



UNIVERSIDAD POPULAR AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE PUEBLA

DECANATO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA Y
FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL

*Pruebas de biodegradabilidad de relaves mineros producto de
la cianuración en la extracción de Au y Ag*

Trabajo de tesis, para obtener el Título de:
Ingeniero Ambiental e Ingeniero en Biotecnología, presentan:

*Karla Itzel Ortiz Sayavedra
Acela Tejeda Gil*

Directora:

Dra. Genoveva Rosano Ortega

Co-Director:

*Dra. María Elena Raynal Gutiérrez
Dra. Sofía Esperanza Garrido Hoyos*

Puebla, Pue., México Abril de 2018





UPAEP – Secretaría General

Dirección General de Apoyos Académicos

Dirección del Centro de Recursos para el Aprendizaje y la Investigación.

Biblioteca Central - **Karol Wojtyla**

Tesis Digitales Restricciones de uso:

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de textos, imágenes, gráficas, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente de donde la obtuvo mencionando el autor o autores involucrados en el documento.

Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Expresamos nuestro agradecimiento a la Doctora e Investigadora **Genoveva Rosano Ortega**, la directora de esta tesis; por su dedicación y apoyo incansable a lo largo de este proyecto, sin ello la consolidación y culminación de éste no se hubiera logrado. Gracias por la confianza ofrecida desde que llegamos a esta facultad, por el tiempo y su amistad.

Asimismo reconocemos a las co-directoras la **Dra. Sofía Esperanza Garrido Hoyos** y la **Dra. María Elena Raynal** por tener la amabilidad de facilitarnos su conocimiento y compartirnos su vasta experiencia en el campo de la investigación, por todos los recursos, el tiempo invertido y además siempre permanecer al pendiente del desarrollo y status del proyecto. De la misma manera se agradece al **Dr. Elie Girgis El Kassis** por su orientación, guía y atención a todas nuestras consultas referentes a biología molecular y purificación de muestras, por su apoyo en laboratorios y su mentoría.

A todos ustedes, muchas gracias por los consejos, las enseñanzas y las habilidades que nos brindaron para mejorar en nuestra vida profesional.

Gracias a **nuestros amigos**; un trabajo de investigación es también fruto del reconocimiento y del apoyo vital que nos ofrecen las personas que nos estiman, sin los cuales no tendríamos la fuerza y energía que nos anima a crecer como personas y como profesionales. Gracias por su compañía, por estar con nosotros en laboratorios, presentaciones y momentos decisivos; por estos años de universidad de los cuales nos llevamos momentos inolvidables, miles de sonrisas y principalmente, su amistad y cariño.

Pero, sobre todo infinitas gracias a nuestros **padres**, por su paciencia, comprensión y solidaridad con este proyecto, por el tiempo que nos han concedido, un tiempo robado a la historia familiar. Gracias por todo lo que no han dado, por las oportunidades que no brindan, por no dejarnos y por darnos siempre el aliento necesario para concluir esta etapa. Sin su apoyo este trabajo nunca se habría escrito y, por eso, este trabajo es también el suyo.



H. Puebla de Zaragoza, a 09 de abril de 2018

**Asunto: Liberación de tesis
que para obtener el título de Ingeniería Ambiental**

A QUIEN CORRESPONDA:

Por este conducto me permito informar a ustedes que la **tesis de Licenciatura en Ingeniería Ambiental** de la **C. Karla Itzel Ortiz Sayavedra con ID 94096**, respectivamente, titulada "*Pruebas de biodegradabilidad de relaves mineros producto del uso de cianuración en la extracción de Au y Ag*", bajo mi dirección **está terminada y cumple con los requisitos necesarios para obtener el grado de Ing. en Ambiental**. Por lo anterior, espero que puedan presentar su examen profesional de licenciatura a la brevedad posible.

En espera de su respuesta, reciba mis más altas y distinguidas consideraciones.

ATENTAMENTE

Dra. en C. Genoveva Rosano Ortega

Catedrática-Investigadora SNI,
Directora de la Facultad de Ing. Ambiental
Decanato de Ciencias Biológicas
Tel. (222) 2 29 94 00 Ext. 7963.
E-mail: genoveva.rosano@upaep.mx

c.c.p. Interesada.
Mtra. Laura Contreras Mioni, Decana de Ciencias Biológicas

Decanato de Ciencias Biológicas
Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla
21 Sur 1103 Col. Santiago CP 72160 Puebla, Pue, México
Telf. (52)-(222) 2299400



H. Puebla de Zaragoza, a 09 de abril de 2018

**Asunto: Liberación de tesis
que para obtener el título de Ingeniería en Biotecnología**

Dra. Beatriz Pérez Armendáriz

Directora de la Facultad de Ing. Biotecnología

Presente:

Por este conducto me permito informar a ustedes que la **tesis de Licenciatura en Ingeniería en Biotecnología** de la **C. Acela Tejeda Gil con ID 7512**, respectivamente, titulada "*Pruebas de biodegradabilidad de relaves mineros producto del uso de cianuración en la extracción de Au y Ag*", bajo mi dirección **está terminada y cumple con los requisitos necesarios para obtener el grado de Ing. en Biotecnología**. Por lo anterior, espero que puedan presentar su examen profesional de licenciatura a la brevedad posible.

En espera de su respuesta, reciba mis más altas y distinguidas consideraciones.

ATENTAMENTE

Dra. en C. Genoveva Rosano Ortega

Catedrática-Investigadora SNI,
Directora de la Facultad de Ing. Ambiental
Decanato de Ciencias Biológicas
Tel. (222) 2 29 94 00 Ext. 7963.
E-mail: genoveva.rosano@upaep.mx

c.c.p. Interesada.

Mtra. Laura Contreras Mioni, Decana de Ciencias Biológicas

Decanato de Ciencias Biológicas
Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla
21 Sur 1103 Col. Santiago CP 72160 Puebla, Pue, México
Telf. (52)-(222) 2299400

RESUMEN

Comentario [Office1]: Reescribir cuando el documento este terminado con nuevos insights

La industria minera es una actividad base para el desarrollo y equilibrio de la economía mundial. México, es un país de gran potencial minero gracias a sus características geográficas y edafológicas; en 2013, ocupó el octavo lugar en el mercado internacional como exportador de oro. La extracción de metales preciosos utiliza en la mayoría de los casos el método de cianuración, que implica severos impactos al ambiente como a la salud humana, donde concentraciones de 0.05 a 0.3 mg/dL en sangre generan desde efectos tóxicos hasta la muerte. Es por ello que las zonas mineras del país han presentado un alto impacto, por los relaves del proceso que llegan a presentar concentraciones de 100 a 500 mg/L de cianuros y un pH de 10 que evita la volatilización de estos. En el presente trabajo de investigación se van a realizar pruebas de biodegradabilidad a escala laboratorio del efluente del tratamiento primario por oxidación avanzada con concentraciones entre 0.8 y 1.4 mg/L y en condiciones originales de los relaves mineros producto del método de cianuración utilizado en la extracción de Au y Ag, a través del uso de microorganismos nativos capaces de degradar cianuro, bajo condiciones aeróbicas para mejorar la calidad de los efluentes tratados al alcanzar concentraciones menores a 2 mg/L de CN⁻ cumpliendo así con los valores establecidos por la normatividad aplicable (NOM-001-SEMARNAT-1996), en conjunto con la validación y complemento de la técnica de ozonación que se está desarrollando en UPAEP, con la finalidad de establecer las bases de un tratamiento de bajo impacto ambiental.

Palabras clave: biodegradabilidad, relave minero, cianuro, ozonación, oro.

ABSTRACT

Comentario [Office2]: Volver a traducir cuando el resumen este terminado

The mining industry is the basis activity for the balance and development of the world's economy. Mexico is a country of great mining potential due to its geographical and soil characteristics; in 2013, it ranked eighth in the international market as a gold exporter. Precious metals extraction used in most cases the cyanidation method, which implies serious impacts on the environment and so human health, where concentrations of 0.5 to 0.3 mg/dL in blood generate from toxic effects even death. That's why mining areas of the country have presented a dramatic impact in cause of the mining tailings that present concentrations from 100 to 500 mg/L of cyanide and a 10 pH scale which avoids the volatilization of these. This investigation research pretends to execute biodegradability tests on a laboratory scale of the primary effluent result of the advanced oxidation treatment that presents concentrations between 0.8 y 1.4 mg/L and the original, product of the cyanidation method that is used in the extraction of Au and Ag, through the use of native and no native microorganisms, capable of degrading cyanide to improve the quality of treated effluent reaching concentrations below 3 mg / L CN- thus complying with the established values in the applicable normativity (NOM-001-SEMARNAT-1996) altogether Validating and complementing the ozonation technique that has been developing at UPAEP, in order to establish the basis for a low environmental impact treatment.

Key Words: biodegradability, mining tailings, cyanide, ozonation, gold.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	vi
ABSTRACT	vii
ÍNDICE GENERAL	viii
ÍNDICE DE TABLAS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
INTRODUCCIÓN	xiii
1. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES.....	1
1.1. La minería	1
1.2. La minería en el mundo.....	1
1.3. La minería en México	2
1.4. Proceso de cianuración.....	2
1.5. Relaves mineros	4
1.6. Almacenamiento de relaves en presas.....	5
1.7. Causas de los fallos en las presas de relaves.....	6
1.8. Impacto ambiental de la actividad minera.....	9
1.9. Impacto del cianuro	11
1.9.1. Organismos y animales marinos	12
1.9.2. Aves	12
1.9.3. Mamíferos	12
1.9.4. Efectos en la salud humana.....	13
1.10. Tratamiento de efluentes contaminados por cianuro.....	15
1.10.1. Tratamientos químicos.....	15
1.10.1.1. INCO Dióxido de azufre/Aire	16
1.10.1.2. Peróxido de hidrógeno	16
1.10.1.3. Ácido de Caro.....	16
1.10.1.4. Cloración alcalina.....	16
1.10.1.5. Precipitación de complejos Hierro-Cianuro	17
1.10.2. Tratamientos biológicos.....	17
1.10.3. Contraste de tratamientos	20
1.10.4. Pruebas de biotratabilidad	20
1.10.5. Análisis molecular.....	21
1.10.7. Reacción de la polimerasa en cadena.....	22
1.10.8. Etapas de la PCR.....	23

2. MARCO CONTEXTUAL	25
2.1. Endeavour Silver Corp	25
2.2. Proceso de flotación	26
2.3. Marco legal	27
2.4. Situación actual del problema	28
3. JUSTIFICACIÓN	30
4. HIPÓTESIS	32
5. OBJETIVO GENERAL	33
6. OBJETIVOS PARTICULARES	33
7. ALCANCES Y LIMITACIONES	34
8. METODOLOGÍA	35
8.1. Muestreo	35
8.2. Preparación de soluciones	37
8.3. Obtención del inóculo	39
8.3.1. Pruebas preliminares	41
8.4. Pruebas de biodegradabilidad	41
8.4.1. Monitoreo de densidad óptica	42
8.4.2. Monitoreo de pH	42
8.4.3. Monitoreo de oxígeno disuelto	43
8.4.4. Monitoreo de cianuros libres	43
8.4.5. Monitoreo de NH ₃	43
8.5. Identificación de bacterias	44
8.5.1. Extracción de ADN	44
8.5.2. Electroforesis en gel	46
8.5.3. PCR punto final	47
8.5.4. Cebadores utilizados y condiciones PCR	47
9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
9.1. Parámetros Monitoreados	51
9.1.1. Oxígeno disuelto	51
9.1.2. Potencial de Hidrógeno (pH)	53
9.1.3. Densidad Óptica	55
9.1.4. Correlación entre cianuro y amoníaco	57
9.2. Análisis molecular	61
10. CONCLUSIÓN	63

BIBLIOGRAFÍA.....	64
ANEXOS	73
Anexo 1. Gráficos	73
Anexo 2. Plan de muestreo suelo	77

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ejemplos de fallas en presas de relaves	8
Tabla 2. Contraste de efectos agudos y crónicos ante la exposición de cianuro.....	14
Tabla 3. Guía de selección para los procesos de tratamiento de cianuro.....	16
Tabla 4. Comparación de reportes en la biorremediación de cianuros	18
Tabla 5. Marco Legal aplicable.....	27
Tabla 6. Registro de los puntos de muestreo para Río Atoyac y Presa Manuel Ávila Camacho	37
Tabla 7. Solución Peptonada Isotónica Estéril (SPIE)SPIE	38
Tabla 8. Solución Buffer-Fosfato (PBS por sus siglas en inglés Phosphate Buffered Saline)	38
Tabla 9. Medio Mineral o Medio Mínimo	38
Tabla 10. Solución Ajustadora de Fuerza Iónica (ISA)	39
Tabla 11. Buffer Tris-acetato-EDTA (TAE) 1X.....	39
Tabla 12. Preparación del inóculo para su conservación	41
Tabla 13. Puntos para curva de calibración de CN^-	43
Tabla 14. Puntos para curva de calibración de NH_3	44
Tabla 15. Selección de muestras para análisis molecular	46
Tabla 16. Preparación de indicador molecular.....	46
Tabla 17. Cantidades a considerar para preparación de muestras a correr en el gel.....	46
Tabla 18. Componentes usados en la reacción PCR.....	47
Tabla 19. Descripción detallada de la mezcla de sets de cebadores para programa para Gammaproteobacterias (Gamma359f + Gamma871r)	47
Tabla 20. Condiciones de PCR para Gammaproteobacterias.	48
Tabla 21. Descripción detallada de la mezcla de sets de cebadores para programa para Alfaproteobacteria (Alf28f + Alf684r)	48
Tabla 22. Condiciones de PCR para Alfaproteobacterias.....	48
Tabla 23. Descripción detallada de la mezcla de sets de cebadores para programa PCR de Actinobacterias (Act664f + Act941r)	49
Tabla 24. Condiciones de PCR para Actinobacteria.....	49
Tabla 25. Descripción detallada de la mezcla de sets de cebadores para programa PCR de Bacilli (BacF + 1378R)	49
Tabla 26. Condiciones de PCR para Bacilli.....	50
Tabla 27. Códigos utilizados de referencia para	51
Tabla 28. Orden de las muestras inyectadas en los geles de agarosa, para referencia de las figuras siguientes.	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama del proceso general de lixiviación	4
Figura 2. Ilustraciones esquemáticas de los métodos de elevación en presas de relaves	6
Figura 3. Cuadro que muestra la relación de la actividad minera y su impacto	9
Figura 4. Ejemplo de las dimensiones de una presa de jales en México	11
Figura 5. Clasificación de los cianuros totales	15
Figura 6. Mapa de México señalando las 3 minas con proyección de crecimiento.....	25
Figura 7. Localización general del proyecto El Cubo	26
Figura 8. Diagrama del proceso general de lixiviación	27
Figura 9. Vista satelital Mina El Cubo, Endeavor Silver Corp.....	36
Figura 10. Geolocalización de los puntos de muestreo del Río Atoyac- Presa Manuel Ávila Camacho, Edo. De Puebla.	37
Figura 11. Ejemplo de bioreactor elaborado y utilizado en las pruebas de biodegradabilidad. ..	42
Figura 12. Kit de extracción de ADN utilizado en el experimento (QIAGEN)	44
Figura 13. Mediciones diarias de oxígeno disuelto para los reactores a 10 ppm de CN^-	52
Figura 14. Mediciones diarias de oxígeno disuelto para los reactores a 20 ppm de CN^-	52
Figura 15. Mediciones diarias de pH para los reactores a 10 ppm de CN^-	54
Figura 16. Mediciones diarias de pH para los reactores a 10 ppm de CN^-	54
Figura 17. Mediciones diarias de densidad óptica para los reactores a 10 ppm de CN^-	56
Figura 18. Mediciones diarias de densidad óptica para los reactores a 10 ppm de CN^-	56
Figura 19. Mediciones diarias de la degradación de cianuro en los reactores a 10 ppm.....	57
Figura 20. Mediciones diarias de la degradación de cianuro en los reactores a 20 ppm.....	58
Figura 21. Mediciones diarias de amoníaco para los reactores a 10 ppm de CN^-	58
Figura 22. Mediciones diarias de amoníaco para los reactores a 20 ppm de CN^-	59
Figura 23. Mediciones diarias de cianuro contra amoníaco a 10 ppm. Gráfico del matraz 1 seleccionado como el de mejores resultados y utilizado para el análisis molecular.....	60
Figura 24. Mediciones diarias de cianuro contra amoníaco a 20 ppm. Gráfico del matraz 2 seleccionado como el de mejores resultados y utilizado para el análisis molecular.....	60
Figura 25. Amplificación Gammaproteobacterias.....	61
Figura 26. Amplificación Alfaproteobacterias	62
Figura 27. Amplificación Actinobacterias.....	62
Figura 28. Amplificación Bacilli	62

INTRODUCCIÓN

La minería es considerada como una industria colosal desde la perspectiva de materiales que este sector remueve de la tierra (Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático [INECC], 2007). La demanda de metales preciosos en el mercado internacional coloca a la minería como una actividad económica primaria por excelencia debido al impacto social que provoca su efecto multiplicador en la economía de un territorio. Lamentablemente, a pesar de ser un sector de alto valor, las tecnologías de extracción de metales preciosos, son el campo de la minería con desarrollo más lento. Típicamente la obtención de los metales preciosos se lleva a cabo mediante procesos hidrometalúrgicos, debido a su simplicidad y bajo costo (Nava-Alonso, Elorza, Pérez-Garibay, & Uribe-Salas, 2007), a pesar del desarrollo de tratamientos alternativos como los pirometalúrgicos y electrometalúrgicos (Tetreault, 2012). La técnica más utilizada para la extracción de oro, es la cianuración; dicha técnica ha sido utilizada desde hace más de 100 años debido a su viabilidad económica (Logsdon, Hagelstein, & Mudder, 1999), consiste en la disolución de metales de un mineral molido, a través del uso de una solución acuosa de cianuro de sodio de 0.01% a 0.05% (Logsdon *et al.*, 1999; Nava-Alonso *et al.*, 2007); debido a que el cianuro es altamente reactivo y tóxico, se ha buscado su reemplazo con otras sustancias como el mercurio, lamentablemente, el uso de otras sustancias ha generado aún más problemas como afecciones en el sistema nervioso de trabajadores o mayores daños al ecosistema (Carrillo & Astudillo, 2011).

México se coloca como un país con gran importancia en el mercado internacional de los metales pesados al estar posicionado en primer plano en el contexto mundial por la riqueza de yacimientos minerales, en especial de oro y plata, la industria minera del país resalta debido a su papel fundamental, en el desarrollo económico de la nación (Parga & Carrillo, 1996). En 2017, México fue el mayor productor de plata del mundo (Secretaría de Economía, 2018) y ocupó el octavo lugar como productor de oro en 2016 (Cámara Minera de México [CAMIMEX], 2017). Las altas concentraciones de cianuro en los relaves mineros generados en la industria de extracción de metales preciosos como el oro y la plata, implican un impacto negativo ambiental y social en México debido a que los compuestos de cianuro tienen diferentes estabilidades y toxicidades (Nava-Alonso *et al.*, 2007).

La mayoría de los relaves en México no reciben un tratamiento antes de ser descargados en las presas de jales o cuerpos de agua, donde la concentración total de cianuro se encuentra en un rango de 100-500 mg/L, excediendo los límites máximos permisibles de la norma mexicana NOM-001-SEMARNAT-1996. Los métodos de tratamiento para efluentes cianurados varían desde la

degradación natural, oxidación química, precipitación y biodegradación (Logsdon *et al.*, 1999). Sin embargo dentro de los pocos casos de empresas que tratan los relaves antes de su descarga, la mayoría opta por la degradación natural, lo que implica que los relaves son conducidos a jales o presas, donde se evapora el cianuro y los gases se van a la atmósfera. Aunado a esto, existe el riesgo de accidentes en las presas de jales que llegan a generar escurrimientos y arrastre de residuos mineros peligrosos, siendo eventos devastadores que afectan la calidad del agua de mantos freáticos, así como de cuerpos receptores que albergan especies acuáticas y terrestres del ecosistema (INECC, 2007).

Dicha problemática ha llevado a la búsqueda de nuevos métodos de tratamiento, tratamientos de innovación pero que lamentablemente resultan ser costosos debido al alto consumo de reactantes, producen subproductos peligrosos, además de requerir mayor tiempo de tratamiento y espacio para infraestructura. La ozonización es una técnica novedosa e innovadora (Salinas, Rivera, Carrillo, Patiño, Hernández, J. & Hernández, L. E., 2004), que resalta frente a otros debido a su fácil instalación, operación y mantenimiento. De acuerdo a estudios realizados, la técnica de ozonización avanzada desarrollada en UPAEP, obtuvo resultados positivos alcanzando una remoción de cianuros en los relaves tratados del 99.3% (Ramírez, Rosano-Ortega, Garrido-Hoyos & Cruz-Juárez, 2015), desafortunadamente, dicho valor no se ubicó dentro del límite máximo permisible (3 mg/L) en embalses para uso en riego agrícola como lo establece la NOM-001-SEMARNAT-1996. Así, surge la necesidad de la adaptación de un método terciario de tratamiento, los cuales usualmente son de carácter biológico, buscando reducir la dosis de O₃ así como el consumo de energía, consiguiendo con esto, costos más accesibles y tratamientos de remoción más eficientes. Este trabajo pretende determinar con precisión el potencial de biodegradación de los microorganismos seleccionados en diferentes condiciones mediante pruebas de biodegradabilidad, con el propósito de disminuir la concentración de cianuro, a valores donde el tratamiento biológico pueda realizar un desempeño significativo. Para ello se cuenta con estudios previamente realizados como es el caso de éxito de la mina “*Former Homestake Gold Mine*” en Dakota del Sur, donde en los años ochenta se implementó un proceso de tratamiento biológico por parte de *Pseudomonas paucimobilis*, en donde la concentración del cianuro en el agua residual era de 4.2 mg/L y al final del proceso se llegaba a un

valor de 0.06 mg/L (Thomas, 1993).

1. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES

1.1. La minería

La minería constituye una actividad económica primaria por excelencia debido al impacto social que provoca su efecto multiplicador en la economía de un territorio. Además de ser representada por la exploración, explotación y beneficio de minerales de la corteza terrestre en forma de yacimientos; ésta actividad es realizada en zonas con características geológicas específicas (Ley Minera DOF 11.08.14).

En términos prácticos la actividad minera se define con base a 3 conceptos: exploración, explotación y beneficio; las obras realizadas en el terreno con el objetivo de identificar, desprender y extraer productos minerales de los depósitos, así como cuantificar y evaluar las reservas económicamente aprovechables que contengan (Ley Minera DOF 11.08.14).

1.2. La minería en el mundo

Históricamente, se puede decir que la minería comenzó alrededor de 5000 años antes de Cristo, donde se conocen los primeros intentos de extracción de cobre. Pero fue hasta el imperio Romano que se formalizó la actividad minera, donde los metales preciosos como el oro alcanzaron cifras de producción sorprendentes para la época. Sin embargo, durante los siglos subsecuentes, el avance tecnológico se perdió. El desarrollo minero no tuvo lugar hasta el año 1500 en el continente Europeo donde los metales tuvieron un auge (Griem, 2017). La minería no presentó ningún avance significativo durante los siglos siguientes. Fue hasta finales del siglo XX donde esta industria atravesó por un rediseño, logrando desarrollarse a causa del crecimiento de la economía mundial (Sánchez-Albavera & Lardé, 2006).

La creciente demanda global de metales y el incremento a largo plazo de los precios del mercado mundial, ha llamado la atención de diversos países que buscan una mejor posición en la economía global. Los países que presentan las características necesarias para la obtención de metales, dependen en primera instancia de la localización geográfica de sus depósitos, la calidad de los mismos y la situación política que vive en ese momento el país (Schaffartzik, Mayer, Eisenmenger, & Krausmann, 2016). Latinoamérica es un sector básico en la minería mundial, gracias a que cumple con las condiciones propicias para el desarrollo

de la industria minera. Los países con mayor influencia histórica sobre la minería en Latinoamérica son Bolivia, Chile y México (Sánchez-Albavera & Lardé, 2006).

1.3. La minería en México

La riqueza de los yacimientos minerales de México es uno de los aspectos de mayor influencia en la historia económica de la nación, puesto que lo ha posicionado en primer plano en el contexto mundial (Cámara Minera de México, 2017). En la actualidad la industria minera aporta 4% PIB nacional (Secretaría de Economía, 2018).

Desde su inicio las actividades extractivas mexicanas han estado sujetas a los intereses como al patrón de desarrollo de otras naciones (Coll-Hurtado, Sánchez-Salazar, & Morales, 2002). Desde la época del porfiriato la actividad minera en México a evolucionado de acuerdo a las necesidades de la época, por ejemplo en el año de 1823 se permitió la entrada de capitales extranjeros para el desarrollo de esta industria en nuestro país. Para 1992 la publicación de la Ley Minera termina de sentar las bases fundamentales así como regulaciones respectivas a la exploración, extracción y beneficio de la gran variedad de minerales (Coll-Hurtado *et al.*, 2002); Ley que actualmente ha sido reformada y su aplicación permanece vigente.

1.4. Proceso de cianuración

El proceso utilizado para extraer oro usando cianuro se desarrolló en Escocia en 1887 por John Seward MacArthur (Carroll, 2010), y fue utilizado por primera vez en 1889 en la minería a gran escala comercial por la Crown Mines Company en Karangahake, Nueva Zelanda (Eisler & Wiemeyer, 2004). El uso de soluciones a base de agua para extraer y recuperar metales como el oro se denomina hidrometalurgia. El cianuro, en forma de una solución de cianuro de sodio muy diluida, se utiliza para disolver y separar el oro del mineral. Desde este punto se considera la lixiviación con cianuro para ser una alternativa mucho más segura que la extracción con mercurio líquido, que anteriormente era el principal método de eliminación de oro del mineral. Por lo tanto, el cianuro de lixiviación ha sido la tecnología de extracción de oro dominante desde la década de 1970 (Eisler & Wiemeyer, 2004).

Para comprender el proceso de cianuración se debe entender que 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 partes por millón). Además, que el proceso de

disolución de metales se denomina lixiviación (Logsdon *et al.*, 1999). Existen dos enfoques generales para la lixiviación del oro de un mineral mediante el cianuro:

- La lixiviación en tanque: es el método por el cual el mineral aurífero se tritura y se muele hasta reducirlo a menos de un milímetro de diámetro. Finalmente, el mineral molido se lixivia directamente en tanques para disolver el oro en una solución de cianuro (Logsdon *et al.*, 1999).

La lixiviación en pila (por percolación): Con este método convencional, el mineral se tritura y se reduce a unos pocos centímetros de diámetro y se lo coloca en grandes pilas o montones. Una solución de cianuro se hace pasar lentamente a través de estas pilas para disolver el oro (Logsdon *et al.*, 1999).

Los pasos que sigue el proceso de la lixiviación en pila, se pueden sintetizar de la siguiente manera (Ortiz-Azañero, 2001):

1. Trituración del mineral y colocación de éste sobre una superficie impermeable, preparada para coleccionar las soluciones.
2. El cianuro de sodio se disuelve en agua y se esparce por aspersión sobre las pilas, el cianuro percola a través del lecho disolviendo los metales preciosos finamente diseminados.
3. La solución de lixiviación, enriquecida en oro y plata se colecta sobre el piso permeable que, dispuesto en forma ligeramente inclinada, la hace fluir hacia un pozo de almacenamiento.
4. La solución, después de haberse eliminado los finos y el oxígeno, pasa un tanque de agitación herméticamente cerrado en donde se le adiciona zinc en polvo, acetato de plomo y carbón activado cuya acción logrará la precipitación del oro y de esta forma se pueda extraer de la solución.
5. La solución residual o estéril puede recircularse para extraer más oro o dirigirse a un sistema de depósito de relaves.

