



**Benemérita  
Universidad Autónoma de Puebla**

**FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA**

**“FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS DE  
BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO  
VEGETAL EN SEMILLAS DE MALVA REAL (*Alcea  
rosea*)”**

**TESIS PROFESIONAL**

**Que para obtener el Título de:**

**Licenciatura en Ingeniería Ambiental**

**Presenta:**

**MARÍA FERNANDA MARTÍNEZ BUENO**

**Director de Tesis:**

**Dra. Maribel Castillo Morales**

**Codirector de Tesis:**

**Dr. José Carlos Mendoza Hernández**

**Puebla, Pue. Noviembre 2019**

## Índice

Índice .....	0
Índice de figuras.....	iii
Índice de tablas .....	iv
INTRODUCCIÓN .....	v
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	vi
JUSTIFICACIÓN .....	vii
OBJETIVOS.....	viii
HIPÓTESIS.....	viii
1. ANTECEDENTES .....	1
1.1 El suelo .....	1
1.2 Problemática ambiental del suelo .....	2
1.3 Desarrollo de la minería .....	3
1.4 La minería en el México actual .....	4
1.5 Minería en Hidalgo.....	7
1.6 Impacto ambiental de la minería .....	12
1.7 Toxicidad de los metales pesados .....	13
1.7.1 Plomo (Pb).....	14
1.7.2 Arsénico (As).....	15
1.7.3 Cobre (Cu).....	15
1.7.4 Zinc (Zn) .....	15
1.7.5 Cromo (Cr).....	16
1.7.6 Cadmio (Cd) .....	16
1.7.8 Manganeso (Mn).....	16
1.7.9 Níquel (Ni) .....	16
1.8 Tecnologías de remediación aplicables a metales pesados .....	17
1.9 Fitorremediación .....	20
1.9.1 Mecanismos de fitorremediación .....	20
1.9.2 Ventajas de la fitorremediación ante otras técnicas .....	23
1.9.3 El estudio de la rizosfera .....	26
1.9.4 Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal .....	27

1.9.5	Importancia ACC desaminasa .....	31
1.9.6	Importancia de la solubilización de fosfatos .....	34
1.9.7	Importancia y caracterización de bacterias productoras de sideróforos 35	
1.9.8	Importancia de las biopelículas .....	36
2	METODOLOGÍA.....	40
2.1	Área de estudio.....	40
2.2	Muestreo .....	41
2.3	Aislamiento e identificación de las bacterias endófitas .....	42
2.4	Caracterización bioquímica de BPCV .....	42
2.4.1	Solubilización de fosfatos .....	42
2.4.2	Sideróforos .....	42
2.4.3	Producción de Ácido Indol Acético .....	43
2.4.4	Actividad de la enzima ACC desaminasa .....	44
2.5	Biopelícula .....	44
2.5.1	Semillas con inóculo bacteriano .....	45
2.5.2	Semillas con sustrato orgánico e inóculo bacteriano.....	45
2.5.3	Semillas con jal minero e inóculo bacteriano.....	45
3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	46
3.1	Aislamiento e identificación de las bacterias endófitas .....	46
3.2	Caracterización bioquímica de BPCV .....	48
3.3	Análisis de biopelículas en SEM .....	54
3.3.1	Análisis de biopelículas cepa 134.....	54
3.3.2	Análisis de biopelículas cepa 135.....	63
4	CONCLUSIONES.....	73
	BIBLIOGRAFÍA .....	74

## Índice de figuras

Figura 1 Principales minas en explotación metálicas, no metálicas y bancos de material .....	11
Figura 2 Malva real .....	25
Figura 3 Semillas de malva real .....	26
Figura 4 Reacción de la enzima desaminasa del ACC en las reacciones de síntesis y degradación precursoras de etileno .....	32
Figura 5 Etapas de la formación de biopelículas.....	38
Figura 6 Células de <i>P. putida</i> sobre la raíz de una planta de maíz .....	38
Figura 7 Imagen de AFM de biopelícula de <i>Staphylococcus epidermis</i> mostrando la estructura y la cobertura de la superficie de la biopelícula.....	39
Figura 8 Ubicación del muestreo en el municipio de Zimapán, Hidalgo.....	40
Figura 9 Acercamiento a la zona del muestreo en el municipio de Zimapán, Hidalgo .....	41
Figura 10 Producción de Ácido Indol Acético de las cepas.....	51
Figura 11 Producción de ACC desaminasa por cepa bacteriana.....	52
Figura 12 Proceso de formación de biopelículas en semilla de malva real inoculadas con cepa 134, toma realizada después de 8 horas de la inoculación. ....	55
Figura 13 Proceso de formación de biopelículas en semilla de malva real inoculadas con cepa 134, después de 12 horas de la inoculación.....	57
Figura 14 Formación de biopelículas en semilla de malva real inoculadas con cepa 134, a las 24 horas de la inoculación. ....	59
Figura 15 Proceso de formación de biopelículas en semilla de malva real inoculadas con cepa 134, toma realizada después de 48 horas de la inoculación. ....	61
Figura 16 Proceso de formación de biopelículas en semilla de malva real inoculadas con cepa 135, tomas realizadas después de 8 horas de la inoculación.....	64
Figura 17 Proceso de formación de biopelículas en semilla de malva real inoculadas con cepa 135, tomas realizada después de 12 horas de la inoculación. ....	66
Figura 18 Proceso de formación de biopelículas en semilla de malva real inoculadas con cepa 135, toma realizada después de 24 horas de la inoculación. ....	68
Figura 19 Formación de biopelículas en semilla de malva real inoculadas con cepa 135, toma realizada después de 48 horas de la inoculación.....	70

## Índice de tablas

Tabla 1 Inversión extranjera directa en México por sector económico 1999-2018..	5
Tabla 2 Producción minera por estado en 2017.....	6
Tabla 3 Tabla volumen de la producción minera en Hidalgo 2013-2017 .....	8
Tabla 4 Volumen de producción mineral.....	10
Tabla 5 Distribución mineral en Hidalgo.....	10
Tabla 6 Unidades minero-metalúrgicas y de transformación metálicos .....	11
Tabla 7 Unidades minero-metalúrgicas y de transformación no metálicos .....	12
Tabla 8 Ventajas y desventajas o limitaciones de la fitorremediación.....	23
Tabla 9 Algunos microorganismos con potencial para la fitorremediación asistida	29
Tabla 10 Identificación del número de cepa, género y medio de cultivo sólido.....	46
Tabla 11 Pruebas de solubilización de fosfatos y producción de sideróforos .....	48
Tabla 12 Pruebas de producción de Ácido Indol Acético y ACC desaminasa .....	50

## INTRODUCCIÓN

La mala disposición de residuos generados por la industria minera libera metales pesados que representan una fuente de contaminación a los ecosistemas y por consiguiente un riesgo latente a la salud al introducirse a la cadena trófica por medio del suelo, el agua y el aire.

Por lo que este trabajo surge y cumple con la finalidad de aportar un mayor conocimiento y entendimiento de las relaciones microorganismo-planta presentes en los procesos de fitorremediación asistida de metales pesados en suelo con un enfoque en la formación de biopelículas para conocer la dinámica del desarrollo y crecimiento de microorganismos bajo estas condiciones y sus interacciones e influencia en los sistemas de fitorremediación.

Es por ello que se realizaron pruebas de producción de AIA, enzima ACC desaminasa, solubilización de fosfatos y producción de sideróforos de microorganismos endófitos extraídos de plantas provenientes de una presa de jales mineros, dentro de las cuales se hallaba la malva real (*Alcea rosea*). De los diferentes géneros encontrados se seleccionaron 5 cepas de acuerdo con el desempeño mostrado en las pruebas realizadas y en la producción de biopelículas en semillas de malva real *in-vitro*, para su posterior evaluación de la capacidad de formación de biopelículas en presencia de jal y de sustrato orgánico para ser monitoreada por medio de microscopía electrónica de barrido (SEM por sus siglas en inglés).

En este trabajo se muestra la viabilidad del uso de *Pantoea agglomerans* como potencial BPCV al mostrar resultados positivos en la producción de la auxina AIA, la enzima ACC desaminasa, la producción de sideróforos y solubilización de fosfatos; así como el buen desempeño mostrado en la formación de biopelículas en semillas de malva real en la presencia de jal minero y sustrato orgánico, lo que se traduce en la capacidad de esta especie para generar mecanismos pertinentes para sobreponerse a las condiciones adversas del medio permitiéndole a la planta el desarrollo vegetal mediante la adquisición de nutrientes y la aminoración del estrés.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La minería en México es sin duda una de las fuentes económicas más grandes e importantes de la nación. En México la extracción minera es principalmente metálica ocupando el primer lugar mundial en la producción de plata (Volke Sepúlveda & Velasco Trejo, 2002; Secretaría de Economía, 2019), sin embargo, este tipo de actividades no se llevan a cabo de una manera responsable, realizando la mala disposición de residuos mineros como los jales, en montones o relaves que liberan elementos tóxicos como los metales pesados impactando negativamente al medio ambiente, provocando la erosión del suelo, lo que conlleva a limitaciones físicas, químicas y biológicas, a la vez que afectan los cuerpos de agua superficiales, subterráneos y el aire (Demková, Jezný, & Bobul'ská, 2017).

Actualmente existen distintas tecnologías de remediación aplicables a metales pesados en suelo, que pueden ser *in-situ* y *ex-situ* y pueden clasificarse en físicas, químicas y biológicas (Burlakovs & Vircavs, 2010), presentándose como la opción más viable la remediación biológica, pues los tratamientos físicos y químicos a pesar de ser más rápidos, representan una mayor alteración y destrucción al medio así como un mayor costo (Khalid, y otros, 2016).

En el caso de la remediación del suelo por técnicas biológicas, hay que tomar en cuenta que son procesos largos y difíciles pues el suelo en su totalidad se pone a tratamiento (Diez Lázaro, 2008),

Específicamente para este trabajo, la fitorremediación asistida como técnica de remediación biológica, se evaluará la capacidad de las Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (BPCV) para formar biopelículas, buscando su viabilidad para su posterior uso en un proceso de fitorremediación.

## JUSTIFICACIÓN

La disposición inadecuada de residuos mineros sin duda representa un riesgo ambiental y por consiguiente a la salud, por lo que los procesos de remediación biológica juegan un papel importante en la recuperación de estos ecosistemas.

Las BPCV realizan un papel importante en los procesos de fitorremediación asistida, pues al estimular el crecimiento de las raíces y aumentar la disponibilidad de los nutrientes del suelo para que puedan ser absorbidos por estas, así como el aumento de la tolerancia ante distintas fuentes de estrés por medio de la producción de fitohormonas, metabolitos y otros (Egamberdieva, Abd-Allah, & Teixeira da Silva, 2016), permiten su mejor desarrollo para poder participar efectivamente en la inmovilización o captación de los contaminantes.

Este trabajo pretende contribuir a una mejor comprensión y conocimiento de las asociaciones e interacciones que se establecen en los procesos de fitorremediación asistida por medio de las Bacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (BPCV), por lo que se aislaron y caracterizaron de BPCV endófitas presentes en plantas nativas extraídas de suelos contaminados con jales mineros y su papel como potenciales formadoras de biopelículas en las semillas de malva real (*Alcea rosea*) y con ello poder emplear esta técnica para posteriores procesos de fitorremediación de suelos en la presencia de metales pesados.

## **OBJETIVOS**

**General:** Analizar la formación de biopelículas de BPCV en semillas de malva real (*Alcea rosea*).

**Específicos:**

1. Aislar bacterias de la rizosfera de plantas presentes en jales de minas que puedan ser BPCV.
2. Caracterizar bioquímicamente las bacterias como promotoras de crecimiento vegetal
3. Analizar la formación de biopelículas de BPCV mediante microscopia electrónica de barrido (SEM).

## **HIPÓTESIS**

- Las BPCV presentan la capacidad de formar biopelículas en las semillas de malva real (*Alcea rosea*) para poder ser usadas en procesos de fitorremediación de jales de minas.
- Las BPCV no presentan la capacidad de formar biopelículas en las semillas de malva real (*Alcea rosea*) para poder ser usadas en procesos de fitorremediación de jales de minas.

# 1. ANTECEDENTES

## 1.1 El suelo

El suelo a lo largo del tiempo ha tenido distintas definiciones que se adaptan a las diferentes disciplinas que lo toman por objeto de estudio, sin embargo, independientemente del área que lo estudie, sabemos que el suelo es un recurso indispensable en el desarrollo de la vida, pues es un elemento que representa la interfase entre la atmósfera y la corteza terrestre en donde se llevan a cabo interacciones de materia y energía como son los ciclos biogeoquímicos.

El suelo según la (USDA, 1998) es un cuerpo natural compuesto por sólidos (minerales y materia orgánica), líquidos y gases que se producen en la superficie de la tierra, ocupa espacio y es caracterizado por uno o ambas de las siguientes: horizontes, o capas que son distinguibles del material inicial como resultado de adiciones, pérdidas, transferencias y transformaciones de energía y materia o la habilidad de soportar plantas enraizadas en un ambiente natural.

El límite superior del suelo es el límite entre el suelo y el aire, agua superficial, plantas vivas, o materia orgánica que no ha empezado su proceso de descomposición.

El límite inferior que separa el suelo del no suelo abajo es el más difícil de definir. El suelo consiste en horizontes cerca de la superficie de la tierra, que en contraste del material parental ha sido alterado por las interacciones del clima, relieve y organismos vivos a lo largo del tiempo. Por lo que comúnmente el suelo se establece que tiene un límite inferior en 2 m. (USDA, 1998).

Es así como el suelo funge un papel de proveedor de soporte, nutrientes y agua para los seres vivos, que además se ha consolidado como distribuidor y almacén de aguas superficiales y mantos freáticos, de la misma manera, a través de su poder de amortiguación y otros mecanismos y con ayuda de los microorganismos

ayuda a filtrar, almacenar, degradar, neutralizar e inmovilizar contaminantes impidiendo su movilización e incorporación a las cadenas tróficas (Ortiz, Sanz, Dorado, & Villar, 2007).

El suelo entonces se constituye como uno de los cimientos donde se desarrollan procesos naturales y a su vez económicos, sociales y culturales, por lo que cuando la degradación y contaminación del suelo se llevan a cabo, surge una problemática medioambiental compleja.

## **1.2 Problemática ambiental del suelo**

La degradación del suelo puede ser por causas naturales, pero es cierto también que la principal razón de su degradación es debido al desarrollo de actividades antropogénicas como prácticas agrícolas, forestales, ganaderas, así como mala gestión de residuos urbanos e industriales, y otras actividades industriales. El aumento en la liberación de contaminantes al ambiente debido a estas actividades se ha disparado, generando efectos perjudiciales al ambiente y los organismos vivos (Castillo & Yañez, 2018).

En este aspecto, la contaminación del suelo se refiere a la presencia de un químico o sustancia fuera de lugar y/o presencia a una concentración superior a la normal que tiene efectos adversos en cualquier organismo o en las funciones del suelo (FAO, 2016).

Los principales agentes contaminantes son distintos y dependen de su fuente de emisión, siendo así productos fitosanitarios (plaguicidas, herbicidas, fungicidas y fertilizantes) usados en las prácticas agrícolas; lluvias ácidas constituidas de SO<sub>2</sub> y NO<sub>x</sub> que derivan de actividades industriales; contaminantes orgánicos (hidrocarburos monoaromáticos, hidrocarburos policíclicos aromáticos, alifáticos, policlorados, fenoles, nitroaromáticos, alcoholes, éteres, disolventes, etc. que son de los más frecuentes en suelos y aguas; y los metales pesados, procedentes de procesos de combustión de carbón fósil o derivados de petróleo, actividades agrícolas, acumulación de residuos industriales, urbanos y mineros (Ortiz, Sanz,

Dorado, & Villar, 2007).

Este trabajo se enfocará a los metales pesados procedentes de actividades mineras.

Para adentrarnos en la contaminación por metales pesados originado por la minería, es preciso conocer el desarrollo de esta actividad económica.

### **1.3 Desarrollo de la minería**

El desarrollo de la minería en la América española comenzó en el siglo XVI, este se enfocó en la extracción de metales preciosos, siendo plata, y en menor medida, oro. Los minerales de baja ley (cobre, estaño, plomo, etc.) fueron explotados raramente pues era económicamente inviable producirlos en América por lo que resultaba más fácil el importarlos.

La economía basada en la minería permitió la proliferación de minas en Latinoamérica, las minas de oro de Carabaya, Antioquia, Chocó, Popayán y Zaruma y las de plata de Taxco, Guanajuato, Zacatecas, Potosí y Castrovirreina, impulsaron el desarrollo económico.

La corona española era la propietaria de las minas americanas y los particulares eran quienes gozaban el derecho de explotarlas bajo el pago del quinto real, que correspondía a un 20% del producto. (Malamud, Sepúlveda, Pardo, & Martínez, 1995)

Debido al apogeo de la industria minera, sectores económicos distintos crecieron también, como la agricultura, el comercio y los transportes, pues se dio la necesidad de establecer explotaciones agrícolas y ganaderas en torno a las ciudades mineras, así como la conexión con otras ciudades por medio de caminos (Rosati, 1996).

## 1.4 La minería en el México actual

La minería representa una de las fuentes económicas más grandes e importantes de la nación pues provee de insumos a grandes industrias como la construcción, industria metalúrgica, siderúrgica, química y electrónica.

En México, la extracción minera es principalmente metálica (Volke Sepúlveda & Velasco Trejo, 2002). Actualmente, México se ubica entre los 10 principales productores de 16 diferentes minerales que son la plata, bismuto, fluorita, celestita, wollastonita, cadmio, molibdeno, plomo, zinc, diatomita, sal, barita, grafito, yeso, oro y cobre, ocupando el primer lugar mundial en la producción de plata (Secretaría de Economía, 2019).

Así mismo, según la (Secretaría de Economía, 2019), México “es el 1er destino en inversión en exploración minera en América Latina y el 4° en el mundo”.

En cuanto a inversión extranjera, la (Comisión Nacional de Inversiones Extranjeras, 2018), establece que la minería abarcó el tercer lugar en Inversión Extranjera Directa en el sector Industrial Nacional, con una participación de 6.3%, equivalente a 1127.7 millones de dólares (ver tabla 1). Y en el año 2017, las exportaciones minero-metalúrgicas, crecieron en 11.5% respecto de 2016 (Cámara Minera de México, 2018).

Nacionalmente hablando, se destaca la producción de 21 estados de la República en la producción minera metálica. A continuación, se presenta una tabla con el resumen de la producción por estado de los principales metales en 2017, ver tabla 2.

De la misma manera se destaca que en 2017, cuatro metales aportaron el 80.7% del valor total nacional, siendo el oro con un 32%, el cobre, 22.3%, la plata 17.3% y zinc con 9.1% (Cámara Minera de México, 2018).

Tabla 1 Inversión extranjera directa en México por sector económico 1999-2018

Servicios	Manufactura	Construcción	Electricidad y agua	Minería	Industrial	Agropecuario	TOTAL	SECTORES			
								1999	2000	2001	
								2002	2003	2004	
3970.0	9112.8	207.0	338.0	228.4	9886.2	87.8	13943.9	1999	2000	2001	
7340.4	10234.8	227.8	181.8	165.4	10809.9	97.8	18248.1	2002	2003	2004	
22277.9	6792.9	323.2	523.9	50.0	7689.9	75.5	30.043.0	2005	2006	2007	
13511.7	9046.2	487.3	715.6	278.0	10527.1	17.3	24056.1	2008	2009	2010	
8292.6	9264.4	73.9	447.0	146.0	9931.3	1.3	18225.2	2011	2012	2013	
10340.8	13553.3	436.8	214.1	347.8	14552.0	24.9	24917.8	2014	2015	2016	
11474.2	13477.8	427.9	359.7	274.8	14540.1	10.0	26024.3	2017	2018	Acum. 1999-2018	
8862.0	11225.5	660.6	-65.7	429.7	12250.1	-2.0	21110.1	Val or	Part .%	Val or	Part .%
13746.1	13789.2	2744.2	289.0	1822.6	18645.0	79.0	32470.1	17842.3	100.0	523984.6	100.0
14072.0	9245.3	1034.4	504.7	4516.1	15300.6	61.5	29434.1	32.2	0.2	1662.7	0.3
8557.3	7285.2	832.7	67.2	1397.7	9582.7	22.2	18162.2	32.2	0.2	1662.7	0.3
10226.6	14418.6	385.7	641.5	1540.8	16986.6	115.1	27328.2	32.2	0.2	1662.7	0.3
10895.1	11683.3	1735.9	-29.2	873.2	14263.2	127.0	25285.3	32.2	0.2	1662.7	0.3
6181.5	9674.5	1606.0	1219.9	3078.9	15579.3	145.0	21905.8	32.2	0.2	1662.7	0.3
9056.0	31646.1	1188.1	1007.8	2745.0	39587.0	208.3	48851.2	32.2	0.2	1662.7	0.3
6920.3	18251.9	914.6	690.9	2450.3	22307.6	168.9	29396.8	32.2	0.2	1662.7	0.3
12790.5	17464.6	2178.2	733.4	1767.0	22176.2	170.6	35137.3	32.2	0.2	1662.7	0.3
8929.3	17925.9	1112.8	1226.0	1084.3	21349.1	90.2	30368.5	32.2	0.2	1662.7	0.3
10944.7	14716.1	3061.3	1536.1	845.5	20159.0	130.5	31234.2	32.2	0.2	1662.7	0.3
6873.0	7694.8	624.1	1496.6	1121.7	10937.1	32.2	17842.3	32.2	0.2	1662.7	0.3
38.5	43.1	3.5	8.4	6.3	61.3	0.2	100.0	32.2	0.2	1662.7	0.3
2052662.0	256503.0	20262.6	12131.3	28163.0	317059.9	1662.7	523984.6	32.2	0.2	1662.7	0.3
39.2	49.0	3.9	2.3	5.4	60.5	0.3	100.0	32.2	0.2	1662.7	0.3

Fuente: (Comisión Nacional de Inversiones Extranjeras, 2018).

Tabla 2 Producción minera por estado en 2017

Estado	Oro	Plata	Plomo	Cobre	Zinc	Hierro
<b>Total</b>	<b>126,820.30</b>	<b>5,815,034</b>	<b>243,022</b>	<b>742,246</b>	<b>671,444</b>	<b>11,712,533</b>
Aguascalientes	533	38,226	5,467	1,112	23,561	0
Baja California	2,414.80	22,660	0	0	0	5,000
Baja California Sur	0	0	0	17,391	0	0
Coahuila de Zaragoza	0	152,312	0	0	0	3,746,576
Colima	0	0	0	0	0	3,064,351
Chihuahua	20,882.10	990,091	36,093	10,075	100,507	527,330
Durango	11,712.90	682,622	22,647	5,225	96,415	1,730,097
Guanajuato	2,145.40	128,994	0	0	0	0
Guerrero	15,143.20	26,922	0	0	0	140
Hidalgo	67.90	69,420	6,878	4,002	18,161	0
Jalisco	557.30	108,339	4,770	0	1,403	0
México	719.70	202,980	7,444	1,120	37,418	0
Michoacán de Ocampo	148.90	157	0	2,677	0	2,539,862
Nayarit	163.60	4,115	0	0	0	0
Oaxaca	2,611.00	288,858	6,474	1,396	17,713	0
Puebla	0	0	0	0	0	97,622
Querétaro	444.70	20,159	6,603	1,052	6,148	0
San Luis Potosí	2,041.30	152,502	2,002	30,849	33,819	0
Sinaloa	2,845.70	68,527	4,295	1,365	9,384	0
Sonora	42,290.40	408,842	0	624,265	.	1,555
Zacatecas	22,098.40	2,449,308	141,349	41,717	326,915	0

Fuente: (Cámara Minera de México, 2018)

## 1.5 Minería en Hidalgo

Los primeros registros de minas en Hidalgo datan de 1552, cuando se registran las minas La Descubridora y Real del Monte (Servicio Geológico Mexicano, 2018).

En 1555, Fray Bartolomé de Medina implantó el método de amalgamación o también llamado beneficio de patio (Muro, 1964) siendo este una de las aportaciones más importantes para la industria.

