

**INSTITUTO TECNOLOGICO DE COSTA
RICA**

INFORME FINAL DE PROYECTO

**TRATAMIENTO DE DESECHOS DEL CIANURO POR
BIORREMEDIACION**

***ALMA DELOYA M. MSc, COORDINADORA DEL PROYECTO, ESCUELA
DE QUIMICA, CENTRO DE INVESTIGACION EN PROTECCION
AMBIENTAL***

***MARIA PORRAS A. MLA, ESCUELA DE QUIMICA, CENTRO DE
INVESTIGACION EN PROTECCION AMBIENTAL***

SETIEMBRE 2011

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	3
ABSTRACT	4
INTRODUCCION	6
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	7
MARCO TEÓRICO.....	8
Química del cianuro, análisis y tratamientos	9
Métodos usados para biorremediación:	11
Ventajas y desventajas de la biorremediación	12
OBJETIVO GENERAL.....	15
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
MATERIALES Y METODOS.	15
EQUIPO PRINCIPAL.	15
METODOLOGIA.	17
RESULTADOS OBTENIDOS.	19
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	23
CONCLUSIONES	31
RECOMENDACIONES	31
BIBLIOGRAFÍA.....	32
APENDICE 1	36

INSTITUTO TECNOLOGICO DE COSTARICA VICERRECTORIA DE INVESTIGACION

INFORME FINAL DE PROYECTO

TRATAMIENTO DE DESECHOS DEL CIANURO POR BIORRENECIACION.

ALMA DELOYA M. MSc, COORDINADORA DEL PROYECTO, ESCUELA DE QUIMICA, CENTRO DE INVESTIGACION EN PROTECCION AMBIENTAL. E-mail: adeloya@tec.ac.cr

MARIA PORRAS A. MLA, ESCUELA DE QUIMICA, CENTRO DE INVESTIGACION EN PROTECCION AMBIENTAL. E-mail: mporras@tec.ac.cr

RESUMEN

En la investigación se desarrolló un consorcio autóctono de microorganismos degradadores del cianuro para aplicarlo en el tratamiento biológico de los desechos peligrosos del cianuro.

Los microorganismos autóctonos obtenidos, se liofilizaron en diferentes medios protectores, como la Gelatina y Caldo lactosado a diferentes temperaturas, (-35,-45,-55 y -65).

Para tratamiento preliminar de los desechos del cianuro se aplicó un método de pretratamiento en lechada, para la lixiviación preliminar del desecho, con periodos de 3-5 días y un tratamiento posterior, por Lagunas aireadas, aplicando el consorcio de microorganismos liofilizados.

Se obtuvieron ocho diferentes liofilizados bajo diferentes condiciones de temperaturas y con dos medios protectores de liofilización que presentaron excelentes recuperaciones a los seis meses de la liofilización.

El consorcio de microorganismos liofilizados presentó, viabilidad del 70 al 80 %, con porcentajes de remoción del cianuro mayores al 95 por ciento y puede conservarse activo por tiempos prolongados (por años).

Los microorganismos liofilizados, pueden aplicarse en la biodegradación de los desechos del cianuro procedentes de las minas de oro o cualquier otro desecho de cianuro como los baños de electrodeposición de metales, así como los procedentes de la industria manufacturera de joyas.

PALABRAS CLAVES. Microorganismos autóctonos, medio protector, liofilización, lixiviación, consorcio de microorganismos, biorremediación

ABSTRACT

In the following research was developed an autochthonous consortium of degrader microorganisms of the cyanide for the application in the biological treatment of the dangerous wastes of cyanide.

The autochthonous microorganisms obtained were lyophilized in different protective environments such as gelatin and lactose broth at different temperatures, (-35,-45,-55 y -65).

For the preliminary treatment of the cyanide wastes it was applied a method for the preliminary leaching of the waste, with periods between 3 and 5 days, and an posterior treatment, by aerated lagoons, applying the consortium of lyophilized microorganisms.

There were obtained eight different lyophilized in different temperature conditions and with two lyophilization protective media that presented excellent recovery at six months of lyophilization.

The consortium of lyophilized microorganisms presented 70 to 80 percent of viability, with cyanide removal percentages higher than 95 percent and it can be conserved active for a prolonged time (for years).

The lyophilized microorganisms can be applied in the biodegradation of the cyanide wastes from the gold mines or any other cyanide waste such as metal plating baths as well as from jewelry manufacturing.

KEY WORDS. Autochthonous microorganisms, protective media, lyophilization (Freeze drying), leaching, consortium of microorganisms, biodegradation.

INTRODUCCION

Actualmente los desechos del cianuro son tratados por métodos químicos muy eficientes y con buenos resultados. Sin embargo la búsqueda de tecnologías correctivas biológicas para degradar el cianuro, que no generen productos tóxicos y que sean menos impactantes para el ambiente, ha impulsado las investigaciones para sustituir los Métodos Convencionales como son la adsorción, la conversión química y el tratamiento electrolítico. Estos métodos son costosos y corrosivos generando desechos que a veces son más contaminantes que los iniciales.

El planteamiento de este proyecto surge, con el objetivo de adaptar tecnología que sea más amigable con el ambiente, como la biorremediación.

Una de las ventajas del tratamiento de los desechos tóxicos por biorremediación, es que son más económicos porque no se necesita de reactivos químicos, estos implican un manejo adecuado y en la mayoría de los casos, costos elevados e importación de los mismos. Además la biorremediación es un método sencillo y no se necesita de personal experto para el manejo y operación del sistema de tratamiento.

La biorremediación causa impacto menos negativo en el medio ambiente, porque está basada en la acción de microorganismos autóctonos y modificaciones ambientales de gran sencillez, como la aplicación de nutrientes y la aireación.

Por ser el cianuro biodegradable, sus desechos pueden ser tratados por biorremediación, ya que la colonización y crecimiento de los microorganismos no será inhibida por altas concentraciones, si el desecho es acondicionado con un pre-tratamiento como el de lechada (lixiviación en agua con agitación

Durante el tratamiento por biorremediación, el cianuro se transforma en otras sustancias químicas más estables y menos tóxicas mediante procesos físicos, químicos y biológicos naturales.

Los factores que intervienen en el proceso de biorremediación son variados y entre los más importantes para la biorremediación del cianuro en medio acuoso son el pH, el oxígeno y por último la concentración del cianuro.

En la siguiente investigación se desarrolló un consorcio de microorganismos autóctonos, para degradar el cianuro y aplicarlo en el tratamiento biológico de los desechos del cianuro (biorremediación). El tratamiento preliminar consistió en la lixiviación del desecho y un posterior tratamiento aerobio por Lagunas aireadas a pH no menor a 9,4.

Como producto principal del proyecto se obtuvo el desarrollo e implementación de una tecnología adaptada para tratar los desechos del cianuro y desechos tóxicos afines.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los residuos líquidos industriales del cianuro vertidos a la naturaleza sin ningún tratamiento sobrepasa la capacidad de auto-recuperación de los cuerpos receptores, o del suelo sobre el cual se disponen alterando sus características y provocando una eminente contaminación ambiental y un gran impacto ambiental, al destruir ecosistemas y afectar la salud de poblaciones.

El tratamiento de los contaminantes en el agua, permite proteger el medio ambiente y la salud, así como cumplir con las especificaciones de vertido del reglamento 33601 MINSALUD-MINAE que rige en Costa Rica.

Generalmente los tratamientos del desecho del cianuro se han realizado por métodos químicos que son costosos y requieren de sustancias químicas que implican una alta inversión y una adecuada dosificación y manipulación.

Este es el caso de los efluentes procedentes de los procesos que utilizan grandes cantidades de cianuro, como lo es el proceso de recuperación de metales preciosos de oro y plata a partir de yacimientos de rocas

intrusitas de vetas de cuarzo, que presentan reacciones colaterales con los minerales asociados al oro, o la plata, que son bastante complejas y tóxicas. Además en el laboratorio de ingeniería de los materiales del Tecnológico se genera desechos líquidos del proceso de nitruración¹ de metales que pueden tratarse por medio de la biodegradación aplicando el consorcio de microorganismos degradadores del cianuro obtenido producto de esta investigación.

