



**Benemérita
Universidad Autónoma de Puebla**

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

**“Estudio comparativo de tres técnicas de extracción
química secuencial en la fitorremediación de jales
mineros”**

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el Título de:

Licenciatura en Ingeniería Ambiental

Presenta:

Julio Alfredo Vixta Haro

Directora de Tesis:

M.I.A. Miriam Vega Hernández

Co-director de Tesis:

Dr. José Carlos Mendoza Hernández

Puebla, Pue. Junio 2018

A mamá:

por enseñarme a poner el extra en lo ordinario.

A Aris:

por su invaluable compañía entre sueños.

Y a mí:

por tanta paciencia.

Agradecimientos

A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, particularmente a la Facultad de Ingeniería Química por la oportunidad de formarme profesionalmente en sus aulas y pasillos. Podré salir de la BUAP, pero la BUAP nunca saldrá de mí.

A la M.I.A. Miriam Vega Hernández por creer en mí y dedicarme su tiempo durante la realización de este trabajo. Por preocuparse tanto de la tesis como de mi estabilidad mental, usted es un ejemplo e inspiración para mí.

Al M.I. Ángel Silveti Loeza, por sus recomendaciones y valiosos comentarios, que enriquecieron el desarrollo de este proyecto y la visión de mi profesión. Gracias por brindarme material de laboratorio, comprensión y sobre todo su amistad.

Al Dr. José Carlos Mendoza Hernández, coordinador del colegio de Ingeniería Ambiental de la Facultad de Ingeniería Química de la BUAP, por su valiosa orientación y experiencia en la producción de investigación científica.

Al Centro Universitario de Vinculación y Transferencia Tecnológica, por permitirme utilizar sus instalaciones, especialmente a la Ing. Ambiental Mayté Juárez Meneses por instruirme en el uso del equipo ICP-OES, y por recordarme que todos tenemos algo que aprender y enseñar a otros.

A mamá, Aris, papá y Erika, ustedes han sido y seguirán siendo mi sustento, fuerza, motivo e inspiración. Todo al mismo tiempo con las emociones que ello implica.

A mis amigos, a los que no están igual pero siempre irán en mi corazón: Iván, Eli y Karina. A mis amigos de la universidad: Betty, Robert, Lili, Gio, Meli, Lalo y Angy. Especialmente a Denisse por su constante apoyo y por creer en mí, incluso en los días en que yo dejaba de hacerlo. Finalmente, a Naty y Andressa, saudades sempre.

Resumen

La contaminación de suelo por Elementos Potencialmente Tóxicos (EPT) representa riesgos al equilibrio ambiental y la salud humana. Los jales son residuos que resultan de las actividades de explotación minera y se caracterizan por presentar altos contenidos de EPT; a pesar de las regulaciones el problema persiste, es necesario realizar estudios que permitan conocer los riesgos ambientales para proponer técnicas de remediación y planes de ocupación, además, que no se enfoquen únicamente en el contenido total de EPT, pues esta estimación podría minimizar los riesgos asociados a la movilidad y biodisponibilidad de estos. Las técnicas de extracción química secuencial han sido usadas para estudiar la distribución de elementos contaminantes en estudios ambientales, sin embargo, no se cuenta con una técnica de aplicación estandarizada debido a la variabilidad de resultados que estas proporcionan.

Se realizó un estudio comparativo de las concentraciones de Arsénico (As), Cadmio (Cd), Hierro (Fe), Manganeso (Mn), Níquel (Ni), Plomo (Pb) y Zinc (Zn) en muestras de jales de Zimapán, Hidalgo con el objetivo de evaluar la movilidad de EPT mediante el uso de tres técnicas de extracción química secuencial: BCR (Rauret *et al.*, 1999), Hall *et al.* (1995) y Urbina Trinidad (2015). Para ello se realizó un ensayo de fitorremediación con *Ricinus communis*, una enmienda orgánica y Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (BPCV) *Klebsiella* MC173, *Enterobacter* MC101 y *Escherichia* N16. Se determinaron parámetros fisicoquímicos del jal, la concentración total de EPT por el método 3052 de la EPA (1996) y la fracción extraíble de EPT por DTPA-TEA-CaCl₂ (Meers *et al.*, 2007). La metodología que presentó el mayor porcentaje de recuperación fue Hall. La concentración total de elementos de la muestra testigo de jal reveló el siguiente orden: Fe (21638.88 mg/kg) > As (8400.82 mg/kg) > Zn (2631.76 mg/kg) > Pb (1352.03 mg/kg) > Mn (787.82 mg/kg) > Cd (22.54 mg/kg) > Ni (25.23 mg/kg). El análisis de la movilidad de EPT confirmó que las BPCV y *R. communis* influyen su distribución en las distintas fracciones consideradas por cada técnica. Debido al contenido asociado a formas solubles, intercambiables, carbonatos, oxihidróxidos y óxidos de Fe y Mn se encontró alto potencial de movilidad de As, Cd, Fe, Mn, Pb y Zn. Se determinó alta asociación de los EPT a sulfuros primarios, que coincide con las menas características de la región.

Abstract

Contamination of soil for Potentially Toxic Metals (PTMs) poses risks to the environmental balance and human health. The tailings are the wastes of the mining exploitation and they are characterized for having high contents of PTMs; despite the regulations the soil pollution problem persists, thus, it is necessary to make studies estimating the environmental hazards and to propose new occupation plans and remediation treatments, furthermore, not focusing only in the total content of PTMs, since this estimation might minimize the risks associated to mobility and bioavailability of these. The sequential chemical extraction procedures have been used to study the distribution of pollutants in environmental assessments, nevertheless, there is no a technique of standardized application due to the variability of results that those provide.

A comparative study of the Arsenic (As), Cadmium (Cd), Iron (Fe), Manganese (Mn), Nickel (Ni), Lead (Pb) and Zinc (Zn) concentrations was made in tailing samples from Zimapán, Hidalgo, aiming the assessment of the PTMs mobility using three schemes: BCR (Rauret *et al.*, 1999), Hall *et al.* (1995) and Urbina Trinidad (2015). For this, a phytoremediation essay with *Ricinus communis*, an organic amendment and Plant Growth Promoting Bacteria (PGPB) *Klebsiella* MC173, *Enterobacter* MC101 and *Escherichia* N16 was realized. The tailings physicochemical parameters were determined, the total content of PTMs by the EPA's 3052 method (1996), and the PTMs extractable fraction by the DTPA-TEA-CaCl₂ method (Meers *et al.*, 2007). The technique proposed by Hall *et al.* (1995) presented the highest recovery percentage. The total PTMs concentration in the control sample revealed the order: Fe (21638.88 mg/kg) > As (8400.82 mg/kg) > Zn (2631.76 mg/kg) > Pb (1352.03 mg/kg) > Mn (787.82 mg/kg) > Cd (22.54 mg/kg) > Ni (25.23 mg/kg). The PTMs speciation analysis confirmed the influence of PGPB and *R. communis* over the distribution in the different fractions assumed by each procedure. Due to the content associated to soluble, exchangeable, carbonates, Fe and Mn oxyhydroxides and oxides forms, a high mobility potential in As, Cd, Fe, Mn, Pb and Zn was found. It was found a high relation of PTMs to sulfides, this match with the region characteristic ores.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	4
JUSTIFICACIÓN	5
OBJETIVOS	7
Objetivo General	7
Objetivos Específicos.....	7
HIPÓTESIS.....	7
CAPÍTULO I. ANTECEDENTES.....	8
1.1 La Minería.....	8
1.1.1 Residuos mineros	12
1.1.2 Marco normativo en materia de residuos mineros	14
1.2 Elementos Potencialmente Tóxicos	16
1.2.1 Arsénico.....	18
1.2.2 Cadmio	19
1.2.3 Hierro	19
1.2.4 Manganeso.....	20
1.2.5 Níquel	21
1.2.6 Plomo	21
1.2.7 Zinc	22
1.3 Movilidad de los elementos en los suelos	23
1.4 Métodos de Especiación de EPT en Suelos	24
1.4.1 Técnicas para Determinar EPT en solución de suelo	25
1.4.2 Métodos sencillos para determinar la fracción biodisponible de EPT en suelos.....	26
1.4.3 Métodos para Determinar Biodisponibilidad de EPT en Humanos	27
1.4.4 Extracción Química Secuencial.....	28
1.4.5 Espectrometría de Emisión Óptica con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-OES).....	33
1.5 Métodos de Remediación	34
1.5.1 Biorremediación.....	36
1.5.2 Factores que afectan la Biorremediación	37
1.6 Fitorremediación	38
1.6.1 Fitoestabilización y Fitoextracción	39

1.6.2 Efectos y Respuesta de plantas ante presencia de EPT en suelos	41
1.6.3 Bacterias Promotoras del Crecimiento	45
1.6.4 Potencial de <i>Ricinus communis</i> para biorremediación	47
CAPÍTULO II. METODOLOGÍA	51
2.1 Muestreo.....	51
2.2 Análisis fisicoquímico.....	52
2.3 Preparación del inóculo.....	53
2.4 Germinación y cuidado de plántulas	54
2.5 Recolección de suelo de rizósfera	55
2.6 Extracción química secuencial.....	55
2.6.1 Técnica de Extracción Química Secuencial BCR	56
2.6.2 Técnica de Extracción Química Secuencial Hall	58
2.6.3 Técnica de Extracción Química Secuencial Urbina.....	61
2.7 Determinación de EPT	63
2.8 Análisis del fraccionamiento.....	64
2.9 Tratamiento estadístico de los datos	64
CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	65
3.1 Caracterización fisicoquímica de jal y sustrato.....	65
3.2 Presencia de EPT	66
3.2.1 Análisis de Especiación de Arsénico.....	70
3.2.2 Análisis de Especiación de Cadmio	83
3.2.3 Análisis de Especiación de Hierro.....	94
3.2.4 Análisis de Especiación de Manganeso	104
3.2.5 Análisis de Especiación de Níquel	115
3.2.6 Análisis de Especiación de Plomo	124
3.2.7 Análisis de Especiación de Zinc	133
3.3 Análisis de la Varianza.....	143
3.4 Consideraciones de la interacción Jal - <i>R. communis</i> – BPCV.....	145
CONCLUSIONES	147
PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES	150

Índice de Figuras

Figura 1. Volumen de la producción de plata (Kg) por municipios del estado de Hidalgo. Fuente: INEGI (2017)	10
Figura 2. Volumen de la producción de Cobre, Zinc y Plomo (ton) para el estado de Hidalgo. Fuente: INEGI (2017)	11
Figura 3. Distribución porcentual de As en la técnica BCR	73
Figura 4. Distribución porcentual de As en la técnica Hall.	75
Figura 5. Distribución porcentual de As en la técnica Urbina.	78
Figura 6. Fraccionamiento de Arsénico con las técnicas BCR, Hall y Urbina.	80
Figura 7 Distribución porcentual de Cd en la técnica BCR.....	86
Figura 8. Distribución de Cd en la técnica Hall.	88
Figura 9. Distribución porcentual de Cd en la técnica Urbina.	89
Figura 10. Fraccionamiento de Cadmio con las técnicas BCR, Hall y Urbina.	92
Figura 11. Distribución de Fe en la técnica BCR	97
Figura 12. Distribución porcentual de Fe en la técnica Hall	98
Figura 13. Distribución de Fe en la técnica Urbina	100
Figura 14. Fraccionamiento de Hierro con las técnicas BCR, Hall y Urbina.	102
Figura 15. Distribución porcentual de Mn en la técnica BCR.	107
Figura 16. Distribución porcentual de Mn en la técnica Hall.....	109
Figura 17. Distribución porcentual de Mn en la técnica Urbina.....	110
Figura 18. Fraccionamiento de Manganeso con las técnicas BCR, Hall y Urbina.	114
Figura 19. Distribución porcentual de Ni en la técnica BCR.	118
Figura 20. Distribución porcentual de Ni en la técnica Hall.....	119
Figura 21. Distribución porcentual de Ni en la técnica Urbina.....	120
Figura 22. Fraccionamiento de Níquel con las técnicas BCR, Hall y Urbina.....	122
Figura 23. Distribución porcentual de Pb en la técnica BCR.....	127
Figura 24. Distribución porcentual de Pb en la técnica Hall.....	128
Figura 25. Distribución porcentual de Pb en la técnica Urbina	130
Figura 26. Fraccionamiento de Plomo con las técnicas BCR, Hall y Urbina.....	132
Figura 27. Distribución porcentual de Zn en la técnica BCR.....	136
Figura 28. Distribución porcentual de Zn en la técnica Hall.	137
Figura 29. Distribución porcentual de Zn en la técnica Urbina.	139
Figura 30. Fraccionamiento de Zinc con las técnicas BCR, Hall y Urbina.....	142

Índice de Tablas

Tabla 1. Volumen en toneladas de la producción de metales y minerales seleccionados por entidad federativa 2016.	9
Tabla 2. Interrelaciones e impactos de la actividad minera con el ambiente.	12
Tabla 3. Pruebas para determinar la peligrosidad de un residuo.	14
Tabla 4. Límites máximos permisibles para los constituyentes tóxicos en el extracto PECT y base seca.	15
Tabla 5. Concentraciones de referencia totales (CR_T) por tipo de uso de suelo.	16
Tabla 6. Menas abundantes en el distrito de Zimapán.	17
Tabla 7. Efectos tóxicos de micronutrientes a concentraciones elevadas.	42
Tabla 8. Efectos dañinos de elementos no esenciales en plantas.	42
Tabla 9. Potencial de <i>Ricinus communis</i> en procesos de fitorremediación.	48
Tabla 10. Caracterización de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal utilizadas.	54
Tabla 11. Resumen de las técnicas de extracción química secuencial utilizadas.	56
Tabla 12. Longitudes de onda (nm) de medida mediante ICP-OES.	63
Tabla 13. Características fisicoquímicas del sustrato y jal usados en los sistemas de fitorremediación.	65
Tabla 14. Concentración encontrada de EPT (mg kg^{-1}) en sustrato orgánico y jal para fracciones biodisponibles y extracción BCR para muestra de jal sin tratamiento.	66
Tabla 15. Concentración total de EPT obtenida por el método EPA 3052 (1996).	69
Tabla 16. Concentración de As encontrada por las técnicas de extracción química secuencial.	71
Tabla 17. Concentración de Cd encontrada por las técnicas de extracción química secuencial.	84
Tabla 18. Concentración de Fe encontrada por las técnicas de extracción química secuencial.	95
Tabla 19. Concentración de Mn encontrada por las técnicas de extracción química secuencial.	105
Tabla 20. Concentración de Ni encontrada por las técnicas de extracción química secuencial.	116
Tabla 21. Concentración de Pb encontrada por las técnicas de extracción química secuencial.	125
Tabla 22. Concentración de Zn encontrada por las técnicas de extracción química secuencial.	134
Tabla 23. Comparaciones múltiples por la prueba HDS de Tukey.	144

Índice de Ilustraciones

Ilustración 1. Las interacciones planta-microorganismos y los procesos rizosféricos importantes para la fitorremediación.	40
Ilustración 2. Vista satelital de la zona de muestreo en Santa María Zimapán.	51
Ilustración 3. <i>Ricinus communis</i> en zona de muestreo.	52
Ilustración 4. Presa de jales donde se realizó el muestreo en Zimapán, Hidalgo.	52
Ilustración 5. Sistema de fitorremediación con Higuierilla y cepa <i>Escherichia N16</i>	55
Ilustración 6. Filtración de los extractos obtenidos con EPT.	57
Ilustración 7. Análisis de EPT en equipo ICP-OES.	63

INTRODUCCIÓN

La contaminación de suelos con Elementos Potencialmente Tóxicos (EPT) representa riesgos serios para el ambiente y la salud humana. A bajas concentraciones algunos EPT (Cu, Cr, Mo, Ni, Se, Zn, etc.) son esenciales para funciones biológicas de microorganismos, plantas y animales, sin embargo, a altas concentraciones estos mismos elementos pueden causar severos daños en cualquier organismo. Por otro lado, algunos elementos no esenciales pueden provocar daños tóxicos incluso cuando se manifiestan a bajas concentraciones (Evanko & Dzombak, 1997; Seoáñez Calvo, 1999; Volke Sepúlveda *et al.*, 2005).

Los jales son residuos generados a partir de los procesos de extracción minera, dependiendo de su composición mineral (contenido de EPT), tipo de exploración, y operaciones de separación; pueden generar graves impactos en el ambiente (Instituto Nacional de Ecología, 1995). Considerando que la minería se caracteriza por el alto volumen de residuos que genera, actualmente se cuenta con legislación y normatividad que regula la gestión de estos residuos (Camara Minera Mexicana, 2017).

A pesar de las regulaciones ambientales y el desarrollo tecnológico, el problema de la contaminación en suelos persiste. Por ello, los suelos deben ser caracterizados para definir sus riesgos ambientales en función de planes de ocupación y/o aplicación de tratamientos de remediación (Adamo *et al.*, 2018). El análisis de riesgo basado únicamente en el contenido total de EPT podría minimizar los riesgos asociados a su transferencia a cuerpos de agua u organismos, pues no proporciona información acerca de la porción de estos que es transferible o biodisponible. (Learita Prince, 2015; Manahan, 2013).

Para una correcta evaluación del riesgo relacionado a la contaminación por EPT y para estudiar la eficiencia de técnicas de remediación es necesario estudiar la movilidad y biodisponibilidad de los elementos contaminantes. Así, es necesario establecer métodos analíticos que provean información acerca de la dinámica de EPT en suelos (Adamo *et al.*, 2018; Evans & Furlong, 2011).

De acuerdo con la IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) el fraccionamiento es el proceso de clasificación de un analito o un grupo de analitos de una muestra de acuerdo con sus propiedades físicas o químicas (Adamo *et al.*, 2018). Las metodologías de fraccionamiento buscan caracterizar las formas en que los EPT se encuentran presentes en los suelos. La distribución de un EPT en las fracciones minerales de un suelo puede ser lograda a través de métodos analíticos directos o indirectos. Algunos métodos directos son Difracción de Rayos X (DRX), Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) y Resonancia Magnética Nuclear, sin embargo, estos métodos son usualmente cualitativos o semicuantitativos y frecuentemente no detectan cantidades traza de elementos. Por otro lado, están las técnicas de especiación indirecta, como las técnicas de extracción sencillas, o extracción química secuencial (Martínez & Rivero, 2005; Zimmerman & Weindorf, 2010).

Las técnicas de extracción química secuencial están basadas en el uso de una serie de sustancias seleccionadas por su habilidad para reaccionar con los diferentes componentes del suelo y liberar a los EPT asociados a estos (Okoro *et al.*, 2012). La selectividad de los reactivos hacia las fases geoquímicas específicas se ve mejorada por su aplicación secuencial en esquemas que siguen un orden de incremento en la fuerza química del reactivo (Adamo *et al.*, 2018; Martínez & Rivero, 2005). Los extractantes son aplicados generalmente en el siguiente orden: sales buffer a un determinado pH, ácidos débiles, agentes reductores, agentes oxidantes y ácidos fuertes (Margeson & Schinner, 2005; Tessier *et al.*, 1979; Zimmerman & Weindorf, 2010).

Muchos de los procedimientos de extracción química secuencial están basados en la técnica de cinco pasos de Tessier *et al.* (1979), que define a las fracciones minerales como: intercambiable, unida a carbonatos, unida a óxidos de Fe y Mn, unida a materia orgánica y residual. Las modificaciones realizadas generalmente consisten en el uso de otros reactivos, pH, tiempo de retención y temperatura (Okoro *et al.*, 2012; Zimmerman & Weindorf, 2010).

En este trabajo se caracterizaron jales provenientes de una presa del distrito minero de Zimapán, Hidalgo. Este municipio ha sido destacado por su actividad minera debida a la existencia de yacimientos metálicos, no metálicos, rocas dimensionales, agregados pétreos y

gemas o piedras semipreciosas (Servicio Geológico Mexicano, 2016). Algunos depósitos de jales mineros han sido estudiados debido a su alto contenido de EPT, de los que destacan Arsénico, Plomo y Zinc (Learita Prince, 2015; Moreno Tovar *et al.*, 2012; Ruiz Olivares *et al.*, 2013).

Los parámetros analizados comprenden pH, densidad aparente, humedad, materia orgánica, nitrógeno inorgánico, textura, Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC), conductividad eléctrica, color y acidez extraíble. La determinación total de elementos se realizó de acuerdo con el método 3052 de la EPA (1996), además, se realizó una extracción sencilla de EPT con la técnica DTPA-TEA-CaCl₂ (Meers *et al.*, 2007).

Se realizó un ensayo de fitorremediación en muestras de jales con una enmienda orgánica comercial, *Ricinus communis* y Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (BPCV): *Klebsiella* MC173, *Enterobacter* MC101 y *Escherichia* N16 (Mendoza Hernández *et al.*, 2016).

Para el análisis de la movilidad de algunos EPT (As, Cd, Fe, Mn, Ni, Pb y Zn) se aplicó el método de extracción química secuencial BCR (Rauret *et al.*, 1999) y las técnicas propuestas por Hall *et al.* (1995) y Urbina Trinidad (2015). El contenido de elementos en los extractos obtenidos fue analizado mediante la técnica de espectrometría de emisión óptima con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES, por sus siglas en ingles). Los resultados obtenidos se analizaron en función del riesgo ambiental, los cambios en la movilidad de los EPT en los tratamientos de fitorremediación y las diferencias significativas halladas entre las metodologías mediante un análisis ANOVA de un factor en IBM SPSS® Statistics.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La contaminación del ambiente por EPT se ha convertido en un problema grave en el mundo que requiere atención inmediata para mitigar sus efectos. La actividad minera representa uno de los principales vehículos de liberación de EPT en los ecosistemas debido a las altas concentraciones que presentan los desechos sólidos, líquidos y gaseosos que producen (Learita Prince, 2015). La minería en México a pesar de ser un sector productivo en los ámbitos económico y cultural enfrenta retos para lograr un desarrollo sustentable en todas sus operaciones (Camara Minera Mexicana, 2017).

El problema de la contaminación por EPT recae principalmente en que estos no son biodegradables, y por ello, al ser liberados se pueden acumular y difundir en suelos y cuerpos de agua y a su vez entrar en la cadena alimenticia provocando daños a la salud humana y vida silvestre (Bolan *et al.*, 2011; Delgadillo-López *et al.*, 2011).

Entre las medidas que se han adoptado para enfrentar los daños ocasionados por la contaminación de EPT en el ambiente se encuentra la fitorremediación, que a pesar de ofrecer una alternativa verde, de bajo costo y poco mantenimiento requiere garantizar su eficacia, esto sólo puede ser logrado a través de análisis detallados de las interrelaciones entre los componentes del sistema, el suelo, plantas utilizadas, microorganismos, los elementos objetivo y su movilidad durante el tratamiento empleado (Prieto Méndez *et al.*, 2009; Volke Sepúlveda *et al.*, 2005).

En el análisis de la eficacia de tratamientos de fitorremediación aplicados en suelos contaminados con EPT es indispensable conocer las fracciones de agregación en las cuáles se encuentran dependiendo de su estado de oxidación y reactividad, pues esto determina su biodisponibilidad y riesgo al ambiente (Favas *et al.*, 2011). Al respecto, se han propuesto numerosas técnicas de extracción que permiten obtener información acerca de la movilidad de los EPT, sin embargo, debido al uso de reactivos, condiciones de operación y matrices de análisis no existe una técnica homóloga y validada a nivel internacional que garantice la obtención de resultados estandarizados (Okoro *et al.*, 2012; Zimmerman & Weindorf, 2010).

JUSTIFICACIÓN

Los EPT presentes en los jales mineros suelen estar arraigados a las distintas estructuras y agregados presentes en el suelo dependiendo de su estado de oxidación y reactividad, la naturaleza de los minerales en que se encuentran determina su disponibilidad para ser consumidos, transformados o acumulados por plantas y microorganismos (Bolan *et al.*, 2011; DalCarso *et al.*, 2013). A su vez, esta biodisponibilidad puede ser modificada a través de los procesos metabólicos de las BPCV y de las plantas durante los tratamientos de fitorremediación. El estudio de la movilidad de los EPT mediante técnicas de extracción secuencial permite evaluar de forma química el resultado de las interacciones biológicas vislumbrando así la efectividad en la estabilización de estos (Delgadillo-López *et al.*, 2011; Rajkumar *et al.*, 2012).

El análisis de la movilidad de EPT y con ello la efectividad en su estabilización es una herramienta clave en la formulación y establecimiento de estrategias de optimización en los procesos de rehabilitación *in situ* de suelos contaminados, como parte integral del desarrollo sustentable en la gestión de residuos y recuperación de espacios en la minería (DalCarso *et al.*, 2013; Okoro *et al.*, 2012).

La determinación total o pseudototal de EPT en una matriz manifiesta el grado de contaminación de un sitio, sin embargo, brinda poca información con respecto a procesos biológicos, cómo afectan a las plantas o microorganismos, y de los mecanismos de generación de drenaje ácido (Fernández-Ondóño *et al.*, 2017; Meers *et al.*, 2007). Por esta razón, en las últimas décadas se ha incrementado el interés por realizar análisis más detallados acerca de la concentración de los elementos en las diferentes fracciones presentes en suelos. Sin embargo, actualmente no se cuenta con una metodología homóloga y validada a nivel internacional, por lo tanto, hay variabilidad en los resultados (Zimmerman & Weindorf, 2010; Favas *et al.*, 2011). Una comparación entre metodologías de extracción química secuencial, sus ventajas, desventajas, y las distintas fracciones minerales que

consideran permitirá evaluar la utilidad de los resultados que proporcionan respecto a la especiación y evaluación del riesgo ambiental asociado a EPT.

Existen diferencias en el número de pasos, reactivos, tiempo de retención y temperaturas sugeridas por las técnicas revisadas en este trabajo. El método BCR (Rauret *et al.*, 1999) propone cuatro pasos en el fraccionamiento de elementos, por su parte el método propuesto por Hall et al. (1995) considera cinco diferentes fracciones minerales, mientras que Urbina Trinidad (2015) realizó una propuesta de ocho pasos en base a lo propuesto por otros autores (Favas et al., 2011; Hall et al., 1995; Tessier et al., 1979). Lo anterior sugiere que es posible encontrar diferencias significativas en el contenido de EPT extraído en las diferentes fracciones minerales establecidas, el análisis de la información permitirá determinar la utilidad y aporte de cada una de las técnicas de extracción química secuencial.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar la movilidad de elementos potencialmente tóxicos mediante la comparación de tres metodologías de extracción química secuencial en la rizósfera de un tratamiento de fitorremediación en jales mineros de Zimapán, Hidalgo.

Objetivos Específicos

- Analizar las propiedades fisicoquímicas de una muestra representativa de jales mineros de la presa de Santa María, Zimapán, Hidalgo.
- Cuantificar el contenido de Arsénico, Cadmio, Hierro, Manganeseo, Níquel, Plomo y Zinc en la rizósfera de un sistema de fitorremediación con bacterias promotoras del crecimiento vegetal y *Ricinus communis* mediante las técnicas de extracción química secuencial BCR, Hall y Urbina.
- Analizar la movilidad de Arsénico, Cadmio, Hierro, Manganeseo, Níquel, Plomo y Zinc en la rizósfera del sistema de fitorremediación con *Ricinus communis* y bacterias promotoras del crecimiento vegetal.
- Evaluar la significancia de las concentraciones de Arsénico, Cadmio, Hierro, Manganeseo, Níquel, Plomo y Zinc en las fracciones consideradas por las tres técnicas de extracción química secuencial empleadas.

HIPÓTESIS

Existe diferencia significativa entre las concentraciones de Arsénico, Cadmio, Hierro, Manganeseo, Níquel, Plomo y Zinc en las fracciones consideradas por las tres técnicas de extracción química secuencial aplicadas a un sistema de fitorremediación.

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

1.1 La Minería

De acuerdo con la Secretaria de Economía (2017) el sector minero-metalúrgico en México contribuye con el 4% del Producto Interno Bruto Nacional. Como sector minero-metalúrgico da empleo a más de 350 mil personas y genera divisas por más de 14,700 millones de dólares. Al 2015, el valor de la producción minera alcanzó un monto de 16.3 millones de dólares. Particularmente, México ocupa el primer lugar en la producción de plata a nivel mundial. Es de los 10 principales productores de 16 minerales: Plata, bismuto, fluorita, celestita, wollastonita, Cadmio, Molibdeno, Plomo, Zinc, diatomita, sal, barita, grafito, yeso, Oro y Cobre. La actividad minera se extiende en todo el territorio mexicano, en la tabla 1 se puede apreciar la aportación por producto de cada estado durante el 2016.

A pesar del inminente beneficio económico y social de las actividades mineras, en la era del desarrollo sustentable es necesario armonizar el desarrollo de las actividades de extracción minera con el ambiente; para lograr el continuo desempeño ambiental resulta imprescindible contar con estrategias y mecanismos de control en todas las operaciones, estos se manifiestan a través de programas de auditoría ambiental voluntaria que garantizan y certifican el compromiso socioambiental de las empresas. Según la Cámara Minera Mexicana al 2016 se obtuvo la participación de 111 empresas mineras en el Programa de Industria Limpia que impulsa la Procuraduría Federal de Protección al Ambiente (PROFEPA). Además, 38 grupos mineros fueron reconocidos como Empresas Socialmente Responsables (Camara Minera Mexicana, 2017).

El estado de Hidalgo se ha destacado por ser una de las principales entidades mineras desde hace 500 años, actualmente es un importante productor de Manganeseo (Mn) y ocupa el tercer lugar en la producción de Cadmio (Cd) y en menor medida de Oro (Au), Plata (Ag), Plomo (Pb) y Zinc (Zn), los cuales han incrementado sus extracciones durante el 2011 (Learita Prince, 2015; Servicio Geológico Mexicano, 2016).

Tabla 1. Volumen en toneladas de la producción de metales y minerales seleccionados por entidad federativa 2016.

	Preciosos			Industriales no ferrosos	Siderúrgicos				No metálicos		
Entidad federativa	Au (kg)	Ag (kg)	Pb	Cobre	Zinc	Coque	Pellets de Fe	Fierro en extracción	S	Ba	Fluorita
Baja California	3003.8	33922	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Coahuila de Zaragoza	0	78914	0	0	0	1332665	3053207	4109163	0	40658	52556
Colima	0	0	0	0	0	0	3213030	2556781	0	0	0
Chiapas	0	0	0	0	0	0	0	0	268751	0	0
Chihuahua	18043.2	707675	36534	15339	103957	0	0	302228	0	0	0
Durango	9901.4	738790	29617	9408	172316	0	0	1538646	0	0	0
Guanajuato	2451.2	157522	0	0	0	0	0	0	24321	0	0
Guerrero	7400.9	5752	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hidalgo	41.3	56225	3291	1800	17310	0	0	0	21921	0	0
Jalisco	0	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0
México	1206.7	234736	9726	2479	46405	0	0	0	0	0	0
Michoacán de Ocampo	0	0	0	1109	0	35471	866247	2959986	0	0	0
Morelos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nayarit	99.8	3099	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nuevo León	0	0	0	0	0	0	0	0	63138	72254	0
Oaxaca	2386.4	279588	5260	0	0	0	0	0	26370	0	0
Querétaro	445.5	119479	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Puebla	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
San Luis Potosí	3075.0	159412	1660	29181	29830	0	0	0	0	0	540818
Sinaloa	1962.7	37219	2717	1027	6327	0	0	132251	0	0	0
Sonora	43727.6	380409	0	577259	0	0	0	1423617	0	61124	0
Tabasco	0	0	0	0	0	0	0	0	192488	0	0
Tamaulipas	0	0	0	0	0	0	0	0	40031	0	0
Veracruz de Ignacio de la Llave	0	0	0	0	0	0	0	0	41792	0	0
Zacatecas	24425.3	2248253	136053	37153	287273	0	0	0	0	0	0
Otras entidades federativas	673.6	132733	7217	13906	41981	0	0	242676	0	22860	0
Fuente: (INEGI, 2017).											

El estado de Hidalgo está constituido por ochenta y cuatro municipios, de los cuales Zimapán es el más grande y se encuentra a 144 kilómetros de Pachuca de Soto. El municipio de Zimapán se localiza en la porción occidental del estado de Hidalgo, entre las coordenadas

geográficas 19°47'00" y 20°50'00" de latitud norte, y de longitud oeste 98°27'00" y 99°30'00", la altitud media del municipio es de 1,800 msnm. En el municipio existen yacimientos de minerales metálicos, no metálicos, rocas dimensionales, agregados pétreos y gemas o piedras semipreciosas (Servicio Geológico Mexicano, 2008). De los minerales no metálicos se explota calcita para producir marmolina; en lo que se refiere a las rocas dimensionales se tienen varias localidades de material volcánico y sedimentario, para producir losetas rústicas, pisos, adoquines, lajas para fachadas, ornamentos, columnas, etc. En agregados pétreos existen localidades con posibilidades de ser explotadas para producir block, grava y arena para ser utilizados en la industria de la construcción y bloques para cimentación y mampostería.

El municipio de Zimapán cuenta con un considerable número de obras mineras (se tienen registradas 45) que comprenden minas, socavones, niveles, y tiros, entre otros. Dentro del municipio la compañía Peñoles presenta los niveles de producción más altos, seguida por la Compañía Metalúrgica de San Miguel y de menor importancia la Compañía Minera Lomo de Toro y El espíritu (Azpeitia Caballero, 2007).

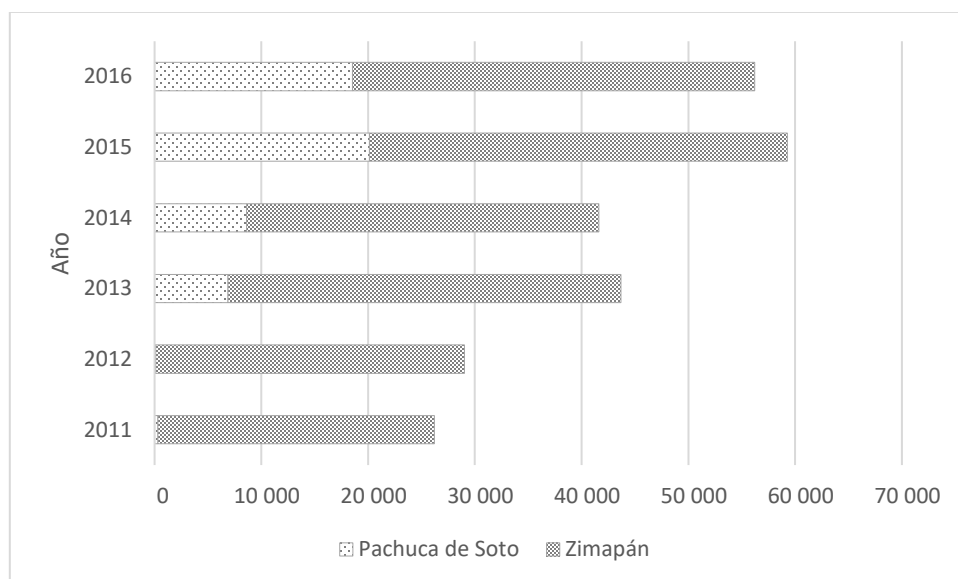


Figura 1. Volumen de la producción de plata (Kg) por municipios del estado de Hidalgo. Fuente: INEGI (2017)

Según datos reportados por el Instituto de Geografía y Estadística en el 2016 el estado de Hidalgo aportó a la producción nacional de plata con 56.225 toneladas de las cuales el 67% fue extraído de Zimapán (Figura 1), esta contribución se ha mantenido predominante sobre la producción de Pachuca de Soto durante los últimos años.

El Cobre, Zinc y Plomo se producen en mayor volumen, para el caso del Cobre la aportación del municipio es adjudicada a la del estado como un volumen total de 1 800 toneladas, mientras que para el Zinc y Plomo la aportación de Zimapán es tan significativa que representa toda la producción del estado con 17310 y 3291 toneladas, respectivamente (Figura 2).

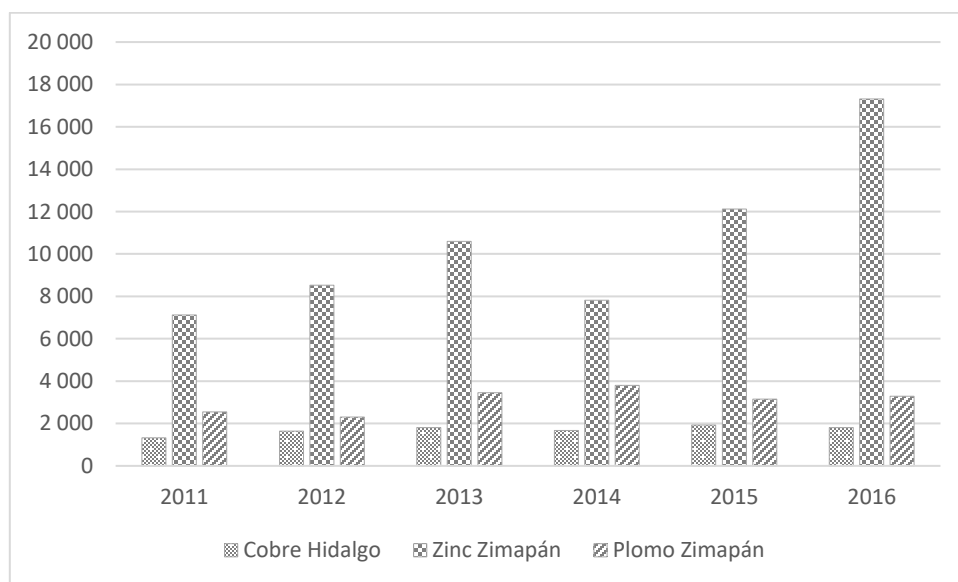


Figura 2. Volumen de la producción de Cobre, Zinc y Plomo (ton) para el estado de Hidalgo.
Fuente: INEGI (2017)

La minería es la principal actividad económica del municipio, seguida por la agricultura y el comercio, por ello la atención del correcto desenvolvimiento de sus actividades significa un eje necesario para lograr el desarrollo sustentable de la población y con ello el análisis de las afectaciones que se han acumulado como pasivos ambientales a lo largo de los años, entre los que sobresalen la contaminación de cuerpos de agua, la sobreexplotación de acuíferos, la alteración irreparable del paisaje, flora y fauna y la

contaminación del aire, suelo y agua por los depósitos de jales mineros (Camara Minera Mexicana, 2017; INEGI, 2017).

1.1.1 Residuos mineros

La excavación, remoción de minerales y la extracción de metales pueden causar daños ambientales desde el subsuelo hasta la atmósfera, incluyendo cuerpos de agua superficiales y mantos freáticos, que además de su intoxicación con sales de EPT como As, Se, Pb y Cd entre otros, en casos extremos pueden causar la pérdida de ecosistemas. Asimismo, el material subterráneo puede generar volúmenes de residuos hasta ocho veces mayores al original (Instituto Nacional de Ecología, 1995). Las operaciones de esta actividad generan una gran cantidad de desechos sólidos, líquidos y gaseosos; en la tabla 2 se destaca el impacto ambiental que se puede esperar de cada etapa de operación de la minería:

Tabla 2. Interrelaciones e impactos de la actividad minera con el ambiente.

Etapas	Descripción	Impacto al ambiente
Prospección	-Estudios de gravimetría, geología, superficial, densidad, etc.	-Procedimientos que no generan impactos ambientales significativos
Exploración	-Barrenación, obras y perforaciones, construcción de caminos, instalación de campamentos	-Destrucción de vegetación, modificación del paisaje
Exploración y beneficio	-Descapote: eliminación de suelo y vegetación -Construcción y obras diversas (tiros, socavones, patios de depósito) -Alto consumo de agua -Acumulación de material sin valor en terrenos -Transporte del material con valor hacia molinos -Extracción y concentración de minerales -Reducción del tamaño del mineral por trituración y molienda -Tratamientos previos a una fusión primaria o electrodeposición	-Destrucción de la capa del suelo y la vegetación -Afectación a cuerpos de agua -Generación de terrenos inestables -Generación de jales -Escurremientos y arrastres de residuos -Oxidación de minerales insolubles y formación de sustancias solubles con alto contenido de metales (drenaje ácido) -Descarga de lixiviados que contienen iones metálicos y reactivos tóxicos

		-La trituración y molienda pueden provocar ruido, vibración y emisión de polvo
Fundición y refinación	-Obtención de metales y sus aleaciones con el uso de hornos industriales. -Eliminación de impurezas en los metales para alcanzar una alta ley de contenido	-Generación de aguas residuales, residuos peligrosos, emisiones a la atmósfera
Fuente: (Gutiérrez, 2003)		

Jal es una palabra de origen náhuatl que significa arena, se utiliza para nombrar a todos los materiales naturales sin valor, vestigios de minerales, reactivos utilizados en el proceso y productos de la oxidación de los minerales, también se nombran colas o relaves (Instituto Nacional de Ecología, 1995). De acuerdo con Volke Sepúlveda *et al.*, (2005) en ningún proceso de concentración se logra una recuperación de 100%, por esto, los jales mineros siempre contienen residuos del mineral, aunque actualmente se puede recuperar una porción de esta concentración, en el pasado era común que las empresas desecharan los residuos en ríos o los dispusieran en montículos al aire libre.

El impacto de las actividades de extracción minera sobre el ambiente se relaciona con la composición de los minerales extraídos, el tipo de explotación, las operaciones de separación del mineral y el entorno, sin embargo, algunos de los reactivos que se utilizan en las operaciones y que es común encontrar en los residuos son (López Sánchez, 2013):

- Ácidos: ácido sulfúrico
- Hidróxidos: cal, carbonato de Sodio e hidróxido de Sodio.
- Selectores (sustancias modificadoras de la superficie de la partícula mineral): sulfato de Cobre, cianuro de Sodio, sulfuro de Zinc, sulfuro de Sodio, silicato de Sodio, bióxido de Azufre y almidón.
- Colectores: xantanos de Potasio o Sodio, aminas y derivadas de las anilinas y aceites.
- Espumantes: aceite de pino, alcohol hexílico, poliglicoles, y orto-isobutil ditiocarbonato de Sodio.

1.1.2 Marco normativo en materia de residuos mineros

Considerando que la minería es una actividad económica que se caracteriza por su alto volumen de generación de residuos y que estos representan riesgos a la salud humana y comprometen la estabilidad de los ecosistemas, actualmente se cuenta con legislación y normatividad que tiene por objetivo regular la gestión de estos residuos.

Entre las leyes que rigen las actividades de exploración, extracción, beneficio y cierre de las minas en México se encuentran la ley minera, ley de inversión extranjera, ley general de desarrollo forestal sustentable, ley de desarrollo rural sustentable y la Ley General del Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente (LGEEPA) y sus reglamentos en materia de ordenamiento ecológico, impacto ambiental, áreas naturales protegidas, autorregulación y auditorías ambientales y prevención y control de contaminación de la atmósfera (Secretaría de Economía, 2015).

Tabla 3. Pruebas para determinar la peligrosidad de un residuo.

Etapas del proceso minero	Pruebas por realizar en el residuo
Minado y tratamiento de minerales	Concentración total
	Movilidad
	Potencial de generación de drenaje ácido
Producción de metales mediante procesos pirometalúrgicos o hidrometalúrgicos	Concentración total
	Movilidad
	pH de la disolución del residuo en agua
Fuente: NOM-157-SEMARNAT-2009	

La NOM-141-SEMARNAT-2003 establece el procedimiento para caracterizar los jales, así como las especificaciones y criterios para la caracterización y preparación del sitio, proyecto, construcción, operación y post-operación de presas de jales para asegurar el control y minimización del riesgo por la peligrosidad de residuos mineros. Esta norma a su vez se relaciona con la NOM-052-SEMARNAT-2005 que establece las características, procedimiento de identificación, clasificación y los listados de residuos peligrosos. Dentro del listado de esta norma se destacan los jales provenientes del beneficio de antimonio, óxidos de Cobre, pirita de Cobre, Plomo y Zinc.

La NOM-052-SEMARNAT-2005 establece una serie de límites máximos permisibles para algunos EPT mediante la técnica de extracción PECT (NOM-053-SEMARNAT-1993), este, se conoce como el lixiviado a partir del cual se determinan los constituyentes tóxicos del residuo y su concentración con la finalidad de identificar su peligrosidad y/o toxicidad al ambiente.

Adicionalmente la NOM-157-SEMARNAT-2009, que establece los elementos y procedimientos para instrumentar planes de manejo de residuos mineros menciona aquellas pruebas que deben realizarse para determinar la peligrosidad de un residuo (Tabla 3). Las concentraciones totales de los elementos que establece esta norma (Tabla 4) pueden ser determinados por los procedimientos descritos por el Apéndice Normativo B: Métodos analíticos de la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004, que pueden ser espectrofotometría de absorción atómica y espectrofotometría de emisión con plasma acoplado inductivamente. Cuando la concentración total de los elementos normados sea mayor que el correspondiente límite máximo permisible base seca se deben realizar pruebas de movilidad, del mismo modo se menciona el criterio por pH (NMX-AA-025-1984 Protección al ambiente-Contaminación del suelo residuos sólidos-Determinación de pH-método potenciométrico) indicando que cuando el pH sea menor o igual que 4 o mayor que 10 se debe considerar al residuo como peligroso.

Tabla 4. Límites máximos permisibles (LMP) para los constituyentes tóxicos en el extracto PECT y base seca.

Contaminante	LMP (mg/L)	LMP (mg/kg)
	PECT	Base seca
Antimonio (Sb)	0.53	10.6
Arsénico (As)	5.00	100
Bario (Ba)	100.0	2000
Berilio (Be)	1.22	24.4
Cadmio (Cd)	1.00	20
Cromo (Cr)	5.00	100
Mercurio (Hg)	0.20	4
Plata (Au)	5.00	100
Plomo (Pb)	5.00	100

Selenio (Se)	1.00	20
Fuente: NOM-157-SEMARNAT-2009		

Por otro lado, la NOM-147-SEMARNAT-2004, que establece criterios para determinar las concentraciones de remediación de suelos contaminados por Arsénico, Bario, Cadmio, Cromo hexavalente, Mercurio, Níquel, Plata, Plomo, Selenio, Talio y/o Vanadio, define las concentraciones máximas que deben tener los suelos que han sido contaminados (menor o igual a 1 000 m²) y que deben someterse a procesos de remediación de acuerdo con el tipo de uso de suelo (Tabla 5).

Tabla 5. Concentraciones de referencia totales (CR_T) por tipo de uso de suelo.

Contaminante	Uso agrícola/residencial/comercial (mg/kg)	Uso industrial (mg/kg)
Arsénico	22	260
Bario	5 400	67 000
Berilio	150	1 900
Cadmio	37	450
Cromo Hexavalente	280	510
Mercurio	23	310
Níquel	1600	20 000
Plata	390	5 100
Plomo	400	800
Selenio	390	5 100
Talio	5.2	67
Vanadio	78	1 000
Fuente: NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004		

1.2 Elementos Potencialmente Tóxicos

Los metales pesados son considerados relevantes como marcadores de contaminación. Se consideran elementos pesados aquellos que presentan densidades superiores a 5 g/cm³, o aquellos que presentan número atómico igual o superior al del Titanio

(Ruvalcaba Sil, 2013; DalCarso *et al.*, 2013). Sin embargo, la gravedad específica no es significativa en cuanto a la reactividad y toxicidad de un metal. Para que el ion de un elemento tenga un efecto dañino sobre un organismo primero debe entrar a la célula.

De acuerdo con su rol en los sistemas biológicos, los metales pesados son clasificados como esenciales y no esenciales. Los esenciales son aquellos que son utilizados por los organismos en cantidades traza para funciones fisiológicos y bioquímicas vitales, los principales metales esenciales son Fe, Mn, Cu, Zn y Ni; por otro lado, los metales pesados no esenciales son aquellos que no son requeridos por los organismos para ninguna función biológica, ejemplo de ellos son Cd, Pb, As y Hg (Ali *et al.*, 2013). Algunos otros no metales y metaloides, como Se y As, son potencialmente tóxicos en función de su concentración (Cheng & Mulla, 1999).

Por lo anterior, se denomina Elementos Potencialmente Tóxicos (EPT) a todos aquellos de importancia ambiental y/o toxicológica, este término puede ser utilizado particularmente para las plantas, refiriéndose a los elementos esenciales y no esenciales que pueden generar efectos tóxicos en ellas o alterar su crecimiento, por otro lado, se sabe que pueden producir intoxicaciones y malformaciones en animales (Volke Sepúlveda *et al.*, 2005).

Aunque se sabe que los suelos principalmente se componen de Al, Fe, Mn, Si con trazas de Cu, Cr, Cd, Zn, As, Se, Ni, Ag, Pb y Hg, las menas que se extraen de las minas del distrito de Zimapán son particularmente ricas en Fe, As y Pb (Tabla 6).

Tabla 6. Menas abundantes en el distrito de Zimapán.

Principal metal o metaloide	Mena	Fórmula	Metales o metaloides asociados
Ag	Pirargirita	Ag_3SbS_3	Au, Cu, Sb, Zn Pb
As	Arsenopirita	FeAsS	Au, Ag, Sb, Hg, U, Br, Mo, Sn, Cu
Cd	Esfalerita	ZnS	Zn, Pb, Cu
Cu	Bornita	Cu_5FeS_4	Fe, Zn, Pb, Cd, As, Se, Sb, Ni
	Calcopirita	CuFeS_2	Pt, Mo, Au, Te
Fe	Pirita	FeS_2	Co, Ni, Se
	Pirrotita	Fe_{1-x}S	

Pb	Boulangerita	$Pb_5Sb_4S_{11}$	Ag, Fe, Zn, V, Cu, Cd, Sb, Tl, Se, Te
	Galena	PbS	
	Jamesonita	$Pb_4FeSb_6S_{14}$	
	Vanadinita	$Pb_5(VO_4)_3Cl$	
Sb	Antimonita o estibinita	Sb_2S_3	Ag, Au, Hg, As
V	Vanadinita	$Pb_5(VO_4)_3Cl$	U, Pb
Zn	Esfalerita	ZnS	Cd, Cu, Pb, As, Se, Sb, Ag
Fuente: (Moreno, Barbanson, & Coreño, 2009)			

A continuación, se presenta información general sobre algunos EPT de importancia ambiental (As, Cd, Pb, Zn, Ni, Mn y Fe):

1.2.1 Arsénico

El Arsénico (As) es un elemento con propiedades de metaloide, ubicado en el grupo VA de la tabla periódica, se encuentra presente en minerales como la arsenopirita (Tabla 3) y como trióxido de Arsénico (As_2O_3), y puede obtenerse del procesamiento de minerales que contienen Cu, Pb, Zn, Ag y Au (López Sánchez, 2013). El lixiviado de minas de oro abandonadas, ha llegado a ser una fuente significativa de contaminación por Arsénico en sistemas hidrosféricos. En adición, la similitud entre las propiedades del Arsénico y del fósforo, permite la coexistencia de estos dos elementos, por lo que con frecuencia los compuestos de Arsénico contaminan los depósitos de fósforo y los fosfatos comerciales (Baird, 2001; Drahota *et al.*, 2014; Mahmud *et al.*, 2008).

