno a los 26 °C) y a su elevada presión de vapor (100 KPa a dicha temperatura), el ácido cianhídrico se volatiliza desde la solución, diluyéndose en la atmósfera en fase gaseosa, desplazando así la reacción



hacia la derecha, en virtud del principio de Le Chatelier, con la consiguiente detoxificación de la disolución. La tasa de volatilización del ácido cianhídrico desde la solución se incrementa con (Álvarez, 2005):

- Un descenso del pH (que desplaza el equilibrio hacia la generación de la fase más volátil).
- Un aumento de la temperatura.
- Un incremento en la aireación de la solución (agitación).
- Un incremento del área de exposición de la solución (diseño de balsas de almacenamiento de gran superficie y poca profundidad).

La presencia de catalizadores como el cobre o el carbón activado (generalmente presentes, el primero por aparecer de forma generalizada en menas auríferas y el segundo por formar parte del proceso de recuperación del oro a partir de la solución cargada (Álvarez, 2005):

Se suele expresar la tasa de volatilización como vida media del cianuro libre presente en la solución, parámetro que puede variar desde unas pocas horas para

soluciones altamente aireadas en presencia de carbón activado o varios meses para soluciones almacenadas a bajas temperaturas. También se debe tener en cuenta la acción de la dilución de la solución mediante el agua de lluvia que, junto con la adsorción de CO₂ en la interfase aire-solución, actúa descendiendo el pH de la solución, favoreciendo la volatilización del ácido cianhídrico. La tasa de emisión de ácido cianhídrico a la atmósfera se puede expresar empíricamente, a partir del equilibrio teórico de soluciones cianuradas al aire, a diferentes valores de pH y temperatura (Menne, 1997):

$$[\text{HCN}]_{\text{aire}} = [(1470/T) \exp. (9275-2292/T)] / [1 + 10^{(\text{pH} - 9.3)}]$$

donde HCN representa los mg de HCN/Nm³ de aire por mg/l de NaCN (o equivalente) en la solución y T la temperatura, en unidades absolutas.

Adsorción por diversas fases minerales:

Ciertos minerales pueden llegar a ayudar a la destrucción del ión cianuro y de los compuestos cianurados. Por ejemplo, se ha demostrado que determinados materiales

carbonosos pueden adsorber en su superficie hasta 0,5 mg CN⁻ /g. Este valor resulta ser 0,05 para minerales arcillosos y feldespatos. A pesar de no haber tasas de adsorción calculadas, se ha demostrado que la bauxita, la ilmenita y la hematites poseen cierta tendencia a la adsorción de compuestos cianurados (Álvarez, 2005).

Degradación fotolítica:

Es un mecanismo de disociación de ciertos compuestos cianurados (especialmente los cianuros de hierro) y un importante catalizador de la oxidación del cianuro a cianato. La fotólisis es un proceso capaz de promover reacciones de oxidación/reducción proporcionando energía a partir de una radiación electromagnética que activa los procesos de transferencia de electrones (Young y Jordan, 2000), haciendo a éstos más aptos para participar en reacciones redox. La fotorreducción ocurre cuando el componente absorbido dona un electrón a otra especie, y la fotooxidación tiene lugar cuando el compuesto absorbido es

el que acepta un electrón de otra especie donante (que se fotorreduce) para llenar su hueco electrónico.

La energía necesaria para activar los electrones (es decir, para que pasen de su estado de reposo a un estado excitado) es prácticamente igual a la que puede proporcionar la radiación electromagnética que corresponde a la región ultravioleta del espectro electromagnético. Se estudian actualmente varias técnicas fotolíticas a escala piloto para la eliminación de compuestos de cianuro (Young et al., 1995).

La fotólisis directa no es eficaz para la eliminación del cianuro libre, pero se sabe que destruye algunos cianuros metálicos, tanto débiles como fuertes. En particular, es capaz de disociar los SAD's más abundantes, los cianuros de hierro (ferro y ferricianuros) (Álvarez, 2005).

OXIDACION QUÍMICA

Los procesos de oxidación química para el tratamiento del cianuro incluyen el proceso con SO₂/Aire (desarrollado por la compañía minera canadiense INCO) y el proceso de

tratamiento con H₂O₂ (peróxido de hidrógeno). Una alternativa de oxidación química más antigua, el Proceso de Cloración Alcalina, se utiliza rara vez en la industria minera en la actualidad (Logsdon, 2001).

En el proceso con SO₂/Aire, el cianuro libre y el cianuro DAD se oxidan y el cianuro de hierro se precipita como un sólido insoluble. El proceso puede aplicarse a soluciones o a lodos y la reacción es rápida. Las posibles limitaciones son la necesidad de obtener una licencia para utilizar el proceso, el costo de construcción de una planta procesadora, la necesidad de realizar ensayos empíricos para optimizar el sistema y la incapacidad del proceso para oxidar subproductos intermedios del cianuro (Logsdon, 2001).

El peróxido de hidrógeno, un potente oxidante, oxida el cianuro libre y el cianuro DAD y los convierte en amonio y carbonato. Los cianuros de hierro no se oxidan mediante el peróxido, pero precipitan como sólidos insolubles y estables. Algunas veces es necesario añadir sustancias químicas para controlar la concentración de cobre en las soluciones con el fin de cumplir con las normas ambientales. El sistema con peróxido no se adapta bien al tratamiento de lodos debido a

los irregulares requerimientos de peróxido de hidrógeno cuando hay sólidos presentes (Logsdon, 2001).

Ambos métodos de oxidación química son capaces de producir concentraciones residuales de cianuro que pueden satisfacer exigentes normas de descarga. Ambos procesos exigen la realización de pruebas en muestras representativas de materiales específicos al sitio antes del diseño final de la planta. El ácido de Caro, que combina ácido sulfúrico con peróxido de hidrógeno para formar H_2SO_5 , también se emplea como agente oxidante para descomponer el cianuro en solución (Logsdon, 2001).

PRECIPITACIÓN

La precipitación de cianuros estables se puede obtener mediante el agregado deliberado de complejantes tales como el hierro. Esto reduce la concentración de cianuro libre y también es eficaz para controlar los elevados niveles de otros metales que pueden estar presentes. Los cianuros de hierro pueden reaccionar con otras sustancias químicas en solución y producir precipitados sólidos, que pueden contener una docena de sales insolubles de cianuro, removiendo de esta

manera el cianuro de la solución. Parte del cianuro de las soluciones de los procesos reaccionará con otros componentes químicos que se encuentren dentro del sistema y formarán concentraciones mucho menos tóxicas de compuestos tales como el amoníaco, el nitrato y el dióxido de carbono (Logsdon, 2001).

BIODEGRADACIÓN

La biodegradación del cianuro es la base de los sistemas de tratamiento de los efluentes residuales industriales, como los utilizados por Homestake Mining Company en los Estados Unidos e ICI Bioproducts en el Reino Unido. Durante más de una década, se ha empleado un proceso biológico para tratar el cianuro en la Mina Homestake en Lead, Dakota del Sur, con el fin de satisfacer los criterios ambientales de descarga. Las condiciones aeróbicas son mucho más favorables para la degradación del cianuro que las condiciones anaeróbicas, aunque los organismos anaeróbicos pueden ser eficaces para tratar el cianuro en concentraciones de hasta varios miligramos por litro. Se han creado tanto sistemas activos como sistemas pasivos de

tratamiento biológico; estos sistemas remueven el cianuro empleando microorganismos aeróbicos o anaeróbicos (Logsdon, 2001).

En Homestake, la solución estéril del molino aurífero se canaliza a través de recipientes para reacciones que contienen bacterias. Las bacterias utilizan el oxígeno del aire para descomponer los compuestos de cianuro en nitratos, bicarbonatos y sulfatos. Este proceso microbiano es capaz de oxidar los complejos de cianuro metálico, los iones metálicos de las especies de cianuro DAD y los subproductos intermedios de la oxidación del cianuro.

Las ventajas del proceso de tratamiento biológico son su diseño simple y el control del proceso operativo, los bajos costos de las sustancias químicas y la capacidad para tratar todas las formas del cianuro y sus subproductos. Las posibles limitaciones de los sistemas de tratamiento biológico son su reducido rendimiento con temperaturas frías y con concentraciones muy altas de cianuro (Logsdon, 2001).

II. MATERIALES Y METODOS

2.1. MATERIALES Y EQUIPOS

a) Material

- Agar Nutritivo (Merck)
- Agar Cetrimide (Merck)
- Agar Glutamato
- Gelatina nutritiva
- Peróxido de hidrogeno
- Alcohol
- Algodón
- Caldo peptonado (Merck)
- Caldo nutritivo (Merck)
- Cal
- Cianuro de sodio
- Agua destilada
- Solución de Nitrato de plata al 3%
- Solución de ioduro de potasio al 10%
- Agar Pseudomonas P

- Matraz erlenmeyer
- Tubos de ensayo
- Placa de Petri
- Vaso precipitado
- Bagueta
- Asa de Kolle
- Espátulas
- Pipetas de 0,1; 1,5; 10.
- Pizetas
- Botellas de vidrio de 5 litro y de 2,5 litros de capacidad.
- Pipetas pasteur
- Cinta de pH
- Bolsas de polipropileno de primer uso
- Microfilm

b) Equipos

- Estufa Incubadora Memmert.
- Balanza Analítica, Marca Sartorius.
- Refrigeradora Modelo MDF-594C (60Hz)
- Baño maría de 40 – 42° C de temperatura. Marca Memmert.
- Agitador magnético (vortex)

- pH-metro digital. Marca Hanna.

2.2. Lugar de experimentación

- Laboratorio de Biotecnología, Escuela Académica Profesional de Biología-Microbiología (Facultad de Ciencias) – UNJBG.
- Laboratorio de Hidrometalurgia, Escuela académico Profesional de Metalurgia (Facultad de Ingeniería) – UNJBG.
- Laboratorios de microbiología de la Dirección Regional de Salud Ambiental – DESA.

2.3. Material en estudio

Efluente líquido cianuro obtenido de una lixiviación a nivel de laboratorio, el mineral aurífero utilizado fue proporcionado por la empresa Minera MINSUR S.A., ubicada en el distrito de Palca, provincia de Tacna. Las coordenadas aproximadas del centro del área son 414 000 E y 8 030 000 N.

2.4. Diseño de experimentación (Steell y Torrie, 1986)

Se utilizó diseños experimentales simple y con estructura factorial. El software utilizado fue Statgraphics Centurion XV.

Factorial

Se utilizó un diseño completamente al azar con estructura factorial de 3 (Tratamientos) x 7 (días de evaluación) haciendo un total de 42 unidades experimentales.

Simple

Se utilizó el diseño completamente al azar con 3 tratamientos y 2 repeticiones haciendo un total de 6 unidades experimentales.

Variables

Variable independiente :

Concentración de *Pseudomonas* sp. (cél/ml)

Variables dependientes :

Biodegradación de cianuro (ppm)

Tasa de degradación de cianuro (ppm/día)

2.5. Metodología

2.5.1. Procedencia del mineral aurífero

Se utilizó un mineral aurífero proporcionado por la Empresa minera **MINSUR S.A.-TACNA**, ubicada cerca al hito 52 de la frontera peruano-chilena. El acceso es por la carretera Tacna-Alto Perú (102 km). La superficie el proyecto pertenece a la comunidad de Vilavilani y el campamento a la comunidad de Palca. Ambas comunidades se ubican en el distrito de Palca, provincia de Tacna. Las coordenadas aproximadas del centro del área son 414 000 E y 8 030 000 N. La zona del tajo se encuentra en el Cerro Checocollo.

El mineral aurífero sirvió para obtener el efluente líquido cianurado que se utilizó en para la degradación de cianuro y para la obtención de rípidos que se aprovechó para aislar una cepa nativa de *Pseudomonas* sp.

2.5.2. Obtención del efluente líquido cianurado - Lixiviación del mineral aurífero a nivel de laboratorio (Soto, 2001).

- Se determinó la cantidad de mineral a usar para preparar 2500 ml y 1500 ml de solución cianurada; para la lixiviación a nivel de laboratorio.
- Se trituró el mineral aurífero proporcionado por la Empresa minera MINSUR S.A., pasando el mineral aurífero por una chancadora de 2 HP.
- Posteriormente se pesó 3 kg de mineral aurífero triturado y se procedió a su molienda, utilizando 5 bolas de acero de 2 ½" de diámetro, 5 bolas de 2" de diámetro, 7 bolas de 1 ½" de diámetro, y 9 bolas de 1" de diámetro.
- Luego se tamizó el mineral aurífero molido por una malla 100.
- A continuación se pesó aproximadamente 850 y 340 gramos de mineral aurífero molido.
- Se agregó los 850 g pesados, a una botella de 5000 ml de capacidad y los 340 g pesados a una botella de vidrio de 2500 ml de capacidad (las botellas empleadas fueron de bordes liso casi uniforme con una abertura en la parte superior de 6 y 4 cm de diámetro respectivamente)

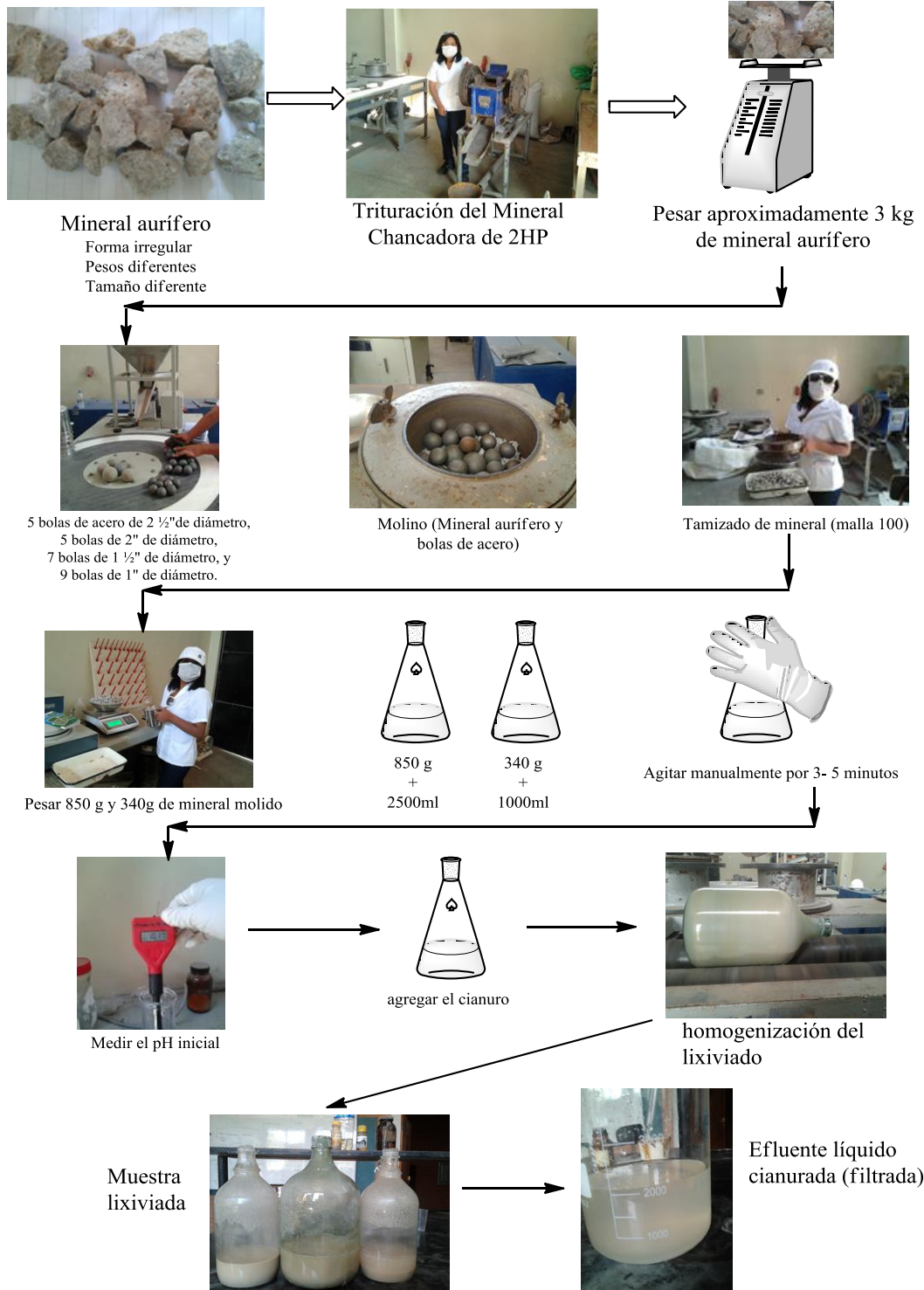
- Posteriormente se agregó 2500 ml de agua destilada a la botella que contuvo los 850 g de mineral molido y 1000 ml al que contuvo los 340 gramos de mineral pesado.
- Se agitó las botellas manualmente durante 3-5 minutos.
- Se homogenizó la muestra y se midió el pH inicial del medio.
- Posteriormente se agregó cal hasta obtener un pH = 10,5 – 11,0 (la cal tiene la función de mantener una alcalinidad de 10 a 11, su consumo varía de acuerdo con cada mineral y está entre 0,5 a 5 kg/Tn).
- Se homogenizó manualmente la muestra 3-5 minutos.
- Se dejó reposar 10 a 15 minutos hasta que el pH se estabilizó y no varió en el medio.
- Posteriormente se agregó NaCN a una concentración 1,0 g/l.