MARCO TEÓRICO

Desde hace más de un siglo, el cianuro ha sido utilizado en todo el mundo en la extracción de oro y plata. Si bien durante décadas se han investigado productos químicos para reemplazarlo, sigue siendo el único producto de lixiviación utilizado, debido a la combinación de una serie de factores como la disponibilidad, la eficacia, el costo y la posibilidad de utilizarlo con un nivel de riesgo aceptable para los seres humanos y el medio ambiente. Más del 90% de la recuperación de oro del mundo se basa en la utilización de cianuro. Hay quienes piensan que debe prohibirse la minería en general debido a las falencias ocasionales y lamentables de operaciones que terminan en graves episodios ambientales. La preocupación pública acerca de los aspectos de seguridad y ambientales del cianuro es válida y comprensible dada la historia y algunos episodios recientes relacionados con el cianuro y la minería. Pese a estas preocupaciones, el uso del cianuro sigue siendo fundamental en una gran cantidad de industrias en las que se maneja de manera segura y ecológicamente racional en decenas de instalaciones en todo el mundo (1).

¹ La nitruración líquida se realiza en un baño de sales fundidas compuesto de una mezcla típica de sales de sodio y potasio. Las sales de sodio, representan 60 a 70% (en peso) de la mezcla total, están compuestas por 96.5% de NaCN, 2.5% de Na₂CO₃ y 0.5% de NaCNO. La nitruración es, uno de los tratamientos térmicos para mejorar dureza y corrosión superficial de metales, más baratos y que menos equipamiento requiere.

Generalmente, cuando se refieren al cianuro se piensa en un elemento contaminante y venenoso, sin conocer que éste se encuentra presente incluso en plantas y frutos en forma natural en pequeñas cantidades (2).

Existen alrededor de 2,000 fuentes naturales de cianuro en la naturaleza. Ejemplo de ello son las almendras, cerezas, alfalfa, rábano, legumbres, col, coliflor, brócoli, nabos, entre otras plantas. Asimismo, está presente en bacterias, hongos, algas e incluso en algunos insectos los cuales, como en el caso de las plantas, producen cianuro en pequeñas cantidades con la finalidad de ahuyentar a sus posibles depredadores (2).

En cuanto a los tipos de cianuro se refiere, el cianuro de hidrógeno y el cianuro de sodio son los de uso más difundido. El cianuro de hidrógeno es un gas incoloro producido a través de la combinación de gas natural con amoníaco a altas temperaturas, y como subproducto de la fabricación de fibras acrílicas (2).

Actualmente, se producen alrededor de 1.4 millones de toneladas de cianuro en el mundo por año. Los principales demandantes de este producto son las empresas de las industrias química e industria (concentrando alrededor del 82% de la demanda) y la minería, que consume el restante 18% (fundamentalmente, de cianuro de sodio) (2).

Química del cianuro, análisis y tratamientos

Potencialmente el cianuro se encuentra presente en las soluciones de procesos relacionados con la extracción de oro y plata de varias formas. Otros compuestos relacionados con el cianuro se forman a causa de interacciones con el mineral, el tratamiento del agua y la atenuación natural. Históricamente, se habla de las siguientes formas de cianuro: cianuro libre, cianuro fácilmente dissociable (WAD), cianuro total y cianuro pasible de cloración (CAC). A través de los años, el procedimiento analítico para cianuro WAD fue el elegido por la industria y las autoridades

normativas para medir el cianuro "toxicológicamente significativo" o "ecológicamente sensible" (1).

El procedimiento analítico para cianuro WAD mide el cianuro libre y otras formas complejas débiles de cianuro. Restar el contenido de cianuro WAD del cianuro total da el contenido de cianuro de hierro básicamente no tóxico estable. Si se aplican y ejecutan correctamente, los procedimientos para el cianuro total y cianuro WAD brindan resultados confiables y significativos que pueden utilizarse con fines de control y cumplimiento de las normas. La sensibilidad de estos métodos es suficiente para determinar la presencia de las distintas formas y cuantificar los niveles de cianuro peligrosos para los seres humanos y el medio ambiente (1).

Los problemas surgen cuando se utilizan estos métodos más allá de sus posibilidades y se procura cuantificar niveles de cianuro cercano o inferior a los que producen impactos en el medio ambiente. Se asigna un valor no justificado a valores bajos y no confiables de cianuro. Puede brindarse un grado razonable de protección para los seres humanos y el medio ambiente mediante la promulgación de normas que protejan el uso en determinadas aguas superficiales y subterráneas (1).

El cianuro se puede presentar en dos formas dependiendo del pH del medio en el que se encuentre. Con pH alcalino predomina la forma soluble del cianuro, mientras que con un pH neutro y ácido en el medio, predomina la forma gaseosa, el ácido cianhídrico (HCN). Por lo tanto, para mantener el cianuro en disolución y no eliminarlo a la atmósfera como un gas tóxico es necesario mantener el medio acuoso a pH alcalino (superior a pH 9) (3).

Los métodos convencionales para degradar el cianuro son el tratamiento electrolítico, la conversión química y la adsorción. Los tratamientos químicos y electroquímicos descomponen el cianuro en nitrógeno y dióxido de carbono, pero son corrosivos y costosos. La adsorción consiste en la remoción del químico empleando carbón activado o intercambio iónico, ambas técnicas costosas. La conversión consiste en transformar el cianuro en compuestos menos tóxicos como el tiocinato o el ferrocianato. En la naturaleza el cianuro también es degradado, pero este proceso puede

durar años o décadas (4).

La biorremediación puede definirse como el uso de organismos vivos, componentes celulares o enzimas libres con el fin de realizar una mineralización, transformación parcial o humificación de residuos o agentes contaminantes. También puede alterar el estado redox de metales. El compostaje es una forma primaria de biorremediación en la cual los residuos orgánicos son biodegradados por microorganismos. Los factores que determinan la biorremediación son complejos y varían dependiendo de la aplicación, siendo en algunos casos, difícil de distinguir entre los factores bióticos y abióticos que contribuyen en dicho proceso. El tratamiento de biorremediación aplicado varía de acuerdo con las propiedades físicas – químicas del contaminante. La contaminación *in situ* se establece en el lugar donde ocurrió la contaminación y la *ex situ* se lleva a cabo retirando a cabo la muestra contaminada y trasladándola hasta la unidad de tratamiento (4).

Los científicos pueden ahora seleccionar diferentes tipos de microorganismos, que pueden adaptarse, sobrevivir y servir en ambientes altamente contaminados. Estos microorganismos, necesitan las sustancias orgánicas que componen los contaminantes, para extraer la energía necesaria a sus funciones vitales. Con esa energía, sustraída de los mismos desechos transforman las sustancias tóxicas y contaminantes (5).

Métodos usados para biorremediación:

Los métodos de biorremediación actuales que definen la forma de aplicación y actuación de las bacterias, según Ecobiotec son: la estimulación de los microorganismos presentes en el medio natural; el uso de formulaciones de microorganismos en polvo (disecados); y el uso de líquidos con microorganismos vivos en estado de latencia (5).

El primer método también llamado bioestimulación o estimulación de microorganismos autóctonos, se basa en activar y potenciar las colonias

bacterianas indígenas (nativas), en los mismos suelos, mediante nutrientes y oxígeno (5).

El segundo método distingue dos formas de conservación: formulaciones de microorganismos deshidratados (obtenido por secado a altas temperaturas) y formulaciones de microorganismos liofilizados (obtenidos por secado a bajas presión y temperatura), que resultan muy eficaces en la degradación de compuestos tóxicos. Un proceso de liofilizado consiste básicamente: en tomar las bacterias aisladas y reproducirlas en grandes cantidades para que luego sean congeladas y luego secarlas. Los microorganismos están vivos, inactivos, pero vivos y pueden ser conservados en tubos especiales, herméticamente cerrados y refrigerados. Por último las bacterias están como polvo blanco y pueden ser encapsuladas para su comercialización. Para ser aplicadas en el medio contaminado son puestas nuevamente en cultivo en un medio líquido. Así las bacterias se rehidratan y empiezan a crecer para ser utilizadas. Como tercer método se usa una mezcla de microorganismos vivos en medio líquido, que tienen las propiedades de transformar y degradar (5).

Ventajas y desventajas de la biorremediación

Ventajas

- Generalmente solo se originan cambios físicos menores sobre el medio
- Cuando se produce correctamente no produce cambios adversos significativos.
- Ofrece una solución más simple y completa que las tecnologías mecánicas
- Menos costosa que otras tecnologías.

