

DEGRADACIÓN MICROBIANA DE CIANURO PROCEDENTE DE PLANTAS DE BENEFICIO DE ORO MEDIANTE UNA CEPA NATIVA DE *P. fluorescens*

MICROBIAL DEGRADATION OF CYANIDE FROM GOLD METALLURGICAL PLANTS UTILIZING *P. fluorescens*

OSCAR JAIME RESTREPO

Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín. Instituto de Minerales Cimex. ojrestre@unal.edu.co

CARLOS ARTURO MONTOYA

Universidad de Antioquia. Maestría en Ingeniería Ambiental

NURY ALEXANDRA MUÑOZ

Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín. Instituto de Minerales Cimex

Recibido para revisar 20 de Septiembre, aceptado 30 de Enero de 2006, versión final 15 de Febrero de 2006

RESUMEN: El cianuro es el compuesto lixivante más utilizado en la industria metalúrgica de metales preciosos. El cianuro presenta efectos nocivos, entre los que se destacan su alta toxicidad y su efecto inhibitorio en la respiración celular. En este trabajo se probó la alternativa biotecnológica de degradar cianuro empleando una cepa nativa de *P. fluorescens*, aislada a partir de muestras de arenas procedentes de plantas de beneficio de oro que utilizan la cianuración ubicadas en municipio de Segovia, Colombia.

En la mayor parte de las plantas de tratamiento no se controlan técnicamente los procesos, lo cual lleva a la utilización de cantidades de NaCN por encima de las necesarias, generando altas descargas del exceso tanto en solución como en las arenas descartadas. Las pruebas de toxicidad realizadas con *D. pulex* indican que una concentración de cianuro mayor o igual a 54 ppm es suficiente para intoxicar e inhibir su sobrevivencia. Los tratamientos convencionales para degradación de cianuro, suelen ser muy comunes y eficientes, sin embargo presentan desventajas por el alto costo que conlleva la compra de los reactivos necesarios. El tratamiento microbiano por su parte, demuestra eliminar grandes cantidades de cianuro de una manera eficiente y económica.

PALABRAS CLAVE: Biotecnología, Cianuración, *P. fluorescens*, Biodegradación.

ABSTRACT: Sodium cyanide is traditionally used in chemical metallurgy to obtain precious metals (gold and silver). Cyanide produces damages because of its toxicity and breath cell inhibition. Here we try a biotechnological process to degrade cyanide with *P. fluorescens* obtained by cyanide heap leaching process in gold metallurgy in Segovia, Colombia.

In Colombia cyanide heap leaching process in gold metallurgy is not controlled and cyanide is used excessively. It means that great quantities of sodium cyanide are lost in sands and in waste water. Toxicity tests made by *D. pulex* show less than 54 ppm of cyanide is enough to kill them. Traditional treatments to cyanide degradation are useful and normal but they are expensive. Microbiological process eliminates cyanide successfully and cheap.

KEY WORDS: Biotechnology, Cyanidation, *P. fluorescens*, Biodegradation.

1. INTRODUCCIÓN

El cianuro (CN) 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

(ADAMSON, 1972, AKCIL A. et al., 2003). Por tanto estas industrias además de ser grandes consumidoras 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 especie más tóxica es la forma HCN, CN^- mientras que los complejos con metales ($\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$, $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$) son relativamente menos tóxicos (OUDJEHANI, K. et al., 2002, KUNZ D.A, et al., 1998).

La degradación natural del cianuro o por procesos químicos se emplea actualmente para detoxificar desechos y/o efluentes contaminados, siendo la primera forma la de mayor interés para la industria por los altos costos que genera 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, K. et al., 2002, AKCIL A., 2003).

Muchos autores (KUNZ D.A, et al., 1998, AKCIL A., 2003, WANG C.S., et al., 1996) han documentado la habilidad de ciertos microorganismos para resistir y crecer en cianuro tomándolo como fuente de nitrógeno.