El As tiene una química bastante compleja y puede encontrarse como As^{-3} , As^{+3} y As^{+5} . En ambientes aerobios, el ion As^{+5} es dominante, usualmente como arseniato (AsO_4^{-3}), en varios estados de protonación: H_3AsO_4 , $H_2AsO_4^{-1}$, $HAsO_4^{-2}$, AsO_4^{-3} , también puede co-precipitar para absorberse en oxihidróxidos de Hierro bajo condiciones moderadamente reductoras o ácidas. Los co-precipitados son inmóviles en estas condiciones, pero la movilidad del As aumenta con el pH. En condiciones reductoras, el As^{+3} es la forma dominante, en forma de arsenito (AsO_3^{+3}) y sus formas protonadas (H_3AsO_3 , $H_2AsO_3^{-1}$, $HAsO_3^{-2}$). La metilación biológica del As crea derivados muy volátiles de arsina, como la dimetil-arsina ($HAs(CH_3)_2$) y la trimetil arsina $As(CH_3)_3$. La absorción y coprecipitación de

óxidos de Hierro son los mecanismos más importantes de remoción, bajo condiciones ambientales comunes (Volke Sepúlveda *et al.*, 2005; Moreno Tovar *et al.*, 2012).

1.2.2 Cadmio

El Cadmio (Cd) se encuentra en el mismo subgrupo de la tabla periódica que el Zinc y el mercurio, pero es más similar al primero. Igual que el Zinc, el único ion de cambio es la especie +2. Y se encuentra de forma natural como CdS o CdCO₃. Normalmente se encuentra como impureza en minerales de Zn, Cu y Pb (Baird, 2001; López Sánchez, 2013).

Su principal uso es como cubierta protectora sobre otros metales, para la manufactura de baterías de Níquel-Cadmio y como estabilizador del PVC (Policloruro de Vinilo). Además de la minería, puede entrar al ambiente por la metalurgia, combustión de carbón y petróleo y por mala disposición de residuos. Este elemento tiende a depositarse y adherirse a la materia orgánica del suelo; sin embargo, parte de él se disuelve en agua, por lo que puede llegar a cuerpos de agua (Volke Sepúlveda *et al.*, 2005).

Las formas más comunes del Cd, pertenecen al Cd⁺², complejos de Cadmio-cianuro y Cd(OH)₂. Las formas dominantes a pH alto son hidróxidos y carbonatos, mientras que a pH bajo (<8) predominan el Cd⁺² y especies acuosas de sulfato. Bajo condiciones reductoras, en presencia de Azufre, se forma el sulfato de Cadmio (CdS) que, por su estabilidad, controla su movilidad. El Cd también precipita en presencia de fosfato, arseniato, cromato y otros aniones (ATSDR, 2016).

1.2.3 Hierro

El Hierro (Fe) es uno de los elementos de mayor abundancia en la corteza terrestre, junto al Oxígeno, Silicio y Aluminio. En los suelos el Hierro es bastante abundante, aunque su cantidad varía mucho en función del pH, de la textura del suelo y del régimen hídrico al que esté sometido este suelo. El Hierro se halla en diferentes minerales en forma soluble o insoluble, como óxidos, sulfuros, carbonatos, y silicatos ferro-magnésicos, que se descomponen mediante oxidación e hidrólisis, dando lugar a la liberación de cierta cantidad

de Fe que precipita en forma de óxidos e hidróxidos (Cheng & Mulla , 1999; Seoáñez Calvo, 1999).

El Hierro disuelto se encuentra principalmente en la forma Fe^{+2} , que permanece estable en escasez de oxígeno y en condiciones de acidez. En presencia de oxígeno, este ion reacciona formando óxido férrico (Fe_2O_3), y en presencia de agua reacciona dando lugar a $\text{Fe}(\text{OH})_3$, el cual se precipita (Acevedo Sandoval *et al.*, 2004; Seoáñez Calvo, 1999).

Cuando el suelo presenta un pH más elevado (básico), el Hierro es absorbido con más fuerza, reaccionando con minerales arcillosos de Fe, Mg y Al, formando compuestos estables insolubles. Por lo general, el incremento del pH del suelo disminuye la solubilidad de las especies solubles inorgánicas, que son Fe^{+2} , Fe^{+3} , $\text{Fe}(\text{OH})_2^+$, $\text{Fe}(\text{OH})^{+2}$, $\text{Fe}(\text{OH})_3$, $\text{Fe}(\text{OH})_4^-$, correspondiendo la mayor parte de los iones en solución a las especies hidratadas de Fe (III) (Acevedo Sandoval *et al.*, 2004; Seoáñez Calvo, 1999).

1.2.4 Manganeso

El Manganeso (Mn) es un microelemento bastante abundante en la corteza terrestres. Como parte de los minerales, se encuentra sobre todo en forma de óxidos y también como silicatos y carbonatos. De forma natural el Manganeso aparece con tres valencias: Mn^{+2} , Mn^{+3} y Mn^{+4} , lo que permite formar compuestos de distinta estabilidad, siendo más estables en condiciones reductoras, los compuestos con la forma Mn^{+2} y en condiciones oxidantes los que presentan Mn^{+4} . La forma en que se presenta el catión de Manganeso depende directamente de las condiciones de óxido reducción del suelo (Cheng & Mulla , 1999; Seoáñez Calvo, 1999).

En general, puede ser encontrado de las siguientes maneras:

- A pH bajo, Mn^{+2} absorbido por los minerales arcillosos
- En forma de óxidos insolubles, sobre todo de Mn^{+3} y Mn^{+4} .
- En condiciones reductoras, Mn^{+2} adsorbido como ion intercambiable, gracias al incremento que las condiciones reductoras proporcionan en la solubilidad.
- Absorbido por la materia orgánica, generalmente como Mn^{+2} retenido de esta forma en los suelos ácidos.

- Disuelto en la solución de suelo en forma de Mn^{+2} , donde puede ser retenido por agentes quelantes de diferente estabilidad.

1.2.5 Níquel

El Níquel (Ni) es un elemento natural muy abundante. El Ni puro es un metal duro, blanco-plateado que puede combinarse con otros metales, tales como el Hierro, cobre, cromo y Zinc para formar aleaciones. Estas aleaciones se usan para fabricar monedas, joyas, válvulas, y principalmente acero inoxidable. Muchos compuestos de Níquel se disuelven fácilmente en agua y son color verde. Este elemento se encuentra en todos los suelos y de forma natural es liberado por emisiones volcánicas. Cuando el Ni es liberado al ambiente termina en suelos y sedimentos donde se adhiere fuertemente a partículas que contienen Hierro o Manganeseo (ATSDR, 2016).

El contenido total de Ni en el suelo es altamente dependiente de su contenido en el material parental (roca madre) del mismo. De cualquier modo, la concentración de Ni en su superficie, puede reflejar el impacto tanto del proceso de formación del suelo como de la contaminación (Volke Sepúlveda *et al.*, 2005).

1.2.6 Plomo

El Plomo (Pb) se ubica en el grupo IVA de la tabla periódica, es un metal gris azulado que se presenta de forma natural y en pequeñas cantidades en la corteza terrestre. Este elemento, es generalmente obtenido de la galena (PbS), la anglesita (PbSO₄) y la cerusita (PbCO₃) (López Sánchez, 2013).

El uso más amplio del Pb elemental es para la fabricación de acumuladores, tetraetilo de Plomo, pinturas, cerámicas, forros para cables, soldadura, elementos de construcción y municiones (ATSDR, 2016). La mayor parte del Pb liberado en el ambiente es retenida por el suelo; los principales procesos que dictan su destino incluyen la adsorción, el intercambio iónico, la precipitación y el acomplejamiento con la materia orgánica. Como contaminante ambiental, normalmente se encuentra en forma elemental, como óxidos e hidróxidos y como

complejos oxianiónicos metálicos. El Pb tiene valencias +2 y +4, de las cuáles el Pb (II) es la forma más común y reactiva. Cuando forma complejos con ligandos orgánicos o inorgánicos se forman compuestos poco solubles; el carbonato de Plomo, y el PbS son las formas sólidas más estables del Plomo (Evanko & Dzombak, 1997; Volke Sepúlveda *et al.*, 2005).

En ambientes muy oxidantes, el Plomo puede formar el ion +4. Así pues, el óxido de Plomo (PbO₂) que escrito en forma iónica es Pb⁺⁴(O⁻²)₂, existe igual que los óxidos mixtos Pb₂O₃ y Pb₃O₄, que no son más que combinaciones de PbO y PbO₂ (Baird, 2001; Orozco Barrenetxea *et al.*, 2008).

1.2.7 Zinc

Se clasifica como un metal de transición (grupo B) en la tabla periódica. El Zinc (Zn) es uno de los elementos más comunes en la corteza terrestre, con una concentración promedio de 40 ppm. Es un elemento que no se encuentra sin duda en forma elemental, por lo que generalmente se extrae de la esfalerita ((ZnFe)S), forma comúnmente asociada a la galena (PbS). El Zn tiene una valencia +2 y forma complejos con aniones, aminoácidos y ácidos orgánicos. Es un elemento traza esencial con actividad importante en enzimas (López Sánchez, 2013).

El principal uso industrial del Zn es como cubierta anticorrosiva para Hierro o acero. También se utiliza en compartimentos de baterías secas y como metal de aleación en la fabricación de latón y bronce. El óxido de Zinc es el compuesto más utilizado en la industria, se puede encontrar en pinturas, plásticos, cosméticos, fármacos, textiles y electrónica (ATSDR, 2016). Una vez liberado al ambiente generalmente permanece en el suelo, pues forma compuesto insolubles. Sin embargo, es uno de los metales pesados con mayor carácter móvil debido a que se encuentra en forma soluble a pH neutro o ácido. A pH alcalino puede formar carbonatos e hidróxidos. Bajo condiciones reductoras, en sistemas muy contaminados cuando se encuentra presente en concentraciones muy elevadas, puede precipitar fácilmente como Zn(OH)₂, ZnCO₃, ZnS o Zn(CN)₂ y co-precipitar con óxidos de Fe o Mn (Evanko & Dzombak, 1997).

1.3 Movilidad de los elementos en los suelos

Los metales en suelos no contaminados generalmente se encuentran en especies estables, como silicatos y alúminas, en las cuales los elementos pueden considerarse inmóviles, este estado se caracteriza por una resistencia a la solubilización y cambio de propiedades. Por otro lado, en los suelos contaminados los EPT se encuentran en gran medida en formas más lábiles, también llamadas móviles, esto se relaciona con sus efectos tóxicos (Armienta *et al.*, 2016; Simeonov & Sargsyan, 2008).

La movilidad o lixiviado de metales y metaloides en el suelo depende de sus formas químicas y de los tipos de enlaces que forma con las partículas de suelo (Gupta *et al.*, 2013). La movilidad también se ve influenciada por propiedades fisicoquímicas del suelo, de las cuales destacan el pH, conductividad eléctrica, potencial redox, textura del suelo, capacidad de intercambio catiónico (CIC) y el potencial de la especie para formar ácidos o bases (Armienta *et al.*, 2016; Prieto Méndez *et al.*, 2009).

La acumulación máxima de estos EPT generalmente se concentra en la superficie en cuyo caso existe la posibilidad de eliminar los problemas mayores usando especies con un sistema radicular de mayor profundidad. La concentración de las fases biodisponibles en el suelo puede llegar a permanecer sin alteraciones durante años, siendo el Cd el elemento más problemático cuando se aplican en forma continua aguas residuales y lodos al suelo (Alarcón & Ferrera Cerrato, 2016; Seoáñez Calvo, 1999).

Los mecanismos de retención de EPT en el suelo suelen consistir en reacciones simples o complejas, siendo las principales: precipitación, acumulación en la superficie, oclusión en otros precipitados, complejación, unión a vertidos residuales, e incorporación a los biosistemas. Las cantidades de EPT disponibles están reguladas, en parte, por el intercambio iónico. La materia orgánica podría ser considerada el factor más importante en la sorción y formación de complejos metálicos, basada en la capacidad de quelación de los componentes orgánicos. Entre los componentes orgánicos con mayor capacidad para ceder electrones en la formación de complejos metálicos, se encuentran los fosfatos, carboxilos,

alcóxidos, y enolatos siendo los complejos más estables aquellos que se obtienen de los metales de transición (Eweis *et al.*, 1999; Seoáñez Calvo, 1999).

En las capacidades depuradoras del suelo destacan dos tipos de factores limitantes: los ecológicos y los sanitarios. Los factores ecológicos están representados principalmente por las condiciones climáticas, destacando la temperatura y humedad, pues están fuertemente vinculadas a la supervivencia de los microorganismos y vegetación, los cuales son fundamentales en la atenuación natural. Por otra parte, los factores sanitarios representan la ventaja que ofrece la percolación de sustancias acuosas a través de suelos para retener sustancias insolubles y clarificar efluentes, esto representa una desventaja cuando la carga microbiana en biosólidos es muy alta, pues el suelo puede aumentar su contenido en sales sin disminuir la Demanda Química de Oxígeno (DQO) (Eweis *et al.*, 1999; Hall *et al.*, 1995; López Sánchez, 2013).

1.4 Métodos de Especiación de EPT en Suelos

De los estudios que se realizan para determinar el efecto de los contaminantes, el análisis de elementos específicos proporciona información sobre la fuente de los contaminantes, sus rutas de dispersión, acumulación, y movilidad durante tratamientos de biorremediación. Por ello, el uso de instrumentos adecuados y la selección de metodologías específicas con la mayor precisión posible para determinar la concentración de los elementos objetivo permiten la correcta evaluación de la eficacia de las medidas de control y limpieza de sitios contaminados (Ruvalcaba Sil, 2013).

Para la realización de un análisis, es imprescindible definir inicialmente los parámetros que permitirán identificar las técnicas y metodologías adecuadas, entre estos se encuentran los elementos objetivo, la concentración aproximada que se puede encontrar en las muestras, la naturaleza de la muestra, el número de muestras y el presupuesto (Skoog *et al.*, 2008).

De acuerdo con la IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) el término especiación define la distribución de un elemento entre especies químicas definidas en un sistema, estas especies químicas indican formas específicas de un elemento y son definidas por la composición isotópica, estado de oxidación y estructura molecular. De este modo, el término fraccionamiento define el proceso de clasificación de un analito o grupo de analitos de una muestra de acuerdo con sus propiedades físicas o químicas (Adamo *et al.*, 2018).

La especiación de EPT en suelos puede ser lograda usando métodos analíticos directos e indirectos. Los métodos directos incluyen Difracción de Rayos X (DRX), Microscopía Electrónica de Barrido (SEM, por sus siglas en inglés) y Transmisión (TEM, por sus siglas en inglés) con Dispersión de Energía de Rayos X (EDS, por sus siglas en inglés) y Espectroscopía por Dispersión de Longitud de Onda (WDS, por sus siglas en inglés), Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR, por sus siglas en inglés) y Espectroscopía de Rayos Gamma (Mössbauer), Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y Resonancia Paramagnética de Electrones (RPE), Espectroscopía de Absorción de Rayos X (EXAFS, XANES, por sus siglas en inglés) (Adamo *et al.*, 2018; Ruvalcaba Sil, 2013).

Con estas técnicas se pueden elucidar la mayor cantidad de EPT unidos a minerales arcillosos, oxihidróxidos de Fe y Mn y sustancias húmicas. Sin embargo, estas técnicas directas son usualmente cualitativas o semicuantitativas y frecuentemente no son lo suficientemente sensibles para detectar cantidades traza (Adamo *et al.*, 2018; Skoog *et al.*, 2008).

Los métodos indirectos de especiación de EPT, que incluyen a las técnicas de extracción química secuencial, dependen de las especies extraídas, y las fases son definidas funcionalmente o en base a los reactivos extractantes utilizados (Adamo *et al.*, 2018).

1.4.1 Técnicas para Determinar EPT en solución de suelo

La solución de suelo provee información para la predicción de la biodisponibilidad y toxicidad de EPT en plantas y actividades biológicas en suelos. Así, una buena estimación de la biodisponibilidad puede ser lograda midiendo la concentración de elementos en el agua

porosa del suelo (Ali *et al.*, 2013). Un gran número de técnicas pueden ser usadas para la caracterización de la fase sólido-líquido y la cuantificación de elementos:

Técnicas electro analíticas (electrodo de ion selectivo, polarografía), resinas de intercambio catiónico/aniónico y absorbentes químicos (óxidos de Al y Mn) para fraccionar formar iónicas y no iónicas, ultrafiltración, técnicas de diálisis y permeación de gel para fraccionamiento a nivel molecular, técnicas espectroscópicas (Resonancia Magnética Nuclear, Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier) para medir el estado de oxidación de elementos, Técnicas de Rayos X para medir distribución y técnicas cromatográficas (HPLC) para medir distribución en fases (Adamo *et al.*, 2018; Ruvalcaba Sil, 2013). Los constantes cambios en la composición química de la solución de suelo debido a las interacción son una desventaja en la predicción de la biodisponibilidad de EPT.

1.4.2 Métodos sencillos para determinar la fracción biodisponible de EPT en suelos

El contenido biodisponible de EPT en suelos puede ser estimado a partir de extracciones químicas o medido directamente analizando tejidos vegetales. Pueden usarse diversos reactivos para extraer del suelo la fracción del contenido total de un elemento que está relacionada a la porción biodisponible para una planta. Estos reactivos consisten en soluciones de ácidos minerales (HCl, HCl + HNO₃), orgánicos (CH₃COOH), sales neutras (CaCl₂, MgCl₂, NaNO₃) o sales de amonio (NH₄Cl, NH₄NO₃), sales buffer (CH₃COONH₄), agentes quelantes (EDTA, DTPA, ácido cítrico, citrato de amonio) (Adamo *et al.*, 2018; Gupta *et al.*, 2013; Meers *et al.*, 2007).

A pesar del gran número de estudios en biodisponibilidad, la mayoría de estos métodos de extracción química están diseñados para medir a los EPT asociados a suelos de vocación agrícola. Por ello, los reactivos se limitan al análisis de un número específico de elementos o se restringen a matrices de análisis específicas para ciertos cultivos. Tomando en cuenta estas dificultades, algunos autores proponen el uso de soluciones de sales de cloruro de calcio, nitrato de sodio o nitrato de sodio como agentes extractantes para predecir el riesgo asociado a suelos contaminados por EPT, o la cantidad residual luego de procesos de remediación (Ali *et al.*, 2013; Cheng & Mulla, 1999).

En cualquier caso, no es fácil obtener buenas estimaciones de la biodisponibilidad de EPT, puesto que las extracciones sencillas solamente predicen esta porción de elementos asumiendo un equilibrio en el sistema. En cambio, las reacciones en los suelos son consecuencia constante de los procesos de interacción entre los componentes del sistema (Alarcón & Ferrera Cerrato, 2016; Margeson & Schinner, 2005).

1.4.3 Métodos para Determinar Biodisponibilidad de EPT en Humanos

Los suelos contaminados por EPT representan un riesgo a la salud humana con base al potencial de estos para dejar el suelo y entrar al organismo. Para evaluar este riesgo se deben tomar en cuenta varias vías de transferencia de los EPT del suelo a humanos. La ruta más importante de consumo de metales es por la cadena alimenticia, en la cual se involucran plantas y animales. La ingestión directa de suelo también es una ruta peligrosa de exposición para humanos, particularmente en niños. Además, la inhalación de partículas con EPT presentes en el ambiente se asocia con efectos diversos a la salud humana (Adamo *et al.*, 2018; Volke Sepúlveda *et al.*, 2005).

La fracción bioaccesible se define como la fracción del contaminante que es movilizada del suelo a los jugos gástricos y por ello, representa la cantidad máxima del contaminante disponible para absorción intestinal. Esta porción de EPT depende del tipo de suelo y del contaminante, los EPT se encuentran agregados a los suelos como una mezcla de compuestos químicos que varían del tamaño de partícula y morfología. Las fases minerales que se forman bajo condiciones ácidas tienen a ser más estables en las condiciones ácidas del estómago, y por ello, menos bioaccesibles. Por otro lado, las fases minerales que se forman bajo condiciones alcalinas serán menos estables bajo condiciones ácidas, es decir, más bioaccesibles (Adamo *et al.*, 2018; Evans & Furlong, 2011).

La bioaccesibilidad variable de EPT en las diferentes fracciones minerales involucra el uso de la determinación de la concentración total de EPT para estimar la exposición a concentraciones inmóviles de estos contaminantes. El uso de modelos *in vivo* es el método más confiable para la evaluación del riesgo por exposición a EPT, se han utilizado ratas, conejos, perros, cerdos y primates, entre otros; los estudios que se realizan incluyen

determinación de contaminantes inorgánicos en sangre, órganos, orina y heces fecales e inducción enzimática (Adamo *et al.*, 2018; Evans & Furlong, 2011; Manahan, 2013)

Debido al conflicto ético que representa el uso de modelo *in vivo* se ha desarrollado el uso de modelos *in vitro* basados en la fisiología del tracto gastrointestinal como una herramienta reproducible y barata para investigar la bioaccesibilidad de EPT presentes en suelos. En estos modelos los suelos contaminados con EPT son tratados con soluciones ácidas (gástricas) y/o neutras (intestinales) conteniendo enzimas y ácidos orgánicos por periodos de tiempo variables con el objetivo de simular el tiempo de residencia en el estómago. Los modelos pueden simular el tránsito a través del tracto gastrointestinal en sistemas estáticos (SBET, DIN, RIV, SHIME, por sus siglas en inglés) y dinámicos (SHIME, TIM, por sus siglas en inglés) y pueden ser extendidos a otros compartimentos (cavidad oral, estómago, intestinos y colon) (Adamo *et al.*, 2018; Ng *et al.*, 2015).

Los modelos *in vitro* se han vuelto importantes en la evaluación del riesgo asociado a suelos contaminados, especialmente para determinar la urgencia de tratamientos de remediación y para desarrollar y evaluar tecnologías de remediación que podrían tener un impacto en la biodisponibilidad de EPT (Castigo Rodríguez *et al.*, 2005; Ng *et al.*, 2015).

1.4.4 Extracción Química Secuencial

Las técnicas de extracción química secuencial están basadas en el uso de una serie de sustancias seleccionadas por su habilidad para reaccionar con los diferentes componentes de una matriz y liberar a los EPT asociados a estos. La selectividad de los reactivos con respecto a las formas minerales se ve mejorada debido a su aplicación secuencial (Adamo *et al.*, 2018; Okoro *et al.*, 2012; Zimmerman & Weindorf, 2010).

La determinación total de los elementos contaminantes manifiesta el grado de contaminación de un sitio, sin embargo, brinda poca información con respecto a procesos biológicos, cómo afecta a las plantas o microorganismos, y de los procesos de generación de drenaje ácido. Por esta razón en las últimas décadas se ha incrementado el interés por realizar análisis más detallados acerca de la concentración de los elementos en las diferentes estructuras sólidas presentes en el suelo (Simeonov & Sargsyan, 2008).

La extracción química secuencial, también es una alternativa para el análisis de elementos traza en suelos naturales, contaminados o jales mineros, pues recrea condiciones ambientales que pueden afectar la composición de los minerales, por lo tanto, tiene variantes en las etapas o fracciones de extracción, así como en los extractantes utilizados, esto debido al grado de especificidad que se puede obtener, por ejemplo, información más detallada sobre los minerales, sus características, solubilidad, disponibilidad, o estabilidad, y a su vez la movilidad de un elemento y las condiciones que podrían afectar su reactividad y toxicidad en el ambiente (Adamo *et al.*, 2018; Volke Sepúlveda *et al.*, 2005).

Muchos de los esquemas de extracción secuencial están basados en el procedimiento de cinco pasos de Tessier *et al.*, (1979), el cual define a las especies secuencialmente extraídas como fracción intercambiable, unida a carbonatos, unida a óxidos de Fe y Mn, unida a materia orgánica y residual. Las principales modificaciones a este esquema consisten en el uso de reactivos adicionales para diferenciar las especies unidas a óxidos de Fe y Mn en tres distintas: unidas a óxidos fácilmente reducibles, unidas a óxidos amorfos y unidas a óxidos cristalinos (Adamo *et al.*, 2018; Okoro *et al.*, 2012; Zimmerman & Weindorf, 2010).

Los sistemas de extracción y fraccionamientos propuestos han originado la definición de otras fracciones, algunas de las cuales se establecen con base a la solubilidad bajo un determinado extractante, a su biodisponibilidad para las plantas o a su presencia en un determinado tamaño de partículas de suelo (Martínez & Rivero, 2005). Los reactivos extractantes generalmente son aplicados de acuerdo con el siguiente orden: sales buffer a un determinado pH, ácidos débiles, agentes reductores, agentes oxidantes y ácidos fuertes. Algunas fracciones que se han encontrado en metodologías propuestas por los autores son:

I. Fracción soluble.

En esta fracción se pueden encontrar metales fácilmente solubles en agua o en condiciones de ligera acidez (Favas *et al.*, 2011).

II. Fracción intercambiable.

Esta fracción es removida mediante el cambio de la composición iónica del agua, permitiendo a los metales absorbidos a las superficies expuestas del sedimento ser removidas fácilmente. Comúnmente se utiliza una sal para

remover esta fracción (Zimmerman & Weindorf, 2010). Los metales en la fracción intercambiable representan una pequeña fracción del contenido total de metales en suelo, lodos y sedimentos, y pueden ser reemplazados por sales neutrales. Esta fracción representa menos del 2% del contenido total de metales, algunas excepciones son K, Ca, y Mn. Algunos de los reactivos comunes usados en esta fase son $MgCl_2$ y acetato de Sodio a pH 5.4 con ácido acético (Okoro *et al.*, 2012).

III. Fracción unida a carbonatos.

Esta fracción representa metales pobremente unidos a Fe, Al y Mn, oxihidróxidos e hidrosulfatos de Hierro pobremente cristalizados. Además, es fácilmente reducible y susceptible a cambio en pH, por eso se usa una solución con pH ácido como extractora (Favas *et al.*, 2011; Zimmerman & Weindorf, 2010). El reactivo más popular para la extracción de elementos unidos a carbonatos en suelos y sedimentos es acetato de Sodio 1 M ajustado a pH 5 con ácido acético. El tiempo de estancia para la completa solubilización de carbonatos depende del contenido de estos en la muestra y el tamaño de partículas (Okoro *et al.*, 2012).

IV. Fracción unida a oxihidroxidos de Fe y Mn

Esta fracción es moderablemente reducible, representa a metales moderadamente unidos a oxihidroxidos de Fe, Al y Mn e hidroxulfatos cristalizados de Hierro. Esta fracción, representa porciones de metales que pueden ser liberadas si las condiciones ambientales se vuelven anóxicas (Favas *et al.*, 2011).

V. Fracción unida a óxidos de Fe y Mn.

Esta fracción es particularmente susceptible a condiciones reductoras (anóxicas). Los óxidos secundarios se encuentran presentes como revestimiento en superficies minerales o como discretas y finas partículas. Esto puede ocurrir como una combinación de la precipitación, adsorción, formación de complejos en la superficie e intercambio iónico. En esta fracción se suele usar hidroxilamina (0.5-1 M), aunque también se ha usado ditionato

de Sodio con citrato de Sodio, bicarbonato de Sodio y ácido oxálico (Favas *et al.*, 2011; Orozco Barrenetxea *et al.*, 2008).

VI. Fracción unida a Materia Orgánica

Para remover los metales unidos a la fase orgánica, se debe oxidar la materia orgánica, esto incluye organismos vivos, detritos, revestimientos en partículas minerales, etc. En la fase orgánica, los compuestos metálicos unidos pueden permanecer en el suelo por periodos largos pero pueden ser inmovilizados por procesos de descomposición. Bajo condiciones oxidantes, la degradación de la materia orgánica puede llevar a la liberación de los metales unidos a estos componentes y a sulfuros secundarios. Es importante considerar que la fracción liberada durante la fase de oxidación no es considerada como biodisponible debido a que se encuentra asociada a sustancias húmicas de alto peso molecular, que naturalmente liberan a los metales muy lentamente. El reactivo más común para la extracción de metales en la fase orgánica es peróxido de hidrógeno con posterior reabsorción o precipitación de los elementos liberados con acetado de amonio (Okoro *et al.*, 2012; Tessier *et al.*, 1979; Zimmerman & Weindorf, 2010).

VII. Fracción unida a sulfuros primarios

Al igual que la fracción unida a materia orgánica, esta fase puede ser liberada bajo condiciones oxidantes. Los extractos obtenidos en esta fase contienen metales unidos a sulfuros primarios. Para obtener esta fracción se suele usar peróxido de Hidrogeno, clorato de Potasio con ácido nítrico y ácido clorhídrico, estos reactivos logran reducir sulfuros con mayor selectividad, sin embargo también se atacan silicatos (Okoro *et al.*, 2012; Favas *et al.*, 2011).

VIII. Fracción residual

Esta fase consiste en metales fuertemente asociados a estructuras cristalinas de minerales primarios, secundarios y fracciones resistentes que no serían liberadas bajo condiciones normales. Esta fase sirve como herramienta en la evaluación del riesgo potencial a largo plazo de los elementos tóxicos en la biósfera. La digestión se realiza con ácidos fuertes, como nítrico, clorhídrico

o una mezcla de ellos, como agua regia. La fase residual proporciona un estimado de la cantidad máxima de elementos que son potencialmente movilizables con cambios ambientales (Okoro *et al.*, 2012).

Existe una falta de uniformidad entre los métodos de extracción química secuencial, lo cual hace extremadamente difícil la comparación de resultados obtenidos por diferentes laboratorios. Además, no se pueden aplicar sistemas de control de calidad de materiales de referencia. Por ello, la *Bureau Community of Reference* propuso un método sencillo de cuatro pasos que define a sus fracciones como: paso 1, soluble, intercambiable y unida a carbonatos; paso 2, metales unidos a óxidos de Mn y Fe fácilmente reducibles; paso 3, metales unidos a materia orgánica y sulfuros; paso 4, metales unidos a silicatos (Rauret *et al.*, 1999; (Pérez López *et al.*, 2008) Zimmerman & Weindorf, 2010).

Considerando que la información que proveen las técnicas de extracción química secuencial acerca de la distribución de EPT en suelos incrementa al aumentar el número de pasos (Urbina Trinidad, 2015) pero también reduce la confiabilidad de resultados, los métodos propuestos por Hall *et al.*, (1995) y BCR (Rauret *et al.*, 1999) representan un buen compromiso entre la cantidad y calidad de la información que puede ser obtenida por estas metodologías de especiación.

Problemas y Opciones de las Técnicas de Extracción Química Secuencial

Se han reconocido dos principales problemas experimentales en la aplicación de técnicas de extracción secuencial para fraccionamiento de EPT en suelos y sedimentos: la readsorción y redistribución de EPT entre fases durante la extracción y la naturaleza operacional de las extracciones. El primer problema significa que los EPT liberados por un extractante podrían asociarse con otros componentes sólidos no disueltos o superficies durante el tiempo de retención. Los procesos de readsorción y redistribución son principalmente influenciados por las características geoquímicas de la matriz y podrían llevar a serias malinterpretaciones de los datos de extracción, especialmente en las fracciones relacionadas a la movilidad (Adamo *et al.*, 2018; Anju & Banerjee, 2010).

El segundo problema se relaciona estrictamente con la especiación operacional, es decir, no se conoce a detalle la naturaleza del material que se extrae. Las fases geoquímicas

se encuentran frecuentemente nombradas en varios esquemas en base a la respuesta a los reactivos extractantes, pero esta distinción podría ser incorrecta debido a la naturaleza de los constituyentes orgánicos e inorgánicos a los cuales los metales se encuentran asociados. En la práctica, las fracciones operacionales podrían ser mucho menos específicas de lo deseado y estar formadas de asociaciones inesperadas entre los elementos y especies químicas (Adamo *et al.*, 2018; Anju & Banerjee, 2010; Zimmerman & Weindorf, 2010).

Por otro lado, los métodos directos para especiación en estado sólido pueden proveer información más precisa respecto a la naturaleza de los constituyentes del suelo involucrados en la retención de EPT, así las formas minerales pueden ser caracterizadas a precisión. Los métodos directos son más sofisticados que los métodos químicos y necesitan un alto nivel de especialización para ser incluidos en estudios de especiación de EPT. Por ello, ambos estudios pueden complementarse para ofrecer una estimación más realista de la movilidad de elementos en suelo (Adamo *et al.*, 2018; Evans & Furlong, 2011; Ng *et al.*, 2015).

1.4.5 Espectrometría de Emisión Óptica con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-OES)

Las espectroscopias de emisión óptica (ICP-OES, por sus siglas en inglés) son técnicas de análisis inorgánico utilizadas en análisis elemental e isotópico, poseen gran sensibilidad de entre las técnicas de análisis al determinar y cuantificar la mayoría de los elementos de la tabla periódica, espectros simples con pocas interferencias y además es posible realizar análisis multi-elemental y medir relaciones isotópicas en cantidades traza rápidamente; No obstante, requieren equipos costosos con montos de mantenimiento elevados (Alarcón & Ferrera Cerrato, 2016; Taylor, 2001).

Hay muchos diseños diferentes de ICP-OES disponibles actualmente, los cuales poseen varios componentes similares, como nebulizador, cámara de pulverización, antorcha de plasma, detector de emisión y espectrómetro, pero pueden diferir significativamente en el diseño de la interfase y sistemas de introducción de muestra (Thomas, 2004; Ruvalcaba Sil, 2013).

En un equipo ICP-OES todas las muestras son normalmente introducidas en forma líquida, previamente filtradas para evitar bloqueos de flujo en los capilares del equipo, e inyectadas al equipo por una bomba peristáltica (Alarcón & Ferrera Cerrato, 2016). El líquido es convertido en un aerosol por un aparato llamado nebulizador. Posteriormente, es transferido por una cámara de nebulización hacia la descarga de plasma (Skoog *et al.*, 2008). La radiación generada por los elementos es colectada enfocando lentes convexos y espejos, luego es transferida a un dispositivo de dispersión de longitudes de onda. Finalmente, la intensidad de la radiación es medida por medio de detectores e interpretada por espectrometría (Ruvalcaba Sil, 2013; Skoog *et al.*, 2008).

1.5 Métodos de Remediación

El objetivo de los métodos de remediación es limpiar los efectos residuales de la actividad humana en un sitio, esto impulsado por la cada vez más estricta legislación ambiental y la necesidad de activar sitios que han sido abandonados por su carácter de pasivos ambientales. Existen muchas tecnologías disponibles para la descontaminación de suelos afectados que se encuentran en constante investigación y desarrollo debido a las crecientes necesidades sociales e industriales por métodos de mayor eficacia, menor tiempo de operación y mejor relación costo-beneficio (Ali *et al.*, 2013; Evans & Furlong, 2011; Orozco Barrenetxea *et al.*, 2008).

El propósito de remediar un suelo es poder hacerlo apto para otro uso particular, disminuir el riesgo que representa para la salud humana, animales y plantas, asegurando que los niveles de concentración del contaminante se mantienen lo suficientemente bajos para no afectar su propósito de uso, o el desarrollo industrial, el Foro para la Remediación Sustentable del Reino Unido (SURF, 2009) reconoce seis principios claves para la remediación sustentable:

1. Protección de la salud humana y al ambiente.
2. Prácticas seguras de trabajo.
3. Decisiones basadas en evidencia consistente, clara y reproducible.
4. Mantenimiento de registros e informes transparentes.

5. Buena dirección y participación de los interesados
6. Ciencia del sonido.

La elección del método a utilizar y los estándares siempre serán gobernados por los factores específicos del sitio, incluyendo condiciones locales, riesgo potencial y tiempo. Los procesos disponibles para biorremediación de suelo se pueden dividir en cinco categorías (Evans & Furlong, 2011; Moreno Tovar *et al.*, 2012; Romero *et al.*, 2008; Rasul Chaudhry, 1994):

- **Biológicos**
Involucran la transformación o mineralización de contaminantes a formas menos tóxicas y más móviles. Son útiles con un amplio rango de compuestos orgánicos, para beneficiar la estructura del suelo y su fertilidad.
- **Químicos**
Los compuestos son destruidos, fijados o neutralizados por reacciones químicas, con estos métodos la transformación de sustancias es posible a formas más o menos biodisponibles dependiendo de lo requerido. Sin embargo, en algunos casos los reactivos usados pueden causar daño al suelo y son requeridos tratamientos secundarios.
- **Físicos**
Estos procesos involucran la remoción física de los contaminantes, frecuentemente por excavación para posterior tratamiento y disposición. A pesar de que la remoción física no representa contaminación secundaria, este método no es realmente remediación y los costos de remoción y disposición posterior requieren ser debidamente calculados.
- **Solidificación/Vitrificación**
La solidificación es la encapsulación de contaminantes dentro de sólido monolítico de alta integridad estructural, con o sin fijación estructural. La vitrificación usa altas temperaturas para fusionar contaminantes. La mayor ventaja de estos métodos es que aquellos contaminantes que no pueden ser desintegrados se vuelven indisponibles

para el medio. Una desventaja es que la estructura del suelo queda irrevocablemente dañada.

- Termales

Los contaminantes son destruidos por tratamientos con calor, usando incineración, gasificación, pirólisis o volatilización. Claramente, la principal ventaja de estos métodos es que los contaminantes son destruidos efectivamente. Sin embargo, la generación de energía supone altos costos y las técnicas no se ajustan a compuestos tóxicos por el peligro a la generación de nuevos contaminantes, además, la estructura del suelo es dañada.

Una forma común de clasificar a las técnicas es como *in situ* y *ex situ*. Esta clasificación reúne a las técnicas no por sus métodos, sino por el lugar donde el tratamiento es efectuado, es decir, en el sitio de contaminación (*in situ*), o fuera de este (*ex situ*). Ambos tipos de tratamiento suponen ventajas y desventajas, por ejemplo, en el caso de los tratamientos *ex situ* se pueden controlar las variables y disturbios, por otro lado, los tratamientos *in situ* son preferibles cuando los contaminantes se encuentran ampliamente distribuidos y a profundidades donde considerar la remoción para tratamientos *ex situ* supondría costos excesivos (Evans & Furlong, 2011; Castigo Rodríguez *et al.*, 2005).

1.5.1 Biorremediación

Asimilar que los procesos biológicos en la naturaleza se encuentran sobrecargados y no son capaces de asimilar la gran carga y diversidad de contaminantes que se liberan al ambiente diariamente condujo al desarrollo de tecnologías que atenúen y enmienden los daños causados, pues contar con aire y agua limpios y suelos fértiles es la clave de la supervivencia (Alarcón & Ferrera Cerrato, 2016). El concepto de biorremediación es relativamente nuevo y se refiere a restaurar, enmendar o desintoxicar ecosistemas de diversos contaminantes, entre los que se pueden mencionar compuestos orgánicos y metales pesados, mediante procesos biológicos (Castigo Rodríguez *et al.*, 2005; Rasul Chaudhry, 1994).

Los mecanismos biológicos bajo el proceso de atenuación natural son biosorción, desmetilación, metilación, complejación, quelación y oxidación. Los microorganismos que son capaces de utilizar una gran variedad de sustancias como fuente de carbono y degradar muchos compuestos orgánicos son comúnmente encontrados en suelos, por ello, cuando se mejoran y optimizan las condiciones para ellos, los bioprocesos que estos realizan por naturaleza se vuelven más rápidos y efectivos (Evans & Furlong, 2011; Mendez & Maier, 2008).

La biorremediación presenta ventajas sobre otras técnicas para eliminar compuestos contaminantes, porque además de usar procesos naturales para destruir contaminantes orgánicos, los productos formados generalmente son inocuos, el costo es menor al compararse con otras tecnologías y puede ser ejecutada en modalidad *in situ* o *ex situ* (Alarcón & Ferrera Cerrato, 2016; Castigo Rodríguez *et al.*, 2005).

1.5.2 Factores que afectan la Biorremediación

Entre los factores que pueden afectar un procedimiento de biorremediación destacan dos grupos principales, aquellos que se relacionan con las condiciones ambientales (temperatura, humedad, tipo de suelo, etc.) y aquellos inherentes a la contaminación en sí (características del contaminante, y susceptibilidad a la descomposición biológica, entre otros) (Evans & Furlong, 2011; Prieto Méndez *et al.*, 2009). Los procesos en el suelo también pueden afectar los métodos de biorremediación, dentro de estos se pueden mencionar el transporte, la retención y la transformación: el transporte de sustancias en el suelo puede ser mediante lixiviación hacia agua subterráneas, por escurrimiento, o incluso volatilización al aire, este transporte a su vez es afectado por el flujo de masa, dispersión o difusión molecular; la retención (comúnmente conocida como absorción) frecuentemente reduce la biodisponibilidad y degradabilidad de compuestos (Alarcón & Ferrera Cerrato, 2016; Ali *et al.*, 2013).

Los componentes del suelo con mayor afinidad para retención son las arcillas y humus; mediante los procesos de transformación las concentraciones del contaminante se reducen gradualmente con la formación de metabolitos de menor toxicidad. Es importante destacar que a pesar de que la mayoría de los procesos de transformación son realizados por microorganismos (los cuales deben mantenerse en un rango ideal de 20-30°C, pues este rango optimiza la actividad enzimática)

las plantas también juegan un rol significativo en estos procesos, por lo que en recientes años ha incrementado la atención a los métodos de fitorremediación (Cheng & Mulla, 1999).

Existen otras circunstancias como disponibilidad de nutrientes, oxigenación, o presencia de inhibidores que juegan un rol importante en la determinación de la viabilidad de una tecnología de biorremediación, pero todas son inherentes a aplicación individual dada la gran variedad de los factores mencionados previamente, pues en el sistema todas interactúan y modifican los efectos de la contaminación, para bien o mal. Luego de la consideración de los factores involucrados se debe considerar cuál técnica es la más apropiada y con ello, la elaboración de un plan de remediación (Cheng & Mulla, 1999; DalCarso *et al.*, 2013; Orozco Barrenetxea *et al.*, 2008).

1.6 Fitorremediación

La fitorremediación aprovecha los bioprocesos que les permiten a las plantas adaptarse y desarrollarse en medios contaminados por sustancias orgánicas e inorgánicas. Las plantas que son tolerantes a los metales y metaloides tienen la capacidad de eliminar, inmovilizar, volatilizar, degradar, transformar, mineralizar, estabilizar o destruir estos contaminantes en los suelos (Alarcón & Ferrera Cerrato, 2016; Delgadillo-López *et al.*, 2011).

Los mecanismos de adaptación, como el aumento de la solubilidad, la quelación, exclusión, redistribución y acumulación de contaminantes permiten que las plantas se vuelvan resistentes a la toxicidad del medio y por lo tanto son capaces de sobrevivir en las presas de jales (Núñez López *et al.*, 2004).

La mayor ventaja de la fitorremediación es que no genera impactos negativos en los suelos donde es aplicada, pues las plantas ayudan a reestructurar al suelo dañado mediante la simbiosis con la actividad microbiana y aportando materia orgánica, controlando así la erosión por viento y lluvia minimizando la dispersión de los elementos contaminantes presentes (Ali *et al.*, 2013; Núñez López *et al.*, 2004).

La elección de las plantas adecuadas para la fitorremediación puede basarse en plantas que ya se han adaptado al sitio contaminado, o plantas que hayan demostrado ser de rápido crecimiento, adaptación y en el caso de remediación de EPT, ser capaces de acumular grandes

cantidades de metales y/o metaloides con alta producción de biomasa, considerando además que las especies, si son introducidas, no representen un daño para la biodiversidad existente en el sitio y que no sean utilizadas para alimentación de animales o humanos, pues de este modo se evita la incorporación de EPT a la cadena trófica (Bolan *et al.*, 2011; Mendoza Benítez *et al.*, 2008; Zhi-xin *et al.*, 2007).

En los últimos años se ha generado una terminología nueva para las variantes de fitorremediación basada en el papel que tienen las plantas durante el proceso de remediación y los mecanismos involucrados, se han definido así la fitodegradación, fitoestimulación, fitovolatilización, fitoestabilización, fitoextracción y rizofiltración. Teniendo en cuenta los tipos de contaminantes que se pueden encontrar en los desechos mineros resulta más viable aplicar la fitoestabilización y/o fitoextracción en el proceso de recuperación de estas zonas (Learita Prince, 2015; Mendoza Benítez *et al.*, 2008; Núñez López *et al.*, 2004).

1.6.1 Fitoestabilización y Fitoextracción

La fitoestabilización utiliza plantas excluyentes que desarrollan un denso sistema de raíz, para reducir la biodisponibilidad de metales y otros contaminantes en el ambiente por medio de mecanismos de secuestro, lignificación o humidificación. Las plantas excluyentes han desarrollado una tolerancia a los EPT principalmente en sus raíces y evitan la traslocación a partes aéreas (Eweis *et al.*, 1999; Núñez López *et al.*, 2004). El objetivo principal de esta técnica es reducir la movilidad y la biodisponibilidad de los elementos contaminantes presentes en los suelos. El proceso de fitoestabilización se lleva a cabo en la rizósfera y las raíces de plantas, los exudados de estas plantas pueden cambiar el pH en el medio y aumentar la solubilidad y movilidad de los EPT (Criollo *et al.*, 2012; Etesami, 2018).

La fitoestabilización puede ser empleada para remediar contaminación por EPT como As, Cd, Cr, Cu, Hg, Pb y Zn en residuos mineros. No obstante, los jales mineros pueden presentar gran acidez y por ello es recomendable mejorar las características fisicoquímicas del suelo, pues así se facilitan los procesos biológicos que reducen la movilidad y biodisponibilidad sin alterar la concentración total de los metales y metaloides. Algunos

ejemplos de mejoras en el suelo son el uso de cal, zeolitas, aluminosilicatos, óxidos e hidróxidos de Fe y óxidos de Mn e incluso estiércol (Ali *et al.*, 2013; USEPA, 2000).

Los ácidos orgánicos que enriquecen al suelo por acción vegetal y microbiana, además de azúcares, aminoácidos, lípidos, flavonoides, proteínas, enzimas y carbohidratos afectan la dinámica de los metales y metaloides en los suelos mediante las reacciones que se han mencionado previamente. Algunos de los ácidos orgánicos comunes en la rizósfera son acético, butírico, cítrico, láctico, málico, oxálico, propiónico y tartárico (Bauddh & Singh, 2015; Bolan *et al.*, 2011).

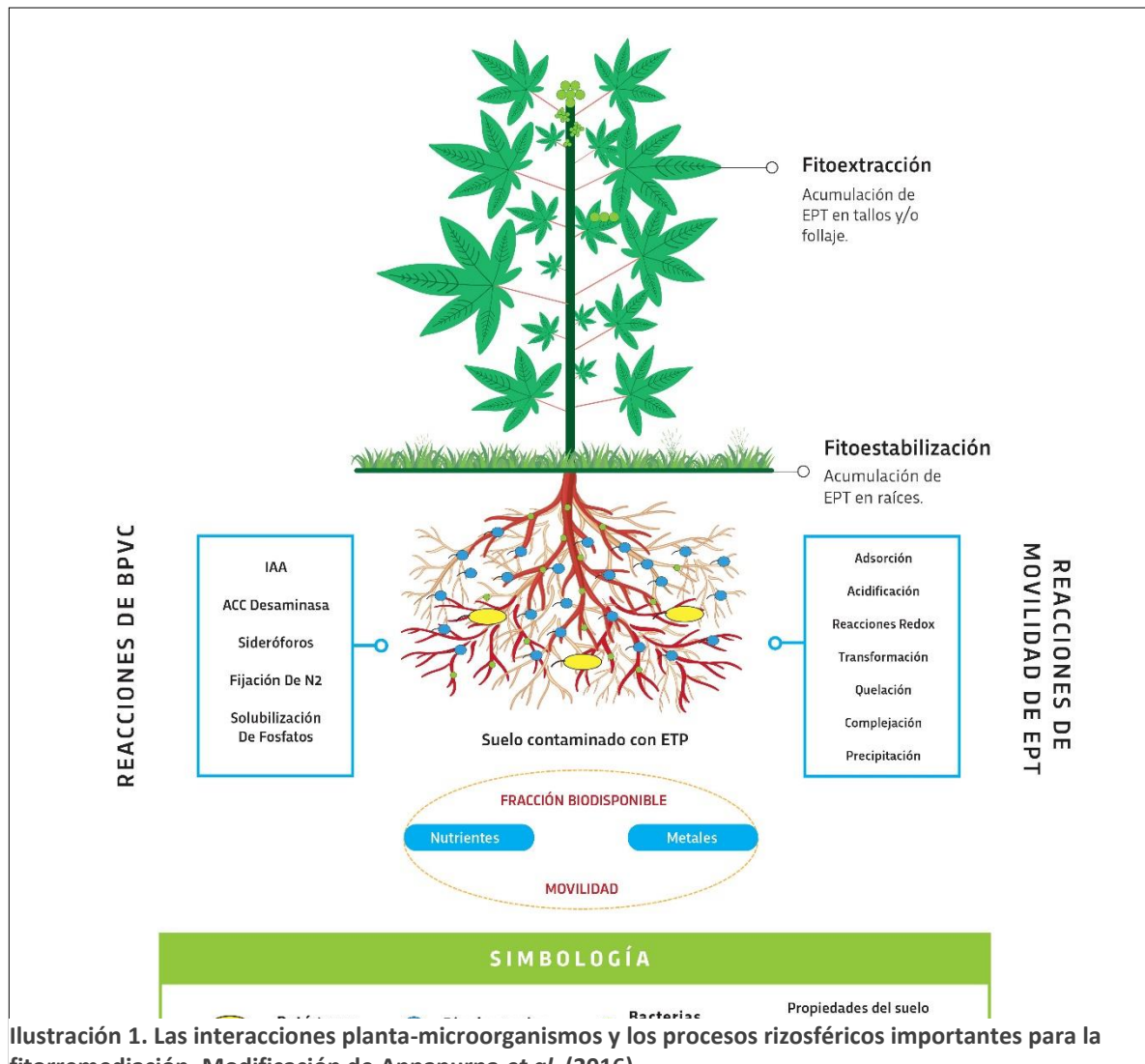


Ilustración 1. Las interacciones planta-microorganismos y los procesos rizosféricos importantes para la fitorremediación. Modificación de Annapurna *et al.* (2016).