Desventajas

- Para muchos tipos de contaminantes su efectividad no ha sido determinada.

- El tiempo de actuación es largo.
- Su implementación es específica para cada lugar contaminado.
- Su optimización requiere información sustancial acerca del lugar contaminado y las características del contaminante (6).

Otro aspecto importante sobre los microorganismos empleados en biorremediación es que estos emplean CN como fuente de carbono y de nitrógeno, según resultados realizados por Garcés, A, *et al* 2006 en su trabajo Aislamiento de consorcio de microorganismos degradadores de cianuro.

Los factores que interviene en el proceso de biodegradación son múltiples:

- **Temperatura y humedad en el medio**, estimulan el crecimiento y la actividad de los microorganismos aerobios, que necesitan oxígeno para vivir.
- **La acidez del medio**, el pH ácido limita la capacidad de desarrollo de los microorganismos.
- **La disponibilidad de oxígeno**, hay sustancias como el aceite que no se degrada en un medio anaerobio. Por otro lado, hay sustancias como algunos pesticidas y los tóxicos difenilos policlorados PCBs que sólo se degradan en medios aerobios (7).

Para realizar la biodegradación es necesario considerar algunas etapas.

- **Caracterizar el Contaminante:** Se deben conocer los parámetros básicos como concentración de contaminante, DBO, DQO, pH y temperatura.
- **Selección del Microorganismo:** Esta etapa es muy importante ya que cada especie presenta diferentes capacidades para la biodegradación; para la remediación de aguas contaminadas con trazas de cianuro la literatura

recomienda emplear *Pseudomonas*.

- Medio de Cultivo: Todos los microorganismos vivos necesitan cierta cantidad de macronutrientes y micronutrientes o trazas de elementos para sobrevivir y realizar todas sus funciones metabólicas.
- Inóculo: Es el proceso que se lleva a cabo para dar inicio a la fermentación.
- Fermentación: Esta etapa es la parte más importante en el proceso de biorremediación (7).

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un consorcio de microorganismos, adaptado para degradar concentraciones elevadas de cianuro que se conserve por tiempos prolongados, para aplicarlos en la biorremediación de los desechos peligrosos del cianuro.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aplicar el pre-tratamiento por lechada para la lixiviación y desintoxicación de desechos del cianuro.
- Obtener un extracto enzimático o microbiano por la técnica del sustrato selectivo, para aplicarlo en la biorremediación de los desechos del cianuro.
- Secar el extracto obtenido por liofilización, para conservarlo y disponerlo para su aplicación por periodos prolongados (por años).

MATERIALES Y METODOS.

Se obtuvo un consorcio de microorganismos a partir de un desecho líquido de cianuro, generado durante el proceso de nitruración, en el Laboratorio de Ingeniería de los Materiales del Instituto Tecnológico de Costa Rica, sede Cartago.

EQUIPO PRINCIPAL.

El contenido de cianuro en el desecho se midió con el Espectrofotómetro portátil, LaMotte SMART Spectro.

El oxígeno disuelto se determinó con un medidor con electrodo de membrana, marca Fischer Scientific, modelo APG4, portátil.

El control del pH durante el tratamiento del desecho de cianuro se midió con pH-metro de mesa Dnver- UB-10, instrumental.

Las observaciones al microscopio se realizaron con el Microscopio Trinocular, Marca MOTIC, modelo BA300.

Para la separación del extracto de microorganismo a liofilizar se usó la centrifuga, Centrífuga Damon y EC División y EC- HN-FII, modelo dcs-16rv-r.

Los medios bacteriológicos se esterilizaron en auto clave Biocientifica-C-7511

La determinación de la humedad residual del liofilizado, se realizó en estufa Marca Thermo Electrón Corportion, Precision



Para la liofilización se utilizó el Liofilizador - Freeze Dyer ALPHA 2-4 / LD.

METODOLOGIA.

El desecho en estudio **se caracterizó en cuanto al contenido de cianuro**, usando el Método de Cianuro 36-SC del Espectrofotómetro portátil, LaMotte SMART Spectro.

Para la obtención del consorcio degradador del cianuro, primero se procedió a la **lixiviación** del desecho en agua a temperatura ambiente, con micronutrientes de calcio, hierro y magnesio, con agitación por tres días y controlando que el pH siempre fuera superior o igual a 10,4 para obtener un medio alcalino. Además se controló que el oxígeno disuelto se mantuviera por lo menos en 2 mg/L, para asegurar las condiciones aerobias (8) (9).

Posteriormente, como segundo paso para la **obtención del consorcio** de los microorganismos degradadores del cianuro, en los experimentos montados y previamente agitados por tres días, se prolongó la agitación por 63-72 días, bajo las condiciones mencionadas y se alimentó día por medio durante todo el periodo del ensayo, con 1,4 mg/L del desecho de cianuro, como única fuente de carbono y nitrógeno para las funciones de las bacterias. (10)

Todos los ensayos de lixiviación y biodegradación se montaron en replicas por triplicado, en recipientes de 25 litros, con un volumen del desecho a tratar de 20 litros.

Los ensayos de control, durante el proceso de obtención del consorcio de microorganismos fueron: **pH, oxígeno disuelto, temperatura y exámenes microscópicos**. Todos los análisis se realizaron de acuerdo con los Método Estandarizados para el análisis de aguas y aguas residuales (11).

Para la selección y adaptación, los consorcios de microorganismos, se separaron por centrifugación, a 5000 rpm, durante 10 minutos, se lavaron con agua destilada dos veces y se incubaron por 48 horas a temperatura ambiente, en caldo lactosado al 20%. Se añadieron micronutrientes y se aumentó gradualmente la concentración de cianuro desde 1,400 hasta 2500 mg/L. Los ensayos se realizaron bajo condiciones aerobias, manteniendo el oxígeno disuelto por lo menos en 2 mg/L y el pH entre 9,4 a 10,4 unidades de pH (8).

Este **proceso de selección y adaptación** de los microorganismos se llevó a cabo hasta la tercera generación de microorganismos, re-inoculando los microorganismos separados por centrifugación a 5000 rpm en caldo lactosado, bajo las mismas condiciones anteriores de nutriente, oxígeno y pH.

Se controló en todos los casos el crecimiento de los microorganismos por observaciones al microscopio, día por medio. Las nuevas cepas obtenidas se volvieron a separar por centrifugación y se congelaron para su posterior **liofilización**.

Los consorcios de microorganismos, separado por centrifugación se resuspendieron en diferentes medios protectores de liofilización como son la gelatina al 10% y 5% y la lactosa al 10%, y 5% (12).

Después de la resuspensión, la congelación de los microorganismos, se realizó el día anterior a la liofilización por un periodo de 20 a 24 horas a temperaturas de -3 a 0 grados centígrados.

El proceso de liofilización se realizó a presiones de 0,250, 0,070, 0,021 y 0,0054 milibares equivalentes a temperaturas de resublimación entre -35, -45, -55 y -65 grados centígrados respectivamente. Los tiempos de liofilización fueron de 24 a 36 horas para el proceso de secado primario. El secado secundario se realizó a 20 grados centígrados, por 10 a 8 horas (13).

A los liofilizados se les **determinó la humedad** tanto en el secado primario como en el secado secundario, con el propósito de controlar la humedad final del liofilizado.

Los liofilizados se conservaron en refrigeración y a temperatura ambiente en ambos casos en frascos de vidrio y tapados.

Los microorganismos liofilizados **se recuperaron**, re-hidratándolos a temperatura ambiente, en una suspensión de caldo lactosado al 10 %, con una concentración de cianuro de 2500 mg/L, pH de 9,4 a 10,4 y concentración de oxígeno disuelto de no menor que 2 mg/L. Para la **recuperación de los microorganismos** liofilizados se tomaron 10 ml al 0,1 %, de la suspensión del cultivo liofilizado y se resuspendieron en 100 ml de caldo lactosado al 10 %. La suspensión del liofilizado se incubó por 48 horas a temperatura ambiente (14).

El **recuento heterótrofo** de microorganismos, se realizó a las 48 horas de recuperación, para calcular el **porcentaje de recuperación** del liofilizado. El recuento heterótrofo se realizó en el Laboratorio CEQIATEC, Departamento de Química del ITCR.