De lo anterior se deduce que el tratamiento biológico de fuentes contaminadas con CN, provee una alternativa económica y efectiva sin generar o añadir químicos en el ambiente (AKCIL A., 2003). Una de las especies microbianas que más se ha estudiado por su capacidad de degradar compuestos cianurados es *Pseudomonas fluorescens* (OUDJEHANI, K. et al., 2002, AKCIL A., 2003).

En este trabajo se probó la alternativa biotecnológica de degradar cianuro empleando una cepa nativa de *P. fluorescens*, aislada a partir de muestras de arenas o colas procedentes de varias pequeñas plantas de

beneficio de oro que utilizan la cianuración como proceso de beneficio del material aurífero en el Nordeste Antioqueño (Municipio de Segovia, Antioquia, Colombia, donde se han explotado los yacimientos de oro durante más de 200 años). De los casi 80 pequeñas plantas artesanales que se encuentran funcionando actualmente en el municipio, la totalidad descargan las arenas cianuradas, con concentraciones de cianuro ambientalmente inaceptables (directamente al suelo o a pequeñas corrientes de agua).

El impacto de las descargas varía entre los entables dependiendo de la técnica usada en la cianuración (percolación o agitación), del tamaño de la planta (capacidad para tratamiento de arenas), de las cantidades de cianuro utilizadas (25 a 300 Kg de NaCN/mes) y del control que se haga del proceso (cantidad de NaCN que reacciona y cantidad residual). En la mayor parte de las plantas de tratamiento no se controlan técnicamente los procesos, lo cual lleva a la utilización de cantidades de NaCN por encima de las necesarias, generando altas descargas del exceso tanto en solución como en las arenas descartadas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Microorganismos

Se escogieron 6 plantas de beneficio de oro del municipio de Segovia, Antioquia, Colombia y se seleccionaron sus arenas residuales las cuales contenían cantidades importantes de cianuro (Tabla 1). Las muestras fueron tomadas en diferentes días de descarga (0, 1, 3, 7 y 14 días). El aislamiento de *Pseudomonas fluorescens* se llevó a cabo en beakers de 1 litro conteniendo 100 g de arenas y 200 ml de agua estéril. Después de haber agitado durante una hora se dejó reposar cada beaker por 5 minutos y se inoculó una muestra de 10 ml de la solución clarificada en 90ml de caldo peptonado y se durate 60 horas a 32°C, tiempo en el cual se reinocularon en medio sólido

nutritivo y en medio Cetrimide a diferentes concentraciones.

Tabla 1. Contenido de cianuro libre y total en las plantas de beneficio de oro*

Table 1. Contenido de cianuro libre y total en las plantas de beneficio de oro*

*Medición colorimétrica

Planta	Concentración de cianuro libre (ppm)					Concentración de cianuro total (ppm)				
	Día de descarga					Día de descarga				
	0	1	3	7	14	0	1	3	7	14
Wilson Montoya	504	450	430	422	412	2264	2218	2163	2137	2023
Los Toritos	355	348	336	328	322	1823	1802	1786	1762	1750
Las Vegas	396	328	313	305	290	2045	2016	1988	1975	1961
El Paraíso	205	198	175	130	112	632	613	608	589	560
El Cóndor	153	148	127	115	94	317	293	281	270	254
Mariadama	16	14	12	8	6	127	113	105	90	87

2.2. Determinación de cianuro

Para la determinación de cianuro se emplearon varias técnicas de medición como son colorimetría, análisis volumétrico y electrodo de cianuro selectivo.

2.3. Ensayos de biodegradación de cianuro

Después de haber obtenido varias cepas nativas de cada planta de beneficio se seleccionó una de ellas por su mayor velocidad de crecimiento y se tomaron inóculos microbianos de 48 horas de crecimiento y se diluyeron hasta 10^{-4} en caldo peptonado. De esta última dilución se tomó 1ml y se inoculó en 100 de solución de NaCN con concentraciones de 100 hasta 1000 ppm de cianuro. A los cultivos bacterianos se les proporcionó las condiciones de temperatura, oxigenación y humedad semejantes a las climáticas del municipio de Segovia. Todos los experimentos se desarrollaron durante 236 horas.