Se debe tomar en cuenta que no todos los minerales de oro y plata son aptos para un tratamiento por cianuración. En cianuración en pila la roca huésped debe ser además porosa y permeable a la solución, a veces requiere aglomeración. Aun cuando un examen mineralógico pudiera indicar que un determinado mineral oro-plata es adecuado para ser cianurado en pila es necesario estudiar su comportamiento metalúrgico a través de un programa de pruebas de Laboratorio y Piloto (Ortiz-Azañero, 2001).

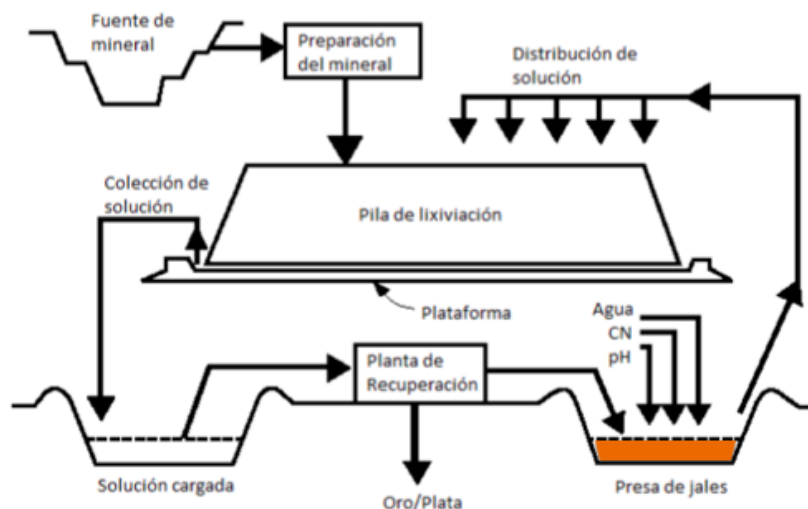


Figura 1. Diagrama del proceso general de lixiviación

Fuente: National Wildlife Health Center. 1999. Field Manual of Wildlife Diseases: Birds. Chapter 46 Cyanide. Imagen: Schematic of a typical heap leach system. pg. 341. Washington, D.C. Estados Unidos de América.

1.5. Relaves mineros

La palabra "relaves" es genérica, ya que describe el subproducto de varias industrias extractivas. Por tanto, los relaves son mezclas de rocas trituradas y fluidos de molinos, lavadores o concentradores que permanecen después de la extracción de metales preciosos, minerales, combustibles minerales o carbón de la mina.

Cabe destacar, que la relación de relaves a concentrado suele ser muy alta, generalmente alrededor de 200: 1 (Kossoff *et al.*, 2014). Esto expresa, que cuando el punto pico de producción de metales se supera, la extracción de mineral resulta en menor grado; convirtiéndose así en una tendencia establecida a largo plazo, que a su vez acarrea diversas dificultades directamente relacionadas a las presas que contienen y acotan a los relaves mineros.

Más aún, hay evidencia histórica que demuestra como los períodos de aumento de la demanda de los metales preciosos correlacionan con falla de la presa de los relaves que se produjo entre 24 y 36 meses (Davies & Martin, 2009). Por ejemplo, la extracción de oro promedio entre 1830 y 1900 fue de alrededor de 20 g/ton Au, pero este grado ha ido cayendo

constantemente desde entonces. Si se extrapola esta tendencia en el futuro, el grado podría caer a 2 g/ton en el año 2050 y tan sólo 0,7 g/ton para el año 2100 (Müller & Frimmel, 2010). Así, la tarea de almacenar relaves con seguridad y eficientemente es sustancial y crucial, así como significativa mayor en el futuro.

1.6. Almacenamiento de relaves en presas

Los métodos para el manejo y almacenamiento de relaves incluyen eliminación, eliminación submarina, retención de humedales, relleno, apilamiento en seco y almacenamiento detrás de represas (Kossoff *et al.*, 2014). El principal método empleado actualmente, especialmente por grandes empresas trasnacionales, es el último, con las estructuras producidas a menudo denominadas "estanques de relaves" o "presas de relaves", donde los relaves se almacenan normalmente con agua para prevenir la formación de polvo superficial y de drenaje ácido especialmente cuando están presentes cantidades de pirita generadora de ácido y de pirrotita. Inconvenientemente, el mantenimiento de un nivel de agua adecuado puede ser problemático, especialmente en las zonas áridas y semiáridas

Hay al menos 3500 de presas de relaves en todo el mundo (Davies & Martin, 2009) con dimensiones que van desde unas pocas hectáreas hasta algunos miles de hectáreas. Para tener una idea sobre el dimensionamiento de estas presas, un claro ejemplo es la represa de relaves de Cornelia en Arizona, considerada la mayor (en volumen) en los Estados Unidos, con una profundidad de 305 metros y un diámetro de 2,5 Km (Stefanov, 2002).

Las presas de relaves se construyen comúnmente a partir de materiales locales, en lugar del concreto utilizado, por ejemplo, en represas de retención de agua. Aunque el dique inicial es comúnmente hecho de suelo de origen local, residuos de roca e inclusive, a menudo también se utilizan los relaves para la construcción.

En muchos casos, en lugar de instalar inicialmente una capacidad completa finalizada la estructura, los terraplenes de retención intermedios son construidos para luego ir aumentándolos a medida que aumenta la demanda de almacenamiento (Kossoff *et al.*, 2014). Dichos terraplenes pueden ser levantados de forma ascendente, descendente o verticalmente (línea central).

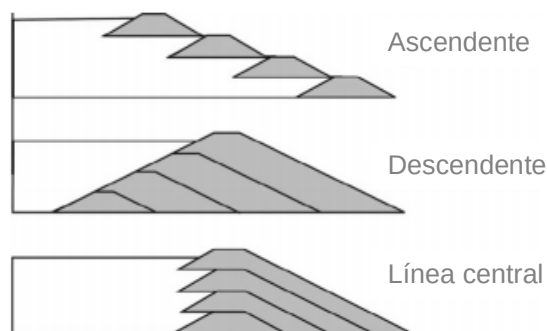


Figura 2. Ilustraciones esquemáticas de los métodos de elevación en presas de relaves

Fuente: Kossoff *et al.* 2014. Mine tailings dams: Characteristics, failure, environmental impacts, and remediation, Applied Geochemistry. pg. 233.

La elevación ascendente se logra mediante la colocación del nuevo material dentro de la represa existente, la elevación de la línea central se logra colocando material nuevo directamente encima de terraplenes, mientras que la subida descendente describe la elevación del terraplén colocando el nuevo material fuera del embalse. De estos tres métodos de construcción la elevación ascendente es la más barata, ya que requiere una cantidad menor de material.

Los relaves son normalmente bombeados desde el molino hasta el embalse como suspensión, por lo que su dispersión debe de ser de manera uniforme. Es una buena práctica colocar una serie de puntos de descarga de relaves alrededor del embalse y utilizarlos secuencialmente a fin de preservar la integridad estructural de los sucesivos aumentos de relave en la represa.

1.7. Causas de los fallos en las presas de relaves

Se ha recopilado información sobre los fallos de la presa de relaves y ejemplos clave de estos se resumen en la Tabla 1. Aunque los datos publicados son incuestionablemente valiosos, están incompletos, como incidentes más pequeños son muy comunes y no están suficientemente informados en la literatura científica y medios populares. También se piensa que muchos, si no la mayoría de los fallos no son reportados debido a temores de mala publicidad así como problemas legales particularmente en China y Rusia. Se ha estimado que la tasa actual de fallas en presas de relaves corresponde de dos a cinco por año (Davies &

Martin, 2009). Dado el número total de embalses de relaves actuales es c. 3500, la tasa de fracaso es de uno en 700 a uno en 1750. Esto es mucho más alto que el del fallo en represas de retención de agua, que aproximadamente es de uno de cada 10.000 (Davies & Martin, 2009). Los datos disponibles sugieren que los embalses activos en lugar de inactivos son más propensos a fracasar. Rico *et al.* (2008), de un extenso análisis de los datos de fallas en presas en la unión europea, concluyó que el 83% de los fallos ocurrieron cuando la presa aún se mantenía activa, el 15% ocurrieron en presas inactivas y abandonadas y sólo el 2% ocurrió en presas inactivas pero mantenidas.

Para los embalses inactivos el *overtopping*, ocasionado por la cementación de relaves, ha sido citado como el principal modo de falla en casi la mitad de los incidentes. Las causas del fracaso en las represas activas son más diversas que las de los embalses inactivos, pero se pueden extraer algunas conclusiones generales. Rico *et al.* (2008) clasifica los fracasos en once grandes grupos, tales como: fundación, inestabilidad de la pendiente, desbordamiento, hundimiento de la mina, lluvia inusual, derretimiento de la nieve, tuberías o filtraciones, licuefacción sísmica, causas estructurales y causas desconocidas. Hay una cierta superposición obvia entre varias de estas categorías y casi todos los grupos pueden tener causas múltiples como serían el mantenimiento inadecuado y fallo estructural. Sin embargo, Rico, Benito, Salgueiro, Díez-Herrero & Díez-Herrero (2008) informan que del 25% global de los fracasos se explican por fenómenos naturales extremos, una tasa que puede aumentar con el cambio climático.

Así mismo, las presas construidas de forma ascendente son las que tienen más probabilidades de fallar por licuación estática (pérdida de propiedades sólidas en respuesta a una tensión por lo que el material se comporte de manera líquida), de esta forma son consideradas estructuras imponentes para las cuales es de vital importancia buenas prácticas de diseño y administración si la integridad debe mantenerse. Otra causa frecuente de fallo del embalse de la presa, para los embalses activos, es el fracaso de la fundación. La permeabilidad de la fundación es una limitación vital para la estabilidad la propia estructura de la presa. Material de cimentación de baja permeabilidad tiende a elevar la presión de poros, comprometiendo la estructura haciéndola más vulnerable a fallos.

La integridad de las presas de relaves depende tanto del buen diseño de estas así como de un adecuado mantenimiento preventivo. La mayoría de los fallos están precedidos por señales de advertencia, excepto los provocados por fenómenos naturales. Los buenos

programas de gestión y mantenimiento son, por lo tanto, un requisito esencial para el vertido eficaz de relaves. La combinación de los datos en registros operativos debidamente actualizados (por ejemplo, fechas de registro, ubicaciones y condiciones meteorológicas en el momento de la disposición) permitirá una cuantificación confiable del riesgo, así como respuestas preventivas proactivas eficaces.

Tabla 1. Ejemplos de fallas en presas de relaves

Mina / ubicación y año) / material	Mineral extraído / material liberado	Volumen liberado de relaves m ³	Activa (A) / Inactiva (I)	Causa	Método de elevación de la presa	Fatalidades inmediatas
San Ildfonso, Potosí (Bolivia, 1626)	Sulfuro / Ag, Hg	Desconocido	A	Desconocida	Desconocido	≈ 4000
El Cobre Old Dam (Chile, 1965)	Cu	1.900.000	A	Ruptura por terremoto	Ascendente	>300
Church Rock (New Mexico, 1979)	U	400.000	A	Desconocida	Desconocido	Desconocida
Cerro Negro No. 4 (Chile, 1985)	Cu	2.000.000	A	Ruptura por terremoto	Ascendente	Desconocida
Jinduicheng (Provincia Shaanxi, China, 1988)	Mo	700.000	A	Overtopping / mal mantenimiento	Ascendente	≈ 20
Harmony, Merriespruit (Sudáfrica, 1994)	Au	600.000	I	Ruptura por lluvia intensa / mal mantenimiento	Ascendente	17
Stava (Norte de Italia, 1995)	Fluorita	190.000	A	Mal mantenimiento	Ascendente	≈ 250
Porco (Bolivia, 1996)	Sulfuro	400.000	A	Ruptura por lluvia intensa	Ascendente	Posibles 3 niños
Aznalcóllar (España, 1998)	Sulfuro	1.300.000	A	Fallo en la fundación / mal mantenimiento	Mixto	0
Baia Mare and Baia Borsa (Rumania, 2000)	Ag, Au / cyanide	Dos incidentes de 100.000	A	Ruptura por lluvia intensa y derretimiento de nieve	Ascendente	0
Kingston plant (Tennessee, USA, 2008)	Cenizas de carbón / 226Ra + 228Ra / As / Hg	4.100.00	A	Fallo en el muro de retención	Ascendente	0
Ajkai Timfoldgyar Zrt	Al / Álcali	6.000.000 - 7.000.000	A	Desconocida	Desconocido	10

Fuente: Kossoff *et al.* 2014. Mine tailings dams: Characteristics, failure, environmental impacts, and remediation, Applied Geochemistry. pg. 234.

1.8. Impacto ambiental de la actividad minera

Debido al desarrollo y modernización en los procesos de extracción y procesamiento de los recursos minerales, así como a la generación de grandes cantidades de residuos provenientes de sus procesos, la industria minera en México ha generado por décadas una gran cantidad de desechos y sitios contaminados a lo largo de todo el país.

FASE	DESCRIPCIÓN	IMPACTO AMBIENTAL
Exploración	Barrenación, obras y perforaciones	Dstrucción de vegetación
Explotación	Obras diversas: tiros, socavones, patios para depósito de minerales, zonas para descarga de materiales	Operación de presas de jales: arrastre de residuos peligrosos. Descarga de aguas residuales
Beneficio	Concentración Trituración y molienda Tratamientos previos	Generación de ruido Vibración y emisión de polvo
Fundición y refinación	Obtención de metales y sus aleaciones (uso de hornos industriales) Eliminación de impurezas en los metales para aumentar la ley de contenido	Emisiones a la atmósfera, residuos peligrosos y aguas residuales

Figura 3. Cuadro que muestra la relación de la actividad minera y su impacto

Fuente: Volke-Sepúlveda, T. & Velazco, J. A. (2002). *Tecnologías de remediación para suelos contaminados*. México, Ciudad de México. Instituto Nacional de Ecología (INE-SEMARNAT), 64 pp.

Para la evaluación del impacto ambiental del desarrollo de una operación minera se deben considerar los siguientes efectos:

Afectación al suelo. Los suelos expuestos pierden sus propiedades físicas, químicas y biológicas debido a la alteración de su estructura original. Esto, generado por la drástica modificación del relieve, la modificación de la dinámica de los procesos de

ladera, así como alteraciones en la horizonación (mezcla de horizontes), agravan los procesos de erosión, arrastre y sedimentación del suelo hasta ocasionar su infertilidad y subsecuentemente ocasionan la desertización parcial a total del área afectada. Así mismo, el régimen hídrico sufre variaciones significativas a causa de alteraciones en el nivel freático, y variaciones texturales así como estructurales. Más aún, los peligros geotécnicos implicados derivan a desestabilización de laderas por sobrecargas y/o excavaciones así como subsidencia por huecos principalmente por depresión en el nivel freático.

Contaminación del aire. Principalmente por emisiones sólidas, ruido y gases tóxicos procedentes de diversas fases del proceso de exploración, explotación y beneficio. Principalmente, la suspensión de polvos se asocia con enfermedades respiratorias, mientras que la mezcla de gases como SO_x , NO_x y CO_2 con el aire se asocia con la lluvia ácida. Derivando así, evidencia tangible en áreas circundantes a esta actividad principalmente en vegetación destruida por los ácidos, suelo estéril y erosionado.

Afectación de las aguas superficiales y subterráneas. La dinámica fluvial sufre alteraciones debido a variaciones antropogénicas del perfil y trazado de la corriente fluvial por excavaciones, diques y represas; aumentando así, el riesgo de inundación en temporada de lluvias por escurrimiento superficial en laderas. Más aún, la modificación del terreno ocasiona la pérdida de grandes masas de agua, conservándose porcentajes menores a los de la superficie original; así como también ocasiona alteraciones del régimen hidrogeológico que impacta directamente al nivel freático y al régimen de recarga modificando el flujo subterráneo por efectos barrera, drenajes inducidos, infiltración restringida/favorecida, compactación, modificación del relieve y deforestación.

Por si fuera poco, uno de los impactos significantes deriva en la contaminación que genera en cuerpos de agua, como lo son coloides en suspensión, especies en dilución como sustancias tóxicas y metales pesados que a su vez magnifican la dimensión del problema.

Aunado a esto, se agudiza el riesgo medioambiental ante un panorama que enfrenta construcciones deficientes de lagunas de oxidación, botaderos, presas de jales, entre otros; su inadecuado manejo y mantenimiento que claramente conducen a un punto de mayor impacto a lo que corresponde la contaminación del agua.

Impacto sobre la flora y fauna: implica la remoción total de la vegetación en el área de las operaciones mineras, así como una destrucción parcial o una modificación de la

flora en el área circunvecina, originando así pérdida de hábitat para especies nativas así como zonas naturales de recarga hídrica y secuestro de CO₂. Generando de esta manera presión sobre los ecosistemas inherentes al área, ocasionando la pérdida significativa de biodiversidad y su riqueza.

1.9. Impacto del cianuro

Una de las razones para el alto valor adjudicado al oro es su resistencia al ataque de la mayoría de los químicos. Una excepción es el cianuro o, más específicamente, una solución de elevada concentración de este elemento capaz de solubilizar el metal precioso. Convirtiendo así al cianuro como agente lixivador exclusivamente del oro por excelencia.

Al margen de sus indudables ventajas de alta recuperación, el cianuro es una sustancia química altamente tóxica, clasificada como uno de los principales contaminantes que puede tener un impacto catastrófico e irreversible en la salud humana como al medio ambiente y, por ende, en la diversidad biológica.

El efluente de una planta de recuperación de oro típicamente contiene entre 600 a 1000ppm de NaCN (González & Sahores, 2004), el cual es acumulado en balsas o presas de exorbitantes dimensiones (Figura 4) para su degradación natural. Sin embargo, a elevadas concentraciones la degradación puede durar semanas y aun meses, implicando un riesgo latente de posibles derrames, percolaciones a acuíferos cercanos y emanaciones de HCN gaseoso cerca de presas de jales, entre otros.



Figura 4. Ejemplo de las dimensiones de una presa de jales en México

Fuente: Presa de Jales (2015). Construcciones y Remodelación de Tierra Caliente S. A. de C. V. México. Recuperado el 8 de abril de 2016 de <http://construccionestierracaliente.com.mx/contacto.html>

1.9.1. Organismos y animales marinos

Los peces y los invertebrados marinos son especialmente sensibles a la exposición al cianuro. Evidencias manifiestan que 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. Por tanto, concentraciones de cianuro libre en el ambiente marino que oscilan entre 5,0 y 7,2 (Vaghn, 2011) microgramos por litro reducen la capacidad nadadora e inhiben la reproducción de muchas especies de peces. Otros efectos adversos pueden ser mortalidad retardada, desarrollo de patologías, respiración entrecortada, alteraciones osmo-regulatorias 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 veloz para la mayoría de las especies marinas (Vaghn, 2011). 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.

1.9.2. Aves

Al igual que las especies marinas, las aves también se ven afectadas al entrar en contacto directo con este contaminante. Las especies de aves con mayor grado de afectación son aquellas especies migrantes poniendo en riesgo su sobrevivencia en el futuro. El valor DL_{50} para las aves oscila entre 0,8 a 11,1 miligramos por kilo de peso (Vaghn, 2011). La mayoría de las especies más sensibles tuvieron alguno de los síntomas como 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 (Vaghn, 2011).

1.9.3. Mamíferos

Los efectos tóxicos del cianuro en los mamíferos son relativamente comunes debido a la vasta cantidad de plantas de forraje que consumen y que por tanto contienen cianuro. El valor DL_{50} para los mamíferos oscila entre 2,1 miligramos por kilo de peso y 6,0-10,0 miligramos por kilo de peso (Vaghn, 2011).

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, éste se excreta fácilmente. No se han encontrado evidencias acerca de la biomagnificación del cianuro en la cadena alimenticia (González & Sahores, 2004). Si bien la intoxicación crónica por cianuro existe, su incidencia 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, sin embargo los efectos observados en estudios en animales fueron similares a los observados en seres humanos (González & Sahores, 2004).

1.9.4. Efectos en la salud humana

El cianuro puede ingresar al cuerpo por inhalación, ingestión o absorción a través de los ojos y la piel, por lo que el grado de toxicidad del HCN para los humanos depende del tipo de exposición. La concentración letal de HCN gaseoso (CL_{50}) es de 100-30ppm (González & Sahores, 2004) la inhalación de esos niveles de cianuro causa la muerte en 10 a 60 minutos, teniendo en cuenta que cuanto más alta es la concentración más rápido se produce la muerte. La inhalación de 2.000ppm de cianuro hidrogenado puede ser fatal en tan solo un minuto (González & Sahores, 2004). El valor DL_{50} por ingestión del HCN es de 50-200 miligramos, o de 1-3 miligramos por kilo de peso; mientras que para el NaCN el valor de DL_{50} es de 150-300 miligramos por kilo de peso, con una toxicidad significativa de 50 miligramos de NaCN (González & Sahores, 2004). En contacto con la piel normal, el valor DL_{50} es de 100 miligramos por kilo de peso (Agencia para sustancias tóxicas y el registro de enfermedades [ATSDR], 2014).

Si bien el tiempo de exposición, la forma de exposición y la dosis pueden variar, la acción bioquímica del cianuro es la misma una vez que ingresa en el cuerpo (González & Sahores, 2004). Una vez que se encuentra en el torrente sanguíneo, el cianuro forma un complejo estable de citocromo oxidasa, una enzima que promueve el traspaso de electrones a

las mitocondrias de las células durante la síntesis de trifosfato de adenosina (ATP). Si la citocromo oxidasa no funciona correctamente las células no consiguen aprovechar el oxígeno del torrente sanguíneo, lo que causa hipoxia citotóxica o asfixia celular. La falta de oxígeno provoca que el metabolismo cambie de aerobio a anaerobio, lo que conlleva a la acumulación de lactato en la sangre (González & Sahores, 2004). 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, incluso el corazón.

Los síntomas iniciales del envenenamiento pueden aparecer tras la exposición a concentraciones de entre 20 y 40ppm HCN gaseoso (ASTDR, 2014), y pueden revelarse como dolor de cabeza, somnolencia, vértigo, ritmo cardíaco rápido y débil, respiración acelerada, enrojecimiento facial, náusea y vómito. Estos síntomas pueden estar acompañados por convulsiones, dilatación de las pupilas, piel fría y húmeda, ritmo cardíaco aún más rápido y respiración superficial (ASTDR, 2014). En el tramo final y más agudo del envenenamiento, las pulsaciones se vuelven lentas e irregulares, la temperatura corporal comienza a descender, los labios, la cara y las extremidades toman un color azulado, el individuo cae en coma y muere. Estos síntomas pueden ocurrir ante una exposición sub-letal al cianuro, pero disminuirán los efectos si el cuerpo comienza a desintoxicarse y expulsa la sustancia como tiocianato, 2 amino tiazolina, 4 ácido carboxílico, con otros metabolitos menores (ASTDR, 2014). El cianuro no se acumula ni se biomagnifica, por lo que exposiciones prolongadas a concentraciones subletales de cianuro no necesariamente causarán intoxicación.

Tabla 2. Contraste de efectos agudos y crónicos ante la exposición de cianuro

	EFFECTOS AGUDOS	EFFECTOS CRÓNICOS
CARDIOVASCULARES	Taquicardia, tensión en el pecho	Palpitaciones
RESPIRATORIOS	Irritación de mucosas, ardor de boca y faringe, edema pulmonar	Irritación y tensión en el pecho
NEUROLÓGICOS	Dolor de cabeza, mareo, confusión, ansiedad, convulsiones	Dolor de cabeza, vértigo, fatiga, alteraciones en el apetito y el sueño
GASTROINTESTINALES	Náuseas, vómitos	Náuseas y vómitos
DERMATOLÓGICOS	Coloración de la piel roja o rosa brillante	Dermatitis, brotes escarlatiniformes y pápulas
ENDÓCRINOS	N/A	Agrandamiento de la glándula tiroides, disfunción tiroides en el metabolismo de la vitamina B12

Fuente: Información extraída de González & Sahores, 2004, (Elaboración propia)

1.10. Tratamiento de efluentes contaminados por cianuro

Lo preocupante del uso de los proceso de cianuración en la extracción de metales, es el manejo de los residuos de cianuro y sus diferentes complejos (Carroll, 2010). Cuando hablamos del término “cianuro”, nos referimos a alguno de los tres tipos de cianuro que se conocen, identificar el tipo de cianuro con el que estamos trabajando es clave en el desarrollo de un tratamiento. Existen tres clases de cianuro: (1) cianuro total, es decir complejos fuertes Metal-Cianuro de Fe; (2) cianuros débiles ácido disociados (*weak acid dissociable* [WAD]), los cuales son complejos con Ag, Cd, Cu, Hg, Ni y Zn; finalmente (3) cianuro libre en forma CN^- o HCN (Botz, Mudder & Akcil, 2005) como se muestran en la Figura 5.

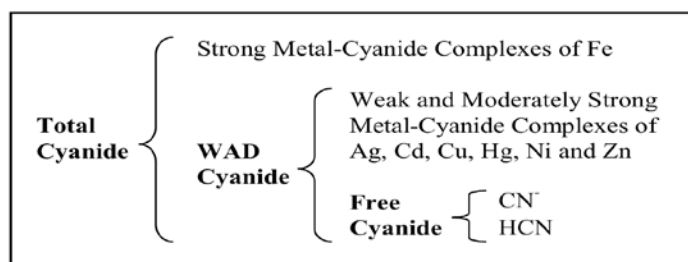


Figura 5. Clasificación de los cianuros totales

Fuente: Botz, M., Mudder, T., & Akcil, A. (2005). Cyanide treatment: physical, chemical and biological processes. *Advances in gold ore processing*, 672-700.

Los procesos de tratamiento del cianuro se encuentran clasificados en aquellos que se basan en destrucción y aquellos que son sobre la recuperación. Los procesos de destrucción, pueden ser químicos o biológicos, donde se busca convertir el cianuro en compuestos menos tóxicos. Los procesos de recuperación son aquellos en los que se utiliza un enfoque de reciclaje, es decir, remoción del cianuro de la solución y reutilizado en un circuito metalúrgico (Botz *et al.*, 2005). A su vez los procesos pueden ser físicos, químicos o biológicos (Akcil & Mudder, 2003). Determinar que procesos son los más apropiados en la remoción de cianuro de una operación minera en particular debe basarse en las características químicas del relave, el volumen del mismo, las condiciones ambientales del sitio y las normas de regulación que aplican al sitio (Akcil, 2003).

1.10.1. Tratamientos químicos

La mayoría de los procesos de destrucción química del cianuro difieren significativamente, de un método al otro, sin embargo, la mayoría operan bajo la consigna

principal de convertir los cianuros en compuestos menos tóxicos, mediante reacciones de oxidación. Existen varios procesos que ya han sido probados y se ha confirmado que los efluentes resultantes presentan bajos niveles de cianuro y metales (Carroll, 2010).

1.10.1.1. INCO Dióxido de azufre/Aire

El proceso de dióxido de azufre (SO_2) y aire se desarrolló por INCO en 1980, ha sido aplicado en más de treinta sitios alrededor del mundo. El proceso utiliza SO_2 y aire con la presencia de un catalizador de cobre que permite la oxidación del cianuro al complejo menos tóxico OCN^- . Este proceso se ha observado con mejor resultados en relaves con moderadas concentraciones de cianuro, los resultados de estos procesos alcanzan concentraciones por debajo de 5 mg/L (Botz *et al.*, 2005).