En el año de 1823 Thomas Kinder y John Taylor constituyeron la Compañía Británica de Real del Monte y en 1824 se creó la Compañía de Aventureros de las minas de Real del Monte que desapareció en 1849 creando en su lugar la Compañía Aviadora de Real del Monte y Pachuca (Servicio Geológico Mexicano, 2018).

Para el año de 1891, McArthur y Forrest marcaron el inicio del procedimiento de cianuración en el país para el oro y 3 años más tarde, Hunt lo hizo para la plata. En 1906 la compañía United States Smelting Refining and Mining Company adquirió todos los derechos en Pachuca e inició con una capacidad de procesamiento de 10t/d, un año después se amplió a 300t/d convirtiéndose así en 1909 la Compañía Real del Monte y Pachuca en la hacienda de cianuración más grande del mundo. A la fecha esta compañía ha producido 40,000 toneladas de plata y 231 toneladas de oro, representando 16% y 6% respectivamente de la producción nacional y mundial (Servicio Geológico Mexicano, 2018).

El distrito de Zimapán fue incorporado posteriormente con el descubrimiento de minerales oxidados en el área El Carrizal, donde se desarrolló la mina Lomo de Toro en 1632, en 1920 operaban 18 minas cuya producción era fundida en hornos regionales. En 1945 se descubrieron nuevos cuerpos de óxidos en la mina Lomo de Toro por Hidalgo Mining and Smelting Co. Y se estimuló la producción en varias minas cercanas con lo que en 1957 se alcanzó una producción de 2500t/mes de óxidos y sulfuros (Servicio Geológico Mexicano, 2018).

Para el año de 1910 la fabricación de cemento comenzó con la fábrica La Tolteca como resultado de las posibilidades de detener la importación de cemento por parte de la Asociación Portland Cementera Mexicana (Servicio Geológico Mexicano, 2018).

Actualmente, Hidalgo produce minerales metálicos (Oro, Plata, Cobre, Manganese, Plomo y Zinc) y no metálicos (Arcillas, Arena, Azufre, Caliza, Grava, entre otros), en la siguiente tabla se puede observar el volumen y valor de la producción minera estatal de 2013-2017 expresado en toneladas, véase tabla 3.

Tabla 3 Tabla volumen de la producción minera en Hidalgo 2013-2017

### Volumen de la Producción Minera 2013-2017 (Toneladas)

Años/ Productos	2013	2014	2015	2016	2017 p/*
<b>Metálicos</b>					
Oro (kg)	34.00	67.90	118.90	56.60	67.90
Plata (kg)	43,677.30	41,617.00	59,274.00	56,586.00	69,420.00
Cobre	1,804.00	1,673.00	1,932.00	2,391.00	4,002.00
Manganeseo	187,863.00	204,434.00	192,166.00	194,131.00	204,510.00
Plomo	3,450.00	3,797.00	9,155.00	5,123.00	6,878.00
Zinc	10,600.00	7,819.00	12,119.00	14,814.00	18,161.00
<b>No metálicos</b>					
Agregados Pétreos	854,700.00	3,203,675.00	2,881,100.00	6,927,292.00	4,553,199.75
Arcillas	870,825.00	1,065,000.00	1,215,000.00	1,328,799.00	1,362,354.00
Arena 1/*	6,783,236.00	8,266,920.00	9,416,000.00	10,296,645.00	10,535,541.72
Azufre 2/*	35,351.00	40,300.00	35,360.00	19,700.00	18,514.00
Calcita 3/*	452,843.00	585,090.00	590,850.00	71,350.00	-
Caliza	6,572,450.00	13,741,500.00	22,098,463.00	16,132,128.00	12,598,371.75
Cantera	62,200.00	36,600.00	12,600.00	12,600.00	-
Caolín	6,141.25	15,450.00	100.00	8,500.00	1,000.00
Basalto	-	3,955,600.00	4,625,500.00	4,497,900.00	5,008,300.00

<b>Grava 4/*</b>	9,188,615.40	17,179,260.00	21,999,700.00	17,310,685.38	17,946,411.66
<b>Puzolana</b>	-	-584,718.00	690,775.00	690,775.00	70,821,881.00
<b>Fosforita</b>	-	-	70,439.00	93,327.00	67,980.00
<b>Tezontle</b>	14,676.10	1,092,700.00	814,200.00	820,500.00	615,250.00
<b>Yeso</b>	398,199.00	409,825.00	544,825.00	442,933.00	454,118.18

\*

p/ Cifras preliminares.

1/ Mineral para construcción. Cifras calculadas con base al consumo de cemento y cal.

2/ Incluye la extracción minera y el obtenido en la refinación de petróleo crudo. Cifras corregidas en base a información proporcionada por PEMEX. 3/ Carbonato de calcio.

4/ Mineral para construcción. Cifras calculadas con base al consumo de cemento.

*Fuente:* (Servicio Geológico Mexicano, 2018).

De la tabla anterior podemos observar que el mineral metálico que más se extrae es el Manganeso, resaltando su volumen con 204,434 toneladas. Otro mineral es el plomo que en el año 2015 obtuvo su máximo valor de producción siendo 9, 155 toneladas (Servicio Geológico Mexicano, 2018).

En cuanto a participación en el volumen y valor de la producción nacional en el año 2017, el Manganeso ocupó el 94.89% de la participación con un volumen de 204,510 toneladas y un valor de producción estatal de 1016,090,499.75 mdp, el siguiente mineral fue el plomo con un 2.83% y un volumen de 6,878 toneladas y 465,695,220.65 mdp, finalmente siguió el Zinc con un total de 2.70% equivalentes a 18,161 toneladas y 993,026,554.02 mdp (Servicio Geológico Mexicano, 2018).

Las regiones mineras metálicas que se encuentran en el estado, se agrupan de acuerdo al tipo de mineralización, la región de Zimapán se especializa en Oro, Plata, Plomo, Zinc y Cobre con un tipo de yacimiento Metasomático (Servicio Geológico Mexicano, 2018), a continuación se muestra la distribución de minerales en las diferentes minas y su volumen de producción, véase tablas 4 y 5 y figura 1, así como las unidades minero metalúrgicas y de transformación metálicos y no metálicos de acuerdo a la empresa, véase tablas 6 y 7.

Tabla 4 Volumen de producción mineral

No.	Nombre	Empresa	Municipio	t/día	Sustancia
1	El Monte	CIA Carrizal Mining, S.A. de C.V.	Zimapán	2,600	Zn, Cu, Ag
2	Mina San Juan	Real del Monte y Pachuca S.A. de C.V.	Pachuca	2,000	Au, Ag
3	Lolotla, Nonoalco, Buenavista	CIA Minera Autlán, S.A. de C.V.	Lolotla, Nonoalco, Molango	1,700	Mn
4	Zimapán	CIA Minera El Espíritu, S. de R.L.	Zimapán	800	Pb, Zn
5	Zimapán	CIA Minera y Beneficiadora Purísima, S. de R.L.	Zimapán	1,000	Pb, Zn

Fuente: (Servicio Geológico Mexicano, 2018)

Tabla 5 Distribución mineral en Hidalgo

Región minera	Distrito minero	Sustancia	Tipo de yacimiento
<b>Zimapán</b>	Carrizal, El Monte	Au, Ag, Pb, Zn, Cu	Metasomático
<b>Jacala-Nicolás Flores</b>	Nicolás Flores	Au, Ag, Pb, Zn	Hidrotermal
<b>Molango</b>	Molango, Nonoalco	Mn	Sedimentario exhalativo
<b>Pachuca - Actopan</b>	Pachuca-Real Del Monte-Miguel	Au, Ag, Pb, Zn, Cu	Hidrotermal

Fuente: (Servicio Geológico Mexicano, 2018)

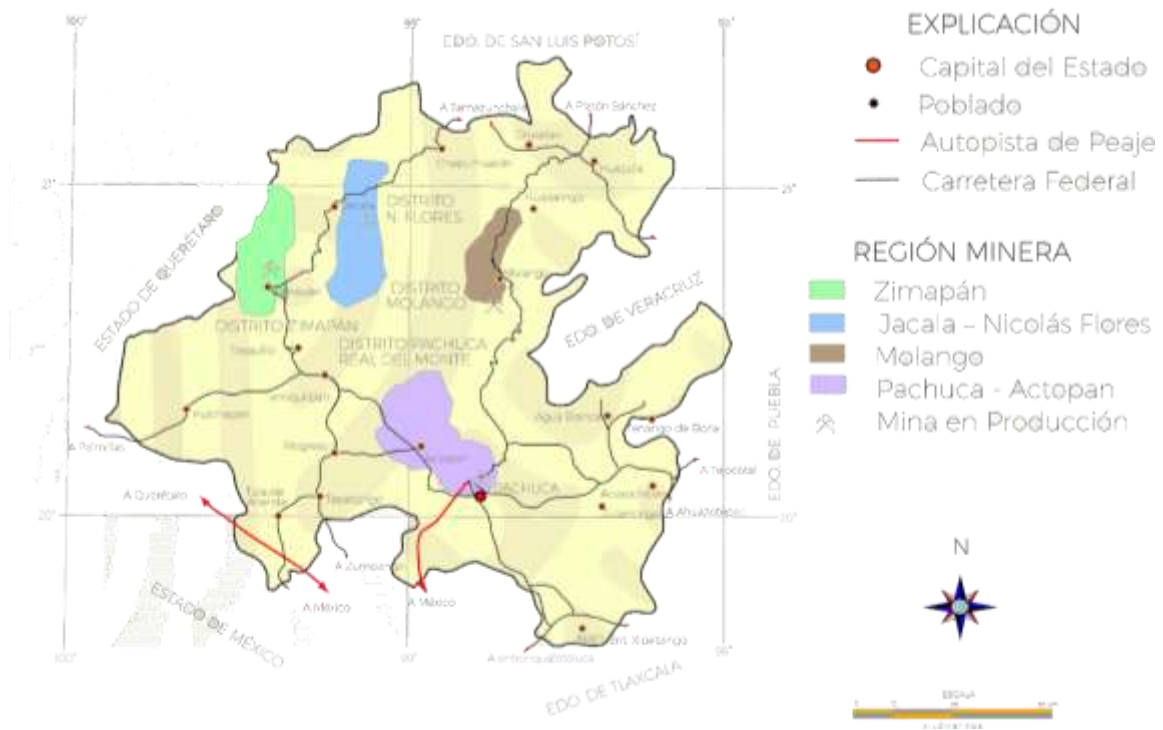


Figura 1 Principales minas en explotación metálicas, no metálicas y bancos de material

Fuente: (Servicio Geológico Mexicano, 2018)

Tabla 6 Unidades minero-metalúrgicas y de transformación metálicas

No.	Empresa	Municipio	Substancia	Producción t/día	Proceso metalúrgico
1	Carrizal Mining, S.A. de C.V.	Zimapán	Concentrados de Plomo, Zinc	2,600	Flotación
2	Real del Monte y Pachuca S.A.	Pachuca	Oro y Plata	2,000	Flotación
3	Cía. Minera Autlán S.A. de C.V.	Lolotla Molango Xochicoatlán	Nódulos de Mn y MnCO <sub>3</sub> .	1,713	Flotación Tostación
4	Comercializadora Zago Import-Export, S.A. de C.V.	Zimapán	Concentrados de Plomo, Zinc		Flotación

Fuente: (Servicio Geológico Mexicano, 2018)

Tabla 7 Unidades minero-metalúrgicas y de transformación no metálicos

No.	Empresa	Municipio	Substancia	Proceso metalúrgico
1	Cementos Mexicanos, S.A. de C.V.	Huichapan	Cemento	Calcinación
2	Cementos Tolteca, S.A. de C.V.	Atotonilco de Tula	Cemento	Calcinación
3	Sociedad Cooperativa Cruz Azul, S.A. de C.V.	Tula de Allende	Cemento	Calcinación
4	Caleras Beltrán, S.A. de C.V.	Atotonilco de Tula	Cal	Calcinación
5	Productora de Cal, S.A. de C.V.	Tepeji del Río	Cal	Calcinación
6	Cal El Tigre, S.A. de C.V.	Atotonilco de Tula	Cal	Calcinación
7	Lafarge Cementos, S.A. de C.V.	Atotonilco de Tula	Cemento	Calcinación
8	Arcillas y Caolines de Apulco, S.A. de C.V.	Tulancingo de Bravo	Arcillas	Lavado y Cribado
9	Comercializadora de Canteras, S.A. de C.V.	Huichapan	Cantera	Extracción, Corte y Pulido
10	Molizim, S.A. de C.V.	Zimapán	Carbonato de Calcio	Trituración y Molienda
11	Vicrila Glass Manufacturing Co.	La Reforma	Arena Sílica	Fundición

Fuente: (Servicio Geológico Mexicano, 2018).

## 1.6 Impacto ambiental de la minería

Las actividades mineras afectan el ambiente reduciendo la biodiversidad, en el suelo provocan su erosión creando nuevos suelos (Antrosoles) que presentan limitaciones físicas, químicas y biológicas que afectan la reinstalación de vegetación (Ortiz, Sanz, Dorado, & Villar, 2007), de la misma manera, provoca contaminación en los cuerpos de agua superficiales y subterráneos y el aire.

Todas las etapas de la minería generan residuos peligrosos, principalmente los procesos de explotación y fundición/refinación teniendo como principales residuos aguas residuales y emisiones a la atmósfera (Volke Sepúlveda & Velasco Trejo, 2002).

La mala disposición de residuos mineros como los jales que son los remanentes de partículas finas (1-600  $\mu\text{m}$ ) de roca minada posterior a su extracción (Castillo & Yañez, 2018) en montones o relaves libera elementos tóxicos y sin un manejo adecuado, los relaves y las minas abandonadas son una fuente importante de metales pesados, que son lavados y precipitan contaminando el ambiente y así el suelo se convierte en no solo un receptor pasivo de metales pesados, sino una fuente de contaminación para otros componentes ambientales y la cadena de alimentación (Demková, Jezný, & Bobul'ská, 2017).

La calidad del aire se ve afectada, de manera que cuando los depósitos minerales se encuentran a cielo abierto pueden ser aerotransportados por medio del viento y el paso de los automóviles y provocar problemas respiratorios. Los elementos susceptibles para aerotransportar incluyen al Pb, As y Cd (Chepkemoui, 2017).

El impacto en el agua puede incluir contaminación por metales y ácidos de minas. Los contaminantes liberados de plantas procesadoras, minas subterráneas, sitios de disposición, sitios activos o abandonados de transporte y relaves, constituyen las principales fuentes de contaminación afectando la flora y fauna presentes en estos cuerpos de agua (Chepkemoui, 2017).

### **1.7 Toxicidad de los metales pesados**

En el caso particular de la contaminación por metales pesados, se entiende por metal pesado a aquellos elementos químicos (metales y metaloides) cuya densidad es mayor que  $4.5 \text{ g/cm}^3$  o con número atómico mayor a 20 (excluyendo los metales alcalinos y alcalinotérreos) como Plomo (Pb), Cadmio (Cd), Cobre (Cu), Mercurio (Hg), Estaño (Sn) y Zinc (Zn), otros no metales son usualmente considerados con los metales pesados como el Arsénico (As), Antimonio (Sb) y Selenio (Se) (Rodríguez-Eugenio, McLaughlin, & Pennock, 2018) las consecuencias de su presencia radican en una elevada toxicidad que amenaza a los ecosistemas pues son los contaminantes más persistentes y complejos para remediar en la naturaleza y no solo en la fertilidad del suelo y calidad de agua,

sino en la calidad alimentaria y la salud humana (Kong & Glick, 2017) debido a que tienden a acumularse en los tejidos de los organismos puesto que no pueden ser metabolizados. La bioacumulación incluye todos los procesos responsables de la recepción de los iones metálicos disponibles por las células vivas, incluye biosorción junto con acumulación intracelular y mecanismos de precipitación, la acumulación intracelular ocurre por los sistemas de transporte de la célula que requieren energía metabólica y la precipitación es la interacción entre metales y metabolitos en los alrededores (Shao, y otros, 2019).

Los elementos considerados como metales pesados, normalmente se encuentran en bajas concentraciones en los suelos pues varios son micronutrientes esenciales para los seres vivos como el Fe, Mn, Zn, B, Co, As, V, Cu, Ni o Mo y aquellos que no realizan ninguna función biológica son Cd, Hg y Pb. Dentro de los metales pesados, el Zn, Ni, Co y Cu son más tóxicos para las plantas mientras que el As, Cd, Pb, Cr y Hg lo son para los animales (McBride, 1994).

Los seres humanos se pueden ver expuestos a estos contaminantes por tres vías, contacto dérmico, inhalación y comida contaminada, esta última representa más del 90% de los casos de exposición por lo que el suelo es el camino directo para la contaminación de vegetales y cultivos a través de la captación de las raíces, estos cultivos que son cultivados en lugares contaminados pueden captar metales pesados o metaloides más allá de los LMP (límites máximos permisibles) si la biodisponibilidad del contaminante es alta y causar problemas de salud (Khalid, y otros, 2016) cuyos efectos a partir de una exposición crónica son perceptibles solo unos años después de la exposición (Singh & Kalamdhad, 2011).

**1.7.1 Plomo (Pb):** Este metal pesado es uno de los más tóxicos y su presencia en suelo es pequeña, 15 mg /kg suelo, sin embargo, a concentraciones mayores es peligroso para la salud humana debido a su persistencia residual y facilidad para entrar a la cadena alimentaria y así entra al organismo humano por vía respiratoria o gastrointestinal. Las principales formas en que es encontrado debido a actividades antropogénicas son PbS, PbO, PbSO<sub>4</sub>, PbO-PbSO<sub>4</sub>. Como parte de

los efectos a la salud humana, el plomo tiene efectos tóxicos a concentraciones de  $\leq 10 \mu\text{g/dL}$  y tiene una afinidad por los eritrocitos de un 95%, causando, deterioros cognitivos y de comportamiento, convulsiones, inducción a estado de coma y finalmente la muerte, además en intoxicaciones agudas y crónicas causa problemas digestivos, dolores epigástricos y abdominales, vómitos, alteraciones renales y hepáticas y anemia (Kumar, Gautam, & Pathak, 2018; Montes, 2016; ASTDR, 2019).

**1.7.2 Arsénico (As):** El arsénico se encuentra ampliamente distribuido en el suelo a una concentración de 2 mg/kg. Puede ser aerotransportado fácilmente y filtrarse al agua directamente o a través del suelo y en el suelo puede ser adsorbido por arcillas o materia orgánica, en ambiente forma compuestos inorgánicos en contacto con oxígeno y azufre. En los seres humanos, inhibe el sistema inmune daña el Sistema Nervioso Central, provoca cirrosis hepática y afecta los riñones, en animales y plantas se combina con carbono e hidrógeno formando compuestos orgánicos (Montes, 2016).

**1.7.3 Cobre (Cu):** Ampliamente encontrado en el ambiente en concentraciones medias de 100 mg/kg suelo en formas de calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ), bornita ( $\text{Cu}_5\text{FeS}_4$ ), etc. representando un micronutriente para plantas y animales. El cobre normalmente es adsorbido por materia orgánica, arcilla, arena y el suelo (Montes, 2016) La exposición a los seres humanos es primordialmente por agua y comida. En altas concentraciones el cobre causa irritaciones en nariz, boca, ojos, vómito, diarrea, calambres estomacales, daño hepático y renal e incluso puede provocar la muerte (Singh & Kalamdhad, 2011).

**1.7.4 Zinc (Zn):** Se encuentra abundantemente en los suelos con una concentración media variando de 10 a 300 mg/kg siendo retenido por silicatos, carbonatos, fosfatos, óxidos y materia orgánica (Montes, 2016). Es considerado como relativamente no tóxico especialmente si se entra en contacto con zinc por vía oral, sin embargo, cantidades elevadas pueden causar problemas en el crecimiento y reproducción, así como también vómitos, diarrea, sangre al orinar,

ictericia, fallo en hígado y riñones y anemia (Singh & Kalamdhad, 2011).

**1.7.5 Cromo (Cr):** Considerado como un contaminante constante, el Cromo es altamente tóxico para organismos acuáticos provocando diferentes tipos de cáncer y es ambientalmente persistente en sus formas de Cr (III) o Cr (VI) (Singh & Kalamdhad, 2011), el Cromo en su forma hexavalente es carcinogénico afectando principalmente los pulmones, hígado, riñón y posiblemente dañando el ADN (Kumar, Gautam, & Pathak, 2018).

**1.7.6 Cadmio (Cd):** Se encuentra por naturaleza en la corteza terrestre en forma de óxido de cadmio, cloruro de cadmio, sulfato o sulfuro de cadmio (Montes, 2016), sin embargo cuando se encuentra en concentraciones mayores, las plantas lo toman y resulta en una inhibición del crecimiento, alteraciones en absorción de nutrientes, clorosis e incluso la muerte de la planta (Kumar, Gautam, & Pathak, 2018). En los seres humanos se ha identificado como órganos objetivo hígado, placenta, riñones, pulmones, cerebro y huesos, sus síntomas dependiendo de la exposición incluyen náuseas, vómitos, dolores abdominales, disnea y debilidad muscular y dentro de sus síntomas por una exposición severa incluyen edema pulmonar y muerte, también puede causar enfermedad Itai-Itai y anemia (Singh & Kalamdhad, 2011).

**1.7.8 Manganeso (Mn):** Se encuentra naturalmente en muchos tipos de rocas en su estado puro pero puede combinarse con óxido, azufre o cloro y puede verse en formas como la pirolusita ( $MnO_2$ ), manganita ( $MnOOH$ ), hausmanita ( $Mn_3O_4$ ) entre otras, así, el manganeso también es un micronutriente elemental, sus concentraciones en suelo oscilan entre 350 – 2000 mg/kg ,pero en concentraciones mayores, puede causar daños en el Sistema Nervioso Central, en cerebro, entorpece la psicomotricidad e irrita pulmones y daña la función reproductora (Montes, 2016).

**1.7.9 Níquel (Ni):** Normalmente encontrado en suelos contaminados, sus concentraciones en huesos son relacionadas con las condiciones ambientales, así

como, la dieta, la exposición ocupacional y la salud promedio de la población. Los seres humanos son intoxicados por medio de agua y comida contaminada. Los niveles comunes de níquel en suelo van de 5 a 500 mg/kg de suelo, encontrándose en un promedio la cantidad de 50 mg/kg suelo, sin embargo, las concentraciones encontradas en suelos destinados a agricultura y suelos procedentes de rocas ígneas muestran concentraciones que van de 3 a 1000 mg/kg suelo y 2000 a 6000 mg/kg suelo respectivamente (Kumar, Gautam, & Pathak, 2018)

### **1.8 Tecnologías de remediación aplicables a metales pesados**

Actualmente, podemos encontrar numerosas tecnologías para la remediación de suelos contaminados con metales pesados, estas pueden ser en *in-situ* y *ex-situ*. Los métodos *in-situ* se refieren a que el contaminante es tratado en el lugar en el que fue encontrado, estas tecnologías se utilizan en lugares que no han sido alterados por medio de excavaciones, así mismo, hace el proceso de remediación más seguro para el personal involucrado, es más económico y altera menos el sitio contaminado. Los procesos *ex-situ* son aplicados a lugares que ya han sido modificados por medio de excavaciones u extracciones por lo que puede llevarse a cabo fuera del sitio (Burlakovs & Vircavs, 2010). Así como esto también las tecnologías de remediación pueden ser clasificadas en físicas, químicas y biológicas.

Dentro de las tecnologías de remediación física están:

1. Reemplazo de suelo: Se sustituye completa o parcialmente el suelo contaminado por uno no contaminado, el suelo reemplazado es tratado para la remoción del contaminante o puesto a disposición. También se puede hacer un esparcimiento del suelo en donde el sitio es profundamente cavado y es esparcido en sitios profundos lo que reduce la concentración del metal. Con esto se disminuye concentración del contaminante y aumenta la funcionalidad del suelo, sin embargo, es una técnica costosa por el uso de mano de obra y maquinaria; los costos de excavación,

transportación de corta distancia y disposición varían de \$270 a \$460 dólares por tonelada (Khalid, y otros, 2016).