2.4. Pruebas de toxicidad por cianuro

Para determinar el grado de toxicidad causada por el cianuro de las descargas de los entables se empleó una población de *Daphnia pulex*, más conocida como pulga de agua, por ser un género ampliamente utilizado en estudios toxicológicos (7,8). Los individuos de esta población, neonatos menores de 24 horas de

edad, provenían de una misma cepa capturada en el embalse La Fe (Medellín, Colombia). Se prepararon 5 niveles de exposición y 4 réplicas por dilución del agua de lixiviación con el fin de establecer la concentración letal media (LC_{50}) del lixiviado de las arenas residuales del proceso de cianuración con un número de individuos de 10 para cada dilución. El número de muertes se leyó a las 24 y 48 horas y mediante el software "Probis 2" se obtuvieron los resultados de LC_{50}^{24} y LC_{50}^{48} , los cuales fueron de 0.054-540 ppm para el entable "Las Vegas" y 0.065-650 para el entable "El Paraíso". (9)

3. RESULTADOS

3.1. Pruebas de toxicidad por cianuro

Los entables "Las Vegas" y "El Paraíso" (cianuración por precolación y por agitación respectivamente), fueron seleccionados para probar la toxicidad de sus descargas cianuradas sobre las especies de *Daphnia pulex*. Las muestras de arenas analizadas corresponden a los días 0, 7, 14 y 70 después de descargadas las arenas, para cada día se hicieron diluciones 1:1; 1:10; 1: 1000; 1:10000.

En la tabla 2 se puede observar que las muestras cianuradas recién descargadas del entable Las Vegas, hasta la mínima concentración de CN, pueden liquidar casi la totalidad de la población de pulgas durante

las primeras 24 horas, mientras que el porcentaje de muertes disminuye considerablemente durante el mismo tiempo de exposición al tóxico cuando se disminuye la concentración de CN y/o se aumentan los días de descarga de las arenas. Por su parte, el 47% de las especies de *Daphnia pulex* sobreviven a una dilución 1:100 de CN en las muestras cianuradas del entable El Paraíso el primer día de exposición.

La alta toxicidad del NaCN presente en la muestra del primer entable, eliminó casi el

100% de la población aun en la dilución 1.10000, por lo que el ensayo en esta muestra sólo duró 24 horas.

Para el segundo día de la prueba, evidentemente aumentó el número de muertes de pulgas en todas las muestras de arenas, sin embargo se nota que las especies de *D.pulex*, en las muestras cianuradas del entable Las Vegas, resistieron mas tiempo la concentración de cianuro y por tanto sobrevivieron mas individuos.

Tabla 2. Porcentaje de toxicidad en *Daphnia pulex* a diferentes concentraciones de cianuro

Table 2. Porcentaje de toxicidad en *Daphnia pulex* a diferentes concentraciones de cianuro

NaCN (mg/l)	Entable "Las Vegas"							Entable "El Paraíso"								
	% Muerte en 24 horas				% Muerte en 48 horas			NaCN (mg/l)	% Muerte en 24 horas				% Muerte en 48 horas			
	Día de descarga									Día de descarga						
	0	7	14	70	7	14	70		0	7	14	70	0	7	14	70
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	30
0.054	98	15	10	0	33	25	18	0.065	8	2.5	3	0	25	25	8	8
0.54	100	15	15	5	55	25	23	0.65	10	5	3	0	70	35	18	18
5.4	100	23	15	15	55	40	30	6.5	53	28	20	20	99	98	93	68
54	100	88	33	25	100	70	62	65	100	87	70	63	100	100	100	100
540	100	100	100	100	100	100	100	650	100	100	100	100	100	100	100	100