El tratamiento del desecho de cianuro, se realizó por triplicado. Como pretratamiento se lixivió el desecho con volúmenes de 20 litros de agua, agitando por 3 días a 200 rpm. Durante los tres días del pretratamiento se mantuvo el pH en valores iguales o superiores a 10,4 unidades de pH. Posterior a la lixiviación se trató el desecho por aireación con difusores, con las mismas condiciones de pH, oxígeno disuelto y nutrientes con las que se obtuvo el consorcio microbiano, prolongando el tiempo tratamiento por 12 días más (16).

Se **cuantificó el cianuro**, antes y después del tratamiento total de 15 días, (3 días de pretratamiento por lixiviación y 12 días de tratamiento por aireación).

RESULTADOS OBTENIDOS.

A continuación se resumen los principales resultados del proyecto. El estudio se realizó en el Centro de Protección Ambiental de la Escuela de Química, abarcando del 22 febrero del 2008 al 22 de febrero del 2010.

En el cuadro 1, se presentan las características del desecho, en cuanto a la concentración del cianuro, seguidamente se presenta el cuadro 2 indicando el tiempo en que aparecieron los microorganismos degradadores del cianuro.

Posteriormente, en los cuadros 3 Y 4 se resume el promedio de la humedad en los liofilizados, resultado del secado primario y secundario en los medios protectores de liofilización. El recuento heterótrofo para obtener el porcentaje de recuperación de los líófilos o viabilidad, se muestra en el cuadro 5.

Por ultimo en el cuadro 6, se muestra el porcentaje de degradación del cianuro por el consorcio microbiano después del pretratamiento en lechada y el tratamiento con aireación y agitación.

Cuadro 1. Concentración de cianuro en el desecho del Laboratorio de ciencias de los materiales, ITCR, Cartago.

Muestra	Concentración (mg / L)
1	1400
2	1300
3	1200
4	1600

Fuente: Deloya, A

Cuadro 2. Aparición de los Microorganismos durante el proceso de obtención del consorcio de Microorganismos autóctonos para degradar cianuro.

Réplica	Vol. Del desecho* (L)	Tiempo de desarrollo del consorcio
1	20	72
2	20	66
3	20	63
4	20	60

*En todos los ensayos se añadió nutrientes: Cloruro de Calcio, Cloruro de hierro y Cloruro de magnesio.

Fuente: Deloya, A

Cuadro 3. Humedad de los Liofilizados en dos medios protectores, después del secado primario

Liofilizado	Medio	Protector
	Caldo lactosado Humedad (%)	Gelatina Humedad (%)
1	11,70	9,09
2	15,80	9,40
3	10,00	8,00
4	12,00	7,40
5	14,00	12,00

Fuente: Deloya, A

Cuadro 4. Humedad de los Liofilizados en dos medios protectores, después del secado secundario.

Liofilizado	Medio	Protector
	Caldo lactosado Humedad (%)	Gelatina Humedad (%)
1	3,89	1,42
2	2,00	1,20
3	5,26	1,35
4	3,00	1,96
5	4,30	1,38

Fuente: Deloya, A

Cuadro 5. Recuento Heterótrofo para determinar la recuperación de los liofilizados.

Muestra	Recuento ufc/ 100ml	
	ANTES DE LIOFILIZAR	DESPUÉS DE LIOFILIZAR
1	$5,9 \times 10^{17}$	$1,5 \times 10^{15}$
2	$1,2 \times 10^{17}$	$3,8 \times 10^{14}$
3	$2,3 \times 10^{16}$	$3,7 \times 10^{14}$

Fuente: Deloya, A

(t) tiempo de recuperación	48 horas
Volumen de ensayo	20 litros
pH	10,4 unidades

Cuadro 6. Porcentaje de degradación del cianuro de acuerdo con las variables seleccionadas. (*)

Ensayo	Concentración inicial cianuro (mg/ L)	Concentración final (mg/ L)	Remoción (%)
1	3600	2,58	99,9
2	1920	2,21	99,8
3	1440	1,65	99,8

Fuente: Deloya, A

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La caracterización del desecho en los diferentes lotes de las muestras, indican concentraciones de cianuro total de 1400 mg/L, 1300 mg/L, 1200 mg/L y 1600 mg/L, ver cuadro 1.

El pH del desecho durante los ensayos varió desde 9,48 a 11,40 unidades de pH. Este parámetro como característica propia del desecho del cianuro, fue una ventaja y uno de los factores más importantes durante el tratamiento por biodegradación del desecho, ya que la literatura menciona que valores alcalinos de pH mejoran la degradación del cianuro (16).

El cianuro se puede presentar en dos formas dependiendo del pH del medio en el que se encuentre. Con pH alcalino predomina la forma soluble del cianuro, mientras que con un pH neutro y ácido en el medio, predomina la forma gaseosa, el ácido cianhídrico (17).

Por lo anterior durante el tratamiento por biodegradación del cianuro, se trabajó manteniendo el pH con valores entre 9,16 a 10,4 esto es de vital importancia para que el cianuro permanezca disuelto y no pase al medio ambiente como HCN gaseoso, porque este gas actúa en pocos segundos

en el sistema respiratorio, inhibiendo enzimas respiratorias como la citocromo oxidasa (18).

Durante el proceso de **tratamiento en lechada** se extrajo el cianuro sólido mediante la agitación usando como disolvente el agua. El cianuro entra en contacto con el agua al ser agitado y se difunde a la fase líquida, con lo que se logra obtener que el cianuro sólido pase a la fase líquida, este proceso preliminar en el tratamiento por biodegradación del cianuro también se conoce como **lixiviación** del cianuro (9).

La agitación para mantener el contacto entre el desecho y el agua mostró ser de vital importancia para realizar la biodegradación del desecho porque permite la lixiviación del cianuro por el agua (19).

El desarrollo y obtención de los microorganismos nativos degradadores del cianuro se logró en periodos muy prolongados, encontrándose el desarrollo de los primeros microorganismos en el primer ensayo a los 72 días y en la segunda réplica a los 66 días, en la tercera réplica a los 63 días y en la última a los 60 días (ver cuadro 2). Este tiempo prolongado para la aparición de los microorganismos autóctonos degradadores del cianuro, en los diferentes reactores de ensayo, concuerda con los tiempos prolongados obtenidos en otras investigaciones, para desechos mineros (14).

Investigaciones recientes revelan el hecho que la toxicidad del cianuro consiste en inhibir la respiración de los microorganismos y posiblemente esta es la razón por lo que los microorganismos degradadores del cianuro necesitan un tiempo prolongado para su desarrollo (20).

Los microorganismos que biodegradan el cianuro tienen sistemas enzimáticos específicos que les permiten desarrollarse en ambientes con alta concentración de cianuro. Durante la biodegradación, la cianuro hidratasa convierte al cianuro en formamida, que finalmente es convertida a Dióxido de Carbono (CO_2) y Amoniaco (NH_3). Otras enzimas como la beta-cianoalamina y la cianuro monoxidasa también pueden biodegradar el cianuro a otras sustancias más simples que no contaminen. Además algunas bacterias transforman directamente el cianuro a CO_2 y

NH_4 por medio de la cianuro dioxigenasa, sin la formación de intermediarios (21).

Para el desarrollo, obtención y adaptación del consorcio microbiano, degradador del cianuro, se aprovechó la capacidad de los microorganismos de utilizar como fuente de carbono y nitrógeno los compuestos cianurados, convirtiendo los desechos tóxicos del cianuro en sustancias que ya no contaminan.

La selección de un consorcio de microorganismos más fuerte y eficientes en degradar el cianuro, se logró por el método del cultivo continuo. Por este método los microorganismos dominantes se seleccionaron por su afinidad por el sustrato. En este caso, la concentración del desecho del cianuro (sustrato selectivo), aumentó la velocidad específica de crecimiento del consorcio de microorganismos degradadores de cianuro, con respecto a la velocidad de crecimiento de otros microorganismos que pudieran crecer en el mismo medio (22).

La liofilización para conservar el consorcio de microorganismos degradadores del cianuro, se llevó a cabo en dos etapas. Una primera etapa de congelación lenta a de 0 a -3 grados centígrados, por 24 horas en donde el agua que contenía el extracto de microorganismos se solidificó. La congelación es de vital importancia para que los solutos y el agua no congelada formen una fase vítrea que permita conservar las características y la estructura del producto final liofilizado. Esta última queda fijada durante esta etapa de congelación (23).