2. Aislamiento de suelo: Se usa para evitar la migración de los contaminantes a las aguas subterráneas cuando otros métodos no son económica o físicamente viables. El suelo contaminado se extrae del no contaminado y se restringe en un área. También se hace uso de barreras subsuperficiales horizontales para separar cuerpos de agua y suelo, también hay barreras verticales que restringen el movimiento lateral de aguas subterráneas, normalmente están hechas de materiales permeablemente bajos como arcilla (Khalid, y otros, 2016).
3. Remedación electrocinética: Una tecnología nueva y costeable que separa y extrae contaminantes orgánicos de los inorgánicos (metales) por medio de un campo eléctrico que remueve las especies cargadas haciendo migrar a los compuestos a los polos correspondientes. Una de sus limitaciones es que su eficiencia se ve disminuida cuando el suelo tiene una humedad <10% así como cuando hay valores extremos de pH, reacciones redox o presencia de depósitos minerales (Volke Sepúlveda & Velasco Trejo, 2002).

Entre las tecnologías químicas podemos encontrar:

1. Técnicas de inmovilización: Se refiere a la disminución de la movilidad y biodisponibilidad del metal por medio de agentes inmovilizadores. Los metales pueden ser inmovilizados por medio de complejación, precipitación y adsorción. Los agentes inmovilizadores incluyen cemento, arcilla, zeolitas, fosfatos, minerales y compuestos orgánicos que provocan una redistribución de los metales de solución del suelo haciéndolos partículas sólidas y así restringiendo su movilidad (Khalid, y otros, 2016).
2. Lavado: El suelo excavado se separa primeramente para eliminar partículas gruesas (grava) con poca capacidad de adsorción, después se hace un lavado con extractantes químicos que desorben y solubilizan los contaminantes. Posterior a esto, se lava con agua para remover los

contaminantes y los agentes extractantes y el suelo se regresa. El grado de adsorción del metal, el pH, textura, capacidad de intercambio catiónico del suelo, el contenido de materia orgánica y el tiempo son variables que determinan la eficacia del tratamiento (Ortiz, Sanz, Dorado, & Villar, 2007).

Finalmente, los tratamientos biológicos, se basan en la actividad biológica natural de los microorganismos (bacterias, hongos, plantas y sus microorganismos asociados) para remediar los sitios contaminados (Durán, 2010).

Estos se presentan como unas de las opciones más viables para reestablecer las condiciones del sitio contaminado, son procedimientos costeables, no invasivos y dan una solución permanente (Khalid, y otros, 2016).

Es importante mencionar que las técnicas de remediación de origen biológico son funcionales cuando los agentes contaminantes se encuentran cerca de la superficie y no son lixiviables o cuando no es una situación de urgencia (González C., 2005).

Dentro de estas técnicas podemos encontrar:

1. Biorremediación: La biorremediación es el uso de microorganismos para degradar, transformar o remover contaminantes a productos metabólicos inocuos o menos tóxicos, aquí se pone en función la capacidad de cada microorganismo para utilizar los contaminantes como fuente de alimento y energía a través de rutas metabólicas.

Para este proceso, lo más recomendable es emplear organismos autóctonos del sitio, pero también pueden utilizarse microorganismos exógenos cuando los microorganismos autóctonos no sean capaces de metabolizar los contaminantes, así se da la estimulación *ex-situ* de los microorganismos indígenas para ser reestablecidos en la zona contaminada en conjunto con los microorganismos capaces de degradar los contaminantes (un proceso llamado bioaumentación), la remediación se puede llevar a cabo *in-situ* o *ex-situ* (Volke Sepúlveda & Velasco Trejo,

2002; Ortiz, Sanz, Dorado, & Villar, 2007). Cabe mencionar que puede que la biorremediación en condiciones de campo no tenga el mismo éxito demostrado en laboratorio (Ortiz, Sanz, Dorado, & Villar, 2007).

2. Fitorremediación: Es el uso de plantas y sus microorganismos asociados para remover, contener o neutralizar contaminantes. Se ha convertido en una de las técnicas más prometedoras para la remediación de suelos contaminados y ha ganado atención debido a que es una tecnología económica (Durán, 2010).

La elección de la o las tecnologías a utilizar dependen de varios factores como las características del suelo, grado de contaminación, presupuesto, tiempo de restauración y la función o uso que se dé al área restaurada. Los tratamientos *in-situ* son normalmente preferidos debido a que son más costeables y la alteración al medio y su destrucción también son más bajos, sin embargo, son procesos más largos y difíciles pues suponen poner en contacto el suelo contaminado en su totalidad con el tratamiento (Diez Lázaro, 2008).

La fitorremediación en este trabajo será la técnica de remediación en la que nos basaremos y profundizaremos a continuación.

## **1.9 Fitorremediación**

La fitorremediación se define como el uso de plantas y sus microorganismos asociados a la rizosfera para remediar matrices contaminadas (suelos, residuos, sedimentos, agua y aire) mediante la extracción, transformación, estabilización y/o degradación de contaminantes orgánicos e inorgánicos. (Muñoz C., Ballinas C., Nevárez M., & Peralta P., 2010).

### **1.9.1 Mecanismos de fitorremediación**

También llamados fitotecnologías, se basan en los mecanismos fisiológicos básicos de las plantas.

**Fitoextracción:** Hace referencia al uso de plantas capaces de acumular los contaminantes en la parte cosechable de la planta para así ser removido por medio de prácticas agrícolas tradicionales. La fitoextracción generalmente se ve limitada por la profundidad a la que llegan las raíces, definiendo así su efectividad. Este mecanismo es comúnmente aplicado a sitios contaminados con metales, elementos radioactivos y fenoles (Muñoz C., Ballinas C., Nevárez M., & Peralta P., 2010). De la misma manera, la fitoextracción, acumula los contaminantes en menos masa que será llevada a disposición en comparación de la excavación de suelos u otros medios (EPA, 2000).

Algunas plantas pueden hiper acumular metales sin efectos tóxicos y sólo unas de estas pueden hacerlo con varios metales. Las plantas hiper acumuladoras, pueden contener más de 1% de metal en su biomasa seca. Este mecanismo se debe a la sobreexpresión de los genes que regulan el transporte de membrana como el transportador de Cobre (COPT1) y el transportador de Zinc (ZNT1) (Greipsson, 2011). Según (Baker et al., 2000) y (Wei and Zou, 2006) citados por (Kumar, Gautam, & Pathak, 2018) se pueden denominar plantas hiperacumuladoras aquellas especies que acumulan más de 10 000 mg/kg peso seco para Zn y Mn, 1000 mg/kg para Co, Cu, Ni, As y Se y 100 mg/kg de Cd en sus raíces y que además considerando el factor de translocación, la concentración en sus brotes es mayor que en las raíces. Así la cantidad de metal que puede concentrarse en los tejidos de la planta es directamente proporcional a la cantidad biodisponible del metal en el suelo, (Wood, Liu, Tang, & Franks, 2016) estas limitantes (el crecimiento lento y la baja producción de biomasa) pueden mejorarse por medio de la manipulación de sus microorganismos asociados y la inoculación de Bacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (BPCV) (Greipsson, 2011; Wood, Liu, Tang, & Franks, 2016), técnica conocida como fitorremediación asistida.

**Fitodegradación:** También llamado fitotransformación. La planta degrada y/o transforma contaminantes orgánicos en sustancias menos tóxicas a través de su absorción, translocación y metabolismo de la planta con reacciones enzimáticas

que se llevan a cabo en la rizosfera (Muñoz C., Ballinas C., Nevárez M., & Peralta P., 2010).

**Fitoestimulación:** Los exudados de las raíces estimulan el crecimiento de microorganismos capaces de degradar los contaminantes orgánicos que no pueden ser incorporados por las plantas (Mentaberry, 2011) es aquí cuando pueden degradarse en la rizosfera (Kalogerakis, 2009).

**Fitovolatilización:** Algunas plantas son capaces de volatilizar contaminantes presentes en el suelo, sedimentos o agua. (Núñez L., Meas V., Ortega B., & Olgúin, 2004). Estos son absorbidos, translocados y transpirados por las partes aéreas de la planta en formas volátiles y menos tóxicas (EPA, 2000). Los contaminantes que pueden ser tratados por esta técnica son los hidrocarburos volátiles y metales. (Muñoz C., Ballinas C., Nevárez M., & Peralta P., 2010).

**Fitoestabilización:** Se basa en la reducción de la biodisponibilidad de metales y otros contaminantes por medio de reacciones químicas como la precipitación en la zona de la rizosfera por los exudados de las plantas, formación de complejos insolubles o mecanismos físicos en donde el contaminante es absorbido y acumulado por las raíces, adsorbido en las raíces de la planta (EPA, 2000) y/o la materia orgánica presente en el suelo limitando su biodisponibilidad y la migración vertical a los mantos freáticos. (Núñez L., Meas V., Ortega B., & Olgúin, 2004). En la fitoestabilización el desarrollo de un amplio sistema de raíces de la planta es vital para reducir la biodisponibilidad de metales y otros contaminantes. Este mecanismo se aplica principalmente a suelos contaminados con metales, metaloides y fenoles.

**Rizofiltración:** Hace referencia a cultivos hidropónicos para absorber, concentrar y precipitar metales pesados en aguas residuales, aguas superficiales y aguas subterráneas extraídas. (Núñez L., Meas V., Ortega B., & Olgúin, 2004). Estos mecanismos por parte de la planta varían de acuerdo con el contaminante y los exudados de las raíces de las plantas pueden provocar la precipitación de algunos

metales. En la rizofiltración estos contaminantes son inmovilizados o acumulados en o dentro de la planta para poder ser removidos físicamente quitando la planta y no funciona su aplicación en suelo y sedimentos puesto que el contaminante debe estar en solución para ser absorbido por la planta. (EPA, 2000).

### 1.9.2 Ventajas de la fitorremediación ante otras técnicas

La siguiente tabla (véase tabla 8) muestra las ventajas y desventajas de la fitorremediación ante otras tecnologías.

Tabla 8 Ventajas y desventajas o limitaciones de la fitorremediación

Ventajas	Desventajas
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Puede realizarse <i>in-situ</i> y <i>ex-situ</i>.</li> <li>• Es una tecnología sustentable que por lo que es poco perjudicial para el ambiente.</li> <li>• Al no transportar el sustrato la dispersión de contaminantes disminuye.</li> <li>• Evita la excavación y el tráfico pesado.</li> <li>• Se pueden tratar tanto contaminantes orgánicos como inorgánicos.</li> <li>• Bajo costo.</li> <li>• No se precisa personal especializado para su manejo.</li> <li>• Sólo se necesitan prácticas agronómicas convencionales.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Su campo de acción únicamente abarca la contaminación superficial que esté en contacto en la zona de la rizosfera (3-6 pies de profundidad para plantas herbáceas y 10-15 pies para árboles).</li> <li>• Debido a que los contaminantes limitan el crecimiento de las plantas, sólo puede aplicarse a concentraciones bajas a medias de contaminantes.</li> <li>• El tiempo para la remoción del contaminante es mayor a comparación de otros métodos.</li> <li>• Grandes áreas necesarias.</li> <li>• En la fitovolatilización los</li> </ul>

<ul style="list-style-type: none"> <li>• No consume energía.</li> <li>• Mejora el suelo y sus propiedades físicas y químicas por medio de la creación de una cubierta vegetal.</li> <li>• Aplicable a lugares contaminados con concentraciones bajas a medias.</li> <li>• No produce contaminantes secundarios.</li> <li>• Fácilmente aceptada por la población por su estética.</li> <li>• Aplicable a distintas matrices (agua, suelo, aire, sedimentos)</li> <li>• Se pueden reciclar recursos (agua, biomasa y metales).</li> <li>• Puede reducir la entrada de contaminantes al ambiente disminuyendo su migración a aguas subterráneas.</li> </ul>	<p>contaminantes pueden ser liberados nuevamente.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Aquellos contaminantes acumulados en madera pueden ser liberados por la combustión.</li> <li>• No se pueden emplear todas las plantas.</li> <li>• Directamente dependiente de las estaciones.</li> <li>• En especies de vida larga (árboles y arbustos) el proceso es más lento.</li> <li>• La solubilidad de algunos contaminantes puede hacerse mayor provocando un mayor daño ambiental o la migración de contaminantes.</li> <li>• Los contaminantes pueden pasar a la cadena alimentaria si algún animal se alimenta de una planta sea empleada para remediación.</li> </ul>
--	--

*Elaboración propia con fuente:* (Delgadillo L., González R., Prieto G., Villagómez I., & Acevedo S., 2011) (Núñez L., Meas V., Ortega B., & Olguín, 2004) (Kumar, Gautam, & Pathak, 2018) (Agudelo B., Macias M., & Suárez M., 2005).

Para este proyecto, se considera el uso de malva real (*Alcea rosea*) debido a que al momento del muestreo fue uno de los ejemplares de plantas endémicas encontradas en las presas de jales mineros, a razón de lo anterior, se considera importante dar una breve descripción de las características de la planta.

La malva real es perteneciente a la familia de las Malváceas y al género *Alcea*, la malva real también conocida como Malvarrosa, Malva loca, Malva de la reina, *Alcea*, entre otros nombres, es una hierba de tallos altos y erectos cubiertos por pelos estrellados, a menudo el tallo alcanza de 2.4 -3 m, las hojas son grandes, llegando a medir de 7.5 – 12.5 cm de diámetro, pecioladas con su forma cordada-ovada teniendo de 5 a 7 lóbulos. Las flores que brotan durante el verano son de gran tamaño, alcanzan a medir más de 10 cm de ancho y pueden ser de varios colores (rojo, rosa, morado, blanco, amarillo, púrpura oscuro) (Figura 2). Su fruto es circular y contiene las semillas (Figura 3) que son de color pardo, rugosas, con forma de riñón y tienen vellosidades en el margen y miden aproximadamente 6 mm; su tiempo de germinación varía de entre 10 a 18 días (Fahamiya, Shiffa, & Aslam, 2016; Sánchez G., 2017; Sánchez, 2016).



*Figura 2 Malva real*

Fuente: (Seeds Gallery, 2017)



*Figura 3 Semillas de malva real*

Fuente: (Science Photo Library, 2019)

### **1.9.3 El estudio de la rizosfera**

Debido a que la fitorremediación es una técnica que aprovecha tanto la capacidad intrínseca de ciertas plantas, así como de los microorganismos asociados a sus raíces para acumular y/o estabilizar contaminantes, es de suma importancia el estudio de la rizosfera que es la región del suelo que se extiende de 1-3 mm alrededor de las raíces y que está totalmente influenciada física y fisiológicamente por las raíces de las plantas. La rizosfera tiene una actividad microbiana mayor en comparación con el resto del suelo, se dice que en un gramo de suelo rizosférico (peso seco), se presenta un conteo aproximado de  $10^8$  bacterias,  $10^6$  actinomicetos y  $10^5$  hongos (Muñoz C., Ballinas C., Nevárez M., & Peralta P., 2010) que se debe principalmente a la diversidad de moléculas en los exudados de las plantas que son liberados a la rizosfera, que bien pueden detener a un organismo y atraer a otro, así mismo las interacciones físicas, químicas y biológicas que experimentan las plantas suceden entre las raíces y su rizosfera

(Bais H.P., 2006).

Dentro de los organismos asociados a las relaciones microorganismo-planta se encuentran las rizobacterias y las bacterias endófitas, las rizobacterias son aquellas que se encuentran en la zona rizosférica de la planta, migrando de gran parte del suelo a las raíces de la planta viva para poder colonizarlas. Por su parte, las bacterias endófitas son aquellas que han colonizado los tejidos internos de la planta sin causar efectos negativos en su hospedero. Ambos tipos de bacterias promueven el crecimiento vegetal de la planta por medio de la reducción de niveles de estrés presentes ante diversas condiciones bióticas y abióticas, por lo que se consideran Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (BPCV), sin embargo, las bacterias endófitas han mostrado mejores adaptaciones ante este tipo de estresores por lo que sus beneficios son mayores a comparación de las rizobacterias. (Ma, Prasad, Rajkumar, & Freitas, 2010; Vinayarani & Prakash, 2018)

#### **1.9.4 Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal**

Como se ha mencionado, la eficiencia de la fitorremediación se ve limitada constantemente por la disponibilidad del metal, por lo que los organismos rizosféricos y/o endófitos que pueden ser nativos y/o inoculados y que tienen la facilidad de colonizar además de una alta actividad enzimática como las bacterias promotoras de crecimiento vegetal (BPCV) juegan un papel interesante en la producción de cultivos porque 1) Estimulan el crecimiento de las raíces, 2) Hacen disponibles para las raíces los nutrientes en el suelo, 3) Fijan el nitrógeno atmosférico y mejoran la fertilidad del suelo, 4) Disminuyen los patógenos transmitidos por el suelo y protegen a la planta ante enfermedades, 5) Aumentan la tolerancia de la planta ante distintos estresores ambientales como la sequía, salinidad, altas temperaturas y la presencia de metales pesados, en este caso, solubilizan los metales y aumentan su disponibilidad, por medio de la reducción del pH del suelo o produciendo quelantes y sideróforos. Parte de los mecanismos

que estos microorganismos realizan para aliviar el estrés de la planta al hacerla más tolerante incluyen: 1) La producción de fitohormonas como el ácido indol acético (AIA), ácido giberélico (AG) o citoquininas, 2) metabolitos antifúngicos y/o enzimas líticas, 3) Producción de Ácido 1-aminociclo propano-1-carboxílico (ACC) desaminasa para reducir el nivel de etileno en las raíces de plantas en desarrollo, 4) solubilización de minerales como el fósforo y el potasio, 5) producción de exopolisacáridos y osmoprotectores e 6) inmovilización de metales pesados (Egamberdieva, Abd-Allah, & Teixeira da Silva, 2016).

Diferentes microorganismos empleados en la fitorremediación asistida han demostrado tener potencial para la remediación de suelos contaminados, tal como se muestra en la tabla 9.

En este trabajo se identificaron los géneros *Bacillus*, *Pantoea* y *Enterobacter*, por lo que es relevante conocer sus características básicas para el contexto de este estudio.

El género *Enterobacter* se caracteriza por ser bacterias gram-negativas con forma de bastón que miden entre 1-3  $\mu\text{m}$  de largo por 0.5  $\mu\text{m}$  de diámetro, son móviles y su cápsula tiende a ser menos notable (Puerta G. & Mateos R., 2010). Se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y se les puede encontrar en agua, suelo y también como parte de la microbiota de animales, insectos y el tracto gastrointestinal humano (Silva y TM. & Martínez O., 2018).

El género *Bacillus* son bacterias gram-positivas que en algunos cultivos de especies pueden ser volverse gram-negativos con el tiempo, son aerobias o anaerobias facultativa, tienen forma de bastón y normalmente se encuentran arregladas en pares de cadenas con bordes redondeados o rectangulares y son productoras de endosporas de manera aerobia cuando se someten a condiciones de crecimiento desfavorables. La pared celular de este género es extremadamente sólida, elástica, y altamente resistente a las presiones. Las especies de este género han demostrado tener una gran cantidad de habilidades que les permiten vivir en todos los ambientes

naturales. La mayoría de las especies de *Bacillus* son saprófitos inofensivos, sin embargo, también se pueden encontrar bacillos patógenos para los seres humanos (Turnbull, 1996; SMI, PHE, 2018; Mudd, Polevitzky, Anderson, & Chambers, 1941).

El género *Pantoea* en 1989 fue registrado incluyendo dos especies, *Pantoea agglomerans* que anteriormente se conocía como *Enterobacter agglomerans*, *Erwinia herbicola* o *Erwinia milletiae*, y *Pantoea dispersa*. El género *Pantoea* son bacterias Gramnegativas con forma de bastones rectos, de 0.5 a 1 µm por 1 a 3 µm, se caracterizan por ser móviles por peritricos y flagelos. Son aerobios facultativos y su temperatura óptima de crecimiento es 30°C. No tienen cápsula ni son formadoras de esporas, Se encuentran fácilmente en superficies de plantas, semillas, suelo, agua y fluidos de animales y humanos, este género es considerados también como un patógeno oportunista (Rafael M, 2007; Brady, y otros, 2010).

Tabla 9 Algunos microorganismos con potencial para la fitorremediación asistida

Microorganismo	Metal
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Microbacterium arabinogalactanolyticum</i></li> <li>• <i>Microbacterium oxydans</i></li> <li>• <i>Bacillus cereus</i></li> <li>• <i>Pseudomonas sp.</i></li> </ul>	Ni
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Mycobacterium sp.</i></li> <li>• <i>Pseudomonas fluorescens</i></li> <li>• <i>Pseudomonas tolaasii</i></li> <li>• <i>Klebsiella sp.</i></li> </ul>	Cd
<ul style="list-style-type: none"> <li>• [<i>Microbacterium saperdae</i>, <i>Pseudomonas monteilii</i>, <i>Enterobacter cancerogenus</i>] (Consortio)</li> <li>• <i>Fusarium oxysporum</i></li> </ul>	Zn
<ul style="list-style-type: none"> <li>• [<i>Pseudomonas sp.</i>, <i>Delftia sp.</i>] (Consortio)</li> <li>• [<i>Variovorax sp.</i>, <i>Pseudoxanthomonas sp.</i>, <i>Bacillus sp.</i>] (Consortio)</li> <li>• <i>Comamonas sp.</i></li> <li>• <i>Delftia sp.</i></li> <li>• <i>Rhodococcus sp.</i></li> <li>• <i>Streptomyces lividans</i></li> </ul>	As
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Agrobacterium radiobacter</i></li> <li>• <i>Arthrobacter mysorens</i></li> <li>• <i>Azospirillum lipoferum</i></li> <li>• <i>Flavobacterium sp.</i></li> </ul>	Cd, Pb

• <i>Bacillus sp.</i>	
• <i>Pseudomonas sp.</i>	
• <i>Bacillus pumilus</i>	
• <i>Bacillus subtilis</i>	Cr, Cu
• <i>Brevibacterium halotolerans</i>	
• <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	
• <i>Burkholderia cepacia</i>	
• <i>Phyllobacterium myrsinacearum</i>	Cd, Zn
• <i>Enterobacter intermedius</i>	
• <i>Pseudomonas jessenii</i>	Ni, Cd, Zn
• <i>Bacillus subtilis</i>	Cd, Cu, Pb

Fuente: (Wood, Liu, Tang, & Franks, 2016).

En este sentido, (Wood, Liu, Tang, & Franks, 2016) mencionan que las habilidades de las BPCV pueden verse superadas por las de comunidades de microorganismos nativos que pueden ser estimuladas por la inoculación de estas BPCV, incluso si el inóculo a lo largo del tiempo disminuye.

De igual manera, para aumentar la biodisponibilidad del metal pesado hay una amplia gama de quelantes que a lo largo del tiempo han sido demostradas sus capacidades para aumentar la movilidad de estos contaminantes y la captación por plantas, dentro de los quelantes químicos más conocidos se encuentra el Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA o AEDT), Ácido N-(2-acetamido)-iminodiacético (ADA), Ácido dietilentriaminopentaacético o ácido pentético (DTPA), Ácido etilenbis (oxietilen nitrilo) tetracético (EGTA) y Ácido piridina-2,6-dicarboxílico o (PDA), entre otros, que debido a su persistencia en suelos han abierto las puertas a quelantes químicos biodegradables como el: Ácido nitrilotriacético (NTA), Ácido (S,S)- Etilendiamino-N,N'-disuccinico (EDDS) o el Ácido iminodisuccinico (IDSA) por mencionar algunos o también compuestos biológicos como los bio-surfactantes, sideróforos y ácidos orgánicos como alternativa a la movilización de estos contaminantes, estos compuestos biológicos han demostrado incrementar la solubilidad de los metales pesados por un periodo corto antes de ser degradados, además pueden ser agregados al suelo

directamente ya purificados previamente o añadiendo a los microorganismos capaces de producirlos, en este caso, se reduce el riesgo de la lixiviación de los contaminantes por medio de la concentración del metal soluble cerca de la rizosfera donde puede ser extraído y si las condiciones permiten la persistencia del microorganismo existe la posibilidad de tener una producción continua de estos compuestos. En el caso de los quelantes químicos y aquellos biodegradables existe la posibilidad de que los metales movilizados puedan lixiviar a cuerpos de agua subterráneos si la relación capacidad-captación-planta: cantidad-aplicada-quelante no es la adecuada (Wood, Liu, Tang, & Franks, 2016).