La fitoextracción (también llamada fitoacumulación) es una técnica que explota la capacidad de algunas plantas para acumular contaminantes en sus raíces, tallos o follaje, las cuales pueden ser fácilmente cosechadas. Los contaminantes extraídos son principalmente metales pesados, aunque también se pueden extraer algunos contaminantes orgánicos. Generalmente los sistemas de fitoextracción se implementan para extraer metales de suelos contaminados, por medio de plantas conocidas como metalófitas (Giordani & Cecchi, 2015; Núñez López *et al.*, 2004).

La eficacia de la fitoextracción depende de muchos factores como la biodisponibilidad de los contaminantes, el estado en el que los metales y metaloides se encuentran en el medio y las propiedades fisicoquímicas del suelo, además, la planta elegida para la fitoextracción debe ser capaz de soportar altas concentraciones de EPT y ser resistente a condiciones de intemperie (Bolan *et al.*, 2001; Learita Prince, 2015; Xiaohai *et al.*, 2008).

La ilustración 1 esquematiza la diferencia entre las técnicas de fitoextracción y fitoestabilización. En el caso de ambos procedimientos es recomendable utilizar microorganismos que estimulan la absorción, movilidad y acumulación de EPT a la raíz de las plantas o que provoquen la precipitación de estos en la rizósfera (DalCarso *et al.*, 2013; Rajkumar *et al.*, 2009).

1.6.2 Efectos y Respuesta de plantas ante presencia de EPT en suelos

Para que una planta puede germinar, desarrollarse y reproducirse adecuadamente requiere absorber ciertos nutrientes. Los macronutrientes, son necesarios en grandes cantidades (>1000 mg/kg de C, H, N, K, Ca, Mg, P, S y Si) y los micronutrientes son requeridos en dosis mucho menores (<100 mg/kg de Cl, Fe, B, Mn, Na, Co, Zn, Cu, Ni y Mo) (Learita Prince, 2015). Los metales pesados que son micronutrientes desempeñan funciones biológicas y fisiológicas, como la biosíntesis de proteínas, ácidos nucleicos y clorofila y su deficiencia puede llegar a provocar daños letales, como inhibición de la fotosíntesis, reducción de la síntesis de carbohidratos, clorosis, disminución del crecimiento y alteración en el metabolismo general. Sin embargo, por encima de las concentraciones

óptimas son tóxicos, en la tabla 7 se ejemplifican algunos de los daños que pueden llegar a provocar (DalCarso *et al.*, 2013; Gupta *et al.*, 2013).

Tabla 7. Efectos tóxicos de micronutrientes a concentraciones elevadas.

Micronutriente	Efectos Tóxicos
Cu	-Inducción al estrés oxidativo (producción de especies reactivas de oxígeno) -Crecimiento retardado y clorosis
Fe	-Intensifica deficiencia de Zn -Retraso del crecimiento
Mn	-Clorosis en los nervios y deformación de las hojas más jóvenes -Necrosis en tallos y hojas Reducción de los niveles de clorofila
Mo	-Malformación de hojas -Amarillamiento de las hojas
Ni	-Inhibición del crecimiento en raíces -Reducción de la transpiración y cierre de estomas
Zn	-Clorosis en las hojas -Inhibición de la fotosíntesis. Retardo en el crecimiento de raíces y tallos
Fuente: Seoáñez Calvo, 1999; DalCarso <i>et al.</i>, 2013.	

Por otro lado, se encuentran los elementos no esenciales, que son tóxicos para las plantas incluso a bajas concentraciones (As, Cd, Cr, Hg, Pb). En la tabla 8 se pueden apreciar algunos de los principales efectos adversos en plantas por la presencia de elementos no esenciales en suelos.

Tabla 8. Efectos dañinos de elementos no esenciales en plantas.

Elemento no esencial	Efectos Tóxicos
As	-Inhibe la germinación de semillas -Inhibe el crecimiento vegetal
Cd	-Inhibición del crecimiento -Desequilibrio en la absorción de agua y nutrientes.
Cr	-Inhibición del transporte de electrones -Reducción de la fijación de CO ₂ .

	- Disminución del crecimiento de raíces
Pb	-Inhibición del crecimiento -Clorosis y muerte -Escasez de agua
Fuente: Seoáñez Calvo, 1999; DalCarso <i>et al.</i>, 2013; Manahan, 2013	

Las plantas acumuladoras reaccionan a los aumentos en la concentración de los EPT para mantener el equilibrio en los iones metálicos esenciales y no esenciales dentro de sus células. En general, hay cuatro principales mecanismos a través de los cuáles se reduce la toxicidad de EPT en las plantas (DalCarso *et al.*, 2013):

1. Se induce el estrés oxidativo y se realizan cambios en la permeabilidad y la integridad de la membrana celular. Producción de especies reactivas de oxígeno, inducida comúnmente por Cu, Zn y Fe.
2. Los EPT (Cd, Pb, As) reaccionan con los grupos funcionales sulfhidrilo y carboxílico de las proteínas, lo cual provoca daño en la estructura y función de proteínas y enzimas.
3. Los cationes y oxianiones compiten por los mismos transportadores en las membranas celulares de la raíz.
4. Se desplazan los iones esenciales en las enzimas y las proteínas de señalización. Por ejemplo, el Cadmio desplaza al Cu, Zn y Fe en algunas enzimas.

Muchas plantas han desarrollado mecanismos de homeóstasis y desintoxicación para enfrentar el estrés provocado por la alta concentración de EPT en suelos. Las especies vegetales capaces de crecer en suelos contaminados con EPT son conocidas como metalófitas (Ginocchio C. & León-Lobos, 2007; Mendez & Maier, 2008).

Las metalófitas se dividen en excluyentes e hiperacumuladoras, usadas para la fitoestabilización y fitoextracción respectivamente. Por un lado, las plantas excluyentes usan mecanismos para mantener a los contaminantes dentro de sus raíces, evitando su transporte a las partes aéreas. Dicha exclusión se consigue mediante la manipulación de la biodisponibilidad de los iones metálicos en el suelo (Ali *et al.*, 2013; Ginocchio C. & León-

Lobos, 2007). Los exudados de las raíces reducen la absorción de iones metálicos, generalmente son sustancias como proteínas transportadoras y ácidos orgánicos que actúan como ligandos formando complejos con los iones metálicos en la rizósfera (Gupta *et al.*, 2013; Rajkumar *et al.*, 2012).

Además de los microorganismos, que mejoran en gran medida los procesos de exclusión, los hongos micorrízicos arbusculares juegan un papel importante en la desintoxicación de EPT, pues liberan glomalina, una proteína que secuestra iones metálicos como Cu, Pb, y Cd, reduce la traslocación de EPT de las raíces a los tallos, y en general, mejora los mecanismos de tolerancia (Bolan *et al.*, 2011; Etesami, 2018).

Por su parte, las plantas acumuladoras han desarrollado mecanismos homeostáticos y de desintoxicación que les permiten bioacumular a los EPT en sus tejidos, sin inhibir las funciones fisiológicas fundamentales. Entre los mecanismos que se utilizan se pueden mencionar el control de la captación de metales, la reducción de la biodisponibilidad de EPT, la inmovilización y quelación de iones metálicos, la compartimentación y el secuestro de complejos. En este tipo de plantas el papel de los microorganismos es aumentar la movilidad y solubilidad de contaminantes. Los principales quelantes de EPT que se encuentran en las plantas acumuladoras son fitoquelatinas (PCs), metalotioneínas (MTs), ácidos orgánicos y aminoácidos. En las plantas acumuladoras, los contaminantes generalmente son atrapados en el apoplasto, vacuolas y la pared celular (Criollo *et al.*, 2012; Learita Prince, 2015; Rajkumar & Freitas, 2008).

Existe un grupo de plantas que por acumular concentraciones más altas de lo normal son llamadas hiperacumuladoras, estas, acumulan de 100 a 1000 veces la cantidad de EPT que es capaz de soportar una planta normal. Los estándares para poder considerar a una planta dentro de este grupo son: debe acumular al menos 100 µg/g de Cd y As; 1000 µg/g de Co, Cu, Cr, Ni y P; 3000 µg/g de Zn y/o 10000 µg/g de Mn (Delgadillo-López *et al.*, 2011; DalCarso *et al.*, 2013).

1.6.3 Bacterias Promotoras del Crecimiento

Los mecanismos mediante los cuales los microorganismos efectúan cambios en la especiación y movilidad de elementos son componentes fundamentales de los ciclos biogeoquímicos, tanto para los EPT como para otros elementos, como carbono, nitrógeno, sulfuro y fósforo. La habilidad de los microorganismos para afectar la especiación de EPT realiza en su capacidad para influenciar los procesos de movilización e inmovilización entre las fases solubles e insolubles. La movilización de EPT puede ser lograda por protonación, quelación y transformación química, mientras que la inmovilización puede ocurrir por precipitación o cristalización de compuestos insolubles orgánicos o inorgánicos, o por absorción, consumo y secuestro intracelular. Incluso, las reacciones redox pueden movilizar o inmovilizar EPT dependiendo de las especies involucradas (Annapurna *et al.*, 2016; Etesami, 2018; Gadd, 2004).

Como se ha mencionado previamente, dada la influencia de los microorganismos en los ciclos biogeoquímicos, estos pueden ser explotados en biotecnología ambiental para optimizar las técnicas de fitorremediación. Así, la solubilización microbiana puede promover la remoción de contaminantes de matrices sólidas como suelos, sedimentos, o desechos industriales. Alternativamente, los procesos de inmovilización pueden promover la transformación de algunos metales a formas insolubles e inertes siendo aplicables también a soluciones acuosas (Ali *et al.*, 2013; Gadd, 2004; Rajkumar & Freitas, 2008).

Las Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (BPCV) son aquellas que pueden incrementar el crecimiento y la productividad vegetal a través de relaciones biológicas directas o indirectas a través de su capacidad de colonizar el sistema radicular de las plantas o su entorno. Pueden clasificarse en tres grupos principales: las que pueden colonizar el tejido de la planta formando nódulos (simbióticas), las que se hospedan en estructuras internas de la planta (endofíticas) y las que se encuentran cerca del sistema radicular de la planta (bacterias de vida libre) (Criollo *et al.*, 2012; Etesami, 2018; Rajkumar *et al.*, 2012).

Recientemente, algunas BPCV resistentes a EPT se han destacado por promover el desarrollo vegetal en suelos contaminados y reducir la biodisponibilidad de metales y

metaloides tóxicos, así como su consumo en plantas, disminuyendo el grado de toxicidad hacia aquellas expuestas al estrés generado por diferentes elementos contaminantes (Annapurna *et al.*, 2016; Criollo *et al.*, 2012; Gupta *et al.*, 2013; Rajkumar *et al.*, 2012).

La tolerancia a EPT en microorganismos es un requisito vital para poder usarlos en tratamientos de suelos contaminados que busquen reducir su movilidad. Los microorganismos se han adaptado a estos contaminantes mediante una serie de modificaciones cromosómicas y de plásmidos, siendo efectivos tanto para micronutrientes esenciales, tanto para elementos no esenciales. Se han reconocido siete mecanismos por los cuales los microorganismos son capaces de resistir la contaminación por EPT (Wheaton *et al.*, 2015; Etesami, 2018; Zhi-xin *et al.*, 2007).

- 1) Exclusión de EPT mediante una barrera permeable
- 2) Secuestro extracelular del metal por enlace a agentes quelantes
- 3) Secuestro intracelular por un agente quelante/proteína
- 4) Desintoxicación enzimática del metal a una forma menos tóxica
- 5) Transporte activo del metal
- 6) Tolerancia pasiva
- 7) Reducción en la sensibilidad del metal en los objetivos celulares a los iones metálicos

La interacción biológica entre plantas y microorganismos juega un rol importante en la adaptación y supervivencia de ambos en suelos afectados por EPT. Algunos de los géneros que se han destacado como BPCV son *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Azospirillum*, *Enterobacter*, *Variovorax*, *Bacillus*, *Azotobacter*, *Klebsiella* y *Aeromonas* incluso en condiciones adversas (Etesami, 2018; Meena *et al.*, 2017).

Algunos de los mecanismos mediante los cuales las bacterias promueven el crecimiento en plantas bajo estrés por EPT son (Castigo Rodríguez, *et al.*, 2005; Rajkumar *et al.*, 2009):

- 1) Producción de agentes quelantes.

- 2) Producción de fitohormonas como ácido indol-3-acético (IAA), citoquinonas (CK), y ácido giberelico (GA) (fitoestimuladores)
- 3) Producción de ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) deaminasa (bioaliviadores)
- 4) Promoción de la fitodisponibilidad de minerales (N, P, K, Ca, Fe, Mn, Cu, Zn, etc) (bioferilizantes)
- 5) Modificación de la biomasa y morfología de la raíz (biomodificadores)
- 6) Prevención de daños perjudiciales por patógenos (biopesticidas)

Una BPCV puede aliviar el estrés por EPT en plantas usando uno o más de los mecanismos mencionados arriba. Existen una serie de pruebas que pueden realizarse para determinar a una cepa como BPCV, estas son: Producción de ácido indol acético, solubilización de fosfatos, consumo de metales/metaloideos y producción de ACC-deaminasa (Annapurna *et al.*, 2016; Rajkumar *et al.*, 2012).

1.6.4 Potencial de *Ricinus communis* para biorremediación

Ricinus communis, comunmente llamado ricino, castor, tártago e higuerilla entre otros, es una planta oleaginosa que pertenece a la familia *Euphorbiaceae*. Entre los aceites no comestibles, el aceite de ricino es el más popular por su gran variedad de aplicaciones de tipo industrial, médico y cosméticas (Bauddh *et al.*, 2015), existen además otros bioproductos generados a partir de esta planta que son de interes comercial como el ácido ricinoleico, grasa de litio (hidroxiestearato de litio), ácido undecilénico y ácido 11-aminoundecanoico (Annapurna *et al.*, 2016; Bauddh *et al.*, 2015; Kiran & Prasad, 2017)

Se ha encontrado a *Ricinus communis* como una especie dominante creciendo en sitios contaminados por desechos industriales. Algunos otros estudios han mostrado que la higuerilla crece espontáneamente en sitios contaminados por metales y ha sido propuesta como candidata para restaurar sitios con un amplio rango de contaminantes (Kumar *et al.*, 2017; Ruiz Olivares *et al.*, 2008).

Algunas especies que han sido estudiadas en fitorremediación como *Brassica juncea*, *Helianthus annuus* y *Zea mays* presentan inconvenientes en su uso, pues además de tener un

periodo de vida corto y baja productividad de biomasa, poseen la desventaja de que los impactos tóxicos de los contaminantes pueden trasladarse a la cadena alimenticia y causar daños en humanos y animales. En el contexto de biorremediación, las plantas a usarse deben ser perennes, con gran generación de biomasa y tolerantes a estreses bióticos y abióticos (Bauddh *et al.*, 2015; Rajkumar & Freitas, 2008).

R. communis ha sido reportada como una candidata apta para la fitoestabilización de sitios contaminados por sustancias orgánicas e inorgánicas, metales pesados e hidrocarburos aromáticos policíclicos. Ha ganado importancia considerable en la remediación de sustratos con altas concentraciones de Cu, Zn, Mn, Pb y Cd. Es útil en la fitoextracción de Boro y tolerante al Cu, Fe, Mn y Zn. Además es una planta apta para la remediación de Cd y Pb (Annapurna *et al.*, 2016; Kiran & Prasad, 2017; Kumar *et al.*, 2017). En la tabla 9 se muestran investigaciones realizadas en la exploración de su potencial como fitorremediador.

Tabla 9. Potencial de *Ricinus communis* en procesos de fitorremediación.

Metal Contaminante	Nivel de Contaminación	Tipo de experimento	Tiempo de exposición	Accumulación del metal ($\mu\text{g g}^{-1}$)		Referencia
				Raíces	Tallos	
Arsénico	10, 50, 100, 250, 500 y 5000 $\mu\text{g/L}$	Hidroponia	30 días	467.38 mg/kg	44.60 mg/kg	(Melo, <i>et al.</i> , 2009)
Arsénico $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	35 y 150 mg As dm^{-3} suelo	Maceta	35 días	4.26 y 39.55 mg/kg	2.42 y 1.79 mg/kg	(Melo, <i>et al.</i> , 2012)
Arsénico (NaZHASO_4)	9.13 ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Suelo contaminado	-	40	48.75	(Mahmud, <i>et al.</i> , 2008)
Cadmio (CdCl_2)	0.2 $\mu\text{M CdCl}_2$	Maceta	7 días	-	-	(Shi <i>et al.</i> , 2015)
Cadmio (CdCl_2)	100 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Suelo	Maceta	90 días	1256.81	261.35	(Bauddh & Singh, 2015)
Cadmio (CdCl_2)	50 100 200 $\text{mg Cd} \cdot \text{kg}^{-1}$ suelo	Maceta	28 días	341.4 386.0 2517.9	14.7 28.0 59.8	(Shi & Cai, 2009)
Níquel (NiCl_2)	164.5 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	Suelo contaminado	-	217.8	174.5 tallo y	(Malarkodi, <i>et al.</i> , 2008)

		con lodos de agua residual			97.80 hojas	
Níquel	275 mg Ni kg ⁻¹ suelo	Macetas	35 días	185.00	35.0 tallo y 53.0 hojas	(Rajkumar <i>et al.</i> , 2009)
Níquel (NiCl ₂)	0-250 Ni kg ⁻¹	Macetas	45 días	455	300	(Adhikari & Kumar, 2012)
Níquel (NiSO ₄)	150, 300 y 600 ppm	Suelo en Macetas	12 meses	67.2	48.7	(Giordani & Cecchi, 2015)
Plomo	400 μmol Pb L ⁻¹ Solucion	Hidroponia	40 días	24,000-25,000	550-600	(Romeiro, et al., 2006)
Cadmio	0.32-2.77 mg/kg	Suelo contaminado	120 días	0.34 mg/kg	0.57 mg/kg	(Xiong, <i>et al.</i> , 2018)
Zinc	152-1427			38.65	23.24	
Cadmio CdCl ₂ ·2.5H ₂ O	5, 10 y 20 mg/L	Hidroponia	5 semanas	0-42.56 mg/kg		(Zhi-xin, <i>et al.</i> , 2007)
Plomo Pb(NO ₃) ₂ ·H ₂ O	50, 100 y 200			0-446.03		
Cadmio Cd(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	1,2,4,8 y 16 mg/L	Hidroponia	30 dias	8579 mg Pb/kg (max)	471 mg Cd/kg (max)	(De Souza Costa <i>et al.</i> , 2012)
Plomo Pb(NO ₃) ₂	6,12,24,48 y 96					
Cadmio	1,2,10,20 y 40 mg/kg	Macetas	4 meses	1.12-44.4 mg/kg	0.40-20.8 mg/kg	(Wang, Zhao, Guo, & Zhou, 2016)
Cobre	50, 100, 200, 400 y 600			11.6-44.6	12.8-38.8	
Zin	100, 200, 400, 600 y 800			138-420	167-713	

Plomo	2267 mg/kg	Suelo contaminado con residuo de mina de Pb	-	-	2.029 mg/kg	(Xiaohai, <i>et al.</i> , 2008)
Cobre	89			43 mg/kg	55	
Zinc	277			43	55	
Níquel	275 mg/kg	Suelo contaminado artificialmente (macetas)	3 semanas	203 mg/kg <i>Pseudomonas sp.</i>	44.0 mg/kg	(Rajkumar & Freitas, 2008)
Cobre	300			175.6 <i>P. jessenii</i>	14.0	
Zinc	400			407.3 <i>P. jessenii</i>	121.6	
Arsénico	183-14,660 mg/kg	Jales mineros	-	0.49 mg/kg	0.76 mg/kg	(Santos-Jallath, <i>et al.</i> , 2012)
Cadmio	45-308			0.90	2.19	
Plomo	327-1754			21.28	57.50	
Cobre	149-459			11.19	11.96	
Zinc	448-459			133.89	114.37	
Cadmio	162.4 mg/kg	Zona Industrial Hyderabad	-	9.5 mg/kg	6.7 mg/kg	(Boda <i>et al.</i> , 2017)
Plomo	1152			124.4	153.7	
Manganeso	205.33			15.9	14.6	
Zinc	245.1			146.4	118.4	
Hierro	2061			599.1	417.7	
Níquel	89 mg/kg	Jales mineros	-	13 mg/kg	15 mg/kg	(Ruiz Olivares <i>et al.</i> , 2013)
Cobre	1248			30	25	
Zinc	9862			570	75	
Manganeso	1655			110	140	
Plomo	2882			85	60	
Cadmio	92			6.5	2.2	

CAPÍTULO II. METODOLOGÍA

2.1 Muestreo

El muestreo se realizó siguiendo los parámetros establecidos por la NMX-AA-132-SCFI-2006 y las consideraciones mencionadas por Margesin y Schinner (2005). El área de muestreo fue en una presa de jales de la localidad de Santa María en el municipio de Zimapán, Hidalgo. La dirección de Jales de Santa María tiene por dirección calle Montserrat, colonia Fas, y las coordenadas son 20°73'59" N 99°39'82" W, en la ilustración 2 se puede observar una vista satelital de la zona de muestreo.



Ilustración 2. Vista satelital de la zona de muestreo en Santa María Zimapán. Los puntos negros delimitan representan la zona de muestreo. Fuente: Google (2018).

El muestreo del sitio fue realizado con el patrón tipo zigzag, recolectando las muestras de una profundidad 0-20 cm. La recolección de las muestras se realizó con materiales de plástico (para disminuir interferencias); las muestras compuestas fueron transportadas en costales de rafia de polipropileno donde permanecieron en refrigeración a 4°C hasta el

momento de su análisis. En las ilustraciones 3 y 4 se muestra el establecimiento natural de *R. communis* en la zona de muestreo.



Ilustración 3. *Ricinus communis* en zona de muestreo.



Ilustración 4. Presa de jales donde se realizó el muestreo en Zimapán, Hidalgo.

2.2 Análisis fisicoquímico

Las muestras compuestas de jal fueron secadas a temperatura ambiente para retirar el exceso de humedad. Posteriormente por medio del método del cuarteo se subdividió y tamizó para la realización del análisis de los parámetros fisicoquímicos. Las determinaciones fisicoquímicas fueron realizadas en la muestra de jal y en el sustrato comercial Miracle-Grow[®] que se utilizó como enmienda orgánica durante los tratamientos.

Las determinaciones analíticas para la evaluación de las muestras se realizaron siguiendo los métodos propuestos por la NOM-021-SEMARNAT-2000. Se determinó pH en agua (Método AS-02) en una suspensión sobrenadante de una mezcla de relación 1:2 suelo: agua desionizada con un equipo multiparámetro, además, se analizó pH en KCl (Método AS-24) con una relación de mezcla 1:2 suelo: KCl; la densidad aparente fue medida por el método AS-03; se analizó el contenido de humedad por gravimetría (Método AS-05).

El contenido de materia orgánica (Método AS-07) fue estimado a través del método de Walkley y Black; se realizó la determinación de nitrógeno inorgánico extraíble con el

procedimiento micro Kjeldahl (Método AS-08); se analizó la textura (Método AS-09) en las muestras por el método de Bouyoucos (1936); se midió la capacidad de intercambio catiónico (CIC) por el método AS-12 con acetato de amonio; la conductividad eléctrica (CE) en extracto de saturación fue determinada mediante un medidor de CE de lectura directa por el método AS-18; el color fue estimado con las tablas de Munsell (Método AS-22); la acidez extraíble (Método AS-32) fue elaborada por la técnica cloruro de bario-trietanolamina (BaCl_2 -TEA).

Para determinar una primera evaluación de la biodisponibilidad de nutrientes en jal y en el sustrato se realizó una extracción por el método de pentaacetato de dietilentiamina, trietanolamina y cloruro de calcio (por sus siglas DTPA-TEA- CaCl_2) (Meers *et al.*, 2007). La extracción total de elementos se realizó conforme al procedimiento 3052 establecido por la EPA (2007) y su posterior análisis por la técnica ICP-OES:

- I. Pesar 0.5 g de muestra y colocar en un recipiente de teflón.
- II. Agregar 2 ml de H_2O_2 30%.
- III. Agregar 9 ml de HNO_3 concentrado.
- IV. Agregar 3 ml de HCl concentrado
- V. Colocar en microondas digestor a 175°C durante 15 min, y dejar enfriar.
- VI. Filtrar el sobrenadante, aforar a 50 ml y colocar en un frasco de polietileno previamente etiquetado para su posterior análisis.

2.3 Preparación del inóculo

Las cepas elegidas para los ensayos de fitorremediación *Klebsiella* MC173, *Enterobacter* MC101 y *Escherichia* N16 fueron proporcionadas por el Cuerpo Académico BUAP 256 “Control de la Contaminación Ambiental” de la Facultad de Ingeniería Química; estas fueron previamente aisladas en rizósfera de plantas establecidas naturalmente en jales y caracterizadas como BPCV, además, se identificó su taxonomía (Tabla 10) por Mendoza Hernández *et al.* (2016).

Se colocaron las cepas en tubos con 5 ml de caldo Luria Bertani (LB) y se incubaron a 30°C durante 48 horas en un equipo de agitación orbital a 80 rpm. Al finalizar el periodo

de incubación se transfirieron los 5 ml de caldo LB a matraces Erlenmeyer con 200 ml del mismo caldo, esto con el objetivo de magnificar las cepas bacterianas, posteriormente se incubaron.

Tabla 10. Caracterización de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal utilizadas

Código	Planta Huésped	Género bacteriano	Producción de IAA ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Actividad ACC desaminasa ($\mu\text{M } \alpha\text{KB mg}^{-1} \text{h}^{-1}$)	Producción de sideróforos	Solubilización de fosfatos ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
MC173	<i>Acacia farnesiana</i>	<i>Klebsiella</i>	11.5 ± 0.06	1.2 ± 0.05	+	0.22 ± 0.12
MC101	<i>Crotalaria pumila</i>	<i>Enterobacter</i>	9.1 ± 0.03	1.2 ± 0.03	+	0.33 ± 0.02
N16	<i>Ricinus communis</i>	<i>Escherichia</i>	9.0 ± 0.04	1.8 ± 0.05	+	0.38 ± 0.08
Fuente: Mendoza Hernández et al., 2016.						

Al final del periodo de incubación el caldo LB se centrifugó en tubos Corning en series de 50 ml a 8000 rpm durante 15 min, se retiró el sobrenadante y se resuspendió hasta terminar los 200 ml de LB. Se agregaron 50 ml de solución buffer de fosfatos a la biomasa recuperada, y se colocó en vórtex para homogeneizar (5-10 s). Finalmente, se ajustó el inóculo hasta obtener una absorbancia de 0.5 $\text{OC}_{600\text{nm}}$ en un espectrofotómetro UV-VIS (Perkin Elmer Lambda 20).

2.4 Germinación y cuidado de plántulas

Los ensayos de fitorremediación con *R. communis* y BPCV fueron realizados en macetas, las cuáles fueron elaboradas con botellas de PET de 1.5 L de capacidad, en estas se colocó 1 Kg de mezcla de muestras de jales de y sustrato Miracle-Grow® en tres diferentes modalidades:

- Jal
- Jal + sustrato compost 10% mezclado (homogéneo)
- Jal + sustrato compost 5% sin mezclar (heterogéneo)

En los ensayos se sembraron 2 semillas de *Ricinus communis* por maceta. El sembrado se realizó por triplicado por cada cepa bacteriana utilizada, los inóculos de estas fueron elaborados como se indicó previamente. Una vez ajustada la absorbancia del inóculo se agregaron 25 ml de este a las semillas sembradas, para los testigos se utilizaron 25 ml de solución buffer de fosfatos. Se realizó una segunda inoculación 30 días después de la germinación. Las plantas fueron regadas cada tercer día y cultivadas durante 60 días en condiciones de invernadero (Ilustración 5).



Ilustración 5. Sistema de fitorremediación con Higuerilla y cepa *Escherichia* N16.

2.5 Recolección de suelo de rizósfera

Para realizar el análisis de la movilidad de los EPT en los jales se seleccionaron las plantas de *Ricinus communis* que presentaron mejor crecimiento en base a la altura de tallo, hojas y aspecto general. La extracción de suelo de rizósfera se realizó cuidadosamente 60 días después de los tratamientos haciendo una abertura cercana a la raíz, se recolectaron aproximadamente 10 gramos de cada maceta.

2.6 Extracción química secuencial

El análisis de la presencia de EPT se realizó mediante tres metodologías de extracción química secuencial, todas ellas consisten en determinar la presencia de los elementos en las diferentes fracciones minerales en las que pueden existir. Las técnicas fueron realizadas

después de tamizar y secar las muestras extraídas a peso constante, usando 0.5 gr de muestra, en la tabla 11 se resumen las condiciones utilizadas:

Tabla 11. Resumen de las técnicas de extracción química secuencial utilizadas.

Fracción	Condiciones
Método 1. BCR	
F_{BCR1}	0.11 M CH ₃ COOH, agitar por 16 horas
F_{BCR2}	0.5 M NH ₂ OH·HCl (pH 1.5 con HNO ₃), agitar durante 16 horas
F_{BCR3}	35% H ₂ O ₂ , calentar a 85°C hasta reducir el volumen a 1/1.5 ml, CH ₃ COONH ₄ 1 M (pH 2 con HNO ₃), agitar por 16 horas
F_{BCR4}	H ₂ O ₂ + HNO ₃ + HCl
Método 2. Hall	
F_{H1}	1.0 M NaOAc (pH 5 con CH ₃ COOH), agitar por 6 h.
F_{H2}	0.25 M NH ₂ OH·HCl (en 0.25 M HCl), agitar por 2 horas a 60°C
F_{H3}	1.0 M NH ₂ OH·HCl (en 25% HOAc), agitar 3 horas, 90°C
F_{H4}	KClO ₃ /HCl 12M; HNO ₃ 4 M, 90°C
F_{H5}	H ₂ O ₂ + HNO ₃ + HCl
Método 3. Urbina	
F_{U1}	agua destilada, agitar durante 20 min
F_{U2}	1.0 M MgCl ₂ (pH 7), agitar durante 1 hora
F_{U3}	1.0 M NaOAc (pH 5 con CH ₃ COOH), agitar por 10 horas
F_{U4}	0.2 M oxalato de amonio, agitar 1 hora en oscuridad
F_{U5}	0.04 M NH ₂ OH·HCl (25% CH ₃ COOH v/v), agitar 6 horas a 96°C
F₆	0.02 M HNO ₃ + 30% H ₂ O ₂ , 85°C durante 2 horas; 3.2 M acetato de amonio 20% HNO ₃
F₇	KClO ₃ / 12M HCl; HNO ₃ 4 M, 90°C
F₈	H ₂ O ₂ + HNO ₃ + HCl
Fuente: Rauret <i>et al.</i>, 1999; Hall <i>et al.</i>, 1995; Urbina Trinidad, 2015.	

2.6.1 Técnica de Extracción Química Secuencial BCR

Este procedimiento (Rauret *et al.*, 1999) es muy similar al propuesto por Tessier *et al.* (1979) con la principal diferencia de que en la primera fracción del procedimiento en lugar de evaluar la fracción intercambiable y de carbonatos por separado, las combina en la primera fracción.

Esta técnica fue realizada con la muestra de jal sin ningún tratamiento con el objetivo de evaluar la distribución inicial de elementos. En este procedimiento, se pesó 0.5 g de cada



Ilustración 6. Filtración de los extractos obtenidos con EPT

muestra en tubos para centrífuga de polipropileno Corning de 50 ml y se realizó la extracción para cada tratamiento de fitorremediación y sus testigos como sigue (Fernández E. , Jiménez, Lallena, & Aguilar , 2004; Serna Rueda, 2017; Fernández-Ondoño *et al.*, 2017):

- Fracción intercambiable y unida a carbonatos
 - I. Añadir 20 ml de ácido acético 0.11 M, agitar a 30 rpm durante 16 h.
 - II. Centrifugar a 3000 rpm durante 20 min. Filtrar el sobrenadante, aforar a 50 ml y colocar en frascos de polietileno previamente etiquetados (Ilustración 6).
 - III. Lavar el residuo con 10 ml de agua destilada agitando durante 15 min a 30 rpm y centrifugando durante 20 min a 3000 rpm. Desechar el sobrenadante y repetir.
- Fracción reducible (unida a óxidos de Hierro y Manganeso)

- IV. Al residuo del paso III añadir 20 ml de cloruro de hidroxilamina 0.5 M (Ajustar el pH de este reactivo a 1.5 con HNO_3). Agitar durante 16 horas.
- V. Centrifugar a 3000 rpm durante 20 min. Filtrar el sobrenadante, aforar a 50 ml y colocar en un frasco de polietileno previamente etiquetado. Lavar el residuo como en la primera fracción siguiendo el paso III.
- Fracción unida a materia orgánica
 - VI. Agregar 5 ml de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) 30% y dejar reposar durante 1 hora a temperatura ambiente.
 - VII. Llevar a 85°C durante 1 hora o hasta que el volumen se reduzca a 1.5 o 1 ml.
 - VIII. Agregar 5 ml de H_2O_2 y digestar a 85°C , hasta reducir el volumen a 1.5 o 1 ml nuevamente.
 - IX. Agregar 25 ml de acetato de amonio (pH 2 con HNO_3) y agitar a 30 rpm durante 16 horas a temperatura ambiente.
 - X. Filtrar el sobrenadante, aforar a 50 ml y colocar en una botella de polietileno previamente etiquetada. lavar el residuo siguiendo el paso III.
- Fracción residual

Fue realizada conforme al procedimiento 3052 de la USEPA (1996)

 - XI. Colocar el residuo del paso VI en un recipiente de teflón, agregar 2 ml de H_2O_2 30%, esperar a la reacción. Agregar 9 ml de HNO_3 concentrado y 3 ml de HCl .
 - XII. Colocar en microondas digestor a 175°C durante 15 min.
 - XIII. Filtrar el sobrenadante, aforar a 50 ml y colocar en un frasco previamente etiquetado.

2.6.2 Técnica de Extracción Química Secuencial Hall

En el procedimiento propuesto por Hall *et al.* (1995) las fases categorizadas fueron, absorbida, intercambiable, carbonatos, oxihidróxidos de Fe, óxidos de Fe, sulfuros-materia

orgánica y residual. En esta metodología el tiempo de estancia en cada fase fue seleccionado previamente por el autor de la técnica en base a la premisa de no encontrar mayor cantidad extraíble de los elementos objetivo al prolongar el tiempo de retención:

- Fracción Absorbida/Intercambiable y Carbonatos (AIC)
 - I. A 0.5 g de muestra en un tubo Corning de 50 ml agregar 10 ml de CH_3COONa 1.0 M (pH 5) y tapar. Agitar en vórtex de 5-10 s y colocar a 30 rpm durante 6 horas.
 - II. Centrifugar por 10 min a 5000 rpm y filtrar el sobrenadante en un matraz de aforo de 50 ml.
 - III. Enjuagar con 5 ml de agua, agitar en vórtex (5-10 s) y centrifugar nuevamente; mezclar este sobrenadante con el anterior.
 - IV. Agregar 5 ml de agua, agitar en vórtex (5-10 s), centrifugar y mezclar este sobrenadante con el anterior. Aforar y colocar en un frasco de polietileno previamente etiquetado.
 - V. Realizar una segunda extracción con 10 ml de CH_3COONa 1 M, repitiendo los pasos II, III y IV.
- Fracción unida a oxihidróxidos de Fe
 - VI. Al residuo, agregar 10 ml de $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ 0.25 M en HCl 0.25 M, tapar y agitar en vórtex por 5-10 s.
 - VII. Colocar en baño María a 60°C por 2 horas con la tapa aflojada. Tapar y agitar en vórtex cada 30 min.
 - VIII. Centrifugar a 5000 rpm por 10 min, filtrar el sobrenadante en un matraz de aforo de 50 ml.
 - IX. Enjuagar el residuo siguiendo los pasos III y IV.
 - X. Realizar una segunda extracción con $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ 0.25 M, pero solamente calentar por 30 minutos.
- Fracción unida a óxidos de Fe
 - XI. Al residuo del paso X, agregar 15 ml de $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ 1 M en CH_3COOH al 25%, tapar y agitar en vórtex durante 5-10 s.

- XII. Colocar en baño maría a 90°C durante 3 horas con la tapa ajustada, agitar en vórtex cada 20 min.
- XIII. Centrifugar durante 10 min a 5000 rpm y filtrar el sobrenadante.
- XIV. Enjuagar el residuo con 5 ml de CH₃COOH al 25%, colocar en vórtex y centrifugar nuevamente mezclando el sobrenadante con el anterior.
- XV. Realizar un segundo enjuague repitiendo el paso XIV, mezclar los sobrenadantes, aforar a 50 ml y colocar en un frasco previamente etiquetado.
- XVI. Realizar una segunda extracción con NH₂OH·HCl 1 M, pero sólo calentar por 1.5 h.
- Fracción unida a sulfuros y materia orgánica.
 - XVII. Al residuo de la extracción anterior, agregar 375 mg de KClO₃ y 2.5 ml de HCl 12 M. Tapar y agitar en vórtex (5-10 s). Agregar 5 ml adicionales de HCl, tapar y agitar en vórtex.
 - XVIII. Luego de 30 min, agregar 7.5 ml de agua, tapar y agitar en vórtex. Centrifugar por 10 min a 5000 rpm. Filtrar el sobrenadante.
 - XIX. Al residuo, agregar 5 ml de HNO₃ 4 M, tapar y agitar en vórtex. Colocar en baño María a 90°C durante 20 min.
 - XX. Agitar en vórtex y centrifugar por 10 min. Filtrar el líquido sobrenadante mezclándolo con el extracto anterior.
 - XXI. Enjuagar el residuo siguiendo los pasos III y IV.
- Fracción residual (EPA, 1996)
 - XXII. Colocar el residuo de la extracción anterior en un recipiente de teflón, agregar 2 ml de H₂O₂ al 30%, esperar a la reacción. Agregar 9 ml de HNO₃ concentrado y 3 ml de HCl.
 - XXIII. Colocar en microondas y digerir a 175°C durante 15 min.
 - XXIV. Filtrar el sobrenadante, aforar a 50 ml y colocar en un frasco previamente etiquetado.

2.6.3 Técnica de Extracción Química Secuencial Urbina

Esta metodología es una adaptación de los métodos planteados por Tessier *et al.* (1979), Favas *et al.* (2011) y Hall *et al.* (1995) propuesta por Urbina Trinidad (2015). Para esta extracción se utilizó 0.5 g de muestra en tubos Corning de polipropileno de 50 ml.

- Fracción soluble (Favas *et al.*, 2011)
 - I. Agregar 4 ml de agua destilada, agitar durante 30 min a 30 rpm.
 - II. Centrifugar durante 20 min a 5000 rpm, filtrar el sobrenadante, aforar a 50 ml y colocar en un frasco previamente etiquetado.
 - III. Enjuagar el residuo con 10 ml de agua agitando a 30 rpm durante 15 min, centrifugar y desechar el sobrenadante. Realizar un segundo enjuague.
- Fracción intercambiable (Tessier *et al.*, 1979).
 - IV. Agregar 4 ml de $MgCl_2$ 1M (pH 7) y agitar durante 1 hora a 30 rpm.
 - V. Centrifugar a 5000 rpm por 20 min, filtrar el sobrenadante, aforar a 50 ml y colocar en un frasco etiquetado.
 - VI. Enjuagar el residuo siguiendo el paso III.
- Fracción unida a carbonatos (Tessier *et al.*, 1979).
 - VII. Agregar 4 ml de CH_3COONa 1 M (pH 5 ajustado con ácido acético). Agitar durante 10 horas a 30 rpm.
 - VIII. Centrifugar a 5000 rpm durante 20 min, filtrar el sobrenadante, aforar a 50 ml y colocar en un frasco previamente etiquetado.
 - IX. Enjuagar el residuo siguiendo el paso III.
- Fracción unida a oxihidróxidos de Fe (Favas *et al.*, 2011).
 - X. Agregar 20 ml de oxalato de amonio 0.2 M (pH 3), y agitar durante una hora en oscuridad.
 - XI. Centrifugar a 5000 rpm durante 20 min, filtrar el sobrenadante, aforar a 50 ml y colocar en un frasco previamente etiquetado.
 - XII. Enjuagar el residuo siguiendo el paso III.

- Fracción unida a óxidos de Fe (Tessier *et al.*, 1979)
 - XIII. Agregar 10 ml de $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ 0.04 M (en 25% ácido acético v/v). Agitar durante 6 horas a 96°C con agitación ocasional.
 - XIV. Centrifugar a 5000 rpm por 20 min, filtrar el sobrenadante, aforar a 50 ml y colocar en un frasco previamente etiquetado.
 - XV. Enjuagar el residuo siguiendo el paso III.
- Fracción unida a materia orgánica (Tessier *et al.*, 1979)
 - XVI. Agregar 1.5 ml de HNO_3 0.02 M y 2.5 ml de H_2O_2 30% y calentar a 85°C por dos horas con agitación ocasional.
 - XVII. Agregar una segunda alicuota de 1.5 ml de H_2O_2 al 30% (pH 2 con HNO_3), y calentar por 3 horas a 85°C con agitación ocasional.
 - XVIII. Luego de enfriarse, agregar 2.5 ml de Acetato de amonio 3.2 M (20% HNO_3 , diluir hasta 10 ml y agitar continuamente durante 30 min.
 - XIX. Centrifugar a 5000 rpm por 20 min, filtrar el sobrenadante, aforar a 50 ml y colocar en un frasco previamente etiquetado.
 - XX. Enjuagar el residuo siguiendo el paso III.
- Fracción unida a sulfuros (Hall *et al.*, 1995)
 - XXI. Al residuo del paso anterior, agregar 375 mg de KClO_3 y 2.5 ml de HCl 12 M. Tapar y agitar en vórtex (5-10 s). Agregar 5 ml adicionales de HCl , tapar y agitar en vórtex nuevamente.
 - XXII. Luego de 30 min, agregar 7.5 ml de agua, tapar, agitar en vórtex y centrifugar por 10 min a 5000 rpm. Filtrar el sobrenadante.
 - XXIII. Al residuo, agregar 5 ml de HNO_3 4 M, tapar y colocar en vórtex. Colocar en baño María a 90°C durante 20 min. Agitar en vórtex y centrifugar por 10 min. Filtrar el líquido sobrenadante mezclando con el extracto anterior.
 - XXIV. Enjuagar el residuo siguiendo el paso III.
- Fracción residual (EPA, 1996)

XXV. Colocar el residuo de la extracción anterior en un recipiente de teflón, agregar 2 ml de H_2O_2 30%, esperar a la reacción. Agregar 9 ml de HNO_3 concentrado y 3 ml de HCl .

XXVI. Colocar en microondas y digerir a 175°C durante 15 min.

XXVII. Filtrar el sobrenadante, aforar a 50 ml y colocar en un frasco previamente etiquetado

2.7 Determinación de EPT

Luego de los procesos de extracción química secuencial, las muestras se analizaron mediante la técnica de espectrometría de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES, por sus siglas en inglés) en un equipo Varian 730-ES (Ilustración 7). Los elementos que se analizaron fueron: As, Cd, Fe, Mn, Ni, Pb y Zn; los elementos objetivo fueron analizados con tres longitudes de onda distintas, eligiendo aquella que presentaba mayor índice de detección y menor interferencia (Tabla 12).



Ilustración 7. Análisis de EPT en equipo ICP-OES.

Tabla 12. Longitudes de onda (nm) de medida mediante ICP-OES.

Longitud de Onda	As	Cd	Fe	Mn	Ni	Pb	Zn
1°	188.980	214.439	238.204	257.610	231.604	220.353	213.857
2°	193.696	226.502	259.940	259.372	216.555	182.143	202.548
3°	197.198	228.802	234.350	260.569	221.648	217.000	205.20

2.8 Análisis del fraccionamiento

Se calculó el promedio de las dos réplicas analizadas por muestra, tanto para la concentración total como del fraccionamiento de elementos. Se determinó la suma de las concentraciones de los EPT obtenidos en las fracciones de cada muestra analizada para evaluar el porcentaje de recuperación de cada técnica. Finalmente, se calculó la contribución porcentual de cada fracción al total obtenido por EPT. En la ilustración 8 se muestran los



Ilustración 8. Extractos obtenidos con las técnicas de extracción química secuencial

frascos de polietileno con los extractos de EPT obtenidos.

2.9 Tratamiento estadístico de los datos

Para la comparación entre las tres técnicas de extracción utilizadas, en base a las fracciones definidas por cada método y su biodisponibilidad, todas las técnicas fueron divididas en 4 categorías representativas definidas como fracción intercambiable (F_{BCR1} , $F_{H1}+F_{H1.2}$, $F_{U1}+F_{U2}+F_{U3}$), reducible (F_{BCR2} , $F_{H2}+F_{H2.2}+F_{H3}+F_{H3.2}$, $F_{U4}+F_{U5}$), oxidable (F_{BCR3} , F_{H4} , $F_{U6}+F_{U7}$), y residual (F_{BCR4} , F_{H5} , F_{U8}). El tratamiento estadístico de los datos se realizó con el software IBM® SPSS Statistics® 22. Se evaluó la distribución normal de las variables aleatorias agrupadas (método BCR, Hall y Urbina) mediante el estadístico de prueba Kolmogorov-Smirnov Lilliefors, posteriormente se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) de un factor con la prueba Post Hoc de Tukey en el nivel de significancia 0.05.

CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Caracterización fisicoquímica de jal y sustrato

En la tabla 13 se pueden observar los resultados obtenidos de la caracterización fisicoquímica, el pH encontrado fue neutro tanto para la muestra de jal, como para la muestra de sustrato comercial, en contraste, la densidad aparente encontrada en ambas muestras tuvo gran diferencia, con 0.26 g/m^3 en el sustrato y 1.57 g/m^3 para la muestra de jal que coincide con la textura encontrada (Franco arenosa), del mismo modo la humedad mostró diferencias significativas en ambas muestras. La conductividad en jal alcanzó hasta los 2 dS/m, esto indica que los valores en salinidad son muy altos, mientras que en la muestra de sustrato se presentaron valores que resultan despreciables para la salinidad (0.03 dS/m). El porcentaje de materia orgánica fue bajo (8.20%) al compararse con el encontrado en la muestra de sustrato (50.69%), valores que son coherentes con el tipo de matriz analizada.

Tabla 13. Características fisicoquímicas del sustrato y jal usados en los sistemas de fitorremediación.

Parámetro	Muestra de sustrato		Muestra de jal	
pH en agua	6.74		6.75	
pH en KCl	6.93		6.73	
Densidad aparente g/m^3	0.26		1.57	
Color	7.5 YR 2.5/2 VERY DARK BROWN (húmedo)	2.5Y 2.5/1 DARK BROWN (seco)	2.5Y 4/1 DARK GRAY (húmedo)	2.5Y 6/1 GRAY (seco)
Textura	Franco		Franco Arenoso	
Humedad por gravimetría (%)	131.38		0.0077	
pH en el extracto de saturación	6.62		6.24	
Acidez extraíble meq/100g	75.33		4.53	
Conductividad en extracto dS/m	0.03		2	
Materia Orgánica %	50.69		8.20	
Nitrógeno total mg/g	6.07		1.63	

Ruiz Olivares *et al.* (2013) realizaron un análisis de las propiedades fisicoquímicas en jales de Santa María, Zimapan de los cuales se hallaron resultados similares a los reportados en este trabajo en pH (6.4), conductividad eléctrica (2303 y $2357 \mu\text{mhos}\cdot\text{cm}^{-1}$) y contenido de materia orgánica, en pérdida por ignición, (6.7 y 7.7%).

3.2 Presencia de EPT

En la tabla 14 se observan los valores obtenidos para una aproximación de la fracción biodisponible de As, Cd, Fe, Mn, Ni, Pb y Zn por el método DTPA-TEA-CaCl₂ en las muestras del sustrato Miracle Grow® y de jales mineros. No se encontraron niveles detectables de As en el sustrato, mientras que en el jal se alcanzaron fracciones biodisponibles de 14.71 mg/kg; se obtuvieron resultados bajos de Cd para ambas muestras, sin embargo, la muestra de jal presentó hasta 30 veces más contenido de este elemento (0.90 mg/kg).

Se encontró un contenido mayor de Fe en el sustrato que en la muestra de jal, siendo de 25.24 y 2.28 mg/kg respectivamente; el contenido de Mn mostró un comportamiento similar con 19.11 y 2.27 mg/kg para el sustrato y el jal, respectivamente. El contenido de Ni en el sustrato (0.11 mg/kg) fue mayor que la concentración en el jal (0.05 mg/kg). La concentración de Pb en el jal (13.61 mg/kg) fue mayor al compararse con la del sustrato (0.38 mg/kg), a su vez, se observó el mismo patrón en el contenido de Zn obteniendo 70.50 mg/kg en la muestra de jal contra 10.92 mg/kg en el sustrato orgánico.

Tabla 14. Concentración encontrada de EPT (mg/kg) en sustrato orgánico y jal para fracciones biodisponibles y extracción BCR para muestra de jal sin tratamiento.

		As	Cd	Fe	Mn	Ni	Pb	Zn
Extracción DTPA-TEA-CaCl₂								
1	Sustrato	ND	0.03 ± 0.0	25.24 ± 1.7	19.11 ± 0.75	0.11 ± 0.15	0.38 ± 0.11	10.92 ± 0.23
2	Jal Minero	14.71 ± 0.73	0.90 ± 0.03	2.28 ± 0.18	2.27 ± 0.08	0.05 ± 0.07	13.61 ± 0.91	70.50 ± 2.12
Extracción BCR Jal Minero								
1	intercambiable y unida a carbonatos	64.16 ± 1.62	7.10 ± 0.35	20.57 ± 0.36	175.31 ± 6.81	0.16 ± 0.93	34.34 ± 1.75	631.57 ± 8.12
2	reducible	707.16 ± 19.14	5.86 ± 0.32	3496.57 ± 31.42	226.36 ± 0.91	5.25 ± 0.80	964.37 ± 22.79	1810.62 ± 27.61
3	materia orgánica	983.63 ± 26.0	8.30 ± 0.36	5680.80 ± 37.68	93.41 ± 9.51	8.64 ± 0.83	68.03 ± 6.60	461.28 ± 32.69
4	residual	12909.39 ± 11.86	18.72 ± 0.35	21040.09 ± 28.27	308.35 ± 19.37	25.05 ± 0.19	474.78 ± 5.38	2100.07 ± 13.06

En la extracción realizada a la muestra de jal por la técnica de BCR se obtuvieron resultados considerablemente mayores que los del método DTPA-TEA-CaCl₂, se obtuvieron hasta 768.32 mg/kg (5.24%) de As en las primeras dos fracciones del método, consideradas como potencialmente biodisponibles, de un total de 14 664.33 mg/kg. Esta concentración excede más de 50 veces la encontrada en el método por DTPA-TEA-CaCl₂. La concentración de Cd hallada en las dos primeras fracciones de BCR fue de 12.99 mg/kg, que corresponde al 32.49% del total extraído (39.98 mg/kg). A su vez, esta concentración excede 14 veces el contenido recuperado por la extracción con DTPA-TEA-CaCl₂.