1.10.1.2. Peróxido de hidrógeno

El tratamiento del peróxido de hidrógeno es similar al desarrollado por INCO, se utiliza en el tratamiento de soluciones con cianuros de tipo libre o WAD. Al igual que el tratamiento de dióxido de azufre requiere de la adición del catalizador de cobre. Este proceso presenta resultados por debajo de 1 mg/L pero requiere de concentraciones iniciales relativamente bajas y modificaciones de pH de la muestra (Botz *et al.*, 2005).

1.10.1.3. Ácido de Caro

El ácido peroximonosulfúrico (H_2SO_5), es un agente desarrollado para su aplicación en sitios donde la adición del catalizador de cobre no es deseada (Botz *et al.*, 2005).

1.10.1.4. Cloración alcalina

En el pasado era la técnica más utilizada, pero fue reemplazada gradualmente por otros procesos. Este proceso es efectivo cuando se buscan concentraciones mínimas de cianuro, sin embargo sus costos son muy elevados por la cantidad de agentes que se requieren. Se divide en dos fases, la primera es la conversión del cianuro a CNCl , posteriormente la segunda fase es la hidrólisis de este complejo para la obtención de compuestos menos tóxicos OCN^- (Botz *et al.*, 2005).

Las distintas aplicaciones de los métodos químicos antes mencionados pueden ser observadas en la Tabla 3.

Tabla 3. Guía de selección para los procesos de tratamiento de cianuro

Proceso de Tratamiento	Eliminación de cianuro de hierro	Eliminación de cianuro WAD	Aplicación de abono	Aplicación de solución
SO_2 /Aire	✓	✓	✓	✓

Peróxido de hidrógeno	✓	✓		✓
Ácido caro		✓	✓	✓
Cloración alcalina	✓	✓		✓
Precipitación de hierro	✓	✓	✓	✓
Carbón activado	✓	✓		✓
Biológico	✓	✓		✓
Recuperación de cianuro		✓	✓	✓
Atenuación natural	✓	✓	✓	✓

Fuente: Botz, M., Mudder, T., & Akcil, A. (2005). Cyanide treatment: physical, chemical and biological processes. *Advances in gold ore processing*, 672-700.

1.10.1.5. Precipitación de complejos Hierro-Cianuro

Se recomienda en el tratamiento de cianuros totales y WAD, se utiliza una reacción con iones ferrosos, donde la precipitación puede ser controlada para la separación de los sólidos precipitados. Requiere condiciones de pH por debajo de 6 para un óptimo proceso (Betz *et al.*, 2005).

1.10.2. Tratamientos biológicos

La biotecnología y la biohidrometalurgia son áreas multidisciplinarias que incluyen campos de estudio como el de los procesos de minería, la hidrometalurgia, el medio ambiente, la microbiología, la bioquímica, entre muchos otros (Akcil & Mudder, 2003). La habilidad de degradar cianuros simples e inorgánicos ha sido demostrada tanto en organismos eucariotas como procariotas, dentro de un diverso rango de taxa y por diversos procesos metabólicos. Algunos de los procesos metabólicos que han sido observados incluyen reacciones hidrolíticas, oxidativa, reductivas, de sustitución y de transferencia. Sin embargo actualmente el tipo de tratamiento biológico más aceptado y económico es mediante bacterias (Carroll, 2010).

La habilidad de destrucción de cianuro de los microorganismos fue examinada por primera vez a principio del siglo XX y se demostró su capacidad comercial en el caso Homestake Gold Mine, en Estados Unidos alrededor del año 1980. Con el paso del tiempo se han reportado diversas investigaciones sobre el uso de microorganismos en condiciones de laboratorio y plantas piloto (Kuyucak & Akcil, 2013) como los que se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Comparación de reportes en la biorremediación de cianuros

Clase	Orden	Familia	Género	Especie	Tipo de metabolismo respiratorio	Tinción de Gramm	Autores que la mencionan
Actinobacteria	Actinomycetales	Actinomycetaceae	<i>Actinomyces</i>		anaerobio facultativo	positiva	Given, Dixon, Douglas, Mihoc, & Mudder (1998); Mudder <i>et al.</i> (1998)
Actinobacteria	Actinomycetales	Micrococcaceae	<i>Arthrobacter</i>		aerobia	positiva	Given <i>et al.</i> (1998); Mudder <i>et al.</i> (1998); Asano, Fujishiro, Tani, & Yamada (1982)
Actinobacteria	Actinomycetales	Micrococcaceae	<i>Micrococcus</i>		aerobia	positiva	Given <i>et al.</i> (1998); Mudder <i>et al.</i> (1998)
Actinobacteria	Actinomycetales	Nocardiaceae	<i>Rhodococcus</i>		aerobica	positiva	Komeda, Kobayashi, & Shimizu (1996); Kobayashi, NAGASAWA, & YAMADA (1989); Blakey, Colby, Williams, & O'Reilly (1995)
Actinobacteria	Actinomycetales	Brevibacteriaceae	<i>Brevibacterium</i>	<i>B. imperiali</i>	aerobia	positiva	Komeda <i>et al.</i> (1996); Kobayashi <i>et al.</i> (1989); Blakey <i>et al.</i> (1995); Alfani, Cantarella, Spera, & Viparelli (2001)
Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae	<i>Bosea</i>	<i>B. thiooxidans</i>	aerobia	negativa	van Buuren, Makhouta, & Olivier (2011)
Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	<i>Paracoccus</i>		aerobio	negativa	Given <i>et al.</i> (1998); Mudder <i>et al.</i> (1998)
Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	<i>P. paucimobilis</i>	aerobia	negativa	Whitlock (1990)
Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	<i>B. pumilus</i>	anaerobio	positiva	Ingvorsen, Højer-Pedersen, & Godtfredsen (1991); Meyers, Gokool, Rawlings, & Woods (1991); Watanabe, Yano, Ikebukuro, & Karube (1998)
Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>		anaerobio	positiva	Given <i>et al.</i> (1998); Mudder <i>et al.</i> (1998)
Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	<i>Streptococcus</i>		anaerobia facultativa	positiva	Khamar, Makhdoumi-Kakhk & Gharaie (2015)
Betaproteobacteria	Burkholderiales	Alcaligenaceae	<i>Alcaligenes</i>		aerobia	negativa	Given <i>et al.</i> (1998); Mudder <i>et</i>

							<i>al.</i> (1998)
Betaproteobacteria	Burkholderiales	Alcaligenaceae	<i>Alcaligenes</i>	<i>A. xylosoxidans</i>	aerobia	negativa	Ingvorsen <i>et al.</i> (1991); Meyers <i>et al.</i> (1991); Watanabe <i>et al.</i> (2001)
Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	<i>Burkholderia</i>	<i>B. cepacia</i>	aerobia	negativa	Adjei & Ohta (2000)
Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	<i>Ralstonia</i>	<i>R. eutropha</i>	aerobia facultativa	negativa	van Buuren <i>et al.</i> (2011)
Betaproteobacteria	Nitrosomonadales	Thiobacillaceae	<i>Thiobacillus</i>		aerobia	negativa	Given <i>et al.</i> (1998); Mudder <i>et al.</i> (1998)
Betaproteobacteria	Neisseriales	Neisseriaceae	<i>Chromobacterium</i>	<i>C. violaceum</i>	aerobia	negativa	Ingvorsen <i>et al.</i> (1991); Meyers <i>et al.</i> (1991); Watanabe <i>et al.</i> (2001)
Betaproteobacteria	Neisseriales	Neisseriaceae	<i>Neisseria</i>		aerobia	negativa	Given <i>et al.</i> (1998); Mudder <i>et al.</i> (1998)
Gammaproteobacteria	Enterobacteria	Enterobacteriaceae	<i>Citrobacter</i>		aerobia	negativa	Dash, Gaur, & Balomajumder (2009)
Gammaproteobacteria	Enterobacteria	Enterobacteriaceae	<i>Escherichia</i>	<i>E. coli</i>	aerobia	negativa	Figueira, Ciminelli, Andrade, & Linardi (1996); Kao, Liu, Lou, Lin, & Chen (2003)
Gammaproteobacteria	Enterobacteria	Enterobacteriaceae	<i>Klebsiella</i>	<i>K. oxytoca</i>	aerobia	negativa	Figueira <i>et al.</i> (1996); Kao <i>et al.</i> (2003)
Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Halomonadaceae	<i>Halomonas</i>		aerobia facultativa	negativa	Khamar <i>et al.</i> (2015)
Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	<i>Acinetobacter</i>		aerobia	negativa	Finnegan <i>et al.</i> (1991)
Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	<i>P. fluorescens</i>	aerobia	negativa	Baxter & Cummings (2006)
Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	<i>P. pseudoalcaligenes</i>	aerobia	negativa	USEPA (1994)
Gammaproteobacteria	Pseudomonale	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	<i>P. putida</i>	aerobia	negativa	Dash <i>et al.</i> (2009)
Gammaproteobacteria	Pseudomonale	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>		aerobia	negativa	Akcil (2003)
Gammaproteobacteria	Pseudomonale	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	<i>P. stutzeri</i>	aerobia	negativa	Ingvorsen <i>et al.</i> (1991); Meyers <i>et al.</i> (1991); Watanabe <i>et al.</i> (2001)

Nota. Elaboración Propia
Recopilación de diversos artículos

1.10.3. Contraste de tratamientos

Cuando realizamos un análisis costo beneficio entre cualquier proceso de tratamiento de cianuros, se deben considerar los factores económicos, ambientales, legislativos y requerimientos involucrados. Al comparar un tratamiento químico, el tratamiento biológico requiere de una inversión inicial mucho más elevada. Sin embargo visto desde una perspectiva a largo plazo sucede todo lo contrario. Aunque los procesos biológicos tienen ventaja sobre los químicos en el sentido de la generación de efluentes mucho más amigables con el ambiente, las variables económicas se hacen presentes cuando condiciones climáticas, afectan las del mantenimiento de los microorganismos. Bajo las condiciones actuales de las legislaciones, justificar un tratamiento biológico sobre un químico parecería difícil. Sin embargo con legislaciones más estrictas los papeles se invirtieron debido a la capacidad de producir efluentes más limpios (Söderholm *et al.*, 2015). Otro concepto interesante representa que los procesos biológicos convencionales no siempre proveen los resultados satisfactorios, en especial porque el tratamiento de relaves mineros llega a tener residuos resistentes a tratamientos biológicos o que en las concentraciones que se encuentran son letales para organismos. Aquí es donde nace la idea de procesos químicos de oxidación avanzada en combinación a procesos biológicos para el tratamiento de relaves industriales y mineros (Oller, Malato & Sánchez-Pérez, 2011).

1.10.4. Pruebas de biotratabilidad

Los estudios de biotratabilidad son diseñados para determinar la cantidad y velocidad de degradación de los compuestos de interés, las condiciones óptimas para que la biodegradación ocurra (SenGupta, 1995) y señalar cuestiones específicas técnicas, de costos y tiempos (King, Sheldon & Long, 1997). Los estudios de biotratabilidad pueden usarse de manera indiferente en proyectos de biorremediación ya sean in-situ o ex-situ. Los resultados que se obtienen determinan la viabilidad de emplear las tecnologías de biorremediación, el tiempo del tratamiento y las condiciones generales como pH, nutrientes, concentraciones. Las pruebas de biotratabilidad proveen información para estimar el marco de tiempo para una biorremediación a escala industrial y estimar los costos relacionados a un proyecto industrial (SenGupta, 1995). El objetivo es identificar las condiciones óptimas para la degradación de los compuestos de interés, así como determinar a manera general la cantidad que se removerá (King *et al.*, 1997).

1.10.5. Análisis molecular

La diversidad microbiológica del planeta es infinita y bastante desconocida, a lo largo de los años se han buscado formas de analizar esta diversidad y conocer las diferentes comunidades bacterianas. La filogenética así como la taxonomía nos permiten estudiar esta diversidad así como facilitar la identificación de las especies bacterianas en una muestra. Para hacer uso de la filogenia se utilizan los análisis molecular que permiten reconstruir la estructura poblacional de una comunidad a un nivel que las técnicas tradicionales de identificación no logran llegar (Cruz-Leyva, Zamudio-Maya, Corona-Cruz, González-De La Cruz, & Rojas-Herrera, 2015).

La primera categoría taxonómica utilizada en los sistemas de clasificación biológica es el dominio. Los tres dominios fueron propuestos por Carl Woese en 1990, la propuesta nació con base a un árbol filogenético donde hay tres divergencias a partir de un progenitor ancestral (LUCA). Los tres dominios son Eukarya, Archaeabacteria y Bacteria (Woese, Kandler, & Wheelis, 1990). Dentro del dominio bacteria a lo largo de las investigaciones y análisis se han descubierto 30 phyla (Euzéby, 2016).

1.10.6. Uso del gen 16S ARNr

El gen 16S del ARN ribosomal presenta una ventaja sobre otros y juega el rol principal en la identificación de bacterias, debido a sus secuencias altamente conservadas que dan lugar a regiones comunes utilizadas como sitio de iniciación para la elongación de los cebadores (*primers*); y a la presencia simultánea de zonas específicas con variaciones únicas entre grupos filogénicos (Cuadra, 2017).

Rodicio y Mendoza (2004), enumeran las principales 6 características que colocan al 16S ARNr como el gen indicado para la identificación filogénica y análisis taxonómico:

- Es una molécula muy antigua, presente en todas las bacterias actuales.
- Debido a la constancia de su estructura y función las alteraciones en la secuencia reflejan probablemente cambios aleatorios.
- a) Los cambios ocurren de manera lenta, aportando información sobre procariotas y al tomar en cuenta las variaciones del ARNr 18S, información sobre la escala evolutiva.
b) Los ARNr SSU contienen, suficiente variabilidad para diferenciar los organismos más próximos.
- El tamaño relativamente largo de los ARNr 16S (1.500 nt) disminuye las variaciones estadísticas.

- La conservación en estructura secundaria ayuda aportando una base para el alineamiento preciso.
- Existen bases de datos amplias y en continuo crecimiento sobre estas secuencias.

La construcción de árboles filogenéticos toma lugar gracias al análisis comparativo de las secuencias del 16S ARNr. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), fue desarrollada por K. Mullis en la década de los 80 (Cuadra, 2017), esta metodología permite la amplificación selectiva de secuencias, para ello se utilizan diversos *primers* que permiten amplificar secuencias específicas.

1.10.7. Reacción de la polimerasa en cadena

Se conoce como PCR por su nombre en inglés (*Polymerase Chain Reaction*), esta técnica convierte pequeñas cantidades de ADN, para amplificar millones de copias de regiones específicas para análisis, se considera una técnica bastante compleja pues incluye secuenciación, clonación y modificaciones genéticas (Clark & Pazdernik, 2013). Para realizar una PCR entran en juego los elementos más importantes: la muestra de ADN, los *primers*, los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina) y la enzima polimerasa.

De la técnica inicial de PCR punto final, descrita a continuación, se han desarrollado diversos tipos de PCR, al menos existen 32 versiones diferentes, cada una de ellas con fines distintos y variaciones específicas a los objetivos de cada una de ellas. Por ejemplo la PCR tiempo real es una técnica cuantitativa con la que se puede conocer un aproximado de las cantidades de DNA presente en diferentes muestras. Otra técnica es la PCR anidada, esta consiste en dos fases, la primera es la amplificación de una secuencia de interés, seguido de una segunda amplificación, de un segmento más pequeño dentro del primer amplicon, también se utiliza para darle características especiales a una secuencia como lo es la adición de la GC-clamp utilizada para otros estudios como el DGGE (Rajalakshmi, 2017).

Los equipos utilizados para llevar a cabo la reacción son llamados termocicladores, están diseñados para establecer un sistema homogéneo para las distintas condiciones de temperatura y tiempo. La enzima más usada para la reacción de PCR es la Taq ADN polimerasa, esta enzima se obtuvo de *Thermus aquaticus*, una bacteria capaz de sobrevivir a temperaturas muy altas (Tamay de Dios, Ibarra, & Velasquillo, 2013).

La elección de *primers* dependerá del perfil a identificar, en primera instancia se podría considerar un perfil universal, el ARNr está altamente conservado por lo que los

investigadores utilizan *primers* universales para identificar los tres dominios de organismos. Otro enfoque recomendado para la identificación mediante PCR es la identificación a nivel clase, donde los oligonucleótidos específicos para diversas clases de un dominio nos permiten conocer la diversidad de nuestra muestra (Cuadra, 2017).

Se denomina primer a las secuencias de oligonucleótidos que se unirán a las regiones de interés, deben tener la secuencia complementaria del fragmento de interés. Su tamaño suele ser entre 15 y 25 pares de bases y la cantidad de G-C no debe ser más del 55% de la secuencia. Se requiere de dos *primers* para llevar a cabo una reacción PCR, el primero es conocido como *forward* o sentido, mientras que la segunda recibe el nombre de *reward* o anti sentido. Ambos cebadores se diseñan de forma que la sección de interés del ADN sea amplificada por la enzima Taq polimerasa en dirección 5'-3' (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

1.10.8. Etapas de la PCR

Todos los elementos antes mencionados interactuarán a lo largo de tres etapas cíclicas que conforman la PCR: desnaturalización, hibridación y extensión. Durante la desnaturalización, las cadenas de ADN son expuestas a altas temperaturas consiguiendo separar la doble hélice en dos secuencias *single stranded*, usualmente este momento tiene lugar a 95 °C durante una exposición de 20 a 30 segundos; el tiempo dependerá del porcentaje de guaninas y timinas que existen dentro de la secuencia (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

La segunda etapa recibe el nombre de hibridación, durante esta, los cebadores se alinean al extremo 3' de la secuencia base, los cebadores hibridan con su secuencia complementaria formando el complejo templado-*primers*. Para conseguir esto la temperatura de hibridación o temperatura *melting* (T_m) debe ser la óptima por lo general se encuentra entre 50-60 °C (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

Finalmente la extensión, durante esta etapa se debe conseguir en primer lugar que la enzima Taq polimerasa actúe sobre el complejo templado-*primers*, una vez que esto es alcanzado se procede a una función catalítica de alta velocidad con sentido 5' a 3' donde la enzima agrega dNTP's complementarios para crear las cadenas completas de ADN. La temperatura usual para este paso debe ser de 72 °C, ya que a esa temperatura la enzima es funcional (Tamay de Dios *et al.*, 2013). Esta secuencia debe ser repetida, la reacción PCR es conocida como reacción exponencial pues de una secuencia original de DNA se obtienen 4 copias después de dos ciclos, 16 copias después de 4 ciclos, 256 después de 8 y así

sucesivamente hasta alcanzar millones de secuencias amplificadas conocidas como amplicones. Los amplicones deberán tener un tamaño teórico producto de la cantidad de bases que existe entre las dos secuencias de *primers* (Rajalakshmi, 2017).

2. MARCO CONTEXTUAL

2.1. Endeavour Silver Corp

Fundada en 2004, es una compañía minera de plata-oro de nivel intermedio dedicada a la evaluación, adquisición, exploración, desarrollo y explotación de propiedades de metales preciosos en América Latina, todo desde un punto de partida orientado a la sustentabilidad (Endeavour Silver, 2015). Tras 11 años de continuo crecimiento, ha sido condecorada como la empresa minera de planta de mayor crecimiento en América del Norte y actualmente tiene programas de expansión en 3 minas de plata-oro en operación en México: la mina Guanaceví, en el estado de Durango, y las minas Bolañitos y El Cubo (Figura 6), en el estado de Guanajuato (Endeavour Silver Corp, 2013).

La mina El Cubo, fue la tercera mina adquirida por Endeavour en julio de 2012, se ubica a 6 kilómetros al noroeste de la Ciudad de Guanajuato, Guanajuato (Figura 7), bajo las siguientes coordenadas Longitud 20°59'51.53"N y Latitud 101°10'56.43"O (Hard Rock Consulting, 2015). La planta de procesamiento tiene una antigüedad que data del siglo XVII, y más de 150 años, utilizando la cianuración, fue el primer sitio en México extrayendo oro y por este método. Ubicada en el segundo distrito minero de tipo histórico más grande en México, con un área total de 8141ha, la planta cuenta con 6 presas de jales (Endeavour Silver Corp, 2013).



Figura 6. Mapa de México señalando las 3 minas con proyección de crecimiento
Fuente: Endeavour Silver. (2015). Informe Anual y Reporte de Sustentabilidad 2015. Vancouver, Canads: Endeavour Silver Corp. Recuperado el 3 de diciembre de 2016, de http://sp.edrsilver.com/_resources/2015_Endavour_Spanish_Web.pdf



Figure 4-1 General Location of the El Cubo Project (EDR, 2016)

Figura 7. Localización general del proyecto El Cubo

Fuente: Hard Rock Consulting, LCC. (2015). Updated Mineral Resource and Reserve Estimates for the El Cubo Project, Guanajuato State, Mexico. National Instrument 43-101 Technical Report. *Endeavour Silver Corp.* Recuperado el 5 de noviembre de 2016, de http://edrsilver.com/_resources/reports/El_Cubo_technical_report_march_2016.pdf

En 2013 debido a lo peligroso que es el uso de cianuro, se cambió el proceso de lixiviación por un proceso de flotación; anterior al cambio por cada kg de plata que se obtenía, se utilizaban 5.44 kg de cianuro de sodio, la producción de plata en 2013 fue más de 30000 kg (Hard Rock Consulting, 2015).

Los jales pertenecientes a El Cubo son Mastrantos I, II y IV, los cuales aún contienen los residuos resultado de la cianuración, por otra parte los jales destinados para el proceso de flotación son Mirasol, Mastrantos III y VI.

2.2. Proceso de flotación

El proceso de flotación data del siglo XV cuando se comenzó a utilizar como método de enriquecimiento de los minerales de carbonato de cobre. Pero su aplicación general es reciente, a finales del siglo XIX, la demanda de materia prima metalúrgica obligó a la gente a buscar nuevas tecnología. Comenzó como un proceso de mezcla de polvo mineral con agua y aceite, la variación de aceite permitía obtener minerales de tipo sulfuros como galena (PbS), sfalerita (ZnS) y pirita (FeS), mediante un ajuste de pH estos eran separados.

Fue hasta principios del siglo XX se empezó a añadir aire o CO₂ y a recolectar una espuma inestable, durante la primera guerra mundial el proceso de flotación fue usado en Australia y en EUA para extraer sulfuros de enormes cantidades de residuos de separación de sulfuro por sedimentación selectiva. En los años 20 se patentó el uso de los xantatos y

algunos años más tarde se generalizó el uso de otros surfactantes, hoy en día se procesan anualmente 2.000 millones de toneladas de minerales molidos por este proceso (Tangient LLC, 2015).

En la flotación se aprovechan diferentes características físico-químicas de la superficie de los minerales, algunos se vuelven hidrófobos con la adición de ciertos activadores; se inyecta aire al tanque y permite que las partículas hidrófobas floten en forma de espuma, para que esta se retire (Figura 8). La flotación se utiliza poco en la extracción de oro pues solo se recupera el oro libre, sin embargo se ve limitada por el tamaño de granos, el oro debe tener un grueso entre 250 y 400 μm (Naranjo, 2012).

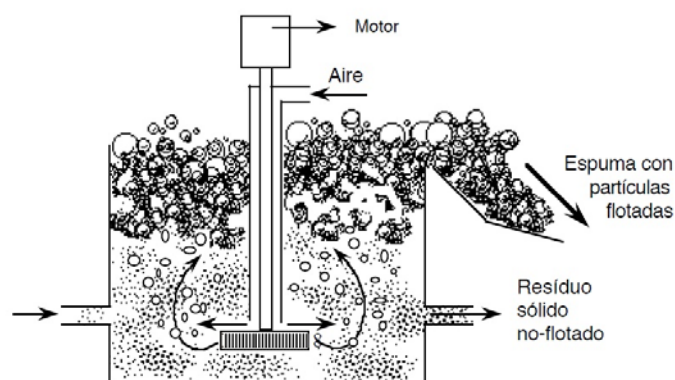


Figura 8. Diagrama del proceso general de lixiviación

Fuente: Tangient LLC. (2015). Flotación. Recuperado el 3 de diciembre de 2016, de <http://procesosbio.wikispaces.com/Flotaci%C3%B3n>

La flotación se ha utilizado por años en combinación con la amalgamación y la cianuración, sin embargo en la actualidad la combinación de la flotación con la cianuración es el combo de mayor uso. Esto se debe a que el oro recuperado por flotación suele llevar no sólo oro, sino algunos otros minerales que pueden ser separados mediante la cianuración. La hidrofobicidad del oro, se consigue mediante la adición de colectores como los xantatos que permiten una mejor recuperación del mineral en cuestión, el más común es el xantato isopropílico de sodio (RahilKhan, 2016). La flotación comúnmente requiere del trabajo en pH neutro o básico, dependiendo de los reactantes a utilizar (Naranjo, 2012).

2.3. Marco legal

Tabla 5. Marco Legal aplicable

Ley General del Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente
--

	Título Cuarto. Protección al Ambiente Capítulo III. Prevención y Control de la Contaminación del Agua y de los Ecosistemas Acuáticos
	Ley de Aguas Nacionales
	Título Séptimo. Prevención y Control de la Contaminación de las Aguas y Responsabilidad por Daño Ambiental. Capítulo I. Prevención y Control de la Contaminación del Agua Capítulo
	Ley Minera
	Artículo 19. Fracción V. Aprovechar las aguas provenientes del laboreo de las minas para la exploración o explotación y beneficio de los minerales o sustancias que se obtengan y el uso doméstico del personal empleado en las mismas.
	NOM-001-SEMARNAT-1996 Límites Máximos Permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales, con el objeto de proteger su calidad y posibilitar su uso.
	NOM-004-SEMARNAT-2002 Protección ambiental.- Lodos y biosólidos.-Especificaciones y límites máximos permisibles de contaminantes para su aprovechamiento y disposición final.

2.4. Situación actual del problema

Los incidentes y contaminación a causa de un mal manejo del cianuro en la industria minera no son situaciones ajenas a la realidad y actualidad de nuestro país.

El día 20 de marzo de 2018, la Procuraduría Federal de Protección al Ambiente (PROFEPA) dio un comunicado oficial con referencia a lo sucedido el pasado 11 de marzo del mismo año. La empresa Primero Empresa Minera, S.A. de C.V., localizada en el municipio San Dimas, Durango recibiría una inspección en material de contaminación de suelo en seguimiento al derrame de 200 litros de solución cianurada gastada al río Piaxtla, por su parte las afectaciones en relación con el agua serían evaluadas por la Comisión Nacional del Agua (CONAGUA) (Procuraduría Federal de Protección al Ambiente [PROFEPA], 20 de marzo de 2018).

Con base en la información proporcionada por la empresa, en el cumplimiento a lo señalado en el artículo 130 del Reglamento de Ley de la General para la Prevención y Gestión Integral de los residuos LGPGIR (Procuraduría Federal de Protección al Ambiente [PROFEPA], 16 de marzo de 2018); la concentración de cianuro en la solución derramada se encontraba dentro del rango de 100 a 180 mg/l de cianuro (PROFEPA, 20 de marzo de 2018).

La causa fue un descuido en el cierre de la válvula de una pipa que transportaba remanente de solución cianurada, ocasionando que drenara la solución, una vez que esta

alcanzó la corriente, se desplazó aproximadamente 245 m lineales, causando la muerte de un número indeterminado de peces, en su mayoría con tamaño de 1 a 5 cm (PROFEPA, 16 de marzo de 2018).

En respuesta a la emergencia, la empresa realizó el retiro de los peces muertos e implementó un programa de monitoreo de la vida silvestre en el entorno del río Piaxtla donde ocurrió el derrame (PROFEPA, 16 de marzo de 2018). De acuerdo con Yadira Narváez, titular de la Comisión Nacional del Agua (Conagua) en Durango; las comunidades aledañas al río Piaxtla, están seguras ya que se realizaron de manera inmediata los protocolos de emergencia. Como parte del plan de contingencia se realizó una limpieza a 250 metros del lecho del río y se siguió un monitoreo constante aguas abajo por 20 días. Según la funcionaria, el lecho del río contaba con poca agua el día del percance, lo que evitó el avance y fue mínima la pérdida, solo se registraron pequeños peces muertos (Hernández, 2018).