### **1.9.5 Importancia ACC desaminasa**

Como se mencionó anteriormente las BPCV tienen un papel importante en la aminación de estrés ambiental a la planta. Bajo condiciones de estrés, bióticas y abióticas (metales pesados, salinidad, sequía, etc.) la planta experimenta problemas en su desarrollo, morfología y fisiología, así como desórdenes bioquímicos que afectan su metabolismo y su ciclo de vida normal. Uno de esos desórdenes es el aumento de producción de etileno que conduce a la inhibición del crecimiento de la raíz y la planta en general (Singh M., 2018).

Para un desarrollo normal de la planta es esencial que los niveles de etileno sean bajos por lo que es importante la reducción de estos niveles que se producen bajo condiciones de estrés (Glick, Penrose, & Li, 1998), para lograr esto, se puede tratar a la planta con químicos que inhiban la biosíntesis de etileno o la enzima ACC desaminasa producida por las BPCV como inhibidores biológicos. Las sustancias químicas a pesar de ser buenas inhibidoras se han reportado como tóxicas y persistentes, por otro lado, las bacterias productoras de la enzima ACC desaminasa protegen a la planta también ante otro tipo de estresores (Singh M., 2018).

Las BPCV bio-sintetizan la enzima ACC desaminasa, que cataliza ACC (precursora de la biosíntesis de etileno) en  $\alpha$ -cetobutirato y amonio. Debido a que los exudados de las raíces contienen triptófano, aminoácidos, azúcares, ácidos orgánicos y otras

moléculas, las BPCV se adhieren a la superficie de las semillas o raíces induciendo a la planta a sintetizar más ACC que en otros casos necesitaría y estimulando la exudación de más ACC de la raíz. El ACC provee nitrógeno a las BPCV para que puedan sobrevivir ante las condiciones desfavorables. (Singh M., 2018).

### 1.9.5.1 Ruta metabólica producción e inhibición de etileno

A continuación, se presenta la ruta metabólica de la producción e inhibición de etileno (Figura 4).

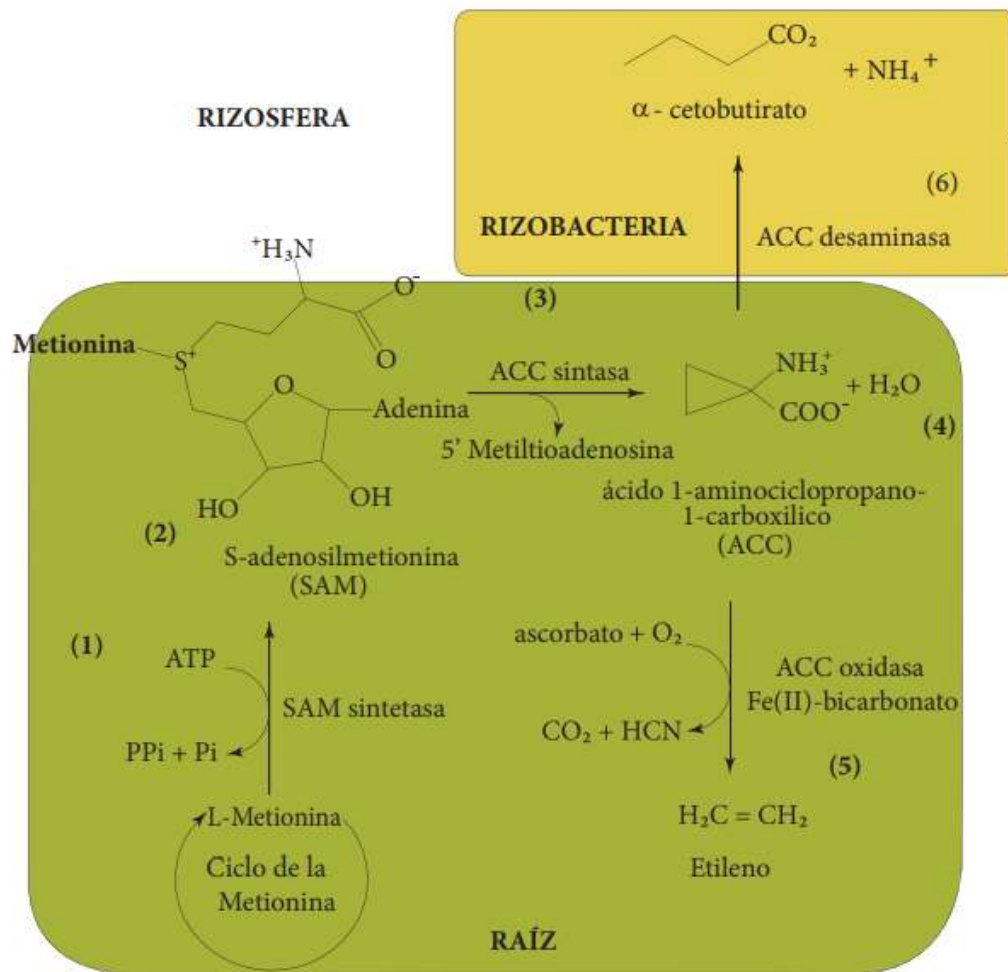


Figura 4 Reacción de la enzima desaminasa del ACC en las reacciones de síntesis y degradación precursoras de etileno

Fuente: (Esquivel C., Gavilanes R., Cruz O., & Huante, 2013).

- (1) La L-metionina que se encuentra en los exudados de las raíces se convierte en S-adenosilmetionina (SAM) por medio de la activación con ATP, reacción catalizada por SAM sintetasa que se produce durante condiciones de estrés ambiental.
- (2) SAM se convierte a ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) mediante ACC sintasa con ayuda de piridoxal-5-fosfato como cofactor. La enzima ACC sintasa es estimulada por fitohormonas como auxinas (AIA), citocinas (Z) y el etileno.
- (3) A partir del ACC se sintetiza etileno por medio de ACC oxidasa donde además se generan como subproductos CO<sub>2</sub> y HCN. Aquí el hierro (Fe<sup>+++</sup>) actúa como cofactor y como cosustrato el ascorbato.

La vida media de las enzimas ACC sintasa y ACC oxidasa es corta y se encuentran en bajas concentraciones y el ACC también puede ser convertido en *N*-malonil-ACC mediante ACC *N*-malonil transferasa.

Así es como entra la importancia de la ACC desaminasa:

- (4) El ACC se convierte en  $\alpha$ -cetobutirato y amonio con ayuda de la ACC desaminasa producida por las BPCV.

Tanto el amonio como el  $\alpha$ -cetobutirato son metabolitos comunes para plantas y otros organismos como una alternativa más de fuente de nitrógeno.

Se ha reportado que la actividad enzimática de la ACC desaminasa es inducida por niveles bajos del sustrato ACC, pero no presenta una alta afinidad por el mismo, esto deja a la ACC oxidasa (la enzima productora de etileno) una mayor ventaja al tener mayor afinidad por el ACC, por esa razón el aumento en la cantidad de ACC desaminasa es importante y para que esta compita exitosamente por el sustrato con la ACC oxidasa, la ACC desaminasa debe tener entre 100 a 1000 veces más que la oxidasa (Esquivel C., Gavilanes R., Cruz O., & Huante, 2013).

### 1.9.6 Importancia de la solubilización de fosfatos

El fósforo (P) es importante para el crecimiento y desarrollo adecuados para las plantas. Es el segundo macronutriente más importante después del nitrógeno (N) y es un factor limitante para el crecimiento de las plantas. Está presente en el suelo en altas cantidades, pero su disponibilidad es baja comparada con el total. La cantidad de fósforo en suelo se expresa como  $P_2O_5$ . La solubilización de P decrece o se inmoviliza por precipitaciones químicas, absorción o ambas, sin embargo, la principal razón de la baja disponibilidad es porque sólo puede ser absorbido por las plantas en la forma monobásica ( $H_2PO_4^-$ ) y la di básica ( $HPO_4^{2-}$ ) (Singh M., 2018; Corrales R., Arévalo G., & Moreno B., 2014).

Los fosfatos están presentes en el suelo en formas orgánicas e inorgánicas, la mayoría de los compuestos de fósforo mineral insolubles se encuentran en las formas inorgánicas y no pueden ser absorbidos por las plantas. Sin embargo, por medio de las BPCV pueden ser convertidas a formas accesibles para las plantas y así ser absorbidas, los mecanismos de las BPCV para la solubilización de fosfatos incluyen: 1) la liberación de complejos o minerales solubilizadores de compuestos como aniones de ácidos orgánicos (compuestos de bajo peso molecular como ácido butírico, oxálico, succínico, láctico, cítrico, etc.), sideróforos, protones, iones hidroxilo y  $CO_2$ . Al liberar ácidos orgánicos las Bacterias Solubilizadoras de Fosfato (BSF) disuelven los fosfatos inorgánicos aumentando la solubilidad de estos por la ionización de protones para reducir el pH y combinar  $PO_4^{3-}$  y formar  $HPO_4^{2-}$  o  $H_2PO_4^-$  (Yang, y otros, 2018), 2) liberación de enzimas extracelulares para la mineralización de fosfatos, 3) la liberación de P durante la degradación del sustrato por BPCV (Singh M., 2018). Por lo que un aumento en la disponibilidad del fósforo por BPCV mejora el desarrollo de la planta.

(Singh M., 2018) menciona que los géneros de bacterias que se han reportado como mayores agentes solubilizadores son *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*,

*Flavobacterium*, *Serratia* y *Microbacterium* dentro de estos *Bacillus* y *Pseudomonas* son las más eficientes. En cuanto al reino fungi los mejores géneros son *Aspergillus* y *Penicillium*.

#### **1.9.6.1 Capacidad in vitro y caracterización de BPCV solubilizadoras de fosfatos.**

De acuerdo con (Corrales R., Arévalo G., & Moreno B., 2014) el uso del medio selectivo Pikovskaya (PKV) que contiene fosfato tricálcico (TCP) que ha permitido identificar halos de solubilización que se muestran por la acidificación del medio (viraje a amarillo) cuando las bacterias u hongos hacen uso del fosfato como única fuente nutritiva.

Las cepas que muestren el halo de solubilización son medidas como diámetro total la distancia de extremo a extremo del halo incluida la colonia y como diámetro del halo de solubilización la diferencia entre el diámetro total y el diámetro de la colonia para poder calcular el índice de solubilización de fosfatos (IS) que es la relación entre el diámetro total y el diámetro de la colonia (Ávila M., Lizarazo F., & Cortés P., 2015) para poder determinar las mejores cepas solubilizadoras.

#### **1.9.7 Importancia y caracterización de bacterias productoras de sideróforos**

La disponibilidad del Fe para las plantas es de gran importancia, muchos organismos como las BPCV producen sideróforos que son pequeñas moléculas de alta afinidad por el hierro, actuando como quelante y transformando el Fe en presencia de otros metales para reducirlo a  $Fe^{2+}$ , para poder estar en una forma biodisponible. Además de esto, los sideróforos tienen potencial para el control biológico de hongos y bacterias fitopatógenas (Aguado-Santacruz, Moreno-Gómez, Jiménez-Francisco, García-Moya, & Preciado-Ortiz, 2012).

El método descrito por (Schwyn & Neilands, 1987) se usa para identificar cepas capaces de producir sideróforos a través del Cromo Azurol S (CAS), y el Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HDTMA) como indicadores que forman complejos con hierro férrico para producir un color azul. Así cuando un quelante fuerte de Fe

como los sideróforos entra en contacto con el medio, remueve el Fe del pigmento haciendo que el color cambie de azul a naranja alrededor de la colonia en forma de halo (Louden, Haarmann, & Lynne, 2011; Ambrosini & Passaglia, 2017).

### **1.9.8 Importancia de las biopelículas**

Otro mecanismo de las BPCV es la colonización de las raíces de la planta y su crecimiento para formar biopelículas, la formación de biopelículas brinda resistencia a estrés ambiental y condiciones hostiles dentro de los tejidos del organismo hospedero (Loera M., Ramírez C., Avelar G., & Guerrero B., 2012).

Las biopelículas son comunidades de microorganismos que se desarrollan envueltos en una matriz de exopolisacáricos que se adhieren a una superficie inerte o a un tejido vivo (Castillo M., y otros, 2017). En donde las biopelículas menos complejas formadas con un menor número de células son llamadas micro colonias, agregados o grupos de células que son la unidad básica de crecimiento de una biopelícula (Vega H., Silveti L., Arriola M., Pérez O., & Mendoza H., 2015).

Las bacterias que forman las biopelículas en las superficies de las plantas, usan pequeñas señales para la comunicación intra e inter especie conocida como *Quorum Sensing* (QS) (Carlier, Pessi, & Eberl, 2015), donde más detalladamente las bacterias con capaces de percibir y responder a las señales autogeneradas por sus propias moléculas para coordinar su comportamiento en respuesta al tamaño de su población (Fuqua, Winans, & Greenberg, 1994), es un mecanismo importante cuando las bacterias viven en contacto cercano entre cada una como las biopelículas, donde las células al estar en una matriz extracelular consistente de polisacáridos, proteínas y ADN, actúa como barrera de difusión para la señal molecular creando un ambiente ideal para QS (Vega H., Silveti L., Arriola M., Pérez O., & Mendoza H., 2015).

Se sabe que las plantas pueden soportar el crecimiento de biopelículas encima y dentro de sus tejidos, incluyendo las partes aéreas de la planta, su sistema vascular y el tejido de sus raíces, estas biopelículas asociadas pueden establecer

interacciones comensales, mutualistas y patogénicas con las plantas o aprovechar los nutrientes liberados y crecer saprófitamente (Carlier, Pessi, & Eberl, 2015).

El uso de biofertilizantes que mejoran el crecimiento de las plantas por medio de inoculantes bacterianos en biopelículas favorece a los inoculantes ante los estresores ambientales, presencia de metales pesados, depredación de lombrices, etc. (Vega H., Silveti L., Arriola M., Pérez O., & Mendoza H., 2015). Ante el estrés ambiental, las biopelículas además retienen agua alrededor de las células lo que protege las raíces de las plantas (Singh M., 2018).

#### **1.9.8.1 Formación de biopelículas**

Las primeras interacciones entre las bacterias y la superficie son de gran importancia para la formación de la biopelícula.

La formación de biopelículas está compuesta por varias etapas (Figura 5) en donde las bacterias se adhieren a una superficie biótica o abiótica a través de cargas superficiales y producción de pili, fimbrias y exopolisacáridos. Después de la adhesión inicial el desarrollo tridimensional comienza con la formación de micro colonias multi/mono especie. El siguiente paso, la maduración de la biopelícula, es dependiente de la producción de la matriz, que asegura la cohesión y la estructura tridimensional de la biopelícula. El último paso de la formación es la dispersión, cuando las bacterias vuelven a su estilo planctónico para colonizar otras superficies (Rendueles & Ghigo, 2012).

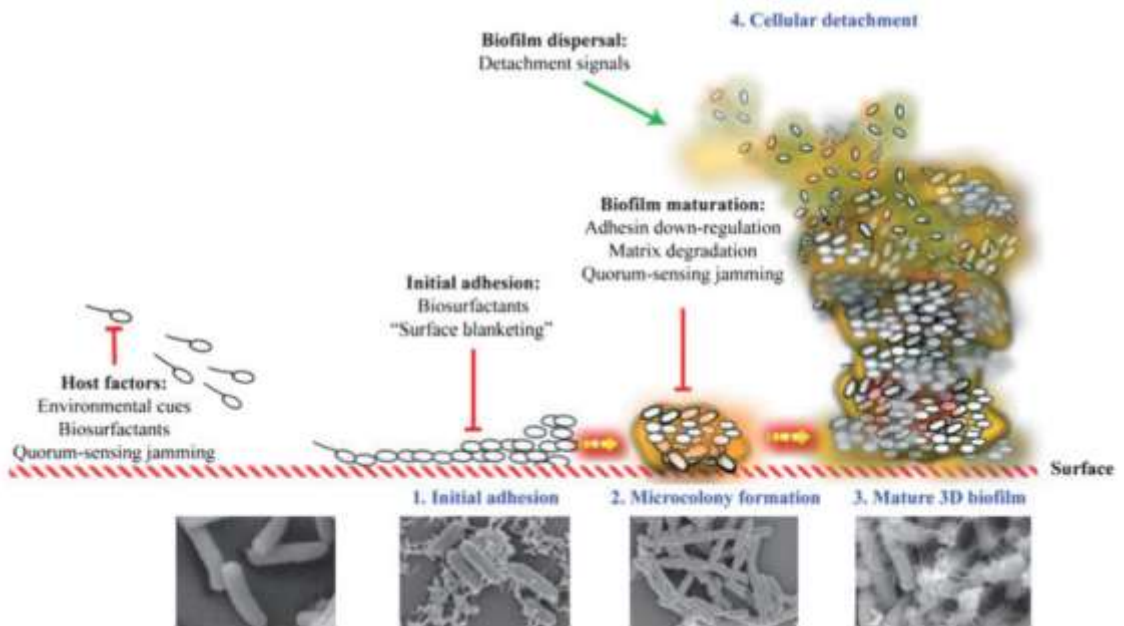


Figura 5 Etapas de la formación de biopelículas

Fuente: (Rendueles & Ghigo, 2012).

Se muestran a continuación, más ejemplos de imágenes de formación de biopelículas obtenidas por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y por Microscopía de Fuerza Atómica (AFM), ver Figuras 6 y 7 respectivamente.

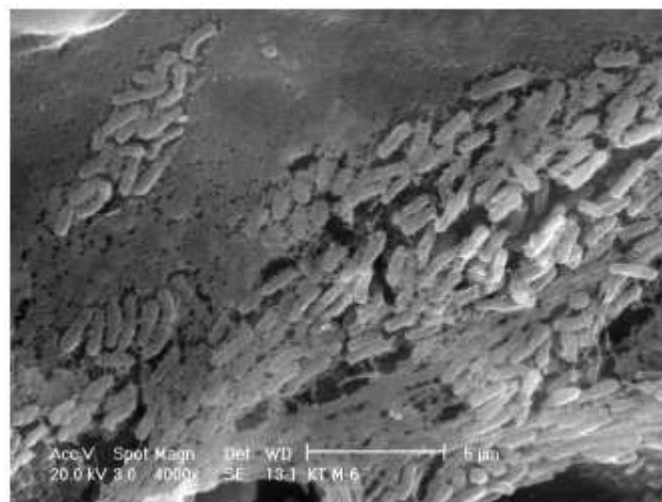
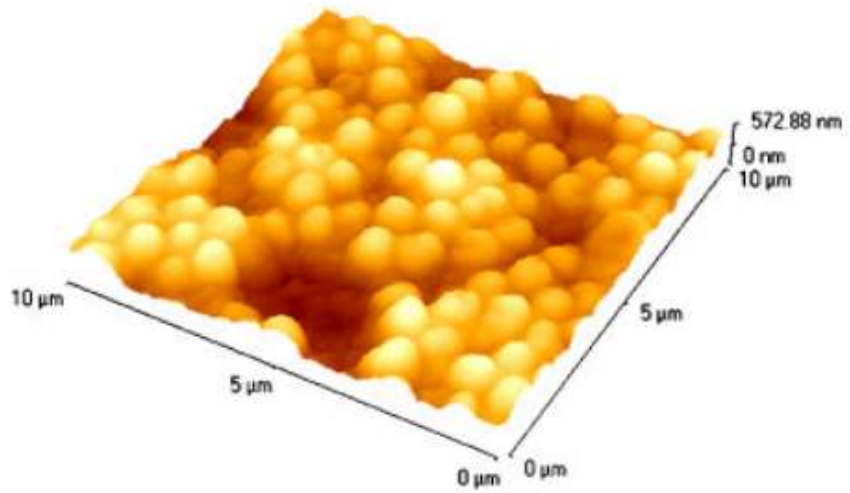


Figura 6 Células de *P. putida* sobre la raíz de una planta de maíz

Fuente: (Yousef C., 2012)



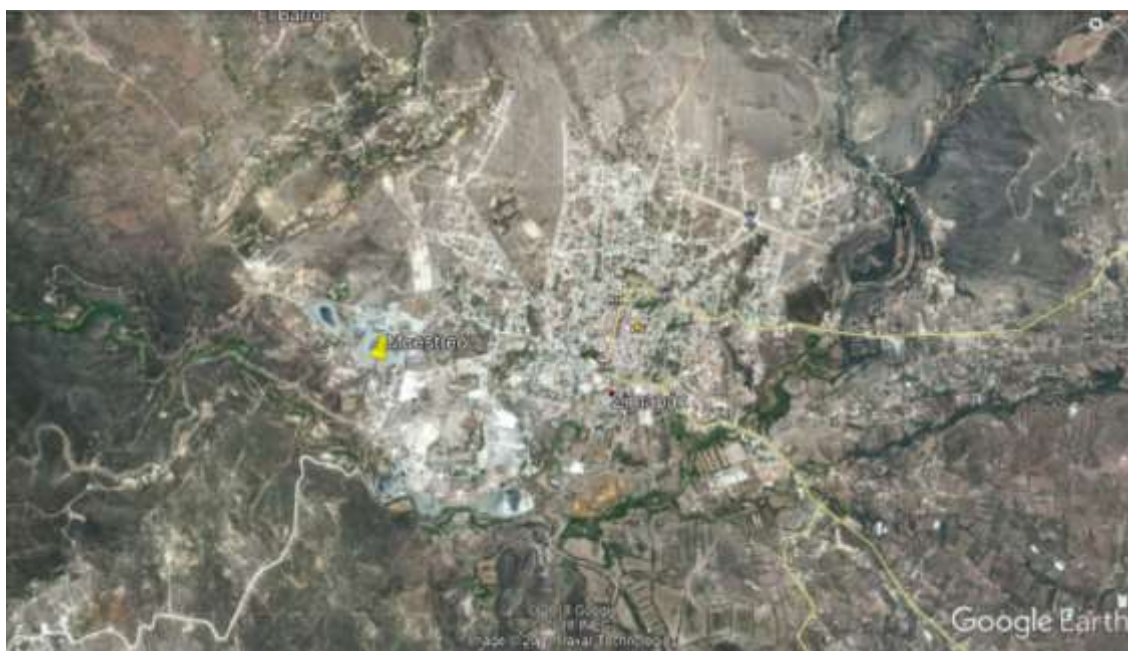
*Figura 7 Imagen de AFM de biopelícula de Staphylococcus epidermidis mostrando la estructura y la cobertura de la superficie de la biopelícula*

Fuente: (Wright, Kierann S., Powell, & Armstrong, 2010).

## 2 METODOLOGÍA

### 2.1 Área de estudio

Se seleccionó el área de interés ubicado en el municipio de Zimapán, Hidalgo, con las siguientes coordenadas: 458372.78 m E y 2292926.58 m N. Para mayor referencia geográfica véanse las Figuras 8 y 9 a continuación.



*Figura 8 Ubicación del muestreo en el municipio de Zimapán, Hidalgo*

*Fuente: Ubicación en mapa realizado por medio de la plataforma Google Earth.*



*Figura 9 Acercamiento a la zona del muestreo en el municipio de Zimapán, Hidalgo*

*Fuente: Ubicación en mapa realizado por medio de la plataforma Google Earth.*

## **2.2 Muestreo**

El muestreo se llevó a cabo en las presas de jales mineros ubicados en Zimapán, Hidalgo. Se tomaron 12 muestras de jal de 200 g cada una en los taludes de la presa sobre una superficie aproximada de 5 km<sup>2</sup>. Así mismo se tomaron diferentes plantas endémicas presentes en el sitio escogidas al azar. Todo se colocó en bolsas herméticamente selladas y se conservaron a 4°C como lo especifica la NOM-021-SEMARNAT-2000.

Cada planta recolectada fue constituida por su raíz, tallo y follaje, así como también su rizosfera donde se abarcó un perímetro de 20 cm alrededor de la planta. Esta muestra de rizosfera se dividió en cuatro cuadrantes para tomar una muestra de cada uno y obtener una muestra homogénea y representativa.