Después de la congelación, la segunda etapa de la liofilización consistió en la sublimación del agua congelada en el extracto denominado secado primario. Para esta etapa se eligieron presiones que van desde 0,0250 a 0,0054 milibares que corresponden a temperaturas durante la sublimación de -35 a -65 grados centígrados.

La etapa del secado primario se realizó por debajo del punto triple del agua, para evitar el paso de ésta por la fase líquida, de tal manera que pasara directamente de la fase sólida a la fase de vapor (sublimación).

Esto permite conservar la estructura inicial de producto así como sus características, químicas y biológicas (23).

Durante el proceso de secado por sublimación se logró eliminar del 95 al 98 por ciento del agua en el extracto de microorganismos.

Después del secado primario (por sublimación) se realizó un segundo secado, denominado secado secundario el cual se llevó a cabo a 20 grados centígrados por lapsos de 8 a 10 horas. Esto se realizó con el propósito de eliminar el agua que quedó fijada o ligada por adsorción durante el proceso de congelación ya que las moléculas del agua libre, es decir no fijada a la estructura de los microorganismos, se eliminaron en el secado primario.

Se utilizó caldo lactosado y gelatina como **medios protectores** de las bacterias, durante todos los ensayos de liofilización. Cuando se analizó la influencia del medio protector en la liofilización, se pudo apreciar que con el caldo lactosado se obtuvieron buenos resultados de liofilización, pero presentó la desventaja de que el producto final fue difícil de solubilizar durante la recuperación. Esto posiblemente por la descomposición de la lactosa durante el proceso de liofilización, lo que causa que la lactosa forme una capa externa impermeable en el liofilizado que no permite una buena rehidratación del producto (23).

Sin embargo al emplear la gelatina como medio protector se obtuvo un producto final que presentó excelentes características de solubilidad, siendo esta prácticamente instantánea.

El uso de protectores es muy importante, porque la liofilización tiene limitaciones durante la etapa de congelación, debido a la formación de cristales de hielo que pueden romper las células y a su vez causar efectos negativos al microorganismo en la etapa de la re-hidratación para su re-activación (24).

Tanto la gelatina como el caldo lactosado son medios protectores altamente hidrofílicos. Ambos medios protectores protegen a los microorganismos, de los daños producidos por la congelación, en la membrana y pared celular. La gelatina es un medio protector no

permeable, que se adsorben en la superficie celular incrementando la viscosidad local, lo cual mantiene el hielo en forma amorfa evitando daño mecánico. En cambio el caldo lactosado es un medio protector semipermeable que forma entre la pared y la membrana celular una capa que protege la célula del daño mecánico (25).

El **porcentaje de humedad** de los productos finales para la segunda etapa de la liofilización, tanto para el secado primario como el secundario, se resumen en los cuadros 4 y 5, presentados en el apartado de Resultados.

Como se observa en los cuadros, los productos liofilizados indican que la gelatina como medio protector dio mejores resultados en cuanto al porcentaje residual obtenida la cual es muy importante para la conservación prolongada, de varios años del producto. Esta humedad del producto final corresponde a la humedad residual que del todo no puede eliminarse durante el proceso de liofilización ya que de ser eliminada se corre el riesgo de alterar las características químicas y biológicas de los liófilos (26).

Como se mencionó anteriormente, la humedad residual de los liófilos es de vital importancia para su conservación y para mantener la actividad de los microorganismos a largo plazo ya que, entre menor se la humedad, mayor será el tiempo de conservación.

Por otro lado, el contenido de humedad residual es necesario para mantener la actividad de los microorganismos porque las proteínas y péptidos de éstos requieren de cierta cantidad de agua para mantener su estructura secundaria y terciaria (27).

La **recuperación de los liofilizados** se realizó a los seis meses de preservación y almacenamiento a temperatura ambiente. En el Cuadro 6 del apartado de Resultados se muestran los datos de recuento heterótrofo los cuales representan recuperaciones superiores del 70% al 80% lo cual, de acuerdo con lo indicado por M.D. **García** y F. **Uruburú**, permite concluir que la liofilización fue exitosa (28).

Durante la recuperación del liofilizado se logró incrementar la sobrevivencia de los microorganismos, re-hidratándolos en caldo lactosado y en gelatina, los mismos medios que se usaron para el crecimiento inicial de las células; de esta forma al mantenerse elevada la presión osmótica durante la rehidratación se logra que la misma se dé en forma lenta. Por otro lado el crecimiento celular, después de la rehidratación tiene una fase de retardo extendida, que se puede reducir si se emplea para el crecimiento un medio de igual composición que el que da óptimo desarrollo pero disminuyendo su concentración original entre un 25 y un 50% (29). Por esta razón la recuperación y rehidratación del consorcio microbiano se realizó en caldo lactosado y gelatina al 10% en lugar de caldo lactosado y gelatina al 20%, concentración que se utilizó para el crecimiento inicial del consorcio de microorganismos (29) (30).

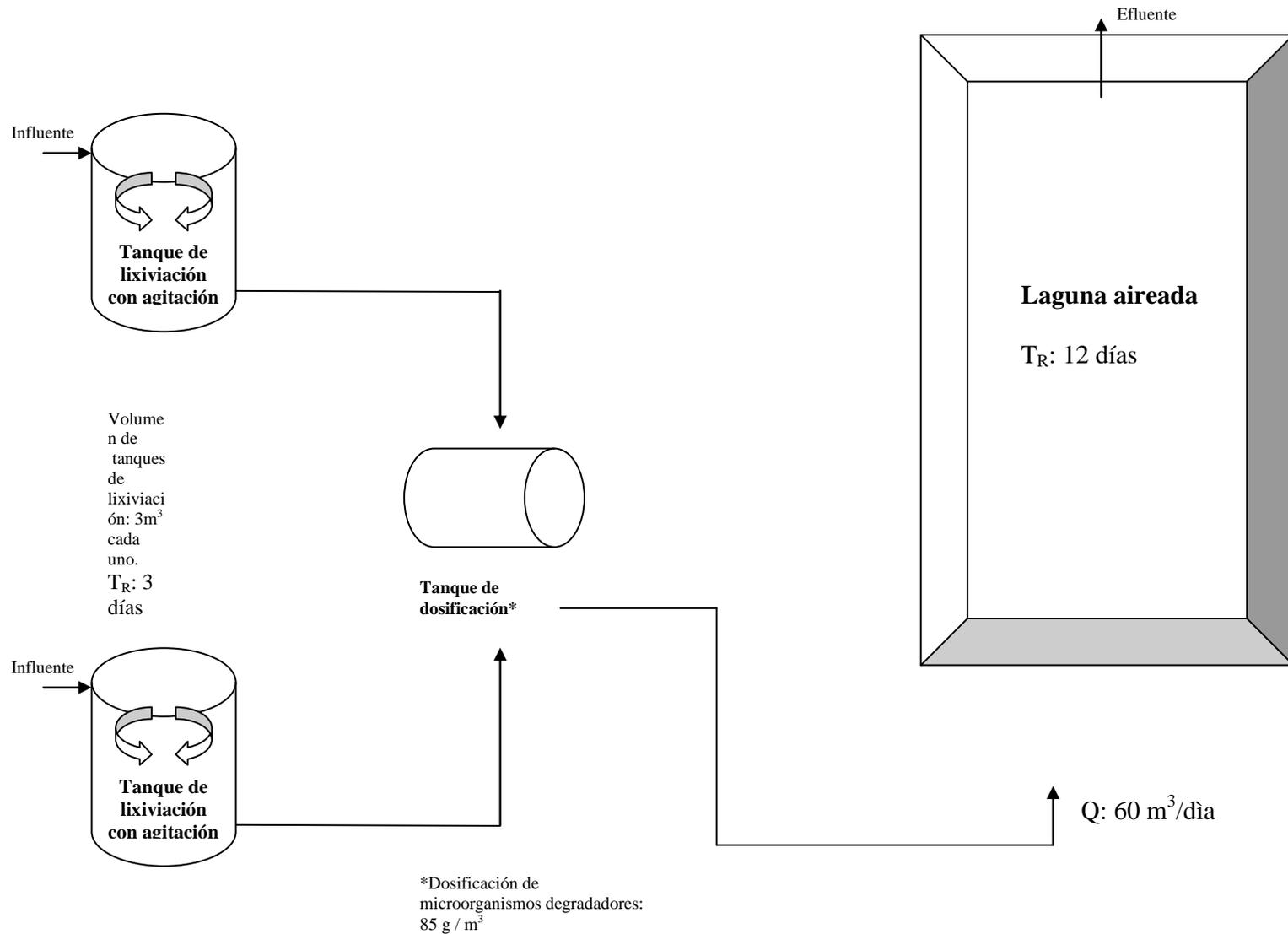
Entre los factores más importantes por los que se obtuvieron tan buenos porcentajes de recuperación se pueden mencionar los siguientes (28).