3. JUSTIFICACIÓN

La industria utiliza agua para una amplia gama de actividades; la minería emplea una mezcla de agua con cianuro para la extracción de oro y plata, por lo tanto los efluentes residuales deben recibir algún tratamiento antes de ser liberados al ambiente ya que contienen cianuro libre, complejos débiles y fuertes de cianuro, metales pesados, entre otras sustancias.

De acuerdo a los estudios realizados en efluentes mineros contaminados con cianuro, las concentraciones alcanzadas se encuentran en un rango de 100 a 500 ppm. La estabilidad de los cianuros y sus efectos en la biósfera han hecho que se utilicen tratamientos como la degradación natural, la cloración alcalina, el uso de peróxido de hidrógeno entre otros para la destrucción del cianuro; lamentablemente, estos métodos resultan ser muy caros, requieren un alto consumo de reactivos o el tratamiento requiere grandes períodos de tiempo. No obstante, la falta de cuidado en cuanto al uso y manejo del cianuro representa un aspecto grave en el impacto ambiental como para la salud, las concentraciones de cianuro pueden ser mortales si sobrepasan los 0.05 a 0.3 mg/dL en sangre según lo indica la Organización Mundial de la Salud [OMS].

La industria minera opta por la degradación natural, por su bajo costo y al no requerir reactivos. Sin embargo, este no permite a los efluentes alcanzar los límites máximos permisibles establecidos (LMP) en las normas oficiales mexicanas, convirtiendo a las presas o jales mineros en zonas de riesgo latente para los seres vivos. Por esta razón se recomienda la innovación en los métodos de tratamiento. Por excelencia, en el tratamiento de aguas, se ha usado uno de los métodos más económicos y con resultados más prometedores como lo es el uso de procesos biológicos y el uso de reacciones químicas de oxidación avanzada. Se ha demostrado como la oxidación avanzada por el método de ozono-coagulación-floculación, tiene resultados óptimos, sin embargo, el uso de microorganismos también ha generado resultados prometedores. Ambas tecnologías son viables y presentan ventajas diferentes entre sí, por lo que se recomienda una combinación de técnicas.

Aunque los procesos de ozonación no son tan costosos a comparación de otros, el costo podría ser aún menor con la implementación de un método biológico que por sí mismo no siempre es óptimo en el tratamiento de efluentes debido a las altas concentraciones de

contaminantes que resultan ser tóxicos para los microorganismos. El tratamiento de los efluentes cianurados podría ser una alternativa para mejorar la calidad de vida de las comunidades una vez escalada en la industria minera, disminuyendo el impacto negativo en la salud de empleados y población vecina, así como la distribución del agua tratada para riego local u otras actividades que proporcionen beneficios a la sociedad. Los resultados de esta investigación representan un escalón más en la búsqueda de una mejora para las condiciones de pueblos mineros.

La NOM-001-SEMARNAT-1996 establece los Límites Máximos Permisibles (LMP) de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales, en cuanto a los LMP de cianuros en embalses naturales y artificiales para uso en riego agrícola es de 3 mg/L, para uso público urbano es 2 mg/L, y en ríos para la protección de vida acuática es de 2 mg/L. La Environmental Protection Agency (EPA) establece que los límites máximos permisibles de cianuro libre en cuerpos de agua dulce para la vida acuática es 0.022 mg/L y para agua potable es de 0.2 mg/L.

Actualmente la UPAEP tiene firmado un convenio de colaboración con la empresa Ozono Polaris S.A. de C.V. (Septiembre 2013), con el Instituto Mexicano de Tecnología del Agua (IMTA) y un convenio de colaboración directa con la empresa La Mina El Cubo en Guanajuato, con el fin de determinar una alternativa para el tratamiento de relaves mineros; se cuenta con la infraestructura, financiamiento y apoyo de investigadores de estas instituciones.

4. HIPÓTESIS

El inóculo bacteriano obtenido de la mina El Cubo en Guanajuato, es capaz de degradar cianuro mediante la actividad metabólica en condiciones aerobias y pH básico a una concentración de al menos 10 ppm, favoreciendo así el diseño de un tratamiento terciario biológico, de los relaves mineros del proceso de extracción convencional de oro y plata.

5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la capacidad degradativa de cianuro del inóculo bacteriano obtenido de la mina El Cubo en Guanajuato, mediante pruebas de biodegradabilidad a escala laboratorio de relaves subproducto de la minería de oro, para sentar las bases de un tratamiento terciario (biológico) de bajo impacto ambiental del efluente tratado por oxidación avanzada que cumpla con la normatividad aplicable.

6. OBJETIVOS PARTICULARES

- 6.1. Elaborar un protocolo de muestreo que garantice un procedimiento adecuado en la obtención, transporte y mantenimiento de las muestras del sitio de estudio, utilizando como fuente de consulta manuales, formatos, herramientas, aspectos y fundamentos técnicos para la obtención del inóculo bacteriano.
- 6.2. Obtener el inóculo a través del tratamiento de las muestras de suelo y lodos de la presa de jales de la mina El Cubo, para proceder con las pruebas de biodegradabilidad.
- 6.3. Evaluar la capacidad de remoción de cianuro, mediante pruebas de biodegradabilidad bajo distintos cambios en los factores (concentración de cianuros) para probar la presencia de bacterias degradadoras de cianuro.
- 6.4. Comprobar la presencia y diversidad de las bacterias del inóculo sometido a las pruebas de biodegradabilidad, con base en técnicas de biología molecular (PCR punto final), para identificar las clases de bacterias presentes.

7. ALCANCES Y LIMITACIONES

- La relevancia de esta investigación radica en la problemática ambiental, social y económica que se genera por el incorrecto manejo de los relaves mineros, con la finalidad de subvencionar un adecuado tratamiento que permita su reúso y reincorporación a los cuerpos de agua buscando el menor impacto tanto a la salud como al ambiente.
- La investigación se realizará con muestras de una mina caso de estudio, por lo que: a) Existe mayor representatividad del efluente a tratar a diferencia de solo utilizar agua sintética elaborada en laboratorio. b) Aislar mayor diversidad de bacterias que ya han desarrollado mecanismos para biodegradar el cianuro de forma natural es más factible que desarrollar estos mecanismos en distintos cultivos puros.
- La realización del proyecto beneficiará al casco urbano y el ambiente, ya que las presas de jales son un riesgo latente, brindando alternativas de solución al problema asociado a los relaves mineros.
- Este proyecto representa la fase de arranque para la puesta en marcha de un biorreactor continuo como prueba piloto para el tratamiento de los relaves.

Sin embargo, podemos mencionar las siguientes limitantes con las que se enfrentará el estudio:

- El estudio abarcará únicamente la mina caso de estudio; las condiciones inherentes de la zona son factores determinantes para la caracterización y tratamiento del relave.
- La fecha límite para la conclusión del proyecto es Mayo 2018.
- Por limitación de tiempo, espacio y recursos, las pruebas de análisis molecular no serán realizadas en su totalidad.
- Las empresas pertenecientes al giro industrial minero son escrupulosas en referencia a la información relacionada a su proceso y operación, por lo que los trámites para el acceso y muestreo toman prolongado tiempo en ser consolidados y se pueden ver condicionados.
- La industria minera del país a pesar de ser uno de los sectores de mayor importancia económica, es una de las industrias que destina irrisorios recursos en tecnologías de tratamiento de relaves.
- Los relaves mineros tienen concentraciones elevadas de contaminantes que pueden llegar a ser tóxicas para microorganismos por lo que el trabajo podría verse limitado.

8. METODOLOGÍA

8.1. Muestreo

El muestreo tomó lugar en dos sitios de interés; ambos sitios fueron seleccionados ventajosamente debido a la presencia de cianuro en la zona circundante a los puntos de toma de muestra, con el propósito de priorizar microorganismos ya adaptados a la interacción con este contaminante. Los sitios muestreados corresponden a la zona de presas de jales de la Mina El Cubo ubicado en la ciudad de Guanajuato. Así como distintos puntos del cauce del Río Atoyac y su cuerpo receptor, la Presa Manuel Ávila Camacho en Valsequillo, estos últimos ubicados en el estado de Puebla.

El muestreo correspondiente a la Mina El Cubo fue efectuado en la zona de presas de jales mineros, bajo las coordenadas: Longitud 20°59'51.53"N y Latitud 101°10'56.43"O. Los jales de esta mina se encontraban completamente evaporados debido al cese de actividades relacionadas al proceso de lixiviación, el cual fue sustituido recientemente por la técnica de flotación para la obtención de Au. La presa de jales de interés, es la denominada Mastrantos II, se procedió a esta toma de muestra debido a que Mastrantos II fue el último jale en uso, por lo que los sedimentos remanentes fueron considerados relevantes a nivel microbiológico debido a la posible presencia de microorganismos capaces de desarrollar mecanismos de resistencia y adaptación al cianuro.

La fecha de muestreo fue el jueves 6 de abril de 2017 con base en lo estipulado en el "Plan de muestreo para relaves mineros y suelo" generado para el proyecto siguiendo los procedimientos establecidos y formatos de la cadena de custodia (Véase anexo 2). Se llevó a cabo una recolección aerobia; la excavación fue a una profundidad aproximada de 0.25m transfiriendo la muestra a recipientes de 250 mL previamente lavados con detergente libre de nutrientes, sometidos a 12 horas de baño ácido, 4 horas de enjuague con agua destilada, expuestos a tratamiento térmico en mufla (250° C) por dos horas y finalmente esterilizados. Los frascos fueron de cierre de rosca, color ámbar, totalmente cubiertos y rotulados, para su posterior transporte en oscuridad a una temperatura menor de 4°C, con el fin mantener la estabilidad de todos sus constituyentes y de esta forma garantizar su preservación para su futuro análisis en laboratorio.



Figura 9. Vista satelital Mina El Cubo, Endeavor Silver Corp

Fuente: Hard Rock Consulting, LCC. (2015). Updated Mineral Resource and Reserve Estimates for the El Cubo Project, Guanajuato State, Mexico. National Instrument 43-101 Technical Report. *Endeavour Silver Corp.* Recuperado el 09 de octubre de 2017, de http://edrsilver.com/_resources/reports/El_Cubo_technical_report_march_2016.pdf

El segundo muestreo corresponde a la toma de sedimentos en 12 puntos del río Atoyac recolectados al margen del cuerpo de agua a una profundidad no mayor a 0.25 m; estas muestras se etiquetaron como AL##. Posteriormente se realizó la toma de sedimentos en 3 puntos de la Presa Manuel Ávila Camacho donde se empleó maquinaria de barrenación con el fin de facilitar la extracción de sedimentos directamente de la zona de transición de la Presa, para estos puntos se utilizaron las etiquetas AV##. Los 15 puntos muestreados se encuentran geolocalizados en la Figura 10, la fecha de muestreo así como las coordenadas por punto se presentan en la Tabla 5. Se utilizó el “Plan de muestreo para relaves mineros y suelo” previamente mencionado, para la toma de muestra, transporte y preservación de las mismas. La elección de estos puntos se realizó bajo el criterio de la diversidad, presencia y concentración de diversos contaminantes de las descargas continuas adyacentes al río Atoyac.

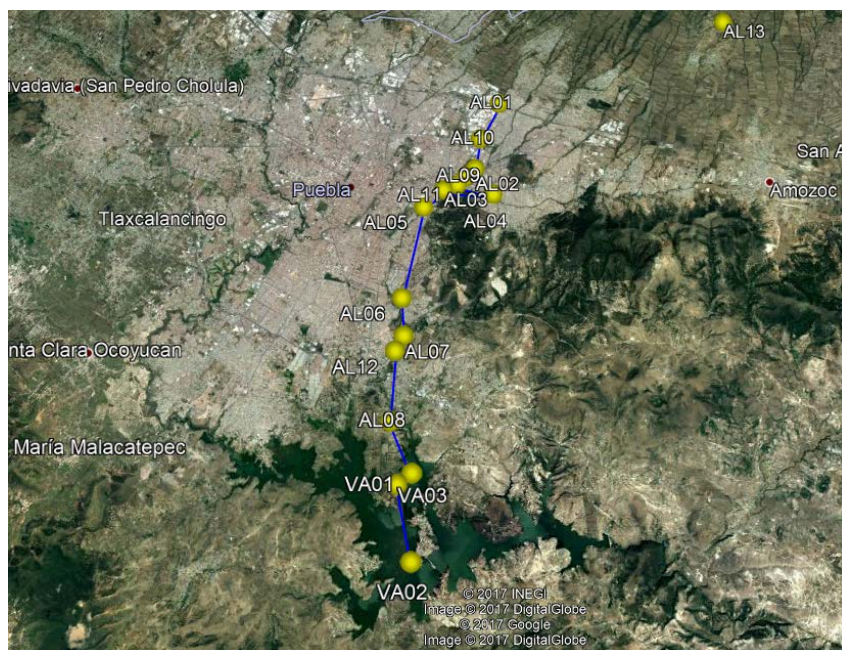


Figura 10. Geolocalización de los puntos de muestreo del Río Atoyac- Presa Manuel Ávila Camacho, Edo. De Puebla.

Elaboración propia en Google Earth Pro 2017

Tabla 6. Registro de los puntos de muestreo para Río Atoyac y Presa Manuel Ávila Camacho

Nombre	Fecha	Coordenadas
AL01	2 de mayo de 2017	19°4'32" N, 98°08'51" O
AL10	2 de mayo de 2017	19°3'38" N, 98°9'18" O
AL02	2 de mayo de 2017	19°2'54" N, 98°9'25" O
AL09	2 de mayo de 2017	19°2'42" N, 98°9'38" O
AL03	2 de mayo de 2017	19°2'23" N, 98°10'10" O
AL11	2 de mayo de 2017	19°2'31" N, 98°9'50" O
AL04	2 de mayo de 2017	19°2'15" N, 98°8'59" O
AL06	2 de mayo de 2017	18°59'49" N, 98°11'4" O
AL05	3 de mayo de 2017	19°1'57" N, 98°10'37" O
AL07	3 de mayo de 2017	18°58'58" N, 98°11'00" O
AL12	3 de mayo de 2017	18°58'38" N, 98°11'11" O
AL08	3 de mayo de 2017	18°57'6" N, 98°11'14" O
AL13	3 de mayo de 2017	19°6'37" N, 98°3'17" O
ALV02	4 de mayo de 2017	18°54'14" N, 98°10'42" O
ALV01	4 de mayo de 2017	18°56'1" N, 98°10'44" O
ALV03	4 de mayo de 2017	18°55'47" N, 98°11'3" O

Nota. Registro elaborado durante los días de muestreo.

8.2. Preparación de soluciones

Para el desarrollo de la investigación se prepararon paulatinamente el siguiente conjunto de soluciones. A continuación se muestran las tablas correspondientes a ellas así como una breve descripción.

La solución peptonada isotónica estéril es un diluyente isotónico para el enriquecimiento no selectivo preliminar de bacterias, para su estudio y normalización. La formulación y preparación se llevaron a cabo con base en lo establecido por la NOM-110-SSA1-1994 (1995).

TABLA 7. SOLUCIÓN PEPTONADA ISOTÓNICA ESTÉRIL (SPIE)SPIE

Peptona de caseína	1g
NaCl	8.5g
Agua destilada	1L

Nota: Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994, Bienes y servicios. Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico. En el Diario Oficial de la Federación, Estados Unidos Mexicanos, 10 de mayo de 1995

La solución Buffer-Fosfato, es una solución amortiguadora de pH. Esta solución se prepara a partir de Cloruro de Sodio, Fosfato de Sodio.

Tabla 8. Solución Buffer-Fosfato (PBS por sus siglas en inglés Phosphate Buffered Saline)

PBS	
NaCl	80g
KH₂PO₄	2g
Na₂HPO₄	11.64g
KCL	1g
Agua deionizada	1L

Nota: AAT Bioquest, Inc. (2017). PBS (Phosphate Buffered Saline) (1X, pH 7.4) recipe and preparation. Recuperado el 13 de enero de 2018, de <https://www.aatbio.com/resources/buffer-preparations-and-recipes/pbs-phosphate-buffered-saline>

El medio mineral es un medio de cultivo que contiene los nutrientes mínimos indispensables. Contiene una fuente de carbono para el crecimiento bacteriano; distintas sales, elementos esenciales como el magnesio, nitrógeno, fósforo y azufre. La formulación utilizada fue la solución A, a la que se le adicionan 0.5 mL de la solución B. Se optó por la formulación utilizada por Khamar et al. (2015) y Chapatwala et al. (1998).

Tabla 9. Medio Mineral o Medio Mínimo

MEDIO MINERAL	
Solución A	Solución B

K₂HPO₄	4.3g/L	+ 0.5mL	MnCl ₂	1mg/L
KH₂PO₄	3.4g/L		FeSO ₄	0.6mg/L
MgCl	0.3g/L		CaCl ₂	2.6mg/L
			NaMoO ₂	6mg/L

Nota: Chapatwala, K. D., Babu, G. R. V., Vijaya, O. K., Kumar, K. P., & Wolfram, J. H. (1998). Biodegradation of cyanides, cyanates and thiocyanates to ammonia and carbon dioxide by immobilized cells of *Pseudomonas putida*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 20(1), 28-33.; Khamar, Z., Makhdoumi-Kakhki, A., & Gharaie, M. M. (2015). Remediation of cyanide from the gold mine tailing pond by a novel bacterial co-culture. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 99, 123-128.

Los electrodos utilizados durante la fase de las pruebas de biodegradabilidad, HI 4009 y HI 4101 (Hanna Instruments), requieren la adición de una solución ISA para ajustar el pH así como proporcionar una fuerza constante iónica que permita medir la concentración de iones. En algunos casos elimina interferencias potenciales de los iones competidores que están presentes. De acuerdo a lo estipulado por laboratorios como Thermo Fisher Scientific, la solución ISA es una solución 10 M de NaOH, debido al volumen pequeño de las muestras se utilizó una solución 5M de NaOH. **Tabla 10. Solución Ajustadora de Fuerza Iónica (ISA)**

ISA (Solución NaOH[5M])	
NaOH	200g
Agua destilada	1L

Nota: Thermo Fisher Scientific Inc. (2018). Reagecon 500ML IONIC STRENGTH ADJUSTER AMMONIA ISA 10M NAOH 500. Recuperado el 13 de enero de 2018, de <http://www.fishersci.se/shop/products/11583092/11583092>

La solución TAE es un Medio usado para preparar gel de agarosa 1% y desarrollar la electroforesis. Recibe este nombre de las iniciales de sus componentes., el pH es alcalino, para que todos los grupos fosfato del DNA estén ionizados por completo y éste se mantenga cargado negativamente.

Tabla 11. Buffer Tris-acetato-EDTA (TAE) 1X

TAE 1X	
TAE 50X	20mL
Agua destilada	1L

Nota: Bio-Rad Laboratories. Run Agarose DNA Gels in Under 20 Minutes. *Bioeducation tech note*, United States. Recuperado el 2 de abril de 2018, de http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lse/literature/Bulletin_5396.pdf

8.3.Obtención del inóculo

Para las muestras de suelo correspondientes a la mina, en condiciones estériles empleando el método de cuartiles, se generó una mezcla homogénea de suelo. Esta muestra fue sometida a un tamizado utilizando una malla del #4 para la remoción de partículas de

gran tamaño y así lograr una granulometría uniforme en la muestra. Posteriormente, se realizaron soluciones 1:10 p/v de suelo/solución peptonada isotónica estéril (Tiong, 2015) en tubos cónicos de 50mL. Dicha disolución se dispuso en el vortex por unos minutos para obtener una mezcla intersticial entre el suelo y la SPIE.

Dicha disolución fue lavada mediante centrifugación en el equipo *Hermle Labnet Z326K*, bajo la siguiente programación:

- a) 500 rpm por 5 minutos (5 repeticiones), priorizando el sobrenadante entre cada repetición.
- b) Del sobrenadante priorizado transferir 1.5mL a un tubo de micro centrífuga, centrifugar a 10000 rpm por 5 minutos.
- c) Retirar sobrenadante y repetir operación b) las veces que sea necesario hasta obtener un pellet (precipitado) que servirá como inóculo para las posteriores pruebas de biodegradabilidad (Bakken, 1985).

Para las quince muestras del Río Atoyac y la Presa de Valsequillo se realizaron soluciones 1:4 v/v de lodos/solución peptonada isotónica estéril (Tiong, 2015) en vasos de precipitados de 1L. Se homogenizaron las muestras con ayuda de un agitador magnético durante una hora; esta mezcla se transfirió a conos imhoff, donde se dejó sedimentar por 12 horas en refrigeración. Transcurrido este lapso de tiempo se extrajo, de la zona más cercana a los sedimentos, 100mL de sobrenadante.

Las disoluciones fueron lavadas mediante centrifugación en el equipo *Hermle Labnet Z326K*, bajo la programación anteriormente empleada para las muestras de suelo de mina.

Para la conservación del inóculo, de ambos grupos de muestras, se centrifugó a 10000 rpm por 5 minutos, se descartó el sobrenadante y posteriormente se agregó SPIE, solución PBS, se re suspendió el pellet antes de agregar glicerol (Tabla 9) y finalmente se mezcló en vortex. Los tubos de micro centrífuga se almacenaron a -20°C.

Tabla 12. Preparación del inóculo para su conservación

Conservación del inóculo	
SPIE	750 µL
PBS	250 µL
Glicerol 60%	500µL

Resuspender

8.3.1. Pruebas preliminares

Las pruebas consistieron en la evaluación del comportamiento de los inóculos a distintas condiciones como lo fueron: medio nutritivo y mineral con un pH fijo de 9, concentraciones de cianuro de 0ppm, 5ppm, 10ppm, 20ppm y 50ppm, incubación a 20°C, 22°C y 28°C, 150rpm y 200rpm, por un periodo de tiempo de 36 horas a una semana. Los resultados obtenidos en la medición de la densidad óptica después de dicha ventana de tiempo a una longitud de onda de 540nm permitieron elegir el origen del inóculo a utilizar. Estas pruebas fueron sustanciales para brindar un panorama más certero y por lo tanto facilitar la puesta en marcha de las pruebas de biodegradabilidad, garantizando la viabilidad de las mismas.

8.4. Pruebas de biodegradabilidad

Para la puesta en marcha de las pruebas se empleó únicamente el inóculo del caso estudio, el cual comprende la muestra de relaves de la mina El Cubo. Todo el material empleado fue esterilizado con el fin de evitar interferencias que llegasen a comprometer el experimento. Se emplearon 10 matraces de 250mL, cuatro para correr las pruebas a 10ppm más su control negativo y cuatro para las pruebas de 20ppm más su control negativo. Al ser reactores aerobios se consideró que el volumen del matraz correspondería a 50% de medio líquido y 50% de aire, por lo que cada reactor fue llenado con 125mL de medio mineral previamente fijado a un pH de 9 así como calibrado a la concentración requerida de cianuros de 10ppm y 20ppm respectivamente, para finalmente ser inoculados con 250µL de muestra procesada de suelo de mina.

Posteriormente, los matraces fueron sellados utilizando un tapón de hule, dichos tapones poseían una varilla de vidrio de una longitud de 16cm ajustada al tamaño de los reactores. La sección de la varilla de vidrio que se encontraba al descubierto (parte superior del tapón) fue recubierta por una manguera de hule de 5cm de longitud, la cual fue adherida al mismo utilizando silicón. El propósito de colocar esta manguera corresponde a facilitar la extracción

diaria de 2mL utilizados en el monitoreo de los distintos parámetros (secciones 8.4.1 a 8.4.5), de igual forma útil en el muestreo diario de biomasa para posteriores análisis moleculares, así como realizar los cambios de medio a lo largo del experimento. Mientras no estaba en uso esta manguera se encontraba sellada con una pinza mohr.

Se utilizaron dos jeringas de plástico, una temporal de 50mL para realizar las extracciones diarias y otra de 20mL que permanecía asegurada al biorreactor para vigilar la posible producción de biogás. Finalmente los reactores fueron dispuestos a incubación en el equipo **Benchmark INCU SHAKER 101** bajo las siguientes condiciones: 25 a 30°C, 200rpm, por un periodo de estadía de 5 semanas. Para el monitoreo diario de la densidad óptica, pH, oxígeno disuelto, cianuros libres y NH_3 se detenía el equipo y se procedía a extraer rápidamente 1mL de muestra de cada reactor para efectuar las correspondientes mediciones. Las mediciones efectuadas con electrodos fueron monitoreados con el equipo multiparamétrico **Thermo Scientific Modelo: Orion 5 Star**. Los reactores se dejaban sedimentar de 20 a 30 minutos, al ver la separación de fases se procedía a extraer 1.5mL de biomasa.



Figura 11. Ejemplo de bioreactor elaborado y utilizado en las pruebas de biodegradabilidad.

Nota: Fotografía propia.

8.4.1. Monitoreo de densidad óptica

Antes de efectuar cualquier otra medición se realizaba el monitoreo diario de la DO en el espectrofotómetro rango UV y visible **VelaQuin Modelo VE-5100UV**, ajustado a una longitud de onda de 540nm.

8.4.2. Monitoreo de pH

Para el monitoreo de pH se utilizó un potenciómetro **Thermo Scientific Orion Triode Modelo PH4221-2BNW**, el cual fue calibrado utilizando el método de 3 puntos con amortiguadores de pH (4, 7, 10). Las mediciones se realizaban diario con el fin de monitorear que el medio permaneciera con un pH de 9 o superior, de presentar alguna variación se procedía a su ajuste inmediatamente.

8.4.3. Monitoreo de oxígeno disuelto

Se efectuó el monitoreo diario de oxígeno disuelto a través de un electrodo **Thermo Scientific Orion Dissolved Oxygen Probe Membrane Cap 080510MD**, el cual fue calibrado semanalmente con solución polarográfica Orion 080514 Thermo Scientific.

8.4.4. Monitoreo de cianuros libres

Se realizó el monitoreo diario de la degradación de cianuros libres a través de un electrodo ion selectivo **Hanna HI 4109 Cyanide Combination Electrode**. Para el uso adecuado del electrodo y debido a la constante variación del estado de éste, previo a realizar las mediciones diarias se efectuó una curva de calibración de 5 puntos para ajustarlas con el estado del sensor. Los puntos de la curva de calibración fueron los siguientes:

Tabla 13. Puntos para curva de calibración de CN⁻

PUNTO	[CN ⁻] PPM
1	2
2	5
3	10
4	20
5	50

Para realizar las mediciones con este sensor se requiere la adición de solución ISA (Tabla 10) a las muestras en una proporción de 4mL de ISA por cada 100mL de muestra.

8.4.5. Monitoreo de NH₃

Se realizó el monitoreo diario de la producción de NH₃ a través de un electrodo ion selectivo **Hanna HI 4101 ammonia ion selective electrode**. Para el correcto uso del electrodo se verificó su estado interno con 2 soluciones buffer **HI 4000-47** a pH 4 y **HI 4000-47** a pH 7. Debido a la constante variación del estado del sensor, previo a realizar las mediciones diarias se efectuó una curva de calibración de 4 puntos para ajustar las mediciones de NH₃. Los puntos de la curva de calibración fueron los siguientes:

Tabla 14. Puntos para curva de calibración de NH_3

PUNTO	$[\text{NH}_3]$ PPM
1	10
2	25
3	50
4	100

Para realizar las mediciones con este sensor se requiere la adición de solución ISA (Tabla 10) a las muestras en una proporción de 4mL de ISA por cada 100mL de muestra.