Se encontraron 3517.14 mg/kg de Fe en las fracciones unida a carbonatos y reducible de la técnica BCR, que corresponden al 11.63% del total encontrado (30238.02 mg/kg). El contenido de Manganeseo extraído en las dos primeras fracciones fue de 401.67 mg/kg, que al igual que en el caso del Hierro excede el contenido encontrado por la extracción DTPA-TEA-CaCl₂, y a su vez, corresponde al 49.99% del total encontrado (803.43 mg/kg).

Para el caso del Ni se obtuvieron hasta 5.41 mg/kg en las 2 primeras fracciones de la técnica BCR (13.82%), de un total de 39.10 mg/kg. El análisis de Pb por la técnica BCR en las fracciones potencialmente movilizables fue de 998.71 mg/kg de un total de 1541.56 mg/kg, esto representa el 64% del total de esta técnica y supera 73 veces la concentración encontrada en la extracción por DTPA-TEA-CaCl₂. Finalmente, se encontraron hasta 2442.19 mg/kg (49%) de Zinc de un total de 5003.54 mg/kg.

Ruiz Olivares *et al.* (2013) realizaron un análisis de la concentración de Ni, Cu, Zn, Mn, Pb y Cd disponible por DTPA-TEA-CaCl₂ en la rizósfera de *R. communis* de 4 sitios distintos del distrito de Zimapán Hidalgo, uno de los cuáles fue el depósito de jales de Santa María; al respecto, se encontraron variaciones significativas en el contenido de Zn de 324.29 a 506 mg/kg, siendo estos valores superiores a la concentración hallada en este trabajo (70.50 mg/kg). En resumen, se observó una mayor concentración de Ni (1.07 a 1.35 mg/kg), Mn (5.55 a 5.89 mg/kg), Pb (51.83 a 54.50 mg/kg) y Cd (3.78 a 4.30 mg/kg) al compararse con los resultados obtenidos en este estudio (Tabla 14), sin embargo, por orden de magnitud, se puede apreciar correspondencia proporcional entre los elementos objetivo, lo cual indica la similitud en la composición mineral de los jales analizados.

La concentración total de elementos para los tratamientos y sus testigos obtenida por el método 3052 de la EPA (1996) puede observarse en la tabla 13. Los valores de Arsénico en los testigos oscilaron entre 7639.35-8400.82 mg/kg, mientras que para los tratamientos variaron de 7202.14 a 9146 mg/kg. El contenido de Cadmio en los testigos tuvo un rango bajo, oscilando entre 21.55-23.19 mg/kg y para los tratamientos presentó variaciones similares de 21.02 a 24.12 mg/kg.

En el caso del Fe, se encontraron concentraciones altas en los tratamientos y sus testigos, en los primeros se halló un rango de 19868.29-23231.98 mg/kg, mientras que en tratamientos se encontró un rango de 17059.039-21896.653 mg/kg. El contenido de Mn tuvo variaciones de 787.82-812.77 mg/kg en los testigos y de 785.82-936.40 mg/kg en los tratamientos. En las concentraciones de Ni se observó una variación de 20.30-28.62 mg/kg en los testigos y de 17.89-27.16 mg/kg en los tratamientos, en estos resultados, se puede notar particularmente una reducción entre las concentraciones totales halladas para los tratamientos de fitoestabilización y sus testigos.

En el análisis de Pb se encontró una variación de 1317.26-1352.03 mg/kg en los testigos, y de 1086.75-1425.18 mg/kg. Finalmente, se encontraron concentraciones altas de Zinc, para el caso de los testigos hubo una variación de 2631.76-3241.24 mg/kg y de 3189.19-3568.52 mg/kg en los tratamientos.

Ruiz Olivares *et al.*, (2013) realizaron un análisis de la concentración total, utilizando $\text{HNO}_3\text{-HClO}_4\text{-H}_2\text{O}_2$ (3:1:1) como agente extractante de Ni, Cu, Zn, Mn, Pb y Cd en rizósfera de *R. communis* creciendo de manera natural en el depósito de jales de Santa María, Zimapán. Al compararse los resultados de dos puntos de muestreo elegidos se observó que el contenido total de Ni (79 y 89 mg/kg), Zn (7379 y 9862 mg/kg), Mn (989 y 1655 mg/kg), Pb (2039 y 2882 mg/kg) y Cd (67 y 92 mg/kg) fue mayor al observado en todas las muestras analizadas en este trabajo (Tabla 15) sin embargo a pesar de las variaciones halladas, debidas a las distintas vetas y composición mineral de una sola mina, se pudo observar correspondencia en la concentración de elementos analizados, lo cual indica la similitud en la composición de los jales mineros analizados. Es de importancia resaltar que, de los 4 sitios analizados por

Ruiz Olivares *et al.* (2013) el depósito de jales de Santa María fue el que presentó las concentraciones más elevadas de EPT.

Romero *et al.* (2008) realizó un análisis de la concentración total de As, Pb, Cu y Zn, utilizando como agente extractante ácido nítrico en horno de microondas de digestión, en 10 muestras del depósito de jales mineros “Cia Zimapán”, Hidalgo. Los valores de los elementos en este trabajo (tabla 15) mostraron correspondencia con el intervalo de concentración hallado de As (3815-40853 mg/kg), Pb (1444-4056 mg/kg) y Zn (2218-17430 mg/kg), no obstante, se observó gran variabilidad en el contenido de elementos de los distintos puntos de muestreo analizados. Adicionalmente en el estudio de Romero *et al.* (2008) se destacó la zona de Zimapán por presentar las concentraciones más altas de As y valores relativamente altos de Pb, Zn y Cr al compararse con los depósitos de jales de Santa Bárbara Chihuahua, Taxco Guerrero y Nacozari Sonora.

Adicionalmente Moreno *et al.* (2012) realizaron un análisis de la concentración total de EPT en las presas de jales de Santa María, San Miguel y el Monte del distrito de Zimapán, hallaron valores promedio superiores de Pb (3934.2 mg/kg), Zn (11363.2 mg/kg), Cd (609.4 mg/kg) y Ni (85.4 mg/kg) a los encontrados en este estudio (tabla 15).

Tabla 15. Concentración de EPT obtenida (mg/kg de masa seca) mediante extracción total por el método EPA 3052 (1996).

	As	Cd	Fe	Mn	Ni	Pb	Zn
Testigo Jal	8400.82 ± 26.5	22.54 ± 3.0	21638.88 ± 41.9	787.82 ± 22.9	25.23 ± 0.6	1352.03 ± 57.0	2631.76 ± 16.0
T J+S M	10270.17 ± 30.0	23.19 ± 2.6	23231.97 ± 21.1	812.77 ± 35.9	28.62 ± 2.4	1351.91 ± 54.9	3241.24 ± 58.1
T J+S SM	7639.35 ± 24.3	21.54 ± 2.0	19868.29 ± 12.9	798.32 ± 41.7	20.50 ± 2.1	1317.26 ± 17.2	3233.81 ± 53.8
MC 173 M	9146.83 ± 8.5	22.35 ± 2.8	21896.65 ± 61.3	785.82 ± 4.7	27.16 ± 3.0	1086.75 ± 48.5	3189.19 ± 49.0
MC 101 M	8331.94 ± 15.5	24.12 ± 2.5	19984.16 ±41.9	792.637 ± 15.1	20.74 ± 3.1	1326.67 ± 8.85	3568.52 ± 41.0
MC 173 SM	7202.14 ± 1.2	22.32 ± 3.3	20222.21 ± 31.8	936.39 ± 33.5	23.89 ± 0.3	1425.180 ± 12.3	3334.70 ± 57.0
N16 SM	7238.11 ± 48.6	21.02 ± 2.7	17059.04 ± 26.58	785.84 ± 38.8	17.89 ± 2.0	1103.89 ± 10.1	3515.80 ± 22.0

SD=desviación estándar; n=2.

El orden de relevancia de los elementos por magnitud es: Fe>As>Zn>Pb>Mn>Ni>Cd. Para el caso de Ni y Cd se encontraron valores similares para ambos, pero la determinación anterior se basó en el valor más alto encontrado para cada elemento en todas las muestras analizadas.

3.2.1 Análisis de Especiación de Arsénico

En la tabla 16 se presenta la concentración obtenida en las muestras de tratamiento con cepas y sus testigos por los tres métodos de extracción química secuencial utilizado.

Técnica BCR

En la figura 3 se presentan las contribuciones en porcentaje de cada fracción considerada por el método de BCR en la especiación de Arsénico. Se logró recuperar un rango de 106.84-187.55% del elemento en contraste con la concentración obtenida de la extracción total (EPA, 1996).

En la fracción intercambiable y unida a carbonatos se encontró una contribución al contenido total de As del 0.93-2.70%. En el testigo del tratamiento con jal y sustrato mezclados se encontró una concentración de 179,71 mg/kg, y en sus tratamientos, *Klebsiella* MC173 y *Enterobacter* MC101, se observó una disminución en el contenido con 146.58 mg/kg y 153.80 mg/kg respectivamente. En el testigo del tratamiento con jal y sustrato sin mezclar se obtuvo una concentración de 220.26 mg/kg, ligeramente mayor a la encontrada en el testigo de jal y *R. communis* (210.32 mg/kg), para sus respectivas cepas hubo un cambio similar en el tratamiento con *Escherichia* N16 (152.71 mg/kg), no siendo así con el tratamiento con *Klebsiella* MC173 que mostró cambios mínimos en la distribución de esta fase con 210.92 mg/kg.

Finalmente, el tratamiento testigo de jal e higuera (sin inóculo bacteriano) presentó una concentración similar a la de los otros testigos (210.33 mg/kg), no obstante, difiere con la obtenida en la muestra de jal sin ningún tipo de tratamiento (64.16 mg/kg), cuyo aporte a la concentración total obtenida es aproximadamente la mitad a la encontrada en el resto de las extracciones (0.44%).

Tabla 16. Concentración de As (mg/kg de masa seca) encontrada en las muestras por las técnicas de extracción química secuencial.

Fracción		Testigo Jal	T J+S M	T J+S S/M	MC173 M	MC101 M	MC173 S/M	N16 S/M
Técnica 1. BCR								
F_{BCR1}	Intercambiable y unida a carbonatos	210.33 ± 5.4	179.71 ± 5.4	220.26 ± 12.6	146.58 ± 7.2	153.80 ± 20.2	210.92 ± 20.2	152.71 ± 16.8
F_{BCR2}	Reducible	1029.08 ± 22.5	884.19 ± 12.3	506.66 ± 0.7	1079.05 ± 6.0	746.16 ± 9.4	703.66 ± 3.5	939.97 ± 3.9
F_{BCR3}	Materia orgánica	1073.58 ± 35.7	530.92 ± 16.0	353.04 ± 23.0	740.76 ± 48.5	604.75 ± 18.4	488.57 ± 28.0	1038.31 ± 34.5
F_{BCR4}	Residual	13442.95 ± 47.0	9815.55 ± 58.5	7081.76 ± 9.3	13855.50 ± 18.2	8093.28 ± 37.5	7531.47 ± 47.7	10980.94 ± 15.8
Σ(F_{BCR1}~F_{BCR4})		15755.93 ± 28.4	11410.38 ± 57.0	8161.72 ± 44.5	15821.89 ± 65.5	9597.99 ± 45.1	8934.62 ± 43.4	13111.93 ± 71.0
Porcentaje de Recuperación		187.55 ± 0.9	111.10 ± 0.9	106.84 ± 0.2	172.98 ± 0.9	115.20 ± 0.8	124.06 ± 0.6	181.16 ± 2.2
Técnica 2. Hall								
F_{H1}	Absorbida/ intercambiable/ carbonatos	133.19 ± 1.0	101.99 ± 10.2	112.94 ± 6.6	119.65 ± 4.2	130.94 ± 10.9	98.22 ± 2.1	82.23 ± 0.6
F_{H1.2}	Absorbida/ intercambiable/ carbonatos II	64.50 ± 4.7	55.09 ± 6.3	68.45 ± 3.3	66.34 ± 5.0	57.09 ± 0.3	57.49 ± 4.3	83.75 ± 8.7
F_{H2}	Oxihidróxidos de Fe	216.80 ± 32.6	152.21 ± 22.2	212.39 ± 16.9	194.42 ± 6.6	162.85 ± 7.5	152.44 ± 2.9	248.45 ± 15.5
F_{H2.2}	Oxihidróxidos de Fe II	163.42 ± 19.8	147.58 ± 22.2	145.68 ± 12.4	145.42 ± 8.1	156.74 ± 46.4	168.04 ± 12.2	170.59 ± 15.5
F_{H3}	Óxidos de Fe	1439.42 ± 36.5	1437.82 ± 18.6	1228.42 ± 19.1	1424.95 ± 21.5	1337.82 ± 27.7	1253.51 ± 3.4	1233.03 ± 48.1
F_{H3.2}	Óxidos de Fe II	51.00 ± 2.0	53.10 ± 1.2	43.57 ± 11.6	48.74 ± 0.8	38.28 ± 0.3	50.43 ± 12.4	55.65 ± 4.4
F_{H4}	Materia orgánica	14452.67 ± 33.0	13472.51 ± 45.3	10271.98 ± 0.6	11623.33 ± 35.0	11702.06 ± 13.1	12665.21 ± 30.9	11520.22 ± 35.3

Fracción		Testigo Jal	T J+S M	T J+S S/M	MC173 M	MC101 M	MC173 S/M	N16 S/M
F_{H5}	Residual	611.84 ± 4.6	311.25 ± 15.6	287.35 ± 1.0	113.97 ± 8.6	84.65 ± 17.0	83.99 ± 4.0	105.87 ± 9.2
Σ(F_{H1}~F_{H5})		17132.83 ± 46.3	27916.24 ± 138.0	12370.78 ± 46.5	13736.82 ± 30.6	13670.43 ± 41.6	14529.33 ± 18.7	13499.79 ± 40.7
Porcentaje de Recuperación		203.94 ± 0.1	271.82 ± 2.1	161.93 ± 0.1	150.18 ± 0.2	164.07 ± 0.8	201.73 ± 0.3	186.52 ± 1.8
Técnica 3. Urbina								
F_{U1}	Soluble	19.09 ± 0.1	14.88 ± 0.7	18.05 ± 0.1	16.59 ± 2.8	19.00 ± 0.5	12.30 ± 0.5	14.64 ± 2.0
F_{U2}	Intercambiable	17.57 ± 0.8	11.13 ± 0.7	15.14 ± 0.3	14.23 ± 1.7	15.89 ± 3.2	11.75 ± 2.3	12.25 ± 0.0
F_{U3}	Carbonatos	309.41 ± 15.3	193.94 ± 12.2	414.56 ± 15.2	282.49 ± 1.1	201.65 ± 14.4	263.51 ± 9.1	423.84 ± 15.3
F_{U4}	Oxihidróxidos de Fe	243.73 ± 4.0	214.32 ± 23.2	252.02 ± 13.3	241.34 ± 21.1	247.83 ± 29.3	182.80 ± 20.1	210.35 ± 0.6
F_{U5}	Óxidos de Fe	523.29 ± 12.4	655.82 ± 0.4	519.05 ± 4.0	569.06 ± 5.8	615.50 ± 5.6	527.54 ± 5.6	650.37 ± 40.0
F_{U6}	Materia orgánica	2960.80 ± 33.9	2733.83 ± 60.3	3082.59 ± 69.9	2707.68 ± 142.2	1938.11 ± 47.6	2668.84 ± 39.5	2035.69 ± 156.3
F_{U7}	Sulfuros	7365.85 ± 33.4	8324.59 ± 162.0	6065.18 ± 114.3	6631.61 ± 49.9	5303.52 ± 41.4	6891.61 ± 13.8	8698.42 ± 41.0
F_{U8}	Residual	138.90 ± 0.5	54.37 ± 18.2	53.84 ± 3.1	38.79 ± 0.4	68.50 ± 10.7	42.31 ± 4.6	51.60 ± 1.8
Σ(F_{U1}~F_{U8})		11578.62 ± 60.7	12202.88 ± 130.48	10420.44 ± 66.01	10501.78 ± 113.6	8410.00 ± 140.5	10600.67 ± 67.9	12097.15 ± 252.9
Porcentaje de Recuperación		137.83 ± 1.2	188.82 ± 0.9	136.41 ± 1.3	114.81 ± 1.35	100.93 ± 1.5	147.19 ± 0.9	167.15 ± 4.6

T=Testigo, J+S= Jal y sustrato, M=Mezclados, S/M=Sin mezclar; n=2.

En la fracción reducible se obtuvo una contribución porcentual del 6.21-7.88%. En el testigo de jal y sustrato mezclados se obtuvo una concentración de As de 884.19 mg/kg, en sus respectivos tratamientos se observó un aumento en el de la cepa *Klebsiella* MC173 con 1079.05 mg/kg, al contrario de la cepa M101, que manifestó una disminución con 746.16 mg/kg. Para el testigo sin mezcla se observó una concentración de 506.66 mg/kg, menor a la del otro testigo, y aumentos en ambos tratamientos con *Klebsiella* MC173 y *Escherichia* N16 con 703.66 y 939.97 mg/kg respectivamente.

En esta fracción el tratamiento con la cepa *Klebsiella* MC173 pareció presentar la misma movilidad en el contenido de As en ambas variantes del experimento. En el testigo de jal con higuerrilla se observó una concentración más alta en contraste a los otros dos realizados (1029 mg/kg), adicionalmente este valor es mayor al encontrado en la muestra de jal sin ningún tratamiento de 707.155 mg/kg.

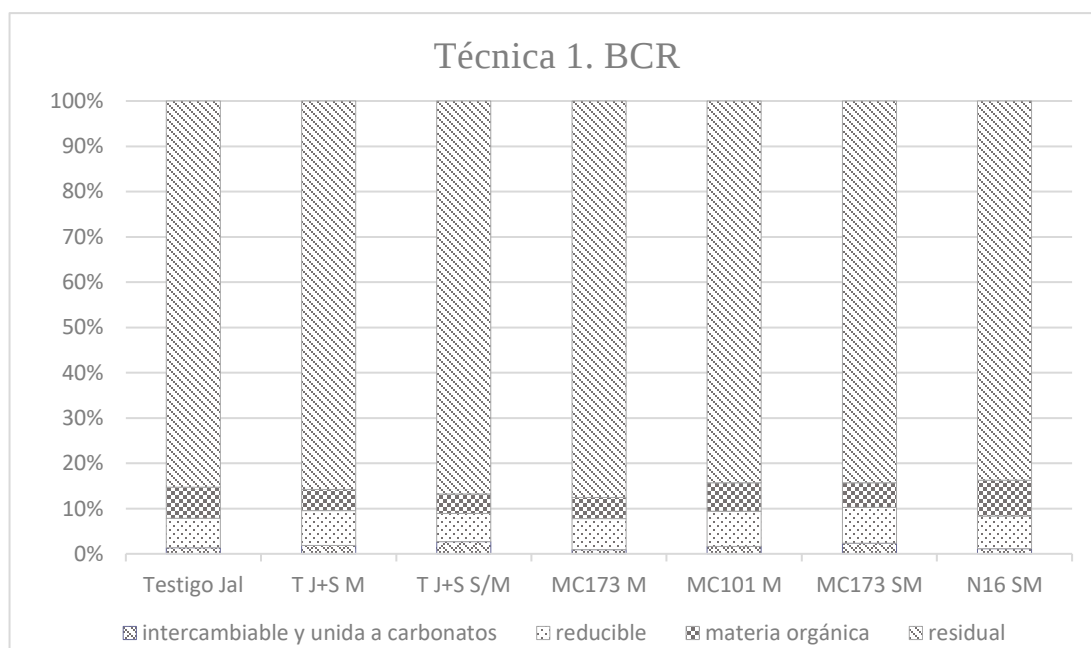


Figura 3. Distribución porcentual de As en la técnica BCR

En la fracción unida a materia orgánica se observó una variación mayor en la distribución porcentual que fue del 4.33 al 7.92% entre todas las muestras. En el ensayo

realizado con jal e higuierilla se encontró una concentración de 1073.58 mg/kg, mayor a la encontrada en la muestra sin tratamiento de 883.63 mg/kg.

En el experimento testigo con mezcla de jal y sustrato se lograron extraer 530.92 mg/kg concentraciones mayores en los experimentos con cepas, siendo de 740.76 mg/kg (*Klebsiella* MC173) y 604.75 mg/kg (*Enterobacter* MC101). En los tratamientos sin mezclar se observó una movilidad similar, el testigo presentó 353.04 mg/kg y los tratamientos con *Klebsiella* MC173 y *Escherichia* N16 presentaron 488.57 mg/kg y 1038.31 mg/kg respectivamente. En los tratamientos con la cepa *Escherichia* N16 se pudo observar una mayor movilización en comparación al resto, en esta fracción.

La fracción residual, también conocida como unida a silicatos, presentó el mayor porcentaje de As con un rango del 83.74 al 87.57%. En la muestra sin tratamiento se encontraron 12909.39 mg/kg, siendo, igual que en el resto de las fracciones menor al de los tratamientos, en el ensayo testigo jal con higuierilla se 13442.95 mg/kg. En el tratamiento con jal y sustrato mezclados se encontraron 9815 mg/kg en el testigo, 13855.50 y 8093.28 mg/kg en los de las cepas *Klebsiella* MC173 y *Enterobacter* MC101, respectivamente. En el testigo del tratamiento sin mezcla se encontraron 7081.76 mg/kg y en los tratamientos con *Klebsiella* MC173 y *Escherichia* N16 7531.47 mg/kg y 10980.94 mg/kg, respectivamente.

Técnica Hall

En la figura 4 se presenta la distribución porcentual de las distintas fracciones por el método propuesto por Hall *et al.* (1995), con esta técnica se logró recuperar del 150.18 al 271.82% del Arsénico recuperado por la técnica 3052 (EPA,1996), este porcentaje de recuperación es mayor al obtenido con la técnica de BCR. En la metodología propuesta por Hall *et al.* (1995) los tres primeros pasos fueron aplicados por segunda vez con el objetivo de evaluar el porcentaje de recuperación de los reactivos empleados. El fraccionamiento de elementos fue observado como sigue.

En la fracción absorbida, intercambiable y unida a carbonatos (AIC) para los dos ataques se obtuvo un contenido porcentual del 0.99-1.47%. El segundo ataque resultó tener alta efectividad, pues con este se logró recuperar del 43.60-101.84% del contenido extraído

en la primera aplicación de NaOAc 1.0 M . El contenido de As encontrado en el testigo realizado con jal e higuierilla (197.69 mg/kg) resultó ser ligeramente mayor al compararse con los otros testigos.

El testigo del tratamiento con mezcla presentó 157.09 mg/kg de As, y los tratamientos 185.99 y 188.03 mg/kg con *Klebsiella* MC173 y *Enterobacter* MC101, respectivamente, para ambos tratamientos. En el experimento sin mezcla se obtuvo una concentración de 181.39 mg/kg en el testigo y de 155.71 y 165.98 mg/kg para los tratamientos con *Klebsiella* MC173 y *Escherichia* N16 respectivamente, en ambos casos hubo una disminución en el contenido de As.

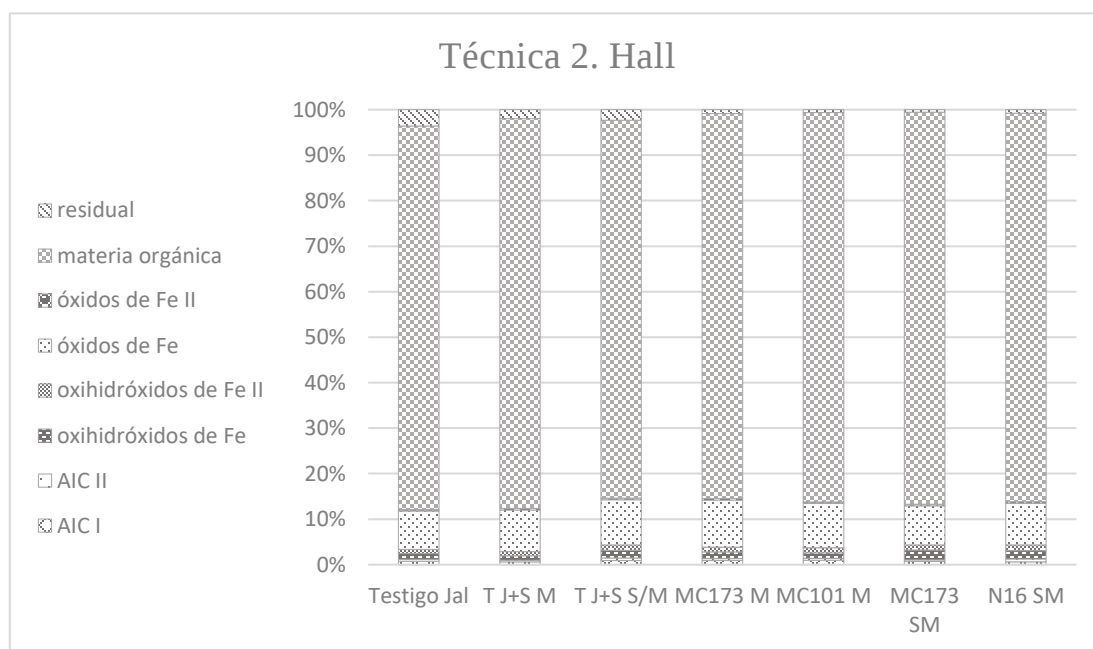


Figura 4. Distribución porcentual de As en la técnica Hall.

En la fracción unida a oxihidróxidos de Fe se halló una contribución porcentual del 1.90 al 3.32% del total extraído, a su vez, la segunda aplicación de clorhidrato de hidroxilamina 0.25 M en esta fracción resultó recuperar del 52.51 al 96.96% del As extraído en el primer ataque. En el testigo de jal e higuierilla se encontraron en promedio 380.21 mg/kg.

En el testigo del tratamiento con jal y sustrato mezclados se hallaron 299.79 mg/kg, y los respectivos tratamientos con *Klebsiella* MC173 y *Enterobacter* MC101 presentaron 339.84 y 319.59 mg/kg, respectivamente, esta movilidad fue similar a la de la fracción anterior en estos dos tratamientos. En el caso de los tratamientos que usaron jal y sustrato sin mezclar, en el testigo se hallaron 358.07 mg/kg, mientras que los tratamientos con *Klebsiella* MC173 y *Escherichia* N16 presentaron 488.04 mg/kg y 419.04 mg/kg, respectivamente.

En la fracción unida a óxidos de Fe se halló del 8.70 al 10.73% de la concentración total recuperada por el fraccionamiento. En esta fracción la segunda aplicación de $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ 1.0 M presentó aportaciones mínimas, que fueron del 2.61 al 4.51% de la primera extracción. En el testigo de tratamiento con jal e higuerilla se encontraron 1490.43 mg/kg. En el testigo de los tratamientos de jal y sustrato mezclados se detectaron 1490.92 mg/kg y en los tratamientos con los inóculos de *Klebsiella* MC173 y *Enterobacter* MC101, se encontraron 1473.69 mg/kg y 1376.10 mg/kg, en ambos tratamientos disminuyó el contenido de As esta fracción. En los ensayos sin mezcla el testigo presentó 1271.99 mg/kg, 1303.94 con *Klebsiella* MC173 y 1288.68 mg/kg con *Escherichia* N16.

En la fracción unida a materia orgánica y sulfuros, se encontró la mayor contribución porcentual de la mayoría de las muestras, oscilando del 83.03 al 86.18%. En el testigo con jal e higuerilla se recuperaron hasta 14452.67 mg/kg. En el testigo del tratamiento con jal y sustrato mezclados se encontró un contenido de Arsénico de 13472.51 mg/kg, y para los tratamientos *Klebsiella* MC173 y *Enterobacter* MC101 se observó una disminución en el contenido de As con 11623.33 mg/kg y 11702.06 mg/kg respectivamente. En el testigo de los tratamientos sin mezcla se encontró una concentración de 10271.98 mg/kg y en los ensayos con inóculos bacterianos se encontraron aumentos con las cepas *Klebsiella* MC173 y *Escherichia* N16 donde se detectaron en promedio 12665.21 y 11520.220 mg/kg respectivamente.

En la fracción residual se encontró un aporte porcentual de 0.57-3.57% del total extraído. En el testigo de tratamiento de jal con higuerilla se encontraron 611.84 mg/kg. En el tratamiento con mezcla se encontraron 311.25 mg/kg en el testigo, 113.97mg/kg de As en el inóculo *Klebsiella* MC173 y 84.65 mg/kg con la cepa *Enterobacter* MC101. En el

tratamiento sin mezcla se encontraron 287.35 mg/kg en el testigo; en los tratamientos con la cepas *Klebsiella* MC173 y *Escherichia* N16 se hallaron 83.99 y 105.87 mg/kg, respectivamente.

Técnica Urbina

La extracción química secuencial sugerida por Urbina Trinidad (2015) logró recuperar del 100.93 al 167.13% del contenido de As hallado por el método 3052 de la EPA (1996). En la figura 5 se presenta la distribución porcentual de Arsénico en las muestras analizadas. En la fracción soluble se encontró una contribución porcentual baja del 0.11-0.23%. En el testigo con jal e higuierilla se encontraron 19.09 mg/kg; en el ensayo con jal y sustrato mezclados se encontró una concentración de 14.88 mg/kg en el testigo, de 16.59 mg/kg en el tratamiento con la cepa *Klebsiella* MC173 y de 19.00 mg/kg con la cepa *Enterobacter* MC101. En el tratamiento sin mezcla se encontraron 18.05 mg/kg en el testigo, con las cepas *Klebsiella* MC173 y *Escherichia* N16 se observó una pequeña reducción en el contenido, de 12.30 mg/kg y 14.64 mg/kg, respectivamente.

En la fracción intercambiable se observó una aportación pequeña (al igual que la fracción soluble), con un intervalo del 0.09-0.19%. En el testigo de higuierilla y jal se observó una concentración de 17.57 mg/kg. En el experimento con jal y sustrato mezclados se encontraron 11.13 mg/kg en el testigo y 14.23 y 15.89 mg/kg de As en los ensayos con las cepas *Klebsiella* MC173 y *Enterobacter* MC101, respectivamente. En el tratamiento con jal y sustrato sin mezclar se encontraron 15.14 mg/kg en el testigo, y para el diseño con las cepas *Klebsiella* MC173 y *Escherichia* N16 se encontraron 11.75 y 12.25 mg/kg, respectivamente.

En la fracción unida a carbonatos se encontró una contribucion porcentual del 1.59 al 3.98%. Los cambios en los tratamientos y sus testigos se observaron como sigue: en el testigo de higuierilla y jal se hallaron 309.41 m/kg. En el testigo del tratamiento con mezcla se hallaron 193.94 mg/kg, y con las cepas *Klebsiella* MC173 y *Enterobacter* MC101 se observó un aumento en la concentración de As con 282.49 y 201.65 mg/kg, evidentemente el cambio más significativo se observó en la cepa *Klebsiella* MC173. En el tratamiento sin mezclar el testigo presentó 414.56 mg/kg, y mientras que el tratamiento con *Klebsiella* MC173 presentó

una disminución con 263.51 mg/kg, el tratamiento con la cepa *Escherichia* N16, mostró un ligero aumento con 423.84 mg/kg.

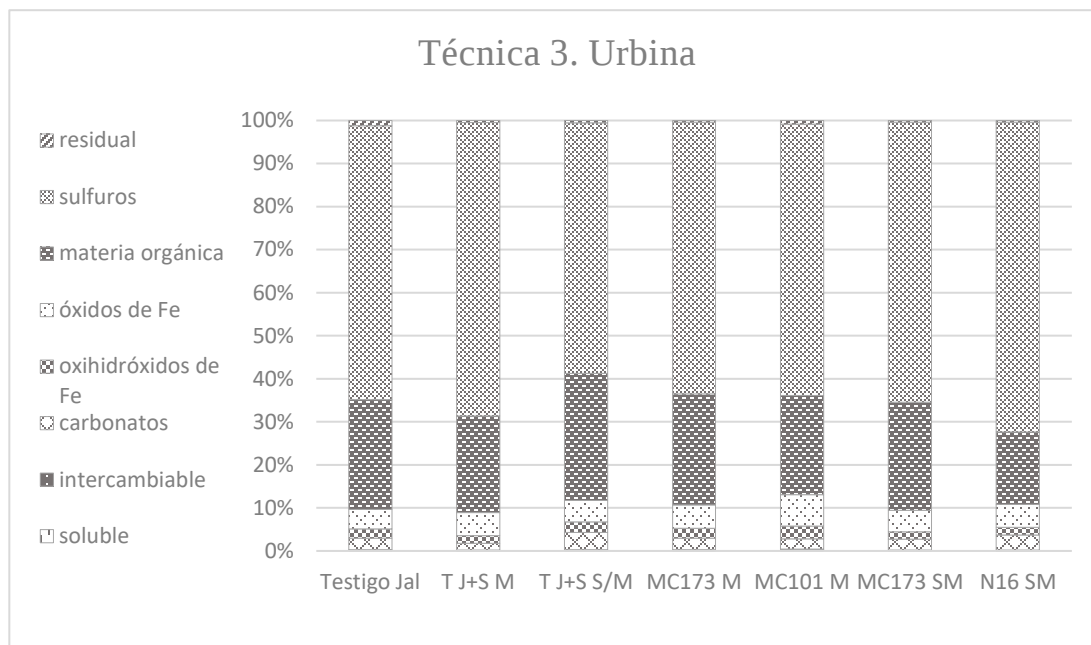


Figura 5. Distribución porcentual de As en la técnica Urbina.

La fracción unida a oxihidróxidos de Fe presentó una contribución del 1.72-2.95% a la concentración total de As hallada con esta técnica. En el testigo de jal e higuierilla se encontró un contenido de 243.73 mg/kg de As. Adicionalmente, en los tratamientos con jal y sustrato mezclados se encontró una concentración de 214.32 mg/kg en el testigo y se observó un aumento de 241.34 y 247.83 mg/kg con las cepas *Klebsiella* MC173 y *Enterobacter* MC101 respectivamente. Finalmente en el tratamiento con jal y sustrato sin mezclar se obtuvo una concentración de 252.02 mg/kg en el testigo y en los tratamientos con las cepas *Klebsiella* MC173 y *Enterobacter* MC101 se detectaron 182.80 y 210.35 mg/kg de As, respectivamente.

La fracción unida a óxidos de Fe, presentó una contribución ligeramente mayor a las anteriores, con un rango de aportación de 4.51-7.32% al total recuperado por esta técnica. En el testigo realizado con higuierilla y jal se encontró una concentración de 523.29 mg/kg. En el tratamiento realizado con jal y sustrato mezclados se encontró una concentración de 655.82

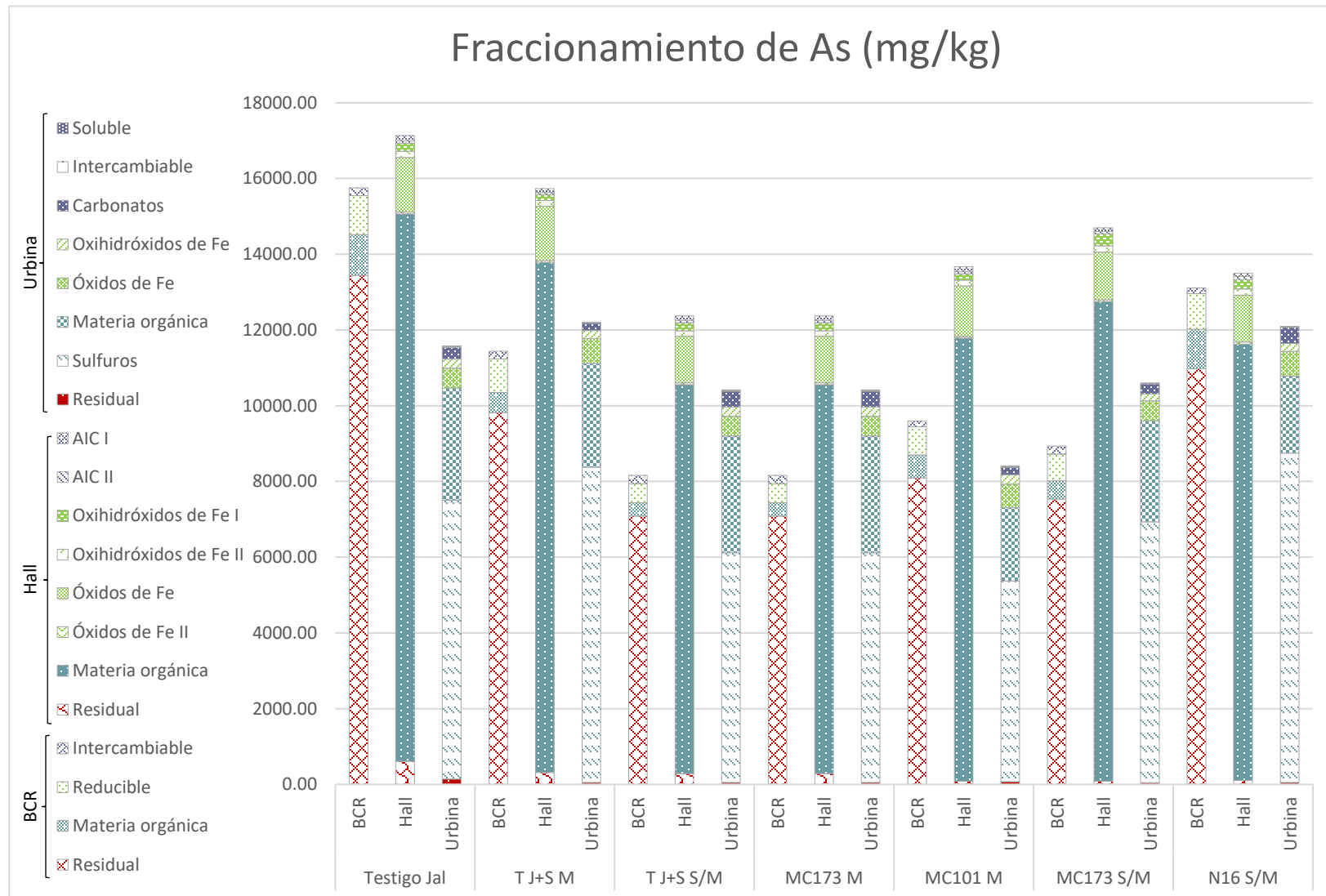
mg/kg en el testigo; en los tratamientos con inóculos se observó disminución en la concentración, la cepa *Klebsiella* MC173 presentó 569.06 mg/kg y la cepa *Enterobacter* MC101 presentó 615.50 mg/kg. El testigo de los tratamientos sin mezcla tuvo 519.05 mg/kg y se notó un aumento en el contenido de As con la cepa *Escherichia* N16 de 650.37 mg/kg, finalmente la cepa *Klebsiella* MC173 presentó un aumento pequeño en la concentración de As en esta fracción con 527.54 mg/kg.

La fracción unida a materia orgánica presentó un aporte al contenido total obtenido por esta metodología del 16.82-29.58%. El ensayo realizado con jal e higuierilla presentó una concentración de 2960.8 mg/kg. Por otro lado, el análisis en la muestra testigo de jal y sustrato mezclados mostró 2733.83 mg/kg; la cepa *Klebsiella* MC173 presentó una pequeña disminución en el contenido de As (2707.68 mg/kg), asimismo, la cepa *Enterobacter* MC101 tuvo una disminución mayor (1938.11 mg/kg). El testigo de los tratamientos sin mezcla presentó 3082.39 mg/kg, mientras que los tratamientos *Klebsiella* MC173 y *Escherichia* N16 presentaron disminuciones con 2668.84 y 2035.69 mg/kg, respectivamente.

En la fracción unida a sulfuros se obtuvo una contribución porcentual de 58.20-71.90%. En el tratamiento con jal e higuierilla se encontró una concentración de 7365.85 mg/kg. En el testigo con jal e higuierilla mezclados se encontraron 8324.59 mg/kg y en los tratamientos con *Klebsiella* MC173 y *Escherichia* N16 se hallaron concentraciones menores (6631.61 y 5303.52 mg/kg, respectivamente). En el ensayo con jal e higuierilla sin mezclar se hallaron 6065.18 mg/kg en el testigo; en los tratamientos con *Klebsiella* MC173 y *Escherichia* N16 se detectaron en promedio 6891.61 y 8698.42 mg/kg.

Finalmente, en la fracción residual se encontró un porcentaje del 0.36-1.2%. En el experimento realizado con jal e higuierilla se encontró una concentración de 138.90 mg/kg. En el testigo con jal y sustrato mezclados se encontró una concentración de 54.37 mg/kg, y en los tratamientos con *Klebsiella* MC173 y *Enterobacter* MC101 se encontraron 38.79 mg/kg y 68.50 mg/kg, respectivamente. En el diseño experimental con jal y sustrato sin mezclar, se encontraron 53.84 mg/kg en el testigo, en los tratamientos con los inóculos bacterianos *Klebsiella* MC173 y *Escherichia* N16 se hallaron 42.31 y 51.60 mg/kg, respectivamente.

Figura 6. Fraccionamiento de Arsénico con las técnicas BCR, Hall y Urbina.



Comparación de Técnicas

De las tres técnicas de extracción química secuencial realizadas se obtuvo el orden de recuperación Hall>BCR>Urbina. Al comparar el contenido de As obtenido en las muestras se observó que el LMP establecido por la NOM-157-SEMARNAT-2009 (100 mg/kg) fue rebasado pues el valor mínimo obtenido en la sumatoria de los fraccionamientos fue de 7202.14 mg/kg y el valor máximo de 10270.17 mg/kg; estos valores también rebasan el LMP establecido por la NOM-147-SEMARNAT-2004 para suelos de tipo industrial que han sido contaminados (260 mg/kg).

Se ha reportado que en suelos no contaminados la concentración de As varía de 0.1 a 50 µg/g y que en dosis de hasta 0.05 mg As/kg/día durante periodos largos se manifiestan daños gastrointestinales, hepáticos, dermicos y neutológicos en humanos (ATSDR, 2007). Por lo anterior, debido a las concentraciones de As halladas, estos representan un alto riesgo para el equilibrio ambiental y la salud.

El contenido de As presente en las muestras se puede atribuir a las menas características de la región, de las cuales destaca la arsenopirita (FeAsS), esta a su vez se encuentra asociada a silicatos, pirita (FeS₂) y marcasita (FeS₂) y por orden estructural a Au, Ag, Sb, Hg, U, Br, Mo, Sn y Cu (Moreno *et al.*, 2009; Moreno *et al.*, 2012).

Wan, Dong, Feng, Lin & Luo (2012) realizaron una comparación de técnicas de fraccionamiento de As en jales del área minera de Shimen realgar, China. De las técnicas realizadas destacan las propuestas por Tessier *et al.* (1979) y BCR (Rauret *et al.*, 1999), la concentración total de Arsénico osciló de 22 mg/kg a 2462 mg/kg, menor a los valores encontrados en este estudio. En cuanto al fraccionamiento con Tessier se obtuvo un porcentaje de recuperación del 72.2 al 123%, el cual fue menor al porcentaje de recuperación hallado con la adaptación de Urbina Trinidad (2015) al método. En la técnica de extracción BCR se halló un rango de recuperación del 73.4 al 102%, que también fue menor al hallado en este trabajo.

Tlustos, Száková, Stárková, & Pablíková (2005) sugieren la aplicación de técnicas de extracción secuencial específicas para el análisis de Arsénico debido a sus propiedades

químicas, al respecto se han revisado las técnicas sugeridas por Wenzel *et al.*, (2001); Azcue *et al.*, (1994) y Shiowatana, Lopez-Sanchez, & Rubio, R. (2001).

En la figura 6 se presenta el agrupamiento de las fracciones en 4 categorías representativas: fracción intercambiable (F_{BCR1} , $F_{H1}+F_{H1.2}$, $F_{U1}+F_{U2}+F_{U3}$) en color añil, reducible (F_{BCR2} , $F_{H2}+F_{H2.2}+F_{H3}+F_{H3.2}$, $F_{U4}+F_{U5}$) en color verde claro, oxidable (F_{BCR3} , F_{H4} , $F_{U6}+F_{U7}$) con verde azulado, y residual (F_{BCR4} , F_{H5} , F_{U8}) en rojo oscuro, esta distribución fue utilizada para comparar las técnicas.

El búffer de ácido acético/acetato de sodio usado por Tessier *et al.* (1979) en la técnica propuesta por Urbina, (utilizada también por Hall *et al.*, 1995) y el ácido acético del método BCR (Rauret *et al.*, 1999) pueden promover la disolución de arcillas y la mayoría de los carbonatos en el suelo, al respecto, el acetato puede prevenir la re-absorción o precipitación de los iones de Arsénico liberados, sin embargo, como se ha probado por los autores (Tessier *et al.*, 1979; Favas *et al.*, 2011; Wan *et al.*, 2012) estos reactivos son preferentemente aptos para cationes que aniones. De esta forma, para la solubilización de las especies aniónicas se recomienda el uso de una solución alcalina de bicarbonato de sodio (pH= 9.0) (Shiowatana *et al.*, 2001). De cualquier modo, las tres técnicas usadas permitieron estimar el riesgo asociado a la movilidad del Arsénico presente en los jales analizados.

En la fracción reducible, se encontró la mayor concentración de As en la técnica propuesta por Hall *et al.* (1995), específicamente en la fracción unida a óxidos de Fe, extraída con $NH_2OH \cdot HCl$ 1M, se encontró al As preferentemente asociado a óxidos que a oxihidróxidos. Al respecto, Wan *et al.*, (2012) atribuyen los porcentajes relativamente bajos de extracción a la poca disolución de oxihidróxidos/óxidos de Fe y Mn, no obstante, se sabe que la disolución de estos materiales incrementa al aumentar la concentración del reactivo, el tiempo de retención, o reduciendo el pH (Hall *et al.*, 1995). Debido a los inconvenientes del uso del clorhidrato de hidroxilamina Shiowatana *et al.*, (2001) proponen el uso de NaOH para obtener mayor eficiencia en la extracción de As, aunque este reactivo puede disolver parte de la materia orgánica, liberando una porción del As unido a esta fracción bajo ciertas condiciones. Drahota *et al.*, (2014) proponen el uso de $NH_4H_2PO_4$ para extraer el As

incorporado a óxidos amorfos y arsenatos, pues las soluciones de fofafos son eficientes en la extracción del As presente en suelos, sedimentos y jales.

Los métodos BCR y Urbina utilizan H_2O_2 en la extracción del Arsénico oxidable. Algunos estudios (Tessier *et al.*, 1979; Tlustos *et al.*, 2005) han comprobado que este reactivo no solamente destruye materia orgánica, también disuelve algunos sulfuros secundarios. Así, las fracciones oxidables por ambas técnicas son una combinación entre materia orgánica y sulfuros. En adición, el uso de $KClO_3/HCl/HNO_3$ en el método Urbina (Hall *et al.*, 1995) reveló que la mayor parte de la fracción oxidable del Arsénico se encuentra unida a sulfuros primarios y no a materia orgánica (Wan *et al.*, 2012).

La fracción residual recuperada con el método Urbina, es comparable con el método Hall, ambas son significativamente menores al contenido de Arsénico hallado en el método BCR debido a que gran parte de los sulfuros de la fracción oxidable permanecieron en la fracción residual de esta técnica por la falta de selectividad del H_2O_2 al completar la disolución de estos minerales.

3.2.2 Análisis de Especiación de Cadmio

En la tabla 17 se presenta la concentración recuperada de Cadmio (mg/kg) por las tres metodologías de extracción química secuencial realizadas.

Técnica BCR

En la gráfica figura 7 se muestra la distribución porcentual de Cadmio encontrada en las muestras para las diferentes fracciones contempladas por la técnica BCR. Con este método se logró un porcentaje de recuperación del 84.61-136.50% con respecto al contenido hallado en la técnica de extracción total de la EPA (1996).

Tabla 17. Concentración de Cd (mg/kg de masa seca) encontrada en las muestras por las técnicas de extracción química secuencial.