- El empleo de protectores como la gelatina y el caldo lactosado protegieron adecuadamente a los liofilos de las condiciones drásticas de congelación y presión.
- Las presiones durante el proceso de sublimación del hielo fueron entre 0,250 a 0,0054 milibares, estas condiciones de presión hacen que el proceso de sublimación sea lento con lo que se obtienen liofilos con mejores características de recuperación.
- La alta densidad celular del extracto del consorcio microbiano que se sometió a liofilización que fue superior a 10^{10} - 10^{11} células/100 ml, (ver cuadro 5). A altas concentraciones se obtienen mejores productos liofilizados con una buena capacidad de recuperación y de actividad.
- El grado de secado secundario alcanzado el cual fue inferior al 2%. Esta agua residual protege de daños a la pared de las células microbianas.
- La rehidratación lenta al disminuir la concentración del medio de rehidratación en un 50 % y no re-hidratando directamente en agua destilada.

Los resultados de la **cuantificación el cianuro**, antes y después del tratamiento total de 15 días, se muestran en el cuadro 7. Puede observarse que las remociones de cianuro fueron en todos los casos superiores al 95 % de remoción del cianuro, estas altas remociones del cianuro se deben al proceso de adaptación del consorcio que se llevó a cabo a hasta la tercera generación con lo que se logró microorganismos más fuerte y eficientes en la remoción del cianuro (29).

El consorcio de microorganismos demostró tener alta eficiencia en degradar cianuro, en concentraciones superiores a las reportadas por Restrepo *et al* en estudios similares (14).

La propuesta de tratamiento se resume en la figura 1, para el tratamiento de desechos del cianuro se propone como pretratamiento la lixiviación del desecho por tres días, seguido del tratamiento por lagunas aireadas, con tiempo de retención (T_r), de 12 días y aplicación del liofilizado de microorganismos en dosis de 500 g/m^3 de desecho lixiviado. Como mecanismo de aireación se recomienda aireación con difusores, manteniendo el oxígeno disuelto en por lo menos 1 mg/L . El tratamiento debe complementarse aplicando cloruro de calcio, cloruro de magnesio y cloruro de hierro como micronutrientes, en dosis de $0,250 \text{ L /m}^3$, (Ver el diagrama del tratamiento en la siguiente página).



CONCLUSIONES

- La adaptación del consorcio microbiano hasta la tercera generación, permitió obtener microorganismos más fuerte y eficientes en la remoción del cianuro, logrando alcanzarse eficiencias de remoción del 95 al 98%.
- El consorcio microbiano autóctono obtenido para degradar cianuro demuestra eliminar el cianuro de manera eficiente y económica, con tiempos de retención cortos de 15 días.
- La alta densidad celular del extracto del consorcio microbiano superior a 10^{10} - 10^{11} células/100 ml y el proceso de sublimación lento a presiones entre 0,250 a 0,0054 milibares fueron las razones para que se obtuvieran liófilos con excelentes características de recuperación entre 70% y 80%.
- Las concentraciones de cianuro eliminadas por el consorcio microbiano (2500 mg/L), son superiores a las reportadas por estudios similares (7).
- La lixiviación previa del desecho de cianuro es indispensable para el tratamiento aplicando el consorcio microbiano.

RECOMENDACIONES

Entre las principales recomendaciones de proyectos futuros pueden resumirse las siguientes:

- Realizar estudios de recuperación de los liofilizados de Microorganismos del cianuro para determinar su viabilidad a los 2, 4, 8, 12,16 y 20 años.
- Seguir en contacto con la **Compañía Infinito** para ofrecer y comercializar el consorcio biodegradador del cianuro.

- Impartir un taller de liofilización por año para motivar a los estudiantes de Ingeniería Ambiental y Biotecnología que realicen trabajos de graduación en el campo de los desechos tóxicos y otros.
- Seguir la metodología de obtención de microorganismos afines a un sustrato para obtener microorganismos degradadores de desechos como: Desechos lácteos, Grasa láctea, Desechos del petróleo, Lodos de tanques sépticos y Lagunas en general.

BIBLIOGRAFÍA

(1) FUNDAMIN, Mudder T. I; Botz, M.2004. El cianuro y la sociedad. Disponible: <http://www.fundamin.com.ar/es/publicaciones/17-mineria-y-sociedad/30-el-cianuro-y-la-sociedad.html> Consultado: abril 2010.

(2) Sociedad Nacional de Minería Petróleo y Energía, 2007. El Cianuro. Informe quincenal de la snmpe. Disponible: <http://www.snmpe.org.pe/pdfs/Informe-Quincenal/Mineria/Informe-Quincenal-Mineria-El-cianuro.pdf> Consultado: mayo 2009.

(3) Programa Medio Ambiente de Fundación Chile. 2009. Patentan un método ecológico para degradar cianuro. Innovación ambiental. Disponible en: <http://www.innovacionambiental.cl/noticia.php?id=77> Consultado: mayo 2010.

(4) Garcés, A et al. 2006. Aislamiento de consorcio de microorganismo degradadores de cianuro. Lasallista. Vol.3. No. 1.

(5) Osorio, M. 2003. Microorganismos que degradan desechos. Diversity reporting award. Consultado: enero 2010. Disponible en: <http://www.biodiversityreporting.org/article.sub?docId=595&c=Bolivia&cRef=Bolivia&year=2003&date=December%202003>.

(6) Lu, T. Universidad de Santiago de Compostela. Biorremediación. Consultado: abril 2010. Disponible: <http://www.usc.es/uscmn/investigacion/documento/Prestige-Biorremediaci%F3n.pdf>

(7) Bench-Colombia. Sistemas de Referencia para la construcción. Consultado: abril 2010. Disponible: <http://bdigital.eafit.edu.co/bdigital/PROYECTO/P660.2995CDC172/capitulo2.pdf>.

(8) Pavas, E; Giraldo, C. " Proceso Acoplado físico-químico y biotecnológico para el tratamiento de aguas residuales procesos Ambientales y Biotecnológicos " Universidad Colombia, ISSN 1692-0694. Noviembre de 2005 DOCUMENTO 38-112005.

(9) LaGrega, M; et al. Gestión de Residuos Tóxicos. Tratamiento, eliminación y recuperación de suelos. Volumen II. Mc Graw Hill. España. 1996.

(10) Castro, M. L; Gonzáles, F. D. Eficiencia de la Biodegradación de Cianuro por un consorcio microbiano aislado de aguas superficiales de quebradas que alimentan el río Llaucano". Universidad Pedro Ruiz Gallo. Peru. 2002.

(11) American Water Works Association, American Public Health Association, Water Pollution Control Federation. Métodos Normalizados para el Análisis de Aguas potables y Residuales. 19th edición. Ediciones Díaz De Santos. España, 1992.

(12) Voget, C. Conservación de cultivos para la biotecnología y la industria, cátedras. Química.unlp.edu.ar. Curso CABBIO, 2005. Consultado el: 15 junio 2010. Disponible en: <http://catedras.quimica.unlp.edu.ar/ingenieriabioquimicaIyII/metconsmicro.ppt>.

(13) Zamora, L. M. Aislamiento, identificación y conservación de cultivos lácticos. Tesis Doctoral, Universidad de Girona. España, 2003.

(14) Restrepo, et al. Degradación Microbiana de Cianuro procedente de plantas de Beneficio de oro, mediante una cepa nativa de *P. fluorescens*. Universidad Nacional de Colombia. Instituto de Minerales, Universidad de Antioquia. Maestría en Ingeniería Ambiental. Colombia. 2006.

(15) Eckenfelder, Wesley. Industrial water pollution control. USA. Mc Graw Hill. 2000.

(16) Logsdon, M. J; Kagelstein, K. y Mudder, T. I. El Manejo del Cianuro en la Extracción de Oro. Consejo Nacional de Metales y Medio Ambiente. USA 2001. Consultado el: 24 de marzo Disponible en: <http://www.aage.org.ar/manejodelcianuro.pdf>.