## **2.3 Aislamiento e identificación de las bacterias endófitas**

Se utilizó la raíz de cada planta lavada con detergente Tween®-20 y fue enjuagada 3 veces con agua destilada estéril, posteriormente fue desinfectada sumergiendo la raíz en etanol al 70% por 1 minuto, consecutivamente fue sumergida en antibiótico, finalmente se desinfectó en solución de Hipoclorito de sodio (NaClO) al 2% durante 2 minutos.

Concluida la desinfección se prosiguió a macerar las raíces, embebiéndolas primero en solución salina de NaCl al 0.85%.

Consecutivamente se tomó una alícuota de 500 µL y se inoculó en Caldo LB y Caldo Rojo Congo, se incubó por 48 h a 30°C. Posteriormente se sembró en medios sólidos Agar Nutritivo y Agar Rojo Congo para observar la morfología colonial e iniciar el aislado por extensión en superficie tipo escocés.

## **2.4 Caracterización bioquímica de BPCV**

### **2.4.1 Solubilización de fosfatos**

Se tomaron inóculos para siembra en superficie de los medios sólidos en caja Petri usando el medio específico PVK (Pikovskaya), que contiene fosfato tricálcico  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , como única fuente de P. Las muestras se incubaron a 28°C por 48 horas. Aquellas que presentaron halo son capaces de solubilizar fosfatos y se procede a su caracterización.

### **2.4.2 Sideróforos**

Para poder realizar esta prueba, primero se prepararon las siguientes soluciones que posteriormente fueron inoculadas.

Se prepararon las siguientes soluciones como sigue.

Solución 1.

1. 10 ml de 1mM FeCl<sub>3</sub> 6 H<sub>2</sub> O (en 10 mL de HCl)
2. 50 mL de la solución CAS (1.21 mg/mL)
3. 40 mL de Hexadecyltrimetilamominium bromide (1.82 mg/mL)

#### Solución 2.

1. 30.24 g de PIPES en 750 mL de solución salina, ajustar el pH a 6.8 con KOH 50% y llevar hasta 800 mL. Esta solución es autoclaveada después de adicionar 15 g de agar.

#### Solución 3.

1. 2g glucosa, 2 g manitol, y elementos traza en 70 mL agua destilada.

#### Solución 4.

1. 30 ml de solución esterilizada por filtración 10%(P:V) de casaminoácidos

Después de autoclavar a 50°C se adicionan las soluciones 3 y 4.

La solución 1 se adiciona hasta el final con agitación suficiente.

Una vez preparados los medios se inoculó con las cepas bacterianas y se dejó incubando a 30°C por 72 horas monitoreando a las 48 horas.

### **2.4.3 Producción de Ácido Indol Acético**

Se utilizó un medio de cultivo líquido que fue preparado a base de glucosa como fuente de carbono, sales minerales y agua destilada, se llevó a cabo por método colorimétrico utilizando el reactivo de Salkowski preparado a partir de cloruro férrico en ácido sulfúrico (Glickmann & Deessaux, 1995; Mayer, 1958). Se empleó un espectrofotómetro UV/VIS Lambda™ 25 marca Perkin Elmer® a 530 nm expresando en µg mL<sup>-1</sup>.

#### **2.4.4 Actividad de la enzima ACC desaminasa**

Para cuantificar la actividad de la enzima ACC desaminasa las bacterias se incubaron en Caldo BPF (Bacto *Pseudomonas* F) por 24 horas a 30°C, se centrifugó en centrifugadora Sorvall™ Primo™R marca Thermo Scientific™ a 9000 G por 10 minutos para retirar el sobrenadante y se lavó con Buffer Tris HCl (pH 7.5) 0.1 M. Posteriormente se añadió un medio mínimo (Salino Manitol) SM con 5mM de la enzima ACC, se incubó por 24 h a 30°C y se centrifugó a 9000 G por 10 minutos. Se re-suspendió el pellet en Buffer Tris HCl (pH 7.5) 0.1 M y se repitió el proceso de centrifugado bajo las mismas condiciones; al pellet se le agregó Buffer Tris HCl (pH 8.5) y Tolueno y se agitó con Vortéx Type 16700 Mixer Maxi-Mix I Modelo no. M16715. De la suspensión se tomó una alícuota y se agregó solución de ACC al 0.5 M y Buffer Tris HCl (pH 8.5) 0.1 M incubándose a 30°C por 30 minutos. Posteriormente se añadió HCl 0.56 N y se centrifugó a 14000 G por 5 minutos y se tomó una alícuota de sobrenadante y se agregó HCl 0.5N y 2,4-dinitrofenilhidrazina en HCl 2N al 0.2% y se dejó reaccionar por 30 minutos a 30°C y se añadió NaOH 2N.

La actividad se midió en UV-VIS a 540 nm y la actividad de ACC desaminasa se determinó con una curva de calibración de  $\alpha$ -cetobutirato.

#### **2.5 Biopelícula**

Las bacterias seleccionadas que cumplieron con las características de ser Promotoras de Crecimiento Vegetal se propagaron en Caldo Luria Bertani (LB) y Caldo Rojo Congo y se ajustó la concentración a una absorbancia a 0.5 Å equivalente a  $1 \times 10^9$  UFC/mL con Buffer de Fosfatos pH 7.4, 0.1 M.

Se desinfectaron previamente las semillas con alcohol al 70% por 5 minutos, para posteriormente enjuagar con agua destilada, consecutivamente se sumergieron en una solución de Cloro al 5% por 1 minuto y se enjuagaron con agua destilada estéril.

Para el análisis de la formación de biopelículas en semillas, se realizó un ensayo en placa Petri con tres variantes diferentes: semillas con inóculo bacteriano, semillas con sustrato orgánico e inóculo bacteriano y finalmente semillas con jal minero e inóculo bacteriano.

### **2.5.1 Semillas con inóculo bacteriano**

En placa Petri se colocaron las semillas y se inocularon con solución bacteriana previamente ajustada a una absorbancia de 0.5 Å. Posteriormente, se incubaron en condiciones de oscuridad a 28° C. Se realizó el monitoreo de las etapas de formación de la biopelícula bacteriana, así como de su morfología a las 8, 12, 24 y 48 horas.

### **2.5.2 Semillas con sustrato orgánico e inóculo bacteriano**

Se seleccionaron previamente cinco cepas bacterianas en función de la mayor densidad de producción de la biopelícula bajo las condiciones señaladas en el apartado anterior. Se colocaron las semillas de malva real (*Alcea rosea*) en sustrato orgánico comercial *Miracle-Gro®* y se inocularon con la suspensión bacteriana ajustada a 0.5 Å y se incubaron a 28° C para monitorear a las 8, 12, 24 y 48 horas. Se analizaron por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).

### **2.5.3 Semillas con jal minero e inóculo bacteriano**

Las cinco cepas usadas en la parte del experimento anterior se usaron colocando semillas en jal minero y se inocularon con suspensión bacteriana ajustada a 0.5 Å y se incubaron a 28° C para monitorear 8, 12, 24 y 48 horas después, posteriormente se analizaron por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).

Para el análisis por SEM, las muestras se colocaron en una cinta de carbono conductora y fueron recubiertas con oro en una Unidad de Pulverización Catódica Denton Vacuum, DESK V SCD-030 antes de SEM. Las observaciones de

microscopía fueron llevadas a cabo en microscopio JEOL modelo JSM-6610LV, usando un detector secundario de electrones (SE) en muestra a granel trabajando en modo de alto vacío a 20kV de voltaje de aceleración.

### 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 Aislamiento e identificación de las bacterias endófitas

Se aislaron e identificaron cepas bacterianas (ver tabla 10) de las cuales 10 corresponden al género *Pantoea agglomerans*, 3 cepas más corresponden al género *Enterobacter*, 2 de las cuales se identificaron como *Enterobacter hormaechei* y 1 como *Enterobacter aerogenes* y 1 cepa más correspondiente al género *Bacillus pumilus*. Algunas cepas crecieron en Caldo LB y se sembraron en Agar Nutritivo (AN), otras más crecieron en Caldo Rojo Congo y fueron sembradas en Agar Rojo Congo (ARC) respectivamente.

Tabla 10 Identificación del número de cepa, género y medio de cultivo sólido

No. cepa	Género Bacteriano	Medio de cultivo
103	<i>Enterobacter aerogenes</i>	ARC
107	<i>Pantoea agglomerans</i>	ARC
113	<i>Pantoea agglomerans</i>	ARC
114	<i>Enterobacter hormaechei</i>	ARC
124	<i>Bacillus pumilus</i>	ARC
129	<i>Pantoea agglomerans</i>	ARC
133	<i>Pantoea agglomerans</i>	AN
134	<i>Pantoea agglomerans</i>	ARC
135	<i>Pantoea agglomerans</i>	ARC
139	<i>Pantoea agglomerans</i>	AN
142	<i>Pantoea agglomerans</i>	ARC
143	<i>Pantoea agglomerans</i>	AN
146	<i>Pantoea agglomerans</i>	ARC
154	<i>Enterobacter hormaechei</i>	ARC

Fuente: Elaboración propia con datos obtenidos en el estudio.

Todas las cepas fueron aisladas a partir de las plantas extraídas de las presas de jales mineros ubicadas en Zimapán, Hidalgo; los géneros identificados concuerdan con algunos de los géneros reportados como BPCV, existen reportes de su asociación y uso en procesos de fitorremediación asistida de suelos contaminados con metales pesados, dentro de los géneros reportados se encuentran *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Streptomyces*, *Rhizobium* (Glick, 2012; Egamberdieva, Abd-Allah, & Teixeira da Silva, 2016; Ulla, y otros, 2014). Por su parte, *Pantoea agglomerans*, ha sido reportada por (Quecine, y otros, 2012) en experimentos con caña de azúcar, promoviendo su crecimiento y desarrollo, asimismo, (Kandel, Joubert, & Doty, 2017) mencionan estudios acerca del uso de *Pantoea agglomerans* en maíz y arroz como parte de bacterias endófitas que promueven el crecimiento de la planta.

(Abou-Shanab, Ghanem, Ghanem, & Al-Kolaibe, 2017) y (Gutiérrez M., y otros, 2008) reportan, la identificación y uso de *Bacillus pumilus* como BPCV demostrando resultados positivos en la fitorremediación de suelos contaminados por metales pesados, siendo este uno de los géneros aislados e identificados en este trabajo.

Así mismo, (Kumar, Srivastava, Singh, & Behl, 2009) muestran el uso de *Enterobacter aerogenes* como BPCV en ensayos de cultivos en maceta con *Brassica juncea* obteniendo resultados prometedores, mientras que (Egamberdieva, Khaitov, Hashem, & Fathi, 2014) aislaron, identificaron y emplearon *Enterobacter hormaechei* como BPCV en un cultivo de tomate con resultados positivos identificando al mismo tiempo su resistencia bacteriana ante varios antibióticos como la ampicilina, amoxicilina, ácido clavulánico y otros.

Estos son ejemplos de las asociaciones microorganismo-planta que se llevan a cabo en los procesos de fitorremediación asistida con bacterias y que son de interés en este proyecto para la formación de las biopelículas, estas relaciones fueron descritas anteriormente y son necesarias para la remediación exitosa del suelo contaminado, ciertamente el éxito del proceso difiere entre las cepas bacterianas

seleccionadas para su uso y por ende los metabolitos que se liberen por estas (Ma, Prasad, Rajkumar, & Freitas, 2010; Mitter, y otros, 2013).

### 3.2 Caracterización bioquímica de BPCV

Dentro de la caracterización bioquímica realizada a las cepas bacterianas, esto es las pruebas de solubilización de fosfatos y producción de sideróforos, se observa que:

- a) en la prueba de solubilización de fosfatos, todas las cepas muestran el halo característico de solubilización lo que nos indica que son positivas (véase tabla 11),
- b) por su parte en la prueba de sideróforos la totalidad de las cepas muestran resultados positivos, véase tabla 11, lo que es de suma importancia ya que nos confirma que las bacterias encontradas a partir de las muestras del sitio de estudio donde se ubican los jales de minas en la zona de Zimapán, Hidalgo, son BPCV por lo que ayudan a la asimilación de macro y micronutrientes (Fósforo y Hierro), así como reducen el estrés que genera la presencia de estresores en la planta lo que promueve su crecimiento.

*Tabla 11 Pruebas de solubilización de fosfatos y producción de sideróforos*

No. cepa	Solubilización de fosfatos	Sideróforos
103	+	+
107	+	+
113	+	+
114	+	+
124	+	+
129	+	+
133	+	+
134	+	+
135	+	+
139	+	+
142	+	+

143	+	+
146	+	+
154	+	+

Fuente: Elaboración propia

Estos resultados afirman lo dicho por (Ojuederie & Babalola, 2017), donde menciona que los géneros *Bacillus* y *Enterobacter* se identifican como Bacterias Solubilizadoras de Fosfato proporcionando a la planta el fósforo que necesita ante condiciones de estrés y promoviendo el crecimiento de esta por medio de la fijación de N<sub>2</sub> y haciendo accesibles otros elementos tales como Fe, Mg, Ca, Na, etc. necesarios para el desarrollo adecuado de las plantas. Así también, en estudios similares para la evaluación de las propiedades de *Pantoea agglomerans* como BPCV por (Cherif-Silini, y otros, 2019) se demuestran sus capacidades para aliviar el estrés de la planta, siendo positivas las pruebas de solubilización de fosfatos y producción de sideróforos, estudio que concuerda con lo reportado anteriormente por (Dastager, Deepa, Puneet, Nautiyal, & Pandey, 2009) y (Zhang, y otros, 2011) que igual muestra valores positivos en la producción de sideróforos y solubilización de fosfatos.

Los resultados obtenidos en la prueba cuantitativa de solubilización de fosfatos para este estudio concuerdan con los estudios realizados por (Singh, y otros, 2013) en los que se reportan la capacidad de *Enterobacter aerogenes* para solubilizar fosfatos utilizando el medio Pikovskaya, así como también lo señala (Noguez I., González C., Carrillo, Martínez G., & Mendoza H., 2017) donde muestran que el género *Enterobacter sp.* cuenta con características de BPCV por medio de su actividad de solubilización de fosfatos y producción de sideróforos.

En cuanto a los resultados de la cepa *Bacillus pumilus*, estos concuerdan con datos similares mostrados por (Wagi & Ahmed, 2019) y (Kaushal, Kumar, & Kaushal, 2017) donde demuestran que *Bacillus spp.* es un género con atributos para promover el crecimiento vegetal por medio de diferentes pruebas, en la

solubilización de fosfatos sus resultados fueron siempre positivos; en la producción de sideróforos, se observó que las diferentes cepas de *Bacillus* fueron exitosas por medio de la producción de halos amarillos en el medio CAS. Resultados similares se obtuvieron con (Ait Kaki, y otros, 2013), donde para las pruebas de sideróforos *Bacillus spp.* arrojaron resultados positivos por medio de la metodología utilizada en este en este trabajo.

Como se muestra en la tabla 12, todas las cepas probadas mostraron resultados positivos a la producción de AIA con valores de entre 7.37 y 13.39  $\mu\text{g/mL}$  considerándose como los valores extremos aquellos de las cepas 143 y 107 respectivamente dentro del grupo de cepas aisladas, purificadas e identificadas. Por otro lado, la actividad de la enzima ACC desaminasa presenta valores de entre 3.70 y 18.66  $\mu\text{M } \alpha\text{KB mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$  siendo estos los valores extremos correspondientes a las cepas 107 y 142 respectivamente.

Tabla 12 Pruebas de producción de Ácido Indol Acético y ACC desaminasa

No. cepa	AIA producción $\mu\text{g/mL}$	AIA	ACC DESAMINASA $\mu\text{M } \alpha\text{KB mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$
<b>103</b>	10.25	+	3.77
107	13.39	+	3.70
113	10.60	+	16.33
<b>114</b>	10.32	+	10.69
<b>124</b>	9.54	+	17.46
129	11.66	+	13.47
133	11.30	+	18.51
134	11.52	+	11.44
135	11.17	+	10.24
139	9.05	+	12.87
142	10.62	+	18.66
143	7.37	+	13.25
146	11.14	+	12.35
<b>154</b>	10.53	+	13.55

Fuente: Elaboración propia

De acuerdo con la Figura 12, que se muestra a continuación, las cepas que tuvieron una mayor producción de Ácido Indol Acético fueron la cepa 107, seguida de las cepas 129,133,134, 135 y 146 con valores que van desde 11.14 hasta 13.39  $\mu\text{g/mL}$  ; por el contrario, aquellas que registraron una menor producción fueron las cepas 143, en conjunto con las cepas 139, 124 y 103 con unos valores de 7.37 hasta 10.25  $\mu\text{g/mL}$ .

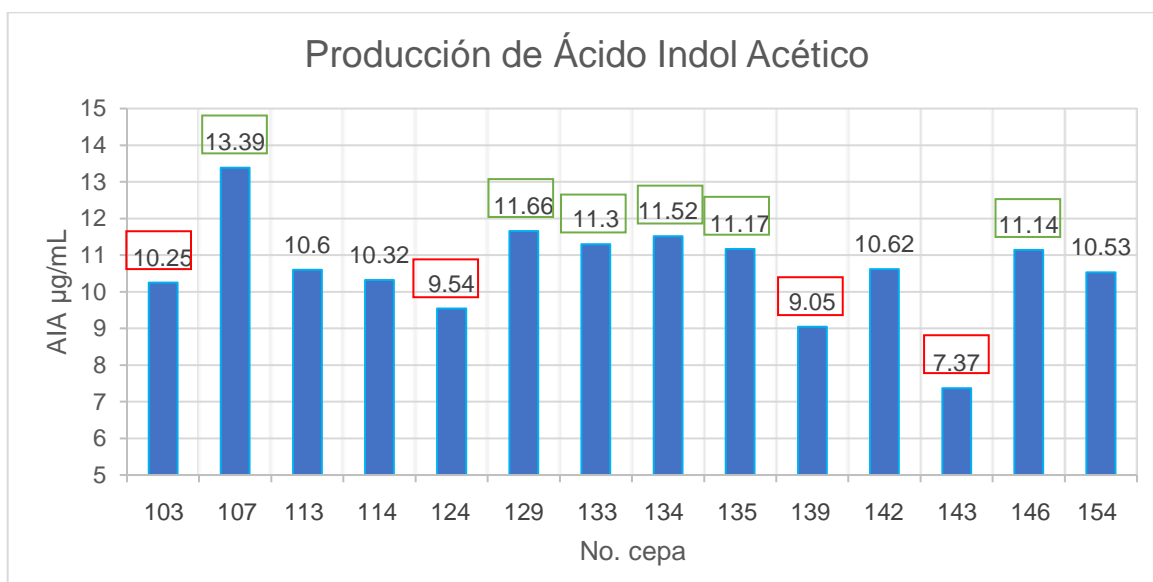


Figura 10 Producción de Ácido Indol Acético de las cepas

Fuente: Elaboración propia

En la Figura 13, se presentan las cepas con su respectiva producción de ACC desaminasa, teniendo de mayor a menor producción la cepa 142 seguida de las cepas 133, 124 y 113 con un valor que va de 16.33 hasta 18.66  $\mu\text{M } \alpha\text{KB mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Por el contrario, aquellas cepas que presentan una menor producción fueron las cepas 107, 103, 135, 114 y 134 con valores de 3.7 hasta 11.14  $\mu\text{M } \alpha\text{KB mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

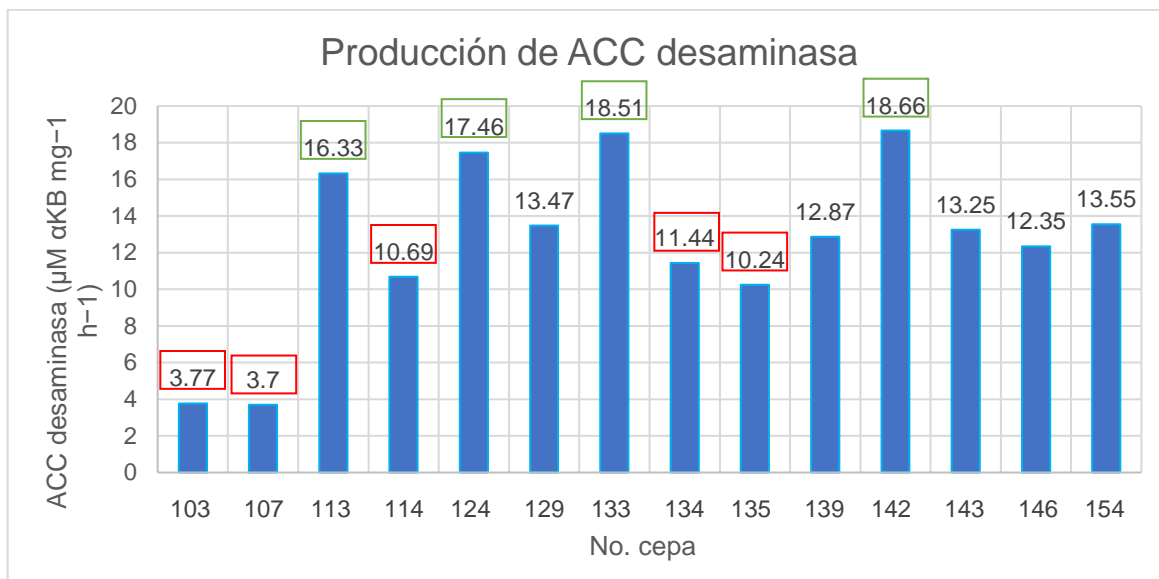


Figura 11 Producción de ACC desaminasa por cepa bacteriana

Fuente: Elaboración propia.

Los resultados obtenidos en estas pruebas confirman lo estudiado por (Noguez I., González C., Carrillo, Martínez G., & Mendoza H., 2017) mostrando que *Enterobacter sp.* resulta ser una productora de AIA y con actividad de la enzima ACC-desaminasa, igualmente con lo reportado por (Mendoza H., Perea V., Arriola M., Martínez S., & Pérez O., 2016) quienes mencionan el uso de diferentes especies del género *Enterobacter*, obteniendo resultados positivos en las pruebas sugiriendo su capacidad para ser usadas como BPCV.

(Noguez I., González C., Carrillo, Martínez G., & Mendoza H., 2017) reporta resultados que van desde  $8.40 \pm 0.06$  –  $10.52 \pm 0.06$   $\mu\text{g/mL}$  para la producción de AIA y resultados en un rango de  $0.09 \pm 0.02$  a  $1.68 \pm 0.31$   $\mu\text{M } \alpha\text{KB mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$  para la actividad de ACC desaminasa; y (Mendoza H., Perea V., Arriola M., Martínez S., & Pérez O., 2016), obtuvo resultados en la producción de AIA similares con valores que van de  $9.8 \pm 0.06$  –  $11.1 \pm 0.05$   $\mu\text{g/mL}$  y para la actividad enzimática de ACC desaminasa obtuvieron valores aún más bajos que van de  $0.0 \pm 0.02$  a  $1.4 \pm 0.28$   $\mu\text{M } \alpha\text{KB mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Así, nuestros resultados se encuentran en un rango que va de 10.25-10.53

$\mu\text{g/mL}$  en la producción de AIA para el género *Enterobacter* y un rango de 3.77-13.55  $\mu\text{M } \alpha\text{KB mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$  para la actividad enzimática de ACC desaminasa, lo que confirma las buenas capacidades de las cepas 103, 114 y 154 respectivamente para la producción de AIA y la actividad de la enzima ACC desaminasa para el género *Enterobacter spp.*

Por otro lado, el género *Bacillus*, en un estudio publicado por (Chagas, y otros, 2015) muestra resultados positivos en la producción de AIA por *Bacillus spp.* pero con resultados muy variados que se encuentran en un rango que va desde 10 hasta 97  $\mu\text{g/mL}$  en ausencia de nitrógeno, asimismo (Ait Kaki, y otros, 2013) muestran resultados en la producción de AIA de entre 6-53  $\mu\text{g/mL}$ , lo que coincide con los resultados obtenidos en el presente trabajo donde se detectó una producción de AIA por *Bacillus pumilus* de 9.54  $\mu\text{g/mL}$  de AIA, por lo se relacionan directamente con lo que menciona (Sajjad Mirza, y otros, 2001) donde se hace evidente que la producción de hormonas auxinas tales como el AIA pueden variar notablemente entre especies diferentes y entre cepas de la misma especie.