$$\text{NaCN} = \frac{2500\text{ml} \times 1\text{g}}{1000\text{ml}}$$

$$\text{NaCN} = 2,5 \text{ g}$$

- Cuando se agregó NaCN a una muestra se consideró que debe ser alcalina con un pH = 10-11, de preferencia pH 11; ya que una vez agregado el cianuro de sodio el pH del medio disminuye.

- Se homogenizó la muestra durante 24 h en los molinos.
- Posteriormente se filtró y separó la fase líquida (efluente líquido cianurado - solución rica) de la sólida (rípidos o lodos).
- Se agregó el líquido cianurado a un vaso precipitado de 5 litros de capacidad.
- Se agregó a la muestra 300 g de carbón activado y se agitó la muestra a 360 rpm por 24 horas.
- Se filtró la muestra para separar el carbón del líquido cianurado (solución pobre o solución barren)
- La solución barren obtenida es la que posteriormente se utilizó para realizar la biorremediación, esta solución barren se almacenó en frascos herméticos y a temperatura ambiente. Esta solución es la que fue considerada efluente líquido cianurado (solución barren).





Efluente líquido cianurado
agregar carbon activado



Extracción de oro
Homogenizar a 305 rpm
por 24 h



Filtrar el efluente líquido cianurado
para separar la solución líquida del
carbón activado



solución barren o solución pobre
(efluente líquido cianurado)

**Figura 11: Lixiviación a nivel de laboratorio para obtención de
efluente líquido cianurado**

2.5.3 Aislamiento de *Pseudomonas* sp. nativo (Restrepo, 2006)

El aislamiento de *Pseudomonas* sp. se llevó a cabo en un vaso precipitado de 1 litro. Se pesó 100 g de rípidos y/o 100 ml de la solución pobre cianurada, y se trasvasó a un vaso precipitado de 1000 ml que contuvo 200 ml de agua destilada estéril luego se homogenizó manualmente aproximadamente por 1 hora y se dejó reposar por 5 minutos. Se agregó un inóculo de 10 ml de la fase líquida en 90 ml de caldo nutritivo y otro inóculo de 10 ml a 90 ml de caldo peptonado, cada uno por separado; se incubó por 48 h a 30-32°C, se sembró una muestra de estos medios incubados en placas con Agar Glutamato mediante siembra por agotamiento, se incubó a 36°C por 48 horas, se tomó una de las colonias desarrolladas y se realizó la coloración Gram, prueba de la catalasa, prueba de motilidad y se sembró en agar glutamato e inoculó a 36°C por 48 h para su purificación. La cepa pura se conservó en viales a 4 °C.

Coloración Gram:

La membrana de las bacterias contiene péptidoglicano. Cuando se adiciona el cristal violeta y lugol forman un

complejo cristal violeta-yodo. La diferencia que se observa en la resistencia a la decoloración, se debe a que la membrana externa de las Gram negativas es soluble en solventes orgánicos, como por ejemplo la mezcla de alcohol/acetona. La capa de peptidoglicano que posee es demasiado delgada como para poder retener el complejo de cristal violeta-yodo que se formó previamente, y por lo tanto este complejo se escapa, perdiéndose la coloración azul-violácea. Pero por el contrario, las Gram positivas, al poseer una pared celular más resistente y con mayor proporción de peptidoglicanos, no son susceptibles a la acción del solvente orgánico, sino que este actúa deshidratando los poros cerrándolos, lo que impide que pueda escaparse el complejo cristal violeta/yodo, y manteniendo la coloración azul-violácea. Las bacterias Gram negativas tienen una capa más delgada de peptidoglicán y poseen una membrana externa.

Prueba de la catalasa (Mac Faddin, 2003)

Colocar una gota de agua oxigenada sobre un portaobjetos con ayuda de una pipeta Pasteur, Suspender la bacteria, Detectar la formación de burbujas

La enzima catalasa cataliza la liberación de agua y oxígeno a partir del peróxido de hidrógeno. La producción rápida de burbujas (efervescencia) cuando el cultivo bacteriano se mezcla con una solución de peróxido de hidrógeno se interpreta como una prueba positiva (es decir, presencia de catalasa).

Prueba de motilidad (Mac Faddin, 2003)

Con un asa de kolle en forma de aguja, se tomó una colonia característica y se lo introduce en el tubo, con medio semisólido (Agar Nutritivo). Introducir la aguja hasta el fondo, formando un canal de punción, trayecto por el cual la retiraremos luego.

Algunas bacterias son móviles por presentar flagelo, los flagelos son encontrados principalmente en las formas bacilares y pueden presentarse en número y posición variados. La base de esta prueba sirve para determinar si la bacteria es móvil o inmóvil.

La motilidad se puede observar por un crecimiento turbio lejos de la picadura realizada en la inoculación del medio de cultivo.

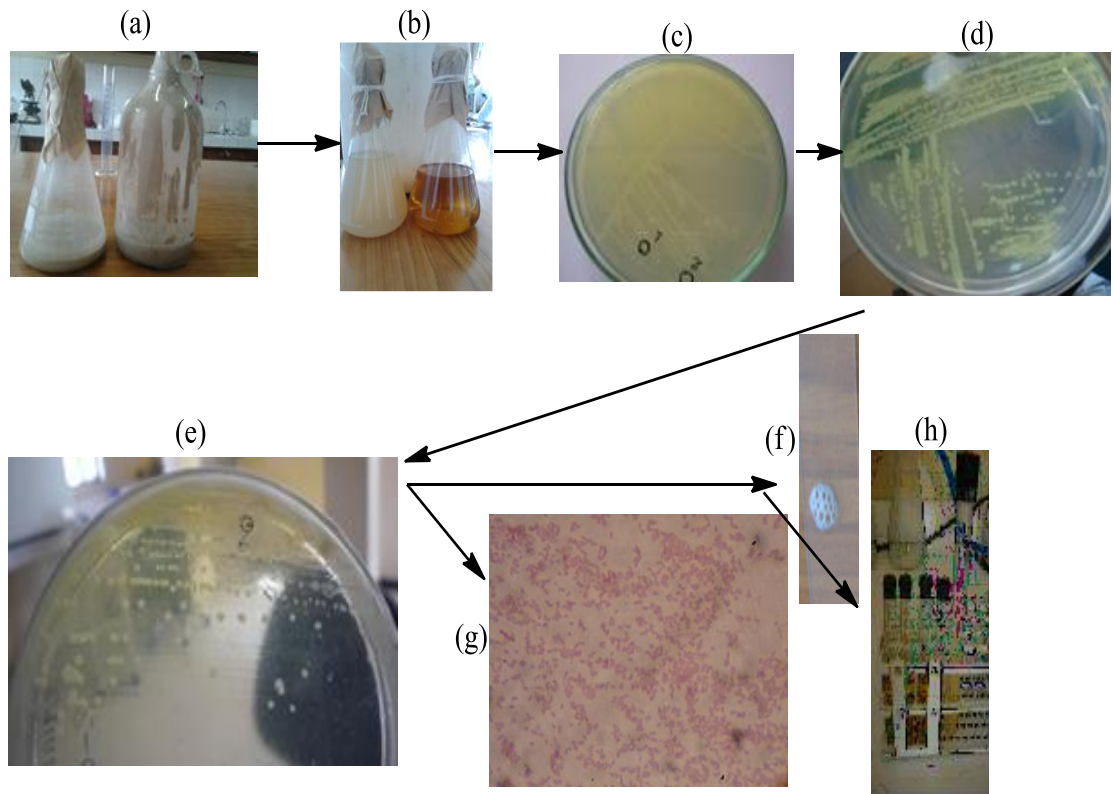


Figura 12 Aislamiento de *Pseudomonas* sp.: (a) Rípidos de la lixiviación a nivel de laboratorio con 200 ml de agua destilada estéril; (b) Incubó en Caldo peptonado a 30°C x 24 h (c) Crecimiento bacteriano en Agar Glutamato a 36° C x 24 h (d) Colonias amarillo verdosa (e) Colonias aisladas para realizar la identificación; (f) Prueba de la catalasa-positivo (g) Bacilos cortos Gram negativos (h) Prueba de motilidad de *Pseudomonas* sp.

2.5.4 Identificación de la *Pseudomonas* sp. (Bergey's, 2004)

La cepa aislada son bacilos Gram negativos, catalasa positiva, y presenta movilidad. Para su identificación se sometió a la cepa aislada a crecimiento a tres temperaturas 4, 36, y 41°C, después se realizó la prueba de licuefacción de la gelatina por último y se sembró en Agar *Pseudomonas* P.

Crecimiento bacteriano a 4, 36 y 41°C

Con un asa de kolle, se tomó una colonia característica y se sembró por agotamiento en agar glutamato que se incubó a 4, 36 y 41°C. La temperatura óptima de crecimiento *Pseudomonas* sp. fué de 36°C, también crece a 4°C, pero no se observa crecimiento a 41°C.

Licuefacción de la Gelatina (Mac Faddin, 2003)

La gelatina es una proteína que tiene la capacidad de gelificar, cuando es hidrolizada por la gelatinasa en los aminoácidos que la componen pierde su característica de gelificar. Se pueden emplear varios medios que permiten la visualización macroscópica como la gelatina adherida a carbón activado.

Los resultados se compararon con claves de identificación bacteriana (Bergey's Manual of systematic bacteriology 2004).

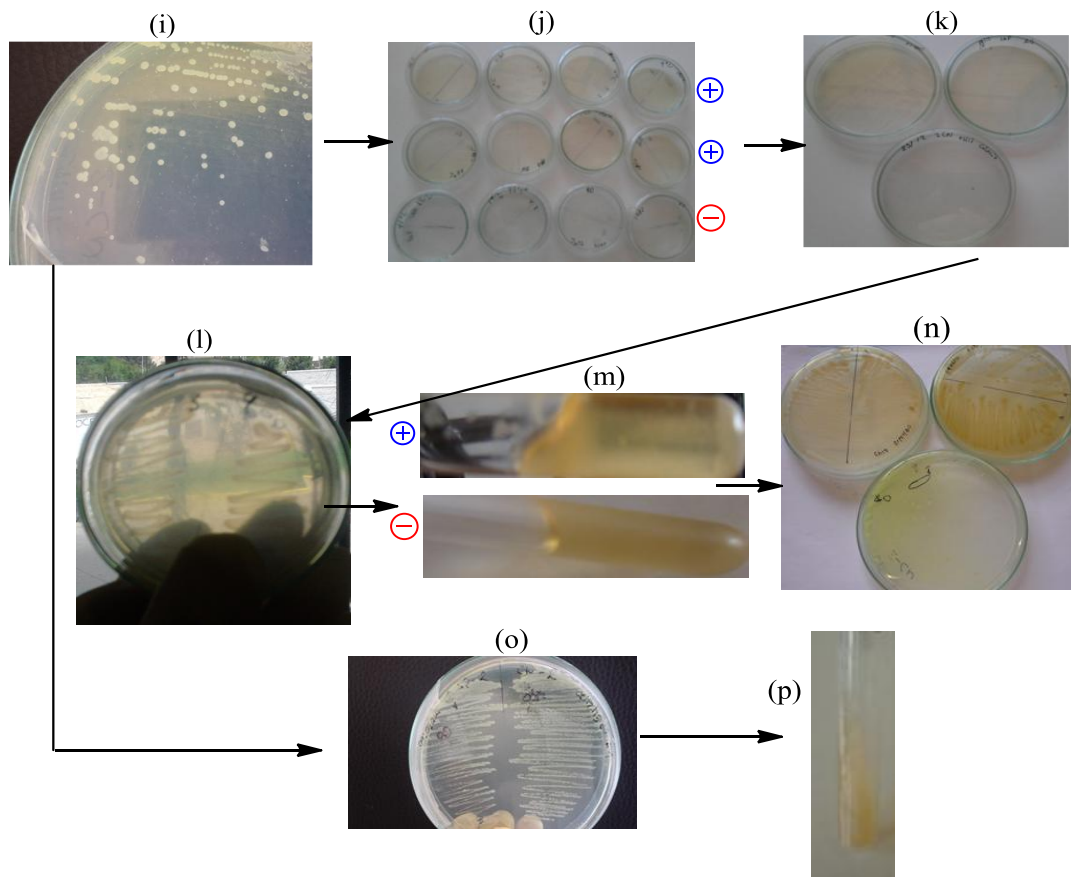


Figura 13 Identificación de *Pseudomonas* sp.: (i) Colonias aisladas de *Pseudomonas* sp.; (j) Crecimiento bacteriano a 4, 36 y 41°C; (k) Crecimiento de *Pseudomonas* sp. a 4 y 36° C, no se observó crecimiento a 41°C; (l) Crecimiento bacteriano (Colonias cremosas); (m) Prueba de licuefacción de la gelatina positivo; (n) Crecimiento en Agar Glutamato y en Agar Pseudomonas P (o) Crecimiento en Agar Nutritivo (p) Conservación de Cepa Nativa.