8.5. Identificación de bacterias

Finalizado el periodo de las pruebas de biodegradabilidad, en base a los parámetros monitoreados se seleccionaron los puntos de mayor interés para proceder a la aplicación de técnicas moleculares como la extracción de ADN y su amplificación con PCR punto final.

8.5.1. Extracción de ADN

La extracción del ADN genómico se efectuó utilizando el **DNeasy UltraClean Microbial Kit** catalog number 12224-50 según las instrucciones del proveedor (QUIAGEN) (Figura 12).



Figura 12. Kit de extracción de ADN utilizado en el experimento (QUIAGEN)

Las instrucciones que se siguieron para realizar la extracción de ADN fueron las siguientes:

1. Se agregaron 1.4mL de cultivo microbiano (bacterias) a un tubo de recolección de 2 mL y se centrifugó a 10,000 gravedades durante 30s a temperatura ambiente. Se decantó el sobrenadante y se centrifugó de nuevo a 10,000 gravedades durante 30s a temperatura

ambiente. Posteriormente se eliminó completamente el sobrenadante. *Nota: Dependiendo del tipo de cultivo microbiano, puede ser necesario centrifugar más de 30s.*

2. Se re suspendió el sedimento celular en 300µL de solución PowerBead y se agitó suavemente la mezcla en vortex. Se transfirieron las células re suspendidas a un tubo PowerBead.
3. Al Tubo PowerBead se agregaron 50 µL de Solución SL.
4. Se aseguraron los tubos PowerBead horizontalmente en la base de agitación del Vortex y éste se programó a velocidad máxima durante 15 min.
5. Los tubos PowerBead se centrifugaron por 1min a un máximo de 10,000 gravedades por 30s a temperatura ambiente.
6. A un tubo de recolección limpio de 2 ml se transfirió el sobrenadante. *Nota: esperar 200 µl de sobrenadante. Siempre transferir la misma cantidad de sobrenadante a los tubos de recolección.*
7. Se agregaron 100 µl de solución IRS al sobrenadante y se puso en vortex durante 5s. Incubar a 4°C para 5 minutos.
8. Se centrifugaron los tubos a 10,000 gravedades por 1 min a temperatura ambiente.
9. Evitando el sedimento, se transfirió todo el volumen del sobrenadante a una colección limpia de tubos de recolección de 2 ml. *Nota: esperar 300-350 µL de sobrenadante.*
10. Se agregaron 900 µL de Solución SB al sobrenadante y se puso en vortex durante 5s.
11. Se cargaron 700 µL en una columna MB Spin y se centrifugó a 10,000 gravedades durante 30s a temperatura ambiente. Se descartó el líquido en el tubo de recogida, posteriormente se agregó el sobrenadante restante a la MB Spin Column, y se centrifugó de nuevo a 10,000 gravedades durante 30s a temperatura ambiente. *Cada muestra procesada requirió 2-3 cargas. Se desechó todo el líquido del tubo de recogida.*
12. Se agregaron 300 µL de solución CB y se centrifugó a 10,000 gravedades durante 30s a temperatura ambiente.
13. El líquido en el tubo de recogida se descartó y se centrifugó a 10,000 gravedades por 1 min a temperatura ambiente.
14. La columna MB Spin fue colocada en un nuevo tubo de recolección de 2 mL.
15. Se agregaron 50 µL de solución EB al centro de la membrana del filtro blanco.
16. Se centrifugó a 10,000 gravedades durante 30s a temperatura ambiente.
17. Finalmente se descartó la columna MB Spin. Ahora el ADN está listo para aplicaciones posteriores. *Nota: Se almacenó el ADN en congelación preferentemente a -20°C o -80°C ya que la solución EB no contiene EDTA.*

A continuación en la Tabla 15 se muestra la selección de los puntos de mayor interés que fueron sometidos a análisis molecular.

Tabla 15. Selección de muestras para análisis molecular

#	Reactor	[CN ⁻]	Fecha de toma de muestra
1	M1	10ppm	21-Octubre-2017
2			01-Noviembre-2017
3			11-Noviembre-2017
4			13-Noviembre-2017
5			21-Noviembre-2017
6			16-Noviembre-2017
7	M2	20ppm	21-Octubre-2017
8			01-Noviembre-2017
9			02-Noviembre-2017
10			11-Noviembre-2017
11			13-Noviembre-2017
12			21-Noviembre-2017

8.5.2. Electroforesis en gel

Para determinar la presencia de ADN se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1% (1 g de agarosa en 100 ml de buffer TAE 1X). Se utilizó como guía base un marcador molecular **1 Kb Plus DNA Ladder Thermo Scientific**, cuya preparación se detalla en la Tabla 16. Para las muestras a ser inyectadas en los pozos del gel se tomaron en cuenta los criterios desglosados en la Tabla 17.

Tabla 16. Preparación de indicador molecular

INDICADOR MOLECULAR	
Marcador molecular 1 kb plus	1 µL
Colorante de carga de ADN 6x	1 µL
Agua milli-q	4 µL
Total	6 µL

Tabla 17. Cantidades a considerar para preparación de muestras a correr en el gel

CANTIDAD DE ADN	POCO ADN <380 µg/L	MINIMO A USAR 380-590 µg/L	MUCHO ADN >600 µg/L
Colorante de carga de ADN 6x	3 µL	1 µL	1 µL
ADN (muestra de reactor)	15 µL	5 µL	3 µL
Agua Milli-Q	----	----	2 µL
TOTAL	17 µL	6 µL	6 µL

El gel se corrió bajo el siguiente programa: 120V, 300mA y 60 minutos. Finalmente, el gel es bañado en bromuro de etidio durante 10 minutos y a 20rpm, posteriormente se enjuagó en agua destilada por el mismo periodo de tiempo y cantidad de rpm, para exponerse a luz UV en un transiluminador; dicha combinación permitirá visualizar las bandas de los productos ADN en el gel.

8.5.3. PCR punto final

Se llevó a cabo la amplificación de ADN a través de la técnica de PCR punto final, con el objetivo de hallar la presencia de las 4 clases de bacterias que se ha comprobado tienen especies capaces de degradar cianuro; se buscó identificar: *gammaproteobacterias*, *actinobacterias*, *alfaproteobacterias* y *bacilli*. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo utilizando Prime STAR Max Premix (2x) (Takara Clontech) haciendo uso del equipo de PCR punto final denominado termociclador marca Lux™ Thermal Cycler (Interchangeable Block System-Gradient & More). Los componentes utilizados para cada una de las reacciones pueden apreciarse en la Tabla siguiente:

Tabla 18. Componentes usados en la reacción PCR

Componente de la reacción de PCR	Volumen (μL)
Prime STAR Max Premix	12.5
Primer Mix	0.50
DNA (muestra de reactor)	2
Agua	10
TOTAL	25

8.5.4. Cebadores utilizados y condiciones PCR

8.5.4.1. Gammaproteobacterias

Se utilizaron los primers listados en la tabla así como las condiciones de PCR. Se utilizó la técnica de PCR para revelar la existencia de Gammaproteobacterias haciendo uso del primer mix universal Gamma359f + Gamma871r (Muhling, Woolven & Colin, 2008).

Tabla 19. Descripción detallada de la mezcla de sets de cebadores para programa para Gammaproteobacterias (Gamma359f + Gamma871r)

Primer	Secuencia	Dirección
--------	-----------	-----------

Gamma 395f	CMATGCCGCGTGTGTGAA	Forward
Gamma 871r	ACTCCCCAGGCGGTCDACTTA	Reverse
Muhling, M., Woolven, J., & Colin, M. (2008). Improved group-specific PCR primers for denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the genetic diversity of complex microbial communities. <i>The ISME Journal</i> , 2: 379- 392		

El programa de PCR empleado para las Gammaproteobacterias fue el siguiente

Tabla 20. Condiciones de PCR para Gammaproteobacterias.

#Etapa	Nombre de la etapa	Temperatura	Tiempo
1		98°C	4 minutos
2	32 ciclos	98°C	10 segundos
3		54°C	1 segundos
4		72°C	5 segundos
5		72°C	5 minutos
6		4°C	10 minutos
En las etapas 2.3 y 4 se repitieron por 32 ciclos.			

8.5.4.2. Alfaproteobacterias

Se utilizó la técnica de PCR para revelar la existencia de Alfaproteobacterias haciendo uso del primer mix universal *Alf28f* + *Alf684r* (Muhling *et al*, 2008).

Tabla 21. Descripción detallada de la mezcla de sets de cebadores para programa para Alfaproteobacteria (*Alf28f* + *Alf684r*)

Primer	Secuencia	Dirección
Alf 28f	ARCGAACGCTGGCGGCA	Forward
Alf 684r	TACGAATTTYACCTCTACA	Reverse
Muhling, M., Woolven, J., & Colin, M. (2008). Improved group-specific PCR primers for denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the genetic diversity of complex microbial communities. <i>The ISME Journal</i> , 2: 379- 392		

El programa de PCR empleado para las Alfaproteobacterias fue el siguiente

Tabla 22. Condiciones de PCR para Alfaproteobacterias.

#Etapa	Nombre de la etapa	Temperatura	Tiempo
1		98°C	4 minutos
2	32 ciclos	98°C	10 segundos
3		69°C	1 segundos
4		72°C	5 segundos

5	72°C	5 minutos
6	4°C	10 minutos
En las etapas 2.3 y 4 se repitieron por 32 ciclos.		

8.5.4.3. Actinobacteria

Se utilizó la técnica de PCR para revelar la existencia de Clase Actinobacteria haciendo uso del primer mix universal *Act664f* + *Act941r* (Yang *et al.*, 2008).

Tabla 23. Descripción detallada de la mezcla de sets de cebadores para programa PCR de Actinobacterias (*Act664f* + *Act941r*)

Primer	Secuencia	Dirección
Act664f	TGTAGCGGTGGAATGCGC	Forward
Act941r	AATTAAGCCACATGCTCCGCT	Reverse

Yang, Y. W., Chen, M. K., Yang, B. Y., Huang, X. J., Zhang, X. R., He, L. Q., Zhang, J., & Hua, Z. C. (2015). Use of 16S rRNA gene-targeted group-specific primers for real-time PCR analysis of predominant bacteria in mouse feces. *Applied and environmental microbiology*, 81(19), 6749-6756.

El programa de PCR empleado fue el siguiente.

Tabla 24. Condiciones de PCR para Actinobacteria

#Etapas	Nombre de la etapa	Temperatura	Tiempo
1		98°C	4 minutos
2	30 ciclos	98°C	10 segundos
3		65°C	5 segundos
4		72°C	5 segundos
5		72°C	5 minutos
6		4°C	59 minutos
En las etapas 2.3 y 4 se repitieron por 30 ciclos.			

8.5.4.4. Bacilli

Se utilizó la técnica de PCR para revelar la existencia de Clase Bacilli haciendo uso del primer mix universal *BacF* + *1378R* (Garbeva, 2013).

Tabla 25. Descripción detallada de la mezcla de sets de cebadores para programa PCR de Bacilli (*BacF* + *1378R*)

Primer	Secuencia	Dirección
BacF	GGGAAACCGGGGCTAATACCGGAT	Forward
1378R	CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG	Reverse

Garbeva, P., Van Veen, J. A., & Van Elsas, J. D. (2003). Predominant

Bacillus spp. in agricultural soil under different management regimes detected via PCR-DGGE. *Microbial Ecology*, 45(3), 302-316.

El programa de PCR empleado fue el siguiente.

Tabla 26. *Condiciones de PCR para Bacilli.*

#Etapa	Nombre de la etapa	Temperatura	Tiempo
1		98°C	4 minutos
2	35 ciclos	98°C	10 segundos
3		65°C	15 segundos
4		72°C	5 segundos
5		72°C	5 minutos
6		4°C	10 minutos
En las etapas 2,3 y 4 se repitieron por 35 ciclos.			

9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La degradación de cianuro efectuada en éste proyecto se evaluó mediante la realización de pruebas aerobias empleando para este fin 10 reactores (matraces) batch bajo condiciones controladas que garantizaron el desarrollo óptimo de las pruebas. Se realizaron dos experimentos, ambos sometidos a las mismas condiciones, el primero de ellos corresponde a las pruebas de 10ppm, donde el tiempo de estancia fue de 28 días (678 horas), presentando cambio de medio a los 11 días (264 hrs) y a los 22 días (528hrs). El segundo corresponde a las pruebas de 20ppm, donde el tiempo de estancia fue de 34 días (768 horas), presentando cambio de medio en el mismo periodo que para las pruebas de 10ppm.

9.1. Parámetros Monitoreados

A continuación se harán referencias a los diversos resultados en gráficas, en la Tabla 27 se encuentran las referencias utilizadas a lo largo de esta sección.

Tabla 27. Códigos utilizados de referencia para

Código	Significado
M1	Reactor 1
M2	Reactor 2
M3	Reactor 3
M4	Reactor 4
M0	Control Negativo
10 ppm	Gráficas referentes a experimento 1, la concentración de cianuro a 10 ppm
20 ppm	Gráficas referentes a experimento 2, la concentración de cianuro a 20 ppm

9.1.1. Oxígeno disuelto

Se monitoreo diariamente la concentración de oxígeno disuelto en los reactores, a continuación se presentan en la Figura 13 las mediciones diarias de oxígeno disuelto para los reactores a 10 ppm y en la Figura 14 las mediciones para los reactores a 20 ppm. Los matraces fueron incubados a 200 rpm con la finalidad de obtener un buen nivel de oxígeno disuelto.

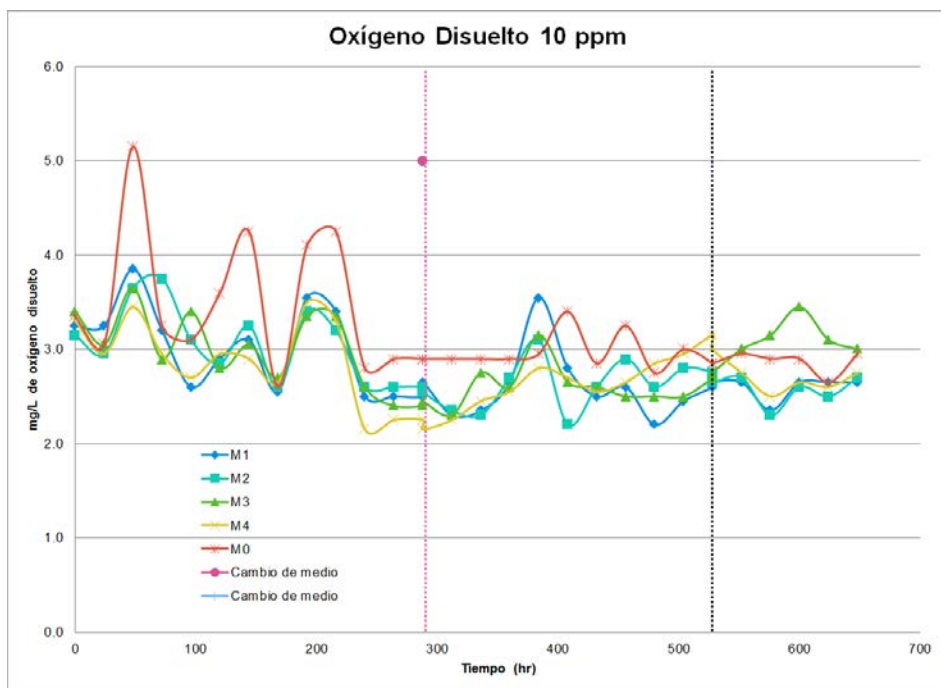


Figura 13. Mediciones diarias de oxígeno disuelto para los reactores a 10 ppm de CN

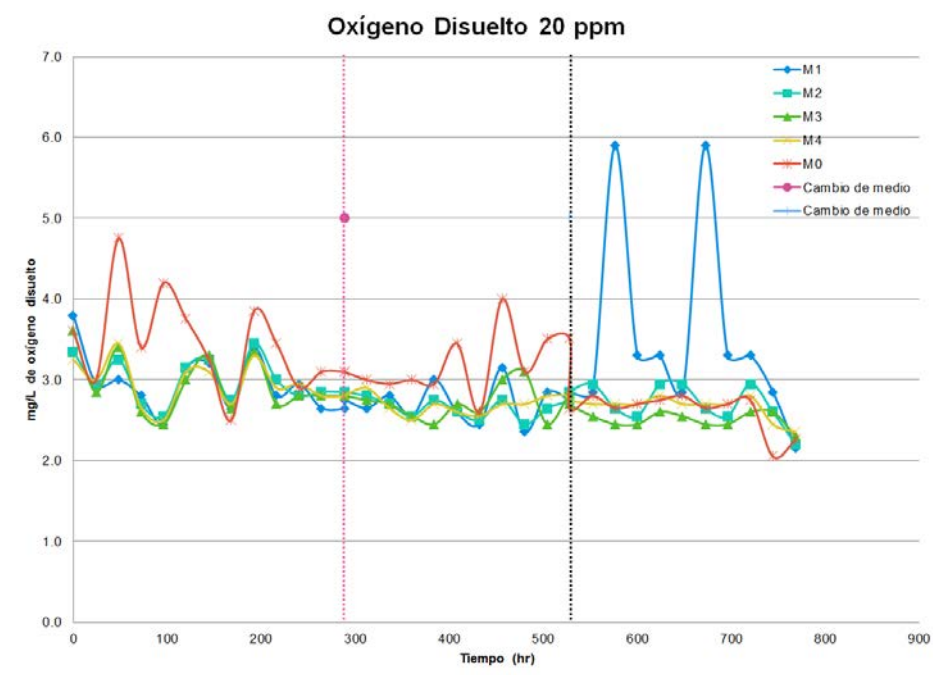


Figura 14. Mediciones diarias de oxígeno disuelto para los reactores a 20 ppm de CN

Al analizar el conjunto de información recabada a lo largo de los 32 días, se denoto un comportamiento similar para todos los reactores la mayoría de las mediciones entre 2.5 y 5 mg/L de oxígeno disuelto. Las condiciones que se esperaban eran superiores a 3 mg/L buscando una cantidad de oxígeno óptima para un ambiente aeróbico, sin embargo hubo momentos en los que el reactor posiblemente paso a condiciones aeróbicas facultativas.

Aunque el principal objetivo de este proyecto se basa en un tratamiento aeróbico, las bacterias que se esperan encontrar pueden ser tanto aeróbicas como aeróbicas facultativas como se muestra en la Tabla 4.

La variación entre mediciones y los niveles pudo tener lugar debido a el tipo de medición que se llevaba a cabo, para futuros experimentos se recomendaría el uso de sensor o electrodo de medición en tiempo real, ubicado en el interior de cada matraz, capaz de realizar mediciones en el correcto estado de la muestra (en agitación) y sin alteración en el régimen de alimentación de oxígeno al medio líquido.

De igual forma la falta de estabilidad entre mediciones puede estar relacionada al sistema *batch*, según Johnson (1967) el uso de un reactor continuo permite alcanzar después de un tiempo de estancia prolongado un equilibrio en el comportamiento de estas mediciones.

9.1.2. Potencial de Hidrógeno (pH)

El pH de los reactores se ajustó inicialmente en el medio mineral garantizando un control preliminar y uniforme de 9.5 en todos los reactores. Según Huertas *et al.* (2010) la degradación de cianuro se ve afectada por el pH, el cual debe ser estrictamente controlado.

Durante los ensayos se observó una variación de pH entre 9.5 y 8.5, por lo que se realizaron ajustes en diversos momentos del experimento a los reactores que presentaban bajo potencial de hidrogeno, a continuación se muestran las figuras 15 y 16 para 10 ppm y 20 ppm respectivamente.

Como se mencionó anteriormente se buscan bacterias alcalófilas capaces de resistir valores de pH arriba de 9 (Huertas *et al.* 2010), debido al manejo del cianuro; a menor pH mayor volatilización de cianuro, a mayor PH, mayor control del cianuro. Aunque las sales utilizadas para el medio mineral suelen ser parte de buffers con valores más neutros, también son utilizadas en diversas investigaciones para el cultivo de microorganismos en condiciones básicas (Khamar *et al.*, 2015; Tiong *et al.*, 2015; Mirizadeh, Yaghmaei & Nejad, 2014). el único inconveniente es la inminente necesidad de reajustar pH en diversas ocasiones, para ello se utilizó una solución NaOH 0.04N.

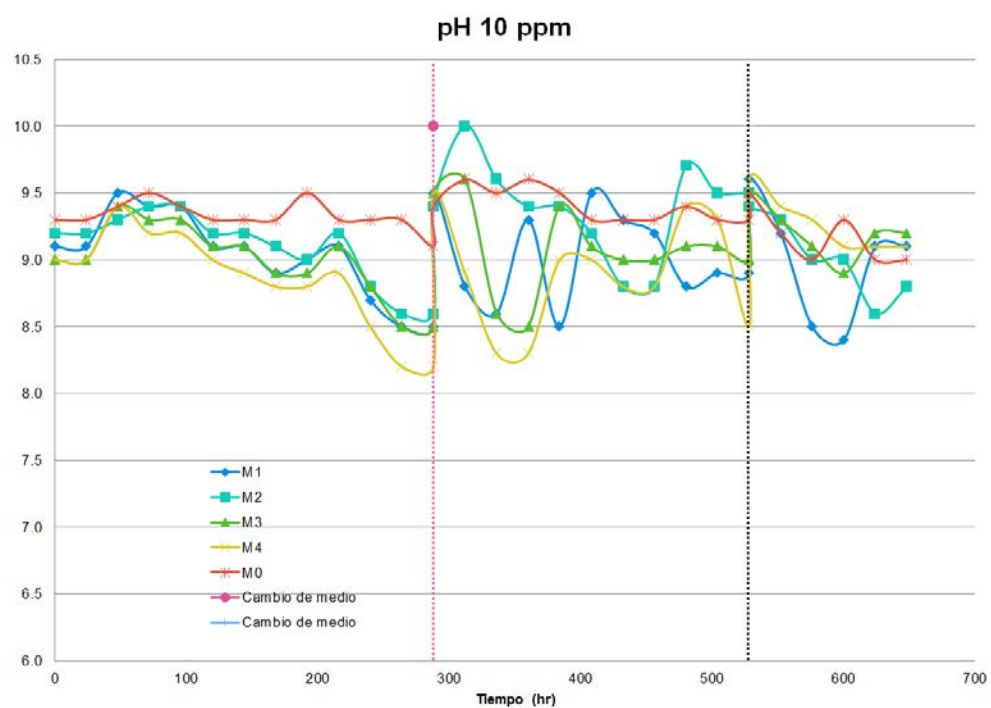


Figura 15. Mediciones diarias de pH para los reactores a 10 ppm de CN^-

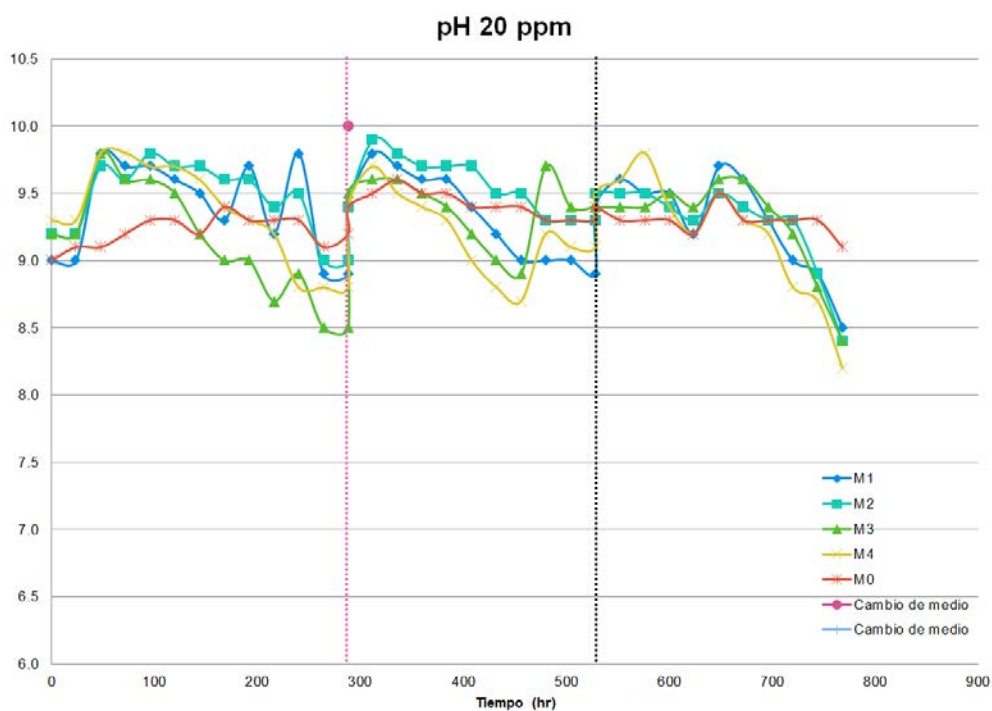


Figura 16. Mediciones diarias de pH para los reactores a 10 ppm de CN^-

9.1.3. Densidad Óptica

El monitoreo diario de este parámetro siempre fue lo primero de que lo que se realizaba lectura, aprovechando que la constante agitación de los reactores permitía obtener muestras perfectamente homogenizadas, otorgando lecturas acertadas respectivamente al crecimiento bacteriano en el medio.

Las figuras 17 y 18 muestran el comportamiento de la Densidad Óptica (DO) de ambos experimentos. Se puede observar claramente que conforme el tiempo de estancia del reactor aumentaba la DO lo hacía de igual manera en comparación con el valor inicial después de cada cambio de medio, implicando así que si había producción de biomasa en cada reactor y que la única fuente de carbono empleada en el medio mínimo se estaba cumpliendo su propósito.

Aunque existió un aumento de la DO, los valores no variaron tanto entre los iniciales y finales, al ser el cianuro la única fuente de carbono, el crecimiento de las bacterias se pudo ver alentado, según lo investigado por Tao, Bausch, Richmond, Blattner, & Conway (1999), usar un medio escaso puede influir en la velocidad y cantidad de reproducción de las bacterias. Para este proyecto se decidió trabajar con una única fuente carbono (Chapatwala, Babu, Vijaya, Kumar & Wolfram, 1998; Khamar *et al.*, 2015), buscando estresar a la bacteria lo suficiente como para desarrollar el mecanismo de degradación de cianuro. Nuestro objetivo era que fueran capaces de degradar el cianuro por lo que al utilizar una única fuente se puede garantizar esto. Adicionar una fuente de carbono como algunos autores recomiendan (Mirizadeh *et al.*, 2014) ayuda al aumento de la biomasa pero puede llegar a repercutir en la capacidad degradativa.

Para el experimento de 10ppm la lectura de mayor DO corresponde al matraz 1, con un tiempo de estancia de 144 horas con un valor 0.521 de absorbancia. Después del primer cambio de medio realizado a las 264 horas la lectura más alta de DO la registró el matraz 4 a un tiempo de 480 horas 0.298abs. Para el segundo cambio de medio se puede observar claramente como la DO aumenta en menor tiempo resultando la mayor lectura a en el matraz 1 a 576 horas con una DO de 0.514abs.

Por otra parte, para el experimento de 20ppm la lectura de mayor OD corresponde al matraz 1 a las 96 horas de estancia con un valor de 0.481abs. Después del primer cambio de medio registró su mayor lectura el matraz 4 a un tiempo de 336 horas con una OD de

0.206abs. Para el segundo cambio de medio la lectura de OD más elevada corresponde al matraz 4 con un valor de 0.347abs a un tiempo de 648 horas.

La razón por la que las primeras mediciones de OD presentaran valores mucho más elevados que aquellas mediciones después del cambio de medio, es debido a que el inóculo inicial llevará partículas de suelo de origen que por sus características arcillosas influyeron en esta lectura inicial.