(Zhang, y otros, 2011) reportan un valor de actividad enzimática de ACC desaminasa de *Pantoea agglomerans* de 370  $\mu\text{M } \alpha\text{KB mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , de *Pantoea ananatis* y *Pantoea stewartii*, con concentraciones de entre 0.1 a 35.6 $\pm$ 11  $\mu\text{M } \alpha\text{KB mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , en cuanto al valor de producción de AIA para *Pantoea agglomerans* fue de 11.9 $\pm$ 1.1  $\mu\text{g/mL}$  y para las otras especies de *Pantoea* fue de 6.3 $\pm$ 0.8 a 13.1 $\pm$ 0.1  $\mu\text{g/mL}$ . Donde tal como lo señala (Sajjad Mirza, y otros, 2001) la producción de la actividad de la enzima ACC desaminasa pueden variar notablemente entre especies diferentes y entre cepas de la misma especie.

### **3.3 Análisis de biopelículas en SEM**

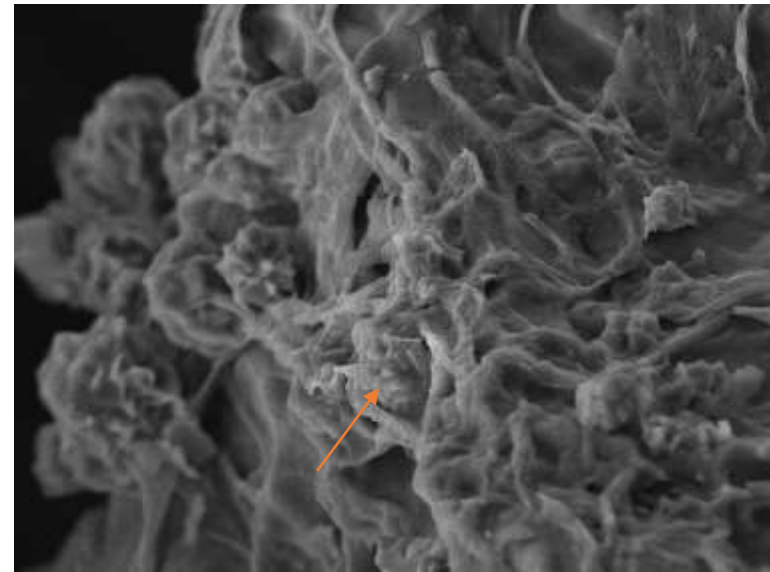
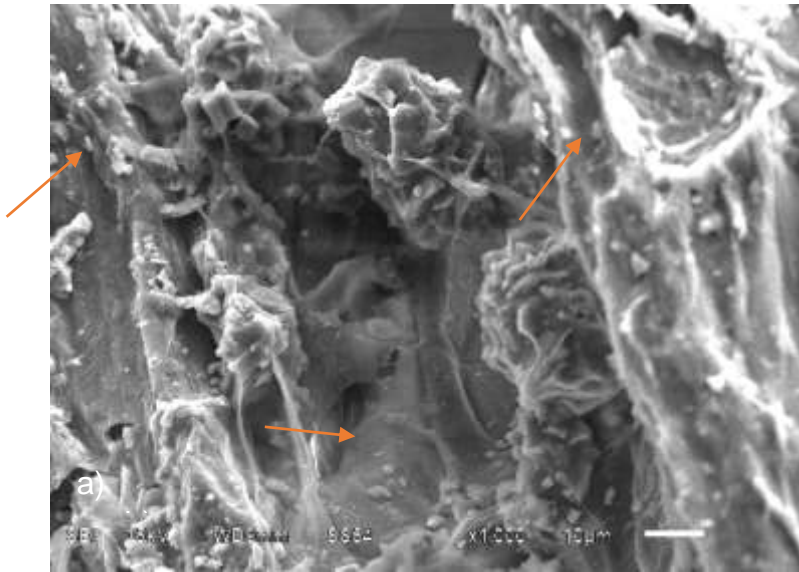
Conforme con los resultados de producción de AIA y de la actividad de la enzima ACC desaminasa mostrados anteriormente, se eligieron las 5 mejores cepas para realizar las pruebas de formación de biopelículas, de las cuales únicamente se presentan como ejemplos los resultados de las cepas 134 y 135 debido a los buenos resultados que mostraron.

A continuación, se presenta el análisis de la formación de biopelículas basándose en las fotografías tomadas en el SEM, mediante las que se describen las etapas de formación de las biopelículas en las semillas de malva real (*Alcea rosea*) inoculadas con las cepas 134 y 135 respectivamente tanto en jal minero como en sustrato orgánico *Miracle-Gro®*, esto a las 8, 12, 24 y 48 horas.

#### **3.3.1 Análisis de biopelículas cepa 134**

##### **3.3.1.1 Visualización a las 8 horas**

En la Figura 14 se muestra la semilla de malva real a las 8 horas posteriores a la inoculación con la cepa 134 aquí, los microorganismos que se observan presentan una morfología correspondiente a bacilos (Figura 14a) encontrándose adheridos a la superficie de la semilla y en conformación de micro colonias (Figura 14b) donde se percibe el inicio de producción de exopolisacárido, de la formación de una monocapa y por consiguiente la existencia de algunos espacios de la pared de la semilla sin colonizar tanto en presencia de jal como de sustrato orgánico (Figura 14<sup>a</sup> y b).

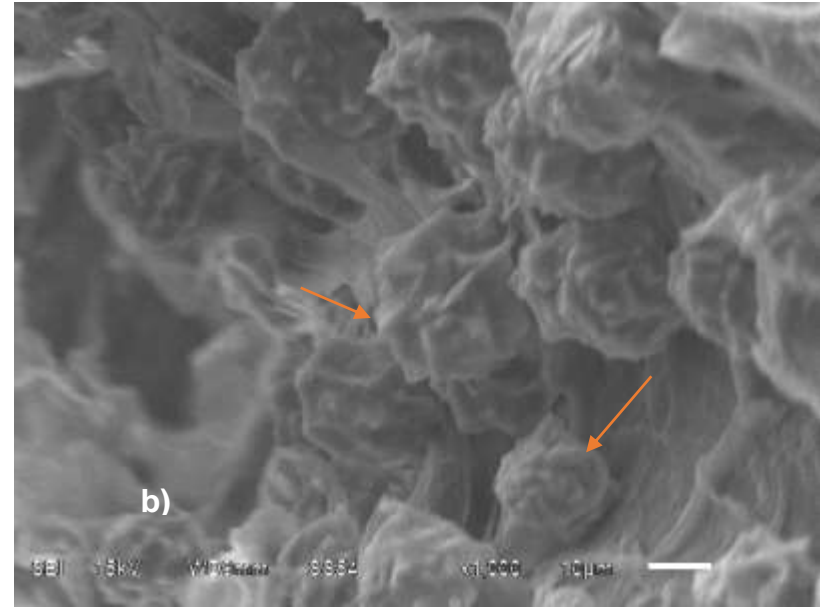
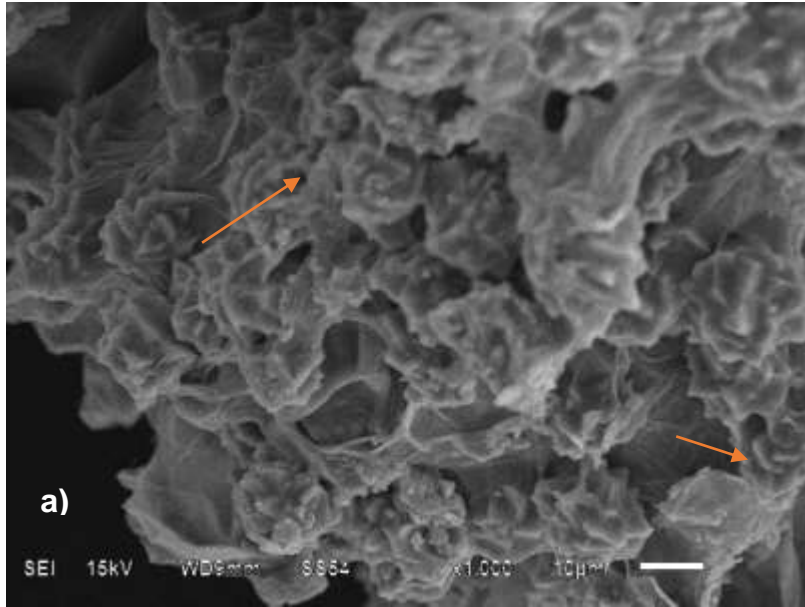


*Figura 12 Proceso de formación de biopelículas en semilla de malva real inoculadas con cepa 134, toma realizada después de 8 horas de la inoculación.*

*a) Semilla inoculada en presencia de jal, b) semilla inoculada en presencia de sustrato orgánico; a) y b) fueron tomadas con una ampliación 1000x a 200 μm.*

### **3.3.1.2 Visualización a las 12 horas (Figura 15)**

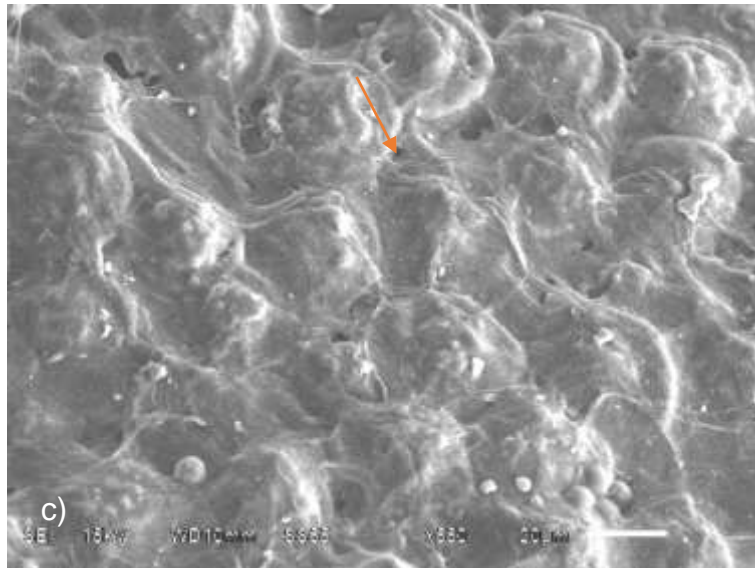
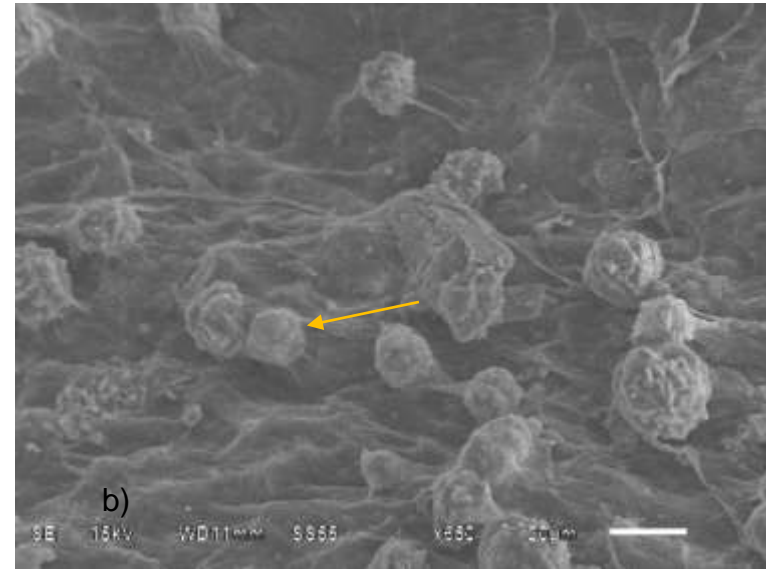
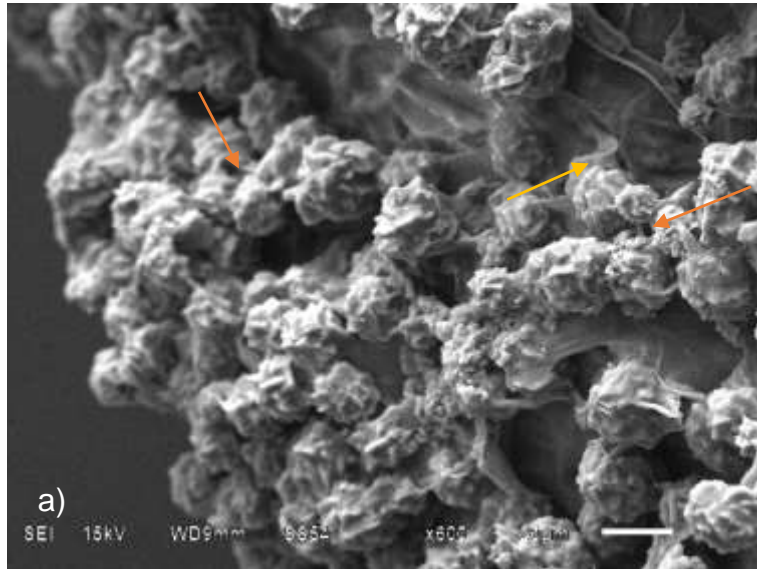
A las 12 horas la formación de colonias ha aumentado en presencia de jal y de sustrato orgánico, así como la producción de exopolisacárido, apreciándose la creación de canales de intercambio de nutrientes y agua a medida que va madurando la biopelícula.



*Figura 13* Proceso de formación de biopelículas en semilla de malva real inoculadas con cepa 134, después de 12 horas de la inoculación. a) Semilla inoculada en presencia de jal, b) semilla inoculada en presencia de sustrato orgánico, a) y b) fueron tomadas con ampliación 1000x a 10 µm.

### **3.3.1.3 Visualización a las 24 horas (Figura 16)**

A las 24 horas en la fotografía correspondiente a la semilla inoculada en jal (Figura 16a), puede observarse la superficie de la semilla colonizada en su totalidad por las bacterias conformadas en colonias. En las fotografías de la semilla en presencia de sustrato orgánico (Figura 16 b y c) se aprecia de una manera más detallada el proceso de conformación de la biopelícula en multicapas y por consiguiente la inserción de las colonias dentro de la estructura del exopolisacárido. De la misma manera se aprecian los canales de intercambio tanto en presencia de jal como de sustrato orgánico.



*Figura 14 Formación de biopelículas en semilla de malva real inoculadas con cepa 134, a las 24 horas de la inoculación.*

*a) Semilla inoculada en presencia de jal, fotografía tomada a una ampliación 600x a 20  $\mu$ m; b) y c) corresponden a la semilla inoculada en presencia de sustrato orgánico, b) fue tomada con una ampliación 650x a 20 $\mu$ m y c) fue tomada con una ampliación 550x a 20  $\mu$ m.*

#### **3.3.1.4 Visualización a las 48 horas (Figura 17)**

Finalmente, a las 48 horas de inoculación, en ambos casos (tanto para jal como para sustrato orgánico) la maduración de la biopelícula se ha dado en su mayoría, esto es percibido por su crecimiento tridimensional y la poca presencia de colonias libres, sin embargo, es importante mencionar que pese a la presencia de jal, se muestra ya la germinación de la semilla con la existencia de un brote (Figura 17a), lo cual comparado con las indicaciones del fabricante de la marca de las semillas de malva real (*Alcea rosea*) utilizadas, redujo el tiempo de germinación de 12 días en condiciones normales a 48 horas con la asistencia de las BPCV.

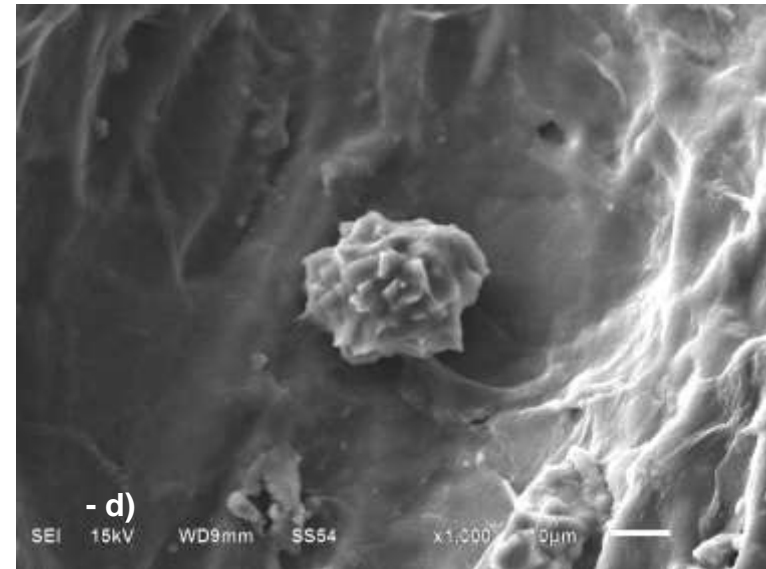
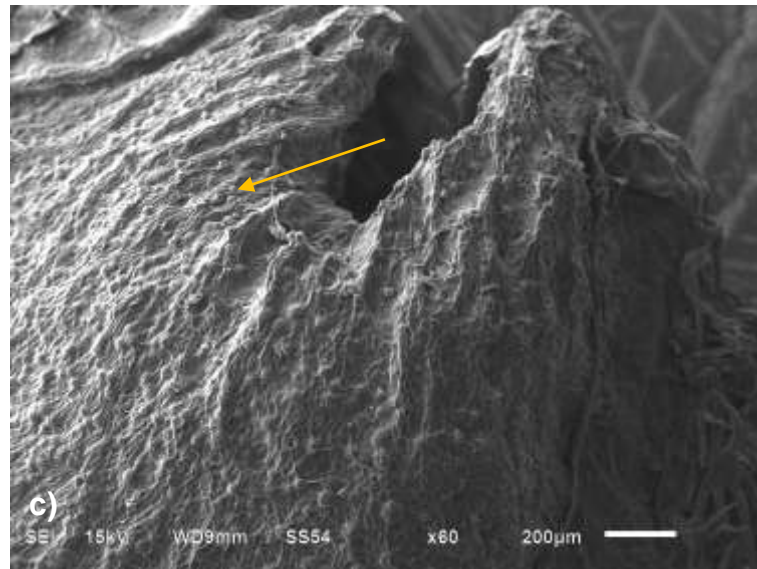
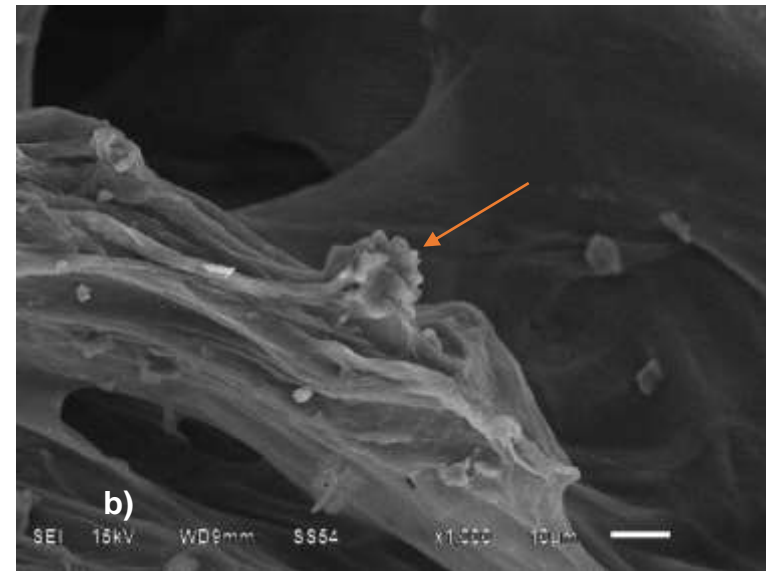
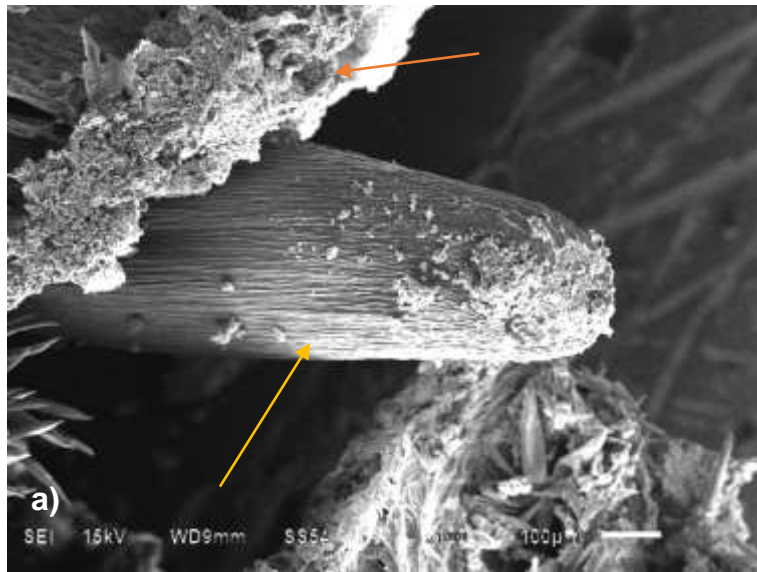


Figura 15 Proceso de formación de biopelículas en semilla de malva real inoculadas con cepa 134, toma realizada después de 48 horas de la inoculación.

a) y b) Semilla inoculada en presencia de jal, c) y d) semilla inoculada en presencia de sustrato orgánico. a) fue tomada con una ampliación 100x a 100µm, c) fue tomada con una ampliación 60x a 200µm, b) y d) fueron tomadas con una ampliación 1000x a 10µm. 61

Los resultados obtenidos del análisis de SEM acerca de la formación de biopelículas con la cepa 134 identificada como *Pantoea agglomerans* nos confirman que tiene morfología de bacilo, además, a lo largo del monitoreo, a las 8, 12, 24 y 48 horas, se percibe la formación de una biopelícula mono especie, debido a la presencia de microorganismos morfológicamente iguales.

Durante el monitoreo en SEM de la formación de la biopelícula de la cepa 134, se pueden identificar las distintas fases de desarrollo donde encontramos a las 8 horas la adhesión de las células individuales sobre la pared y el inicio de formación de micro colonias y producción de exopolisacárido, a las 12 horas se observa la continua formación de colonias dispuestas en una monocapa más homogénea con producción de exopolisacárido y la presencia de canales de transporte activo en esta estructura, a las 24 horas se inicia la formación multicapa observándose por la inserción de los microorganismos en el exopolisacárido y finalmente a las 48 horas se da la maduración de la biopelícula por medio de la conformación tridimensional de esta, estas observaciones se relacionan con lo mencionado por (Branda, Vik, Friedman, & Kolter, 2005) quien señala la relación del *Quorum sensing* con el desarrollo de la arquitectura de la biopelícula y los resultados de este trabajo concuerdan con un estudio de (Mendoza H., Cedillo R., Muñoz G., & Silva A., 2008) donde se evalúa la cinética de crecimiento de una biopelícula del género *Klebsiella* mediante AFM coincidiendo con las etapas de formación observadas donde a las 8 horas se mostró la formación de una monocapa, que a las 12 horas presentaba la existencia de canales de agua mientras que a las 24 horas se observó la conformación de más de una capa y el aumento de canales de agua, que de la misma manera coincide con (Castiblanco & Sundin, 2015) quien afirma que las biopelículas maduras muestran capas y micro y macro colonias.