2.5.5 Activación y obtención del inóculo de *Pseudomonas* sp. para la experimentación (Marín, 2010)

- Se tomó una azada de la cepa aislada y se sembró en 50 ml caldo nutritivo que se incubó a 30°C por 24 h.
- Posteriormente se realizó diluciones de la cepa incubada usando como diluyente caldo peptonado al 0,1%, se realizó 4 diluciones (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) y extrayendo de la cepa incubada en caldo nutritivo una alícuota de 1 ml para agregarlo en 9ml de caldo peptonado para la dilución de 10^{-1} , y así sucesivamente para las siguientes diluciones hasta 10^{-4} .
- Se determinó la concentración bacteriana.

$$N_{25} = A \times 25 \times INV. DIL$$

$$N_{25} = 112 \times 25 \times 10^7$$

$$N_{25} = 2,8 \times 10^{10}$$

DONDE:

N° de cél = Número de Células

A = Número de células por mililitro contado en una cuadrícula de área de $1/25 \text{ mm}^2$ de la cámara Neubauer.

INV. DIL = Inverso de la dilución de donde se obtuvo la muestra

Cuadro 06. Concentración bacteriana y volúmenes de solución barren a utilizar

REACTOR N°	CONCENTRACIÓN BACTERIANA (cél/ml)	INÓCULO UTILIZADO (ml)	VOL MUESTRA (ml)	MUESTRA TOTAL (ml)
1	$1,75 \times 10^8$	19	285	304
2	$8,75 \times 10^7$	9,5	294,5	304
3	$5,47 \times 10^6$	0,15	303,9	304

FUENTE: Elaboración propia

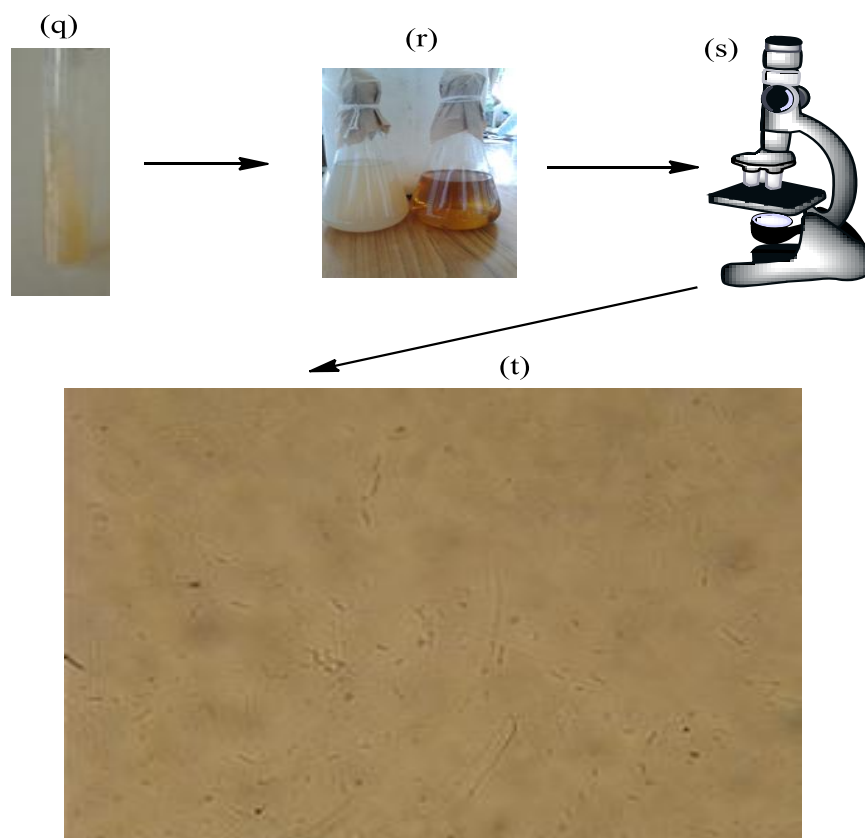
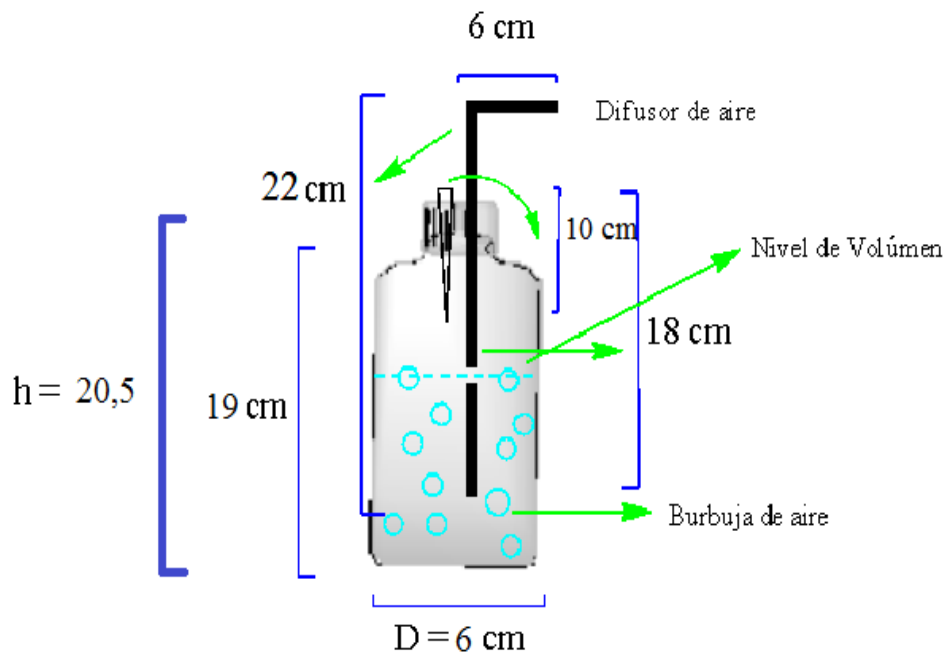


Figura 14 Activación *Pseudomonas* sp.: (q) Cepa de *Pseudomonas* sp.; (r) Siembra en Caldo nutritivo incubar 30°C x 24h (s) observación al microscopio en cámara newbauer, (t) Observación de *Pseudomonas* sp. en a 4 y 36° C, no se observó crecimiento a 41°C;

2.5.6 Diseño de biorreactores

Para esta experimentación se diseñó y construyó los biorreactores aireados con las siguientes características:

- Biorreactor de material de vidrio de aproximadamente de 500 ml de capacidad con las siguientes dimensiones: 20,5 cm altura; 6,0 cm de diámetro en la base con tapa de jebe de 6 cm de diámetro con dos agujeros de 0,5 y 0,6 mm de diámetro, por donde se instalaron dos tubos, un tubo que sirvió para ser conectado con una manguera al motor de aireación de 1,5 l/min y el otro tubo que sirvió para la salida. Los tubos de vidrio son de 22 cm de altura y el otro tubo de aproximadamente 10 cm de altura.
- Todo el sistema de biorreactores se conectó a un motor de pecera, para obtener una muestra aireada.



Leyenda:
 h = altura del biorreactor

Figura 15. Esquema del biorreactor diseñado y construido.

2.5.7 Acondicionamiento de los biorreactores para la experimentación.

Se utilizó 2 motores de pecera con flujo de salida de aire de 2,5 l/min con una salida de aire, que produjo en los biorreactores aireados 0,15 VVM. Cada motor sirvió para airear 03 biorreactores. El motor a través de una manguera en forma de "Y" se conectó a un primer biorreactor, las dos

salidas del motor se acoplaron a dos de los terminales de la manguera en “Y” el tercer terminal de la manguera se conectó al tubo de entrada del biorreactor; el primer biorreactor se conectó luego al segundo biorreactor, uniendo con la manguera el tubo de salida de aire del primer biorreactor con el tubo de entrada de aire del segundo biorreactor, el segundo biorreactor se conectó finalmente al tercero biorreactor, uniendo el tubo de salida de aire del segundo biorreactor con el tubo de entrada de aire del tercer biorreactor por medio también de una manguera.

En la manguera en forma de “Y” se intercaló un filtro de aire Vacushell para evitar la entrada de contaminante desde el aire insuflado en los biorreactores. Posteriormente se procedió a esterilizar en autoclave todo el sistema de biorreactores a 121°C x 15min quedando así acondicionado para la experimentación.



Foto 01: Biorreactores aireados durante el proceso de degradación de cianuro libre por *Pseudomonas* sp.

En la foto 01, muestra el proceso de degradación de cianuro libre por *Pseudomonas* sp. nativo en los dos sistemas de biorreactores conectados en serie, la evaluación se realizó cada 24 horas por un periodo de 7 días.

2.5.8 Experimentación de la degradación de cianuro

Acondicionados los dos sistemas de biorreactores aireados se introdujo con asepsia la solución barren y el inóculo bacteriano como se detalla a continuación:

- En el primer biorreactor se introdujo 285ml de solución barren luego 19 ml de inóculo bacteriana.
- En el segundo biorreactor se introdujo 294,5 ml de solución barren y 9.5 ml de inóculo bacteriano.
- En el tercer biorreactor se introdujo 303,9 ml de muestra (solución barren o solución pobre) obtenidas en el proceso de extracción de oro; después al mismo biorreactor se inoculó 0,1 ml del caldo nutritivo que contiene a *Pseudomonas* sp.
- Los sistemas de biorreactores luego se incubaron bajo los siguientes parámetros:
 - pH : 10
 - T° : ambiente

- Concentración bacteriana:
 - ✓ 1^{er} Biorreactor (A)= $1,75 \times 10^8$ cél/ml
 - ✓ 2^{do} Biorreactor (B)= $8,75 \times 10^7$ cél/ml
 - ✓ 3^{er} Biorreactor (C)= $5,47 \times 10^6$ cél/ml

- Volumen de inóculo bacteriano:
 - ✓ 1^{er} Biorreactor (A) = 19 ml
 - ✓ 2^{do} Biorreactor (B)= 9,5 ml
 - ✓ 3^{er} Biorreactor (C)=1 ml

- Volumen final de los biorreactores:
 - ✓ 304 ml

- VVM: : 1,5

- Concentración de cianuro inicial de cada biorreactor:
 - ✓ 250 ppm

2.5.9 Evaluación de la experimentación de la degradación de cianuro

En esta fase de experimentación se evaluó la biodegradación de cianuro libre cada 24 horas, mediante el método titulométrico. En este método se realizó lo siguiente:

Detección de cianuro libre (Soto, 2001)

- Con una jeringa estéril de 10ml se tomó 5 ml de muestra del biorreactor el cual fue agregado a un beakers de 50 ml de capacidad.
- Luego se adicionó 3 gotas de Ioduro de Potasio al 10%
- Posteriormente se homogenizó y tituló la muestra con nitrato de plata.
- Para la determinación de cianuro total se procedió a multiplicar el gasto total por 0,5 (factor).
- Finalmente el gasto se multiplicó por 0,5; según la siguiente fórmula:

$$CC\left(\frac{\text{mg}}{\text{L}}\right) = \text{GASTO TOTAL} \times 0,5$$

Leyenda:

CC = Concentración de cianuro libre
mg/l = miligramos por litro
Gasto total = Gasto total de nitrato de plata

2.5.10 Determinación de la capacidad degradadora de cianuro libre por *Pseudomonas* sp.

Para la determinación en la disminución de la concentración inicial de cianuro libre a través del tiempo, se utilizó tres tratamientos A, B, y C (Biorreactores) con sus respectivas repeticiones, la disminución de cianuro a través del tiempo se determinó por el método titulométrico con nitrato de plata; en total constaron de 6 biorreactores que fueron adaptados con filtros vacuchield, algodón, tubos de vidrio, etc. Cabe mencionar que el pH del medio fue constante.

2.5.11 Cuantificación de la capacidad degradadora de cianuro por *Peudomonas* sp.

La cuantificación de la cepa degradadora se realizó en función a la concentración de cianuro libre, con el fin de determinar la concentración de cianuro libre degradado en función de la máxima concentración de cianuro libre evaluado; a su vez para determinar también la tasa de degradación se hizo dividiendo la máxima concentración de

cianuro libre degradado con el tiempo en que se produjo esta máxima degradación.

Finalmente por métodos estadísticos se realizó el análisis de varianza ANOVA para establecer si existe diferencia significativa entre los tratamientos para la máxima degradación de cianuro y para la tasa de degradación; también se realizó la prueba de Tukey para determinar cuál de los tratamientos tuvo mayor valor de degradación y tasa de degradación de cianuro.

III. RESULTADOS

3.1. CAPACIDAD DEGRADADORA DE CIANURO POR *Pseudomonas* sp.

Cuadro 07: Concentración de cianuro libre determinados en los biorreactores (A, B, C) con sus repeticiones (R) en 168 horas de evaluación.

HORAS DE EVALUACIÓN	CONCENTRACIÓN DE CIANURO LIBRE DETERMINADO EN LOS BIORREACTORES AIREADOS (ppm)								
	TRATAMIENTO								
	A			B			C		
	R1	R2	PROM A	R1	R2	PROM B	R1	R2	PROM C
0	250	250	250	250	250	250	250	250	250
24	130	140	135	170	175	172,5	175	180	177,5
48	100	125	112,5	125	100	112,5	100	115	107,5
72	50	75	62,5	100	75	87,5	50	90	70
96	30	40	35	50	40	45	40	60	50
120	20	30	25	40	30	35	30	40	35
144	5	10	7,5	25	15	20	25	20	22,5
168	2,5	5	3,75	10	10	10	10	15	12,5

Leyenda:

FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

- A = Concentración *Pseudomonas* sp. $1,75 \times 10^8$ cél/ml
- B = Concentración *Pseudomonas* sp. $8,75 \times 10^7$ cél/ml
- C = Concentración *Pseudomonas* sp. $5,47 \times 10^6$ cél/ml
- R1 = Primera Repetición
- R2 = Segunda Repetición
- ppm = Partes por millón

En el Cuadro 07: se observa la disminución de las concentraciones iniciales de cianuro libre (250 ppm) presentes en los biorreactores aireados; en el biorreactor "A" se obtuvo una

concentración de cianuro libre final de 3,75 ppm, en el “B” de 10 ppm y en el “C” 12,5 ppm.