(17) Blanco, D; Rendueles, M. Reducción del impacto ambiental en el desarrollo de nuevos proyectos de minería de oro. Áreas Técnicas. 2001.

Consultado el: 25 de marzo 2009. Disponible en:
<http://www.unizar.es/aeipro/finder/MEDIO%20AMBIENTE>.

(18) Guerrero, J.J. Cianuro: Degradación Biológica. Perú 2003. Consultado el: 25 de marzo 2009. Disponible en:
<http://www.unt.edu/resource/02cyanidefeature.htm>.

(19) Logsdon, M. J. El manejo del cianuro en la extracción de oro.

Consultado: 22 de mayo del 2009. Disponible en:
<http://www.aage.org.ar/manejodelcianuro.pdf>.

(20) Guerrero, J. Cianuro: Toxicidad y Destrucción Biológica. Revista, El ingeniero de Minas. Año X, no 35. Perú 2003. Disponible en:
<http://www.unt.edu/resource/02cyanidefeature.htm>. Consultado el: 28 Octubre del 2009.

(21) Guerrero, J. Biodegradación del Cianuro. Congreso Nacional de Ciencias Ambientales, Universidad Nacional Federico Villareal, Perú, 2004.

(22) Microbiología Industrial. Selección, mantenimiento y mejoramiento de microorganismos de interés industrial. Capítulo 3. Biotechnology. Vol. 1. Microbial Fundamentals. Ed. H.J. Rehm, G. Reed, Verlag Chemie, 1981.

(23) Zamora, L. M. Aislamiento, identificación y conservación de cultivos lácticos. Tesis Doctoral, Universidad de Girona. España, 2003.

(24) García, M. D. y Uruburu, F. Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). Universidad de Valencia. 46100 Burjassot (Valencia). Disponible en:
<http://catedras.quimica.unlp.edu.ar/ingenieriabioquimicaIyII/seminario3.doc>. Consultado el 9 de febrero del 2010.

(25) Voget, C. Conservación de cultivos para la biotecnología y la industria, catedras.quimica.unlp.edu.ar. Curso CABBIO, 2005. Consultado: mayo 2009. Disponible en:
<http://catedras.quimica.unlp.edu.ar/ingenieriabioquimicaIyII/metconsmicro.ppt>.

(26) Freire, J.R. y Sato, M.L. Conservación de Cultivos de Rizobios. Revista Latinoamericana de Biología. Vol. 41, pag.34-41, año 1999.

(27). Fernández, A. General Information to Pharma 2. Modulo V, Liofilización: Un poco de historia. Consultado el: 13 junio 2010. Disponible en: http://personal.us.es/mfarevalo/recursos/tec_far/liofilizacion.pdf

- (28) García, M. D. y Uruburu, F. Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). Universidad de Valencia. 46100 Burjassot (Valencia). Consultado el 9 de febrero del 2010. Disponible en: <http://catedras.quimica.unlp.edu.ar/ingenieriabioquimicaIyII/seminario3.doc>
- (29) Microbiología Industrial. Selección, mantenimiento y mejoramiento de microorganismos de interés industrial. Capítulo 3. Biotechnology. Vol. 1. Microbial Fundamentals. Ed. H.J. Rehm, G. Reed, Verlag Chemie, 1981.
- (30) S. Borrego et al. Comportamiento de Tres Mutantes de micobacterias productoras de precursores esteroides conservadas por liofilización. Biotechnology Microbial Fundamentals. Ed. H.J. Rehm, G. 2001, Brasil 2001.
- (31) Sepúlveda, V; Velasco, T. Tecnologías de remediación para suelos contaminados. México: Instituto Nacional de Ecología, 2002. Consultado 28 de mayo de 2010. Disponible: <http://www2.ine.gob.mx/publicaciones/libros/372/tecnomexico.html>.
- (32) Tchobanoglous, G; y Burton, F. 1995. Ingeniería de Aguas Residuales: Tratamiento, Vertido y Reutilización. Tercera Edición. Madrid McGraw Hill Interamericana de España S.A, España. 1012 p.
- (33) División de Protección al Ambiente Humano, Reglamento de Vertido y Reuso de Aguas Residuales, DECRETO, N° 33601-MINAE-MINSALUD, Ministerio de Salud, Costa Rica, 2007.

APENDICE 1

ANALISIS DE CONTROL DIARIO DURANTE LA OBTENCION DE LOS MICROORGSNISMOS Y SU ADAPTACION A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CIANURO.

Tabla 1. Parámetros físico químicos de algunas muestras de cianuro tratadas con microorganismos. OCTUBRE 2008.

Fecha	Muestra	pH	Temperatura	OD
08-10-08	Tina	10.17	26.5	0.54
10-10-08	Tina	10.22	26.9	2.35
15-10-08	Tina	10.27	22.1	4.61
23-10-08	Tina	10.15	24.2	2.66
28-10-08	Tina	10.18	25.0	2.54
08-10-08	Cola	9.67	24.5	0.56
10-10-08	Cola	9.75	25.1	2.08
15-10-08	Cola	9.74	22.7	4.44
23-10-08	Cola	9.81	24.4	2.31
28-10-08	Cola	9.88	25.2	2.23

Tabla 2. Parámetros físico químicos de algunas muestras de cianuro tratadas con microorganismos. FEBRERO 2009.

05-02-09	Tina	10.34	17.8	4.19
05-02-09	Coca	10.15	17.8	3.74
05-02-09	Control	10.42	18.4	3.78
07-02-09	Tina	9.82	18.9	3.76
07-02-09	Coca	10.02	18.9	3.50
12-02-09	Tina	10.28	18.1	4.02
12-02-09	Coca	9.83	18.1	4.02
16-02-09	Tina	10.01	22.1	4,03
16-02-09	Coca	9.80	22.0	3,70
24-02-09	Tina	9.65	22.7	3,68
24-02-09	Coca	9.80	22.8	5,54
28-02-09	Tina	9,80	22,7	3,89
Nuevo Montaje				
26-02-09	Tina	10.30	21.9	4.17
26-02-09	Coca	10.20	21.9	3.80
27-02-09	Tina	9.63	21.8	2.30
27-02-09	Coca	9.39	21.7	2.38

Tabla 3. Parámetros físico químicos de algunas muestras de cianuro tratadas con microorganismos. MARZO 2009

Fecha	Muestra	pH	Temperatura	OD
02-03-09	Coca	9.42	20.6	2.4
	Tina	9.62	20.5	2.32
	Coca 2 conc	9.94	20.3	2.30
	Tina	9.56	21.0	2.28
	Coca	9.33	21.7	2.42
05-03-09	Coca	9.33	19.8	2.29
	Tina	9.57	20.1	2.18
	Coca 2 conc	9.83	19.4	2.37
06-03-09	Tina	9.61	21.4	2.10
	Coca	9.38	21.0	2.27
	Coca 2 conc	9.78	21.0	2.28
08-03-09	Tina	9.60	20.4	2.00
	Coca	9.38	20.0	2.20
	Coca 2 conc	9.80	20.0	2.21
10-03-09	Tina	9.62	22.5	2.02
	Coca	9.26	22.3	1.58
	Coca 2 conc	9.63	21.6	2.40
11-03-09	Tina	9.41	22.7	2.22
	Coca	9.19	22.4	2.18
	Coca 2 conc	9.38	21.8	2.25
12-03-09	Tina	9.43	22.6	2.20
	Coca	9.20	22.4	2.00
	Coca 2 conc	9.41	21.7	2.16
17-03-09	Tina	9.34	21.8	2.53
	Coca	9.23	21.6	2.17
	Coca 2 conc	9.36	21.8	2.38
18-03-09	Tina	9.30	21.5	2.48
	Coca	9.20	21.2	2.10
	Coca 2 conc	9.28	21.5	2.20
18-03-09	Tina	9.37	19.8	2.33
	Coca	9.32	19.7	2.19
	Coca 2 conc	9.40	20.1	2.18
26-03-09	Tina	9.31	20.8	2.6
	Coca	9.26	20.5	3.1
	Coca 2 Conc	9.35	20.8	2.7
30-03-09	Tina	9.28	21.8	2.50

Tabla 4. Parámetros físico químicos de algunas muestras de cianuro tratadas con microorganismos. ABRIL 2009