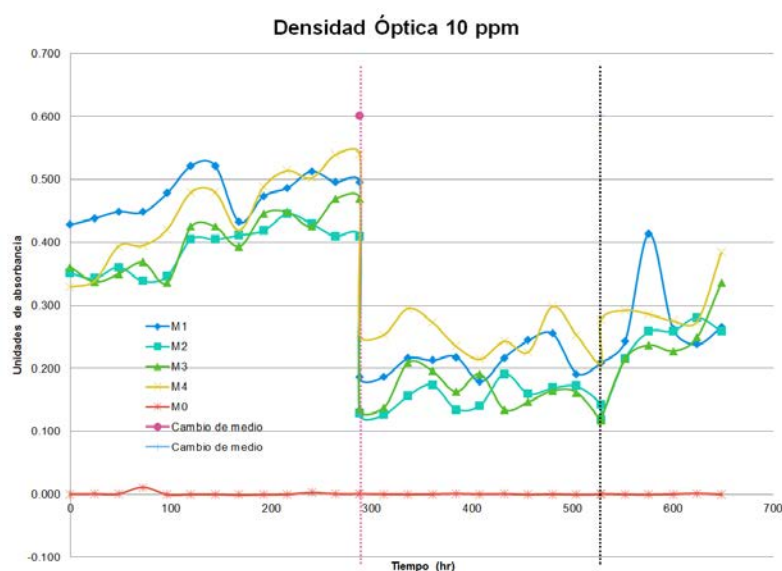


Figura 17. Mediciones diarias de densidad óptica para los reactores a 10 ppm de CN^-

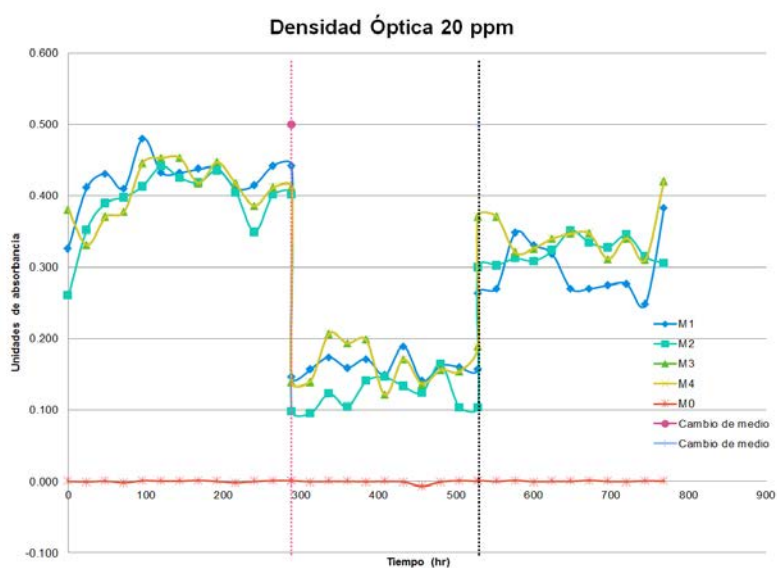


Figura 18. Mediciones diarias de densidad óptica para los reactores a 10 ppm de CN^-

9.1.4. Correlación entre cianuro y amoníaco

La representatividad de obtener el inóculo de un caso de estudio facilitó la puesta en marcha de las pruebas considerando el hecho de que las bacterias presentes ya habían interactuado con el contaminante a ser degradado, las mediciones de cianuro para cada experimento se encuentran en las Figuras 19 y 20 donde se aprecian las curvas de degradación, se puede notar que conforme paso el tiempo la velocidad de remoción era mucho mayor, para el segundo cambio de medio fueron necesarias alrededor de 96 horas de estancia para alcanzar las concentraciones que inicialmente tomaron 264.

En su gran mayoría los microorganismos capaces de degradar cianuro en condiciones aeróbicas han demostrado producir amoníaco como metabolito resultante de la degradación (Dash *et al.*, 2009), debido a esto se monitorearon los valores de NH_3 , dichas mediciones se encuentran en las Figuras 21 y 22, donde se puede apreciar un pico recurrente en los días cercanos al cambio de medio.

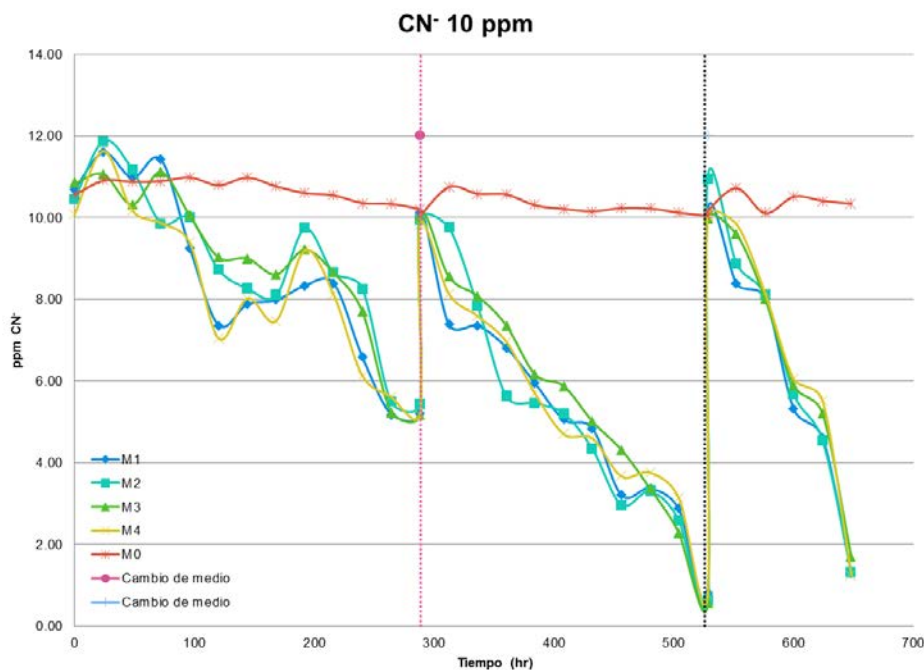


Figura 19. Mediciones diarias de la degradación de cianuro en los reactores a 10 ppm

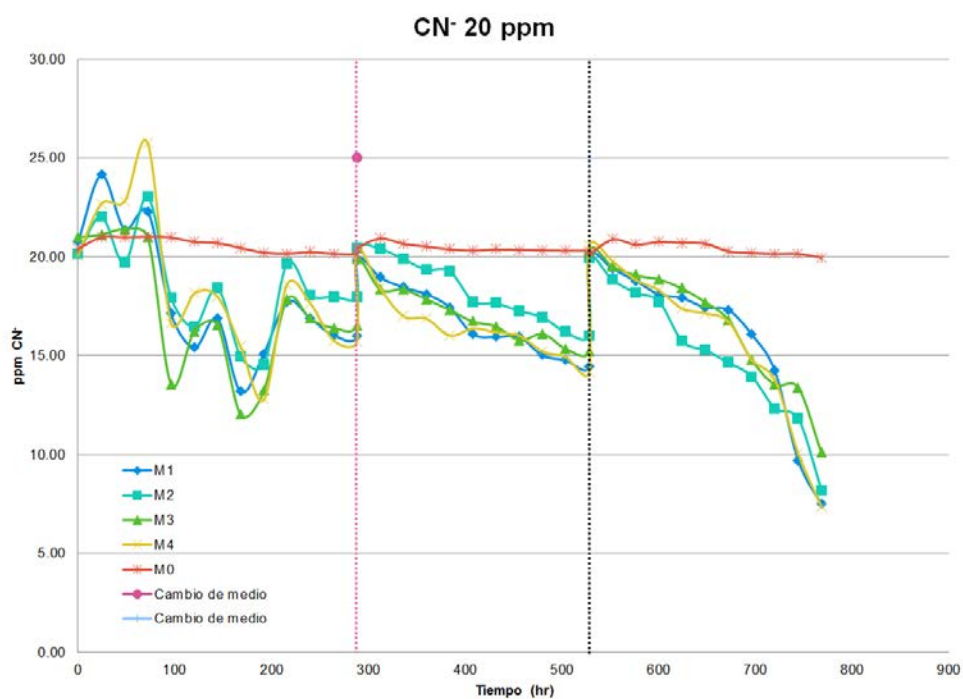


Figura 20. Mediciones diarias de la degradación de cianuro en los reactores a 20 ppm

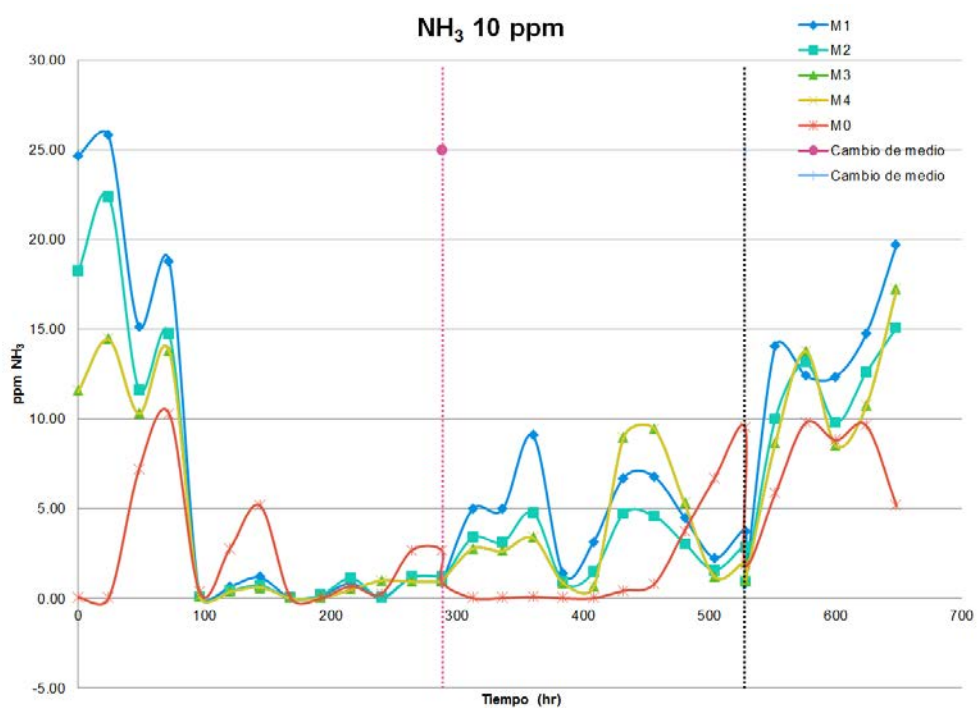


Figura 21. Mediciones diarias de amoníaco para los reactores a 10 ppm de CN

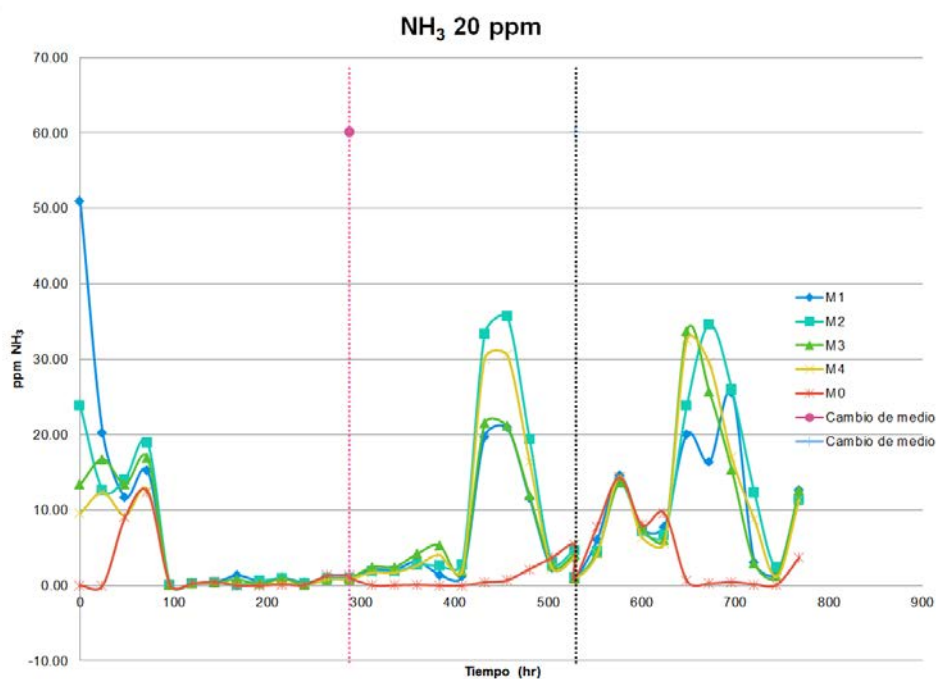


Figura 22. Mediciones diarias de amoníaco para los reactores a 20 ppm de CN

En las figuras 23 y 24 se puede observar la correlación existente entre el cianuro y amoníaco, donde durante las primeras dos fases del experimento tanto para 10 ppm y 20 ppm., se observa una casi nula relación entre ambos factores, sin embargo para la tercera fase del experimento se puede observar el comportamiento esperado donde existe una relación inversamente proporcional entre la degradación de cianuro y la producción de amoníaco, es posible que durante las primeras fases los metabolitos producidos fueran otros diferentes al amoníaco pues la biomasa se encontraba en un proceso de adaptación.

Cabe destacar que al tener un inoculo inicial donde quizá la diversidad de la muestra era mayor se pudo tener una presencia mayor de enzimas productoras de otros metabolitos como lo son la Cianuro Hidratasa, Nitrato Hidratasa, Cianidasa, entre otras mencionadas por Dash *et al.* (2009).

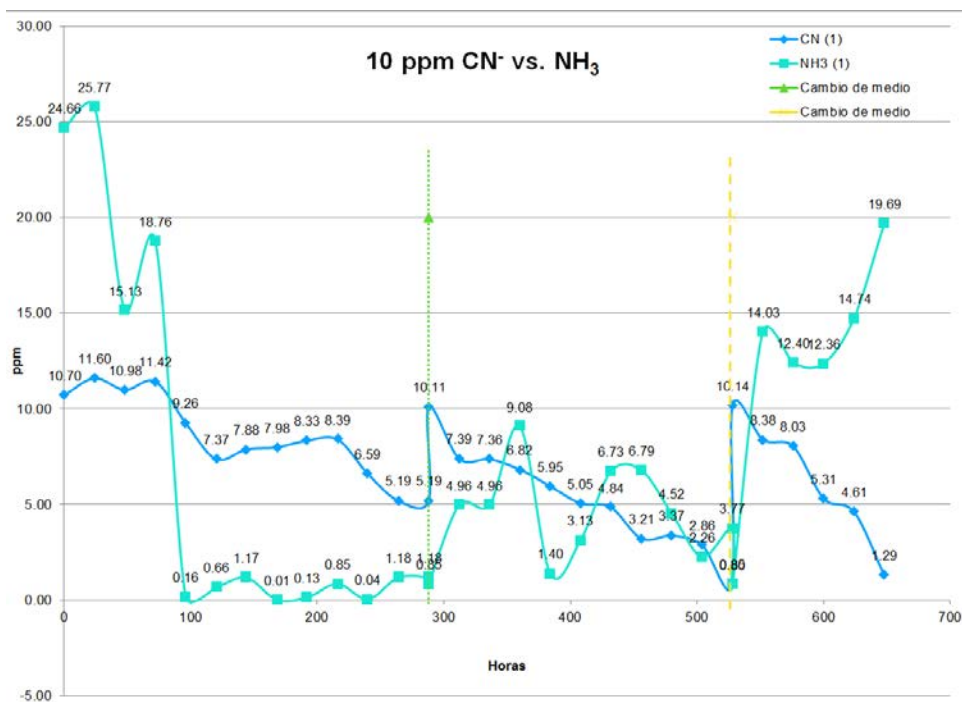


Figura 23. Mediciones diarias de cianuro contra amoniaco a 10 ppm. Gráfico del matraz 1 seleccionado como el de mejores resultados y utilizado para el análisis molecular.

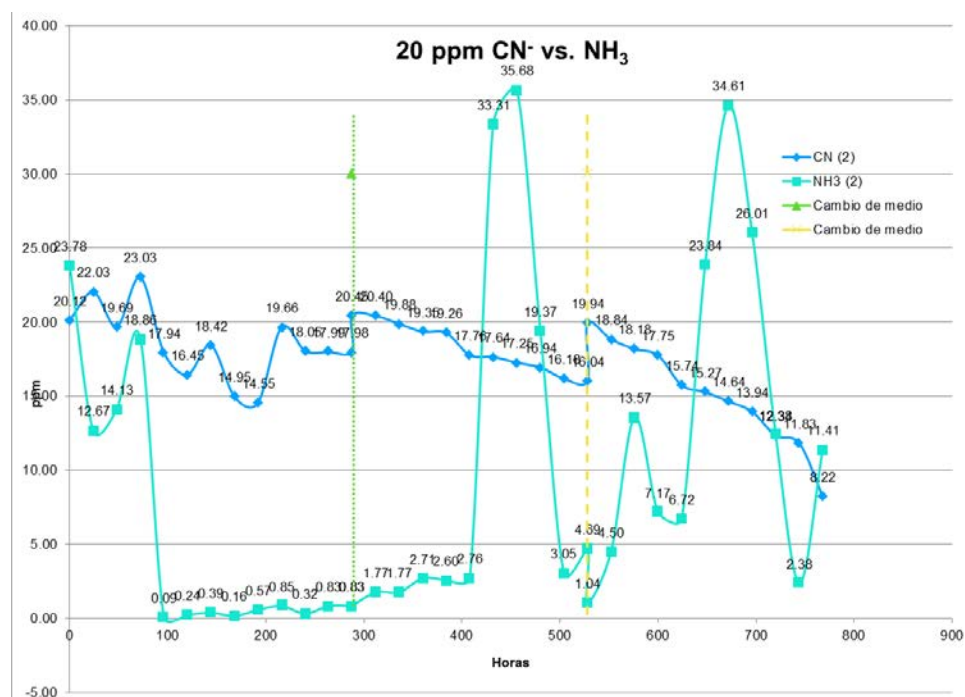


Figura 24. Mediciones diarias de cianuro contra amoniaco a 20 ppm. Gráfico del matraz 2 seleccionado como el de mejores resultados y utilizado para el análisis molecular.

9.2. Análisis molecular

De los puntos iniciales y finales de cada fase para cada experimento se analizaron por PCR los resultados donde se obtuvo la presencia de clases Gammaproteobacteria (Figura 25), Alphaproteobacteria (Figura 26), Actinobacteria (Figura 27) y Bacilli (Figura 28). Todos ellos conformados por 15 muestras cargadas en gel de agarosa, para ello se ejemplifica en la Tabla 28, el orden que se siguió en las imágenes mostradas a continuación.

Tabla 28. Orden de las muestras inyectadas en los geles de agarosa, para referencia de las figuras siguientes.

# de gel / # de cubeta	1	2	3	4	5	6	7	8
Exp. 1	Marcador molecular	Muestra 0	M. 288	M. 312	M. 528	M. 552	M. 528	M. 648
Exp. 2	Marcador molecular	Muestra 0	M. 288	M. 312	M. 528	M. 552	M. 528	M. 648

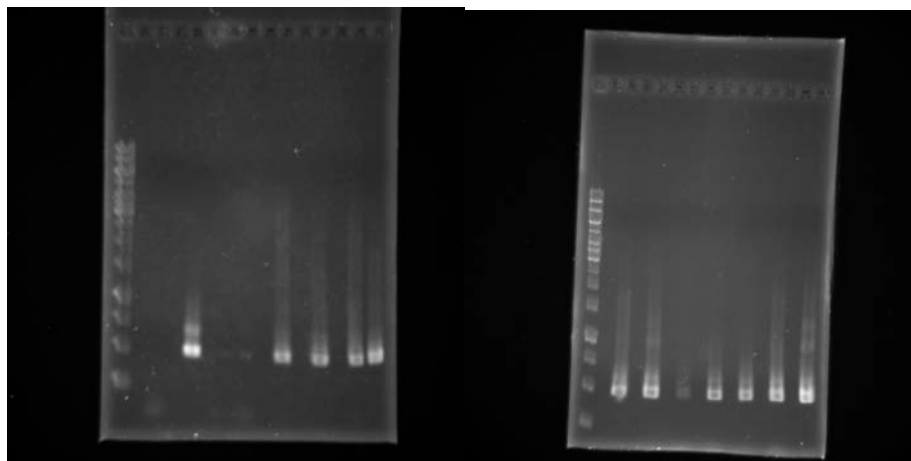


Figura 25. Amplificación Gammaproteobacterias

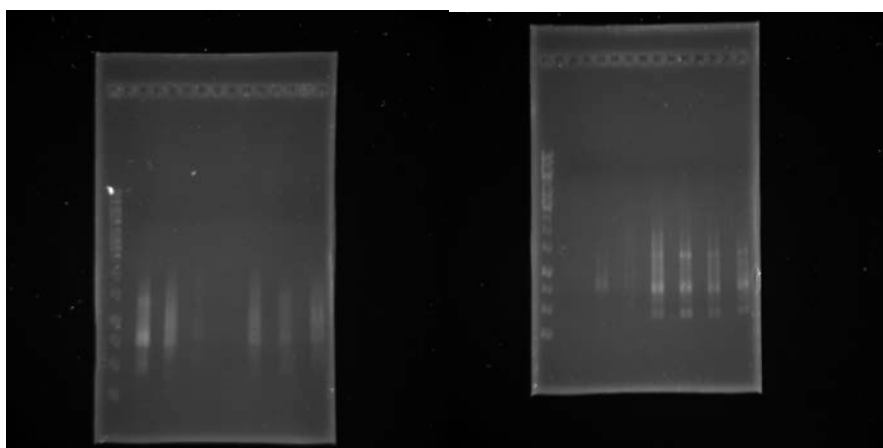


Figura 26. Amplificación Alfaproteobacterias

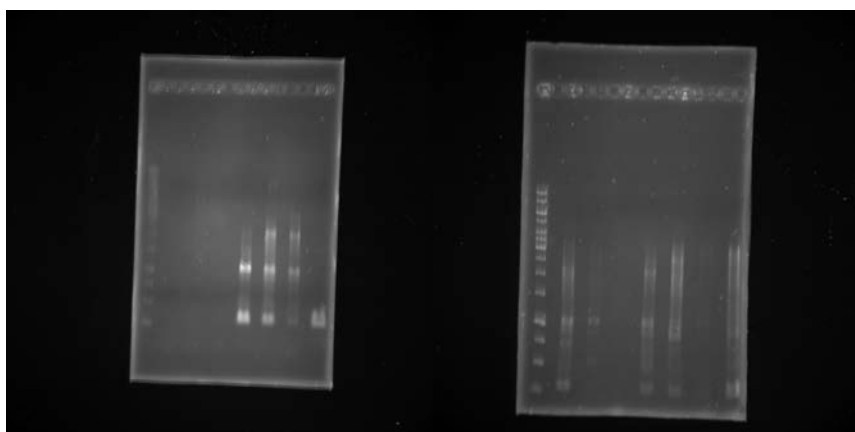


Figura 27. Amplificación Actinobacterias

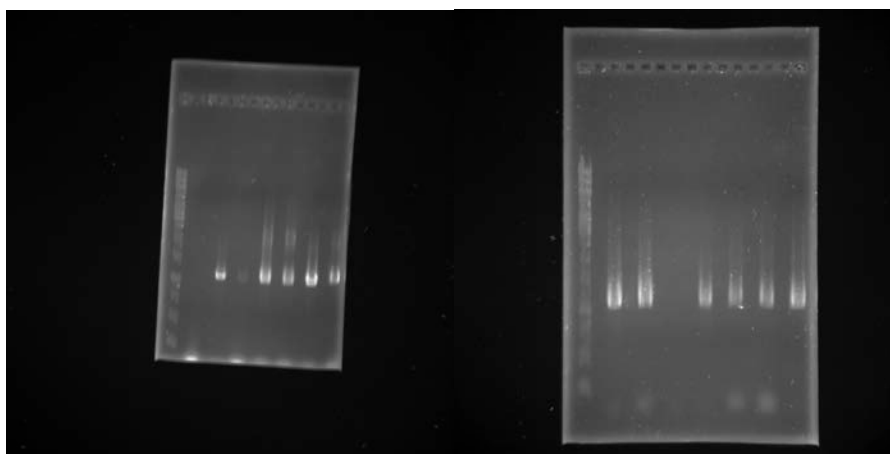


Figura 28. Amplificación Bacilli

10. CONCLUSIÓN

Al evaluar la capacidad degradativa de cianuro del inóculo bacteriano obtenido de la mina El Cubo en Guanajuato, mediante pruebas de biodegradabilidad a escala laboratorio de relaves subproducto de la minería de oro se lograron sentar las bases de un tratamiento terciario biológico de alto impacto en el rango de biodegradación de contaminantes cumpliendo la normatividad aplicable. Se demostró que al trabajar con inóculos nativos a la zona de estudio el éxito alcanzado en las pruebas fue rotundo, mostrando una rápida adaptación y supervivencia de las bacterias en un medio mineral prospectando así tiempos menores de estadía en futuras aplicaciones que esto conlleve. Se resalta la importancia del trabajo de un caso de estudio ya que la reproducibilidad de este proyecto es completamente viable para sentar las bases y consiguientes adaptaciones a futuros prospectos.

Se comprobó la presencia de microorganismos degradadores de cianuro, gracias a la PCR se pudo observar la diversidad de la muestra, lamentablemente por falta de tiempo ya no se pudo concluir con este proyecto, estos pequeños hallazgos abren la puerta a nuevas investigaciones y mayores alcances. Una vez comprobada la presencia de bacterias capaces de sobrevivir con el cianuro como única fuente de carbono la siguiente fase es la optimización de estas condiciones así como la estandarización de ellas para poder poner a prueba en planta piloto el inóculo obtenido.