Es notable además, que la cepa 134 fue capaz de disminuir el tiempo de germinación de la semilla, pues a las 48 horas se apreció un brote en presencia de jal minero, esto se relaciona con lo mencionado por (Ma, Prasad, Rajkumar, & Freitas, 2010), quienes hablan acerca de la capacidad de las bacterias endófitas

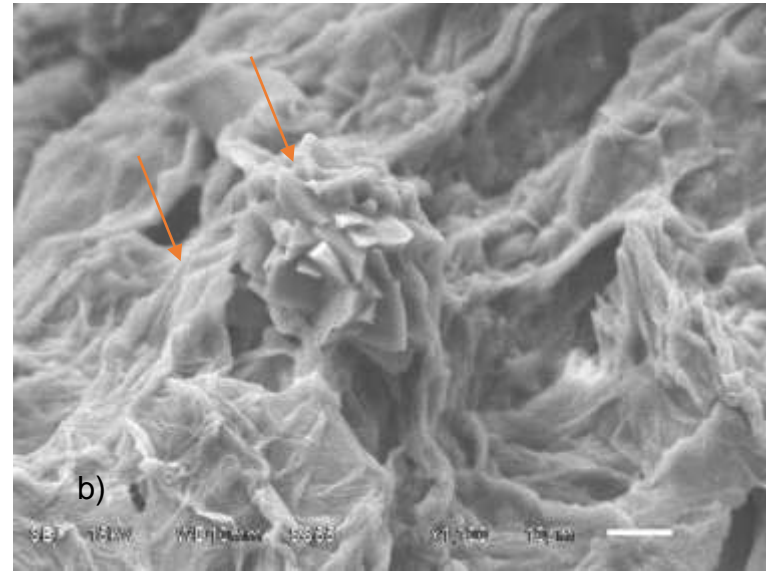
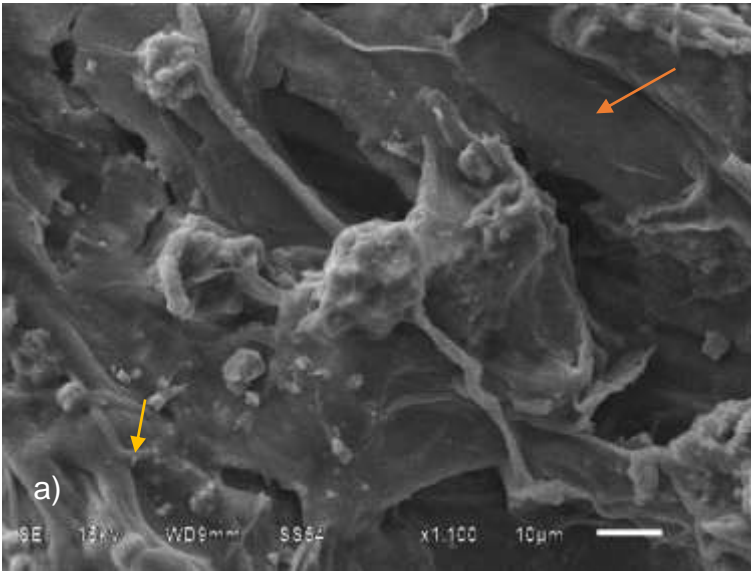
para sobreponerse ante los estresores tanto bióticos como abióticos mostrando una mejor tolerancia y desempeño.

(Ramey, Koutsoudis, von Bodman, & Fuqua, 2004) hacen referencia a que la formación de biopelículas en las semillas y brotes por parte de bacterias endófitas es un proceso que sin duda es un precursor importante de la colonización de la rizosfera que se encuentra en desarrollo, donde ha demostrado a través de estudios la gran resistencia ante tratamientos antibacteriales donde la remoción completa de la biopelícula no se logró por lo que sería mejor la colonización por parte de bacterias no patógenas conforme lo señalan (Fett & Cooke, 2003).

### **3.3.2 Análisis de biopelículas cepa 135**

#### **3.3.2.1 Visualización a las 8 horas (Figura 18)**

A las 8 horas de inoculación, las semillas tanto en presencia de jal como de sustrato orgánico muestran la adhesión de microorganismos con morfología correspondiente a bacilos y la formación de micro colonias dispersas en la superficie de la semilla en conjunto con la producción de exopolisacárido.



*Figura 16 Proceso de formación de biopelículas en semilla de malva real inoculadas con cepa 135, tomas realizadas después de 8 horas de la inoculación.*

*a) Semilla inoculada en presencia de  $\text{NaCl}$ , b) corresponden a semilla inoculada en presencia de sustrato orgánico. a) y b) fueron tomadas con una ampliación 1100x a  $10\ \mu\text{m}$ .*

### **3.3.2.2 Visualización a las 12 horas (Figura 19)**

A las 12 horas de inoculación, una mayor producción de exopolisacárido se percibe en la superficie de la semilla (Figura 19 a y c) así como la formación de canales dentro de la estructura de la biopelícula (Figura 19 a y c)

Así mismo, en ambas observaciones de SEM se puede visualizar cómo las colonias de microorganismos se congregan justo en la zona de la semilla donde aparece el brote al momento de la germinación (véase Figura 19 b y d).

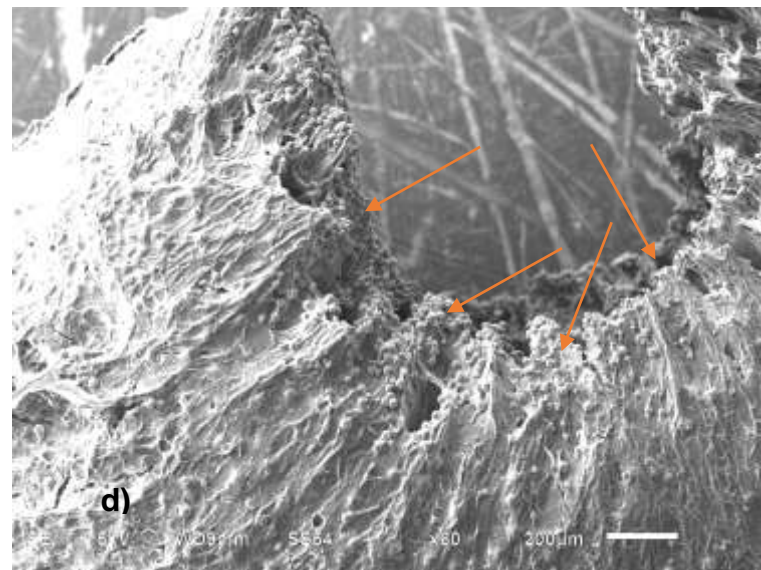
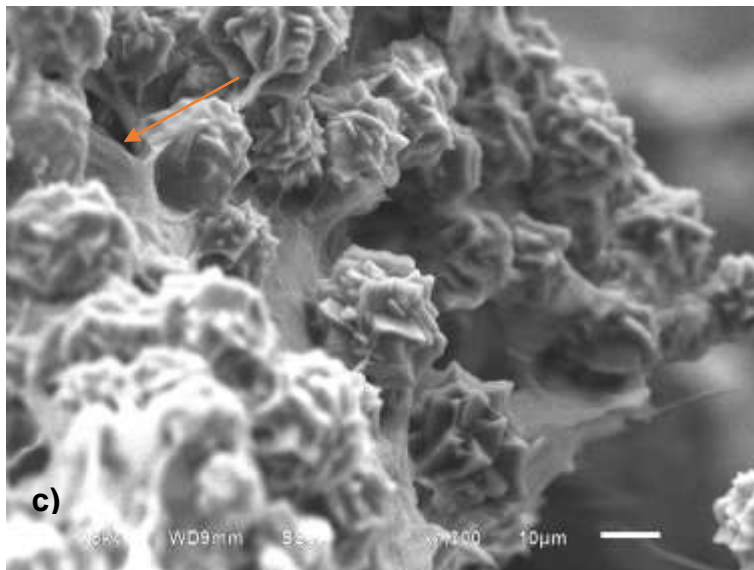
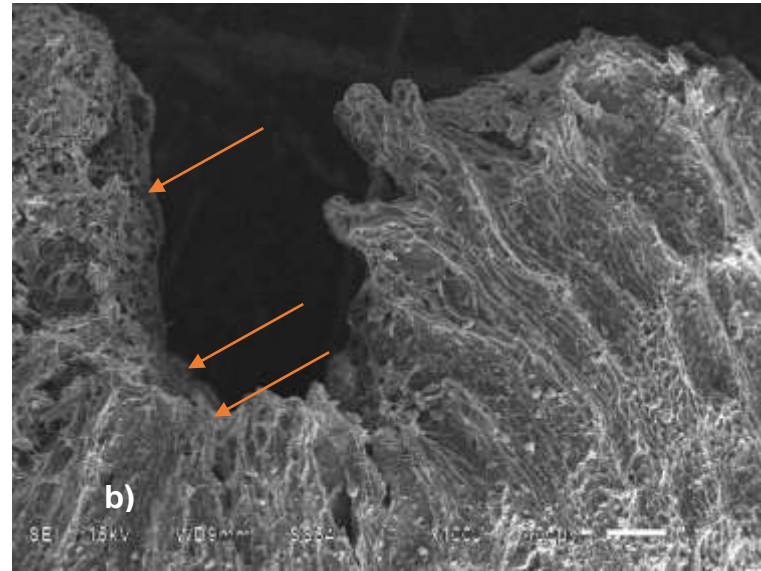
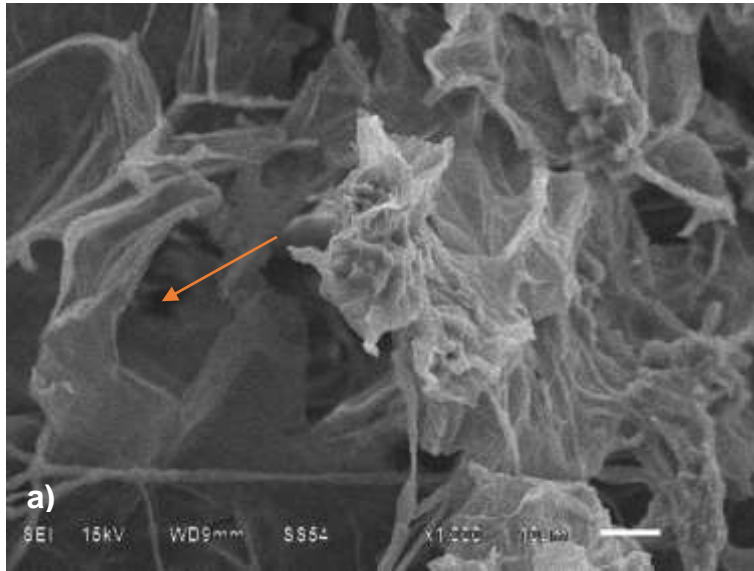
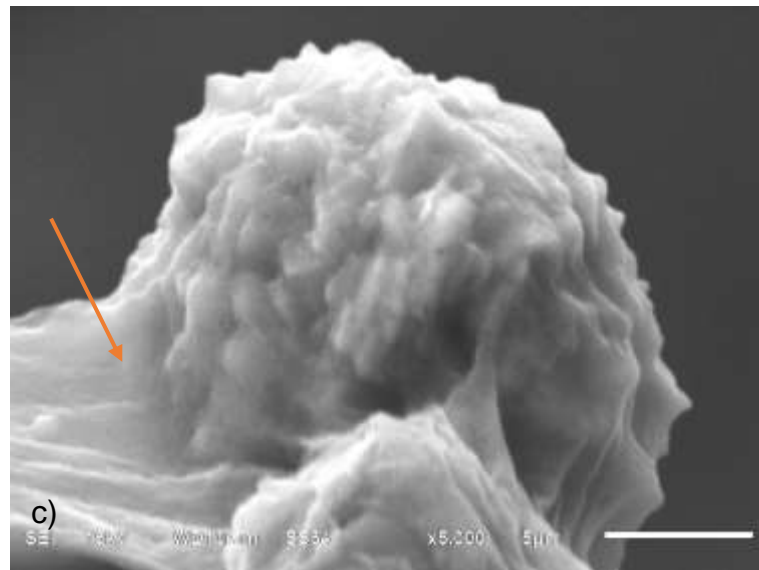
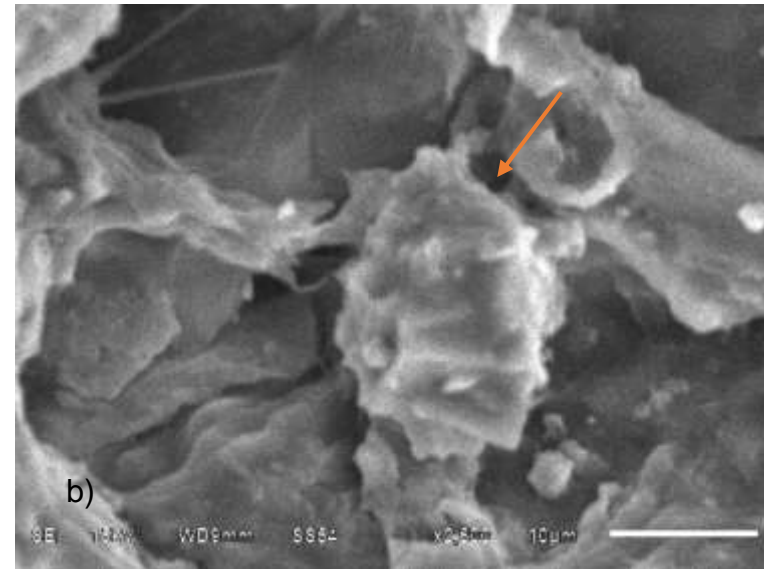
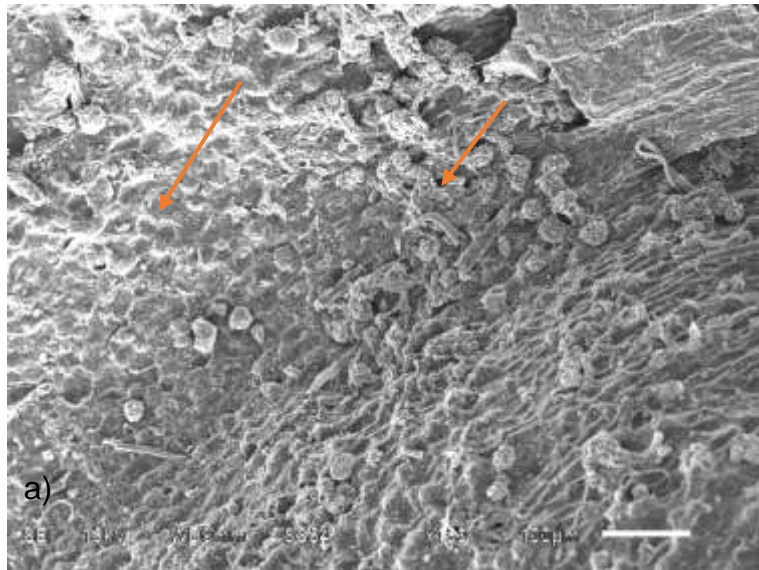


Figura 17 Proceso de formación de biopelículas en semilla de malva real inoculadas con cepa 135, tomas realizada después de 12 horas de la inoculación. a) y b) Semilla inoculada en presencia de sal, c) y d) semilla inoculada en presencia de sustrato orgánico. a) y c) son fotografías tomadas con una ampliación a 1000x a 10µm, b) fotografía tomada con una ampliación 100x a 100µm y d) fotografía tomada con una ampliación 66 60x a 200µm.

### **3.3.2.3 Visualización a las 24 horas (Figura 20)**

A las 24 horas de inoculación, la matriz de exopolisacáridos que embebe a los microorganismos confiere una estructura más desarrollada que va permitiendo la maduración de la biopelícula de tal manera que la biopelícula sigue su crecimiento en extensión, pero va iniciando su formación tridimensional tanto en presencia de jal como de sustrato orgánico (Figura 20), en donde se distinguen claramente los canales de comunicación (Figura 20 a y b). y, por otro lado, se puede visualizar que el desarrollo del exopolisacárido se va conformando en capas donde se aprecian los microorganismos insertos en esta estructura (Figura 20 a y c).

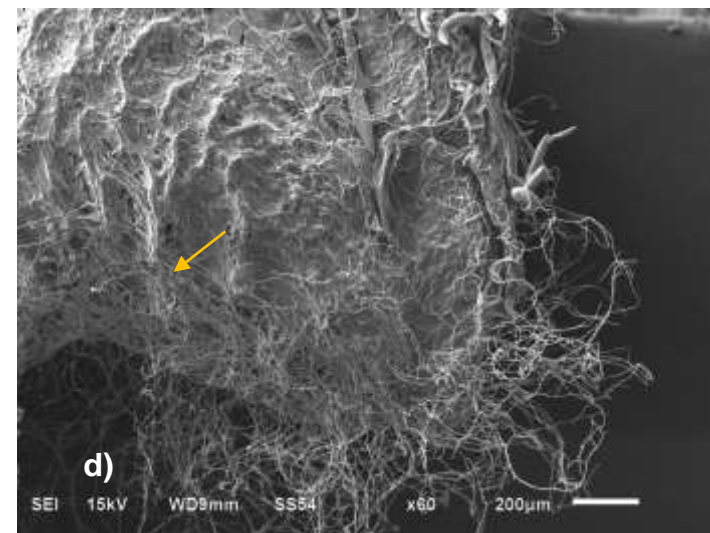
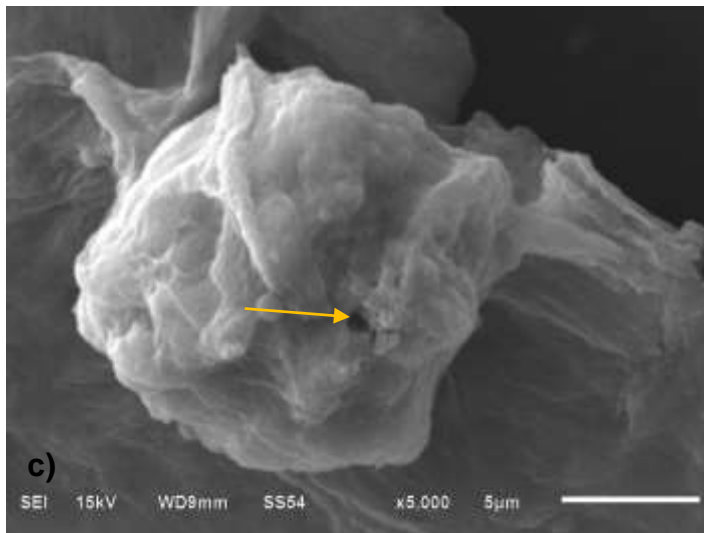
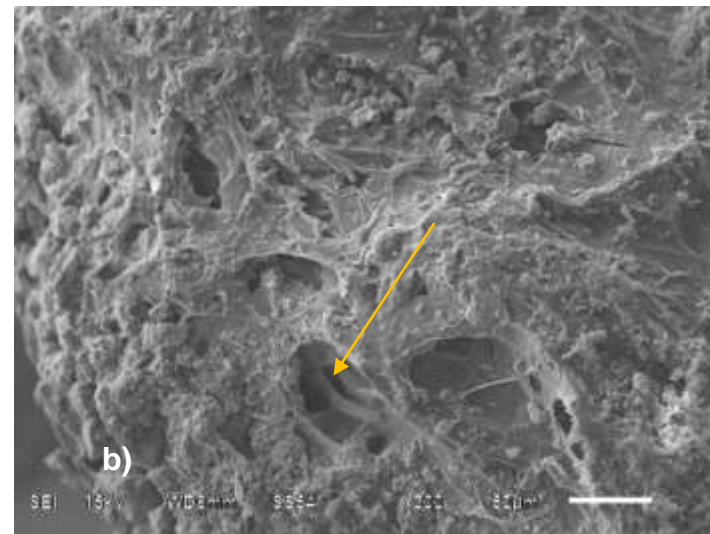
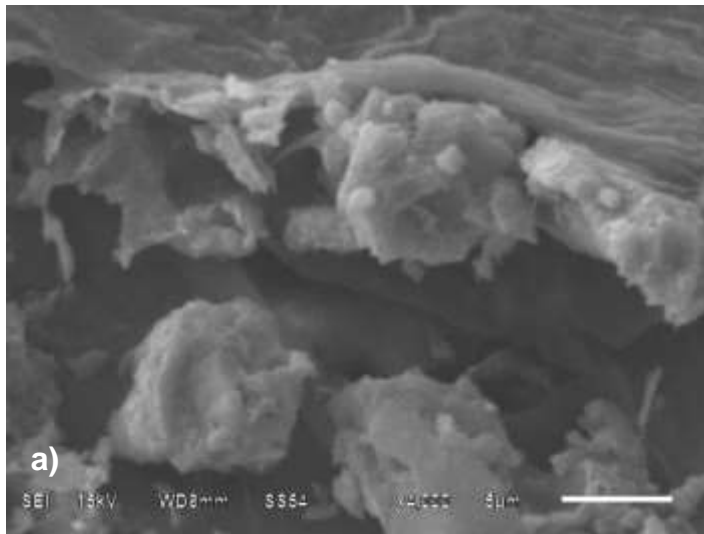


*Figura 18 Proceso de formación de biopelículas en semilla de malva real inoculadas con cepa 135, toma realizada después de 24 horas de la inoculación.*

*a) y b) Refieren a la semilla inoculada en presencia de jal, a) fue tomada con una ampliación 150x a 100 µm y b) fue tomada con una ampliación 2500x a 10µm, c) corresponde a la semilla inoculada en presencia de sustrato orgánico, y la fotografía fue tomada con una ampliación 5000x a 5 µm.*

#### **3.3.2.4 Visualización a las 48 horas (Figura 21)**

Finalmente, a las 48 horas de inoculación, las biopelículas que se han desarrollado en presencia de jal y de sustrato orgánico han llegado a la madurez al verse conformadas por multicapas y la presencia de canales (Figura 21 b y d), en ambos casos los microorganismos se perciben completamente embebidos en el exopolisacárido.



a) y b) corresponden a la semilla inoculada en presencia de sal, c) y d) refieren a la semilla inoculada en presencia de sustrato orgánico; a) fue tomada con una ampliación 4000x a 5µm mientras que b) fue tomada con una ampliación 300x a 50µm, c) fue tomada con una ampliación 5000x a 5µm y d) fue tomada con una ampliación 60x a 200µm.

Los resultados del análisis de biopelículas para la cepa 135 realizados por medio de SEM concuerdan con la morfología de bacilos, siendo identificada también la cepa 135 como *Pantoea agglomerans*, asimismo, se percibe durante el monitoreo la formación de una biopelícula mono especie pues no hay presencia de microorganismos con una morfología distinta.

Las etapas de formación de la biopelícula en esa cepa se observaron con un desarrollo más lento en comparación con aquel de la cepa 134, siendo que durante las primeras 8 horas se observó la adhesión de bacilos y conformación de micro colonias y en el periodo de 12 a 24 horas se mostró la presencia de canales en la formación de una monocapa a través de una extensión superficial por medio del exopolisacárido segregado por las colonias, lo que de acuerdo con (McLandsborough, Rodríguez, Pérez C., & Weiss, 2006) refieren como la estructura que permite la adhesión irreversible y que ayuda a mantener micro colonias y la biopelícula. Tiempo después, a las 48 horas de la inoculación ya se percibe la maduración de la biopelícula por medio de su formación de multicapas y aumento de canales de transporte activo además de que los microorganismos se perciben insertos en la estructura del exopolisacárido, lo que concuerda con lo reportado por (De Beer & Stoodley, 2013) quienes indican que las biopelículas al ir madurando van creando canales y espacios intersticiales, que de acuerdo con (Rajbir, Debarati, & Rakesh K., 2006) su formación está regulada por el *Quorum Sensing* que controla los cambios en la madurez de las biopelículas a través de la formación de estos canales que aseguran la entrega eficiente de nutrientes a las células, por lo que observamos que en el caso de la formación de las biopelículas de esta cepa el crecimiento y por ende el mecanismo de QS se establece de manera exitosa lo que se ve reflejado directamente en el crecimiento y madurez de la biopelícula en un corto periodo de tiempo (48 horas), observándose la extensión de la biopelícula incluso fuera de la superficie de la semilla en forma radicular, apreciándose como fibras delgadas, que no se observan en la semilla con tratamiento de la cepa 134. De la misma manera que con la cepa 134, estos resultados coinciden con (Mendoza

H., Cedillo R., Muñoz G., & Silva A., 2008) quien describe las distintas etapas de formación de una biopelícula.

Por lo mostrado en el análisis de SEM podemos suponer que tal y como lo señala (War Nongkhlaw & Jo, 2016), las bacterias endófitas colonizan los tejidos en forma de células individuales, en pares o en micro colonias.