Fracción		Testigo Jal	T J+S M	T J+S S/M	MC173 M	MC101 M	MC173 S/M	N16 S/M
Técnica 1. BCR								
F_{BCR1}	Intercambiable y unida a carbonatos	7.79 ± 0.2	7.59 ± 1.3	7.07 ± 0.5	4.62 ± 0.4	5.13 ± 0.3	8.60 ± 0.4	7.00 ± 0.5
F_{BCR2}	Reducible	7.88 ± 0.5	6.76 ± 0.3	3.95 ± 0.2	7.67 ± 0.9	5.56 ± 0.4	4.58 ± 0.2	7.59 ± 0.1
F_{BCR3}	Materia orgánica	3.75 ± 0.9	4.16 ± 0.6	4.01 ± 0.8	3.07 ± 0.9	3.11 ± 0.7	3.86 ± 0.9	7.34 ± 0.1
F_{BCR4}	Residual	9.41 ± 0.7	7.20 ± 1.2	7.35 ± 1.4	7.31 ± 0.6	6.56 ± 0.4	6.48 ± 0.29	6.62 ± 0.9
Σ(F_{BCR1}~F_{BCR4})		28.83 ± 0.2	25.71 ± 2.9	22.38 ± 2.9	22.66 ± 2.7	20.36 ± 1.3	23.51 ± 0.5	28.55 ± 1.5
Porcentaje de Recuperación		129.13 ± 18.1	110.86 ± 0.0	103.69 ± 3.8	101.44 ± 0.6	84.61 ± 3.6	106.32 ± 13.4	136.50 ± 10.6
Técnica 2. Hall								
F_{H1}	Absorbida/intercambiable/ carbonatos	4.74 ± 0.3	4.83 ± 0.8	4.24 ± 0.0	4.56 ± 0.3	4.85 ± 0.4	4.83 ± 0.2	4.26 ± 0.1
F_{H1.2}	Absorbida/intercambiable/ carbonatos II	2.07 ± 0.2	1.36 ± 0.4	2.08 ± 0.2	2.09 ± 0.2	1.49 ± 0.1	1.78 ± 0.1	2.62 ± 0.3
F_{H2}	Oxihidróxidos de Fe	5.54 ± 1.3	3.91 ± 0.9	5.66 ± 1.0	5.44 ± 0.8	4.38 ± 1.0	3.34 ± 0.1	5.92 ± 0.1
F_{H2.2}	Oxihidróxidos de Fe II	4.40 ± 0.0	3.31 ± 0.1	1.64 ± 0.4	2.11 ± 0.6	2.31 ± 1.0	3.87 ± 0.1	2.03 ± 0.1
F_{H3}	Óxidos de Fe	3.09 ± 0.5	3.39 ± 0.5	2.37 ± 0.1	3.51 ± 1.3	2.73 ± 0.3	3.14 ± 0.2	2.91 ± 0.0
F_{H3.2}	Óxidos de Fe II	0.11 ± 0.0	0.07 ± 0.0	0.24 ± 0.1	0.10 ± 0.0	0.08 ± 0.0	0.06 ± 0.0	0.12 ± 0.0
F_{H4}	Materia orgánica	6.28 ± 0.5	7.85 ± 2.2	7.92 ± 0.3	7.87 ± 0.2	7.71 ± 0.3	9.65 ± 0.4	9.51 ± 1.1

Fracción		Testigo Jal	T J+S M	T J+S S/M	MC173 M	MC101 M	MC173 S/M	N16 S/M
F_{H5}	Residual	1.14 ± 0.3	8.50 ± 1.0	0.91 ± 0.6	1.24 ± 0.5	0.62 ± 0.2	0.90 ± 0.1	1.09 ± 0.1
Σ(F_{H1}~F_{H5})		27.37 ± 0.4	33.22 ± 1.25	25.05 ± 2.6	26.90 ± 1.3	24.16 ± 2.51	27.57 ± 0.8	28.44 ± 1.2
Porcentaje de Recuperación		122.37 ± 14.5	144.44 ± 21.5	116.21 ± 1.3	120.94 ± 9.2	100.20 ± 0.1	124.60 ± 14.9	136.83 ± 23.1
Técnica 3. Urbina								
F_{U1}	Soluble	1.63 ± 0.1	1.12 ± 0.0	0.15 ± 0.0	0.08 ± 0.0	0.09 ± 0.0	0.14 ± 0.0	0.07 ± 0.0
F_{U2}	Intercambiable	0.71 ± 0.1	0.63 ± 0.0	0.72 ± 0.0	0.78 ± 0.0	0.74 ± 0.2	0.52 ± 0.0	0.60 ± 0.0
F_{U3}	Carbonatos	2.86 ± 0.1	1.66 ± 0.1	3.84 ± 0.0	2.82 ± 0.3	1.86 ± 0.1	2.62 ± 0.4	4.59 ± 0.1
F_{U4}	Oxihidróxidos de Fe	0.50 ± 0.1	0.38 ± 0.1	0.41 ± 0.0	0.45 ± 0.0	0.48 ± 0.0	0.22 ± 0.1	0.37 ± 0.0
F_{U5}	Óxidos de Fe	6.80 ± 0.2	7.23 ± 1.5	6.04 ± 1.0	6.92 ± 0.8	6.82 ± 1.8	6.06 ± 0.7	7.01 ± 1.2
F_{U6}	Materia orgánica	4.72 ± 0.7	5.56 ± 0.5	5.07 ± 0.0	5.09 ± 0.2	5.25 ± 0.6	6.24 ± 0.3	4.69 ± 0.2
F_{U7}	Sulfuros	6.14 ± 2.8	6.29 ± 0.1	5.69 ± 0.1	5.93 ± 0.4	6.51 ± 0.8	6.85 ± 0.2	6.65 ± 1.3
F_{U8}	Residual	0.84 ± 0.4	0.50 ± 0.2	0.63 ± 0.4	0.34 ± 0.1	0.31 ± 0.2	1.26 ± 0.2	0.63 ± 0.0
Σ(F_{U1}~F_{U8})		24.20 ± 3.98	23.37 ± 0.7	22.55 ± 0.4	22.42 ± 1.2	22.05 ± 0.5	23.91 ± 1.8	24.61 ± 2.9
Porcentaje de Recuperación		107.15 ± 3.3	101.61 ± 14.6	105.01 ± 7.8	100.77 ± 7.3	92.07 ± 12.0	107.70 ± 7.7	118.97 ± 29.1

T=Testigo, J+S= Jal y sustrato, M=Mezclado, S/M=Sin mezclar; n=2.

En la fracción intercambiable y unida a carbonatos se encontró una contribución del 20.38-36.56% al total encontrado de Cadmio, el contenido de este elemento en los testigos fue ligeramente mayor en el diseño experimental con jal e higuierilla (Tabla 17). Respecto al ensayo con jal y sustrato mezclados se observó una disminución en la concentración de Cd al usar BPCV (4.62 mg/kg con *Klebsiella* MC173 y 5.13 mg/kg con *Enterobacter* MC101) al comparase con el testigo (7.59 mg/kg).

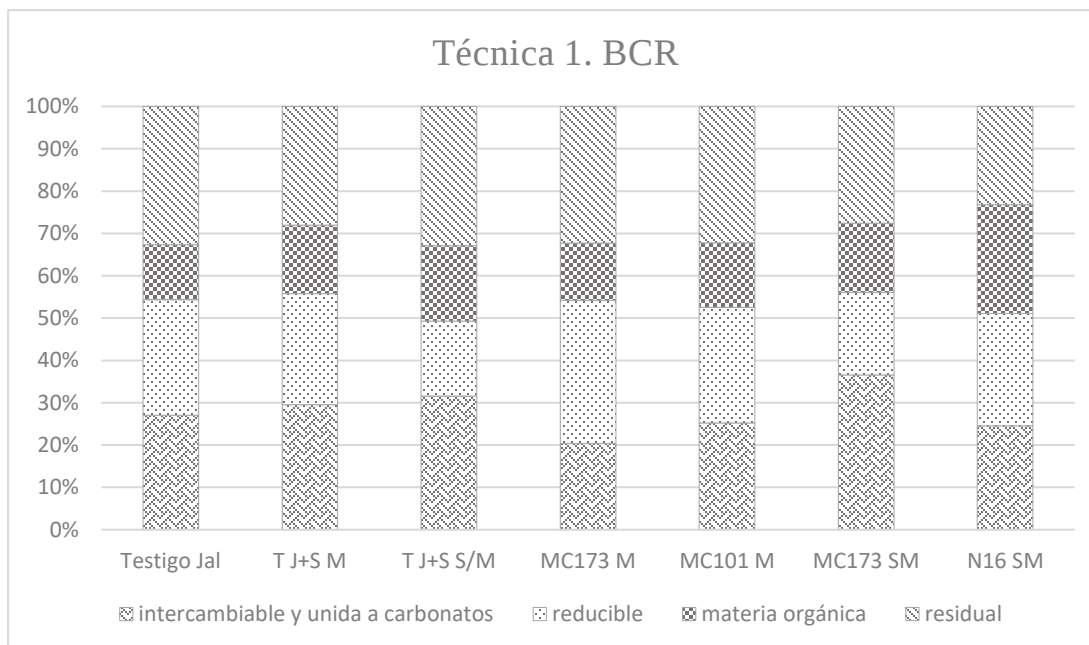


Figura 7 Distribución porcentual de Cd en la técnica BCR.

En la fracción reducible del método BCR se observó un contenido mayor en el testigo con jal e higuierilla (7.8823 mg/kg) en relación con los otros dos analizados. El testigo de jal y sustrato mezclados presentó 6.76 mg/kg, los tratamientos con las cepas *Klebsiella* MC173 (7.67 mg/kg) y *Enterobacter* MC101 (5.56 mg/kg) no presentaron cambios similares. En el testigo de los ensayos sin mezclar se detectaron 3.94 mg/kg, en los tratamientos *Klebsiella* MC173 (4.58 mg/kg) y *Escherichia* N16 (7.59mg/kg). La movilidad de Cd en presencia de *Klebsiella* MC173 fue similar, en ambos casos aumentó el contenido de Cd.

En la fracción unida a materia orgánica se observó una contribución porcentual del 13.35-25.72% donde el menor contenido de Cd se observó en el tratamiento realizado con jal e higuierilla (8.63 mg/kg) y el mayor con la cepa *Escherichia* N16 (7.34 mg/kg). En los

tratamientos con jal y sustrato mezclados, con las cepas *Klebsiella* MC173 (3.07mg/kg) y *Enterobacter* MC101 (3.11 mg/kg) se detectó una reducción de Cd con respecto al testigo (4.16 mg/kg). En los ensayos sin mezclar se observaron cambios similares con la cepa *Klebsiella* MC173 (3.86 mg/kg) en comparación al testigo (4.01 mg/kg), no siendo así con *Escherichia* N16 (7.34 mg/kg).

Finalmente, la fracción residual presentó una contribución porcentual del 23.17% al 32.86% del total recuperado por esta técnica. Los cambios en la distribución del Cd en esta fracción mineral no fueron uniformes ni presentaron un patrón específico. En general, la disminución del contenido de Cd en la fracción unida a materia orgánica, y el aumento observado para las fracciones potencialmente movilizables denota el aumento de la biodisponibilidad para Cd por acción de las cepas *Klebsiella* MC173 y *Enterobacter* MC101.

Técnica Hall

En la figura 8 se presenta la distribución porcentual de Cd para las diferentes fracciones consideradas por el método Hall *et al.* (1995). Por esta metodología se logró recuperar del 100.20 al 144.44% con relación al contenido extraído por la técnica 3052 (EPA,1996).

En la fracción AIC se observó una contribución del 18.62 al 26.23%. Además, con la segunda aplicación de acetato de sodio en esta fracción se logró recuperar del 28.22 al 61.59% del contenido de Cd obtenido inicialmente. En el testigo realizado con jal e higuierilla (6.81 mg/kg) se obtuvo una concentración ligeramente mayor a la recuperada en los otros dos analizados.

En el testigo realizado con jal e higuierilla mezclados se obtuvo una concentración de 6.19 mg/kg, y en los respectivos tratamientos *Klebsiella* MC173 (6.65 mg/kg) y *Enterobacter* MC101 6.34 (mg/kg) se detectó un ligero aumento. Asimismo, se observó un aumento en la movilidad de Cd al comparar el contenido encontrado en el testigo de jal y sustrato sin mezclar (6.32 mg/kg) y sus respectivos tratamientos con las cepas *Klebsiella* MC173 (6.61 mg/kg) y *Escherichia* N16 (6.88 mg/kg).

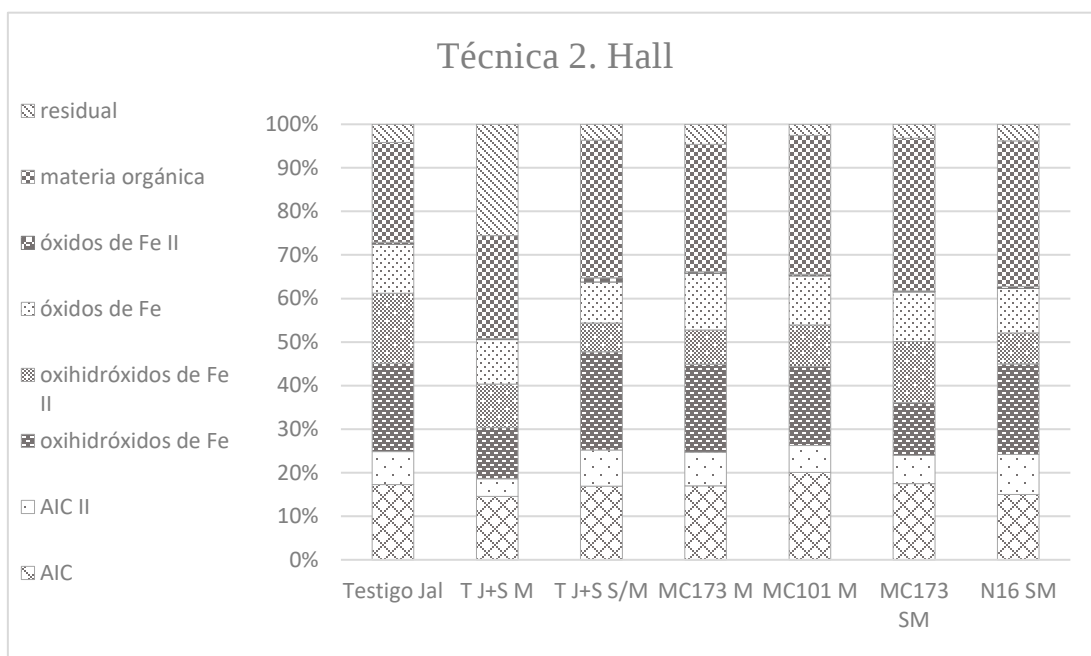


Figura 8. Distribución de Cd en la técnica Hall.

En la fracción unida a oxihidróxidos de Fe se observó una contribución porcentual del 21.74% al 36.33% de la concentración total obtenida. Adicionalmente, la segunda aplicación de clorhidrato de hidroxilamina tuvo gran efectividad, pues se logró recuperar del 29.02% al 116.16% del contenido extraído por el primer ataque.

En la fracción unida a óxidos de Fe, se encontró del 10.41% al 13.41% del contenido total recuperado por esta metodología. El segundo ataque de clorhidrato de hidroxilamina 1.0 M esta fracción recuperó del 2.02% al 10.12% de la concentración obtenida mediante el primer ataque.

En la fracción unida a materia orgánica se detectó una contribución porcentual del 22.96% al 35.0%, siendo el menor valor de Cd el del testigo con jal e higuera (6.28 mg/kg) y el mayor el del tratamiento *Klebsiella* MC173 SM (9.65 mg/kg), sin embargo, esta concentración no tuvo relevancia al compararse con su respectivo testigo (7.92 mg/kg).

Finalmente, en la fracción residual, también llamada unida a silicatos, se encontró la menor contribución porcentual al contenido total hallado, siendo de 2.56% a 4.60%, con

excepción del contenido encontrado en el testigo del tratamiento con jal y sustrato mezclados (8.50 mg/kg) que reportó una contribución del 25.59%.

Técnica Urbina

En la figura 9 se observa la distribución porcentual de Cadmio en las distintas fracciones consideradas por Urbina Trinidad (2015). Por medio de esta técnica se logró recuperar del 92.07 al 118.97% de la concentración obtenida por el método de extracción total 3052 (EPA, 1996).

En esta técnica la fracción soluble presentó una contribución irrelevante con respecto a la concentración total obtenida de (0.29-6.72%) con valores solamente destacables en el testigo de jal e higuerilla (1.63 mg/kg) y de jal con sustrato mezclados (1.12 mg/kg).

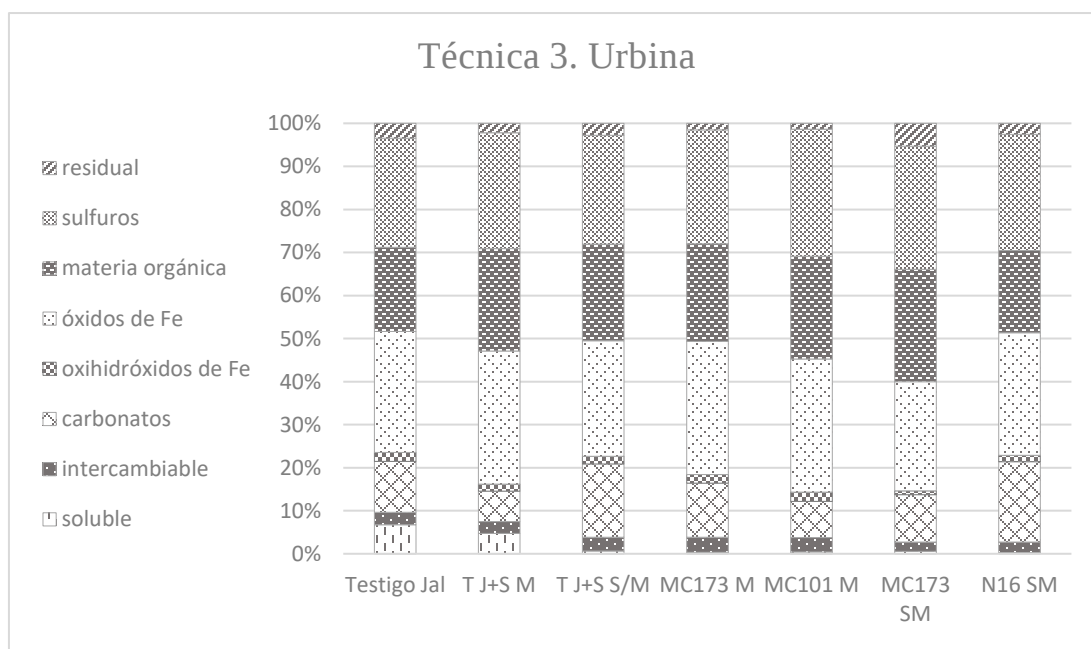


Figura 9. Distribución porcentual de Cd en la técnica Urbina.

La fracción intercambiable presentó una contribución del 2.15-3.48% al contenido total recuperado por este fraccionamiento y tuvo cambios menores en los tratamientos con cepas al compararse con sus testigos en ambas variantes del experimento (Tabla 17).

La fracción unida a carbonatos presentó una contribución porcentual del 7.10% al 18.67% del contenido total encontrado en esta técnica. En los tratamientos con mezcla se

observaron aumentos con las cepas al compararse con el testigo, siendo mayor el encontrado con la cepa *Klebsiella* MC173 (2.82 mg/kg), a su vez, esta no presentó el mismo comportamiento en la otra variable del experimento pues redujo su contenido con respecto al testigo evaluado.

En la fracción unida a oxihidróxidos de Fe se encontró una contribución pequeña al total (0.91-2.16%). Por lo anterior, los cambios observados en esta fracción no fueron destacables. Por otro lado, en la fracción unida a óxidos de Fe se observó un porcentaje del 25.35-30.94% del total encontrado en la técnica. En el tratamiento con mezcla los cambios que se registraron en las cepas *Klebsiella* MC173 (6.92 mg/kg) y *Enterobacter* MC101 (6.82 mg/kg) fueron pequeños al compararse con su testigo (7.22 mg/kg). Este comportamiento fue similar a los tratamientos sin mezcla con las cepas *Klebsiella* MC173 (6.06 mg/kg) y *Escherichia* N16 (7.0 mg/kg) con relación a su testigo (6.04 mg/kg).

La fracción unida a materia orgánica presentó un porcentaje alto (19.04-26.10%) del contenido total recuperado, además, se observó una pequeña disminución (0.2-0.4 mg/kg) en los tratamientos con mezcla al compararlos con su testigo. En los tratamientos sin mezcla se observaron comportamientos diferentes con las cepas, en el tratamiento con *Escherichia* N16 se detectaron 4.68 mg/kg y en el de *Klebsiella* MC173 se recuperaron 6.24 mg/kg mientras que el testigo tuvo 5.07 mg/kg.

En la fracción unida a sulfuros se encontró un porcentaje de contribución del 25.24-29.51% del total para esta metodología. Esta fracción presentó una contribución similar a la fracción unida a materia orgánica del método Hall, debido a que ambas fases son realizadas con los mismos extractantes, en esta metodología los cambios no parecieron ser relevantes para el tratamiento con jal y sustrato mezclados, por otro lado, en el tratamiento sin mezclar se observó un aumento uniforme para las cepas *Klebsiella* MC173 (6.85 mg/kg) y *Escherichia* N16 (6.64) al compararse con su testigo (5.69 mg/kg).

Finalmente, la fracción residual presentó un porcentaje similar al obtenido con el método Hall (1.40-5.28%), en esta fracción los cambios fueron mínimos, sin embargo, se observó una ligera disminución entre los tratamientos con las cepas *Klebsiella* MC173 (0.34

mg/kg) y *Enterobacter* MC101 (0.31 mg/kg) en el tratamiento con mezcla con relación a su testigo (0.50 mg/kg).

Comparación de Técnicas

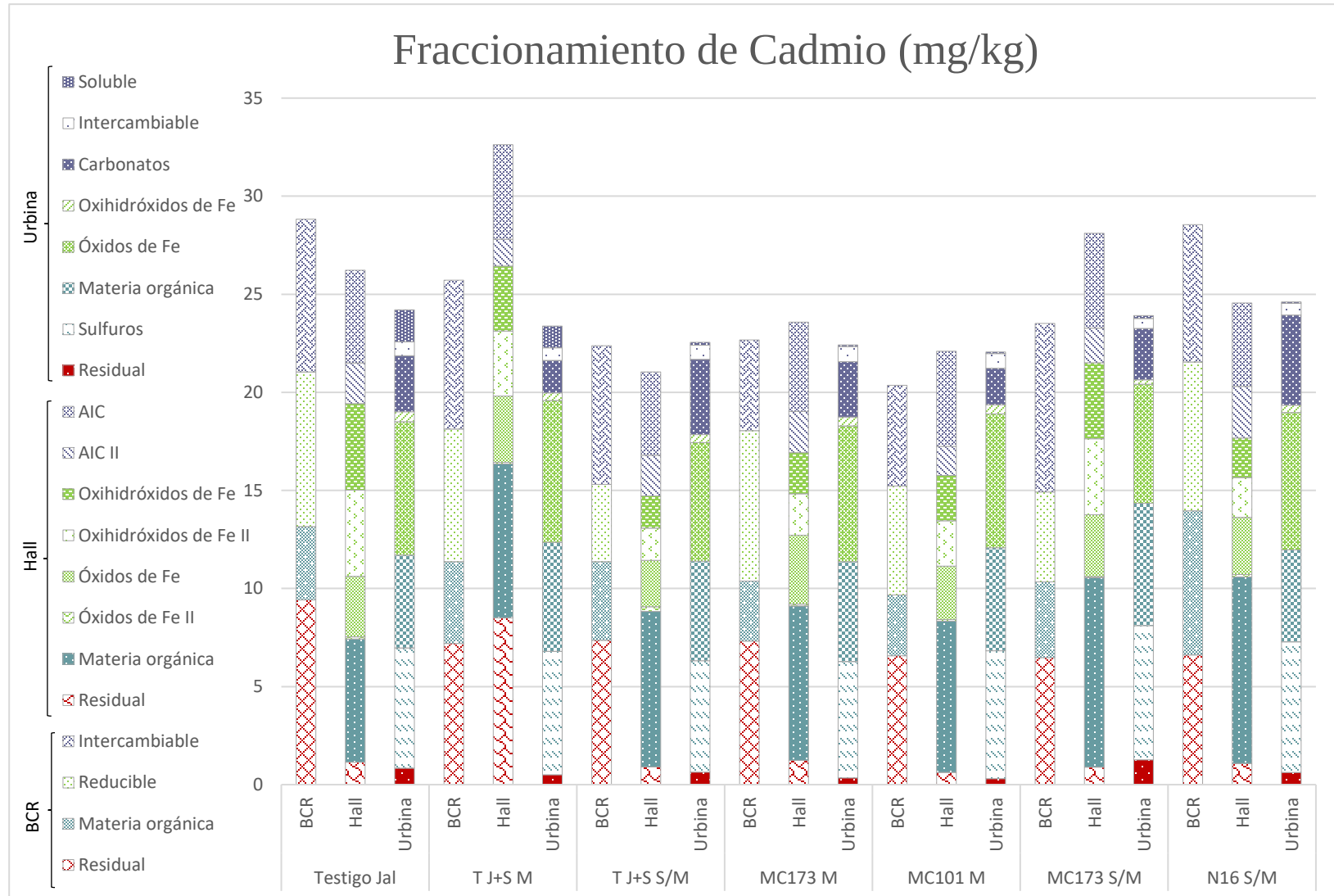
En el análisis de riesgo ambiental se encontró al Cadmio por encima del LMP de la NOM-157-SEMARNAT-2009 (20 mg/kg), pues el promedio en la extracción total para todas las muestras fue de 22.44 mg/kg, lo cual obliga a clasificar a los jales como residuos peligrosos. Sin embargo, este valor promedio está por debajo de los parámetros que establece la NOM-147-SEMARNAT-2004 para suelos que han sido contaminados, siendo el de uso agrícola-residencial-comercial de 37 mg/kg e industrial de 450 mg/kg.

Estudios previos han sugerido que las plantas pueden sufrir efectos tóxicos cuando la concentración total de Cd en el suelo es >8 mg/kg, o cuando la concentración biodisponible es >0.001 mg/kg (de Souza Costa et al., 2012; Ghosh & Singh, 2005; Shi & Cai, 2009). Por lo anterior, es posible atribuir efectos tóxicos en las plantas pobladoras de los jales mineros de Zimapán por causa del contenido de Cd hallado.

La concentración de Cd presente en los jales se puede atribuir a las menas características de la región, de las que destacan la esfalerita (ZnS), bornita y boulangerita (Moreno *et al.*, 2009). En el análisis de Moreno *et al.*, (2012) también se encontró al Cadmio como inclusiones en forma de sulfuro de Cadmio (greenockita) en jales mineros de Zimapán, Hidalgo.

Anju & Banerjee (2010) realizaron una comparación entre las técnicas de Tessier *et al.* (1979) y BCR (Rauret et al., 1999) en la movilidad de Cadmio obteniendo mayor recuperación en la metodología Tessier en el análisis de jales de depósitos recientes y de 1980. Tlustos *et al.* (2005) realizaron una comparación entre los fraccionamientos propuestos por Quevauviller (1998), Li *et al.* (1995) y Zeien (1995) y concluyeron que cuando el contenido de elementos presentes en las muestras es bajo, resulta preferible la aplicación de técnicas de fraccionamiento sencillas, como la propuesta por Quevauviller (1988).

Figura 10. Fraccionamiento de Cadmio con las técnicas BCR, Hall y Urbina.



Una vez agrupadas las fracciones en las cuatro especies representativas: intercambiable, reducible, oxidable y residual (Figura 10), se procedió a realizar un análisis de comparación descriptiva. Se observó un patrón uniforme de fraccionamiento en las tres técnicas empleadas. En la fracción intercambiable se encontró la mayor concentración de Cd en la técnica BCR, en la cual se utilizó ácido acético 0.11 M, que resultó tener mayor afinidad en la extracción de este elemento que las soluciones de MgCl_2 0.1 M (Urbina Trinidad, 2015) y NaOAc 1.0 M (Hall *et al.*, 1995; Urbina Trinidad, 2015), por otro lado este resultado también puede atribuirse al tiempo de retención, la técnica BCR utiliza 16 horas mientras que las metodologías planteadas por Hall *et al.* (1995) y Urbina Trinidad (2015) proponen 6 y 11.3 horas respectivamente, algunos autores sustentan la posibilidad de extraer mayores cantidades de un elemento aumentando la concentración y tiempo de retención o disminuyendo el pH, sin embargo, se desconocen los efectos que estas modificaciones podrían tener en las fracciones subsecuentes (Anju & Banerjee, 2010; Wan *et al.*, 2012).

En la fracción reducible se encontró la mayor concentración de Cd en la técnica propuesta por Hall *et al.* (1995), esta a su vez, se halló preferentemente asociada a oxihidróxidos de Fe por afinidad al $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$, no obstante, las diferencias de concentración halladas en las fases unidas a óxidos y oxihidróxidos de Fe y Mn del método Hall *et al.* son atribuibles a cambios en la concentración, pH, temperatura y tiempo de estancia del extractante. La suma de las fracciones intercambiable y reducible de las tres técnicas llegó a sobrepasar el 50% del contenido total de Cadmio en algunas muestras analizadas, esto evidencia alta movilidad de este elemento.

En la fracción oxidable se halló un porcentaje importante del Cd total recuperado en las técnicas BCR (13.35-25.72%) y Hall (22.95-35.0%), sin embargo, este contenido fue mayor en la técnica Urbina Trinidad (44.88-54.72%), debido a la disolución (oxidación) de sulfuros metálicos presentes en los jales mineros, los cuáles son característicos de jales oxidados (Anju & Banerjee, 2010).

La fracción residual de los procedimientos de Hall y Urbina resultó tener la menor contribución al total de Cd, a diferencia del método BCR que no realiza una diferenciación entre la presencia de sulfuros y silicatos. Correspondiendo a los resultados hallados por Anju

& Banerjee (2010), en la mayoría de las muestras analizadas se encontró más del 90% del Cd en las tres primeras fracciones, esto indica un alto potencial en la movilidad de este elemento.

3.2.3 Análisis de Especiación de Hierro

En la tabla 18, se muestra la concentración de Fe hallada en las muestras analizadas mediante las técnicas de extracción química secuencial seleccionadas.

Técnica BCR

La figura 11 presenta la distribución porcentual de Fe en las diferentes fracciones consideradas por el método BCR. Por esta técnica se logró recuperar del 106.23-150.13% del contenido obtenido por el método de extracción total 5032 (EPA, 1996). En la fracción intercambiable y unida a carbonatos se observó una contribución porcentual muy pequeña (0.02-0.3%) al total recuperado por el fraccionamiento. El mayor aumento en esta fracción se registró en los tratamientos sin mezcla con las cepas *Klebsiella* MC173 (74.02 mg/kg) y *Escherichia* N16 (24.84 mg/kg) al compararse con su testigo (18.5 mg/kg).

En la fracción reducible del método BCR se encontró una contribución porcentual del 9.6-14.81% de la suma total recuperada de las muestras. En el tratamiento sin mezclar se encontró un aumento significativo entre las cepas *Klebsiella* MC173 (3062.88 mg/kg) y *Escherichia* N16 (3548.95 mg/kg) y su respectivo testigo (2016.69 mg/kg)

En la fracción unida a materia orgánica se recuperó del 15.6% al 20.1% del total obtenido por esta técnica. En los testigos con enmienda, mezclados (3952.64 mg/kg) y sin mezclar (3555.96 mg/kg) se observó una disminución importante del contenido de Fe con respecto al testigo realizado únicamente con jal e higuerilla (5488.45 mg/kg). En los tratamientos con *Klebsiella* MC173 SM (4718.05 mg/kg) y *Escherichia* N16 SM (4559.78 mg/kg) se observó que el contenido de Fe aumento con respecto al control.

Tabla 18. Concentración de Fe (mg/kg de masa seca) encontrada en las muestras por las técnicas de extracción química secuencial.

Fracción		Testigo Jal	T J+S M	T J+S S/M	MC173 M	MC101 M	MC173 S/M	N16 S/M
Técnica 1. BCR								
F_{BCR1}	Intercambiable y unida a carbonatos	7.84 ± 1.5	39.62 ± 3.6	18.50 ± 2.5	5.07 ± 1.1	7.01 ± 0.1	74.02 ± 1.0	24.84 ± 0.1
F_{BCR2}	Reducible	3124.99 ± 71.6	3426.48 ± 25.5	2016.69 ± 40.4	3544.13 ± 32.52	3395.16 ± 36.0	3062.88 ± 23.2	3548.95 ± 26.0
F_{BCR3}	Materia orgánica	5488.45 ± 3.4	3952.64 ± 40.3	3555.96 ± 5.3	4447.00 ± 51.7	3817.44 ± 35.0	4718.05 ± 19.8	4559.78 ± 28.4
F_{BCR4}	Residual	19503.81 ± 45.6	17991.08 ± 25.0	15515.72 ± 46.7	17546.61 ± 0.6	15700.74 ± 47.1	15650.3063 ± 12.3	17476.49 ± 25.2
Σ(F_{BCR1}~F_{BCR4})		28185.72 ± 111.4	25409.82 ± 13.7	21106.87 ± 14.2	25542.82 ± 82.6	22920.35 ± 46.1	23502.92 ± 28.4	25610.06 ± 79.5
Porcentaje de Recuperación		130.25 ± 0.3	109.37 ± 0.0	106.23 ± 0.1	116.65 ± 0.1	114.69 ± 0.5	116.22 ± 0.0	150.13 ± 0.7
Técnica 2. Hall								
F_{H1}	Absorbida/ intercambiable/ carbonatos	2.37 ± 0.1	1.82 ± 0.6	0.65 ± 0.7	2.33 ± 1.9	1.30 ± 0.1	1.91 ± 0.7	0.12 ± 0.1
F_{H1.2}	Absorbida/ intercambiable/ carbonatos II	3.09 ± 0.3	2.55 ± 0.0	2.88 ± 0.0	1.62 ± 0.6	2.27 ± 0.8	3.76 ± 1.4	4.25 ± 1.0
F_{H2}	Oxihidróxidos de Fe	1184.37 ± 22.9	642.14 ± 4.5	942.83 ± 112.8	949.52 ± 11.5	691.93 ± 32.2	513.14 ± 32.9	1108.29 ± 68.8
F_{H2.2}	Oxihidróxidos de Fe II	1419.63 ± 19.2	1109.63 ± 9.1	1042.63 ± 162.3	1041.60 ± 10.5	1361.90 ± 20.2	1168.67 ± 92.4	1205.04 ± 19.6
F_{H3}	Óxidos de Fe	5702.75 ± 163.3	5603.81 ± 153.7	5733.40 ± 162.7	6069.19 ± 53.4	6083.96 ± 254.7	5608.55 ± 35.0	5494.92 ± 195.8
F_{H3.2}	Óxidos de Fe II	994.64 ± 12.6	831.18 ± 5.2	756.90 ± 3.3	600.89 ± 84.3	532.96 ± 64.0	919.10 ± 20.7	810.85 ± 46.0
F_{H4}	Materia orgánica	16423.89 ± 15.2	17184.62 ± 41.1	15767.21 ± 30.9	16287.12 ± 31.4	17154.50 ± 34.0	18417.95 ± 36.0	17226.35 ± 14.3

Fracción		Testigo Jal	T J+S M	T J+S S/M	MC173 M	MC101 M	MC173 S/M	N16 S/M
F_{H5}	Residual	9154.17 ± 159.5	23686.87 ± 32.9	8748.17 ± 13.9	9907.74 ±17.0	9026.12 ± 36.2	10075.46 ± 27.4	9397.82 ± 121.1
Σ(F_{H1}~F_{H5})		34884.91 ± 347.5	49062.50 ± 3.3	32994.67 ± 484.3	34860.01 ± 165.3	34854.95 ± 235.9	36708.55 ± 49.76	35197.64 ± 412.6
Porcentaje de Recuperación		161.21 ± 1.3	211.19 ± 0.2	166.06 ± 2.3	159.20 ± 1.2	174.41 ± 0.8	181.52 ± 0.53	206.33 ± 2.7
Técnica 3. Urbina								
F_{U1}	Soluble	0.22 ± 0.0	0.56 ± 0.1	0.37 ± 0.0	0.20 ± 0.0	0.31 ± 0.2	0.52 ± 0.0	0.30 ± 0.2
F_{U2}	Intercambiable	1.90 ± 0.1	0.96 ± 0.0	2.34 ± 1.0	1.38 ± 0.3	0.77 ± 0.3	1.60 ± 0.1	0.47 ± 0.3
F_{U3}	Carbonatos	210.63 ± 0.4	53.40 ± 0.3	142.31 ± 1.1	268.17 ± 1.4	48.89 ± 0.2	53.02 ± 0.3	491.69 ± 5.3
F_{U4}	Oxihidróxidos de Fe	427.33 ± 1.4	348.10 ± 32.6	407.23 ± 8.3	443.63 ± 30.6	491.00 ± 3.9	295.90 ± 24.1	345.53 ± 0.4
F_{U5}	Óxidos de Fe	5303.10 ± 180.3	5657.67 ± 159.7	5722.01 ± 18.4	5743.08 ± 17.5	6115.84 ± 40.7	5554.79 ± 174.9	5417.10 ± 130.3
F_{U6}	Materia orgánica	7425.44 ± 83.7	9395.00 ± 272.5	7479.77 ± 62.3	7419.60 ± 60.7	6617.61 ± 83.3	7704.27 ± 142.9	6904.25 ± 97.3
F_{U7}	Sulfuros	12832.57 ± 94.2	15697.01 ± 408.8	11027.42 ± 180.2	12378.44 ± 14.6	22204.42 ± 47.2	14414.48 ± 288.1	11847.06 ± 226.6
F_{U8}	Residual	2016.49 ± 30.9	5527.12 ± 172.4	2828.97 ± 51.0	2049.12 ± 71.9	3219.99 ± 62.3	2192.49 ± 34.5	3177.87 ± 44.9
Σ(F_{U1}~F_{U8})		28217.68 ± 161.6	36680.17 ± 32.4	27610.41 ± 156.60	28303.61 ± 197.1	38698.83 ± 62.9	30217.57 ± 267.7	28184.27 ± 414.4
Porcentaje de Recuperación		130.05 ± 0.5	157.69 ± 0.3	139.58 ± 0.9	128.9 ± 0.5	193.6 ± 0.1	150.53 ± 1.6	163.32 ± 2.7

T=Testigo, J+S= Jal y sustrato, M=Mezclado, S/M=Sin mezclar; n=2

La fracción residual presentó la mayor contribución porcentual (66.6-73.5%). El mayor cambio se registró en el tratamiento sin mezclar con la cepa *Escherichia* N16, la cual presentó 25610.06 mg/kg al compararse con el testigo (15515.72 mg/kg). En general, en esta metodología los cambios con las cepas *Klebsiella* MC173 y *Enterobacter* MC101 en el tratamiento de jal y sustrato mezclados no parecieron tener cambios uniformes, o seguir un patrón (tabla 18). Esto podría deberse a que las alteraciones en las fracciones unidas a silicatos generalmente no se atribuyen a la acción microbiana por las limitaciones biológicas en la asimilación de las especies químicas características de esta fracción.

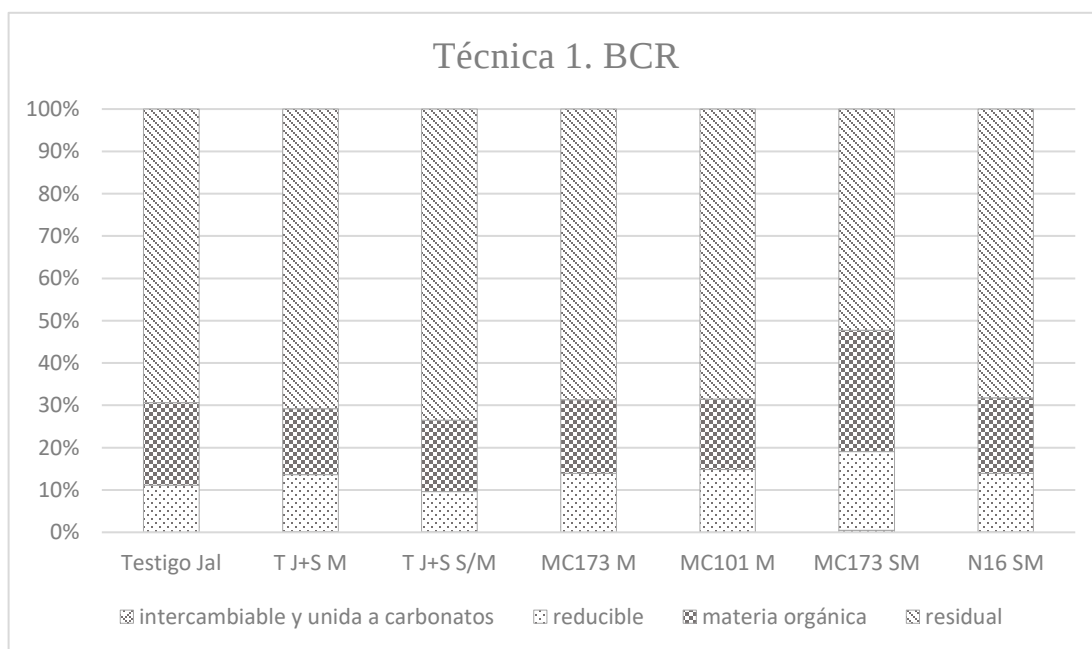


Figura 11. Distribución de Fe en la técnica BCR

Técnica Hall

En la figura 12 se muestra la distribución porcentual de las fracciones consideradas por la técnica Hall *et al.* (1995). Por esta técnica se logró recuperar del 159.2-211.19% de la concentración de Fe hallada por el método 3052 de la EPA (1996).

En la fracción absorbida, intercambiable y unida a carbonatos se observó una contribución porcentual muy pequeña (al igual que en el método BCR) que fue del 0.009% al 0.02%. La segunda aplicación de NaOAc en esta fracción resultó recuperar una concentración mayor a la del primer ataque, en esta fracción el mayor contenido fue encontrado en los tratamientos con las cepas *Escherichia* N16 SM (4.37 mg/kg) y *Klebsiella* MC173 SM (5.67 mg/kg), de las cuales el respectivo testigo presentó (3.53 mg/kg).

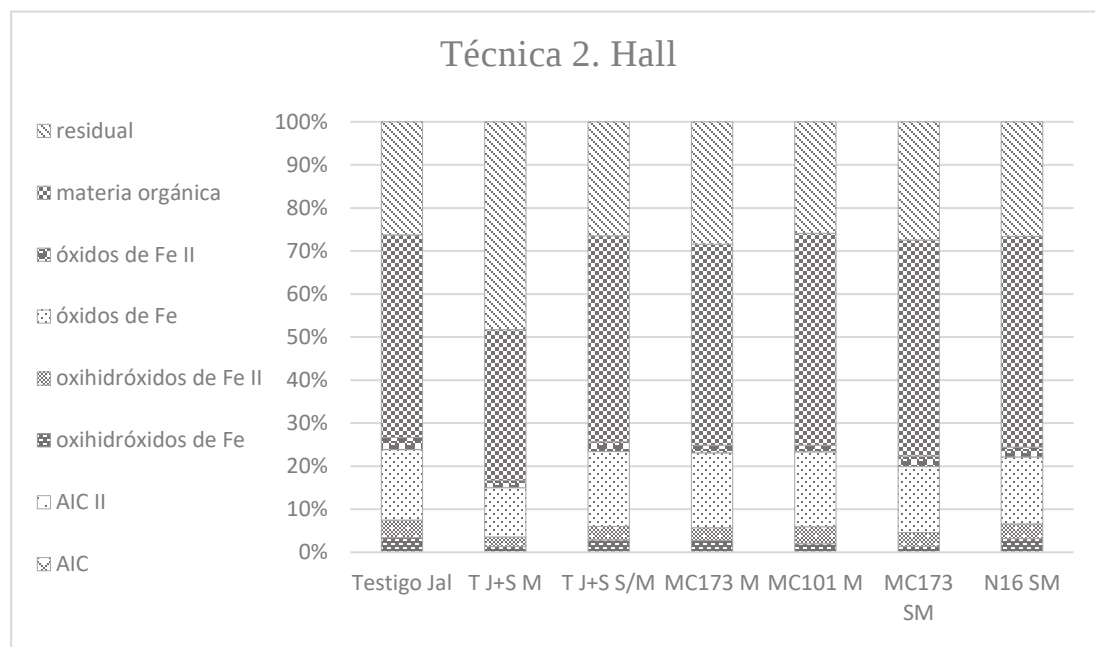


Figura 12. Distribución porcentual de Fe en la técnica Hall

En la fracción unida a oxihidróxidos de Fe la contribución porcentual fue del 3.57% al 7.46%; la mayor concentración en esta fracción fue hallada en el testigo realizado con jal e higuierilla (2603.99 mg/kg). En los tratamientos con mezcla se observó un aumento en las cepas *Klebsiella* MC173 (1991.13 mg/kg) y *Enterobacter* MC101 (2053.84 mg/kg) con respecto a su testigo 1751.77 mg/kg). En esta fracción no se observó la misma movilidad en la otra variable del experimento, excepto para el tratamiento con la cepa *Escherichia* N16 (2313.33 mg/kg) que aumentó el contenido de Fe con respecto a su testigo (1985.46 mg/kg).

En la fracción unida a óxidos de Fe se observó un porcentaje de contribución del 13.11% al 19.67% al total recuperado por este fraccionamiento. Adicionalmente, la segunda

aplicación de $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ 1.0 M en esta fracción presentó un menor índice de recuperación con respecto al primer ataque (2.04-17.44%) realizado. La presencia de Fe en el testigo realizado con jal e higuierilla (6697.40 mg/kg) resultó ser mayor con respecto a los testigos realizados con mezcla (6434.99 mg/kg) y sin mezcla (6490 mg/kg) de sustrato. En los tratamientos realizados con las cepas *Klebsiella* MC173 (6670.08 mg/kg) y *Escherichia* N16 (6616.92 mg/kg) en la variante del experimento con mezcla se observó un aumento en la concentración de Fe con respecto al testigo. Esta movilidad con la cepa *Klebsiella* MC173 se repitió en el ensayo sin mezcla (6527.65 mg/kg).

En la fracción unida a materia orgánica se encontró la mayor contribución porcentual (35.03-50.18%) del total recuperado en el método Hall. En esta fracción se observaron disminuciones en el contenido de Fe entre el testigo jal e higuierilla (16423.89 mg/kg) y los testigos con enmienda y jal mezclados (17184.62 mg/kg) y sin mezclar (15767.21 mg/kg). En el tratamiento realizado con jal y sustrato sin mezclar se encontraron diferencias en la distribución de Fe entre las cepas *Klebsiella* MC173 (18417.95 mg/kg) y *Escherichia* N16 (17226.35 mg/kg).

La fracción residual presentó una contribución que fue del 25.89-48.28% de la concentración total de Fe para esta metodología. En este paso de la extracción se observó un comportamiento uniforme en el contenido de Fe, a excepción del testigo para jal y sustrato mezclados que presentó 23686.87 mg/kg, esta concentración fue mayor a la presentada en los tratamientos con las cepas *Klebsiella* MC173 (9907.74 mg/kg) y *Enterobacter* MC101 (9026.12 mg/kg).

Técnica Urbina

En la figura 13 se presenta la distribución porcentual de cada fracción considerada por el método Urbina Trinidad (2015). Mediante esta metodología se logró un porcentaje de recuperación del 128.9% al 193.6% con respecto a la concentración obtenida por el método de extracción total utilizado (EPA, 1996).

En la fracción soluble se obtuvo una contribución porcentual muy pequeña (tabla 18) y por lo tanto no se puede apreciar en la gráfica 11, el mayor valor de Fe detectado en esta fracción fue de 0.56 mg/kg, que correspondió análisis realizado en el testigo de jal y sustrato mezclados. La fracción intercambiable también presentó concentraciones bajas que fueron del 0.002-0.008% del total recuperado por esta técnica, la concentración más alta en esta fracción se observó en el testigo de jal y sustrato sin mezclar (2.34 mg/kg).

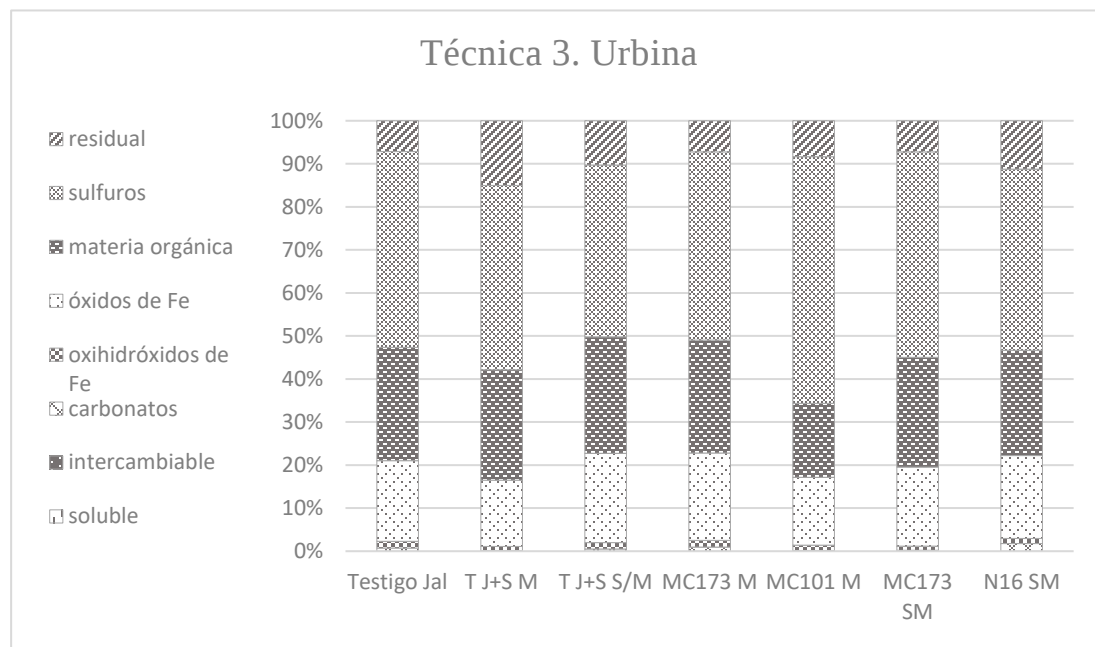


Figura 13. Distribución de Fe en la técnica Urbina

En la fracción unida a carbonatos también se observó una contribución porcentual pequeña (0.13-1.74%), los cambios más relevantes se observaron con la cepa *Escherichia* N16 S/M (491.69 mg/kg) al compararse con su testigo (142.31 mg/kg) y en la cepa *Klebsiella* MC173 M (268.17 mg/kg) cuando su testigo tuvo 53.40 mg/kg de Fe.