BIBLIOGRAFÍA

- Adjei, M. D., & Ohta, Y. (2000). Factors affecting the biodegradation of cyanide by Burkholderia cepacia strain C-3. *Journal of bioscience and bioengineering*, 89(3), 274-277.
- Akcil, A. (2003). Destruction of Cyanide in Gold Mill Effluents: Biological versus Chemical Treatments. *Biotechnology Advances*, 21: 501-511.
- Akcil, A., & Mudder, T. (2003). Microbial destruction of cyanide wastes in gold mining: process review. *Biotechnology Letters*, 25(6), 445-450.
- Agencia para sustancias tóxicas y el registro de enfermedades [ATSDR]. (2014). Cianuro (Cyanide). Estados Unidos: Departamento de Salud y Servicios Humanos, Gobierno de Estados Unidos. Recuperado el 10 de marzo de 2016, de: http://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts8.html
- Alfani, F., Cantarella, M., Spera, A., & Viparelli, P. (2001). Operational stability of Brevibacterium imperialis CBS 489-74 nitrile hydratase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 11(4-6), 687-697.
- Asano, Y., Fujishiro, K., Tani, Y., & Yamada, H. (1982). Aliphatic nitrile hydratase from Arthrobacter sp. J-1 purification and characterization. *Agricultural and Biological Chemistry*, 46(5), 1165-1174.
- AAT Bioquest, Inc. (2017). PBS (Phosphate Buffered Saline) (1X, pH 7.4) recipe and preparation. Recuperado el 13 de enero de 2018, de <https://www.aatbio.com/resources/buffer-preparations-and-recipes/pbs-phosphate-buffered-saline>
- Bakken, L. (1985). Separation and purification of bacteria from soil. *American Society for Microbiology*, 49(6), 1482-1487.
- Baxter, J., & Cummings, S. P. (2006). The current and future applications of microorganism in the bioremediation of cyanide contamination. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 90(1), 1-17.
- Blakey, A. J., Colby, J., Williams, E., & O'Reilly, C. (1995). Regio-and stereo-specific nitrile hydrolysis by the nitrile hydratase from Rhodococcus AJ270. *FEMS microbiology letters*, 129(1), 57-61
- Botz, M., Mudder, T., & Akcil, A. (2005). Cyanide treatment: physical, chemical and biological processes. *Advances in gold ore processing*, 672-700.
- Cámara Minera de México [CAMIMEX]. (2017). *Informe Anual 2016. Estadísticas*. México: Autor. Recuperado de <https://www.camimex.org.mx/files/2615/0092/9348/05-Info17.pdf>

- Carrillo, G., & Astudillo, A. (2011). Evaluación de las emisiones de vapor mercurial en procesos de amalgamado artesanal: caso Cantón Ponce Enríquez, Provincia del Azuay. *MASKANA*, 2 (2), 71-81.
- Carroll, J. E. (2010). A Look at Chemical Degradation vs. Biodegradation of Cyanide and Metal-Complexed Cyanides Found in Industrial Wastewater Generated by the Mining Industry. Recuperado el 10 de marzo de 2016, de <http://home.eng.iastate.edu/~tge/ce421-521/jec.pdf>
- Chapatwala, K. D., Babu, G. R. V., Vijaya, O. K., Kumar, K. P., & Wolfram, J. H. (1998). Biodegradation of cyanides, cyanates and thiocyanates to ammonia and carbon dioxide by immobilized cells of *Pseudomonas putida*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 20(1), 28-33.
- Clark, D. P., & Pazdernik, N. J. (2013). *Molecular biology*. Elsevier. Recuperado el 15 de febrero de 2018, de <https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/polymerase-chain-reaction>
- Coll-Hurtado, A., Sánchez-Salazar, M. T., & Morales, J. (2002). *La minería en México: Geografía, historia, economía y medio ambiente 1.5*. 2. México, D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Cruz-Leyva, M. C. D. L., Zamudio-Maya, M., Corona-Cruz, A. I., González-de la Cruz, J. U., & Rojas-Herrera, R. A. (2015). Importancia y estudios de las comunidades microbianas en los recursos y productos pesqueros. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 2(4), 99-115.
- Cuadra, J. M. M. H. (2017). Filogenia bacteriana mediante el análisis del rRNA 16S.
- Dash, R. R., Gaur, A., & Balomajumder, C. (2009). Cyanide in industrial wastewaters and its removal: a review on biotreatment. *Journal of Hazardous Materials*, 163(1), 1-11.
- Davies, M., Martin, T. (2009). Mining market cycles and tailings dam incidents. *Proceedings of the 13th International Conference on Tailings and Mine Waste*, 1-4 November 2009, Banff, Alberta, Canada.
- Eisler, R., & Wiemeyer, S. N. (2004). Cyanide hazards to plants and animals from gold mining and related water issues. *Reviews of environmental contamination and toxicology* (pp. 21-54). Springer, New York, NY.
- Endeavour Silver. (2015). *Informe Anual y Reporte de Sustentabilidad 2015*. Vancouver, Canada: Endeavour Silver Corp. Recuperado el 3 de diciembre de 2016, de http://sp.edrsilver.com/_resources/2015_Endavour_Spanish_Web.pdf
- Endeavour Silver Corp. (2013). El Cubo, México. Recuperado el 5 de noviembre de 2016, de <https://csr.edrsilver.com/Spanish/sustentabilidad/informe-anual/el-cubo/default.aspx>

- Euzéby, J.P. (2016). List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1997, 47, 590-592. (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. <http://www.bacterio.net>).
- Figueira, M. M., Ciminelli, V. S., Andrade, M. C. D., & Linardi, V. R. (1996). Cyanide degradation by an *Escherichia coli* strain. *Canadian journal of microbiology*, 42(5), 519-523.
- Finnegan, I., Toerien, S., Abbot, L., Smit, F., & Raubenheimer, H. G. (1991). Identification and characterisation of an *Acinetobacter* sp. capable of assimilation of a range of cyano-metal complexes, free cyanide ions and simple organic nitriles. *Applied microbiology and biotechnology*, 36(1), 142-144.
- Garbeva, P., Van Veen, J. A., & Van Elsas, J. D. (2003). Predominant *Bacillus* spp. in agricultural soil under different management regimes detected via PCR-DGGE. *Microbial Ecology*, 45(3), 302-316.
- George, M. W. (2017). 2016 Minerals Yearbook Gold (pp. 31.1-31.8) (United States, U. S. Department of the Interior, U. S. Geological Survey).
- Given, B., Dixon, B., Douglas, G., Mihoc, R. & Mudder, T. (1998). Combined aerobic and anaerobic biological treatment of tailings solution at the Nickel Plate Mine. *The Cyanide Compendium on CD by Mining Journal Books Limited*, London, UK, ISBN 0-9537-33602.
- González, S. & Sahores, M. (2004). Impacto ambiental debido al uso de cianuro en la minería a cielo abierto. *Cianuro, metales pesados y drenaje ácido*. Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, 42
- Griem, W. (19 de marzo de 2017). Historia de la minería. Recuperado el 10 de marzo de 2018, de <http://www.geovirtual2.cl/depos/000Historia01.htm>
- Hanna Instruments. (s.f.). HI 4009 HI 4109 Cyanide Ion Selective Electrode: Instruction Manual. Hanna Instruments
- Hanna Instruments. (s.f.). HI 4101 Ammonia Ion Selective Electrode: Instruction Manual. Hanna Instruments
- Hard Rock Consulting, LCC. (2015). Updated Mineral Resource and Reserve Estimates for the El Cubo Project, Guanajuato State, Mexico. National Instrument 43-101 Technical Report. Vancouver, Canada: Endeavour Silver Corp. Recuperado el 5 de noviembre de 2016, de http://edrsilver.com/_resources/reports/El_Cubo_technical_report_march_2016.pdf
- Hernández, B. (20 de marzo de 2018). Mínimos daños por derrame de cianuro en San Dimas: Conagua. El Sol de Durango. Recuperado de <https://www.elsoldedurango.com.mx/local/minimos-danos-por-derrame-de-cianuro-en-san-dimas-conagua>

- Huertas, M. J., Sáez, L. P., Roldán, M. D., Luque-Almagro, V. M., Martínez-Luque, M., Blasco, R., Castillo, F., Moreno-Vivián, C., & García-García, I. (2010). Alkaline cyanide degradation by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 in a batch reactor. Influence of pH. *Journal of Hazardous Materials*, 179(1-3), 72-78.
- Ingvorsen, K., Højer-Pedersen, B., & Godtfredsen, S. E. (1991). Novel cyanide-hydrolyzing enzyme from *Alcaligenes xylosoxidans* subsp. *denitrificans*. *Applied and environmental microbiology*, 57(6), 1783-1789.
- Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático [INECC]. (2007). *Industria minera: Importancia de la minería en México*. Ciudad de México, México: INECC. Recuperado de http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/16/parte3_12.html
- Johnson, M. J. (1967). Aerobic microbial growth at low oxygen concentrations. *Journal of Bacteriology*, 94(1), 101-108.
- Kao, C. M., Liu, J. K., Lou, H. R., Lin, C. S., & Chen, S. C. (2003). Biotransformation of cyanide to methane and ammonia by *Klebsiella oxytoca*. *Chemosphere*, 50(8), 1055-1061.
- Khamar, Z., Makhdoumi-Kakhki, A., & Gharaie, M. M. (2015). Remediation of cyanide from the gold mine tailing pond by a novel bacterial co-culture. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 99, 123-128.
- King, B., Sheldon, J., & Long, G. (1997). *Practical Environmental Bioremediation: The Field Guide, Second Edition*.
- Kobayashi, M., NAGASAWA, T., & YAMADA, H. (1989). Nitrilase of *Rhodococcus rhodochrous* J1. *The FEBS Journal*, 182(2), 349-356.
- Komeda, H., Kobayashi, M., & Shimizu, S. (1996). A novel gene cluster including the *Rhodococcus rhodochrous* J1 nhlBA genes encoding a low molecular mass nitrile hydratase (L-NHase) induced by its reaction product. *Journal of Biological Chemistry*, 271(26), 15796-15802.
- Kossoff, D., Dubbin, W. E., Alfredsson, M., Edwards, S. J., Macklin, M. G., & Hudson-Edwards, K. A. (2014). Mine tailings dams: characteristics, failure, environmental impacts, and remediation. *Applied Geochemistry*, 51, 229-245.
- Kuyucak, N., & Akcil, A. (2013). Cyanide and removal options from effluents in gold mining and metallurgical processes. *Minerals Engineering*, 50-51, 13-29.
- Ley Minera. Publicada el 26 de Junio de 1992. En el Diario Oficial de la Federación, Estados Unidos Mexicanos, última Reforma, publicada DOF 11 de Agosto de 2014.
- Logsdon, M. J., Hagelstein, K., & Mudder, T. I. (1999). *The Management of Cyanide in Gold Extraction*. Ottawa, Ontario: International Council on Metals and the Environment [ICME].

- Meyers, P. R., Gokool, P., Rawlings, D. E., & Woods, D. R. (1991). An efficient cyanide-degrading *Bacillus pumilus* strain. *Microbiology*, 137(6), 1397-1400.
- Mirizadeh, S., Yaghmaei, S., & Nejad, Z. G. (2014). Biodegradation of cyanide by a new isolated strain under alkaline conditions and optimization by response surface methodology (RSM). *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 12(1), 85.
- Mudder, T., Fox, F., Whitlock, J., Fero, T., Smith, G., Waterland, R. & Vietl, J. (1998). The homestake wastewater treatment process. Part 2: operation and performance. *The Cyanide Compendium on CD by Mining Journal Books Limited*, London, UK, ISBN 0-9537-33602.
- Muhling, M., Woolven, J., & Colin, M. (2008). Improved group-specific PCR primers for denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the genetic diversity of complex microbial communities. *The ISME Journal*, 2: 379- 392
- Müller, J., & Frimmel, H. E. (2010). Numerical analysis of historic gold production cycles and implications for future sub-cycles. *The Open Geology Journal*, 4(1), 29-34.
- Naranjo, D. (2012). Flotación directa de oro nativo grueso, como sustituto de la amalgamación tradicional. *Universidad Nacional de Colombia*. Recuperado el 3 de diciembre de 2016, de <http://www.bdigital.unal.edu.co/7226/1/43469333.2012.pdf>
- National Wildlife Health Center. (1999). Field Manual of Wildlife Diseases: Birds. Chapter 46 Cyanide. Imagen: Schematic of a typical heap leach system. pg. 341. Washington, D.C. Estados Unidos de América.
- Nava-Alonso, F., Elorza, E., Pérez-Garibay, R., & Uribe-Salas, A. (2007). Análisis químico de cianuro en el proceso de cianuración: revisión de los principales métodos. *Revista de metalurgia*, 43 (1), 20-28. doi:10.3989/revmetalm.2007.v43.i1.48
- NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-110-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. PREPARACIÓN Y DILUCIÓN DE MUESTRAS DE ALIMENTOS PARA SU ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO. En el Diario Oficial de la Federación, Estados Unidos Mexicanos, 10 de mayo de 1995
- Oller, I., Malato, S., & Sánchez-Pérez, J. (2011). Combination of Advanced Oxidation Processes and biological treatments for wastewater decontamination—A review. *Science of The Total Environment*, 409(20), 4141-4166.
- Ortiz-Azañero, A. (2001). Recuperación de oro y plata de minerales por HeapLeaching. *Departamento Académico de Ingeniería Metalúrgica-UNMSM*, telefax: 452-1521. Recuperado el 10 de marzo de 2016, de: http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtual/publicaciones/geologia/v04_n7/recup_oro_plata.htm

- Parga, J.R., & Carrillo, F.R. (1996). Avances en los métodos de recuperación de oro y plata de minerales refractarios. *Revista de Metalurgia*, 32 (4), 254-261. doi:10.3989/revmetalm.1996.v32.i4.907
- Peña-Moran. (26 de Enero de 2015). Cianuro en las minas de México [Gráfico]. Grupo ECOTiciasS.L.. México. Recuperado el 8 de abril de 2016 de http://www.ecoticias.com.mx/noticia/cianuro-en-las-minas-de-mexico_4656
- Presa de Jales (2015). Construcciones y Remodelación de Tierra Caliente S. A. de C. V.. México. Recuperado el 8 de abril de 2016 de <http://construccionestierracaliente.com.mx/contacto.html>
- Procuraduría Federal de Protección al Ambiente [PROFEPA]. (16 de marzo de 2018). *ATIENDE PROFEPA DERRAME DE SOLUCIÓN CIANURADA AL RÍO PIAXTLA EN MUNICIPIO DE SAN DIMAS, DURANGO*. (BP/298-18). Ciudad de México, México: PROFEPA. Recuperado el 10 de abril de 2018, de <https://www.gob.mx/profepa/prensa/profepa-realiza-jornada-por-la-industria-limpia-incidir-en-el-empresariado-mexicano-sobre-la-responsabilidad-en-el-cuidado-ambiental>
- Procuraduría Federal de Protección al Ambiente [PROFEPA]. (20 de marzo de 2018). *INSPECCIONARÁ PROFEPA A PRIMERO EMPRESA MINERA, S.A. DE C.V., PARA DETERMINAR AFECTACIÓN A SUELO POR DERRAME DE SOLUCIÓN CIANURADA*. (BP/317-18). Ciudad de México, México: PROFEPA. Recuperado el 10 de abril de 2018, de <https://www.gob.mx/profepa/prensa/inspeccionara-profepa-a-primero-empresa-minera-s-a-de-c-v-para-determinar-afectacion-a-suelo-por-derrame-de-solucion-cianurada>
- RahilKhan, A. (2016). Gold Extraction & Recovery Processes. 911 Metallurgist a Practical Guide to Mineral Processing Engineering. Recuperado el 3 de diciembre de 2016, de <https://www.911metallurgist.com/blog/gold-extraction-recovery-processes>
- Rajalakshmi, S. (2017). DIFFERENT TYPES OF PCR TECHNIQUES AND ITS APPLICATIONS. *International Journal of Pharmaceutical, Chemical & Biological Sciences*, 7(3).
- Ramírez, J. A., Rosano-Ortega, G., Garrido-Hoyos, S. E., & Cruz-Juárez, G. (2015). Estudio del efecto de ozonación en la estabilización del cianuro presente en relaves de la industria minera de Au y Ag (Tesis de licenciatura). Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla, Puebla, México.
- Rico, M., Benito, G., Salgueiro, A. R., Díez-Herrero, A., & Pereira, H. G. (2008). Reported tailings dam failures: A review of the European incidents in the worldwide context. *Journal of hazardous materials*, 152(2), 846-852.

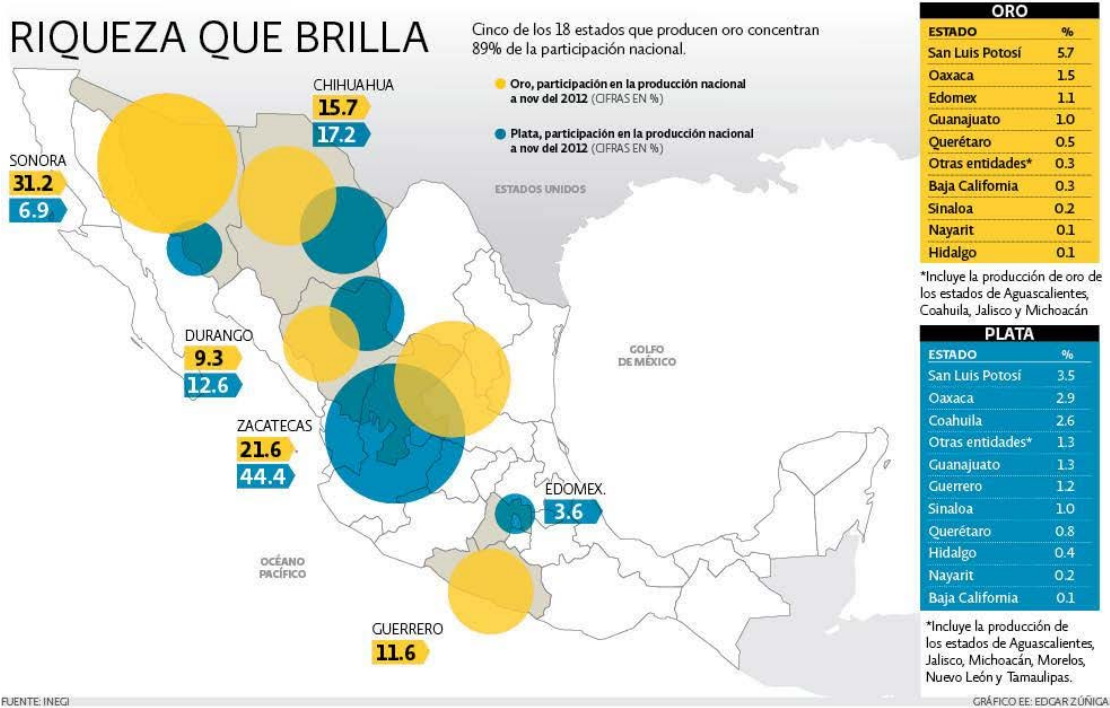
- Rodicio, R. M., & Mendoza, C. M. (2004). Identification of bacteria through 16S rRNA sequencing: Principles, methods and applications in clinical microbiology. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 22(4), 238-245.
- Salinas, E., Rivera, I., Carrillo, R., Patiño, F., Hernández, J., & Hernández, L. E. (2004). Mejora del proceso de cianuración de oro y plata, mediante la preoxidación de minerales sulfurosos con ozono. *Revista de la Sociedad Química de México*, 48 (4), 315-320.
- Sánchez-Albavera, F., & Lardé, J. (2006). *Minería y competitividad internacional en América Latina*. CEPAL, ONU.
- Schaffartzik, A., Mayer, A., Eisenmenger, N., & Krausmann, F. (2016). Global patterns of metal extractivism, 1950–2010: Providing the bones for the industrial society's skeleton. *Ecological Economics*, 122, 101-110.
- Secretaría de Economía. (2018). *Minería; El sector minero-metalúrgico en México contribuye con el 4 por ciento del Producto Interno Bruto nacional*. México: Secretaría de Economía. Recuperado de <https://www.gob.mx/se/acciones-y-programas/mineria>
- SenGupta, C. (1995). *Hazardous and Industrial Waste Proceedings, 27th Mid-Atlantic Conference*.
- Söderholm, K., Söderholm, P., Helenius, H., Pettersson, M., Viklund, R., Masloboev, V., Mingaleva, T., & Petrov, V. (2015). Environmental regulation and competitiveness in the mining industry: Permitting processes with special focus on Finland, Sweden and Russia. *Resources Policy*, 43, 130-142.
- Stefanov, W. (2002). *ISS004-E-5201*. Estados Unidos de America: National Aeronautics and Space Administration [NASA]. Recuperado de <https://eol.jsc.nasa.gov/SearchPhotos/photo.pl?mission=ISS004&roll=E&frame=5201>
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*, 2(2), 70-78.
- Tangient LLC. (2015). Flotación. Recuperado el 3 de diciembre de 2016, de <http://procesosbio.wikispaces.com/Flotaci%C3%B3n>
- Tao, H., Bausch, C., Richmond, C., Blattner, F. R., & Conway, T. (1999). Functional genomics: expression analysis of *Escherichia coli* growing on minimal and rich media. *Journal of bacteriology*, 181(20), 6425-6440.
- Tetreault, D. (2012). La minería mexicana en el contexto internacional. *Observatorio del desarrollo. Investigación, reflexión y análisis*, 1 (3), 18-20.

- Thermo Fisher Scientific Inc. (2018). Reagecon 500ML IONIC STRENGTH ADJUSTER AMMONIA ISA 10M NAOH 500. Recuperado el 13 de enero de 2018, de <http://www.fishersci.se/shop/products/11583092/11583092>
- Thomas, Y. C. (1993). Bacteria: Teaching Old Bugs New Tricks, *National Geographic Society*. Recuperado de: http://www.flora-balance.com/health_beneficial_bacteria.html
- Tiong, B., Bahari, Z. M., Lee, N. S. I. S., Jaafar, J., Ibrahim, Z., & Shahir, S. (2015). Cyanide degradation by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* strain W2 isolated from mining effluent. *Sains Malaysiana*, 44(2), 233-238.
- USEPA, Guidance manual for electroplating and metal finishing pretreatment standards. Effluent Guidelines Division: Office of Water Regulations and standards and Permits Division: Office of Water Enforcement and Permits, 1-1, February, 1984, pp. 5-24.
- Vaghn., P. (2011) .Efectos del cianuro en la salud y el ambiente. CAEM. Recuperado el 10 de marzo de 2016, de: http://wp.cedha.net/wp-content/uploads/2011/06/efecto_cianuro_en_la_salud_humana.pdf
- van Buuren, C., Makhotla, N., & Olivier, J. W. (2011). The ASTER process: technology development through to piloting, demonstration and commercialization. *In Proceedings of the ALTA* (pp. 23-28).
- Volke-Sepúlveda, T. & Velazco, J. A. (2002). *Tecnologías de remediación para suelos contaminados*. Mexico, Ciudad de México. Instituto Nacional de Ecología (INE-SEMARNAT)
- Wark, J. (15 de julio de 2007). Homestake Gold Mine. AirPhoto. Recuperado el 8 de abril de 2016 de <http://www.airphotona.com/image.asp?imageid=14658>
- Watanabe, A., Yano, K., Ikebukuro, K., & Karube, I. (1998). Cyanide hydrolysis in a cyanide-degrading bacterium, *Pseudomonas stutzeri* AK61, by cyanidase. *Microbiology*, 144(6), 1677-1682.
- Whitlock, J. L. (1990). Biological detoxification of precious metal processing wastewaters. *Geomicrobiology Journal*, 8(3-4), 241-249.
- Woese, C. R., Kandler, O., & Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(12), 4576-4579.
- Yang, Y. W., Chen, M. K., Yang, B. Y., Huang, X. J., Zhang, X. R., He, L. Q., Zhang, J., & Hua, Z. C. (2015). Use of 16S rRNA gene-targeted group-specific primers for real-time PCR analysis of predominant bacteria in mouse feces. *Applied and environmental microbiology*, 81(19), 6749-6756.

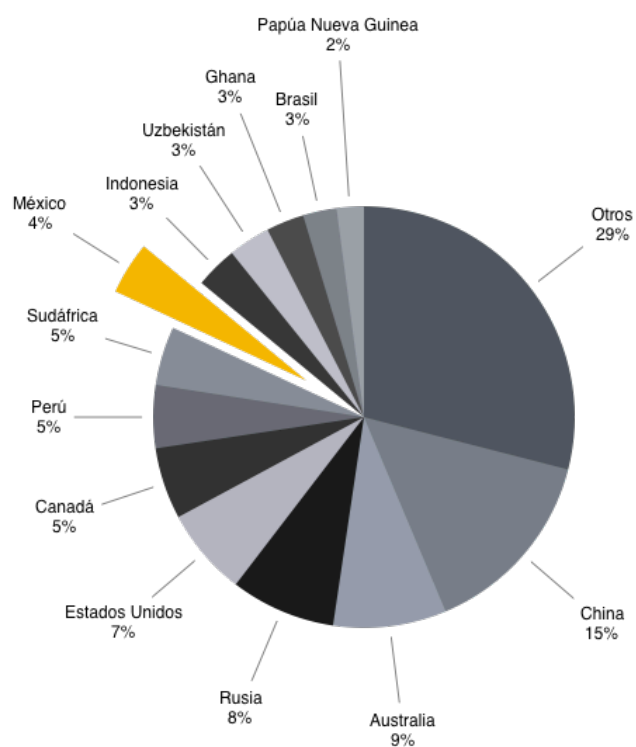
Zuñiga, E. (6 de febrero de 2013). Riqueza que brilla [Gráfico]. En INEGI, *El Economista*. Recuperado el 8 de abril de 2016 de <http://eleconomista.com.mx/infografias/2013/02/06/riqueza-que-brilla>

ANEXOS

Anexo 1. Gráficos



Anexo 1.1. Mapa de las zonas de importancia minera (oro y plata) de México
Fuente: Zuñiga, E. (6 de febrero de 2013). Riqueza que brilla [Gráfico]. En INEGI, El Economista. Recuperado el 8 de abril de 2016 de <http://eleconomista.com.mx/infografias/2013/02/06/riqueza-que-brilla>



Anexo 1.2. Gráfico de los principales países productores de oro

Fuente: George, M. W. (2017). 2016 Minerals Yearbook Gold (pp. 31.1-31.8) (United States, U. S. Department of the Interior, U. S. Geological Survey).



Anexo 1.3. Publicidad contra el uso del cianuro en España

Fuente: Peña-Moran. (26 de Enero de 2015). Cianuro en las minas de México [Gráfico]. Grupo ECOTiciasS.L.. México. Recuperado el 8 de abril de 2016 de http://www.ecoticias.com.mx/noticia/cianuro-en-las-minas-de-mexico_4656



Anexo 1.4. Mina Home Stake Gold en Dakota del Sur

Fuente: Wark, J. (15 de julio de 2007). Homestake Gold Mine. AirPhoto. Recuperado el 8 de abril de 2016 de <http://www.airphotona.com/image.asp?imageid=14658>

Anexo 1.5 Descripción detallada de la mezcla de sets de cebadores para programa para *Betaproteobacteria* (Beta359f + Beta682r)

Primer	Secuencia	Dirección	Referencia
Beta359f	CMATGCCGCGTGTGTGAA	Forward	The ISME Journal. 2: 379-392.
Beta682r	ACTCCCCAGGCGGTCDACCTTA	Reverse	The ISME Journal. 2: 379-392.

El programa de PCR empleado para las *Betaproteobacterias* fue el siguiente

Anexo 1.6 Condiciones de PCR para *Betaproteobacterias*.

#Etapas	Nombre de la etapa	Temperatura	Tiempo
1		98°C	4 minutos
2	32 ciclos	98°C	10 segundos
3		63°C	1 segundos
4		72°C	5 segundos
5		72°C	5 minutos
6		4°C	10 minutos
En las etapas 2,3 y 4 se repitieron por 32 ciclos.			

Anexo 2. Plan de muestreo suelo



**Plan de muestreo para relaves
mineros y suelo**

DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN

UPAEP

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	3
PLAN DE MUESTREO.....	3
REGISTRO Y CADENA DE CUSTODIA.....	8
CUESTIONARIO.....	9
STAFF TÉCNICO.....	10
GLOSARIO.....	11
REFERENCIAS.....	11
ANEXOS.....	12

INTRODUCCIÓN

Un muestreo es una actividad que requiere de la observación estricta de las técnicas y procedimientos de toma, preservación, transporte y custodia de las muestras.

El diagrama 1 muestra los pasos que verán seguirse para asegurar un muestreo confiable. Posteriormente se describe cada paso.

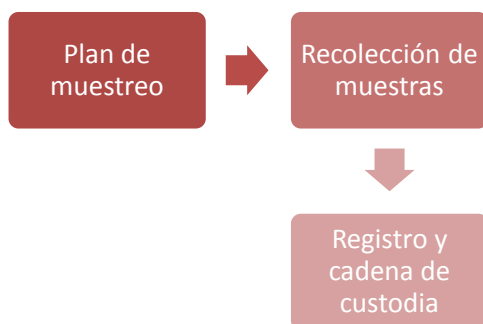


Diagrama 1. Pasos de un muestreo confiable.

PLAN DE MUESTREO

El plan de muestreo **evita errores y minimiza la posibilidad de invalidar resultados obtenidos**. Los análisis de calidad del agua son caros y por tanto debe asegurarse de que las muestras sirvan a los objetivos de la visita de inspección.