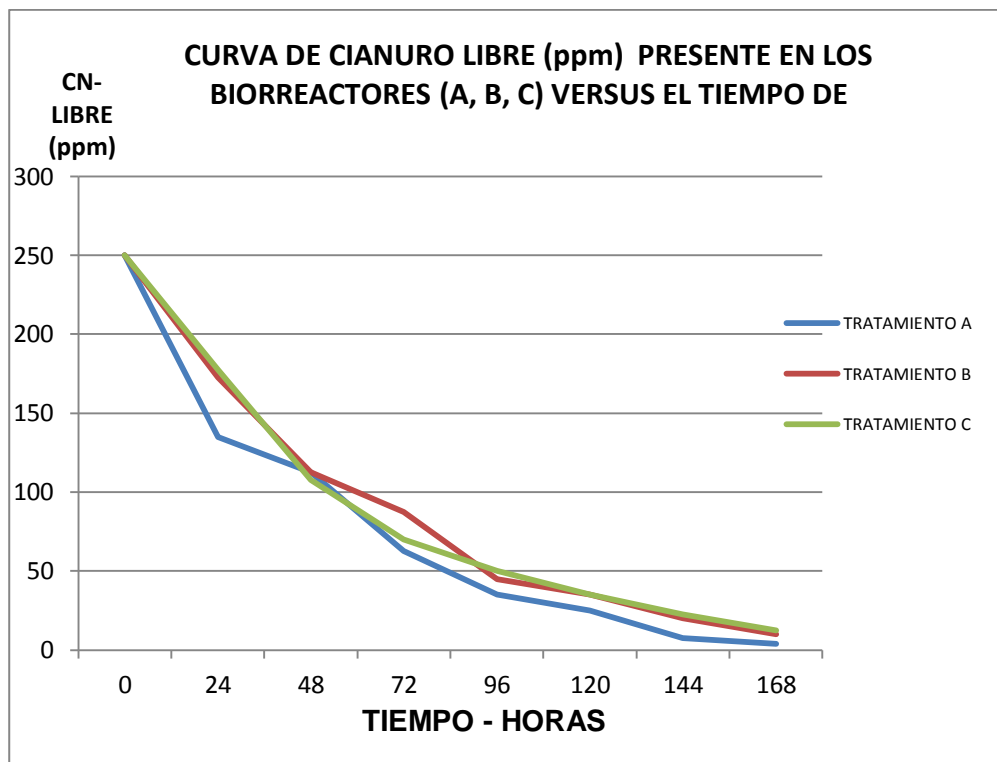


Figura 16: Curva de concentraciones de cianuro libre presente en los biorreactores (A, B, y C) en 168 horas de evaluación.

En la Grafico 16, se observa la curva de disminución de cianuro libre en los tratamientos A, B, C; partiendo de una concentración inicial de 250 ppm de cianuro libre presente en los biorreactores, llegando a obtener un resultado de 3,75; 10; y 12,5 ppm respectivamente a cada tratamiento.

3.2. CUANTIFICACIÓN DE LA CAPACIDAD DEGRADADORA DE CIANURO POR *Pseudomonas* sp.

Cuadro N° 08: Concentración de cianuro libre degradado en los tratamientos (A, B, C) con sus repeticiones (R) en 168 horas de evaluación.

N° DE EVALUACIONES	HORAS EVALUACIÓN	CONCENTRACIÓN DE CIANURO LIBRE BIODEGRADADO EN LOS TRATAMIENTO A, B, C; CON SUS REPETICIONES EN 168 HORAS DE EVALUACIÓN (ppm)																						
		TRATAMIENTOS																						
		A							B							C								
		R 1			R2				PROM A	R1			R2				PROM B	R1			R2			
[CN] inicial	[CN] final	Degradación	[CN] inicial	[CN] final	Degradación	[CN] inicial	[CN] final	Degradación		[CN] inicial	[CN] final	Degradación	[CN] inicial	[CN] final	Degradación	[CN] inicial		[CN] final	Degradación	[CN] inicial	[CN] final	Degradación		
0	0	250	250	0	250	250	0	0	250	250	0	250	250	0	0	250	250	0	250	250	0	0		
1	24	250	130	120	250	140	110	115	250	170	80	250	175	75	77,5	250	180	70	250	190	60	65		
2	48	250	100	150	250	125	125	137,5	250	125	125	250	100	145	137,5	250	100	150	250	115	135	142,5		
3	72	250	50	200	250	75	175	187,5	250	100	150	250	75	170	162,5	250	50	200	250	90	160	180		
4	96	250	30	220	250	40	210	215	250	50	200	250	40	200	205	250	40	210	250	60	190	200		
5	120	250	20	230	250	30	220	225	250	40	210	250	30	210	215	250	30	220	250	40	210	215		
6	144	250	5	245	250	10	240	242,5	250	25	225	250	15	225	230	250	25	225	250	20	230	227,5		
7	168	250	2,5	247,5	250	5	245	246,25	250	10	240	250	10	235	240	250	10	240	250	15	235	237,5		

Leyenda: A = Concentración bacteriana $1,75 \times 10^8$ cel/ml
 B = Concentración bacteriana $8,75 \times 10^7$ cel/ml
 C = Concentración bacteriana $5,47 \times 10^6$ cel/ml

R1 = Primera Repetición
 R2 = Segunda Repetición
 ppm = Partes Por Millón

FUENTE: ELABORACION PROPIA

En el cuadro 08: se observa los tres tratamientos utilizados en toda la experimentación con sus respectivas repeticiones, en el cual se determinó la cantidad de cianuro libre degradado en cada tratamiento durante 168 horas de evaluación. Se obtuvo los máximos valores de cianuro degradados partiendo de una concentración de cianuro inicial igual a 0 ppm.

Cuadro 09: Promedio de la concentración de cianuro libre degradado en los tratamientos (A, B y C) en 168 horas de evaluación.

HORAS DE EVALUACIÓN	CONCENTRACIÓN DE CIANURO LIBRE DEGRADADO POR <i>Pseudomonas</i> sp. NATICO								
	TRATAMIENTO								
	A			B			C		
	R1	R2	PROM A	R1	R2	PROM B	R1	R2	PROM C
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	120	110	115	80	75	77,5	70	60	65
48	150	125	137,5	125	145	135	150	140	145
72	200	175	187,5	150	170	160	190	165	177,5
96	220	210	215	200	200	200	200	195	197,5
120	230	220	225	210	210	210	215	215	215
144	245	240	242,5	230	230	230	220	235	227,5
168	247,5	245	246,25	240	240	240	235	240	237,5

FUENTE: ELABORACION PROPIA

En la Cuadro 09: se observa en el tratamiento “A” una concentración de degradación de cianuro libre de 246,25 ppm; en el “B” de 240 ppm y en el “C” 237,5 ppm como valores más altos y finales con respecto a sus respectivas concentraciones iniciales de degradación de cianuro libre.

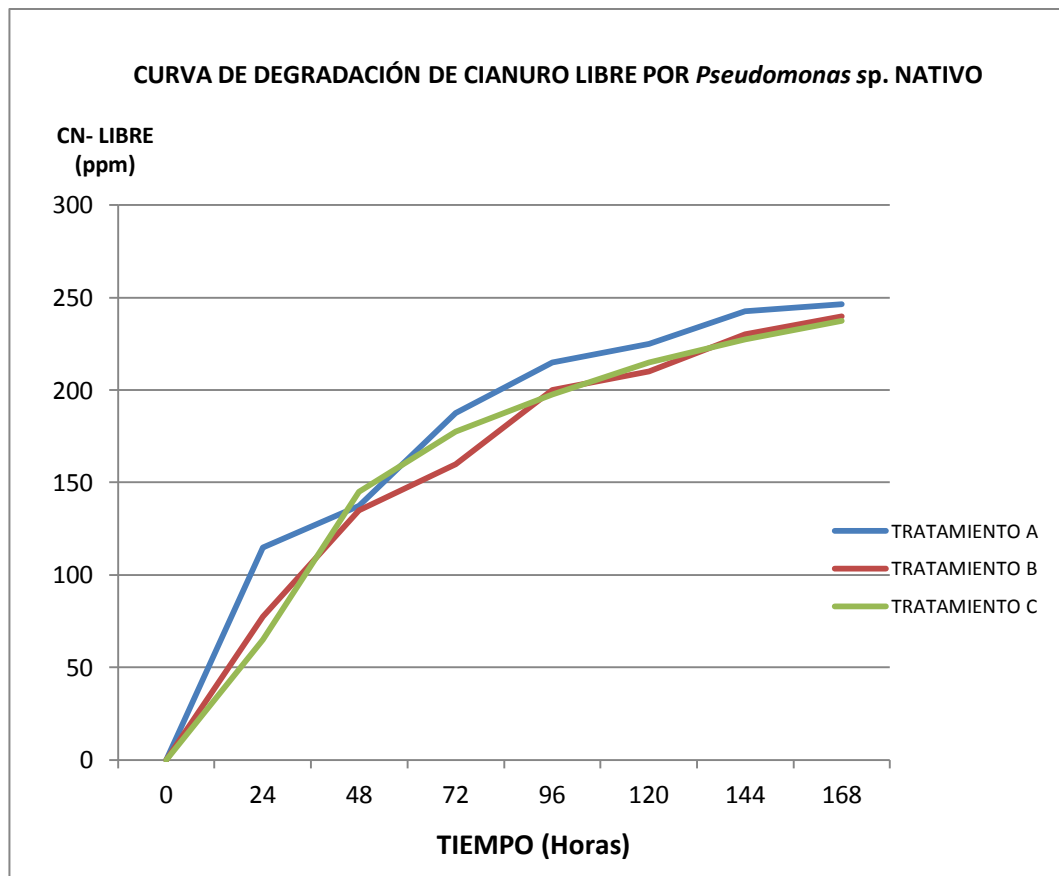


Figura 17: Curvas de cianuro libre degradado por *Pseudomonas* sp. En los tratamientos (A, B, C) en 168 horas de evaluación.

En la Figura 17: se observa la curva de concentración de cianuro degradado; en la cual la concentración inicial de cianuro libre degradado a través del tiempo de experimentación ascendió a un valor significativamente más alto.

Análisis Estadístico

Se utilizó la técnica del análisis de varianza usando la prueba en F a un nivel de significación de 0,05 y 0,01. Se empleó la prueba de Tukey para establecer si existe diferencias entre tratamientos.

Cuadro 10: Análisis de varianza de degradación de cianuro libre (ppm)

Fuentes de variación	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculado	F tabular 0,05 0,01
Días de Evaluación	6	113430,0	18905,0	226,46	2,57 3,81 **
Concentraciones	2	2327,08	1163,54	13,94	3,47 5,78 **
Interacciones AXB	12	2195,83	182,986	2,19	2,25 3,17 NS
Error	21	1753,130	83,482		
Total	41	119706,00			

CV: 4,923 %

** Altamente significativo

NS. Significativo

En el cuadro 10 del análisis de varianza, muestra que existen diferencias estadísticas altamente significativas entre tratamientos, obteniéndose un coeficiente de variación de 4,923% que es aceptable a nivel de laboratorio.

Cuadro 11: Prueba de significación de Tukey para el factor días de evaluación de degradación de cianuro libre (ppm)

O.M.	DÍAS	PROMEDIO	SIGNIFICACIÓN α 0,05
1	24	241,25	a
2	48	233,33	b
3	72	216,66	b c
4	96	204,167	c
5	120	175,00	d
6	144	139,67	e
7	168	85,83	f

Letras iguales no difieren estadísticamente $p < 0,05$

En el cuadro 11 de la prueba de Tukey al 95% de confiabilidad, se muestra que a las 24 horas se observó mayor promedio de degradación con 241,25 ppm , le sigue el segundo y tercer lugar a las 48 y 72 días , con 233,33 y 216,66 ppm en último lugar los 144

y 168 días con 139,67 y 85,83 ppm se aprecia que existen 3 grupos homogéneos que estadísticamente son similares en sus promedios.

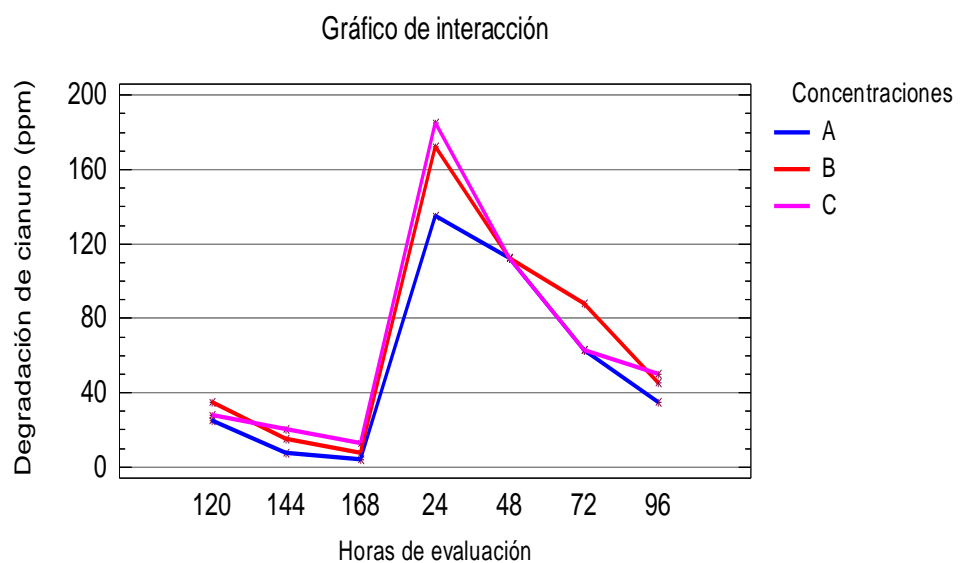


Figura 18: Interacción de la mayor degradación de cianuro libre en 168 horas de evaluación

En el Figura 18 se puede observar que la mayor degradación de cianuro libre por *Pseudomonas* sp., fue a las 24 h comenzado la experimentación, seguido a las 48 horas de evaluación.

Cuadro 12: Prueba de significación de Tukey para el factor concentración bacteriana en la degradación de cianuro libre (ppm)

O.M.	Concentración	Promedio	Significación α 0,05
1	A	195,536	a
2	C	180,714	b
3	B	178,929	b

Letras iguales no difieren estadísticamente $p < 0,05$

En el cuadro 12 de la prueba de Tukey al 95% de confiabilidad, se observa que la concentración A logró el mayor promedio con 195,536 seguido de la concentración C con 180,714 y en el último lugar la concentración B con 178,929.

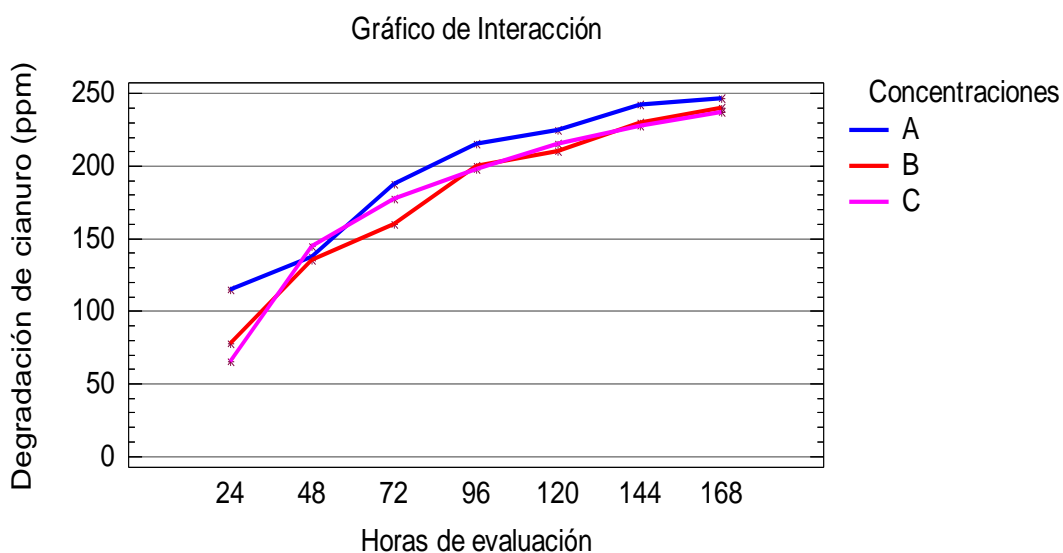


Figura 19: Interacción de la biodegradación de cianuro libre en 168 horas de evaluación

En el Figura 19: se observa la interacción de los tres tratamientos utilizados a lo largo de la experimentación, donde se puede visualizar que la concentración A, tuvo mayor capacidad de degradación frente a los demás tratamientos.