3.2. Biodegradación de cianuro

Según los datos obtenidos en los experimentos de biodegradación de cianuro, se observó que en las primeras 24 horas, el reactor con la mínima cantidad de contaminante se redujo en un 60%, mientras que doblando la concentración en el segundo reactor, sólo se obtuvo un 14% de degradación. Los reactores con 400 y 500 ppm de cianuro si se biodregadaron en un 50% aproximadamente. Las demás concentraciones se mantuvieron altas durante

el mismo tiempo. Para el segundo día del proceso, todos los reactores se mantuvieron en la misma concentración del día anterior. A partir del día 3 de los experimentos, se comenzó a notar una caída muy significativa en la concentración de cianuro en los reactores con concentraciones inferiores a 800 ppm de NaCN.

Las concentraciones de 800 y 900 ppm de cianuro fueron degradadas en un muy bajo porcentaje, mientras que a una concentración de 1000 ppm, no hubo respuesta de la especie bacteriana (figuras 1 y 2)

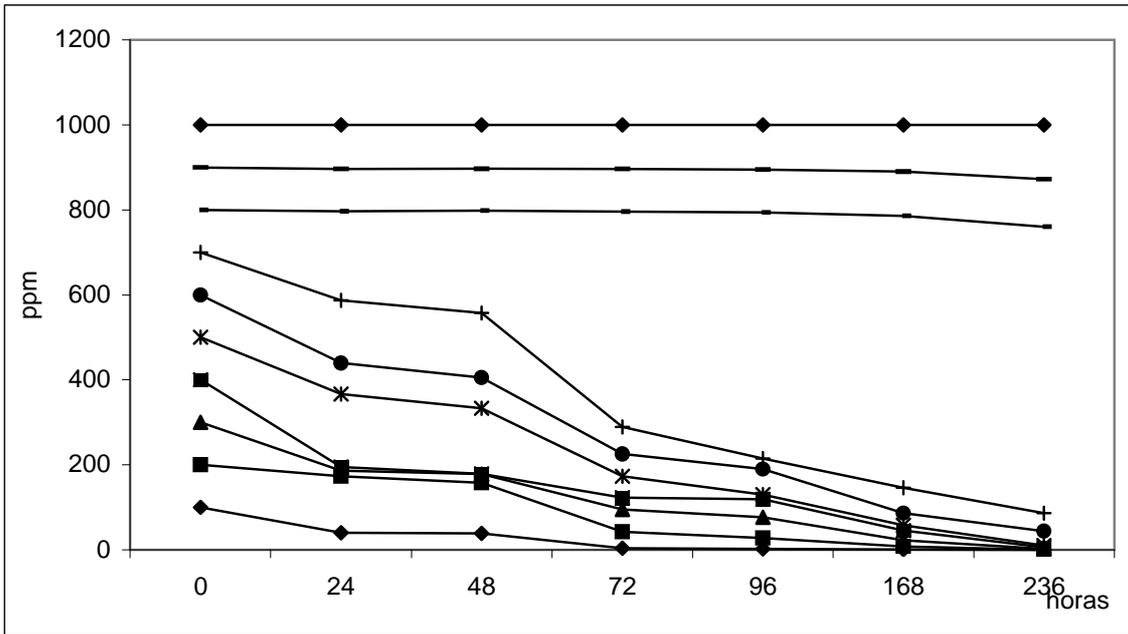


Figura 1. Biodegradación de cianuro con las cepas nativas de *P.fluorecens* a diferentes concentraciones de NaCN

Figure 1. Biodegradación de cianuro con las cepas nativas de *P.fluorecens* a diferentes concentraciones de NaCN