En la fracción unida a oxihidróxidos de Fe se observó una contribución porcentual del 0.94-1.57% del total recuperado para esta metodología. En los tratamientos con jal y sustrato mezclados se observó un aumento en las cepas *Klebsiella* MC173 (443.63 mg/kg) y *Enterobacter* MC101 (491.00 mg/kg) al compararse con su testigo (348.10 mg/kg). En los ensayos sin mezcla se observó la movilidad opuesta entre las cepas *Klebsiella* MC173

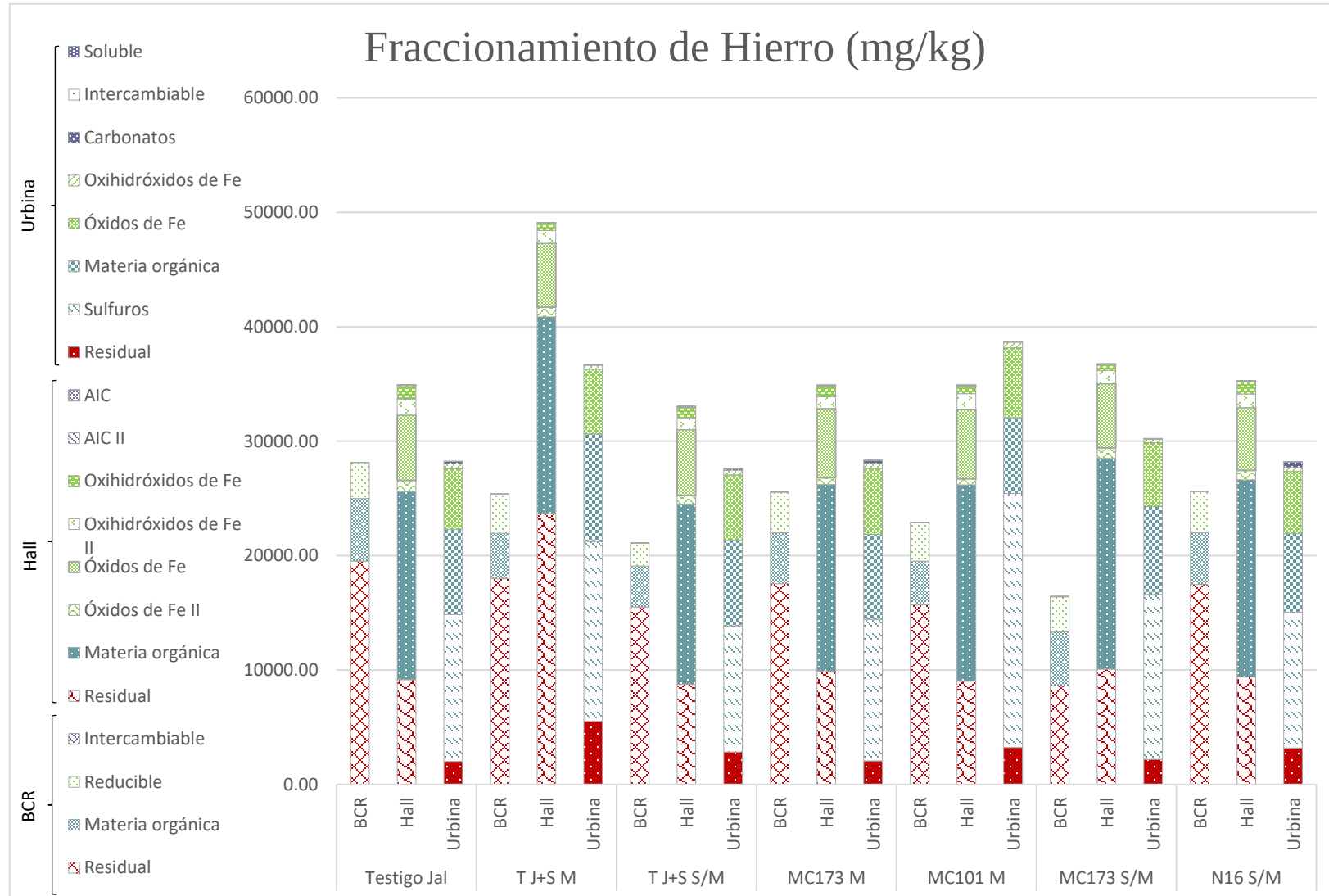
(295.90 mg/kg) y *Escherichia* N16 (345.53 mg/kg) al compararse con su testigo (407.23 mg/kg).

En la fracción unida a óxidos de Fe se encontró una de las contribuciones más importantes para el contenido total con un rango porcentual del 15.42-20.72%. En esta fracción el contenido de Fe en el testigo de jal e higuierilla (5303.10 mg/kg) resultó ser menor que el encontrado en los testigos de jal y sustrato mezclados (5657.67 mg/kg) y sin mezclar (5722 mg/kg). A su vez, se observó un aumento en los tratamientos realizados con la cepa *Klebsiella* MC173 (5743.08 mg/kg) y *Enterobacter* MC101 (6115.84 mg/kg) con mezcla. Por otro lado, en la variante del experimento sin mezcla se observó una movilidad opuesta con las cepas *Klebsiella* MC173 (5554.79 mg/kg) y *Escherichia* N16 (5417.10 mg/kg).

En la fracción unida a materia orgánica se observó un rango porcentual que fue del 17.10% al 27.09%. En esta fracción se evidenciaron cambios por acción de la enmienda orgánica entre el testigo de jal e higuierilla (7425.44 mg/kg) y los de jal y sustrato mezclados (9395.00 mg/kg) y sin mezclar (7479.77 mg/kg). La acción de las cepas *Klebsiella* MC173 (7419.60 mg/kg) y *Enterobacter* MC101 (6617.61 mg/kg) pareció reducir el contenido de Fe en los tratamientos con mezcla. Esta movilidad se observó también con la cepa *Escherichia* N16 (6904.25 mg/kg) en el tratamiento sin mezclar.

La fracción unida a sulfuros en esta metodología presentó una mayor recuperación que la técnica Hall *et al.*, (1995) en esta fase se logró extraer del 39.94-57.37% del total extraído de cada muestra. Como se muestra en la tabla 18 no hay cambios uniformes entre las cepas y sus testigos para poder establecer una relación de movilidad. Finalmente, la fracción residual, presentó una contribución menor comparada a la de las otras dos metodologías pues fue del 7.15-15.07%. Se observaron disminuciones en el contenido de Fe en los ensayos con *Klebsiella* MC173 (2049 mg/kg) y *Enterobacter* MC101 (3219.99 mg/kg) en las macetas con jal y sustrato mezclados con respecto a su testigo (5527.12 mg/kg). En la otra variable del experimento no se observaron cambios uniformes para establecer una relación entre tratamientos y control.

Figura 14. Fraccionamiento de Hierro con las técnicas BCR, Hall y Urbina.



Comparación de Técnicas

En el fraccionamiento de Fe se observó el orden de recuperación Hall>Urbina>BCR. Las NOM-157-SEMARNAT-2009 y NOM-147-SEMARNAT-2004 no establecen un límite máximo permisible (LMP) para el contenido de Fe en residuos y jales. La USEPA (1993) estableció concentraciones de referencia para sedimentos contaminados, hallar contenidos de Fe >25000 mg/kg obliga a clasificar al depósito de jales de Santa María Zimapán como un sitio muy contaminado. Se sabe que el Fe como micronutriente por encima de 100 mg/kg puede provocar efectos dañinos en plantas de los cuales destacan el retraso del crecimiento e intensificación en la deficiencia de Zn (Learita Prince, 2015). Dependiendo de la exposición, el Fe puede provocar conjuntivitis, coriorretinitis y retinitis si contacta con los tejidos y permanece en ellos. Además, la inhalación crónica de concentraciones excesivas de polvos de óxidos de Fe puede desarrollar siderosis e incrementar el riesgo de desarrollar cáncer de pulmón (Benntech, 2018).

La presencia de este elemento en los jales se atribuye a las menas de pirita, pirrotita, galena, esfalerita, calcopirita y marcasita del distrito de Zimapán (Moreno *et al.*, 2009; Romero *et al.*, 2008).

En la figura 14 se presenta la distribución de las fracciones de cada técnica empleada. Los colores utilizados diferencias a las fracciones representativas: intercambiable (añil), reducible (verde claro), oxidable (verde azulado) y residual (rojo oscuro).

En la fracción intercambiable la mayoría de las muestras no sobrepasaron el 1% de contribución al total encontrado por las técnicas, sin embargo, la mayor parte de este contenido fue atribuido a carbonatos en un rango de 53.4-491.7 mg/kg mediante el uso de NaOAc 1.0 M con 10 horas de estancia, confirmando que un aumento en el tiempo de retención incrementa la cantidad de Fe que puede ser extraída, en contraste con el tiempo de retención planteado por Hall *et al.* (1995) (Tlustos *et al.*, 2005; Zimmerman & Weindorf, 2010).

La fracción reducible presentó contribuciones porcentuales similares en las tres técnicas analizadas, adicionalmente, la mayor parte del contenido de Fe de esta fracción se

encontró asociado a óxidos de Fe y Mn, lo cual es común en jales que han sido sometidos a procesos de neutralización/oxidación (Moreno *et al.*, 2009; López Sánchez, 2013).

La presencia del Fe en la fracción oxidable puede ser atribuida mayoritariamente a la presencia de sulfuros primarios (arsenopirita, pirita, calcopirita, pirrotita y estalerita) sobre materia orgánica, sin descartar el hecho de que los reactivos usados en este paso ($\text{KClO}_3 + \text{HCl} + \text{HNO}_3$) pueden atacar algunos silicatos (Favas *et al.*, 2011; Hall *et al.*, 1995). Finalmente, la fracción residual presentó diferencias relevantes en las tres técnicas debido a las consideraciones realizadas en los pasos anteriores. Aproximadamente del 7.26% 15.07% del contenido total de Fe se encontró asociado a grupos silicato (Urbina Trinidad, 2015).

Romero *et al.* 2008 consideran a las altas concentraciones de Fe en los jales una ventaja en la disminución de la dispersión eólica, ya que durante el proceso de oxidación precipitan muchos minerales secundarios de Fe que favorecen la formación de capas cementadas que le dan estabilidad física a los jales, lo cual limita el arrastre por erosión eólica, por otro lado la presencia de pirita en los jales oxidados de Zimapán implica que los jales aún tienen potencial para seguir oxidándose y en consecuencia, generar drenaje ácido bajo condiciones de intemperismo (López Sánchez, 2013). Al respecto, el promedio de precipitación pluvial en Zimapán es de 500 mm anuales, esto aunado al régimen de evaporación (3.75 veces mayor) indica que la escorrentía superficial que se forma en épocas de lluvia podría ser más importante que la infiltración, por lo tanto el riesgo ambiental se dirige a cuerpos de agua superficiales y sedimentos (Moreno *et al.*, 2012; Romero *et al.*, 2008).

3.2.4 Análisis de Especiación de Manganese

En la tabla 19 se muestra la concentración hallada de Manganese en las diferentes fracciones consideradas por las metodologías de fraccionamiento utilizadas.

Tabla 19. Concentración de Mn (mg/kg de masa seca) encontrada en las muestras por las técnicas de extracción química secuencial.

Fracción		Testigo Jal	T J+S M	T J+S S/M	MC173 M	MC101 M	MC173 S/M	N16 S/M
Técnica 1. BCR								
F_{BCR1}	Intercambiable y unida a carbonatos	210.49 ± 4.7	199.49 ± 8.7	192.60 ± 10.6	128.12 ± 12.4	168.74 ± 15.5	178.64 ± 27.3	197.97 ± 6.3
F_{BCR2}	Reducible	229.80 ± 21.5	200.27 ± 17.5	158.90 ± 8.4	260.68 ± 12.8	225.44 ± 0.9	175.03 ± 29.5	227.14 ± 8.0
F_{BCR3}	Materia orgánica	87.03 ± 9.7	91.01 ± 5.1	89.82 ± 0.5	73.50 ± 4.3	70.57 ± 4.8	69.32 ± 7.8	105.72 ± 9.9
F_{BCR4}	Residual	264.72 ± 33.2	371.36 ± 11.9	413.84 ± 21.2	247.67 ± 7.1	282.44 ± 29.4	250.94 ± 15.19	315.14 ± 1.4
Σ(F_{BCR1}~F_{BCR4})		792.05 ± 16.8	862.13 ± 19.4	855.16 ± 2.7	709.97 ± 36.7	747.18 ± 17.8	673.93 ± 18.6	845.98 ± 6.9
Porcentaje de Recuperación		100.55 ± 0.8	106.12 ± 2.3	107.26 ± 5.3	90.33 ± 4.12	94.26 ± 0.4	71.98 ± 0.6	107.76 ± 4.4
Técnica 2. Hall								
F_{H1}	Absorbida/ intercambiable/ carbonatos	88.61 ± 0.3	51.30 ± 7.5	79.51 ± 2.3	81.64 ± 1.4	60.21 ± 1.5	41.73 ± 0.7	90.72 ± 4.3
F_{H1.2}	Absorbida/ intercambiable/ carbonatos II	52.75 ± 39	63.87 ± 0.3	56.54 ± 6.1	59.23 ± 4.1	56.28 ± 2.1	64.94 ± 8.0	70.71 ± 6.4
F_{H2}	Oxihidróxidos de Fe	162.96 ± 19.2	191.20 ± 4.3	174.69 ± 11.3	176.09 ± 7.2	197.74 ± 14.9	186.85 ± 1.8	174.82 ± 1.5
F_{H2.2}	Oxihidróxidos de Fe II	45.92 ± 11.4	45.45 ± 0.3	41.35 ± 6.1	41.06 ± 4.3	46.68 ± 6.9	54.83 ± 3.1	40.88 ± 2.8
F_{H3}	Óxidos de Fe	179.59 ± 1.4	176.12 ± 10.8	176.44 ± 21.2	185.04 ± 3.5	183.87 ± 18.7	175.51 ± 4.2	157.88 ± 0.9
F_{H3.2}	Óxidos de Fe II	28.54 ± 6.0	26.55 ± 4.0	24.32 ± 7.9	21.68 ± 4.4	23.24 ± 6.0	24.80 ± 9.6	28.98 ± 2.6
F_{H4}	Materia orgánica	232.59 ± 31.9	208.04 ± 22.9	276.64 ± 24.0	210.03 ± 23.0	285.59 ± 21.0	235.89 ± 13.5	260.69 ± 3.1
F_{H5}	Residual	250.92 ±	557.34 ±	249.14 ±	248.12 ±	231.86 ±	262.79 ±	248.77 ±

Fracción		Testigo Jal	T J+S M	T J+S S/M	MC173 M	MC101 M	MC173 S/M	N16 S/M
		6.8	35.1	3.4	12.2	3.3	14.5	8.0
$\Sigma(F_{H1} \sim F_{H5})$		1041.87 ± 35.5	1319.86 ± 69.5	1078.64 ± 58.7	1022.90 ± 11.6	1085.47 ± 20.4	1047.33 ± 29.5	1073.45 ± 2.2
Porcentaje de Recuperación		132.24 ± 0.7	162.36 ± 1.4	135.49 ± 14.4	130.18 ± 2.3	136.94 ± 0.0	111.86 ± 0.9	136.77 ± 7.0
Técnica 3. Urbina								
F _{U1}	Soluble	1.51 ± 0.0	1.57 ± 0.0	0.94 ± 0.1	0.53 ± 0.0	1.36 ± 0.1	1.41 ± 0.0	2.94 ± 0.2
F _{U2}	Intercambiable	4.50 ± 0.8	2.59 ± 0.6	3.09 ± 0.3	3.86 ± 0.1	5.25 ± 0.3	2.66 ± 0.4	4.19 ± 0.2
F _{U3}	Carbonatos	174.77 ± 31.5	51.93 ± 3.8	190.60 ± 10.7	204.03 ± 0.4	52.68 ± 0.7	102.44 ± 23.7	223.28 ± 4.8
F _{U4}	Oxihidróxidos de Fe	17.26 ± 2.5	14.30 ± 0.6	13.70 ± 1.2	19.10 ± 1.7	15.23 ± 2.4	14.17 ± 0.5	12.59 ± 0.2
F _{U5}	Óxidos de Fe	300.06 ± 2.5	311.16 ± 20.5	309.25 ± 10.8	317.45 ± 29.5	303.19 ± 31.7	320.00 ± 23.7	317.82 ± 14.6
F _{U6}	Materia orgánica	72.83 ± 1.2	85.77 ± 2.0	73.76 ± 6.7	84.46 ± 3.2	96.64 ± 0.5	78.94 ± 1.2	77.95 ± 4.6
F _{U7}	Sulfuros	194.33 ± 12.6	199.22 ± 11.2	176.73 ± 10.2	184.25 ± 0.2	245.80 ± 8.0	196.94 ± 8.5	200.23 ± 21.6
F _{U8}	Residual	150.64 ± 126.	126.91 ± 17.6	80.50 ± 13.3	162.10 ± 6.4	108.70 ± 16.5	92.24 ± 8.1	110.36 ± 14.8
$\Sigma(F_{U1} \sim F_{U8})$		915.90 ± 10.7	793.45 ± 55.1	848.58 ± 10.6	975.79 ± 37.1	828.85 ± 53.7	808.79 ± 48.3	949.37 ± 30.4
Porcentaje de Recuperación		116.32 ± 4.7	97.57 ± 2.45	106.40 ± 4.2	124.16 ± 4.0	104.52 ± 4.8	86.52 ± 8.3	120.9 ± 2.1

. T=Testigo, J+S= Jal y sustrato, M=Mezclado, S/M=Sin mezclar; n=2.

Técnica BCR

En la figura 15 se presenta la distribución porcentual de Manganeso en las fracciones consideradas por la técnica BCR, por esta técnica se logró recuperar del 71.98% al 107.76% de la concentración extraída por el método de extracción total realizado. En la fracción intercambiable y unida a carbonatos se encontró una contribución porcentual del 18% al 26.6%. El contenido de Mn presentó una disminución en el tratamiento con sustrato y jal mezclados al compararse el testigo (199.49 mg/kg) y la concentración recuperada en las cepas *Klebsiella* MC173 (128.12 mg/kg) y *Enterobacter* MC101 (168.74 mg/kg). En la tabla 19 se muestra que en los ensayos sin mezclar se hallaron cambios menores en la movilidad.

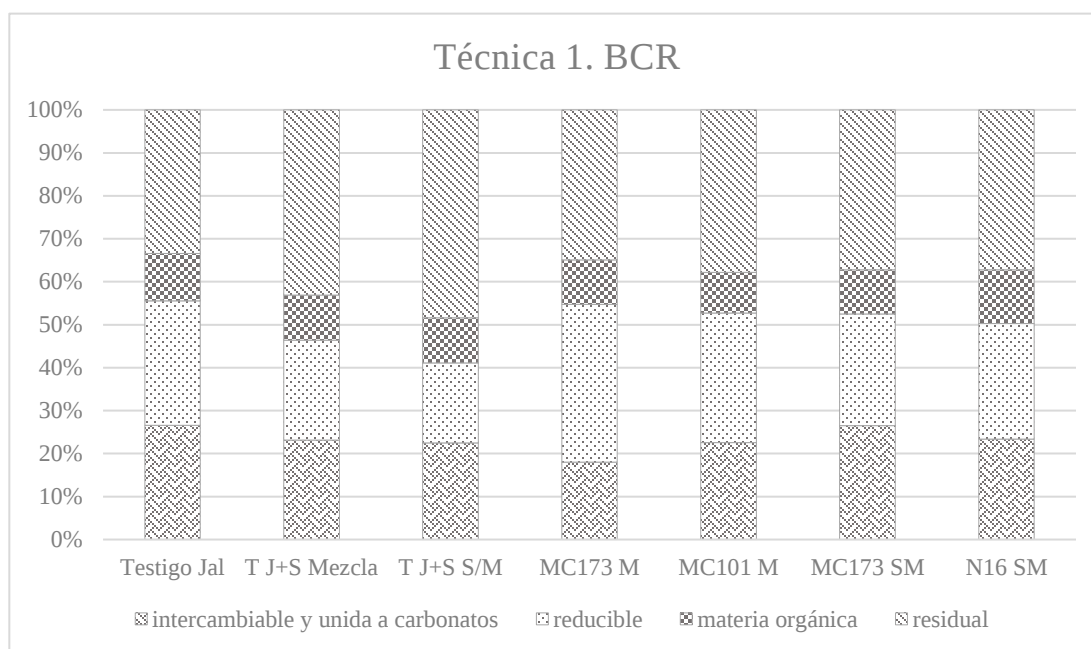


Figura 15. Distribución porcentual de Mn en la técnica BCR.

En la fracción reducible se encontró una contribución porcentual de 18.6-36.7% a la suma total recuperada por esta técnica, en este paso se presentó una variación grande entre el testigo del tratamiento con jal y sustrato sin mezclar (158.90 mg/kg) y los otros dos testigos, se observó un aumento en el contenido de Mn con respecto a los ensayos con *Klebsiella* MC173 (175.03 mg/kg) y *Escherichia* N16 (227.14 mg/kg). En el tratamiento con mezcla la cepa *Klebsiella* MC173 (260.68 mg/kg) presentó movilidad similar al compararse con su testigo (200.27 mg/kg).

En la fracción unida a materia orgánica se halló un porcentaje de contribución del 9.4% al 12.5% al total recuperado por la técnica BCR. En los tratamientos con jal y sustrato mezclados se pudo apreciar una disminución del contenido de Mn en esta fracción con las cepas *Klebsiella* MC173 y *Enterobacter* MC101 (tabla 19), se observó el mismo patrón con la cepa *Klebsiella* MC173 en el tratamiento sin mezclar, no siendo así con la cepa *Escherichia* N16 (105.72 mg/kg) que presentó un aumento en la concentración de Mn con respecto a su testigo (89.92 mg/kg).

La fracción residual presentó un porcentaje del contenido total por la técnica BCR del 33.4% al 48.4%. En esta fracción se encontró una variación grande entre los testigos realizados, sin embargo, los contenidos hallados en los ensayos con cepas (247.57-315.14 mg/kg) resultaron ser menores a las concentraciones halladas en los tres testigos analizados (tabla 19).

Técnica Hall

En la figura 16, se presenta la distribución porcentual de las fracciones consideradas por el método propuesto por Hall *et al.* (1995) mediante la cual se logró un porcentaje de recuperación de 111.86-162.36% con respecto al método 3052 (EPA, 1996). En la fracción AIC se observó un porcentaje de recuperación del 8.7-15.04%, a su vez, con la segunda aplicación de acetato de sodio se obtuvo un alto porcentaje de recuperación (59.5-155.6%) con respecto al contenido extraído por la primera. En esta fracción la cepa *Escherichia* N16 (161.43 mg/kg) presentó un aumento considerable con respecto al su testigo en el tratamiento con ja y sustrato sin mezclar (136.06 mg/kg).

La fracción unida a oxihidróxidos de Fe presentó una contribución porcentual de 17.9-23.1% de la concentración total recuperada por el fraccionamiento, además por medio del segundo ataque de $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ 0.25 M se recuperó del 23.3-29.3% del contenido de Mn obtenido por la primera aplicación del extractante. En los tratamientos con cepas sólo se observaron cambios destacables con la cepa *Klebsiella* MC173 (241.69 mg/kg) con respecto

al testigo (216.04 mg/kg) en el tratamiento con jal y sustrato sin mezclar, en la variable del experimento con mezcla no se observó el mismo patrón de movilidad (Tabla 19).

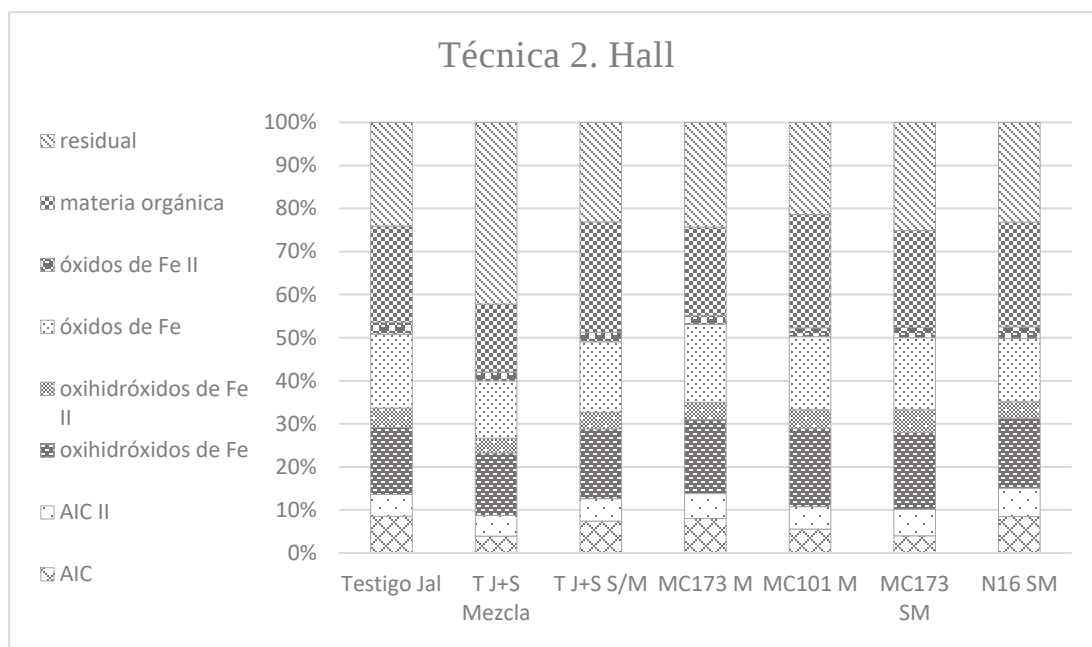


Figura 16. Distribución porcentual de Mn en la técnica Hall.

En la fracción unida a óxidos de Fe y Mn se encontró un porcentaje de contribución del 15.4% al 20.2% del contenido total recuperado por la técnica de Hall. Adicionalmente, por medio de la segunda aplicación de clorhidrato de hidroxilamina se logró recuperar del 11.7% al 18.4% del contenido de Mn obtenido por el primer ataque. En esta fracción no se encontraron cambios resaltantes entre los testigos, por lo tanto, se infiere que *Ricinus communis* no ejerció influencia significativa en la distribución de Mn por si sola. No obstante, en los tratamientos con BPCV se observó una disminución en el contenido de Mn solamente con la cepa *Escherichia* N16 (186.87 mg/kg) con respecto a su testigo (200.76 mg/kg) en el tratamiento de jal y enmienda sin mezclar.

En la fracción unida a materia orgánica se halló una contribución porcentual que fue del 15.8% al 26.3%. Se detectó un aumento importante en el contenido de Mn en la materia orgánica por influencia de la cepa *Enterobacter* MC101 (285.59 mg/kg) con respecto a su testigo (208.04 mg/kg).

Finalmente, en la fracción residual se observó una contribución del 21.4 % al 42.2, se presentó un contenido sobresaliente de Mn en esta fracción en el testigo con jal y sustrato mezclados (557.34 mg/kg), sin embargo, esta concentración pareció reducir por acción del tratamiento con las cepas *Klebsiella* MC173 (248.12 mg/kg) y *Enterobacter* MC101 (231.86 mg/kg) en cuyos casos se infiere cierta estabilización en la concentración de Mn.

Técnica Urbina

En la figura 17 se puede apreciar la distribución porcentual de Manganeso en las fracciones del método de propuesto por Urbina Trinidad (2015), por esta técnica se logró un porcentaje de recuperación del 86.52–124.16% de la concentración encontrada por el método de extracción total 3052 (EPA, 1996).

En la fracción soluble del método Urbina se observó una contribución porcentual muy pequeña (0.1-0.31%) al contenido total recuperado, la concentración más grande en esta fracción se observó en el tratamiento con la cepa *Escherichia* N16 (2.94 mg/kg) en el tratamiento sin mezcla, sin embargo, no se destacaron estos cambios debido a su magnitud.

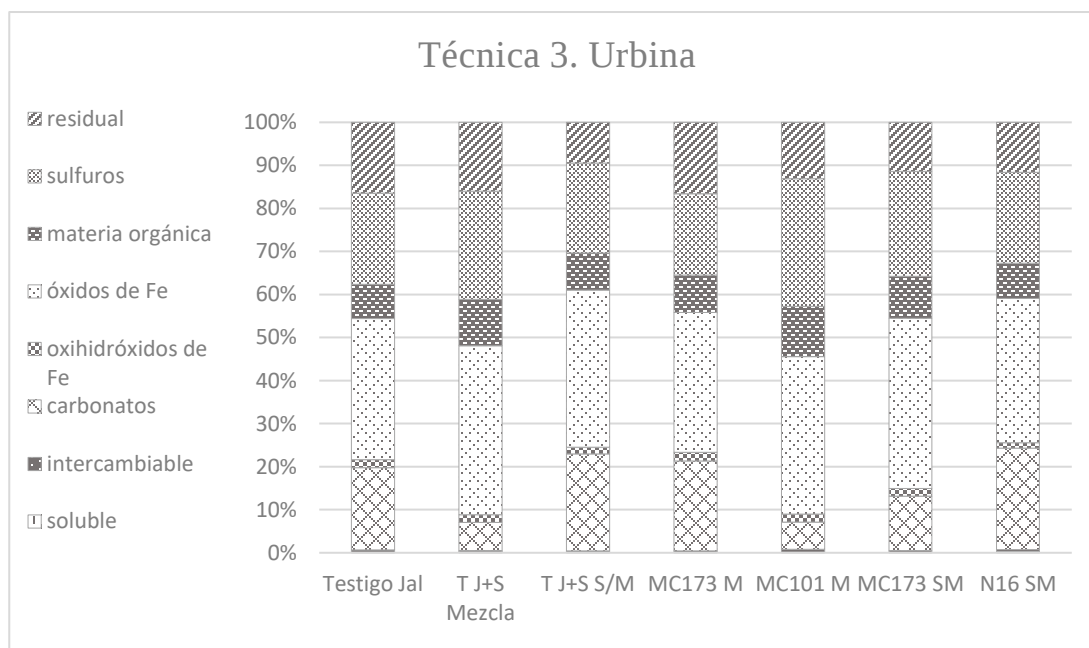


Figura 17. Distribución porcentual de Mn en la técnica Urbina.

En la fracción intercambiable se encontró una contribución porcentual pequeña (0.3-0.6%) al contenido total hallado de Manganeso en cada muestra. Al igual que en la fracción soluble, los cambios en esta fracción fueron pequeños, por lo tanto, no son relevantes en la movilidad total de Manganeso.

En la fracción unida a carbonatos se encontró un porcentaje de contribución de 6.4-23.5% al contenido total de Mn hallado en cada muestra, en el testigo del tratamiento con jal y sustrato mezclados (51.93 mg/kg) se observó una reducción del contenido de Mn con respecto al control realizado únicamente con jal e higuera (174.77 mg/kg). A su vez, los tratamientos con cepas *Klebsiella* MC173 (204.03 mg/kg) y *Enterobacter* MC101 (52.68 mg/kg) en el ensayo sin mezcla presentaron movilidad diferida de Manganeso. Con las cepas *Klebsiella* MC173 (102.44 mg/kg) y *Escherichia* N16 (223.28 mg/kg) también se notaron cambios con respecto a su testigo SM (190.60 mg/kg), sin embargo, estos cambios en la movilidad no fueron definidos.

En la fracción unida a oxihidróxidos de Fe se observó una contribución porcentual del 1.3% al 2% del contenido total hallado por la metodología Urbina, esta aportación no coincide con el contenido porcentual asociado a oxihidróxidos de Fe del método Hall, esta diferencia puede atribuirse a la afinidad del extractante al Manganeso, mientras que en el método Hall se utilizó $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ 0.25 M en el método Urbina se empleó oxalato de amonio 0.2 M.

En la fracción unida a óxidos de Fe se encontró una contribución porcentual del 32.5% al 39.6% del contenido total hallado por esta metodología, las diferencias en la concentración de Mn entre los testigos analizados con *Ricinus communis* no fueron relevantes. La influencia de las cepas *Klebsiella* MC173 (320.00 mg/kg) y *Escherichia* N16 (317.82 mg/kg) en el tratamiento sin mezclar se manifestó como un aumento en el contenido de Mn con respecto al testigo (309.25 mg/kg).

En la fracción unida a materia orgánica se observó un rango porcentual de contribución de 8.0-11.7%, se observó un aumento en el contenido de Mn en los ensayos con *Escherichia* N16 (77.95 mg/kg) y *Klebsiella* MC173 (78.94 mg/kg) con respecto a su testigo (73.76 mg/kg) en el tratamiento sin mezcla.

La fracción unida a sulfuros tuvo un rango de contribución porcentual del 18.9% al 29.7%. El mayor cambio en la distribución de Mn se encontró en el ensayo realizado con la cepa *Enterobacter* MC101 (245.80 mg/kg), en el tratamiento con jal y sustrato mezclados.

La fracción residual presentó una contribución del 9.5% al 16.6%, se encontraron variaciones en las concentraciones de Mn entre los testigos analizados (tabla 19), adicionalmente se detectó un aumento significativo en la concentración de Mn en el tratamiento realizado con la cepa *Klebsiella* MC173 Mezcla (162.10 mg/kg) con respecto a su testigo (126.91 mg/kg).

Comparación de Técnicas

Se obtuvo el orden de recuperación porcentual Hall>Urbina>BCR. La presencia de Manganeso como micronutriente es indispensable para el desarrollo vegetal, debida a sus estados de valencia se puede encontrar principalmente en óxidos, oxihidróxidos y carbonatos (Seoáñez Calvo, 1999). La concentración promedio de Mn en suelos es de 40-900 mg/kg, al respecto, el contenido de Mn hallado en las muestras analizadas se encuentra cerca del límite superior de este intervalo (ATSDR, 2016).

Las normas oficiales mexicanas para procedimientos de gestión de residuos mineros (NOM-157-SEMARNAT-2009) y de concentraciones de remediación en suelos contaminados (NOM-147-SEMARNAT2004) no establecen límites máximos permisibles para el contenido de Mn en suelos, no obstante, de acuerdo con los lineamientos establecidos por la USEPA (1993), al rebasar los 500 mg/kg de Mn, los jales mineros analizados deben ser clasificados como muy contaminados. Se ha reportado que por encima de los 100 mg/kg de Mn en suelo es común encontrar efectos negativos en plantas (Seoáñez Calvo, 1999).

En la figura 18 se muestra el fraccionamiento obtenido, los colores utilizados resaltan las fracciones representativas. En la fracción intercambiable de las tres metodologías se obtuvieron rangos similares de contribución porcentual, no obstante, el uso de 1.0 M NaOAc en la fracción unida a carbonatos del método Urbina (también usada en la fracción AIC del método Hall) reveló que la mayor parte del Manganeso intercambiable se encuentra enlazado a carbonatos.

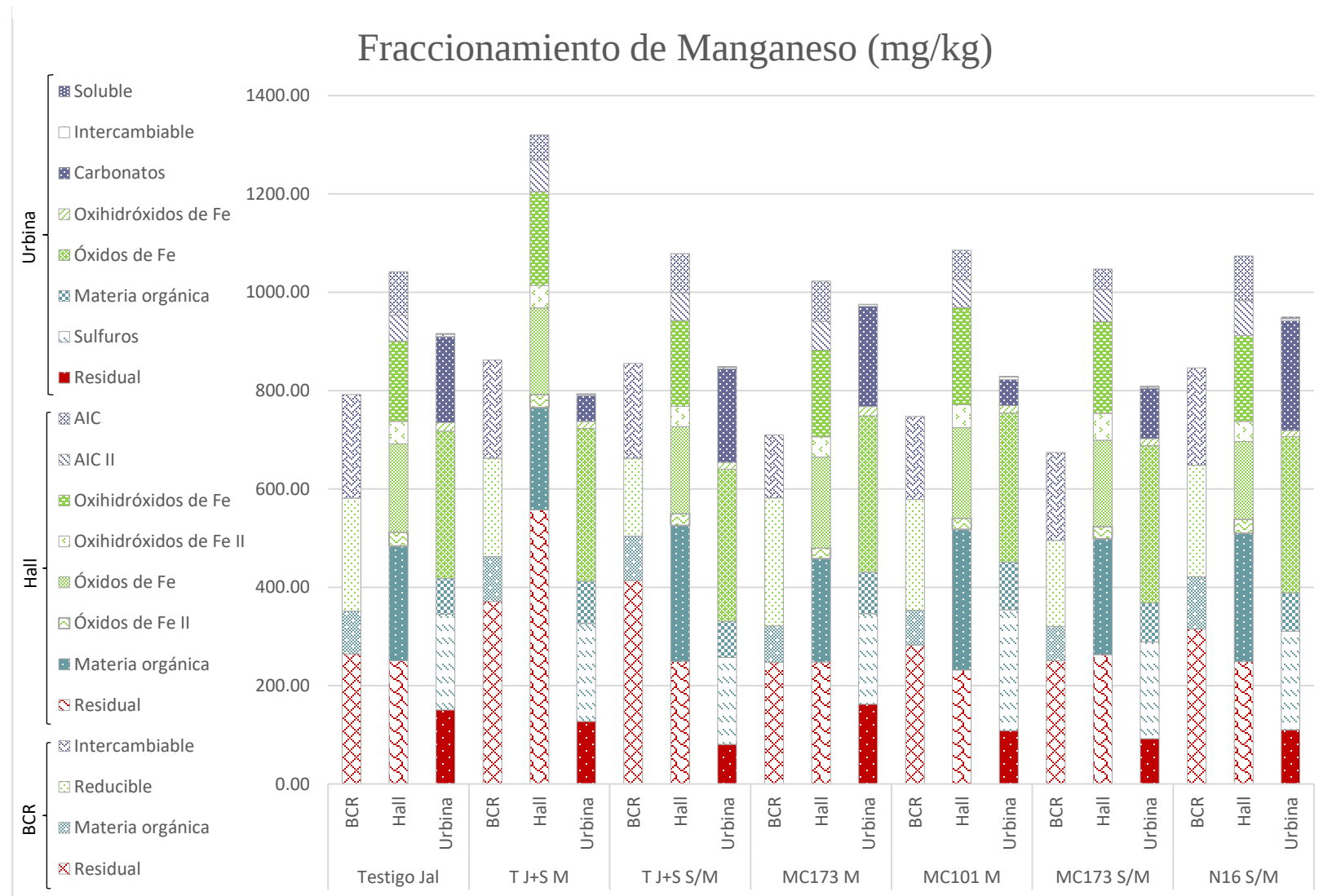
Se encontró una mayor cantidad de Mn reducible en los métodos Hall y Urbina que en la técnica BCR, probablemente debido al número de pasos que estas técnicas utilizan para recuperar al Mn, ya que en los tres procedimientos se utiliza $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ como agente extractante, al respecto, este reactivo tuvo mayor afinidad en la extracción del Mn asociado a oxihidróxidos que el oxalato de amonio, por ello en el fraccionamiento propuesto por Urbina se encontró al Mn unido en su mayoría a óxidos, mientras que en el método Hall este elemento se encuentra distribuido de forma uniforme entre oxihidróxidos y óxidos. Seoáñez Calvo (1999) puntualiza que los óxidos formados con Mn^{+3} y Mn^{+4} son generalmente insolubles, además, que en esta fracción se puede encontrar una cantidad importante de Mn^{+2} absorbido como ion intercambiable debido al incremento de solubilidad que provocan estas condiciones.

En la fracción oxidable se encontraron diferencias grandes entre las tres técnicas utilizadas, debidas fundamentalmente a la afinidad de los reactivos a las formas oxidables de Mn, así se encontró a este elemento unido mayormente a materia orgánica, también se encontraron concentraciones de Mn asociadas a sulfuros, por lo tanto, se puede esperar presencia de alabandina en los jales analizados, así como de sus minerales asociados como: galena, calcopirita, esfalerita, pirita y calcita, entre otros.

La fracción residual de la técnica Urbina presentó diferencias relevantes debido al uso de $\text{KClO}_3/\text{HCl}/\text{HNO}_3$ en las fracciones oxidables de Mn, así, se desconoce la cantidad de silicatos que pueden ser digeridos por esta combinación de reactivos, sin embargo, de acuerdo con los resultados obtenidos por la técnica Urbina el Mn asociado a silicatos es el menos abundante entre las especies químicas consideradas.

La comparación realizada reveló que existen diferencias relevantes en la distribución del Manganese, preferentemente asociadas a la distribución de oxihidróxidos y óxidos de Mn y a la presencia de sulfuros en los jales. No obstante, en todas las muestras se halló más del 50% del contenido total de Mn unido a formas químicas intercambiables y reducibles, esto indica que este elemento presenta un alto potencial de movilidad y biodisponibilidad.

Figura 18. Fraccionamiento de Manganeso con las técnicas BCR, Hall y Urbina.



3.2.5 Análisis de Especiación de Níquel

En la tabla 20, se muestran las concentraciones halladas de Níquel en las etapas consideradas por las tres metodologías de fraccionamiento elegidas.

Técnica BCR

En la figura 19 se presenta la distribución porcentual de Níquel en las distintas fracciones consideradas por el método de BCR, con esta técnica de fraccionamiento se logró recuperar del 99.35% al 192.93% de la concentración recuperada por el método de extracción total utilizado (EPA, 1996). En la fracción intercambiable y unida a carbonatos se observó una contribución porcentual del 0.4% al 6.1% del total recuperado por esta técnica. En esta fracción se encontraron variaciones en la concentración de Ni entre los testigos analizados (Tabla 20); la mayor concentración se encontró en el tratamiento realizado con la cepa *Klebsiella* MC173 (1.67 mg/kg) en el diseño con jal y sustrato sin mezclar, sin embargo, este cambio no fue relevante al compararse con su respectivo testigo (1.31 mg/kg).

La fracción reducible presentó una contribución porcentual del 10.6% al 17.1%, se observó un aumento en el contenido de Ni del testigo realizado con jal e higuierilla (3.39 mg/kg) al compararse con el testigo con jal y sustrato mezclados (4.63 mg/kg), adicionalmente la influencia de las cepas *Klebsiella* MC173 (5.74 mg/kg) y *Enterobacter* MC101 (5.02 mg/kg) se manifestó al incrementarse el contenido de Níquel en esta fracción.

En la fracción unida a materia orgánica se encontró un porcentaje del 19% al 26.0% del total de Ni recuperado por esta metodología, en esta fracción se halló un cambio sobresaliente en el tratamiento realizado con la cepa *Klebsiella* MC173 (6.55 mg/kg) con respecto a su testigo (5.67 mg/kg) en el diseño con jal y sustrato sin mezclar, además, esta cepa presentó influencia similar en la movilidad de Ni en el tratamiento con mezcla aumentando el contenido a 7.79 mg/kg en relación al testigo (6.44 mg/kg).

Tabla 20. Concentración de Ni (mg/kg de masa seca) encontrada en las muestras por las técnicas de extracción química secuencial.

Fracción		Testigo Jal	T J+S M	T J+S S/M	MC173 M	MC101 M	MC173 S/M	N16 S/M
Técnica 1. BCR								
F_{BCR1}	Intercambiable y unida a carbonatos	0.13 ± 0.0	1.12 ± 0.1	1.31 ± 0.2	0.24 ± 0.3	0.36 ± 0.2	1.67 ± 0.3	0.85 ± 0.3
F_{BCR2}	Reducible	3.39 ± 0.7	4.63 ± 0.2	3.81 ± 0.2	5.74 ± 0.3	5.02 ± 0.1	3.80 ± 0.3	4.94 ± 0.3
F_{BCR3}	Materia orgánica	8.36 ± 0.3	6.44 ± 0.4	5.67 ± 0.5	7.79 ± 0.4	5.77 ± 0.2	6.55 ± 0.1	6.08 ± 0.7
F_{BCR4}	Residual	20.26 ± 0.3	16.02 ± 1.4	11.89 ± 0.3	19.84 ± 2.6	18.84 ± 0.2	15.61 ± 0.5	20.14 ± 0.3
Σ(F_{BCR1}~F_{BCR4})		32.15 ± 0.7	28.20 ± 2.1	22.69 ± 0.8	33.62 ± 2.4	29.98 ± 0.2	27.64 ± 0.6	32.01 ± 0.4
Porcentaje de Recuperación		127.71 ± 0.4	99.35 ± 1.1	116.50 ± 7.6	127.44 ± 4.8	129.97 ± 23.1	114.85 ± 1.2	192.93 ± 18.2
Técnica 2. Hall								
F_{H1}	Absorbida/ intercambiable/ carbonatos	0.86 ± 0.2	0.82 ± 0.1	0.45 ± 0.1	0.91 ± 0.2	0.83 ± 0.2	0.80 ± 0.3	0.78 ± 0.1
F_{H1.2}	Absorbida/ intercambiable/ carbonatos II	0.67 ± 0.1	0.54 ± 0.6	0.60 ± 0.4	0.64 ± 0.2	0.54 ± 0.3	0.75 ± 0.1	1.08 ± 0.3
F_{H2}	Oxihidróxidos de Fe	1.24 ± 0.6	1.69 ± 0.0	2.01 ± 0.3	1.33 ± 0.2	1.22 ± 0.1	1.23 ± 0.0	2.71 ± 0.1
F_{H2.2}	Oxihidróxidos de Fe II	2.01 ± 0.5	2.22 ± 0.2	2.07 ± 0.1	1.95 ± 0.0	2.18 ± 0.2	2.41 ± 0.5	1.82 ± 0.1
F_{H3}	Óxidos de Fe	4.09 ± 0.6	3.66 ± 0.2	3.48 ± 0.0	3.32 ± 0.3	3.80 ± 0.1	3.85 ± 0.1	3.36 ± 0.2
F_{H3.2}	Óxidos de Fe II	0.10 ± 0.0	0.14 ± 0.1	0.37 ± 0.1	0.21 ± 0.0	0.22 ± 0.4	0.47 ± 0.1	0.26 ± 0.2
F_{H4}	Materia orgánica	15.49 ± 0.4	18.00 ± 1.1	20.85 ± 1.2	15.65 ± 0.1	17.90 ± 0.1	16.92 ± 2.4	17.47 ± 2.1
F_{H5}	Residual	1.78 ±	20.84 ±	2.55 ±	3.30 ±	2.69 ±	2.18 ±	2.63 ±

Fracción		Testigo Jal	T J+S M	T J+S S/M	MC173 M	MC101 M	MC173 S/M	N16 S/M
		0.1	2.2	0.2	1.4	0.3	0.3	0.3
$\Sigma(F_{H1} \sim F_{H5})$		26.23 $\pm$ 0.0	47.92 $\pm$ 0.3	32.37 $\pm$ 1.4	27.30 $\pm$ 1.5	29.39 $\pm$ 0.4	28.60 $\pm$ 1.3	30.11 $\pm$ 2.7
Porcentaje de Recuperación		104.02 $\pm$ 2.7	168.01 $\pm$ 13.1	158.42 $\pm$ 9.4	101.48 $\pm$ 16.8	143.17 $\pm$ 19.6	119.73 $\pm$ 3.9	168.59 $\pm$ 3.7
Técnica 3. Urbina								
F _{U1}	Soluble	0.38 $\pm$ 0.2	0.27 $\pm$ 0.0	ND	0.35 $\pm$ 0.1	0.42 $\pm$ 0.0	0.05 $\pm$ 0.0	0.22 $\pm$ 0.2
F _{U2}	Intercambiable	1.20 $\pm$ 0.1	1.12 $\pm$ 0.0	0.87 $\pm$ 0.1	1.25 $\pm$ 0.6	1.12 $\pm$ 0.5	1.28 $\pm$ 0.8	1.26 $\pm$ 0.2
F _{U3}	Carbonatos	1.94 $\pm$ 0.0	0.96 $\pm$ 0.2	3.27 $\pm$ 0.1	2.27 $\pm$ 0.2	0.41 $\pm$ 0.4	2.39 $\pm$ 0.0	2.96 $\pm$ 0.0
F _{U4}	Oxihidróxidos de Fe	1.04 $\pm$ 0.1	1.08 $\pm$ 0.1	0.97 $\pm$ 0.1	0.99 $\pm$ 0.4	1.12 $\pm$ 0.2	0.77 $\pm$ 0.0	1.05 $\pm$ 0.3
F _{U5}	Óxidos de Fe	4.26 $\pm$ 0.0	4.29 $\pm$ 0.4	4.38 $\pm$ 0.2	4.53 $\pm$ 0.4	4.44 $\pm$ 0.0	4.52 $\pm$ 0.2	4.84 $\pm$ 0.2
F _{U6}	Materia orgánica	12.21 $\pm$ 0.2	15.37 $\pm$ 3.0	10.80 $\pm$ 2.6	12.11 $\pm$ 0.9	9.04 $\pm$ 0.7	11.82 $\pm$ 0.5	11.78 $\pm$ 0.8
F _{U7}	Sulfuros	7.71 $\pm$ 0.3	9.10 $\pm$ 0.2	6.45 $\pm$ 1.0	5.61 $\pm$ 2.9	14.06 $\pm$ 7.6	8.50 $\pm$ 2.5	9.30 $\pm$ 0.3
F _{U8}	Residual	2.99 $\pm$ 0.6	4.12 $\pm$ 0.4	2.10 $\pm$ 0.0	2.65 $\pm$ 0.1	2.73 $\pm$ 0.1	2.52 $\pm$ 0.1	2.80 $\pm$ 0.1
$\Sigma(F_{U1} \sim F_{U8})$		31.72 $\pm$ 0.1	36.30 $\pm$ 3.7	28.82 $\pm$ 3.3	29.76 $\pm$ 4.7	33.35 $\pm$ 7.1	31.84 $\pm$ 3.4	34.23 $\pm$ 1.3
Porcentaje de Recuperación		125.78 $\pm$ 3.7	127.85 $\pm$ 23.6	140.53 $\pm$ 1.7	109.31 $\pm$ 5.3	160.04 $\pm$ 10.0	133.20 $\pm$ 12.4	193.01 $\pm$ 29.1

T=Testigo, J+S= Jal y sustrato, M=Mezclado, S/M=Sin mezclar; n=2. ND= No Detectable

Finalmente, la fracción residual presentó una contribución porcentual del 52.4% al 63%, en esta fracción el valor más pequeño observado fue correspondiente a la cepa *Klebsiella* MC173 en el tratamiento con jal y sustrato sin mezclar. En general, no se observaron variaciones resaltantes en las muestras analizadas en esta fracción probablemente debido a la limitada influencia que las cepas pueden elegir en silicatos.

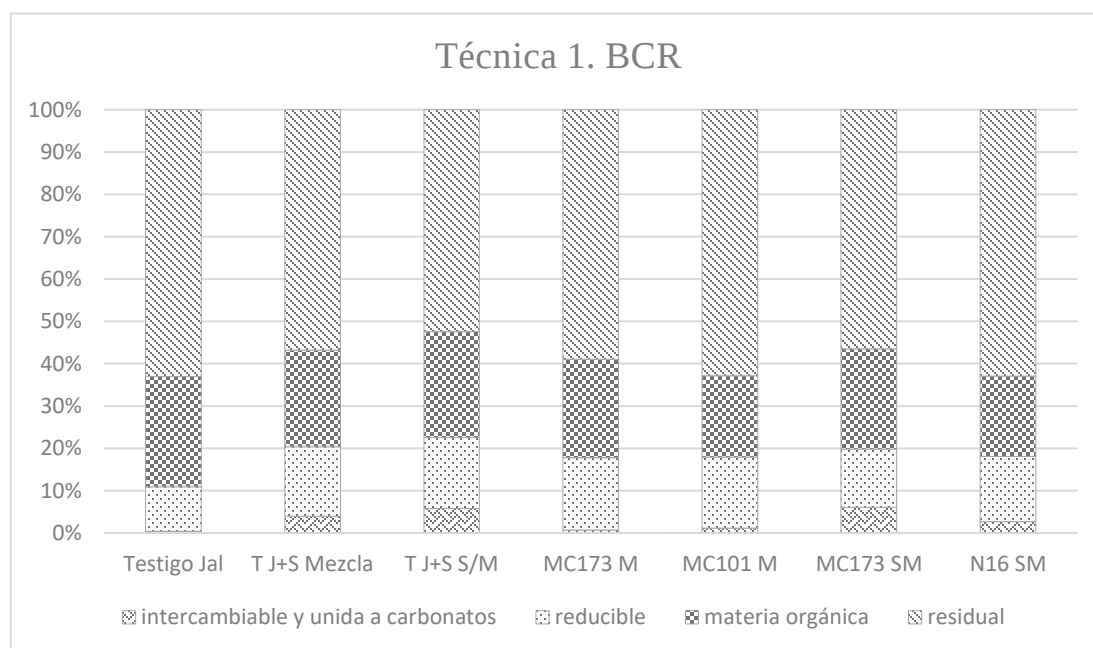


Figura 19. Distribución porcentual de Ni en la técnica BCR.