3.3.PORCENTAJE DE DEGRADACION DE CIANURO LIBRE POR *Pseudomonas* sp.

Cuadro 13: Porcentaje de degradación de cianuro libre en los tratamientos A, B y C durante las 168 horas de experimentación.

PORCENTAJE DE DEGRADACIÓN DE CIANURO LIBRE (%)				
Nº DE EVALUACIONES	TIEMPO DE EVALUACIÓN	TRATAMIENTOS		
		A	B	C
1	24	46	31	26
2	48	55	54	58
3	72	75	64	71
4	96	86	80	79
5	120	90	84	86
6	144	97	92	91
7	168	98,5	96	95

FUENTE: ELABORACION PROPIA

En la Cuadro 13: se observa en el tratamiento A tuvo un mayor porcentaje de degradación de cianuro libre con 98,5% del cianuro total.

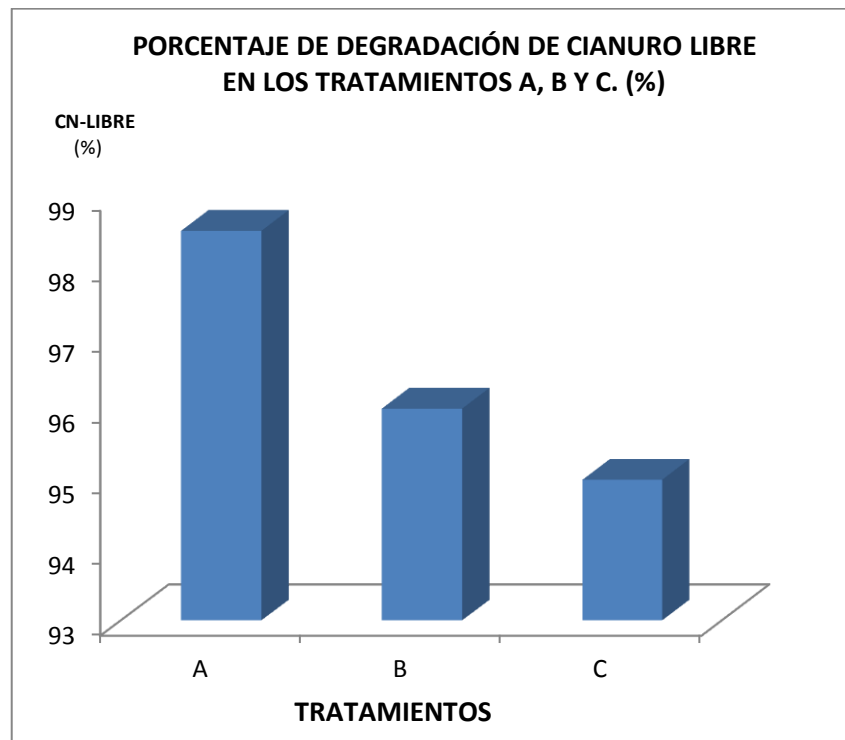


Figura 20: Porcentaje de degradación de cianuro libre en los tratamientos A, B y C durante las 168 horas de experimentación.

En el gráfico 20, se observa los porcentajes de biodegradación de cianuro libre por *Pseudomonas* sp. nativo en 168 horas de evaluación. El tratamiento A tuvo mayor porcentaje de degradación de cianuro libre frente a los demás tratamientos.

3.4. CONCENTRACIÓN MÁXIMA DE CIANURO LIBRE DEGRADADO

Cuadro 14: Concentración máxima de cianuro libre degradado en los tratamientos A, B, y C con sus repeticiones (R).

HORAS EVALU ADAS	CONCENTRACIÓN MÁXIMA DE CIANURO LIBRE BIODEGRADADO (ppm)								
	TRATAMIENTOS								
	A			B			C		
	R1	R2	PROM A	R1	R2	PROM B	R1	R2	PROM C
168	247,5	245	246,25	240	240	240	235	240	237,5

FUENTE: ELABORACION PROPIA

En la Cuadro 14: se muestra la máxima concentración de cianuro libre degradado por *Pseudomonas* sp. nativo, en un periodo de evaluación de 168 horas.

Cuadro 15: Análisis de varianza de máxima concentración de cianuro libre.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado medio	F calculado	F tabular 0,05 0,01
Tratamientos	2	81,250	40,625	7,80	9,55 30,82
Error	3	15,625	5,208		ns
Total	5	96,875			

CV: 0,945 %

NS: NO significativo

El cuadro 15, del ANOVA para la máxima concentración de cianuro libre resultó no significativo entre los tratamientos, El coeficiente de variabilidad fue de 0,945% que es aceptable para las condiciones del ensayo.

Cuadro 16: Prueba de significación de Tukey de máxima concentración de cianuro libre

O.M.	Tratamientos	Promedio	Significación α 0,05
1	T ₁	246,25	a
2	T ₂	240,0	a
3	T ₃	237,50	a

Letras iguales no difieren estadísticamente $p < 0,05$

En el cuadro 16 de la prueba de Tukey al 95% de confiabilidad, se aprecia que los tratamientos son estadísticamente similares.

3.5. TASA DE DEGRADACIÓN DE CIANURO

Cuadro 17: Tasa de degradación de cianuro libre respecto a la concentración máxima de cianuro libre degradado en los tratamientos A, B, C y el respectivo tiempo en que fue alcanzado.

TIEMPO (h)	TASA DE DEGRADACIÓN DE CIANURO LIBRE (ppm/h)								
	BIORREACTORES								
	A			B			C		
	R1	R2	PROM A	R1	R2	PROM B	R1	R2	PROM C
168	1,4732	1,4583	1,4658	1,4286	1,4286	1,4286	1,3988	1,4286	1,4137

FUENTE: ELABORACION PROPIA

En la Cuadro 17: se muestra la tasa de degradación de los tres tratamientos en 168 horas de evaluación; en el que el tratamiento A tiene una mayor tasa de degradación con 1,46; seguido del tratamiento B con 1,43 y por último el tratamiento C con 1,41 ppm/h.

Cuadro 18: Análisis de varianza de la tasa de degradación

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado medio	F calculado	F tabular 0,05 0,01
Tratamientos	2	0,0029	0,0014	7,80	9,55 30,82 ns
Error	3	0,0005	0,0001		
Total	6	0,00034			

CV: 0,69 %

NS no significativo

El cuadro 18 del ANOVA muestra que la tasa de degradación resultó no significativo entre los tratamientos, El coeficiente de variabilidad fue de 0,69% es aceptable para las condiciones del ensayo.

Cuadro 19: Prueba de significancia de Tukey a las 48 horas de evaluación

O.M.	Tratamientos	Promedio	Significación α 0,05
1	T ₁	1,46	a
2	T ₂	1,43	a
3	T ₃	1,41	a

Letras iguales no difieren estadísticamente $p < 0,05$

En el cuadro 19 de la prueba de Tukey al 95% de confiabilidad, se aprecia que los tratamientos son estadísticamente similares.

IV. DISCUSIÓN

Los resultados muestran que el proceso de biorremediación utilizando *Pseudomonas* sp. nativo, aislados de los relaves mineros podría ser considerado como una alternativa para degradar compuestos tóxicos a nivel industrial, considerando que los resultados obtenidos fueron positivos a pesar que sólo se realizó a nivel de laboratorio. *Pseudomonas* sp. puede degradar el cianuro durante su metabolismo, empleando al cianuro como fuente de carbono y nitrógeno convirtiéndolo en amoníaco y dióxido de carbono.

En el cuadro 07 y Figura 11, se evidencia la disminución de la concentración de cianuro libre inicial presente en los biorreactores aireados, que de 250 ppm se obtuvo, 3,75 ppm en el tratamiento A, 10 ppm en el tratamiento B y 12,5 ppm para el tratamiento C; por lo que la curva de concentración de cianuro libre presente en los tratamientos tiene una pendiente negativa. Pero para la cuantificar el cianuro libre total degradado por *Pseudomonas* sp. en las 168 horas de evaluación, que se evidencian en el Cuadro 08 y cuadro 09, se determinó que mientras transcurre las horas de evaluación, la cantidad de cianuro libre degradado es mayor, por lo que se obtuvo una degradación de cianuro libre

degradado de 246,25 ppm en el tratamiento A, 240 ppm para el B y 237,5 ppm para el C, que fueron las concentraciones más altas obtenidas en todo el tratamiento partiendo de una concentración inicial de 0 ppm.

En el Cuadro N° 10, del análisis de varianza de degradación de cianuro, se evidencia que existen diferencias estadísticas altamente significativas entre tratamientos, teniendo en cuenta la concentración bacteriana y el tiempo de evaluación. Para el factor días de evaluación se encontraron diferencias altamente significativas lo que señala que en uno de los días hubo mayor degradación. Para el factor concentración bacteriana se evidencia diferencias altamente significativas es decir que una de las concentraciones obtuvo un mayor promedio de degradación. Por otro lado, para el factor interacción no se encontró diferencias estadísticas lo cual señala que ambos factores actuaron independientemente, estos resultados son confiables, teniendo un coeficiente de variación de 4,923 % que es aceptable para las condiciones del experimento desarrollado en laboratorio.

En el cuadro 11, la prueba de Tukey al 95% de confiabilidad, a las 24 horas se observó el mayor promedio de degradación con 241,25 ppm, le sigue el segundo y tercer lugar a las 48 y 72 días , con 233,33 y 216,66 ppm en último lugar los 144 y 168 días con 139,67 y 85,83 ppm se aprecia que existen 3 grupos homogéneos que estadísticamente

son similares en sus promedios. En el Figura 18, la mayor degradación de cianuro libre por *Pseudomonas* sp., fue a las 24 h comenzado la experimentación.

En todo el proceso de experimentación tuvo porcentaje de degradación de cianuro libre de 98,5% para el tratamiento A, en el B de 96% y en el C de 95%.

En el análisis de varianza de la máxima concentración de cianuro libre (cuadro 15) resultó no significativo entre los tratamientos, teniendo un coeficiente de variabilidad de 0,945% que es aceptable para las condiciones del ensayo y en el cuadro 16, los tratamientos son estadísticamente similares; esto indica que *Pseudomonas* sp. nativo tiene capacidad degradadora de cianuro y que entre los tratamientos la concentración bacteriana empleada no influye sobre la capacidad degradadora de cianuro.

El análisis de varianza para de la tasa de degradación (cuadro 18); resultó no significativo entre los tratamientos, el coeficiente de variabilidad fue de 0,69% que es aceptable para las condiciones del ensayo, se determina que la velocidad de degradación de cianuro es similar en los tres tratamientos.

Edison Gil, en su investigación determinó las condiciones óptimas de biodegradación de cianuro en aguas residuales contaminadas: a un pH 9,5; temperatura 28 °C, tamaño del inóculo $1,21 \times 10^5$ UFC/ml, agitación de 200 rpm y concentración inicial de cianuro 15 mg/L. Los resultados obtenidos indicaron que el Tratamiento biológico empleando *Pseudomonas* sp. puede ser más competitivo que los tratamientos químicos. Empleando el acoplamiento de ambas técnicas (fotocatalítica y biotecnológica) se obtuvo un 99,86% de reducción en la concentración de cianuro; estos resultados indicaron que puede emplearse este acoplamiento para la eliminación de compuestos orgánicos tóxicos en aguas residuales.

María Garces en la investigación de aislamiento de un consorcio de microbianos degradadores de cianuro determinó el crecimiento de consorcios bacterianos en todas las fases del proceso, tanto en condiciones aerobias como anaerobias, lo que permitió afirmar que existió en este consorcio ambos tipos microbianos; con un crecimiento menor en condiciones anaerobias.

Agudelo et al. 2010, determinaron que en una muestra de agua que tuvo una concentración inicial de 200 ppm de cianuro a un pH 10 en 15 días de evaluación, *Pseudomonas aeruginosa* degradó cianuro hasta una

concentración inicial de cianuro de 11,5 ppm; y cuando se tuvo una concentración inicial de 500 ppm de cianuro a un pH 10 en 15 días de evaluación se obtuvo una concentración final de 12,6 ppm.

Restrepo en el 2006, determinó la biodegradación de cianuro con la cepa nativa de *Pseudomonas fluorescens* a diferentes concentraciones de cianuro de sodio y en un periodo de evaluación de 236 horas, el resultado fue la degradación de más del 90% de cianuro de una concentración inicial de 600 ppm, y de aproximadamente 98% de degradación de cianuro cuando se tiene una concentración inicial de 200 ppm

Marín y col., 2010. Determinaron que el tiempo de biodegradación influye en el proceso de degradación de cianuro de sodio, el pH no se considera como un parámetro que influye directamente en el proceso degradativo del cianuro. Evaluando las concentraciones de biodegradación se determinó que la bacteria nativa C33 *Streptococcus* sp. logró degradar en 91% del cianuro inicial, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 49838 disminuyó el 92% de la concentración de cianuro y *Bacillus* sp. degradó un 86,3%. Las pruebas realizadas permitieron determinar que el periodo de vida de las bacterias era muy corto porque necesitaban una fuente extra de energía que les permita un mayor desarrollo y degradación de cianuro como fuente de nitrógeno y carbono, por lo que

se optó por adicionar suero glucosado, que permitió que los microorganismos se adapten al medio.

En la Tasa de degradación de cianuro libre en 168 horas de evaluación, no hubo diferencias significativas entre tratamientos por influencia de la concentración bacteriana, por lo que *Pseudomonas* sp. nativo degrada 1,46 ppm de cianuro libre por hora.

La velocidad de degradación depende tanto del tipo de microorganismo, como de la concentración inicial de cianuro en el medio. A mayor concentración de cianuro, mayor es el tiempo de degradación y por ende la velocidad es menor, esto guarda relación con el pH que se mantiene entre 9,5 y 10 por lo que se garantiza que la reducción de concentración de cianuro por acción de la biodegradación por el microorganismo y no por la volatilización del cianuro.

V. CONCLUSIONES

1. *Pseudomonas* sp. nativo con una concentración bacteriana de $1,75 \times 10^8$; $8,75 \times 10^7$ y $5,47 \times 10^6$ cél/ml degradó en 168 horas de evaluación 246,25 (98,5%), 240 (96%) y 237,5 (95%) ppm de cianuro libre, que estuvo en una concentración inicial de 250 ppm en los tres biorreactores.
2. Teniendo en cuenta las máximas concentraciones de cianuro libre degradado en las 168 horas de evaluación y la concentración de $1,75 \times 10^8$; $8,75 \times 10^7$ y $5,47 \times 10^6$ cél/ml, *Pseudomonas* sp. nativo logró una tasa de degradación de cianuro libre de 1,46; 1,43 y 1,41 ppm/h respectivamente.
3. En la evaluación se determinó que el periodo de vida de las bacterias es muy corto porque necesitan una fuente extra de energía que les permita un mayor desarrollo y degradación de cianuro como fuente de nitrógeno y carbono.
4. En las pruebas de identificación bacteriana del género *Pseudomonas*, la cepa nativa identificada fue *Pseudomonas fluorescens*.
5. *Pseudomonas fluorescens* demostró un alta eficiencia en la degradación de cianuro libre en los efluentes líquidos cianurados a un pH 10 y a temperatura ambiente en condiciones de laboratorio.