Se han elaborado dos **planes de muestreo**, uno para agua (Anexo 1) y otro para suelo (anexo 2) que satisfacen las necesidades del proyecto, teniendo en cuenta las condiciones específicas de seguridad de las muestras. Estos planes se completarán de acuerdo a las observaciones del sitio de muestreo.

Recolección de muestras de agua

A continuación se presenta el diagrama 2 que detalla la **técnica de recolección de agua** que a seguirse en base al plan de muestreo.

Diagrama 2. Procedimiento para la recolección de muestra de agua

1. Elección del punto de pmuestreo

Se cuidará la **representatividad de la muestra**.

No debe haber **materia flotante** en la superficie.

2. Recolección

Las muestras se recolectarán en **4 contenedores de 20 L y 2 contenedores de 2 L** boca ancha de plástico (polietileno).

Las muestras se tomarán a **15 cm de profundidad y evitando tomar sedimentos**.

Se lavará de 2 a 3 veces los recipientes con el relave minero con un recipiente muestreador,

Se llenarán llenar los recipientes con la muestra **hasta que rebose el agua**.

3. Medición de parámetros in situ

Se realizará **medición de PH, temperatura y materia flotante** anotando los valores en el formato registro de campo del anexo 6.

4. Preservación

Las muestras requieren de sustancias preservadoras dependiendo el análisis que se hará. Por lo que estas sustancias se agregarán de acuerdo al anexo 1 plan de muestreo.

Se cerrarán los recipientes de las muestras y se sellarán con **papel parafilm**.

Cada frasco se rotulará con ayuda de una **etiqueta y pluma indeleble**, colocando los datos correspondientes a la muestra y tomando las recomendaciones del apartado de etiquetas de este protocolo.

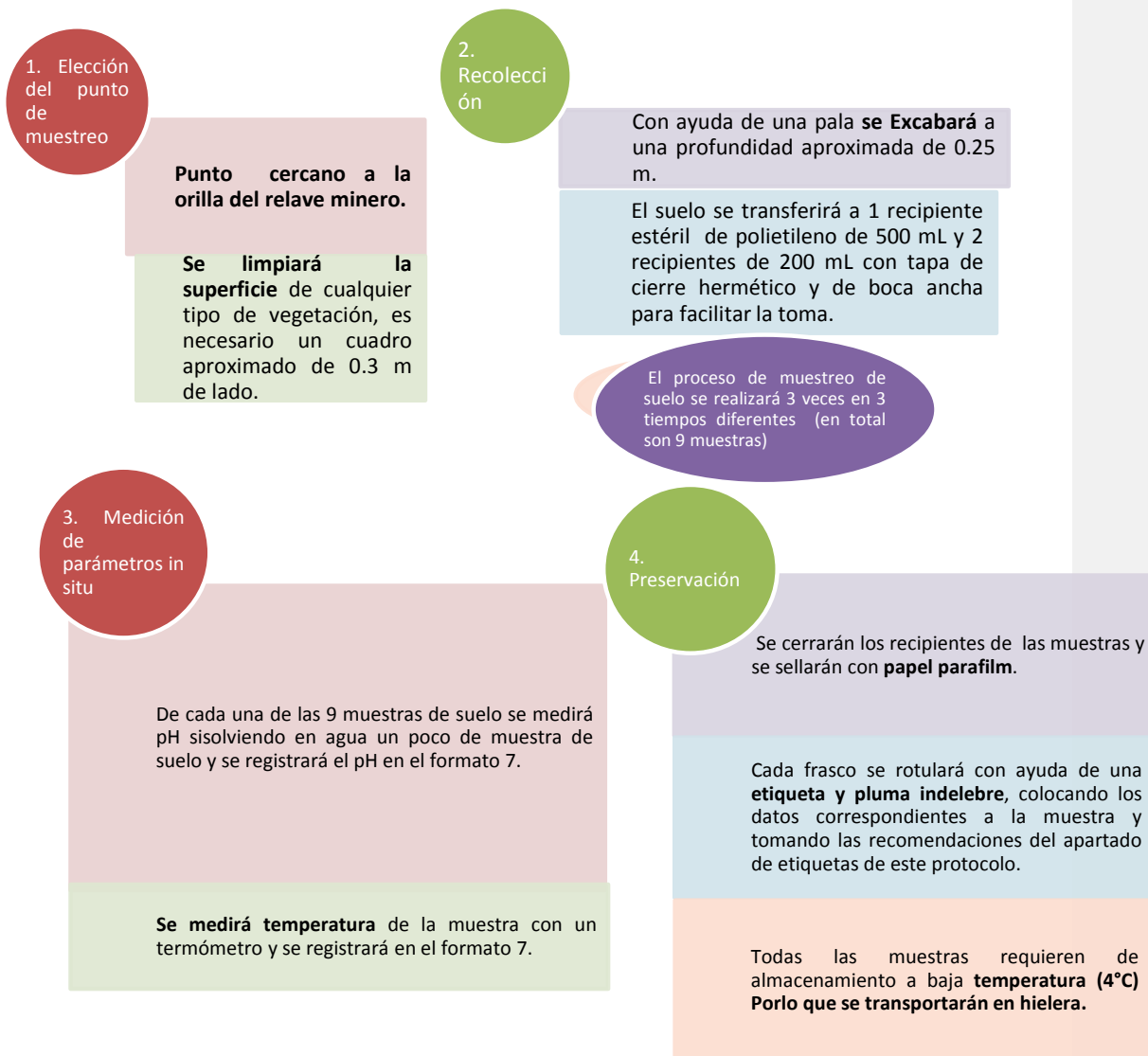
Todas las muestras requieren de almacenamiento a baja **temperatura (4°C)**. Por lo que se transportarán en hielera.

Recolección de muestras de suelo

En base al Manual de procedimientos LOG001 del CIATI "Instructivo para toma de muestra de suelos y lodos para análisis microbiológicos" se elaboró el procedimiento para recolección de las muestras descrito en el diagrama 2.

Las condiciones de conservación indicadas son las recomendadas por los métodos oficiales (Standard Methods, EPA u otro).

Diagrama 2. Procedimiento para la recolección de muestra de suelo



Etiquetas

La identificación de las muestras debe de realizarse con **plumón de tinta indeleble**. La etiqueta debe ser colocada en un lugar visible, no sobrepasar el tamaño del recipiente y adherida adecuadamente para evitar su pérdida. Cabe señalar que ésta **se debe cubrir con cinta adhesiva transparente** para proteger la integridad de los datos. Todas las etiquetas deben contar con la siguiente información como mínimo:

- Fecha y hora en que se tomó la muestra
- Zona y Sector muestreado
- Nombre del proyecto
- Número o clave única que estará asentada en la cadena de custodia.

Las etiquetas para la identificación de muestras para este proyecto se muestran en el anexo 4.

Seguridad e higiene

Para el muestreo se **contará con equipo de seguridad, mascarillas contra gases a base de carbón activado, guantes de látex, botas de seguridad y lentes de seguridad.**

Dentro del plan muestreo se presenta una *lista de verificación* de materiales, reactivos y equipos para el muestreo (ver anexo 3), considerando también los aspectos de seguridad e higiene y los formatos que deberán llevarse para llenarlos en base a las técnicas de recolección y observación.

REGISTRO Y CADENA DE CUSTODIA

La cadena de custodia es una evidencia física que contiene el control y vigilancia de las muestras desde la toma hasta el análisis.

La cadena de custodia debe contener como mínimo la siguiente información:

- El nombre de y responsable del muestreo.
- Los datos de identificación del sitio de muestreo.
- La fecha y hora en que se tomó la muestra y el nombre completo de la persona que la tomó.
- El número o clave única de cada muestra.
- Nombre del laboratorio que recibe las muestras.
- Las determinaciones analíticas requeridas para cada muestra.
- El número de envases consignados.
- La identificación de las personas que participan en las operaciones de entrega y recepción en cada una de las etapas de transporte, incluyendo fecha, hora y firma de los participantes.
- La temperatura y condiciones de preservación en las que se reciben las muestras.
- Observaciones en las que deben incluirse mapas, fotos, condiciones climatológicas, etc.
- Empaque, transporte y entrega.

Ver el Formato de cadena de custodia de campo para muestras de agua y suelo en el anexo 5.

Durante el muestreo se debe llenar también un formato de registro de campo (ver anexo 6 y anexo 7) para anotar datos importantes del sitio de muestreo y características de las muestras que servirán en la interpretación de la caracterización.

CUESTIONARIO

Durante y posterior a la visita de muestreo se contestará este cuestionario en base a las observaciones e información importante para la caracterización de las muestras.

1. Nombre de la mina _____
2. Ubicación de las mina _____
3. Marcar con una x la o las opciones que corresponden.

Metal que se extrae de la mina.

- ☐ Oro
☐ Plata
☐ Cobre
☐ Otro

Tiempo de funcionamiento

- ☐ 1 año
☐ 1-10 años
☐ mayor a 10 años

4. Descripción del proceso
5. ¿Cuál es la jornada laboral en la mina?
6. ¿Cuál es la producción anual o mensual de la mina?
7. ¿Cuenta con presas de jales? En caso de ser afirmativo, decir las dimensiones y tiempo de operación de éstas.
8. ¿Se conoce el caudal del agua residual de la mina?
9. En caso de que se cuente con un Historial de calidad de agua del agua residual de las minas. Presentar este historial

10. Condiciones ambientales

Precipitación _____
Clima _____

11. Añadir Carta topográfica.

12. Describir el sitio de muestreo:

13. Flora y fauna que se observen

SENSORIALES

14. ¿Se identifica algún olor? ¿Cuál?
15. Describa la coloración del agua de la muestra.
16. ¿Está turbia la muestra?
17. Describa la coloración y textura del suelo.
18. Presentar memoria fotográfica de la mina y puntos de muestreo.

STAFF TÉCNICO

Ing. Quim. Laura Isabel Carrillo Flores
Ingeniería Ambiental
UPAEP

Acela Tejeda Gil
Ingeniería en Biotecnología
UPAEP

Karla Itzel Ortiz Sayavedra
Ingeniería Ambiental
UPAEP

Dra. en C. Genoveva Rosano Ortega
Ingeniería Ambiental
Catedrática-Investigadora SNI
Directora de Facultad
Decanato de Ciencias Biológicas, UPAEP

Dra. Sofía E. Garrido Hoyos
Especialista en Hidráulica Nivel V
Coordinación de Desarrollo Profesional e Institucional
Subcoordinación de Posgrado
Instituto Mexicano de Tecnología del Agua

Dra. María Elena Raynal Gutiérrez
Profesor de tiempo completo
Departamento de Ingeniería Civil y Ambiental
UDLAP

GLOSARIO

Agua Residual: Las aguas de composición variada provenientes de las descargas de usos municipales, industriales, comerciales, agrícolas, pecuarias, domésticas y similares, así como la mezcla de ellas.

Bitácora: Cuaderno foliado e identificado, en el que se anotan todos los datos de los procedimientos que se siguen en la toma y análisis de una muestra, así como toda información pertinente y relevante al trabajo de campo y laboratorio. A partir de dicha bitácora se puede reconstruir el proceso de muestreo y análisis.

Caracterización: Es la determinación cualitativa y cuantitativa de los contaminantes químicos o biológicos presentes, provenientes de materiales o residuos peligrosos, para estimar la magnitud y tipo de riesgos que conlleva dicha contaminación (LGPGIR).

Descarga: Acción de verter, infiltrar, depositar o inyectar aguas residuales a un cuerpo receptor en forma continua, intermitente o fortuita, cuando éste es un bien de dominio público o de la nación.

Materia flotante: Todo aquella materia que quede retenido en una malla de entre 2.8 mm y 3.3 mm de abertura.

Preservación: aquellas acciones que tienen por objetivo último el cuidado y el mantenimiento de algún objeto, espacio o incluso ser vivo frente a posibles daños o amenazas que puedan surgir (Diccionario ABC).

REFERENCIAS

Arce, A. L., Calderón, C. G., & Tomasini, A. C., (s.f.). Fundamentos técnicos para muestreo y análisis de aguas residuales. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua IMTA, Comisión Nacional del Agua, México.

CIATI-Centro de Atención y Asistencia Técnica a la Industria (2016). Manual de Procedimientos LOG 001 Instructivo para toma de muestra de suelos y lodos para análisis microbiológicos. ENAC, Madrid.

ANEXOS

Acta de visita número 1

ANEXO 1. PLAN DE MUESTREO PARA AGUA

Tipo de muestreo Simple				
Fecha				
Nombre del sitio de muestreo				
Análisis		Litros necesarios	Tipo de recipiente	Preservación
caracterización	<i>in situ:</i>			
	pH			
	Temperatura			
	Materia flotante			
	Laboratorio:			
	Metales Sodio (Na) Calcio (Ca) Cobre (Cu) Hierro (Fe) Zinc (Zn) Plomo (Pb) Arsénico (As)	1	Plástico (polietileno)	HNO ₃ pH<2 4°C
	Nitrógeno total	1	Plástico (polietileno)	H ₂ SO ₄ pH<2 4°C
	Sulfatos Demanda Química de Oxígeno (DQO) Materia Orgánica Total Sólidos disueltos totales (SDT) Sólidos suspendidos totales (SST) Sólidos sedimentables (SS) Turbidez Oxígeno Disuelto Conductividad	1	Plástico (polietileno)	NaOH pH>8 4°C
tratamiento	oxidación, pruebas de jarra y pruebas de biotratabilidad	79	Plástico (polietileno)	NaOH pH>8 4°C
total de litros		82		

Ubicación y descripción del sitio de muestreo	
Medio de transporte automóvil	
Participantes	
Nombre	Responsabilidades
Laura Isabel Carrillo Flores	Toma de muestras, preservación y etiquetado
Karla Itzel Ortiz Sayavedra	Apoyo para la toma de muestras y etiquetado

Acta de visita número 1

ANEXO 2. PLAN DE MUESTREO SUELO

Tipo de muestreo Simple					
Fecha					
Nombre del sitio de muestreo					
Análisis	Cantidad necesaria	Tipo de recipiente	Preservación		
Caracterización Y tratamiento	in situ:				
	pH Temperatura				
	Laboratorio:				
	Metales	1 2 3	200 g/200 mL	plástico (polietileno), Debe estar lavado con ácido nítrico	refrigerar <6°
	Sodio (Na)		200 g/200 mL		
	Calcio (Ca) Cobre (Cu) Hierro (Fe) Zinc (Zn) Plomo (Pb) Arsénico (As)		200 g/200 mL		
	Sulfatos	1 2 3	500 g/ 500 mL	plástico (polietileno)	oscuridad y refrigerado <6°C
	Nitrógeno total		500 g/ 500 mL		
	Materia Orgánica Total Oxígeno Disuelto Conductividad		500 g/ 500 mL		
	Microbiológicos	1 2 3	500 g/ 500 mL	plástico estéril	Refrigerar a 4°C, NO CONGELAR
			500 g/ 500 mL		
			500 g/ 500 mL		
	total		3600 g/3600 mL		

Ubicación y descripción del sitio de muestreo	
Medio de transporte automóvil	
Participantes	
Nombre	Responsabilidades
Laura Isabel Carrillo Flores	Toma de muestras, preservación y etiquetado
Karla Itzel Ortiz Sayavedra	Apoyo para la toma de muestras y etiquetado

Acta de visita número 1

ANEXO 3. LISTA DE VERIFICACIÓN DE MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPO

Material, reactivos y Equipo	verificado	empacado
Kit de medición de pH		
Termómetro		
Malla de entre 2.8 mm y 3.3 mm de abertura.		
Frasco con solución de ácido nítrico HNO ₃ concentrado		
Frasco con solución de ácido sulfúrico H ₂ SO ₄ concentrado		
Frasco con solución de ácido nítrico HNO ₃		
Frasco con solución de Hidróxido de sodio NaOH 1N		
Recipiente muestreador		
8 Recipientes de 20 Litros de plástico		
4 Recipientes de 1 Litro de plástico		
Papel parafil		
Embudo de plástico (en caso de ser necesario de pendiendo del ancho de la boca del recipiente)		
Pipetas pasteur de plástico		
Pala		
2 L de agua destilada		
1 vaso de plástico		
Hieleras con hielo		
Flexómetro		
Cronómetro		
Etiquetas adhesivas para las muestras		
Marcadores indelebles		
Cuerdas de Nylon (en caso de que requieran)		
Toallas de papel absorbente		
Guantes de latex		
Mascarilla para gases		
Oberol o bata		
Botas de seguridad		
lentes de seguridad		
Protocolo de muestreo		
Formatos de muestreo		
Credenciales de identificación		

ANEXO 4. ETIQUETAS DE LAS MUESTRAS

		Número de muestra	<u>1A</u>
		Fecha	_____
		Hora	_____
Nombre del proyecto:	_____		
Nombre del sitio de muestreo:	_____		
Acta de visita número:	<u>1</u>		
Nombre del muestreador:	<u>Laura Isabel Carrillo Flores</u>		
Tipo de muestra:	<u>simple</u>		
Preservación:	<u>HNO₃, 4°C</u>		
Cantidad:	<u>1L</u>		
Análisis:	<u>Metales</u>		
Nombre de analista:	<u>Laura Isabel Carrillo Flores</u>		

		Número de muestra	<u>2A</u>
		Fecha	_____
		Hora	_____
Nombre del proyecto:	_____		
Nombre del sitio de muestreo:	_____		
Acta de visita número:	<u>1</u>		
Nombre del muestreador:	<u>Laura Isabel Carrillo Flores</u>		
Tipo de muestra:	<u>simple</u>		
Preservación:	<u>H₂SO₄, 4°C</u>		
Cantidad:	<u>1L</u>		
Análisis:	<u>Nitrógeno</u>		
Nombre de analista:	<u>Laura Isabel Carrillo Flores</u>		

		Número de muestra	<u>3A</u>
		Fecha	_____
		Hora	_____
Nombre del proyecto:	_____		
Nombre del sitio de muestreo:	_____		
Acta de visita número:	<u>1</u>		
Nombre del muestreador:	<u>Laura Isabel Carrillo Flores</u>		
Tipo de muestra:	<u>simple</u>		
Preservación:	<u>NaOH, 4°C</u>		
Cantidad:	<u>20L</u>		
Análisis:	<u>Sulfatos, fisicoquímicos. Pruebas de oxidación, de jarra y biotratabilidad</u>		
Nombre de analista:	<u>Laura Isabel Carrillo Flores</u>		

		Número de muestra	<u>4A</u>
		Fecha	_____
		Hora	_____
Nombre del proyecto:	_____		
Nombre del sitio de muestreo:	_____		
Acta de visita número:	<u>1</u>		
Nombre del muestreador:	<u>Laura Isabel Carrillo Flores</u>		
Tipo de muestra:	<u>simple</u>		
Preservación:	<u>NaOH, 4°C</u>		
Cantidad:	<u>20L</u>		
Análisis:	<u>Pruebas de oxidación, de jarra y biotratabilidad</u>		
Nombre de analista:	<u>Laura Isabel Carrillo Flores</u>		

Número de muestra		5A
Fecha		
Hora		
Nombre del proyecto:		
Nombre del sitio de muestreo:		
Acta de visita número:	1	
Nombre del muestreador:	Laura Isabel Carrillo Flores	
Tipo de muestra:	simple	
Preservación:	NaOH, 4°C	
Cantidad:	20L	
Análisis:	Pruebas de oxidación, de jarra y biotratabilidad	
Nombre de analista:	Laura Isabel Carrillo Flores	

Número de muestra		6A
Fecha		
Hora		
Nombre del proyecto:		
Nombre del sitio de muestreo:		
Acta de visita número:	1	
Nombre del muestreador:	Laura Isabel Carrillo Flores	
Tipo de muestra:	simple	
Preservación:	NaOH, 4°C	
Cantidad:	20L	
Análisis:	Pruebas de oxidación, de jarra y biotratabilidad	
Nombre de analista:	Laura Isabel Carrillo Flores	

	Número de muestra	<u>1S</u>
	Fecha	_____
	Hora	_____
Nombre del proyecto:	_____	
Nombre del sitio de muestreo:	_____	
Acta de visita número:	<u>1</u>	
Nombre del muestreador:	<u>Laura Isabel Carrillo Flores</u>	
Tipo de muestra:	<u>simple</u>	
Preservación:	<u>< 6°C</u>	
Cantidad:	<u>Frasco de 200 mL</u>	
Análisis:	<u>Metales</u>	
Nombre de analistas:	<u>Acela Tejeda Gil</u> <u>Karla Itzel Ortiz Sayavedra</u>	

	Número de muestra	<u>2S</u>
	Fecha	_____
	Hora	_____
Nombre del proyecto:	_____	
Nombre del sitio de muestreo:	_____	
Acta de visita número:	<u>1</u>	
Nombre del muestreador:	<u>Laura Isabel Carrillo Flores</u>	
Tipo de muestra:	<u>simple</u>	
Preservación:	<u>< 6°C</u>	
Cantidad:	<u>Frasco de 200 mL</u>	
Análisis:	<u>Metales</u>	
Nombre de analistas:	<u>Acela Tejeda Gil</u> <u>Karla Itzel Ortiz Sayavedra</u>	

	Número de muestra	<u>3S</u>
	Fecha	_____
	Hora	_____
Nombre del proyecto:	_____	
Nombre del sitio de muestreo:	_____	
Acta de visita número:	<u>1</u>	
Nombre del muestreador:	<u>Laura Isabel Carrillo Flores</u>	
Tipo de muestra:	<u>simple</u>	
Preservación:	<u>< 6°C</u>	
Cantidad:	<u>Frasco de 200 mL</u>	
Análisis:	<u>Metales</u>	
Nombre de analistas:	<u>Acela Tejeda Gil</u> <u>Karla Itzel Ortiz Sayavedra</u>	

	Número de muestra	4S
	Fecha	
	Hora	
Nombre del proyecto:		
Nombre del sitio de muestreo:		
Acta de visita número:	1	
Nombre del muestreador:	Laura Isabel Carrillo Flores	
Tipo de muestra:	simple	
Preservación:	< 6°C	
Cantidad:	Frasco de 500 mL	
Análisis:	Sulfatos, <i>Nitrógeno total</i> , Materia Orgánica Total, Oxígeno, Conductividad	
Nombre de analistas:	Acela Tejeda Gil Karla Itzel Ortiz Sayavedra	

	Número de muestra	5S
	Fecha	
	Hora	
Nombre del proyecto:		
Nombre del sitio de muestreo:		
Acta de visita número:	1	
Nombre del muestreador:	Laura Isabel Carrillo Flores	
Tipo de muestra:	simple	
Preservación:	< 6°C	
Cantidad:	Frasco de 500 mL	
Análisis:	Sulfatos, <i>Nitrógeno total</i> , Materia Orgánica Total, Oxígeno, Conductividad	
Nombre de analistas:	Acela Tejeda Gil Karla Itzel Ortiz Sayavedra	

	Número de muestra	6S
	Fecha	
	Hora	
Nombre del proyecto:		
Nombre del sitio de muestreo:		
Acta de visita número:	1	
Nombre del muestreador:	Laura Isabel Carrillo Flores	
Tipo de muestra:	simple	
Preservación:	< 6°C	
Cantidad:	Frasco de 500 mL	
Análisis:	Sulfatos, <i>Nitrógeno total</i> , Materia Orgánica Total, Oxígeno, Conductividad	
Nombre de analistas:	Acela Tejeda Gil Karla Itzel Ortiz Sayavedra	

	Número de muestra	<u>7S</u>
	Fecha	_____
	Hora	_____
Nombre del proyecto:	_____	
Nombre del sitio de muestreo:	_____	
Acta de visita número:	<u>1</u>	
Nombre del muestreador:	<u>Laura Isabel Carrillo Flores</u>	
Tipo de muestra:	<u>simple</u>	
Preservación:	<u>< 6°C, no congelar</u>	
Cantidad:	<u>Frasco de 500 mL</u>	
Análisis:	<u>Microbiológicos</u>	
Nombre de analistas:	<u>Acela Tejeda Gil</u> <u>Karla Itzel Ortiz Sayavedra</u>	

	Número de muestra	<u>8S</u>
	Fecha	_____
	Hora	_____
Nombre del proyecto:	_____	
Nombre del sitio de muestreo:	_____	
Acta de visita número:	<u>1</u>	
Nombre del muestreador:	<u>Laura Isabel Carrillo Flores</u>	
Tipo de muestra:	<u>simple</u>	
Preservación:	<u>< 6°C, no congelar</u>	
Cantidad:	<u>Frasco de 500 mL</u>	
Análisis:	<u>Microbiológicos</u>	
Nombre de analistas:	<u>Acela Tejeda Gil</u> <u>Karla Itzel Ortiz Sayavedra</u>	

	Número de muestra	<u>9S</u>
	Fecha	_____
	Hora	_____
Nombre del proyecto:	_____	
Nombre del sitio de muestreo:	_____	
Acta de visita número:	<u>1</u>	
Nombre del muestreador:	<u>Laura Isabel Carrillo Flores</u>	
Tipo de muestra:	<u>simple</u>	
Preservación:	<u>< 6°C, no congelar</u>	
Cantidad:	<u>Frasco de 500 mL</u>	
Análisis:	<u>Microbiológicos</u>	
Nombre de analistas:	<u>Acela Tejeda Gil</u> <u>Karla Itzel Ortiz Sayavedra</u>	

ANEXO 5. CADENA DE CUSTODIA DE CAMPO PARA MUESTRAS DE AGUA Y SUELO

Nombre del sitio de muestreo													
RECIPIENTES DE MUESTREO													
CANTIDAD				FECHA				FIRMA					
6													
SOLUCIONES PARA PRESERVAR													
NOMBRE DE LA SOLUCIÓN				CANTIDAD				FECHA				FIRMA	
HNO ₃													
NOMBRE DE LA SOLUCIÓN				CANTIDAD				FECHA				FIRMA	
H ₂ SO ₄													
NOMBRE DE LA SOLUCIÓN				CANTIDAD				FECHA				FIRMA	
NaOH 1N													
EMPAQUE				TRANSPORTE				ENTREGA					
NÚN. DE HIELERA	NÚM. DE FRASCOS	FECHA	HORA	NÚN. DE HIELERA	NÚM. DE FRASCOS	FECHA	HORA	NÚN. DE HIELERA	NÚM. DE FRASCOS	FECHA	HORA		
NOMBRE FIRMA OBSERVACIONES				NOMBRE FIRMA OBSERVACIONES				NOMBRE FIRMA OBSERVACIONES					

ANEXO 7. REGISTRO DE CAMPO PARA TOMA DE MUESTRAS DE SUELO

Nombre del sitio de muestreo _____						
Coordenadas _____						
Profundidad _____						
Nombre y firma del muestreador _____						
fecha del muestreo _____						

Número de muestra	Cantidad	Análisis	Hora	Temperatura °C		pH
				SUELO	AMBIENTE	
1S	Llenar frasco de 200 mL	Metales				
2S	Llenar frasco de 200 mL	Metales				
3S	Llenar frasco de 200 mL	Metales				
4S	Llenar frasco de 500 mL	Sulfatos, Nitrógeno total, Materia Orgánica Total, Oxígeno, Conductividad				
5S	Llenar frasco de 500 mL	Sulfatos, Nitrógeno total, Materia Orgánica Total, Oxígeno, Conductividad				
6S	Llenar frasco de 500 mL	Sulfatos, Nitrógeno total, Materia Orgánica Total, Oxígeno, Conductividad				
7S	Llenar frasco de 500 mL	Microbiológicos				
8S	Llenar frasco de 500 mL	Microbiológicos				
9S	Llenar frasco de 500 mL	Microbiológicos				

DESCRIPCIÓN DEL PUNTO DE MUESTREO

OBSERVACIONES