Técnica Hall

En la figura 20 se puede apreciar la distribución porcentual de Ni en las fracciones consideradas por el método Hall, por medio de esta técnica se logró un porcentaje de recuperación del 101.48% al 168.59%. En la fracción absorbida, intercambiable y unida a carbonatos se observó un porcentaje de contribución del 2.8% al 6.19%, además con la segunda aplicación del acetato de sodio se logró recuperar del 64.9% al 139.18% del contenido recuperado en la primera aplicación.

En la fracción unida a oxihidróxidos de Fe se encontró una contribución porcentual del 8.2% al 15.04% del total encontrado para cada muestra por la técnica Hall, además por medio de la segunda aplicación del clorhidrato de hidroxilamina se recuperó del 67.27% al 196.8% del contenido de Ni extraído inicialmente. Los cambios en esta fracción (tabla 20)

son pequeños debido al bajo contenido de Níquel hallado en esta fracción. La mayor concentración en esta fracción fue la detectada en el ensayo con la cepa *Escherichia* N16 (4.53 mg/kg).

La fracción unida a óxidos de Fe representó del 7.9% al 16.0% del contenido total de Ni hallado por esta metodología, adicionalmente, por medio de la segunda aplicación de $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ 1.0 M se logró recuperar del 2.5% al 12.3% de la concentración de Ni recuperada por la primera digestión, por lo anterior, la variación en la concentración de Ni no fue destacable (tabla 20).

En la fracción unida a materia orgánica se observó la mayor contribución porcentual al contenido total de Níquel hallado en las muestras (37.6-64.4%) y se observaron cambios resaltables entre el testigo realizado con jal e higuierilla (15.49 mg/kg) y los ensayos con jal y sustrato mezclado (18.0 mg/kg) y sin mezclar (20.85 mg/kg). En los experimentos con BPCV se observaron reducciones el contenido de Ni (tabla 20).

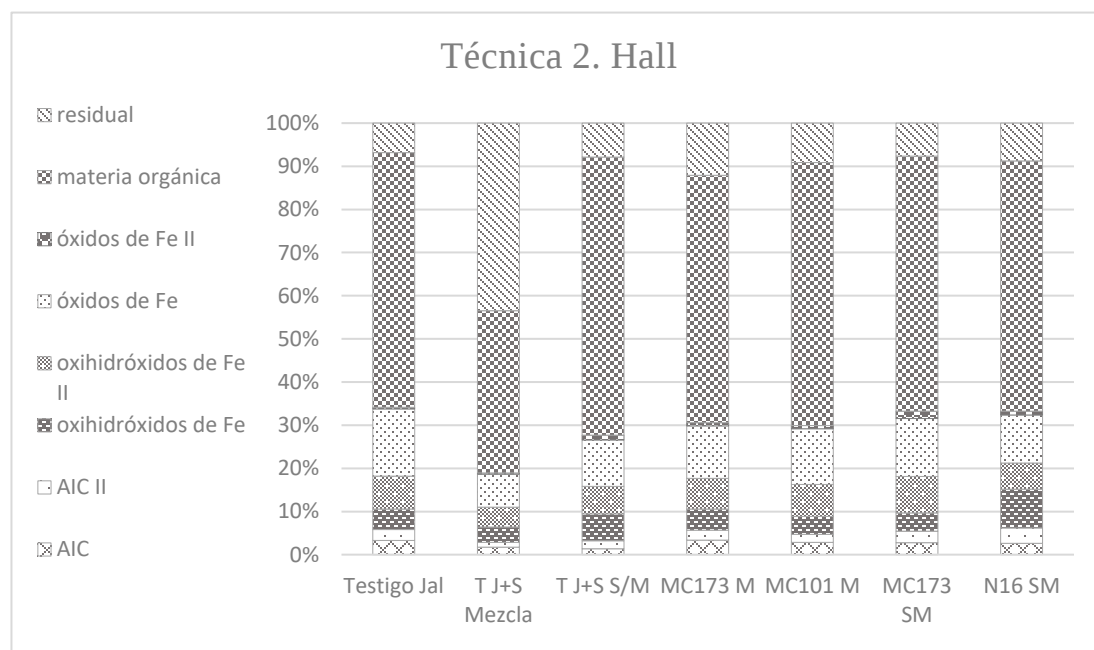


Figura 20. Distribución porcentual de Ni en la técnica Hall.

Finalmente, la fracción residual presentó una contribución porcentual pequeña al total de Ni recuperado por esta metodología (6.8-12.1%), con excepción del contenido encontrado en el testigo con jal y sustrato mezclados (20.84 mg/kg).

Técnica Urbina

En la figura 21 se puede apreciar la distribución porcentual de Níquel para las distintas fracciones consideradas por el método propuesto por Urbina Trinidad (2015). Mediante esta técnica de fraccionamiento se logró recuperar del 109.31-193.01% del contenido hallado por la técnica de extracción total (EPA, 1996). Debido al bajo contenido de Níquel hallado las fracciones potencialmente movilizables presentaron una baja concentración y su movilización no resultó fácilmente evidenciable.

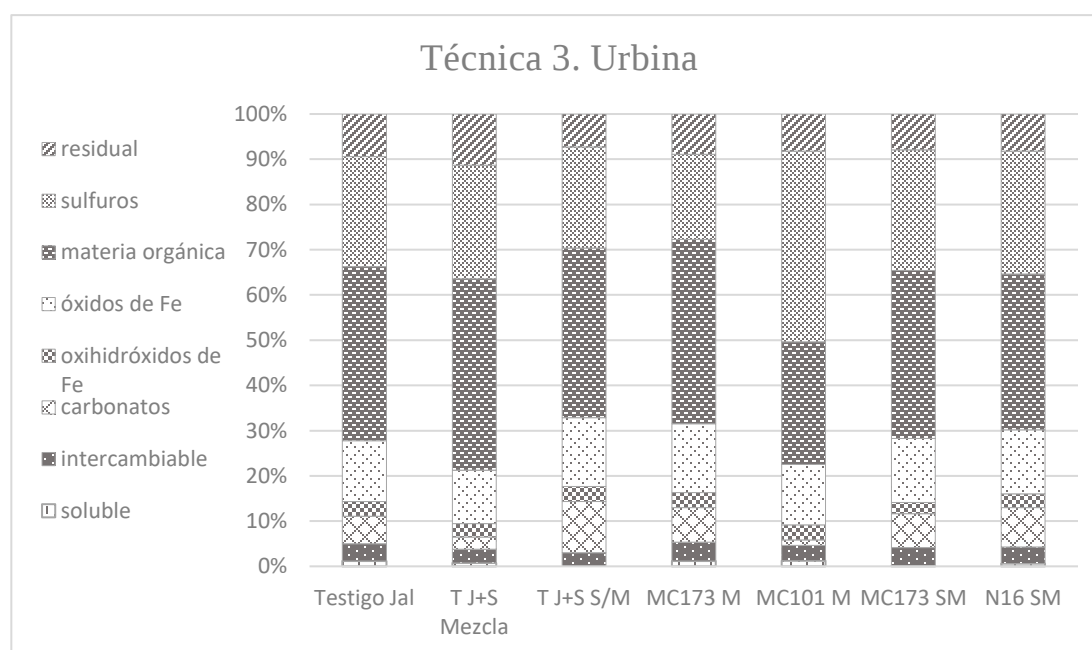


Figura 21. Distribución porcentual de Ni en la técnica Urbina

La fracción soluble presentó una contribución porcentual del 0.1% al 1.3% del total recuperado por la técnica Urbina, en esta fracción se detectó un ligero aumento en la concentración de Ni en los tratamientos con BPCV, siendo el mayor contenido hallado el de la cepa *Enterobacter* MC101 (0.42 mg/kg).

La fracción intercambiable del método Urbina representó del 3.0% al 4.2% del contenido total hallado por este fraccionamiento, en el tratamiento con jal y sustrato sin mezclar se detectó un aumento en la concentración de Ni con las cepas *Klebsiella* MC173 (1.28 mg/kg) y *Escherichia* N16 (1.26 mg/kg) con respecto a su testigo (0.87 mg/kg), el

ensayo con la cepa *Klebsiella* MC173 tuvo la misma movilidad (1.5 mg/kg) con respecto a su testigo en el tratamiento con mezcla (1.12 mg/kg).

La fracción unida a carbonatos presentó una contribución porcentual del 1.2% al 11.3% de la suma total de Ni. El contenido de Ni presentó movilidad en esta fracción, sin embargo, no pareció seguir un patrón específico (Tabla 20), la mayor concentración encontrada para esta fracción fue la del testigo de jal y sustrato sin mezclar (3.27 mg/kg).

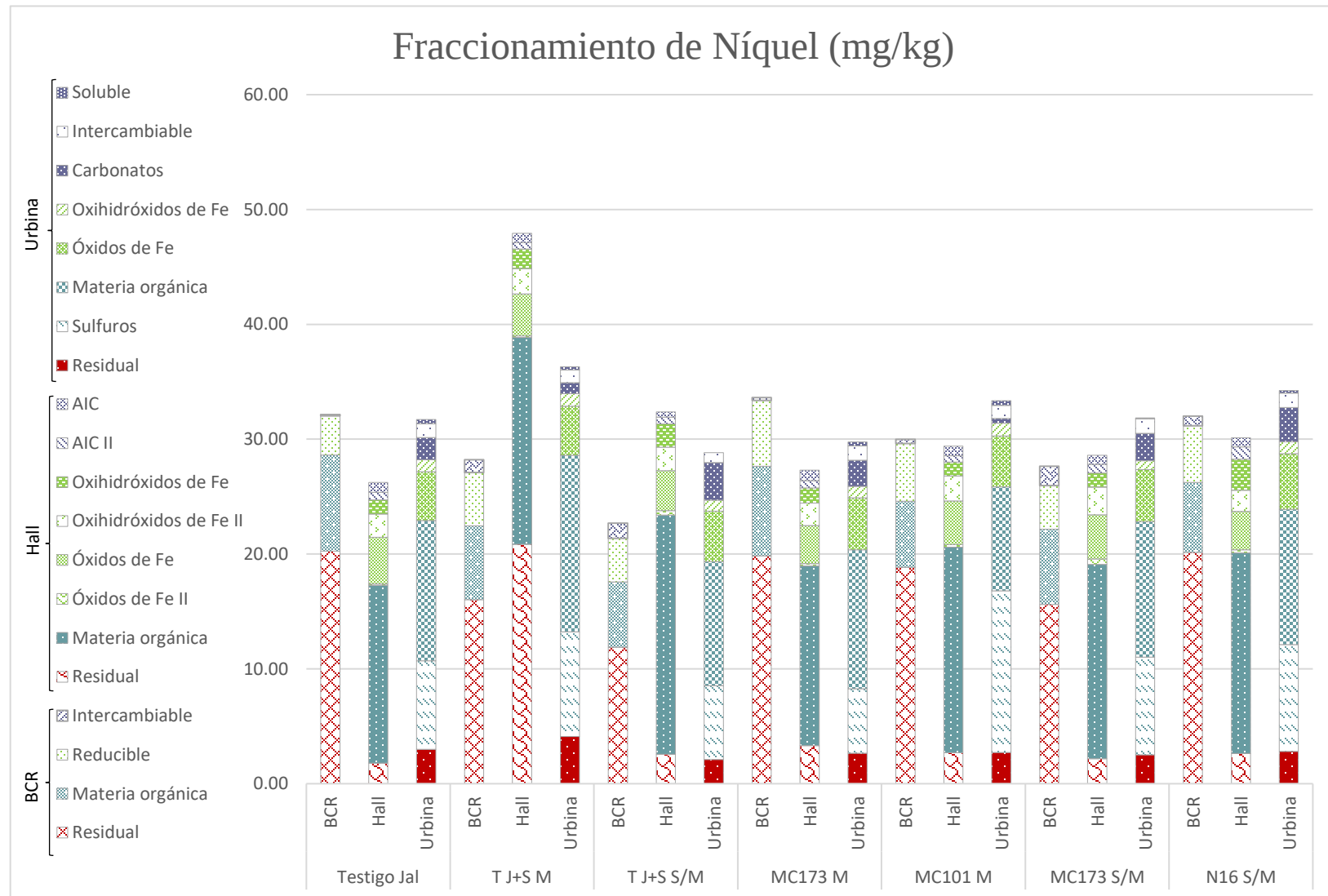
En la fracción unida a oxihidróxidos de Fe se halló un porcentaje de 2.4% al 3.4% del total recuperado por este fraccionamiento, el contenido de Ni en las distintas muestras de tratamiento analizadas tuvo variaciones pequeñas (tabla 20). La fracción unida a óxidos de Fe presentó un rango porcentual del 11.8% al 15.2% de la suma total recuperada por esta técnica, entre los testigos analizados no se encontraron variaciones grandes (Tabla 20)

La fracción unida a materia orgánica presentó una contribución importante (27.1-42.3%) al Ni total extraído, en esta fracción se observaron reducciones del contenido de Ni en los ensayos con *Klebsiella* MC173 (12.11 mg/kg) y *Enterobacter* MC101 (9.04 mg/kg) al compararse con su testigo (15.37 mg/kg) en el tratamiento con jal y sustrato mezclados; al contrario, los ensayos con *Klebsiella* MC173 (11.82 mg/kg) y *Escherichia* N16 (11.78 mg/kg) presentaron mayor concentración de Ni con respecto al testigo (10.80 mg/kg) en el tratamiento sin mezclar.

La fracción unida a sulfuros tuvo una contribución porcentual del 18.8% al 42.2% del contenido total de Ni hallado por esta técnica, la concentración más grande fue hallada en el tratamiento realizado con la cepa *Enterobacter* MC101 (14.06 mg/kg). En el tratamiento con jal y sustrato sin mezclar se observó un aumento en el contenido de Ni por influencia de las cepas *Klebsiella* MC173 (8.50 mg/kg) y *Escherichia* N16 (9.30 mg/kg) con respecto a su testigo (6.45 mg/kg).

La última fase del fraccionamiento propuesto por Urbina Trinidad (2015) presentó una contribución porcentual del 7.3% al 11.3. La concentración de Ni hallada en las muestras analizadas resultó ser congruente con los valores encontrados por la técnica Hall *et al.* (1995) (Tabla 20).

Figura 22. Fraccionamiento de Níquel con las técnicas BCR, Hall y Urbina.



Comparación de Técnicas

El mayor porcentaje de recuperación para Ni correspondió al fraccionamiento propuesto por Urbina Trinidad (2015), seguido por Hall y BCR. En general, el contenido de Ni en las muestras analizadas no fue alto, una causa de ello es que en el distrito de Zimapán no hay menas abundantes que contengan a este elemento, no obstante, suele relacionarse a este elemento con Fe en la composición de pirita, pirrotita y en menas de bornita como impureza (Moreno *et al.*, 2009).

La NOM-157-SEMARNAT-2009 no establece límites máximos permisibles para el contenido de Ni para poder obligar a la realización de pruebas de movilidad, por otro lado, la NOM-147-SEMARNAT-2004, establece LMP para suelos que han sido contaminados, siendo de 1600 mg/kg para suelos de tipo agrícola, residencial y comercial y de 20000 mg/kg para suelos de tipo industrial, como es evidente, el contenido que se halló en las muestras no sobrepasó estos límites (tabla 20). En cuanto al análisis de Ni como micronutriente, la concentración máxima hallada en las muestras (47.92 mg/kg) no sobrepasó los valores óptimos recomendados para el correcto desarrollo vegetal (100 mg/kg) (Seoáñez Calvo, 1999).

La comparación de las técnicas de extracción química secuencial utilizadas, luego de ser agrupadas a las cuatro fracciones representativas (Figura 22), confirmó que en la fracción intercambiable el contenido de Ni fue bajo para los tres fraccionamientos, pues no superó el 10% en la mayoría de las muestras analizadas. Además, mediante el método de Urbina se encontró al Ni como ion intercambiable probablemente asociado a arcillas y carbonatos.

En la fracción reducible de los tres métodos se encontró una contribución mayor a la intercambiable, no obstante, en la mayoría de las muestras analizadas, no superó el 20% del contenido total hallado por las técnicas BCR y Urbina. Las técnicas BCR y Urbina coincidieron en que el Níquel detectado en esta fracción se encontró mayormente unido a óxidos de Fe y Mn.

Se encontraron discrepancias en la fracción oxidable de los tres métodos, principalmente en el método BCR debido a que únicamente se utilizó H₂O₂ como agente oxidante. La combinación de KClO₃/HCl/HNO₃ recuperó mayor cantidad de Ni en los

fraccionamientos restantes. Además, de acuerdo con los resultados obtenidos por la técnica Urbina, el Ni de los jales mineros se encuentra principalmente unido a sulfuros, probablemente como impureza. Estas diferencias en las metodologías también se reflejan en sus fracciones residuales, de cualquier modo, el riesgo de movilidad de este elemento a formas biodisponibles es menor al encontrado en el resto de los elementos analizados, y su presencia no representa un peligro potencial para el desarrollo vegetal.

Se ha demostrado que *R. communis* es capaz de crecer en suelos con alto contenido de Níquel y puede ser usado en la fitorremediación de este elemento, incrementando su eficacia cuando se utilizan enmiendas de suelo (Adhikari & Kumar, 2012; Baudh *et al.*, 2015; Malarkodi *et al.*, 2008).

3.2.6 Análisis de Especiación de Plomo

En la tabla 21 se muestra la concentración de Pb encontrada en las diferentes técnicas de fraccionamiento utilizadas.

Técnica BCR

En la gráfica 23 se muestra la distribución porcentual de Pb en las distintas fracciones del método BCR. Mediante esta técnica se logró un porcentaje de recuperación del 85.07% al 120.64% de la concentración de Pb obtenida por el método de extracción 3052 (EPA, 1996), en la fracción intercambiable y unida a carbonatos se observó una contribución porcentual al total recuperado por la técnica del 0.8% al 6.0%. Entre los testigos analizados se encontraron variaciones en el contenido de Plomo (Tabla 21), en el ensayo realizado con jal y sustrato mezclados se detectó un cambio uniforme al compararse las cepas *Klebsiella* MC173 (10.79 mg/kg), *Enterobacter* MC101 (11.0 mg/kg) y su testigo (46.75 mg/kg).

La fracción reducible presentó la mayor contribución porcentual del fraccionamiento (55.3-72.2%). En el tratamiento con jal y sustrato mezclados se observó un aumento en el contenido de Plomo en el ensayo con *Klebsiella* MC173 (947.19 mg/kg) al compararse con su testigo (848.31 mg/kg).

Tabla 21. Concentración de Pb (mg/kg de masa seca) encontrada en las muestras por las técnicas de extracción química secuencial.

Fracción		Testigo Jal	T J+S M	T J+S S/M	MC173 M	MC101 M	MC173 S/M	N16 S/M
Técnica 1. BCR								
F_{BCR1}	Intercambiable y unida a carbonatos	64.88 ± 0.3	46.75 ± 2.9	34.13 ± 4.0	10.79 ± 0.0	11.00 ± 2.5	72.34 ± 19.0	26.85 ± 2.9
F_{BCR2}	Reducible	876.45 ± 145.8	848.31 ± 93.9	689.62 ± 25.0	947.19 ± 66.6	834.69 ± 7.3	775.44 ± 83.2	881.57 ± 5.8
F_{BCR3}	Materia orgánica	42.40 ± 2.0	51.68 ± 10.9	70.66 ± 12.8	47.13 ± 2.9	51.24 ± 14.8	56.41 ± 22.9	47.30 ± 4.3
F_{BCR4}	Residual	288.56 ± 16.8	382.87 ± 28.1	451.52 ± 113.0	306.46 ± 11.0	326.05 ± 57.5	308.44 ± 18.0	309.32 ± 39.7
Σ(F_{BCR1}~F_{BCR4})		1330.11 ± 172.0	1329.61 ± 135.7	1245.93 ± 154.4	1311.57 ± 80.5	1222.98 ± 77.03	1212.64 ± 40.6	1265.03 ± 44.1
Porcentaje de Recuperación		98.20 ± 8.6	98.23 ± 6.0	94.52 ± 10.5	120.64 ± 2.0	92.16 ± 5.2	85.07 ± 2.1	114.62 ± 5.0
Técnica 2. Hall								
F_{H1}	Absorbida/ intercambiable/ carbonatos	50.95 ± 0.1	70.37 ± 3.9	53.70 ± 2.0	52.60 ± 1.5	68.62 ± 1.3	66.60 ± 0.9	54.85 ± 2.8
F_{H1.2}	Absorbida/ intercambiable/ carbonatos II	74.71 ± 3.2	63.56 ± 4.3	73.36 ± 0.6	76.80 ± 0.2	60.37 ± 10.4	76.80 ± 0.2	93.09 ± 5.3
F_{H2}	Oxihidróxidos de Fe	79.75 ± 0.8	46.05 ± 2.7	53.03 ± 11.2	42.62 ± 3.0	35.35 ± 10.0	44.30 ± 0.3	108.30 ± 0.7
F_{H2.2}	Oxihidróxidos de Fe II	161.65 ± 11.5	159.85 ± 0.3	148.52 ± 17.3	167.44 ± 3.2	164.97 ± 1.0	159.43 ± 16.8	162.75 ± 0.7
F_{H3}	Óxidos de Fe	747.05 ± 84.1	741.52 ± 16.9	688.76 ± 12.7	700.27 ± 5.3	681.07 ± 67.7	707.29 ± 3.2	616.24 ± 14.2
F_{H3.2}	Óxidos de Fe II	43.49 ± 14.0	36.32 ± 1.9	32.65 ± 1.4	31.07 ± 5.2	33.67 ± 2.6	30.69 ± 4.3	31.78 ± 1.6
F_{H4}	Materia orgánica	295.73 ± 3.0	294.41 ± 11.9	246.48 ± 3.4	243.11 ± 10.7	267.73 ± 3.5	254.55 ± 0.5	239.76 ± 2.0
F_{H5}	Residual	21.24 ± 5.7	333.53 ± 37.1	17.48 ± 0.7	32.25 ± 2.2	17.45 ± 3.9	19.43 ± 4.2	17.75 ± 3.9

Fracción		Testigo Jal	T J+S M	T J+S S/M	MC173 M	MC101 M	MC173 S/M	N16 S/M
$\Sigma(F_{H1} \sim F_{H5})$		1474.57 ± 114.4	1745.60 ± 65.9	1313.97 ± 12.8	1346.16 ± 3.5	1329.24 ± 67.3	1359.10 ± 6.0	1324.52 ± 22.0
Porcentaje de Recuperación		109.3 ± 13.1	129.32 ± 10.1	99.75 ± 0.3	124.00 ± 5.9	100.18 ± 4.4	95.37 ± 1.2	119.98 ± 0.9
Técnica 3. Urbina								
F _{U1}	Soluble	0.93 ± 0.2	ND	0.69 ± 0.3	ND	ND	ND	ND
F _{U2}	Intercambiable	ND	ND	0.38 ± 0.2	0.42 ± 0.5	0.33 ± 0.7	ND	0.54 ± 0.8
F _{U3}	Carbonatos	198.35 ± 28.2	26.07 ± 5.4	158.98 ± 45.9	220.65 ± 12.9	14.59 ± 5.9	212.75 ± 33.2	334.89 ± 5.4
F _{U4}	Oxihidróxidos de Fe	89.89 ± 3.0	67.92 ± 6.1	68.13 ± 16.8	114.39 ± 6.4	102.70 ± 7.7	73.63 ± 3.5	85.24 ± 6.1
F _{U5}	Óxidos de Fe	412.58 ± 19.8	415.95 ± 13.1	389.42 ± 23.3	435.99 ± 21.8	412.69 ± 21.2	473.38 ± 8.3	455.07 ± 34.5
F _{U6}	Materia orgánica	117.22 ± 6.7	87.87 ± 5.9	113.70 ± 24.3	133.19 ± 5.5	155.59 ± 9.9	124.11 ± 9.6	104.42 ± 6.1
F _{U7}	Sulfuros	308.60 ± 22.1	309.57 ± 23.1	262.63 ± 29.7	317.85 ± 30.1	309.57 ± 15.6	406.56 ± 40.4	367.98 ± 6.0
F _{U8}	Residual	24.58 ± 2.6	24.54 ± 8.4	25.87 ± 7.2	20.69 ± 0.3	20.62 ± 2.1	33.36 ± 13.9	21.76 ± 0.0
$\Sigma(F_{U1} \sim F_{U8})$		1152.15 ± 7.2	931.92 ± 27.1	1019.80 ± 67.5	1243.18 ± 40.7	1016.09 ± 7.2	1323.79 ± 42.5	1369.89 ± 34.6
Porcentaje de Recuperación		82.28 ± 3.1	69.03 ± 4.8	77.45 ± 6.1	114.42 ± 1.4	76.59 ± 1.1	92.88 ± 2.2	124.09 ± 2.0

T=Testigo, J+S= Jal y sustrato, M=Mezclado, S/M=Sin mezclar. n=2. ND= No Detectable.

Además, en el tratamiento sin mezcla se halló la misma movilidad al contrastar el Pb obtenido con las cepas *Klebsiella* MC173 (775.44 mg/kg) y *Escherichia* N16 (881.57 mg/kg) con respecto al testigo (689.62 mg/kg).

En la fracción unida a materia orgánica se encontró una contribución pequeña (3.3-5.7%) al total recuperado por el fraccionamiento. En el testigo del tratamiento con jal y sustrato sin mezclar (70.66 mg/kg) se observó un aumento en el contenido de Plomo con respecto al testigo realizado con jal e higuera (42.40 mg/kg).

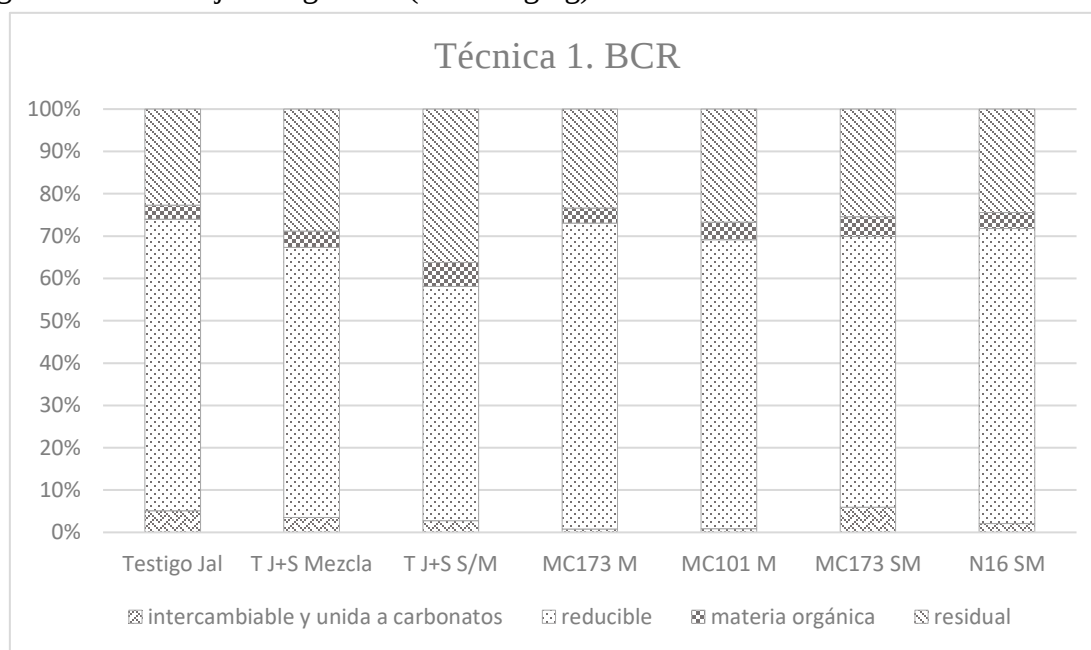


Figura 23. Distribución porcentual de Pb en la técnica BCR

Finalmente, la fracción residual presentó una contribución porcentual del 22.7% al 36.2% del total recuperado por el método BCR, en esta fase del fraccionamiento se encontraron variaciones en los tratamientos que utilizaron BPCV, probablemente por su influencia en la distribución de los elementos. (Tabla 21). Se destacaron los ensayos con jal y sustrato sin mezclar, con resultados similares con las cepas *Klebsiella* MC173 308.44 mg/kg y *Escherichia* N16 309.32 mg/kg).

Técnica Hall

La gráfica 24 presenta la distribución porcentual de Pb en las fracciones consideradas por el método Hall *et al.* (1995), por medio de esta técnica se logró recuperar del 95.37% al 129.32% de la concentración de Plomo hallada por medio de la técnica de extracción total

(EPA, 1996). En la fracción AIC se observó un porcentaje de contribución del 7.7% al 11.17%, a su vez, la segunda aplicación de acetato de amonio tuvo un porcentaje de recuperación del 88.0% al 169.73%. La influencia de las BPCV se pudo apreciar en el tratamiento con jal y sustrato sin mezclar, las cepas *Klebsiella* MC173 (143.41 mg/kg) y *Escherichia* N16 (147.93 mg/kg) presentaron un mayor contenido de Plomo con respecto al testigo (127.06 mg/kg).

La fracción unida a oxihidróxidos de Fe presentó una contribución porcentual del 11.8% al 20.46% al total recuperado por la técnica Hall, además, por medio de la segunda aplicación de clorhidrato de hidroxilamina 0.25 M se logró extraer mayor contenido de Plomo (150.28% al 466.6%), En esta fracción la aplicación de sustrato influyó en la distribución de Plomo pues se encontró un menor contenido del elemento en los testigos realizados con jal y sustrato con mezcla (205.90 mg/kg) y sin mezcla (201.55 mg/kg) al compararse al testigo realizado únicamente con jal e higuierilla (241.40 mg/kg). Las cepas utilizadas no presentaron cambios notables en la movilidad de Plomo, a excepción del tratamiento con *Escherichia* N16 (271.05 mg/kg).

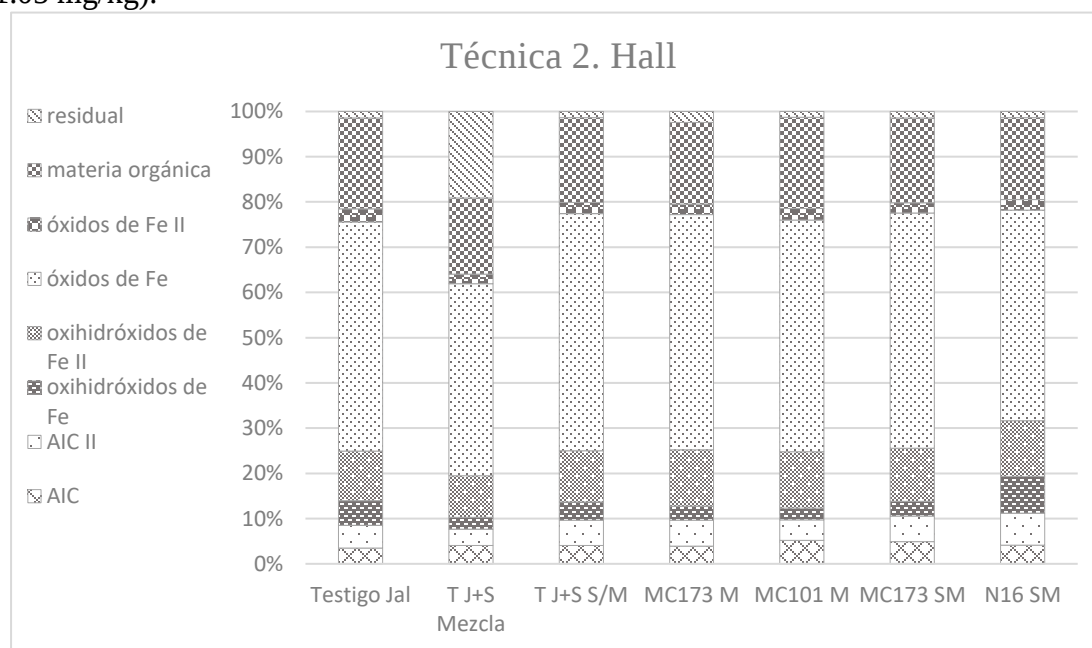


Figura 24. Distribución porcentual de Pb en la técnica Hall.

En la fracción unida a óxidos de Fe del método Hall se encontró una contribución porcentual del 44.6 % al 54.9% del total recuperado en cada muestra, adicionalmente por medio de la segunda aplicación de clorhidrato de hidroxilamina 1.0 M se obtuvo un porcentaje

de recuperación del 4.3% al 5.8% de la concentración de Plomo obtenida con la primera aplicación de este reactivo. En esta fracción el contenido de Plomo presentó una reducción en los ensayos con las cepas *Klebsiella* MC173 (731.34 mg/kg) y *Enterobacter* MC101 (714.74 mg/kg) con respecto a su testigo (777.84 mg/kg) en el diseño experimental con mezcla de jal y sustrato.

La fracción unida a materia orgánica presentó una contribución del 16.9% al 20.1% del total recuperado por la técnica Hall. En el tratamiento con jal y sustrato mezclados se detectó una disminución en la concentración de Plomo en los tratamientos con las cepas *Klebsiella* MC173 (243.11 mg/kg) y *Enterobacter* MC101 (267.73 mg/kg) con respecto al testigo (294.41 mg/kg). Finalmente, la fracción residual presentó una contribución porcentual del 1.3% al 2.4%, a excepción del contenido encontrado en el testigo de jal y sustrato mezclados, el cual presentó 333.53 mg/kg de Pb (19.1%).

Técnica Urbina

En la figura 25 se muestra la distribución porcentual de Plomo en el fraccionamiento realizado con el método propuesto por Urbina (2015). Por medio de esta técnica se logró un porcentaje de recuperación del 69.03-124.09% con respecto al contenido de Pb obtenido por el método de extracción total (EPA, 1996).

En la fracción soluble sólo se logró detectar contenido de Plomo en las muestras de jal con higuerilla y jal con sustrato SM, sin embargo, la contribución porcentual en ambos fue del 0.1%, en cuyos casos no sobrepasó 1 mg/kg (Tabla 21). En la fracción intercambiable no se detectó concentración de Plomo en 3 muestras, asimismo, aquellos ensayos que presentaron contenido de Pb tuvieron una contribución porcentual muy baja (0.03-0.04%) al total recuperado por la técnica.

La fracción unida a carbonatos del método Urbina presentó una contribución porcentual del 1.4% al 24.45%, la concentración hallada en las distintas muestras analizadas presentó variaciones grandes que no permitieron establecer un patrón de movilidad (Tabla 21).

La fracción unida a oxihidróxidos de Fe tuvo un porcentaje del 5.6% al 10.1%. El contenido de Pb fue mayor en el testigo de jal (89.89 mg/kg) que en los realizados con jal y sustrato mezclados (67.92 mg/kg) y sin mezclar (68.13 mg/kg). La influencia de las cepas *Klebsiella* MC173 (114.39 mg/kg) y *Enterobacter* MC101 (102.70 mg/kg) aumentó la concentración de Pb en esta fracción.

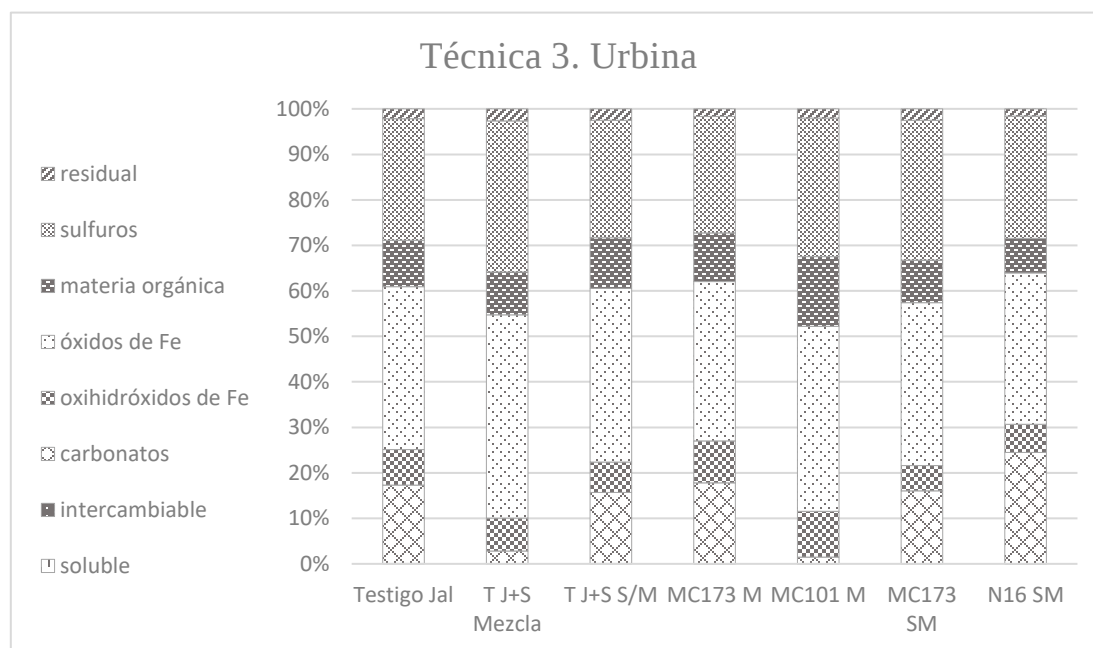


Figura 25. Distribución porcentual de Pb en la técnica Urbina

En la fracción unida a óxidos de Fe se observó una contribución porcentual del 33.22% al 44.6% del total recuperado de Plomo por la técnica Urbina de fraccionamiento. El contenido de Plomo se vio aumentado en los ensayos con las cepas *Klebsiella* MC173 (435.99 mg/kg) y *Escherichia* N16 (412.69 mg/kg) al compararse con la concentración obtenida en el testigo (389.42 mg/kg) del tratamiento con jal y sustrato sin mezclar.

La fracción unida a materia orgánica presentó un rango porcentual de 7.62-15.3% del contenido total de Plomo recuperado por la técnica propuesta por Urbina Trinidad (2015), en esta fase la influencia de las cepas *Klebsiella* MC173 (133.19 mg/kg) y *Enterobacter* MC101 (155.59 mg/kg) aumento la concentración de Pb al compararse con el testigo (87.87 mg/kg) en el tratamiento de jal y sustrato mezclados.

En la fracción unida a sulfuros se observó una contribución porcentual del 25.6% al 33.2%, los cambios en la concentración de Pb entre las diferentes muestras analizadas no presentaron un patrón (Tabla 21).

Por último, la fracción unida a silicatos tuvo un rango de contribución porcentual del 1.6% al 2.6% del total recuperado por el fraccionamiento propuesto por Urbina (2015), los cambios en esta fracción fueron pequeños en comparación a los observados en las fracciones potencialmente movilizables (Tabla 21).

Comparación de Técnicas

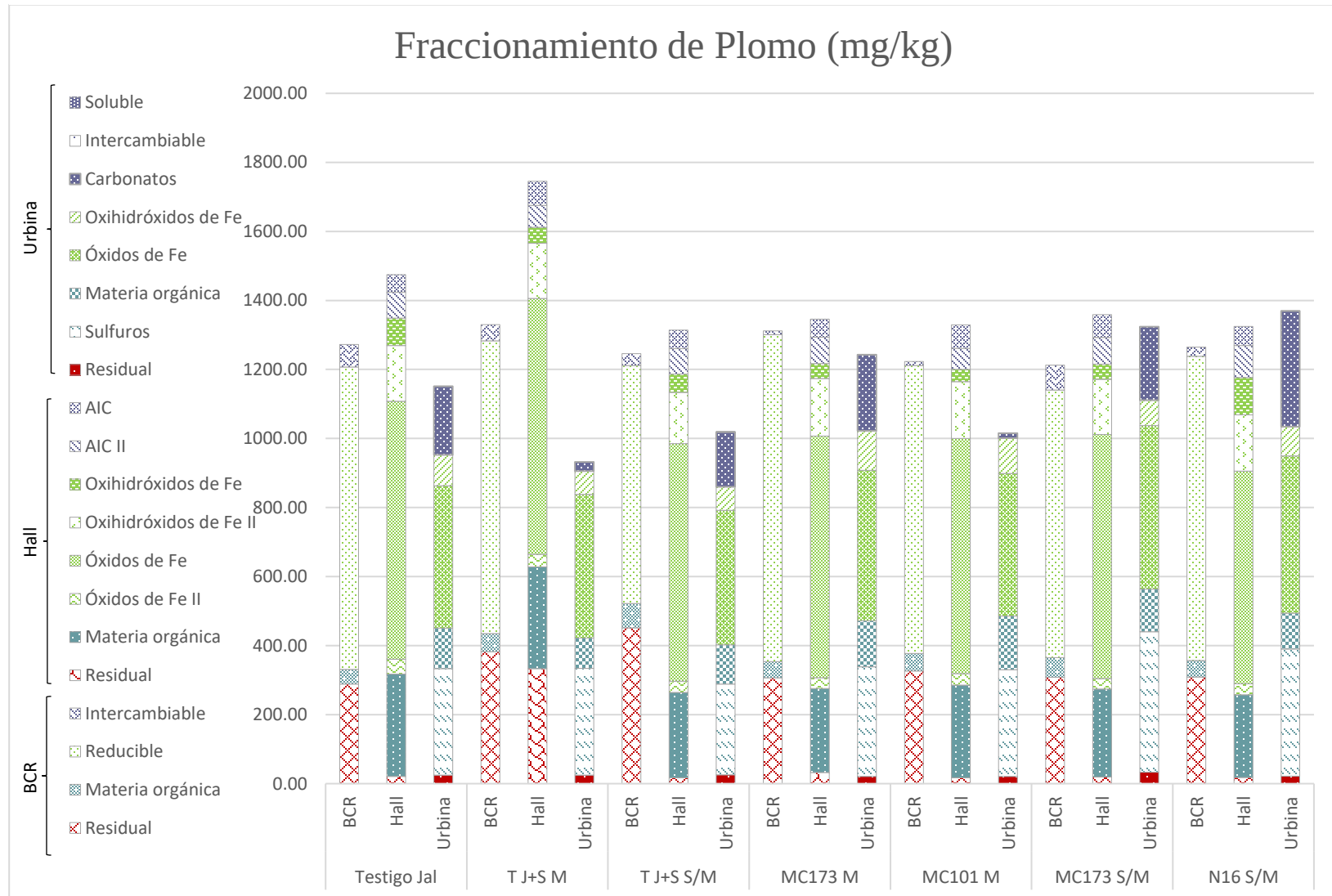
De las tres técnicas empleadas en el fraccionamiento de Pb, el método Hall presentó el mayor porcentaje de recuperación, seguido por BCR y Urbina. La concentración de Plomo encontrada en las muestras analizadas se relaciona con las menas del distrito de Zimapán, de las cuales destacan la boulangerita, galena, jamesonita y vanadinita, a su vez, su presencia se asocia estructuralmente a Fe, Zn, y Cd, entre otros (Moreno *et al.*, 2009).

Del análisis de peligrosidad ambiental, la NOM-052-SEMARNAT-2005 obliga a clasificar a los jales analizados como peligrosos al sobrepasar el LMP en Pb de 100 mg/kg con base al contenido total de Pb encontrado (Tabla 21). Además, también se sobrepasó el LMP para suelos de tipo industrial contaminados por Plomo (800 mg/kg).

Anju & Banerjee (2010) y Tlustos *et al.* (2005) han realizado comparaciones de técnicas de fraccionamiento de Plomo en suelos y jales mineros. Al igual que en los otros EPT analizados, las tres técnicas fueron divididas en cuatro fracciones representativas para su comparación, distinguiéndose estas como intercambiable, reducible, oxidable y residual.

El Plomo hallado en la fracción intercambiable del método Urbina fue mayor al extraído por las técnicas Hall y BCR, este contenido recuperado se debe al uso de NaOAc 1.0 M y el tiempo de retención usado (10 horas), este Pb se asocia a la presencia de carbonatos en las muestras analizadas, por lo tanto, podría encontrarse cerusita (PbCO_3) como componente mineral de los jales. Además, Anju & Banerjee (2010) destacan la habilidad del CaCO_3 como un fuerte absorbente de Pb, y formador de complejos como $\text{CO}_3 \cdot \text{PbCO}_3$.

Figura 26. Fraccionamiento de Plomo con las técnicas BCR, Hall y Urbina.



La fracción reducible de las técnicas BCR y Hall presentó más del 50% de la suma total del Plomo recuperado. En la técnica Urbina varió del 39.44% al 51.92%. De acuerdo con los resultados obtenidos en los fraccionamientos Hall y Urbina, la mayor parte del Pb reducible se encuentra unido a óxidos de Fe y Mn. La adsorción de cationes de Plomo en óxidos de Fe y Mn ha sido sugerida como un mecanismo de fijación universal, pues estos minerales son colectores importantes de metales en suelos, particularmente en rangos altos de pH ($\text{pH} > 7.0$) (Anju & Banerjee, 2010; Favas *et al.*, 2011).

La cantidad de Pb oxidable con H_2O_2 en el método BCR fue baja, variando de 42.40-70.70 mg/kg. En contraste, la cantidad de Pb recuperada con $\text{KClO}_3/\text{HCl}/\text{HNO}_3$ en el método Hall alcanzó hasta 295.72 mg/kg. De acuerdo con el fraccionamiento propuesto por Urbina se lograron extraer hasta 406.60 mg/kg de Plomo asociado a sulfuros primarios, esto corresponde a la presencia de galena (PbS) como mena de Zimapán (Azpeitia Caballero, 2007). El Plomo recuperado en la fracción residual de las técnicas Hall y Urbina fue menor al extraído en el método BCR, como consecuencia de los reactivos empleados.

Moreno Tovar *et al.*, (2012) realizó un análisis por difracción de rayos x (DRX) en jales mineros del distrito de Zimapán, determinando fases minerales de anglesita (PbSO_4), cerusita (PbCO_3) y plumbojarosita [$\text{Pb}((\text{Fe}_3(\text{OH})_6(\text{SO}_4)_2)_2]$], además confirmó por microanálisis con microscopio electrónico de barrido la presencia de anglesita y cerusita.

3.2.7 Análisis de Especiación de Zinc

En la tabla 22 se muestra la concentración de Zinc obtenida para cada una de las fracciones establecidas por los métodos de fraccionamiento utilizados en el análisis de movilidad.

Técnica BCR

En la figura 27 se muestra la distribución de Zinc en las diferentes fracciones del método de extracción secuencial BCR. Por medio de esta técnica se logró recuperar del 100.92 al 153.28% del contenido total de Zn hallado en las muestras por el método de extracción total utilizado (EPA, 1996).

Tabla 22. Concentración de Zn (mg/kg de masa seca) encontrada en las muestras por las técnicas de extracción química secuencial.