RECOMENDACIONES

- Determinar los parámetros óptimos para la degradación de cianuro libre por medio *Pseudomonas fluorescens*.
- Realizar una caracterización molecular la especie nativa aislada de una lixiviación de oro a nivel de laboratorio.
- Se debe cuantificar la especie nativa en todo el proceso de experimentación para determinar el tiempo de vida de la bacteria y el tiempo de generación.
- Determinar todos los residuos generados en un proceso de extracción de oro y que otros compuestos han sido degradados o generados por este tipo de tratamiento biológico.
- En laboratorio, simular las condiciones ambientales y características químicas del mineral en donde se desea aplicar la biorremediación para alcanzar un óptimo desarrollo de los microorganismos.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Adams S., Randy H.; Domínguez V. y García L., 1999. Potencial de la biorremediación de suelo y agua impactados por petróleo. Revista Terra. Vol. 17, No. 2
<http://www.chapingo.mx/terra/contenido/17/2/art159-174.pdf>
- Álvarez R., 2005. Aplicación de sistemas pasivos para el tratamiento de soluciones residuales de procesos de cianuración en minería de oro. Tesis Doctoral.
- Álvarez V. 1997. ¿Lo que ocurre en Yanacocha, Cajamarca, Perú; es un crimen? <http://www.monografias.com/trabajos38/mineriayanacocha/mineriayanacocha2.shtml>
- Atsushi W., Kazuyoshi Y., Kazunori I. y Isao K., 1998. Cyanide hydrolysis in a Cyanide-degrading bacterium, *Pseudomonas stutzeri* AK61, by cyanidase. Pag. 1677-11682.
- ATSDR, 2006. Agency for toxic substances and disease registry. Cyanide. División de toxicología y medicina ambiental.
http://atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts8.pdf

- Akcil A., Karahan A., Ciftci H., Sagdic O., 2003, Biological treatment of cyanide by natural isolated bacteria (*Pseudomonas* sp.), Minerals Engineering, Vol. 16, pp 643-649.
- Bellini M., Chen J., 1998. Accumulation of αketo acids as essential components in cyanide assimilation by *Pseudomonas*: Applied and environmental microbiology.
- Berastian A., 2011. Destrucción del cianuro en efluentes mineros. Consorcio Nuevo Horizonte S.A. UNI. <http://www.scribd.com/doc/231223/destruccion-de-cianuro-en-efluentes-mineros>.
- Barber T., Christopher T., Doorn M., Phyllis F., Hubert T. and Crouch R., 2003. Aquatic ecological risks due to cyanide releases from biomass burning. Chemosphere, Vol. 50, p. 343-348
- Bergey's manual of systematic bacteriology 2004, second edition George M. Garrity editor-in-chief,, volume two the proteobacteria part b the gammaproteobacteria pag. 323-374
- Burbano D., Burbano E., Fajardo J., 2006 .Estudios de métodos químicos de remoción de cianuro presente en residuos de cianuración proveniente del proceso de extracción del oro veta en el departamento de Nariño. Universidad de Antioquia.

- Cámara Argentina de Empresarios Mineros CAEM, 2004. El cianuro, Buenos Aires, pag. 2.
- DINAMA, 2009. Ministerio Nacional del Medio Ambiente. Cianuro.
http://www.mvotma.gub.uy/dinama/index.php?option=com_glossary&func=view&Itemid=120&catid=53&term=Cianuro+.
- Dumestre, A., Chone T., Portal J., Gerard M., and Berthelin J., 1997. Cyanide degradation under alkaline conditions by a strain of *Fusarium solani* isolated from contaminated soils. Applied and Environmental Microbiology. 2729–2734.
- Eisler R., 1991. Cyanide hazards to fish, wildlife and invertebrates: a synoptic review. U.S. Fish and Wildlife Service, Biological Reports v. 85.
- Fernández P., 2007. Desarrollo de un Nuevo Método para la Eliminación de Cianuro de Aguas Residuales de Mina (Tesis Doctoral)
- García V., 2004. “Para despejar dudas Uso de cianuro en la minería del oro”, Diario El Zonda Argentina. victorgarcia@diariozonda.com.ar
- Giraldo L. 1998. Ensayo de toxicidad crónica de clorpirifos sobre *Daphnia pulex*. Trabajo de tesis. Universidad de Antioquia, Medellín, 1998
- Gómez E. 2002. Médico Especialista en Toxicología Clínica, Docente de la Universidad de Antioquia.

<http://www.encolombia.com/medicina/Urgenciastoxicologicas/Cianuro.htm>

- González, S.; 2004. "El cianuro es toxico y Letal ". Por la séptima Digital Tuesday July 27, 2004 at 01:09 AM. Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco.
<http://argentina.indymedia.org/new/2004/07/212476.php>
- González, L., Pulido J., 2005. Análisis de alternativas para la degradación del cianuro en la planta de beneficio de las empresas Mineras Nacionales. Universidad Nacional de Colombia.
- GRUFIDES 2007 (Grupo de Formación e Intervención para el Desarrollo Sostenible Servicio). Minería en Algamarca: Sacando provecho del dolor de un Pueblo.
http://grufidesinfo.blogspot.com/2007/03/el-objetivo-de-este-blog-esdifundir_6673.html
- Guerrero J., 2005. Cianuro: Toxicidad y Destrucción Biológica. Biólogo. Vol. 10, No.35 (jun. 2005); p.23-25.
- Gurbuz, F., Ciftci, H., and Akcil, A., 2009. Biodegradation of cyanide containing effluents by *Scenedesmusobliquus*. J. Hazard. Mater. 162, 74–79.

- Hernández L., 2010. Evaluación de la capacidad de un aislado bacteriano nativo de *Pseudomonas* sp. como potencial degradador de compuestos cianurados. Tesis de Magister en biotecnología, pag. 27.
- Hruschka F.; 1998." Manejo Ambiental en la Pequeña Minería". Agencia Suiza para el desarrollo y la Cooperación. Bolivia.
- Huertas M., Luque V. García M., 2009. Análisis proteómico de la degradación de cianuro. III Jornadas de Divulgación de la Investigación en Biología Molecular, Celular y Biotecnología. Universidad de Córdoba.
- Kao C., Liu J., Lou H., Lin C., Chen S., 2003. Biotransformation of cyanide to methane and ammonia by *Klebsiella oxytoca*. Chemosphere. 50: 1055-1061.
- Knowles C. 1976. Microorganisms and Cyanide, Bacteriological Reviews. vol40, pg 652-680
- Kunz D., 1992. Utilization of cyanide as nitrogenous substrate by *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764: evidence for multiple pathways of metabolic conversion. En: Applied And Environmental Microbiology; Vol 58, N° 6 1992, p. 2022-2029.
- Kunz D., 2005. Alternative routes of enzymic cyanide metabolism in *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764. En: Mycrobiology, Vol 140, Pag. 1705-1712.

- Logsdon M. J.; Hagelstein K.; Y Mudder T. I.; 2001. El Manejo del Cianuro en la Extracción de Oro. Traducido de la publicación en inglés titulada *The management of Cyanide in Gold Extraction*. Consejo internacional de metales y medio ambiente – ICME.
- Luque V. 2005, Metabolismo del cianuro y del cianato en *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. Aplicaciones biotecnológicas, analistas económicos de Andalucía.
- Luque V., 2008. Characterization of the cyanase from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344, an enzyme that is not essential for cyanide assimilation. En: Applied Environmental Microbiology, published online ahead of print on August 2008.
- Mac Faddin, 2003. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica, tercera edición.
- Marín L., Ochoa J., Prado K., 2010. Análisis comparativo in vitro de la actividad biodegradadora de bacterias del Género *Pseudomonas* sp. y microorganismos nativos, para su uso en un proceso de biorremediación in situ de sales de cianuro.
- Mathews C., Van Holde K., Ahern K., 2002, Bioquímica. Tercera edición. Madrid: Editorial Pearson Educación, S.A., pg. 1386.
- Menne D., 1997: Managing cyanides in waste discharge. En : <http://user.wantree.com.au/~menne/cnmanage.htm>

- Meyers R., Rawlings, Woods R. y Lindsay G., 1993. Isolation and characterization of a cyanide dihydratase form *Bacillus pumilus* C1, Journal of Bacteriology, N° 175, pag. 6105-6112.
- Miranda O., 2004. Los comuneros de Pulán: "Nuestras vidas son los ríos. Diario la Republica, Sábado 04 de diciembre de 2004.
<http://www.larepublica.pe/04-12-2004/los-comuneros-de-pulan-nuestras-vidas-son-los-rios>
- Montoya C., 2001. Estudio de la contaminación por cianuro (NaCN) en las plantas de tratamiento de minerales auríferos en el municipio de Segovia y biorremediación de arenas contaminantes. Pag. 102. Tesis (Magister en Ingeniería ambiental). Universidad de Antioquia.
- Mudder T., Botz M., Smith A., 1998. Chemistry and Treatment of Cyanidation Wastewastes: Desing, Startup, and Operation of a Full Scale Facility. In: the Cyanide Monograph, Mining Journal Books limited. London. p 329-353.
- Nahrstedt A., 1988. Cyanogenesis and the role of cyanogenic compunds in insects. Ciba Foundation Symposium 140: Cyanide compunds in biology
- Nawas S.,m Davis J., Wolfram J. y Chapatwal K., 1991: Degradation of cyanides by *Pseudomonas aeruginosa*. Applied Biochemistry and Biotechnology, pag. 865-875

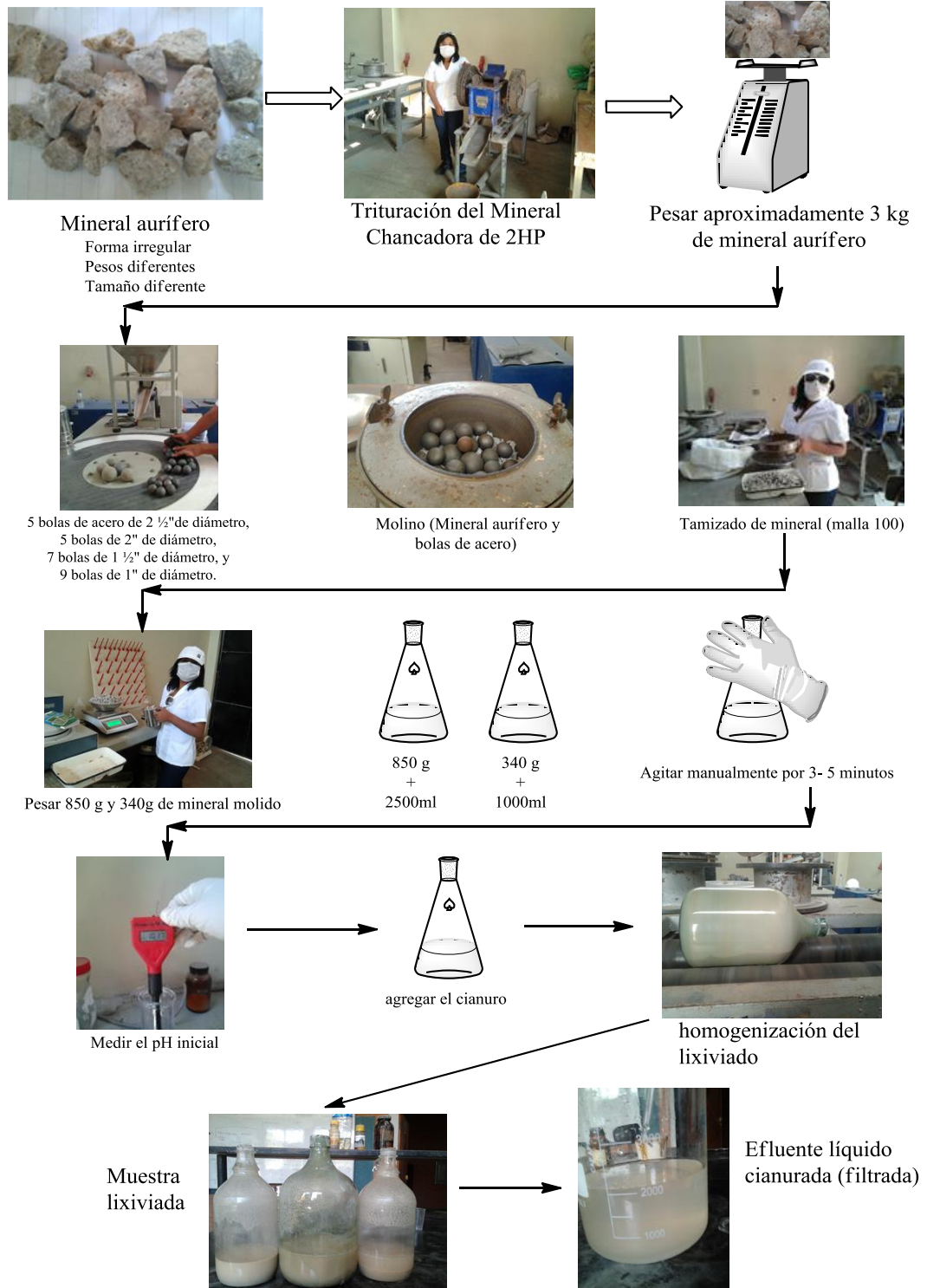
- NIMA, B. 2006. En Cerro El Toro autoridades analizan contaminación minera. Buscan solución a grave problema de Sánchez Carrión (Huamachuco). Diario La Industria. Edíc. 26 Febrero 2006. Trujillo. Perú.
- Oudjehani K., Zagury G., Deschenes L., 2002. Natural attenuation potential of cyanide via microbial activity in mine tailings. *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol 58, pp 409-415.
- Raybuck S. 1992. Microbes and microbial enzymes for cyanide degradation. *Biodegradation*. 3:3–18.
- Rendueles de la Vega M., 2001. Reducción del impacto ambiental en el desarrollo de nuevos proyectos de minería de oro.
- Restrepo, Oscar J., Montoya C., Muñoz N., 2006. Degradación microbiana de cianuro procedente de plantas de beneficio de oro mediante una cepa nativa de *P. fluorescens* Dyna, julio, año/vol. 73, número 149 Universidad Nacional de Colombia Medellín, Colombia pp. 46-51 <http://redalyc.uaemex.mx/pdf/496/49614905.pdf> citado 1 agosto 2010
- Smith, A.; Mudder, T. 1996, Tratamiento de Residuos de Cianuración Pag. 6-239
- Steel y Torrie, 1986. Bioestadística, Segunda edición

- Young C. y Jordan T., 2000. Cyanide remediation, current and past technologies. Proceeding of the 10th annual conference on hazardous waste Reseach, pag. 104-129.
- Young C., Cashin S., Jordan T., 1995: Remediation technologies for the separation and destruction of aqueous cyanide species.

VII. ANEXOS

- Anexo 01: Protocolo de lixiviación a nivel de laboratorio
- Anexo 02: Protocolo de aislamiento *Pseudomonas* sp
- Anexo 03: Protocolo de identificación *Pseudomonas* sp
- Anexo 04: Características generales de especies de *Pseudomonas* – Bergey's manual of systematic bacteriology 2004
- Anexo 05: Activación de *Pseudomonas* sp.
- Anexo 06: Esquema de biodegradación de cianuro por *Pseudomonas* sp
- Anexo 07: Determinación de cianuro libre – titulación con nitrato de plata.
- Anexo 08: Panel fotográfico.