Es notable la diferencia entre el desarrollo de la biopelícula de la cepa 134 con la cepa 135, pues la primera mostró un mejor y más rápido desarrollo y proceso de maduración, así como también la presencia de un brote a las 48 horas, lo que comparando los resultados obtenidos en las pruebas de producción de AIA y la actividad de la enzima ACC desaminasa, nos hace visible la diferencia entre ellas pues la cepa 134 registró una producción de AIA de 11.52  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y una actividad enzimática de ACC desaminasa de 11.44  $\mu\text{M } \alpha\text{KB mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$  que respecto a los resultados obtenidos de la cepa 135 son ligeramente mayores, pues esta última tuvo una producción de AIA de 11.17  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y una actividad de la enzima ACC desaminasa de 10.24  $\mu\text{M } \alpha\text{KB mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Esto nos evidencia la directa relación entre la producción de AIA, la actividad de la enzima ACC desaminasa con la formación de las biopelículas por parte de las BPCV, por otro lado puntualiza la factibilidad del uso de *Pantoea agglomerans* como potenciales formadoras de biopelículas para beneficio de la planta, pues las BPCV por medio de las interacciones microorganismo-planta pudieron disminuir el estrés provocado por las condiciones hostiles ante la presencia de jal, proveyendo a la semilla de otras formas de nitrógeno asimilables por esta, así como la síntesis de AIA que promueve el desarrollo de las raíces, la producción de sideróforos y la solubilización de fosfatos al lograr transformar el Fe y los fosfatos en formas biodisponibles para la semilla generan en la planta los mecanismos para su asimilación.

## 4 CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos muestran que el género *Pantoea agglomerans* cuenta con una elevada producción de AIA, enzima ACC desaminasa, sideróforos, solubilización de fosfatos, por lo que puede ser utilizada como potencial BPCV en procesos de fitorremediación asistida en la presencia de metales pesados debido a que es capaz de generar mecanismos que le permiten a la planta aminorar el estrés generado por la presencia de estos.

Que respecto a la formación de la biopelícula se concluye que la relación microorganismo-planta que se establece en los procesos de fitorremediación asistida por las BPCV son de suma importancia ya que permiten que se desarrollen mecanismos bioquímicos que propicien la realización de rutas específicas a nivel metabólico que le permitan contar con formas biodisponibles de nutrientes que de otra manera no pudiera ser posible, para ser aprovechadas y eso se refleje en el crecimiento de las plantas.

Se muestra que el género *Pantoea agglomerans* permite la germinación de las semillas en un tiempo mucho más corto comparado con el tiempo de germinación, señalado por el fabricante de las semillas.

Los resultados mostrados en este trabajo nos siguen la importancia de continuar estudiando las interacciones microorganismo-planta a través del estudio de las vías enzimáticas que permitan conocer a profundidad los mecanismos que detonan y permiten el mejor crecimiento vegetal, esto propiciado por la formación y desarrollo de las biopelículas bajo condiciones de estrés, así como su potencial influencia y aplicación en los sistemas de fitorremediación.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abou-Shanab, R. A., Ghanem, K., Ghanem, N., & Al-Kolaibe, A. (2017). The role of bacteria on heavy-metal extraction and uptake by plants growing on multi-metal-contaminated soils. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 253-262.
- Aguado-Santacruz, G. A., Moreno-Gómez, B., Jiménez-Francisco, B., García-Moya, E., & Preciado-Ortiz, R. E. (2012). Impacto de los sideróforos microbianos y fitosideróforos en la asimilación de hierro por las plantas: una síntesis. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 9-21.
- Agudelo B., L. M., Macias M., K. I., & Suárez M., A. J. (2005). Fitorremediación: la alternativa para absorber metales pesados de los biosólidos. *Revista Lasallista de Investigación*, 2(1), 57-60.
- Ait Kaki, A., Kacem C., N., Dehimat, L., Milet, A., Youcef-Ali, M., Ongena, M., & Thonart, P. (2013). Biocontrol and Plant Growth Promotion Characterization. *Indian Journal of Microbiology*, 447-452.
- Ambrosini, A., & Passaglia, L. M. (2017). Plant Growth-Promoting Bacteria (PGPB): Isolation and Screening of PGP Activities. In *Current Protocols in Plant Biology* (pp. 190-209). Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).
- ASTDR. (2019, September). *Toxic Substances Portal - Lead*. Retrieved from Agency for Toxic Substances & Disease Registry: <https://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp.asp?id=96&tid=22>
- Ávila M., E. G., Lizarazo F., L. M., & Cortés P., F. (2015). Promoción del crecimiento de *Baccharis macrantha* (Asteraceae) con bacterias solubilizadoras de fosfatos asociadas a su rizosfera. *Acta Biológica Colombiana*, 121-131.
- Bais H.P., W. T. (2006). The role of root exudates in rhizosphere Interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 233-266.
- Brady, C. L., Cleenwerck, I., Venter, S. N., Engelbeen, K., De Vos, P., & Coutinho, T. A. (2010). Emended description of the genus *Pantoea*, description of four species from human clinical samples, *Pantoea septicasp.* nov., *Pantoea eucrinasp.* nov., *Pantoea brennerisp.* nov. and *Pantoea conspicuasp.* nov., and transfer of *Pectobacterium cypripedii* (Hori 1911) Brenner. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2430-2440.
- Branda, S. S., Vik, A., Friedman, L., & Kolter, R. (2005). Biofilms: the matrix revisited. *TRENDS in Microbiology*, 20-26.

- Burlakovs, J., & Vircavs, M. (2010). Heavy Metal Remediation Technologies: Review. *Ecobaltica 2011*, (pp. 1-15). St-Petesburg.
- Cámara Minera de México. (2018). *Informe Anual 2018*. Ciudad de México: CAMIMEX.
- Carlier, A., Pessi, G., & Eberl, L. (2015). Microbial Biofilms and Quorum Sensing. In B. Lugtenberg, *Principles of Plant-Microbe Interactions. Microbes for Sustainable Agriculture* (pp. 45-52). Switzerland: Springer International Publishing Switzerland.
- Castiblanco, L. F., & Sundin, G. W. (2015). New insights on molecular regulation of biofilm formation in plant-associated bacteria. *Journal of Integrative Plant Biology*, 362-372.
- Castillo M., M., H, M., J, Arriola M., J., Pérez O., G., Vega H., M., . . . López R., J. (2017). Crecimiento de biopelículas de *Pseudomonas* en presencia de metales pesados. *Revista Latinoamericana el Ambiente y las Ciencias*, 8(18): 75-82.
- Castillo, M., & Yañez, S. (2018). Fitorremediación de jales mineros asistida con Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal. *Revista Latinoamericana el Ambiente y las Ciencias*, 110-120.
- Chagas, A. F., De Oliveira, A., A., D. O., Santos, G., Chagas, L. F., & Lopes da Silva, A. L., & Costa, J. (2015). Production of indole-3-acetic acid by bacillus isolated from different soils. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 282-287.
- Chepkemoi, J. (2017). *What Is The Environmental Impact Of The Mining Industry?* Retrieved from <https://www.worldatlas.com/articles/what-is-the-environmental-impact-of-the-mining-industry.html>
- Cherif-Silini, H., Thissera, B., Bouket, A., Saadaoui, N., Silini, A., Eshelli, M., . . . Belbahri, L. D. (2019). Wheat Stress Tolerance Induced by Endophyte *Pantoea agglomerans* with Genes Contributing to Plant Functions and Secondary Metabolite Arsenal. *International Journal of Molecular Sciences*, 1-36.
- Comisión Nacional de Inversiones Extranjeras. (2018). *Informe Estadístico sobre el Comportamiento de la Inversión Extranjera Directa en México*. México: Comisión Nacional de Inversiones Extranjeras.
- Corrales R., L. C., Arévalo G., Z. Y., & Moreno B., V. E. (2014). Solubilización de fosfatos: una función microbiana importante en el desarrollo vegetal. *NOVA-Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*, 67-79.

- Dastager, S., Deepa, C., Puneet, S., Nautiyal, C., & Pandey, A. (2009). Isolation and characterization of plant growth-promoting strain *Pantoea* NII-186. From Western Ghat Forest soil, India. *Letters in Applied Microbiology*, 20-25.
- De Beer, D., & Stoodley, P. (2013). Microbial Biofilms. In E. y. Rosenberg, *The Prokaryotes - Applied Bacteriology and Biotechnology* (pp. 343-372). Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Delgadillo L., A. E., González R., C. A., Prieto G., F., Villagómez I., J. R., & Acevedo S., O. (2011). Fitorremediación: Una Alternativa para Eliminar la Contaminación. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 597-612.
- Demková, L., Jezný, T., & Bobul'ská, L. (2017). Assessment of Soil Heavy Metal Pollution in a Former Mining Area-Before and After the End of Mining Activities. *Soil & Water Res.*, 1-8.
- Diez Lázaro, F. J. (2008). *Fitocorrección de suelos contaminados con metales pesados. Evaluación de plantas tolerantes y optimización del proceso mediante prácticas agronómicas*. Santiago de Compostela: s.d.
- Durán, P. (2010). *Transferencia de metales de suelo a planta en áreas mineras: Ejemplos de los Andes peruanos y de la Cordillera Prelitoral Catalana*. Barcelona.
- Egamberdieva, D., Abd-Allah, E. F., & Teixeira da Silva, J. A. (2016). Microbially Assisted Phytoremediation of Heavy Metal-Contaminated Soils. In P. Ahmad, *Plant Metal Interaction: Emerging Remediation Techniques* (pp. 483-498). Srinagar: Elsevier.
- Egamberdieva, D., Khaitov, B., Hashem, A., & Fathi, A. A. (2014). Characterization of salt tolerant *Enterobacter hormaechei* strain associated with tomato root grown in arid saline soil. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 4231-4239.
- EPA. (2000). *Introduction to Phytoremediation*. Cincinnati: National Risk Management Research Laboratory Office of Research and Development.
- Esquivel C., R., Gavilanes R., M., Cruz O., R., & Huante, P. (2013). Importancia agrobiotecnológica de la enzima ACC desaminasa en rizobacterias, una revisión. *Revista fitotecnia mexicana*, 36(3), 251-258.
- Fahamiya, N., Shiffa, M., & Aslam, M. (2016). A Comprehensive Review on *Althaea rosea* Linn. *INDO AMERICAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL RESEARCH*, 6888-6894.

- FAO. (2016). *Estado Mundial del Recurso Suelo Resumen Técnico*. Roma. Retrieved from <http://www.fao.org/3/a-i5126s.pdf>
- Fett, W. F., & Cooke, P. H. (2003). Reduction of *E. coli* O157:H7 and *Salmonella* on laboratory-inoculated alfalfa seed with commercial citrus-related products. *J Food Prot*, 1158-1165.
- Fuqua, W. C., Winans, S. C., & Greenberg, E. P. (1994). Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *Journal of Bacteriology*, 269-275.
- Glick, B. R. (2012). Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. *Scientifica*, 2012, 15.
- Glick, B. R., Penrose, D. M., & Li, J. (1998). A Model For the Lowering of Plant Ethylene Concentrations by Plant Growth-promoting Bacteria. *Journal of Theoretical Biology*, 63-68.
- Glickmann, E., & Deessaux, Y. (1995). A critical examination of the specificity of Salkowsky reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Soil Biology and Biochemistry*, 45,631,640.
- González C., M. d. (2005). Recuperación de suelos contaminados con metales pesados utilizando plantas y microorganismos rizosféricos. *Tierra Latinoamericana*, 29-37.
- Greipsson, S. (2011). Phytoremediation. *Nature Education Knowledge*, 3(10):7, 1-5.
- Gutiérrez M., F. J., Ramos S., B., Probanza, A., Mehouchi, J., Tadeo, F. R., & Talon, M. (2008). The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiologia Plantarum*, 206-211.
- Kalogerakis, N. (2009). *Phytoemediation - A novel Technology to Decontaminate Polluted Sites*. Retrieved from Department of Environmental Engineering Technical University of Crete: <https://www.certh.gr/dat/FDF3B9BD/file.pdf>
- Kandel, S. L., Joubert, P. M., & Doty, S. L. (2017). Bacterial Endophyte Colonization and Distribution within Plants. *Microorganisms*, 1-26.
- Kaushal, M., Kumar, A., & Kaushal, R. (2017). *Bacillus pumilus* strain YSPMK11 as plant growth promoter and biocontrol agent against *Sclerotinia sclerotiorum*. *3 Biotech*, 1-9.
- Khalid, S., Shahid, M., Khan, N., Murtaza, B., Bibi, I., & Dumat, C. (2016). A comparison on technologies for remediation of heavy metal contaminated soils. *Journal of Geochemical Exploration*, 182, 247-268.

- Kong, Z., & Glick, B. R. (2017). The Role of Plant Growth-Promoting Bacteria in Metal Phytoremediation. *Advances in Microbial Physiology*, 71, 97-132.
- Kumar, K. V., Srivastava, S., Singh, N., & Behl, H. (2009). Role of metal resistant plant growth promoting bacteria in ameliorating fly ash to the growth of *Brassica juncea*. *Journal of Hazardous Materials*, 51-57.
- Kumar, V., Gautam, A., & Pathak, C. (2018). *Metallic Contamination and its Toxicity - Phytoremediation as a Potentially Promising Technology: Prospects and Future*. New Delhi: Daya Publishing House.
- Loera M., A., Ramírez C., F. Y., Avelar G., F. J., & Guerrero B., A. L. (2012). Biopelículas multi-especie: asociarse para sobrevivir. *Investigación y ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*, 49-56.
- Louden, B. C., Haarmann, D., & Lynne, A. M. (2011). Use of Blue Agar CAS Assay for Siderophore Detection. *Journal of Microbiology & Biology Education*, 51-53.
- Ma, Y., Prasad, M., Rajkumar, M., & Freitas, H. (2010). Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils. *Biotechnology Advances*, 248-258.
- Malamud, C., Sepúlveda, I., Pardo, R., & Martínez, R. (1995). *Historia de América*. Madrid: Universitas.
- Mayer, A. M. (1958). Determination of indole acetic acid by Salkowsky reaction. *Nature*, 1670-1671.
- McBride, M. B. (1994). *Environmental chemistry of soils*. New York: Oxford University Press.
- McLandsborough, L., Rodríguez, A., Pérez C., D., & Weiss, J. (2006). Biofilms: At the Interface between Biophysics and Microbiology. *FOBI*, 94-114.
- Mendoza H., J. C., Cedillo R., M. L., Muñoz G., A., & Silva A., F. (2008). Efecto de las condiciones ambientales en la formación in vitro de biopelículas de *Klebsiella pneumoniae*. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales*, 3-16.
- Mendoza H., J. C., Perea V., Y. S., Arriola M., J., Martínez S., S. M., & Pérez O., G. (2016). Assessing the effects of heavy metals in ACC deaminase and IAA production on plant growth-promoting bacteria. *Microbiological Research*, 53-61.

- Mentaberry, A. (2011). *Fitorremediación*. Retrieved from Agrobiotecnología: [http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/IQM\\_fitorremediacion\\_argentina\\_25620.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/IQM_fitorremediacion_argentina_25620.pdf)
- Mitter, B., Brader, G., Afzal, M., Compant, S., Naveed, M., Trognitz, F., & Sessitsch, A. (2013). Chapter seven. Advances in Elucidating Beneficial Interactions Between Plants, Soil, and Bacteria. *Advances in Agronomy*, 381-445.
- Montes, J. (2016). *Efectos de los metales pesados en suelos de jales mineros de San Luis Potosí (Tesis de Maestría)*. San Luis Potosí: Universidad Autónoma de San Luis Potosí.
- Mudd, S., Polevitzky, K., Anderson, T. F., & Chambers, L. A. (1941). Bacterial Morphology as Shown by the Electron Microscope II. The Bacterial Cell-wall in the Genus Bacillus. *Journal of Bacteriology*, 251-264.
- Muñoz C., L. N., Ballinas C., M. L., Nevárez M., G., & Peralta P., M. R. (2010). Fitorremediación como una alternativa para el tratamiento de suelos contaminados. *Toctli-Revista Internacional de Ciencia y Tecnología Biomédica*, 1-8.
- Muro, L. (1964). *Bartolomé de Medina, introductor del beneficio de patio en Nueva España*. Retrieved from Fondo Aleph: <http://aleph.academica.mx/jspui/bitstream/56789/29638/1/13-052-1964-0517.pdf>
- Noguez I., J. A., González C., M. C., Carrillo, G. R., Martínez G., M. A., & Mendoza H., J. C. (2017). Caracterización de bacterias promotoras de crecimiento de plantas y su tolerancia a Elementos Potencialmente Tóxicos. *Agroproductividad*, 41-47.
- Núñez L., R. A., Meas V., Y., Ortega B., R., & Olguín, E. J. (2004). Fitorremediación: fundamentos y aplicaciones. *Ciencia Biotecnología y biología molecular*, 69-83.
- Ojuederie, O., & Babalola, O. (2017). Microbial and Plant-Assisted Bioremediation of Heavy Metal Polluted Environments: A Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 1-26.
- Ortiz, I., Sanz, J., Dorado, M., & Villar, S. (2007). *Técnicas de recuperación de suelos contaminados*. Madrid: vt.
- Puerta G., A., & Mateos R., F. (2010). Enterobacterias. *Medicine*, 3426-3431.
- Quecine, M. C., Araújo, W. L., Rossetto, P. B., Ferreira, A., Tsui, S., & Lacava, P. T.-K. (2012). Sugarcane growth promotion by the endophytic bacterium

- Pantoea agglomerans* 33.1. *Applied and environmental microbiology*, 78(21), 7511-7518.
- Rafael M, Z. C. (2007). *Determinación y diferenciación de Pantoea agglomerans y patógenos por medio de perfiles de ácidos grasos a partir de aislamientos de 5 variedades de semillas de Allium cepa L.* Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Rajbir, S., Debarati, P., & Rakesh K., J. (2006). Biofilms: implications in bioremediation. *TRENDS in Microbiology*, 389-397.
- Ramey, B. E., Koutsoudis, M., von Bodman, S. B., & Fuqua, C. (2004). Biofilm Formation in Plant-Microbe Associations. *Plant Science Articles*, 602-609.
- Rendueles, O., & Ghigo, J.-M. (2012). Multi-species biofilms: how to avoid unfriendly neighbors. *FEMS Microbiology Reviews*, 972-989.
- Rodríguez-Eugenio, N., McLaughlin, M., & Pennock, D. (2018). *Soil Pollution a Hidden Reality*. Rome: FAO.
- Rosati, H. (1996). *La economía colonial. Minería*. Retrieved from La América Española Colonial: [http://www7.uc.cl/sw\\_educ/historia/america/html/2\\_1\\_1.html](http://www7.uc.cl/sw_educ/historia/america/html/2_1_1.html)
- Sajjad Mirza, M., Ahmad, W., Latif, F., Haurat, J., Bally, R., Normand, P., & Malik, K. A. (2001). Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane in vitro. *Plant and Soil*, 47-54.
- Sánchez G., S. (2017). *MALVA REAL*. Retrieved from Asociación para la Defensa de la Naturaleza - Enguera: <https://adene.es/wp-content/uploads/2017/02/Malva-real-flor-color-rojo.pdf>
- Sánchez, M. (2016). *Alcea o malva real*. Retrieved from JARDINERIA ON: <https://www.jardineriaon.com/alcea-malva-real.html>
- Schwyn, B., & Neilands, J. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*, 47-56.
- Science Photo Library. (2019). *Hollyhock seeds*. Retrieved from Science Photo Library: <https://www.sciencephoto.com/media/155346/view/hollyhock-seeds>
- Secretaría de Economía. (2019, Agosto 20). *Minería*. Retrieved from Secretaría de Economía, Acciones y Programas : <https://www.gob.mx/se/acciones-y-programas/mineria>

- Seeds Gallery. (2017). *Semillas de Malvarrosa*. Retrieved from Seeds Gallery: <https://www.seeds-gallery.shop/es/inicio/semillas-de-malvarrosa.html>
- Servicio Geológico Mexicano. (2018, Diciembre). *Panorama Minero del Estado de Hidalgo*. Retrieved from <http://www.sgm.gob.mx/pdfs/HIDALGO.pdf>
- Shao, W., Li, M., Teng, Z., Qiu, B., Yaoqiang, H., & Zhang, K. (2019). Effects of Pb(II) and Cr(VI) Stress on Phosphate-Solubilizing Bacteria (*Bacillus* sp. Strain MRP-3): Oxidative Stress and Bioaccumulation Potential. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16, 2172.
- Silva y TM., F., & Martínez O., P. (2018). Complejo *Enterobacter cloacae*. *Revista Chilena Infectología*, 297-298. Retrieved from Retrato Microbiológico.
- Singh M., V. (2018). *Role of Rhizospheric Microbes in Soil. Volume 1: Stress Management and Agricultural Sustainability*. Almore: Springer Nature Singapore Pte Ltd. 2018.
- Singh, J., & Kalamdhad, A. S. (2011). Effects of Heavy Metals on Soil, Plants, Human Health and Aquatic Life. *International Journal of Research in Chemistry and Environment*, 1, 15-21.
- Singh, O., Gupta, M., Mittal, V., Kiran, S., Nayyar, H., Gulati, A., & Tewari, R. (2013). Novel phosphate solubilizing bacteria '*Pantoea cypripedii* PS1' along with *Enterobacter aerogenes* PS16 and *Rhizobium ciceri* enhance the growth of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Plant Growth Regulation*, 1-10.
- SMI, PHE. (2018). *Identification of Bacillus species*. Retrieved from UK Standards for Microbiology Investigations: [https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/697260/ID\\_9i3.1.pdf](https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/697260/ID_9i3.1.pdf)
- Turnbull, P. C. (1996). *Bacillus*. In B. S., *Medical Microbiology* (p. Chapter 15). Galveston: University of Texas .
- Ulla, A., Mushtaq, H., Ali, H., Munis H., M. F., Tariq J., M., & Javed C., H. (2014). Diazotrophs-assisted phytoremediation of heavy metals: a novel approach. *Environmental Science Pollution Research*, 1-10.
- USDA. (1998). *What is Soil?* Retrieved from Natural Resources Conservation Service Soils: [https://www.nrcs.usda.gov/wps/portal/nrcs/detail/soils/edu/?cid=nrcs142p2\\_054280](https://www.nrcs.usda.gov/wps/portal/nrcs/detail/soils/edu/?cid=nrcs142p2_054280)
- Vega H., M., Silveti L., Á., Arriola M., J., Pérez O., G., & Mendoza H., J. C. (2015). Ideas y conceptos de la formación de Biopelículas en la acción de

- Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal. *Revista Latinoamericana el Ambiente y las Ciencias*, 95-111.
- Vinayarani, G., & Prakash, H. S. (2018). Growth Promoting Rhizospheric and Endophytic Bacteria from *Curcuma longa* L. as Biocontrol Agents against Rhizome Rot and Leaf Blight Diseases. *The Plant Pathology Journal*, 218–235.
- Volke Sepúlveda, T., & Velasco Trejo, J. A. (2002). *Tecnologías de remediación para suelos contaminados*. México: INE-SEMARNAT.
- Wagi, S., & Ahmed, A. (2019). *Bacillus* spp.: potent microfactories of bacterial IAA. *PeerJ.*, 1-14.
- War Nongkhlaw, F., & Jo, S. (2016). Microscopic study on colonization and antimicrobial property of endophytic bacteria associated with ethnomedicinal plants of Meghalaya. *The Journal of Microscopy & Ultrastructure*, 132-139.
- Wood, J. L., Liu, W., Tang, C., & Franks, A. E. (2016). Microorganisms in heavy metal bioremediation: strategies for applying microbial-community engineering to remediate soils. *AIMS Bioengineering*, 211-229.
- Wright, C. J., Kierann S., M., Powell, L. C., & Armstrong, I. (2010). Application of AFM From Microbial Cell to Biofilm. *Scanning*, 134-149.
- Yang, P., Zhou, X.-F., Wang, L.-L., Li, Q.-S., Zhou, T., Chen, Y.-K., . . . He, B.-Y. (2018). Effect of Phosphate-Solubilizing Bacteria on the Mobility of Insoluble Cadmium and Metabolic Analysis. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 1-12.
- Yousef C., F. (2012). *Bases genéticas de la formación de biofilms bacterianos en superficies abióticas y vegetales*. Granada: Universidad de Granada.
- Zhang, Y., He, L., Chen, Z., Q., W., Qian, M., & Sheng, X. (2011). Characterization of ACC deaminase-producing endophytic bacteria isolated from copper-tolerant plants and their potential in promoting the growth and copper accumulation of *Brassica napus*. *Chemosphere*, 57-62.