Fecha	Muestra	pH	Temperatura	OD
01-04-09	Tina	9.25	23.8	2.51
	Coca	9.28	23.9	2.60
	Coca 2 Conc	9.30	23.8	2.50
02-04-09	Tina	8.94	23.2	2.76
	Coca 2 Conc	9.00	23.1	2.57
	Coca	8.90	23.1	2.55
	Cubeta	9.95	22.9	2.76
03-04-09	Tina	8.97	24.6	2.68
	Coca 2 Conc	8.84	24.5	2.63
	Coca	8.89	24.7	2.41
	Cubeta	9.68	24.2	2.82
13-04-09	Tina	9.10	21.2	2.7
	Coca 2 Conc	8.98	23.0	2.5
	Coca	9.06	22.8	2.49
	Cubeta	8.45	23.2	2.70
16-04-09	Coca	9.07	21.9	3.14
	Tina	9.13	22.0	3.68
	Cubeta	8.68	22.4	2.70
	Coca 2 conc	9.15	22.2	3.13
17-04-09	Coca	9.00	23.2	3.58
	Tina	9.19	23.1	2.56
	Cubeta	8.60	23.0	3.13
	Coca 2 conc	9.10	23.0	3.65
23-04-09	Coca	8.45	21.9	3.13
	Tina	8.50	22.1	3.58
	Coca 2 conc	8.55	21.9	2.70
	Cubeta	8.39	21.5	2.98
30-04-09	Coca	8.27	21.3	4.27
	Tina	8.31	21.4	4.19
	Coca 2 conc	8.33	21.6	2.68
	Cubeta	8.46	21.2	3.39
	Extracto de cubeta Azul	8.16	21.2	0.18

Tabla 5. Parámetros físico químicos de algunas muestras de cianuro tratadas con microorganismos. MAYO, JUNIO Y JULIO 2009.

Fecha	Muestra	pH	Temperatura	OD
13-05-09	Cubeta azul	9.37	23.3	1.27
	Cubeta Blanca	9.37	23.7	0.52
28-05-09	Cubeta Azul montado (Ω) 21-05-09	9.50	23.3	
28-05-09	Cubeta Blanca (Ω) 21-05-09	9.60	23.2	
02-06-09 2 día	Tina Roja 2 Réplica	9.80	24.4	3.20
04-06-09 3 día	Tina Roja 2 Réplica	9.36	24.0	3.00
18-06-09	Tina Roja medio lactosado	9.87	24.1	3.60
21- 06-09	Tina con Gelatina (GE)	10.03	25.2	2.79
02-07-09	Cubeta azul 1 Réplica	10.19	24.1	3.47
08-07-09	Cubeta azul 1 Réplica	10.10	23.0	3.26
15-07-09	Cubeta azul 1 Réplica	10.00	23.5	3.40
25-07-09	Cubeta azul 1 Réplica	9.84	2.31	3.38

Tabla 6. Parámetros físico químicos de algunas muestras de cianuro tratadas con microorganismos. SETIEMBRE 2009

Fecha	Muestra	pH	Temperatura	OD
10-09-09	Líquido de 28/05→25/06	9.09	23.5	4.82
11-09-09	Líquido de 28/05→25/06	9.05	24.6	4.82
14-09-09	Líquido de 28/05→25/06	9.04	24.7	4.80
16-09-09	Líquido de 28/05→25/06	9.06	24.4	0.20
17-09-09	Líquido de 28/05→25/06	9.07	24.5	0.18
22-09-09	Líquido de 28/05→25/06 Resembrado 17-09-09	9.22	23.7	2.18
23-09-09	Líquido de 28/05→25/06 Resembrado 17-09-09	9.18	23.0	1.85
25-09-09	Líquido de 28/05→25/06 Resembrado 17-09-09	9.20	23.1	2.01
29-09-09	Líquido de 28/05→25/06 Resembrado 17-09-09	9.18	23.2	2.00
11-09-09	Tina (Precipitado 28/05 →25/06)	8.86	24.2	4.95
14-09-09	Tina (Precipitado 28/05 →25/06)	8.98	24.3	4.90
16-09-09	Tina (Precipitado 28/05 →25/06)	8.95	23.6	0.19
17-09-09	Tina (Precipitado 28/05 →25/06)	8.95	23.9	1.37
22-09-09	Tina	9.35	23.6	2.50

	(Precipitado 28/05 →25/06			
23-09-09	Tina (Precipitado 28/05 →25/06	9.39	22.0	3.81
25-09-09	Tina (Precipitado 28/05 →25/06	9.32	22.1	3.20
29-09-09	Tina (Precipitado 28/05 →25/06	9.30	22.2	3.10

TABLA 7. DIFERENTES GENERACIONES DE MICROORGANISMOS ADAPTADOS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CIANURO. SETIEMBRE 2009

Fecha	Muestra	pH	Temperatura	OD
24-09-09	28-05 →25-06 Montado: 10-09-09	9.16	24.0	1.73
24-09-09	Pp 28-05 →25-06 Primera generación Resembrado 24-09-09 segunda generación (pp)	9.34	23.9	2.78
24-09-09	Tercera generación 28-05 →25-06 (pp) Resembrado: 24-09-09	9.28	23.8	2.14
24-09-09	Segunda generación 28-05 →25-06 (pp) montado el 17-09-09 balde negro	9.03	23.4	2.20
24-09-09	Pp			

	28-05 →25-06 Primera generación montado 10-09-09 Tina Roja	9.34	23.3	2.25
--	---	------	------	------

TABLA 8. SEGUNDA GENERACION DE MICROORGANISMOS ADAPTADOS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CIANURO. OCTUBRE 2009

05-10-09	Tina (Precipitado 28/05 →25/06)	9.20	22.9	2.95
08-10-09	Tina (Precipitado 28/05 →25/06)	9.53	23.3	2.95
05-10-09	Liquido de 28/05→25/06 Resembrado 17-09-09	9.28	24.1	2.10
10-10-09	Tina (Precipitado 28/05 →25/06)	9.60	23.6	5.06
05-10-09	Segunda generación de tina Roja 28/05 →25/06 pp montado el 17/09/09	9.30	22.9	2.15
06-10-09	Segunda generación de tina Roja 28/05 →25/06 pp montado el 17/09/09	9.25	23.1	2.20
08-10-09	Segunda generación de tina Roja 28/05 →25/06 pp montado el 17/09/09	9.10	22.5	2.20

TABLA 9. TERCERA GENERACIONES DE MICROORGANISMOS ADAPTADOS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CIANURO. OCTUBRE 2010

02-10-09	Montaje del 01-10-09	9.26	23.6	2.03
05-10-09	Montaje del 01-10-09	9.20	24.1	1.98
07-10-09	Montaje del 01-10-09	9.18	23.3	2.00
08-10-09	Montaje del 01-10-09	9.41	22.4	1.99
15-10-09	28-05 →25-06 Líquido montado 10-09-09	9.31	23.7	1.81
15-10-09	Pp 28-05 →25-06 Tercera generación resembrada 24-09-09	9.29	23.9	2.44
15-10-09	Tercera generación 28-05 →25-06 Pp 24-09-09	9.30	23.8	1.82
15-10-09	Pp segunda generación 28-05 →25-06 Montado 01-10-09 tercera generación	9.17	23.6	2.27
15-10-09	PP 28-05 →25-06 Tercera generación montado 10-09-09	9.53	22.7	2.39
22-10-09	Resembrada 24-09-09 pp 28-05 →25-06 Tercera generación (25-05 pp)	9.51	24.5	0.36
22-10-09	24-09-09 Tercera generación pp 28-05 →25-06	9.45	23.5	0.20

22-10-09	Montado 01-10-09 (pp) 2 A generación Tercera generación de 28-05 →25-06	9.39	24.0	1.39
24-10-09	Pp 28-05 →25-06 Primera generación Tercera montada 10-09-09	9.81	22.3	1.71
10-12-09	17-09-09 28-05 →25-06 Líquido Montado: 10- 09-09	9.84	22.9	1,78
10-12-09	Pp 2ª montado: 01-10-09 23-10-09 Generación 28- 05 →25-06 Tercera generación	9.68	23.0	1,60
10-12-09	Tercera generación	9.82	21.6	1,70
10-12-09	Precipitado 13/08 →03/09 Tercera generación	9.72	22.5	1,67
23-12- 09	Precipitado 13/08 →03/09 Tercera generación	8.6	22.7	1,54