ANEXO 01





Efluente líquido cianurado
agregar carbon activado



Extracción de oro
Homogenizar a 305 rpm
por 24 h



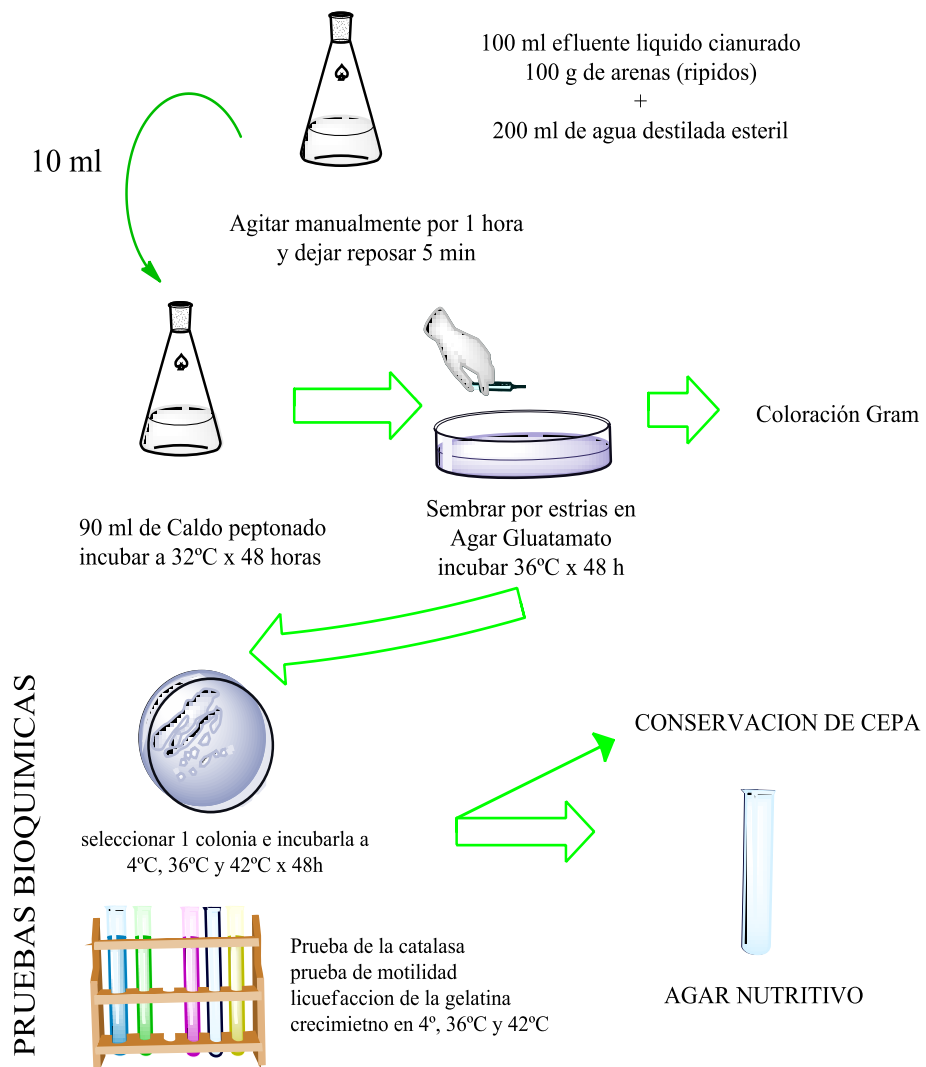
Filtrar el efluente líquido cianurado
para separar la solución líquida del
carbón activado



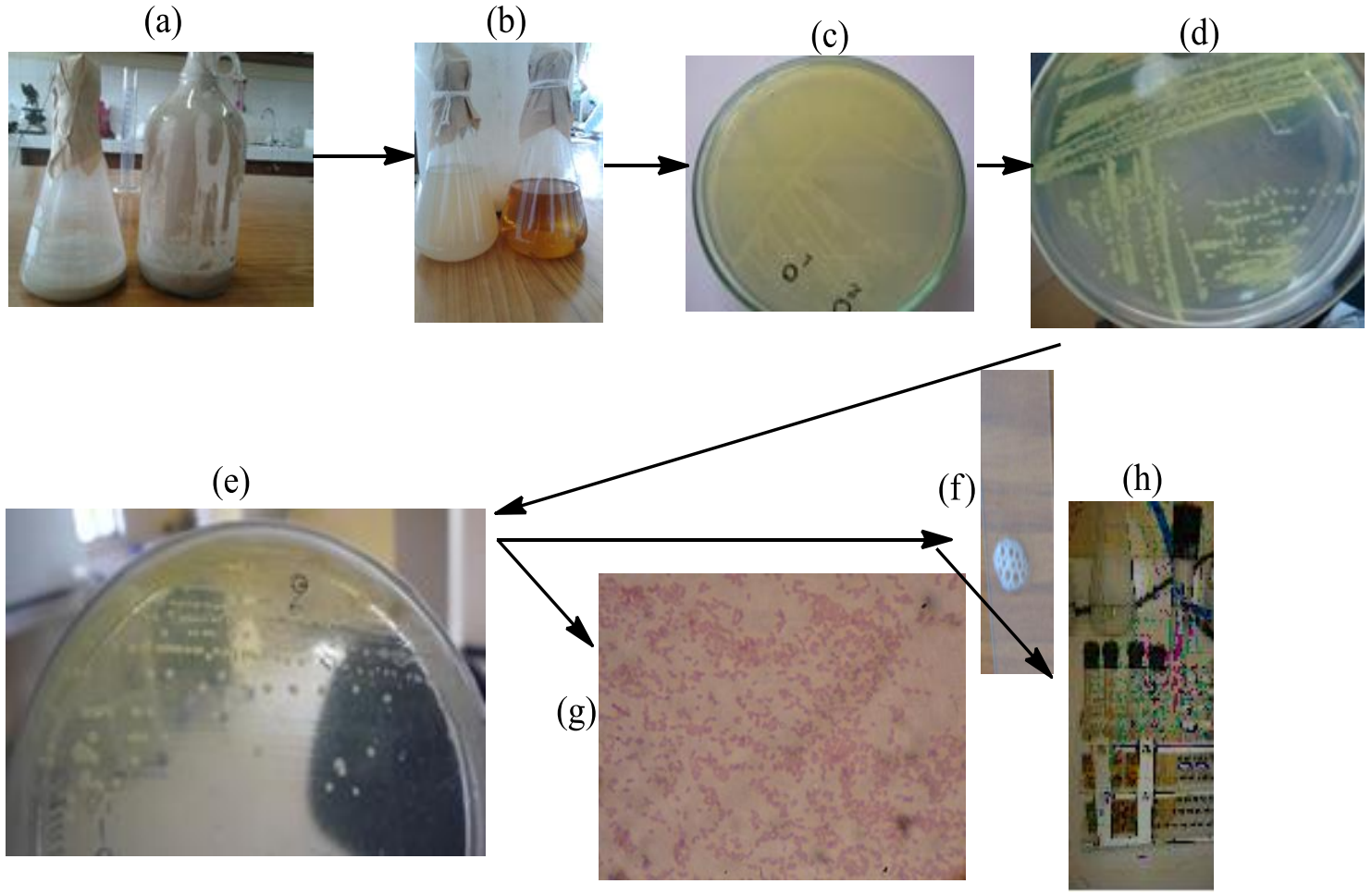
solución barren o solución pobre
(efluente líquido cianurado)

ANEXO 02

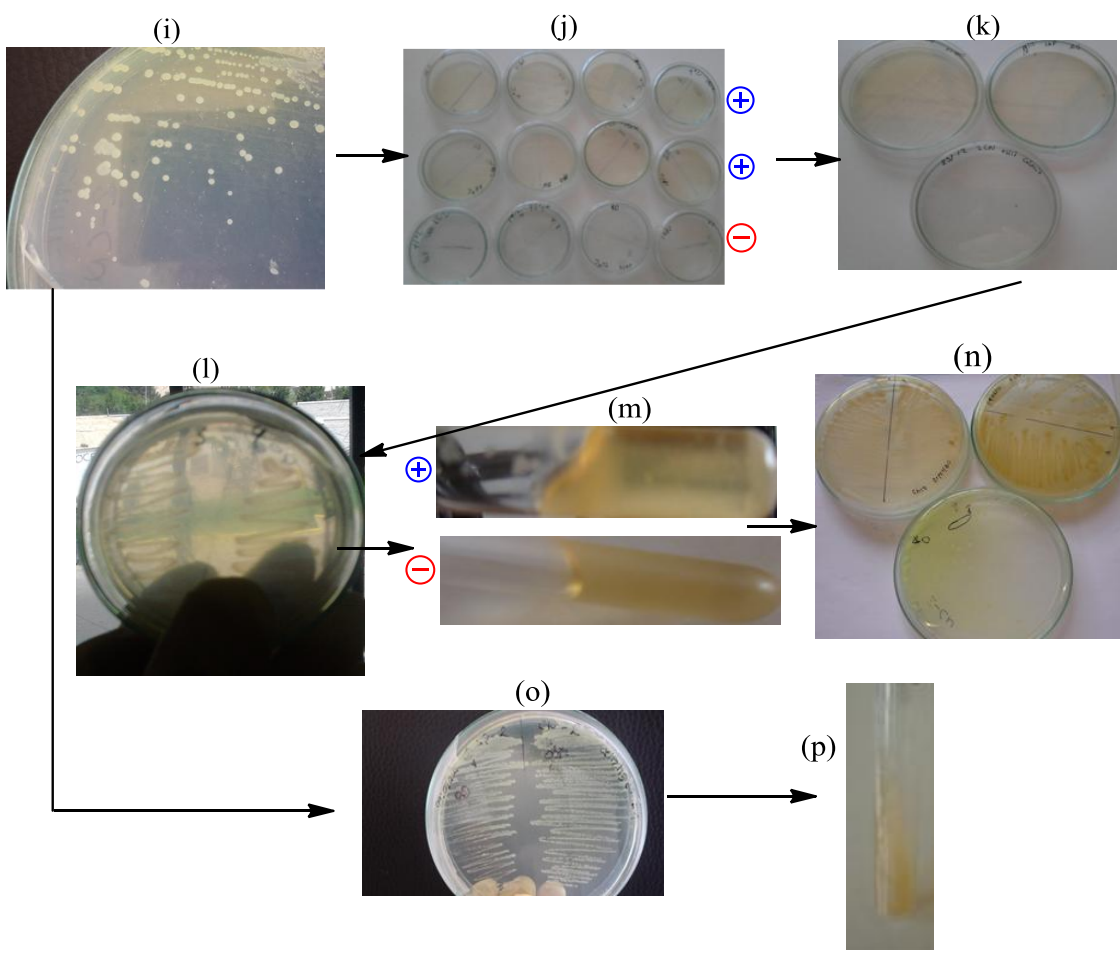
Muestra: solución barren o rípidos.



ANEXO 02



ANEXO 03



ANEXO 04

Características generales de especies de *Pseudomonas*

Características	<i>P.</i> <i>aeruginosa</i>	<i>p.</i> <i>chlororaphis</i>	<i>P.</i> <i>fluorescens</i>	<i>P.</i> <i>putida</i>	<i>P.</i> <i>alcaligenes</i>	<i>P.</i> <i>pseudoalcaligenes</i>
Número de flagelos	1	>1	>1	>1	1	1
Pigmento fluorescente, color	no					
Licuación de gelatina	+	+	+	-	d	D
Desnitrificación	+	+	+	-	+	D
Lecitinasa	-	+	+	-	-	-
Lipasa	+	+	D	-	d	-
El crecimiento en 4°C	-	+	+	+	+	+
El crecimiento en 41°C	+	+	-	-	+	+