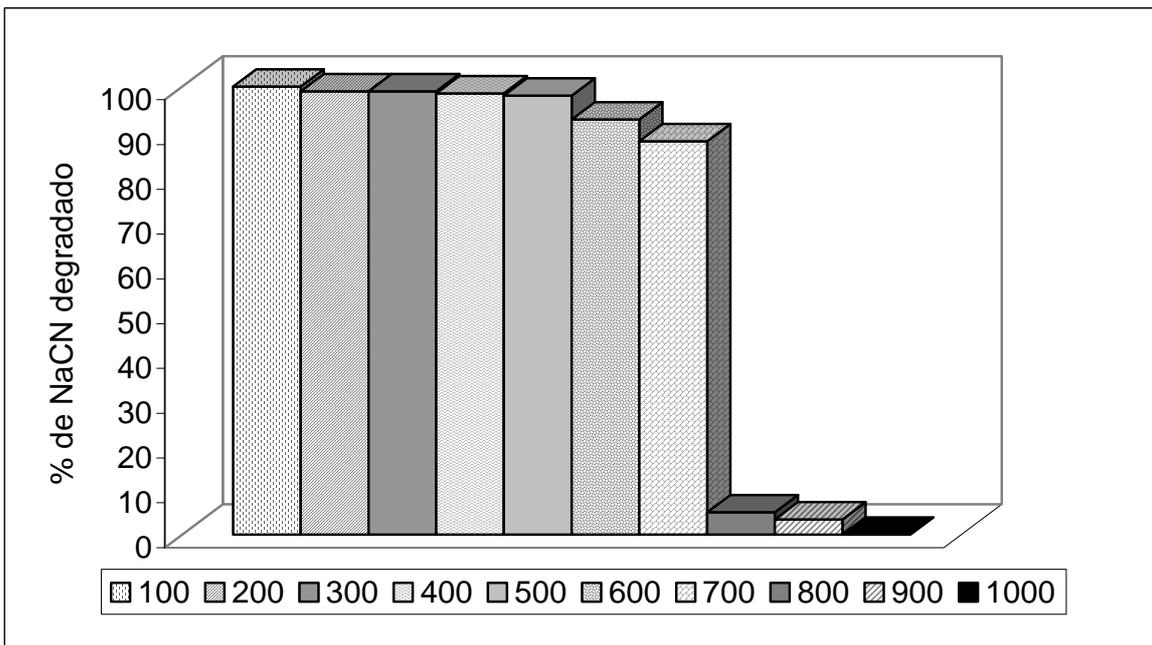


Figura 2. Porcentaje de eficiencia en la biodegradación de cianuro con las cepas nativas de *P.fluorecens* a diferentes concentraciones de NaCN

Figure 2. Porcentaje de eficiencia en la biodegradación de cianuro con las cepas nativas de *P.fluorecens* a diferentes concentraciones de NaCN

4. DISCUSIÓN

Las pruebas de toxicidad realizadas con *D. pulex* indican que una concentración de cianuro mayor o igual a 54 ppm es suficiente para intoxicar e inhibir la sobrevivencia de esta especie animal. Sin embargo, los procesos de atenuación natural del CN contenido en las arenas como adsorción, hidrólisis, saponificación, volatilización, descomposición por radiación solar y dilución por agua lluvia hacen que 14 días después de estar las arenas en el suelo, la LC_{50}^{24} sea solamente 15 veces mayor en las arenas de “Las Vegas” y la LC_{50}^{48} sólo 2 veces mayor. Por el contrario, 70 días después de descargadas las arenas se encuentra que la LC_{50}^{24} disminuyó hasta ser sólo 6 veces mayor en las muestras de la planta de Las Vegas y la LC_{50}^{48} aumentó 5 veces más.

Comparando los resultados del ensayo con los valores máximos permitidos por las normas nacionales e internacionales para residuos sólidos de 0,01 ppm y 1 ppm respectivamente y para conservación de flora y fauna 0,05 ppm se observa que se superan estos valores 500 veces al descargar las arenas (tabla 1).