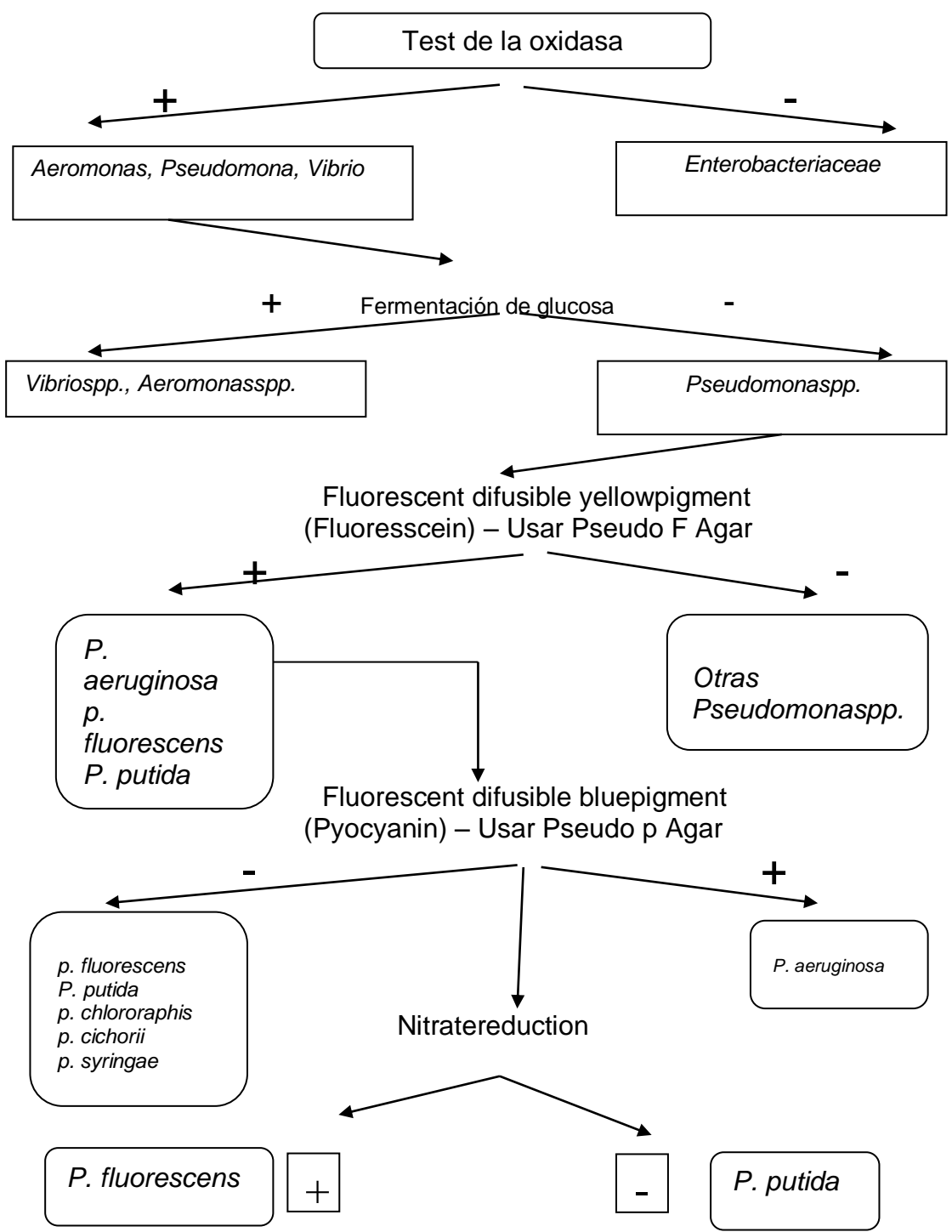
+ Positivo

- Negativo

d Resultado no confirmado

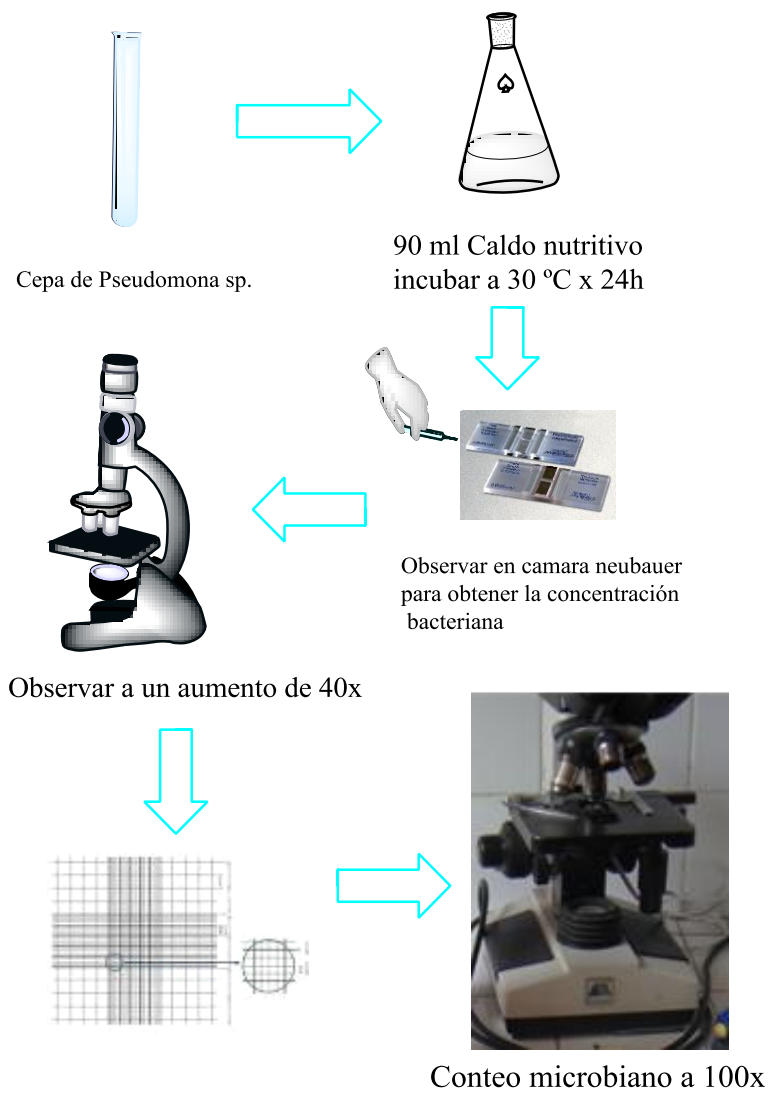
Fuente: Bergey's Manual of systematic bacteriology 2004

IDENTIFICACION DE *Pseudomonas* sp.

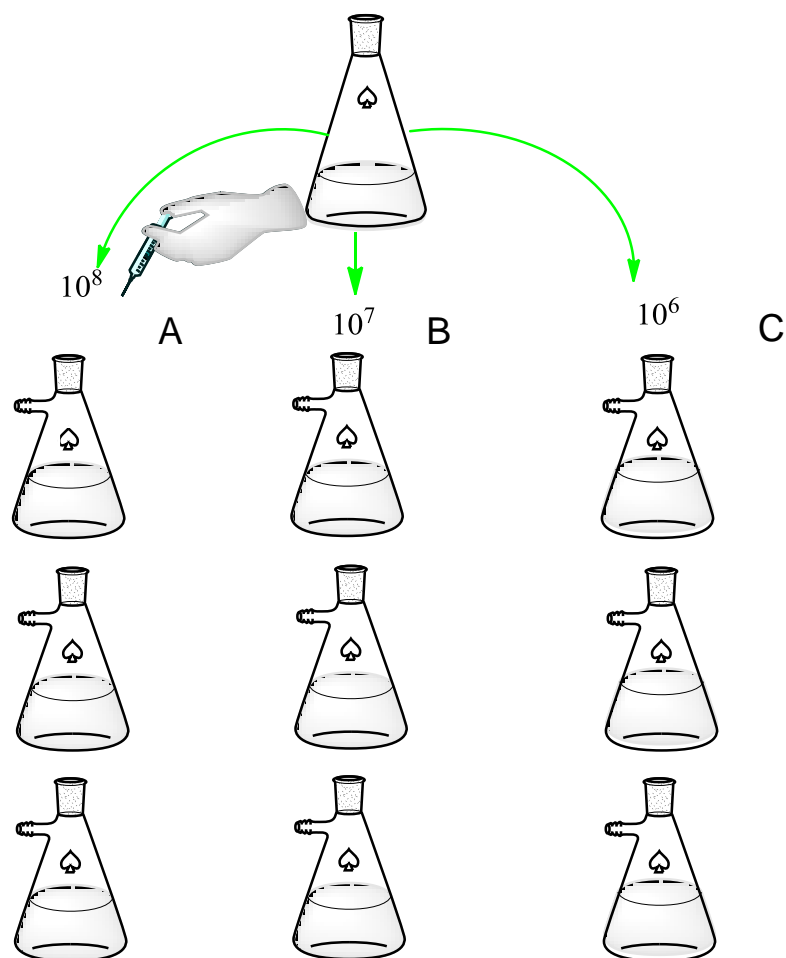


ANEXO 05

ACTIVACIÓN DE CEPAS

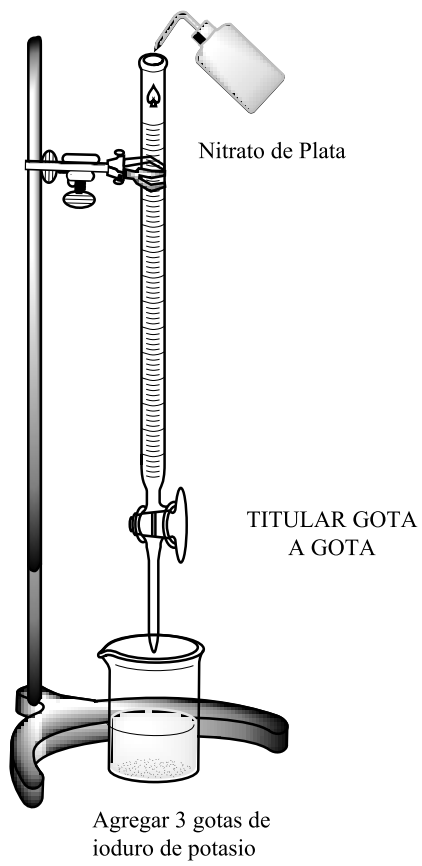


ANEXO 06



Incubar a temperatura ambiente por 168 h, a temperatura ambiente se procederá a determinar la concentración de cianuro libre

ANEXO 07



**ANEXO 08:
PANEL FOTOGRAFICO**

LABORATORIO DE HIDROMETALURGIA – Facultad de Ingeniería



Foto 02: Mineral aurífero



Foto 03: Chancadora de 2 hp para la trituración de mineral



Foto 04: Molienda de mineral aurífero



Foto 05: Tamizado de mineral aurífero (malla 100)



Foto 06: Pesado de mineral para el proceso de lixiviación



Foto 07: Estabilizando el pH del efluente líquido cianurado

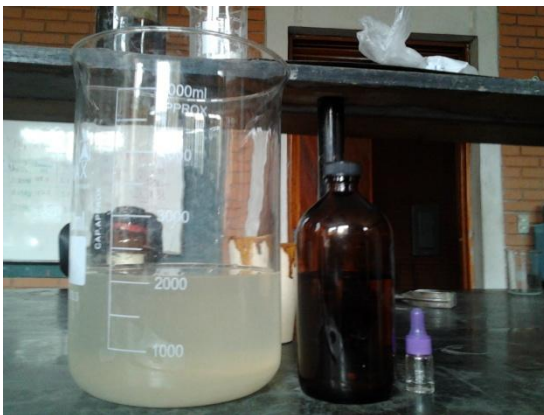


Foto 08: Efluente líquido cianurado con CN



Foto 09: Homogenización del efluente líquido cianurado por 24 horas



Foto 10: Muestras cianuradas



Foto 11: Solución cianurada con carbón activado a 305 rpm por 24 h

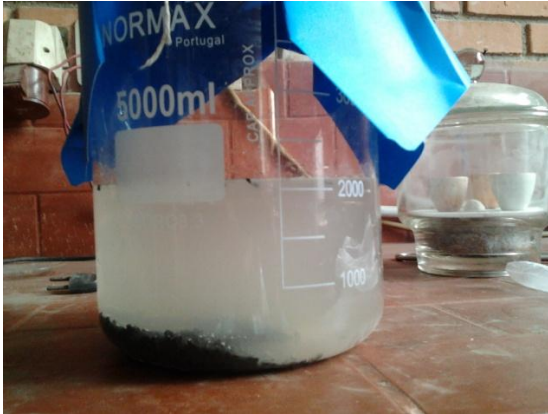


Foto 12: Solución cianurada antes del filtrado.



Foto 13: Efluente líquido cianurado (solución barren)



Foto 14: conservación de la solución barren filtrada para el proceso de biorremediación



Foto 15: Determinación de cianuro libre en la solución barren – Método Titulométrico

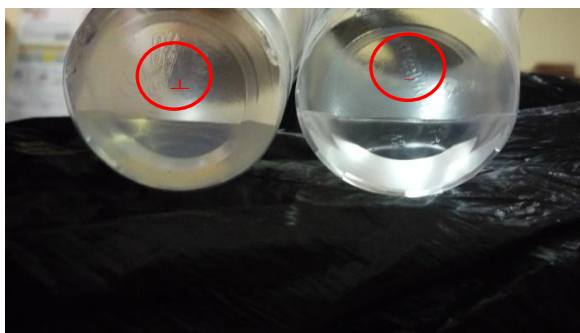


Foto 16: Titular la muestra hasta que observe el viraje característico

Aislamiento e identificación de *Pseudomonas* sp.



Foto 17: Vista general de los materiales a utilizar



Foto: Rípidos en de agua destilada estéril

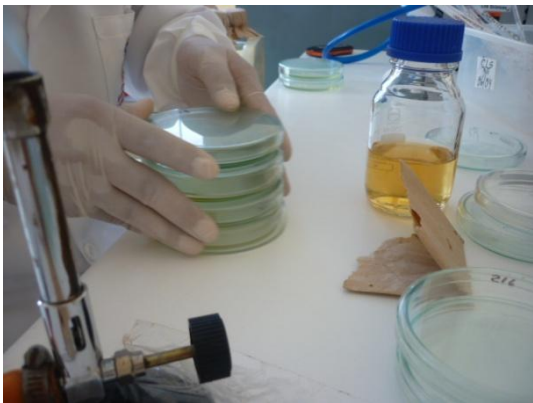


Foto 19: Siembra por agotamiento en agar glutamato

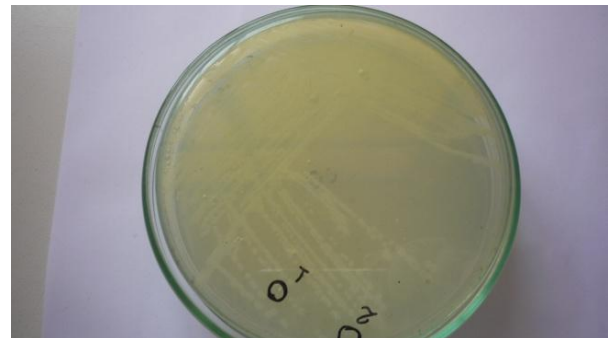


Foto 20: Crecimiento en agar glutamato (se observa una coloración verde amarillenta)

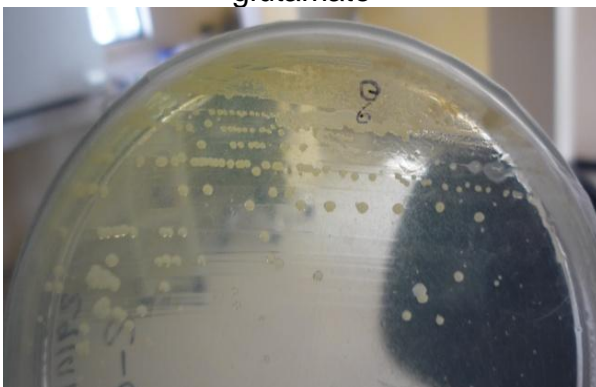


Foto 21: Selección de una colonia característica



Foto 22: Crecimiento de la colonia seleccionada en agar glutamato

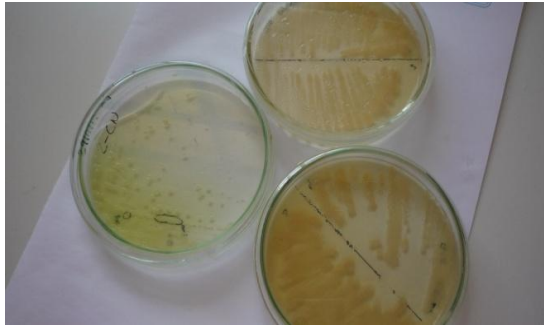


Foto 23: Crecimiento de *Pseudomonas* sp. En agar glutamato y agar *Pseudomonas* p coloración rojo por el pH ácido.



Foto 24: Prueba de mitilidad de *Pseudomonas* sp.

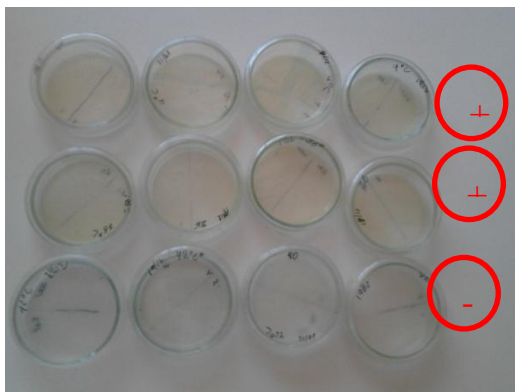


Foto 25: Crecimiento de *Pseudomonas* sp. a 4 (+), 36 (+) y 41 (-)°c



Foto 26: Crecimiento en agar nutritivo



Foto 27: Conservación de *Pseudomonas* sp.



Foto 28: Activación de *Pseudomonas* sp. En caldo nutritivo

BIORREMEDIACIÓN DE EFLUENTES LIQUIDOS CIANURADOS.



Foto 29: Instalación de biorreactores aireados



Foto 30: Solución barren e inóculos de *Pseudomonas* sp.



Foto 31: Toma de muestra en asepsia



Foto 32: 5 ml de solución barren para la titulación con nitrato de plata, en un vaso precipitado



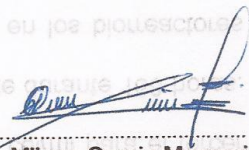
Foto 33: Medición de pH en cada tratamiento (pH=10)



Foto 34: Determinación de concentración de cianuro libre



.....
Blgo. Daladier Castillo Cotrina
Asesor



.....
Bach. Milena Carpio Mamani
Tesista