De las muestras tomadas en cada planta de beneficio se aisló una cepa de *Pseudomonas fluorescens* con muy buena resistencia y capacidad degradadora de cianuro de sodio. Esta especie fue capaz de biodegradar el contaminante a un porcentaje de eficiencia superior al 98% cuando se trabajó a concentraciones de 100 hasta 500 ppm de NaCN. Pero considerando que la norma que reglamenta las descargas de cianuro solo permite 1 ppm en el ambiente, se puede decir que el tratamiento biológico para la degradación de cianuro de manera directa es muy útil y eficaz para arenas que contengan hasta 200 ppm de NaCN en el momento de ser descargadas de los tanques de cianuración.

Optimizando las condiciones del proceso, como tiempo de reacción, población bacteriana, concentración del cianuro y

cantidad de arena a tratar, pueden ser tratadas arenas con contenidos entre 200 y 700 ppm de cianuro, con bacterias en varias etapas.

5. CONCLUSIONES

Los valores de las LC_{50} muestran la necesidad de hacer un tratamiento de detoxificación y/o neutralización de las arenas cianuradas que actualmente se están descargando en las pequeñas plantas de beneficio del municipio de Segovia, Antioquia, Colombia, con el fin de crear las condiciones mínimas necesarias para que sobrevivan algunas especies acuáticas, sin embargo, se requiere de una investigación adicional para determinar la persistencia de la toxicidad del CN descargado en las arenas para las diferentes especies vivas que se quieran estudiar.

Los tratamientos convencionales para degradación de cianuro como adsorción sobre carbón activado o cloración alcalina, suelen ser muy comunes y eficientes, sin embargo presentan desventajas por el alto costo que conlleva la compra de los reactivos necesarios. El tratamiento microbiano por su parte, demuestra eliminar grandes cantidades de cianuro de una manera eficiente y económica.

La cepa nativa de *P. fluorescens* aislada de los entables escogidos en este estudio demostró tener una alta eficiencia en la degradación de cianuro hasta una concentración de 700 mg/l, es decir, una concentración mucho mayor de la que inhibe el crecimiento y desarrollo de *D. pulex*.

AGRADECIMIENTOS

Los autores manifiestan su agradecimiento a la empresa Frontino Gold Mines y todos los funcionarios, dueños y administradores de las plantas de beneficio de Segovia, por su aporte económico y logístico. A los profesores Judith Betancur y Jaime Palacio de la Universidad de Antioquia, por su colaboración en la realización de los ensayos experimentales.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] ADAMSON, R.J. The chemistry of the extraction of gold from its ores. Capetown, South Africa, 1972.
- [2] AKCIL A. et al. Biological treatment of cyanide by natural isolated bacteria (*Pseudomonas* sp). Mineral Engineering. In press, 2003
- [3] ALZAMORA, N. Métodos estadísticos, departamento de estadística e investigación operativa, Universidad Politécnica de Valencia, 1995.
- [4] CROSBY D.G. Environmental toxicology and chemistry. New York , Oxford University Press, pp 336.1998.
- [5] GIRALDO L. Ensayos de toxicidad crónica de clorpirifos sobre *Daphnia pulex*. Trabajo de tesis. Universidad de Antioquia, Medellín. 1998.
- [6] KUNZ D.A, CHEN J.L., PAN G. Accumulation of α keto acids as essential components in cyanide assimilation by *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764, Applied and Environmental Microbiology, vol 64, pp 4452-4459. 1998.
- [7] OUDJEHANI, K. et al. Natural attenuation potential of cyanide in microbial activity in mine tailings. Applied Microbiology and Biotechnology, vol 58, pp 409-415. 2002.
- [8] WANG C.S., KUNZ D., VENABLES B. Incorporation of molecular oxygen and water during enzymatic oxidation of cyanide by *P.fluorescens* NCIMB 11764 Applied and Environmental Microbiology, vol 62, pp 2195-2197. 1996.
- [9] <http://www.bt.cdc.gov/agent/cyanide/basic/espanol/facts.asp>. Consultado en Agosto 25 de 2004.