Fracción		Testigo Jal	T J+S M	T J+S S/M	MC173 M	MC101 M	MC173 S/M	N16 S/M
Técnica 1. BCR								
F_{BCR1}	Intercambiable y unida a carbonatos	749.89 ± 145.9	812.08 ± 85.4	779.22 ± 13.2	461.08 ± 51.1	478.90 ± 102.3	738.29 ± 144.6	649.30 ± 50.2
F_{BCR2}	Reducible	1779.98 ± 14.8	2003.53 ± 14.7	1665.15 ± 33.0	1967.72 ± 76.1	1858.26 ± 214.7	1559.35 ± 23.1	1865.53 ± 65.7
F_{BCR3}	Materia orgánica	461.28 ± 32.7	443.95 ± 20.0	439.06 ± 42.5	328.65 ± 8.8	373.65 ± 5.3	387.60 ± 8.6	505.31 ± 21.3
F_{BCR4}	Residual	1042.26 ± 17.7	1003.34 ± 67.5	1064.27 ± 95.7	942.42 ± 19.8	891.15 ± 2.9	885.14 ± 27.7	847.33 ± 1.9
Σ(F_{BCR1}~F_{BCR4})		4033.41 ± 181.4	4262.89 ± 52.6	3947.70 ± 118.34	3699.87 ± 116.2	3601.96 ± 120.6	3570.38 ± 186.8	3867.47 ± 139.1
Porcentaje de Recuperación		153.28 ± 7.8	131.53 ± 0.7	122.06 ± 1.6	116.00 ± 1.9	100.92 ± 2.2	107.13 ± 7.4	109.99 ± 3.3
Técnica 2. Hall								
F_{H1}	Absorbida/ intercambiable/ carbonatos	348.86 ± 10.0	406.82 ± 23.9	326.87 ± 2.6	353.14 ± 2.1	416.08 ± 4.2	375.60 ± 2.5	299.52 ± 13.9
F_{H1.2}	Absorbida/ intercambiable/ carbonatos II	254.63 ± 19.4	181.43 ± 14.4	252.51 ± 20.2	236.18 ± 6.7	191.64 ± 16.2	215.58 ± 38.0	325.77 ± 10.6
F_{H2}	Oxihidróxidos de Fe	776.73 ± 1.1	463.59 ± 36.4	694.46 ± 33.8	653.44 ± 18.1	519.10 ± 23.5	394.67 ± 19.6	800.04 ± 22.5
F_{H2.2}	Oxihidróxidos de Fe II	724.29 ± 38.1	709.16 ± 31.5	556.44 ± 34.4	551.35 ± 67.5	626.57 ± 109.5	791.42 ± 4.2	612.84 ± 17.0
F_{H3}	Óxidos de Fe	1323.17 ± 33.2	1313.85 ± 14.3	1270.42 ± 29.4	1277.96 ± 12.6	1272.41 ± 14.4	1282.88 ± 37.4	1252.85 ± 30.9
F_{H3.2}	Óxidos de Fe II	73.82 ± 35.3	61.96 ± 4.3	71.44 ± 5.1	50.57 ± 4.8	58.81 ± 16.2	67.78 ± 2.7	67.25 ± 0.1
F_{H4}	Materia orgánica	920.50 ± 34.3	1323.45 ± 18.0	1235.83 ± 3.1	1123.45 ± 8.1	1185.08 ± 1.4	1403.63 ± 25.2	1512.00 ± 17.9
F_{H5}	Residual	174.64 ± 4.0	1219.81 ± 0.3	181.88 ± 11.4	192.19 ± 6.1	87.86 ± 10.3	94.88 ± 1.3	144.36 ± 0.3

Fracción		Testigo Jal	T J+S M	T J+S S/M	MC173 M	MC101 M	MC173 S/M	N16 S/M
$\Sigma(F_{H1} \sim F_{H5})$		4596.65 $\pm$ 104.7	5680.06 $\pm$ 35.5	4589.83 $\pm$ 60.6	4438.21 $\pm$ 21.2	4357.55 $\pm$ 134.6	4626.44 $\pm$ 67.5	5014.63 $\pm$ 77.34
Porcentaje de Recuperación		174.65 $\pm$ 2.9	175.28 $\pm$ 4.2	141.93 $\pm$ 0.5	139.18 $\pm$ 1.5	122.11 $\pm$ 2.4	138.78 $\pm$ 4.4	142.64 $\pm$ 3.10
Técnica 3. Urbina								
F_{U1}	Soluble	9.78 $\pm$ 0.3	16.51 $\pm$ 1.1	6.90 $\pm$ 0.4	5.56 $\pm$ 0.3	9.43 $\pm$ 2.8	14.07 $\pm$ 0.0	9.97 $\pm$ 1.9
F_{U2}	Intercambiable	43.73 $\pm$ 1.3	32.35 $\pm$ 2.5	43.66 $\pm$ 5.0	39.03 $\pm$ 2.7	46.29 $\pm$ 1.0	33.67 $\pm$ 0.5	26.41 $\pm$ 1.3
F_{U3}	Carbonatos	489.80 $\pm$ 120.7	232.54 $\pm$ 41.1	225.29 $\pm$ 11.9	530.57 $\pm$ 11.5	586.54 $\pm$ 33.3	428.20 $\pm$ 36.0	739.86 $\pm$ 12.2
F_{U4}	Oxihidróxidos de Fe	214.68 $\pm$ 3.2	175.59 $\pm$ 7.3	170.28 $\pm$ 8.4	269.10 $\pm$ 60.9	202.52 $\pm$ 2.6	149.44 $\pm$ 4.0	194.96 $\pm$ 15.9
F_{U5}	Óxidos de Fe	1246.68 $\pm$ 2.9	1194.93 $\pm$ 22.8	1216.69 $\pm$ 26.1	1262.86 $\pm$ 8.9	1209.58 $\pm$ 39.7	1236.36 $\pm$ 9.1	1292.16 $\pm$ 14.6
F_{U6}	Materia orgánica	930.91 $\pm$ 92.5	1034.46 $\pm$ 23.8	905.54 $\pm$ 4.3	936.51 $\pm$ 15.2	953.12 $\pm$ 78.1	1055.27 $\pm$ 44.1	899.44 $\pm$ 7.8
F_{U7}	Sulfuros	874.94 $\pm$ 5.6	957.70 $\pm$ 34.6	895.00 $\pm$ 14.1	897.91 $\pm$ 45.8	1007.79 $\pm$ 3.1	1034.51 $\pm$ 35.4	993.31 $\pm$ 160.3
F_{U8}	Residual	106.94 $\pm$ 27.1	90.53 $\pm$ 13.0	101.29 $\pm$ 16.3	51.09 $\pm$ 14.3	58.81 $\pm$ 16.2	58.50 $\pm$ 0.4	59.05 $\pm$ 34.2
$\Sigma(F_{U1} \sim F_{U8})$		3917.45 $\pm$ 14.4	3734.61 $\pm$ 18.1	3564.65 $\pm$ 6.3	3992.63 $\pm$ 107.2	4074.17 $\pm$ 164.1	4010.03 $\pm$ 31.4	4215.16 $\pm$ 147.1
Porcentaje de Recuperación		148.85 $\pm$ 0.4	115.24 $\pm$ 1.5	110.24 $\pm$ 1.6	125.18 $\pm$ 1.4	114.15 $\pm$ 3.3	120.26 $\pm$ 1.1	119.91 $\pm$ 4.9

T=Testigo, J+S= Jal y sustrato, M=Mezclado, S/M=Sin mezclar. n=2.

En la fracción intercambiable y unida a carbonatos se encontró del 12.5% al 20.7% del Zn total recuperado por esta metodología. En el tratamiento con jal y sustrato mezclados se halló una concentración de 461.08 mg/kg en el ensayo con *Klebsiella* MC173 y 478.90 mg/kg con la cepa *Enterobacter* MC101, que al compararse con el testigo (812.08 mg/kg) sugiere que las cepas influyeron en la reducción del contenido de Zn.

En la fracción reducible del método BCR se observó una contribución porcentual del 42.2% al 53.2% del contenido total de Zinc obtenido. En los ensayos realizados con las cepas *Klebsiella* MC173 (1967.72 mg/kg) y *Enterobacter* MC101 (1858.26 mg/kg) se detectaron reducciones en la concentración de Zn con relación al testigo (2003.53 mg/kg) en los tratamientos de jal y sustrato mezclados.

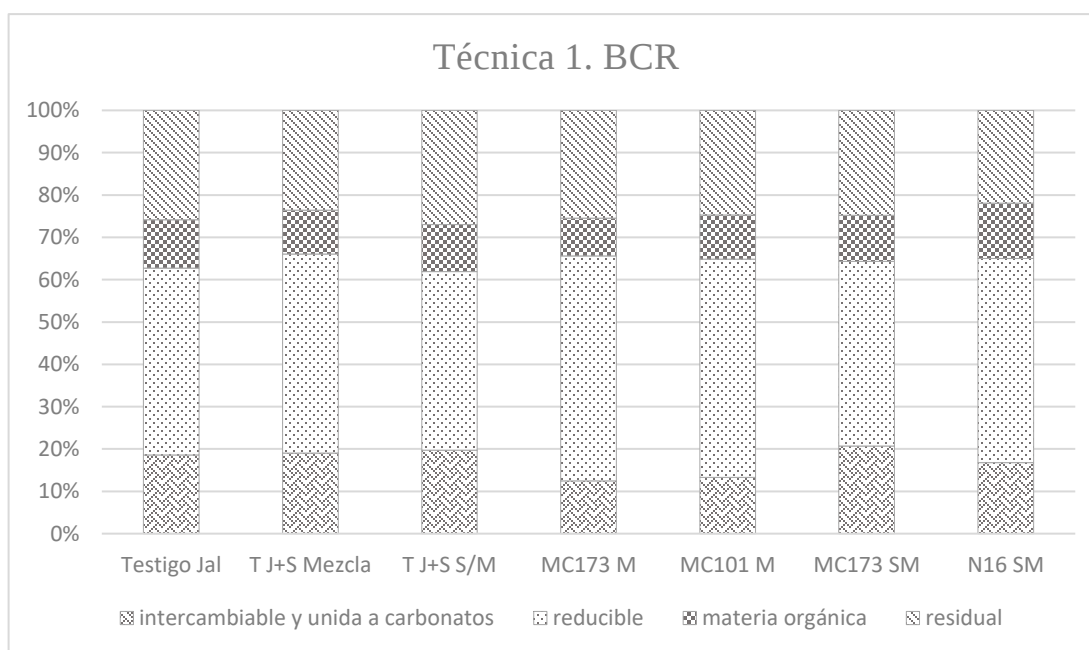


Figura 27. Distribución porcentual de Zn en la técnica BCR.

En la fracción unida a materia orgánica se encontró un rango porcentual del 8.9% al 13.07% del total encontrado de Zinc. En esta fracción se observó una disminución del contenido de Zn al compararse la concentración hallada en el testigo realizado con jal e higuerilla (461.28 mg/kg) y los testigos elaborados con jal y sustrato mezclados (443.95 mg/kg) y sin mezclar (439.5 mg/kg). Además, se observaron disminuciones en el contenido de Zn en los ensayos que incluyeron a *Klebsiella* MC173 (328.65 mg/kg) y *Enterobacter* MC101 (373.65 mg/kg) en macetas con jal y sustrato mezclados.

La fracción residual presentó una contribución porcentual de 21.91-27% al total de Zn encontrado por esta metodología (BCR), la variación entre la concentración hallada en las muestras fue pequeña comparada al rango de valores encontrados (Tabla 22).

Técnica Hall

En la figura 28 se muestra la distribución porcentual de Zn en las fracciones del método Hall, por esta técnica se logró recuperar del 122.11% al 175.28% del contenido total hallado por esta metodología. En la fracción AIC se encontró una contribución porcentual del 10.4% al 13.9% de la suma total recuperada, adicionalmente por la segunda aplicación NaOAc se logró recuperar del 44.6% al 108.8% del Zn extraído por el primer ataque. De los cambios registrados en esta fracción destacó la concentración obtenida en el tratamiento con la cepa *Escherichia* N16 (625.29 mg/kg) con respecto al testigo analizado (579.38 mg/kg) en el tratamiento con jal y enmienda sin mezclar.

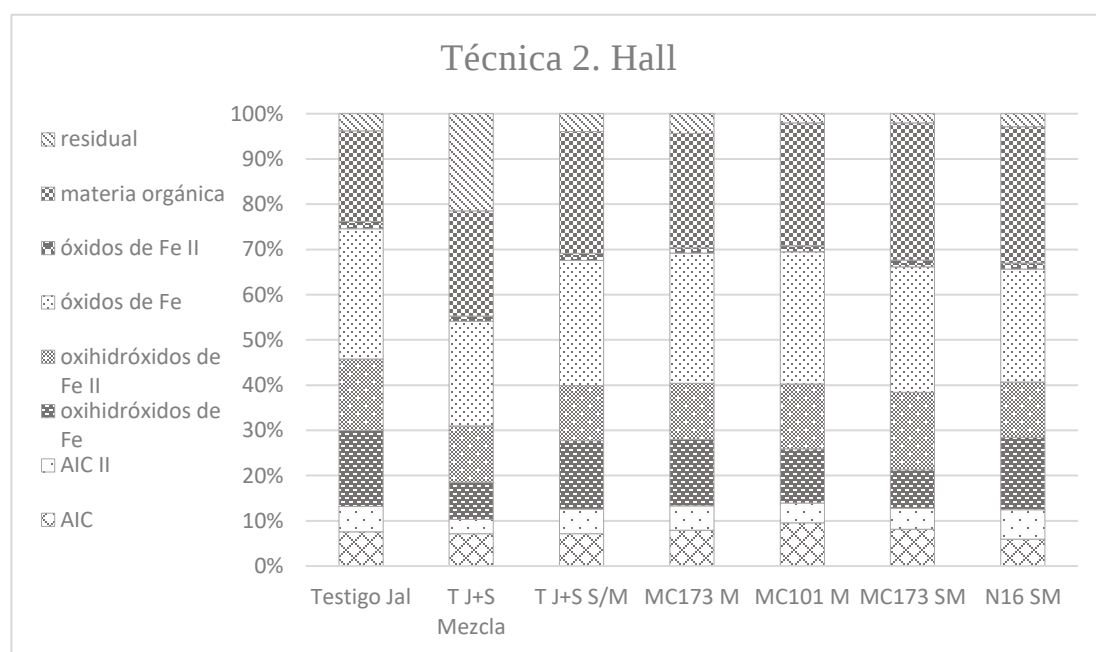


Figura 28. Distribución porcentual de Zn en la técnica Hall.

En la fracción unida a oxihidróxidos de Fe se obtuvo un porcentaje del 20.6% al 32.7% de la suma total recuperada de Zn por esta metodología, además, la segunda aplicación del reactivo extractante tuvo un alto porcentaje de recuperación (76.6-200.5%) con respecto al Zn

extraído inicialmente. En general, todos los tratamientos con enmienda orgánica presentaron reducciones en el contenido de Zn con respecto a los testigos elaborados (Tabla 22).

La fracción unida a óxidos de Fe presentó una contribución porcentual del 24.2% al 30.5% del total recuperado por la metodología Hall, en esta fracción como en los otros elementos se obtuvo un bajo porcentaje de recuperación con la segunda aplicación del reactivo extractante (4.0-5.6%), en el tratamiento de jal y sustrato mezclados se observó una reducción en la concentración de Zn con las cepas *Klebsiella* MC173 (1328.53 mg/kg) y *Enterobacter* MC101 (1331.22 mg/kg) con respecto a su testigo (1375.81 mg/kg).

La fracción unida a materia orgánica tuvo un rango de contribución porcentual del 20.0% al 30.3% de la suma total recuperada de Zn, en esta fracción se observó un aumento en el contenido de Zn entre los testigos realizados con jal y sustrato mezclados (1323.45 mg/kg), sin mezclar (1235.83 mg/kg) y el de jal con *R. communis* (920.50 mg/kg). En el ensayo con mezcla y las cepas *Klebsiella* MC173 (1123.45 mg/kg) y *Enterobacter* MC101 (1185.08 mg/kg) se detectó una concentración aún menor de Zn, por otro lado, la influencia de las cepas *Klebsiella* MC173 (1403.63 mg/kg) y *Escherichia* N16 (1512 mg/kg) tuvo el efecto contrario en la movilidad de este elemento en el ensayo sin mezclar.

La fracción residual presentó un rango porcentual bajo (2.0-4.3%) al total recuperado, a excepción del contenido hallado en la muestra de testigo y jal sin mezcla que presentó un porcentaje de 21.5% (1219.81 mg/kg). El resto de las muestras analizadas no presentó cambios resaltables (Tabla 22).

Técnica Urbina

En la figura 29 se muestra la distribución porcentual de Zinc en las fases del fraccionamiento propuesto por Urbina (2015). Por esta técnica se recuperó del 110.23% al 148.85% del contenido total recuperado en las muestras (EPA, 1996). En la fracción soluble se encontró una contribución porcentual del 0.1% al 0.4% al total encontrado por la técnica, por su magnitud, este valor no es apreciable en la figura 23.

La fracción intercambiable tuvo un rango de contribución porcentual bajo (0.63-1.2%) al total recuperado por la técnica, además, el contenido hallado en los tratamientos realizados con jal y sustrato sin mezclar y las cepas *Klebsiella* MC173 (33.67 mg/kg) y *Escherichia* N16

(26.41 mg/kg) presentó una reducción en la concentración con relación al testigo analizado (43.66 mg/kg).

La fracción unida a carbonatos presentó una contribución porcentual del 6.2% al 17.55%, se observó una reducción en el contenido de Zn en los testigos que se aplicó enmienda orgánica, sin embargo, la concentración obtenida en todos los tratamientos indicó una movilidad opuesta por acción de las BPCV empleadas (Tabla 22), de las cuáles la de mayor magnitud fue la encontrada con *Escherichia* N16 (739.86 mg/kg).

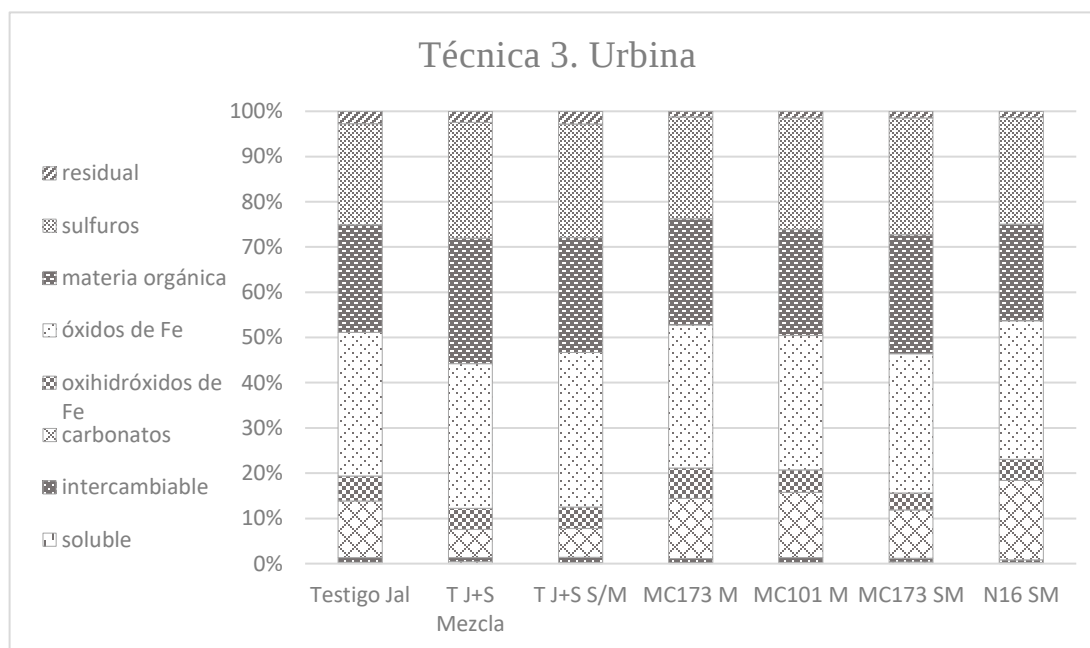


Figura 29. Distribución porcentual de Zn en la técnica Urbina.

En la fracción unida a oxihidróxidos de Fe se halló una contribución porcentual del 3.7% al 6.7%, se detectaron disminuciones de Zn en los testigos realizados con jal y sustrato mezclados (175.59 mg/kg) y sin mezclar (170.28 mg/kg) en relación con el testigo con jal (214.68 mg/kg). Además, se observaron reducciones en el contenido de Zn en los tratamientos realizados con las cepas *Klebsiella* MC173 (269.10 mg/kg) y *Enterobacter* MC101 (202.52 mg/kg) en el diseño experimental con jal y sustrato mezclados.

En la fracción unida a óxidos de Fe se observó un rango porcentual de contribución de 29.7-34.1% al total recuperado por la técnica Urbina (2015), en esta fracción los cambios en la movilidad de Zn fueron pequeños al compararse con la concentración hallada en todas las

muestras, no obstante, en todos los tratamientos con cepas se observó una reducción en la concentración de Zn (Tabla 22), con respecto al testigo realizado únicamente con jal e higuierilla.

En la fracción unida a materia orgánica se encontró una contribución porcentual del 21.34 al 27.7%. En el tratamiento con jal y sustrato mezclados se observaron disminuciones en la concentración de Zn en los ensayos con *Klebsiella* MC173 (936.51 mg/kg) y *Enterobacter* MC101 (953.12 mg/kg) con relación al testigo realizado (1034.46 mg/kg).

La fracción unida a sulfuros presentó una contribución porcentual del 22.3% al 25.8% de la concentración total de Zn hallada por el fraccionamiento, los cambios en esta fracción no siguieron un patrón como en las otras fases, sin embargo, se observaron cambios por la influencia de las BPCV empleadas en todos los tratamientos (Tabla 22)

En la fracción residual del fraccionamiento propuesto por Urbina (2015) se encontró una contribución porcentual pequeña (1.3-2.8%) a la suma total, no obstante, en todos los tratamientos en los que se utilizaron BPCV se observó una disminución en el contenido de Zn (Tabla 22).

Comparación de Técnicas

La presencia de Zn en las muestras analizadas se relaciona con la mena abundante de esfalerita en el distrito de Zimapán, a su vez, este mineral se asocia frecuentemente con Cd, Pb y As (Moreno *et al.*, 2009).

Con respecto al análisis de peligrosidad ambiental, la NOM-052-SEMARNAT-2005 no establece un LMP de Zn para clasificar a un residuo como peligroso, lo mismo sucede con la NOM-147-SEMARNAT-2004. No obstante, según los lineamientos establecidos por la USEPA (1993), debido a la concentración de Zn encontrada en los jales (>200) el depósito debe ser clasificado como muy contaminado. La alta concentración de Zn hallada en las muestras analizadas se encuentra por encima de la concentración indicada para micronutrientes (100 mg/kg) lo cual implicaría encontrar síntomas de fitotoxicidad en las plantas empleadas, algunos de los daños comunes por alta concentración de Zn son clorosis en las hojas, inhibición de la fotosíntesis y retardo en el crecimiento (Seoánez Calvo, 1999).

Favas *et al.* (2011), realizaron un análisis del contenido de Zn en jales de la mina Ervedosa. Anju & Banerjee (2010) y Tlustos *et al.* (2005) han realizado comparaciones de técnicas de extracción química secuencial de Zn en jales mineros y suelos respectivamente. Al igual que con los otros elementos analizados las técnicas fueron divididas en cuatro fracciones representativas para su comparación (Figura 30).

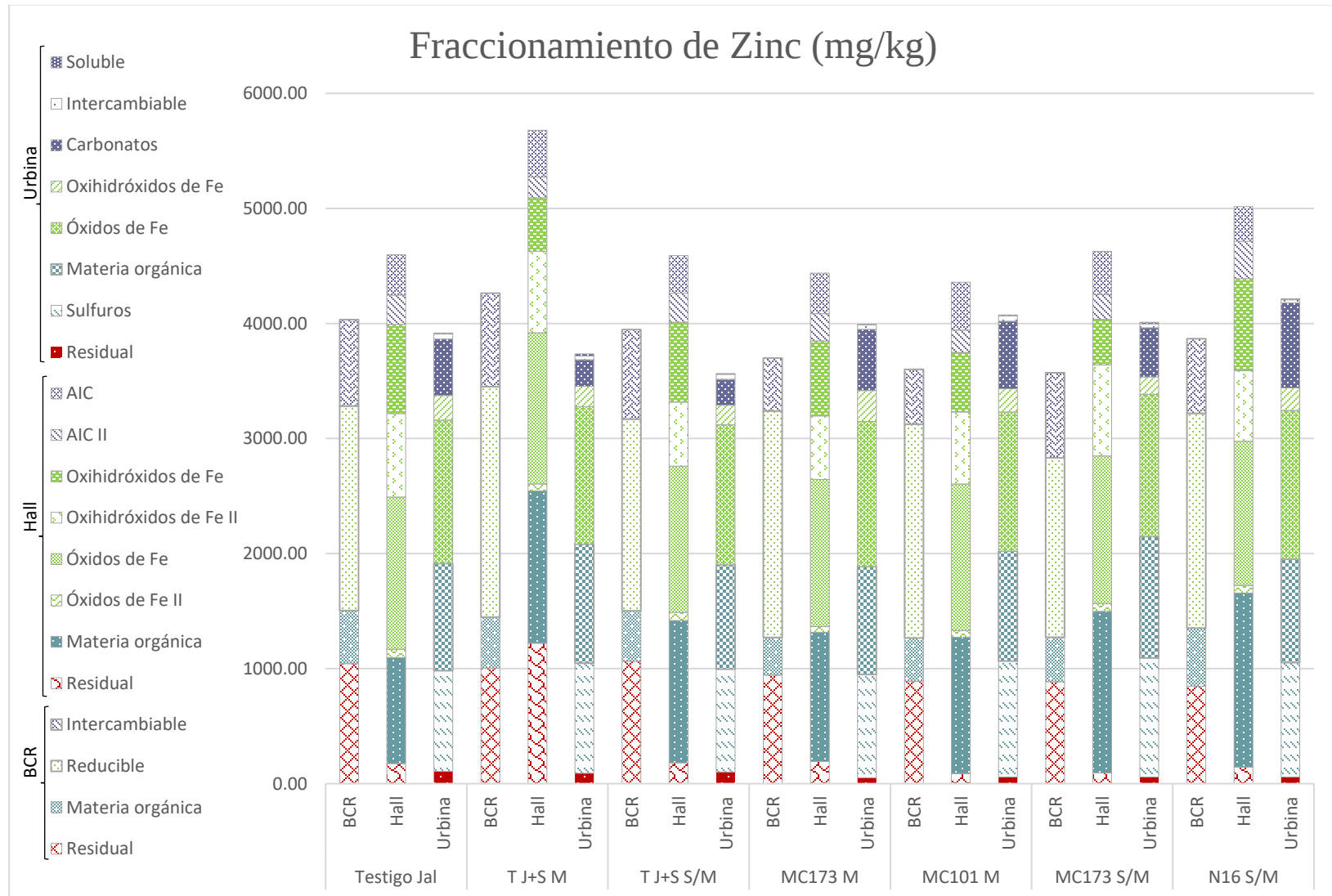
Se obtuvieron resultados similares en la fracción intercambiable de las tres técnicas, en la mayoría de las muestras analizadas el contenido de Zn recuperado en la técnica BCR fue mayor al del método Hall. La fracción soluble del Zn llegó a alcanzar hasta 776.23 mg/kg, esto coincide con el carácter lábil de este elemento, pues se encuentra en forma soluble a pH neutro o ácido (Evanko & Dzombak, 1997). La técnica Urbina reveló que en esta fracción el Zn se encuentra asociado principalmente a carbonatos (ZnCO_3) e hidróxidos (Zn(OH)_2), esto se asocia al pH neutro encontrado en los jales (Baird, 2001), aunque también por su naturaleza iónica también puede llegar a formar complejos con el carbonato de calcio (CaCO_3).

Se encontraron variaciones relevantes en el Zn recuperado bajo condiciones reductoras de las tres técnicas, hallando mayor contribución en el método Hall, en el cual se rebasó el 50% del total de Zn hallado en la mayoría de las muestras. Particularmente, las técnicas Hall y Urbina coincidieron al encontrarse al Zn mayormente unido a óxidos de Fe y Mn, no obstante, la cantidad de Zn extraída en el método Hall fue mucho mayor a la del método Urbina.

El Zinc recuperado en la fracción oxidable del método Urbina fue mayor que el hallado en las técnicas Hall y BCR, en ese orden. En la técnica BCR, con el uso de H_2O_2 como agente oxidante, se hallaron hasta 505.31 mg/kg de Zn asociados a materia orgánica. De acuerdo con los resultados del método Urbina el Zn oxidable se encontró preferentemente unido a sulfuros primarios, la esfalerita (ZnS) es la principal especie mineral portadora de Zn en los jales, esta es relativamente abundante en el distrito de Zimapán (Moreno Tovar *et al.*, 2012).

La fracción residual del método BCR presentó mayor contribución al total recuperado que las técnicas Hall y Urbina, esto se debe al uso de $\text{KClO}_3/\text{HCl}/\text{HNO}_3$ como agente oxidante en el paso anterior, aunque se desconoce la cantidad de silicatos que pueden ser disueltos con esta combinación de reactivos la influencia en los resultados es evidente.

Figura 30. Fraccionamiento de Zinc con las técnicas BCR, Hall y Urbina.



3.3 Análisis de la Varianza

Se encontró normalidad en la distribución de las variables aleatorias agrupadas (fracciones BCR, Hall y Urbina) con el uso del estadístico de prueba Kolmogorov-Smirnov Lilliefors. Como resultado del análisis de varianza (ANOVA) de un factor aplicado a las técnicas de extracción química secuencial analizadas se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones de EPT en las fracciones representativas (intercambiable, reducible, oxidable y residual) en el nivel de significancia del valor $p < 0.05$ por la prueba de diferencia honesta significativa de Tukey (Tabla 23).

En la fracción intercambiable de los tres métodos se encontraron diferencias significativas entre las tres técnicas, principalmente al comparar a la técnica Urbina con BCR y Hall, estas diferencias pueden atribuirse al número de fracciones en que se dividen estas especies químicas, a los reactivos extractantes utilizados, la afinidad de los EPT, al tiempo de retención y a la temperatura utilizada. De este modo, la fracción reducible del método Hall proporcionó resultados significativos en la extracción de todos los EPT al compararse con las otras dos técnicas, probablemente debido al énfasis que se realiza en las especies unidas a oxihidróxidos y óxidos.

Los resultados obtenidos en las fracciones oxidables sugieren que pueden obtenerse resultados distintos al aplicar cualquiera de las tres técnicas, no obstante, debido a la composición del jal, resulta conveniente evaluar las porción de EPT enlazada a sulfuros primarios (Técnica Urbina). En la fracción residual también fue posible hallar diferencias relevantes, principalmente al comparar los resultados obtenidos por la técnica BCR con los de los métodos Hall y Urbina. Esto se debe a que la técnica BCR recupera en la última fracción una porción de los EPT que es asociada a especies oxidables por las técnicas Hall y Urbina.

A pesar de que el orden y nivel de información que ofrecen las técnicas de extracción química secuencial puede ser difuso y difícilmente comparable fue posible comprobar diferencias significativas entre los resultados que estas proporcionan sobre la movilidad de As, Cd, Fe, Mn, Ni, Pb y Zn en tratamientos de fitorremediación de jales mineros, por lo anterior, se acepta la hipótesis planteada.

Tabla 23. Comparaciones múltiples por la prueba HDS de Tukey

Fracción	Arsénico		Cadmio		Hierro		Manganeso		Níquel		Plomo		Zinc	
Intercambiable	Urbina	BCR*	Urbina	BCR*	Urbina	BCR*	BCR	Hall*	Hall	BCR*	BCR	Hall*	BCR	Urbina*
		Hall*		Hall*		Hall*			Urbina	BCR*		Urbina*		
Reducible	Hall	BCR*	Hall	BCR*	Hall	BCR*	Hall	BCR*	Hall	BCR*	Hall	BCR*	Hall	BCR*
						Urbina*								
		Urbina*		Urbina*	Urbina	BCR*	Urbina	BCR*	Urbina	BCR*	Urbina	BCR*	Urbina	BCR*
								Hall*		Hall*		Hall*		Hall*
Oxidable	Hall	BCR*	Hall	BCR*	Hall	BCR*	Hall	BCR*	Hall	BCR*	Hall	BCR*	Hall	BCR*
	Urbina	BCR*	Urbina	BCR*	Urbina	BCR*	Urbina	BCR*	Urbina	BCR*	Urbina	BCR*	Urbina	BCR*
		Hall*		Hall*		Hall*		Hall*		Hall*		Hall*		Hall*
Residual	BCR	Hall*	BCR	Hall*	BCR	Hall*	Urbina	BCR*	BCR	Hall*	BCR	Hall*	BCR	Hall*
						Urbina*								Urbina*
		Urbina*		Urbina*	Hall	Urbina*		Hall*		Urbina*		Urbina*	Hall	Urbina*

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05; n=14

3.4 Consideraciones de la interacción Jal - *R. communis* – BPCV

Estudios recientes han demostrado que los microorganismos juegan un rol importante en las tecnologías de fitorremediación (Wang *et al.*, 2017). Las BPCV pueden asistir la fitorremediación de EPT usando procesos directos e indirectos, los procesos directos son aquellos que influyen en la solubilización, biodisponibilidad y acumulación final de metales pesados en plantas, por otro lado, los procesos indirectos mejoran el crecimiento vegetal y previenen el ataque de patógenos, lo cual facilita la acumulación de metales pesados.

Las cepas utilizadas en este trabajo fueron caracterizadas con cuatro propiedades que las identifican como BPCV por Mendoza Hernández *et al.* (2016). *Klebsiella* MC173, *Enterobacter* MC101 y *Escherichia* N16 son capaces de producir ácido indol acético (IAA), solubilizar fosfatos, sintetizar ACC desaminasa y excretar sideróforos.

El Hierro generalmente se encuentra en suelos como Fe^{3+} , formando hidróxidos y oxihidróxidos insolubles, de este modo, es inaccesible para plantas y microorganismos, en respuesta, las BPCV producen sideróforos que son capaces de quelar Fe^{3+} , el cual puede ser consumido por plantas y microorganismos como nutriente (Kong & Glick, 2017; Ullah *et al.*, 2015). Los sideróforos también pueden solubilizar Mn, Cu y Zn, entre otros elementos (Kidd, *et al.*, 2009). En este estudio, a pesar de haber encontrado altas concentraciones de Fe, más del 95% se encontró asociado a sustancias reducibles, oxidables y residuales. Por lo tanto, es probable que estos agentes quelantes fueran producidos como respuesta al estrés por EPT, y por consecuencia influir en la distribución de los EPT.

Algunos autores han estudiado la asociación de plantas y BPCV bajo estrés por metales pesados en suelos, sedimentos y jales. Rajkumar y Freitas (2008) analizaron la interacción de *Ricinus communis*, *Pseudomonas sp* y *P. Jessenii* y su influencia en la distribución de Zn y Ni, en ambos casos se encontró a estas cepas capaces de aumentar la biodisponibilidad de ambos elementos. Además, se ha comprobado que *R. communis* es moderadamente tolerante al As (Melo *et al.*, 2012; Mahnud *et al.*, 2008) y que se puede utilizar como fitorremediadora. También se ha estudiado a *R. communis* como fitorremediador de Cd, Ni, Pb y Zn (Baudhh & Singh, 2015; Ruiz Olivares *et al.*, 2013; Shi & Cai *et al.*, 2009; Zhi-xin *et al.*, 2007)

El uso de enmiendas orgánicas e inorgánicas incrementa el crecimiento y productividad de las plantas por que propicia un ambiente apto para la formación de rizósfera, además, se ha sugerido que la aplicación de fertilizantes mejora la bioacumulación de Cd, Zn y Ni, entre otros, reduciendo el tiempo requerido para la fitorremediación de suelos contaminados (Bauddh & Singh, 2015).

La movilidad de EPT en el jal incrementó cuando se utilizó la enmienda orgánica, no obstante, los cambios en la distribución fueron mayores al usarse BPCV. Las variaciones observadas en los ensayos no permitieron establecer relaciones específicas en la distribución de elementos. En general, las cepas N16 y MC173 presentaron cambios mayores en la movilidad de EPT. Se hallaron aumentos de la concentración de As, Fe, Mn, Pb, Zn y Cd en las fracciones intercambiable y reducible, lo cual indica que incrementó la biodisponibilidad de los mismos.

La transformación de EPT en formas solubles y biodisponibles por BPCV consecuentemente facilita la fitorremediación (Ullah *et al.*, 2015). Algunos autores han sugerido el uso de consorcios bacterianos que integren microorganismos que se han desarrollado naturalmente en el sitio que se desea remediar. De ser así, es indispensable el monitoreo de la población microbiana para potenciar la remediación de suelos (Kidd *et al.*, 2009, Kong & Glick, 2017)

En suelos de áreas grandes con alta contaminación multielemental es conveniente el uso de sistemas de fitoestabilización que eliminen o minimizen las fracciones móviles o biodisponibles. Una correcta cubierta vegetal posee la ventaja de proteger al suelo de erosión por aire y agua, también reduciendo la percolación a través del suelo y la generación de drenaje ácido (Novo *et al.*, 2018). Frérot *et al.* 2006 demostraron la importancia de usar cultivos mixtos, utilizando leguminosas y hierbas para establecer una comunidad vegetal persistente. Al respecto, Xiong *et al* (2018) demostraron que *Medicago sativa L.* mejora la fitoextracción de Cd y Zn en tratamientos de fitorremediación in situ con *R. communis*.

CONCLUSIONES

El orden del contenido total de los EPT del sistema de fitorremediación fue: Fe>As>Zn>Pb>Mn>Ni>Cd. Se encontró a *Ricinus communis* como una especie capaz de germinar y desarrollarse en presencia de altas concentraciones de Fe, As y Zn y contenidos relativamente altos de Pb y Mn.

La técnica de extracción química secuencial propuesta por Hall *et al.* (1996) presentó los porcentajes más altos de recuperación. La técnica Urbina (2015) permitió apreciar a detalle la distribución de los elementos objetivo en las distintas fracciones minerales consideradas. Por su parte, la técnica BCR presentó información congruente con las otras técnicas en cuanto a las fracciones potencialmente movilizables (intercambiable y unida a carbonatos y reducible).

Los resultados que pueden ser obtenidos por cada técnica presentan diferencias significativas. Por ello, para la elección de una técnica resulta indispensable tomar en consideración la concentración total del elemento objetivo, recursos disponibles, matriz de análisis y el nivel de información que se desea obtener.

Las técnicas utilizadas en el fraccionamiento de As no son las más recomendables. No obstante, se logró obtener una estimación de la fracción biodisponible de As a partir de las primeras etapas de los procedimientos utilizados. La fracción biodisponible de As rebasó los límites máximos permisibles establecidos por la normatividad mexicana en materia de suelos contaminados por jales mineros, revelando así, un riesgo potencial a los ecosistemas y a la salud humana. Se encontró al As preferentemente asociado a especies químicas reducibles y oxidables, particularmente a sulfuros primarios.

El contenido de Cadmio hallado en los análisis no rebasó los LMP establecidos por la NOM-147-SEMARNAT-2004, sin embargo, este elemento se encontró altamente asociado a minerales fácilmente solubles bajo condiciones reductoras y oxidables, por lo tanto, presenta alta facilidad para movilizarse bajo procesos de intemperismo.

Se encontró al Hierro altamente asociado a óxidos y oxihidróxidos y sulfuros. El alto contenido de Hierro en jales contribuye a los procesos de oxidación/neutralización de los jales, previniendo la dispersión eólica de los EPT, sin embargo, debido a su distribución y a los resultados observados en el resto de los elementos aún es posible que estos residuos generen drenaje ácido bajo condiciones de intemperie.

La normatividad mexicana no establece LMP de Manganeso, sin embargo, con referencia a lineamientos internacionales debido al contenido de Mn el depósito de jales debe considerarse como un sitio muy contaminado. El Mn se encontró principalmente asociado a formas intercambiables y reducibles, por lo tanto, su movilidad y el riesgo asociado a ella es muy alto.

El Níquel encontrado en los jales no rebasó los LMP establecidos por la normatividad mexicana, además, este elemento se encontró principalmente asociado a formas oxidables (materia orgánica y sulfuros) y silicatos, por lo tanto, no representa un peligro en comparación al resto de los EPT analizados.

El contenido de Plomo rebasó los límites máximos permisibles establecidos por la normatividad mexicana en materia de suelos contaminados. Este elemento se encontró distribuido principalmente en óxidos de Fe y Mn y sulfuros, correspondiendo con las menas de galena características de la región.

Debido a sus propiedades el Zinc es uno de los EPT con mayor carácter móvil. Se encontró al Zn asociado principalmente a carbonatos, óxidos de Fe y Mn y sulfuros. El alto contenido de Zn en los jales representa riesgos graves al ambiente y la salud humana.

Los elementos analizados presentaron asociaciones significativas a sulfuros primarios, esto corresponde con algunas menas características de la región de Zimapán de las cuales destacan la arsenopirita, esfalerita, calcopirita, pirita, galena y esfalerita.

Ricinus communis ejerció influencia en la movilidad de los EPT, además, se detectaron cambios mayores al utilizarse bacterias promotoras del crecimiento vegetal. Gracias a las técnicas de extracción utilizadas fue posible evidenciar los cambios en la distribución de EPT entre las especies químicas presentes en el sistema de fitorremediación.

Los distintos análisis estadísticos para la evaluación de los resultados pueden afectar la interpretación de los datos, como se esperaba, los valores de concentración de elementos liberados entre las fracciones individuales de los procedimientos fueron poco comparables. No obstante, fue posible evidenciar las diferencias significativas entre las fracciones representativas de las técnicas empleadas.

PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES

El uso de *R. communis* para la generación de bioproductos y biodiesel proporciona una ventaja en la habilitación económica de sitios contaminados, por ello, resulta relevante investigar y definir los procesos relacionados con la fitorremediación de jales mineros, fundamentalmente, la traslocación de EPT a tallos y frutos para el posible uso de estos en otros procesos.

Para comprender más a fondo las interacciones microorganismo-planta-rizósfera que se generaron en el ensayo de fitorremediación resulta conveniente evaluar la acumulación entre las diferentes partes de la planta (raíces, tallo, hojas y frutos) mediante el cálculo los factores de traslocación (cociente entre el contenido de EPT en raíces y tallos) y de bioacumulación (cociente entre el contenido de EPT en la planta y suelo). Así, también se puede determinar si el proceso realizado es de fitoextracción o fitoestabilización y las respectivas actividades de optimización aplicables.

En el uso de bacterias promotoras del crecimiento vegetal es importante evaluar su resistencia a metales pesados, y que los microorganismos seleccionados no sean patógenos, también se puede considerar el uso de hongos micorrizas como auxiliares en tratamientos de fitorremediación.

Para mitigar el problema asociado a la especiación operacional se sugiere el uso de técnicas de cristalografía que respaldan la información y confirman a algunos minerales que se espera que estén asociados a las fracciones definidas por las técnicas de extracción, algunas técnicas que podrían considerarse son la difracción de rayos X (DRX) y la microscopía electrónica.

Es recomendable considerar la adición de Fe, Mn y Zn a los límites máximos permisibles para suelos contaminados por jales mineros, pues a pesar de ser micronutrientes también son elementos que a altas concentraciones pueden generar graves daños a la salud de animales, plantas y humanos.

Para futuras investigaciones resulta relevante la necesidad de preparar nuevos materiales de referencia con contenidos extraíbles de elementos certificados, armonización de esquemas de extracción química secuencial y desarrollo de técnicas específicas optimizadas para las características de la matriz de análisis.

Se sugiere el uso de quimiometría para la evaluación de protocolos de extracción química secuencial y para encontrar relaciones entre las fracciones minerales y el consumo de elementos potencialmente tóxicos por plantas y microorganismos en sistemas de fitorremediación.

TRABAJOS CITADOS

- Acevedo Sandoval, O., Ortíz Hernández, E., Cruz Sánchez, M., & Cruz Chávez, E. (2004). El papel de óxidos de Hierro en suelos. *Terra Latinoamericana* 22, 485-497.
- Adamo, P., Agrelli, D., & Zampella, M. (2018). Chemical Speciation to Assess Bioavailability, bioaccessibility and Geochemical Forms of Potentially Toxic Metals (PTMs) in Polluted Soils. En B. De Vivo, H. Belkin, & A. Lima, *Environmental Geochemistry. Site characterization, data analysis and case histories* (págs. 153-194). Elsevier.
- Adhikari, T., & Kumar, A. (2012). Phytoaccumulation and tolerance of *ricinus communis* L. to nickel. *International Journal of Phytoremediation*, 481-492.
- Alarcón, A., & Ferrera Cerrato, R. (2016). *Biorremediación de suelos y aguas contaminadas con compuestos orgánicos e inorgánicos*. México: Trillas.
- Albella, J., Cintas, A., Miranda, T., & Serratosa, J. (1993). *Introducción a la ciencia de materiales: Técnicas de preparación y caracterización*. Madrid, España: Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
- Ali, H., Khan, E., & Anwar Sajad, M. (2013). Phytoremediation of heavy metals- concepts and applications. *Chemosphere*, 869-881.
- Anju, M., & Banerjee, D. (2010). Comparison of two sequential extraction procedures for heavy metal partitioning in mine tailings. *Chemosphere*, 1393-1402.
- Annapurna, D., Rajkumar, M., & Prasad, M. (2016). Potential of castor bean (*Ricinus Communis* L.) for phytoremediation of metalliferous waste assisted by plant growth-promoting bacteria: Possible cogeneration of economic products. En M. Prasad, *Bioremediation and Bioeconomy* (págs. 147-175). Amsterdam, Netherlands: Elsevier.
- Armienta, M. A., Mugica, V., Reséndiz, I., & Gutierrez Arzaluz, M. (2016). Arsenic and metals mobility in soils impacted by tailings at Zimapán, México. *J Soils Sediments*, 1267-1278.
- ATSDR. (agosto de 2007). *Toxicological profile for Arsenic*. Recuperado el 24 de abril de 2018, de ARSDR.cdc.gov: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp2.pdf>
- ATSDR. (20 de julio de 2016). *Agencia para Sustancia Tóxicas y el Registro de Enfermedades*. Recuperado el 16 de enero de 2018, de ATSDR en Español: <https://www.atsdr.cdc.gov/es/>
- Azcue, J., Mudroch, A., Rosa, F., & Hall, G. (1994). Effects of abandoned gold mine tailings on the arsenic concentrations in water and sediments of Jack of Clubs Lake, BC". *Environ. Tech.*, Vol 15, 669-678.
- Azpeitia Caballero, A. (Diciembre de 2007). Minerales de los distritos mineros metálicos Zimapán, Pachuca- Real del Monte, Molango y su aplicación didáctica. *Tesis de Licenciatura en Ingeniería Minero-Metalúrgica*. Hidalgo, México: Universidad Autónoma del estado de Hidalgo.

- Baird, C. (2001). *Química ambiental*. España: Editorial Reverté, S.A.
- Baoddh, K., & Singh, R. (2015). Effects of organic and inorganic amendments on bio-accumulation and partitioning of Cd in *Brassica juncea* and *Ricinus communis*. *Ecological Engineering*, 93-100.
- Baoddh, K., Singh, K., Singh, B., & Singh, R. (2015). *Ricinus communis*: A robust plant for bio-energy and phytoremediation of toxic metals from contaminated soil. *Ecological engineering*, 640-652.
- Benntech. (2018). *Propiedades químicas del Hierro. - Efectos del Hierro sobre la salud - Efectos ambientales de Hierro*. Recuperado el 27 de abril de 2018, de www.lenntech.es: www.lenntech.es/periodica/elementos/fe/htm
- Boda, R., Prasad Majeti, N., & Suthari, S. (2017). *Ricinus communis* L. (castor bean) as a potential candidate for revegetating industrial waste contaminated sites in peri-urban Greater Hyderabad: remarks on seed oil. *Environ Sci Pollut Res* 24, 19955-19964.
- Bolan, N. S., Park, J., Robinson, B., Naidu, R., & Young Huh, K. (2011). Phytostabilization: A green approach to contaminant containment. *Advances in Agronomy*, 145-204.
- Bouyoucos, G. (1936). Directions for making mechanical analysis of soil by hydrometer method. *Soil Science* 4, 225-228.
- Camara Minera Mexicana. (16 de febrero de 2017). *Informe Anual 2016*. Recuperado el 4 de enero de 2018, de camimex.org.mx: <https://camimex.org.mx/files/9515/0058/4028/02-Info17.pdf>
- Castigo Rodríguez, F., Roldán Ruiz, M. D., Blasco Plá, R., Huertas Romera, M. J., Caballero Domínguez, F. J., Moreno-Vivián, C., & Martínez Luque-Romero, M. (2005). *Biotecnología Ambiental*. Madrid, España: Tébar.
- Cheng, H., & Mulla, D. (1999). The soil environment. En D. Adriano, J.-M. Bollang, W. Frankenberger, & R. Sims, *Bioremediation of contaminated soils* (págs. 1-12). Wisconsin, USA: The American Society of Agronomy and Academic Press.
- Criollo, P., Obando, M., Sánchez M., L., & Bonilla, R. (2012). Efecto de bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR) asociadas a *Pennisetum clandestinum* en el altiplano cundiboyacense. *Revista Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 189-195.
- DalCarso, G., Manara, A., & Furini, A. (2013). An overview of heavy metal challenge in plants: from roots and shoots. *The Royal Society of Chemistry, Metallomics*, 1117-1132.
- De Souza Costa, E. T., Guimaraes Guilherme, L. R., Chaves de Melo, É. E., Teixeira Ribeiro, B., Inácio, E., Da Costa Severiano, E. Hale, B. (2012). Assessing the tolerance of Castor Bean to Cd and Pb for Phytoremediation purposes. *Biol Trace Elem Res* 145, 93-100.
- De Souza Costa, E., Luiz Roberto Guimaraes Guilherme, L. R., Chaves de Melo, É. E., Teixeira Ribeiro, B., dos Santos B. Inácio, E., da Costa Severiano, E. Hale, B. A.

- (2012). Assessing the tolerance of castor bean to Cd and Pb for phytoremediation purposes. *Biol Trace Elem Res*: 145, 93-100.
- Delgadillo-López, A. E., González-Ramírez, C. A., Prieto-García, F., Villagómez-Ibarra, J. R., & Acevedo-Sandoval, O. (2011). Fitorremediación: una alternativa para eliminar la contaminación. *Tropical and subtropical agroecosystems*, 597-612.
- Drahota, P., Grösslová, Z., & Kindlová, H. (2014). Selectivity assessment of an arsenic sequential extraction procedure for evaluating mobility in mine wastes. *Analytica Chimica Acta* 839, 34-43.
- EPA. (Diciembre de 1996). *Method 3052 Microwave assisted acid digestion of siliceous and organically based matrices*. Recuperado el 7 de Febrero de 2018, de Environmental Protection Agency: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/3052.pdf>
- Etesami, H. (2018). Bacterial mediated alleviation of heavy metal stress and decreased accumulation of metals in plant tissues: Mechanisms and future prospects. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 175.191.
- Evanko, C., & Dzombak, D. (1997). *Remediation of Metals-Contaminated Soils and Groundwater*. Pittsburgh, PA: Ground-Water Remediation Technologies Analysis Center.
- Evans, G. M., & Furlong, J. C. (2011). *Environmental biotechnology*. UK: Wiley-Blackwell.
- Eweis, J. B., Ergas, S. J., Chang, D. P., & Schroeder, E. D. (1999). *Principios de biorrecuperación. Tratamientos para la descontaminación y regeneración de suelos y aguas subterráneas mediante procesos biológicos y físico-químicos*. Madrid, España: McGraw-Hill.
- Favas, P. J., Pratas, J., Gomes, M. P., & Gala, V. (2011). Selective chemical extraction of heavy metals in tailings and soils contaminated by mining activity. *Journal of Geochemical Exploration*, 160-171.
- Fernández E., Jiménez, R., Lallena, A., & Aguilar, J. (2004). Evaluation of the BCR sequential extraction procedure applied for two unpolluted Spanish soils. *Environmental Pollution*, 355-364.
- Fernández-Ondoño, E., Bacchetta, G., Lallena, A., Navarro, F., Ortiz, I., & Jiménez, M. (2017). Use of BCR sequential extraction procedures for soils and plant metal transfer predictions in contaminated mine tailings in Sardinia. *Journal of Geochemical Exploration*, 133-141.
- Frérot, H., Gruber, C., Collin, W., Dos Santos, S., & Escarre, A. (2006). Specific interactions between local metal-tolerant plants improve the phytostabilization of mine soils. *Plant Soil*, 53-65.
- Gadd, G. M. (2004). Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. *Geoderma*, 109-119.

- Ghosh, M., & Singh, S. (2005). A comparative study of cadmium phytoextraction by accumulator and weed species. *Environmental Pollution*:133, 365-371.
- Ginocchio C., R., & León-Lobos, P. (2007). Recursos Genéticos para fitoestabilización: Plantas que reducen la contaminación por desechos mineros. *INIA Tierra adentro*, 20-23.
- Giordani, C., & Cecchi, S. (2015). Phytoremediation of Soil Polluted by nickel using agricultural crops. *Environmental Management*, 675-681.
- Google. (2018). *Mapa de Zimapán, Hidalgo*. Recuperado el 6 de febrero de 2018, de Google Maps:<https://www.google.com.mx/maps/@20.7373289,99.4008887,737m/data=!3m1!1e3>
- Gupta, D. K., Corpas, F. J., & Palma, J. M. (2013). *Heavy Metal Stress in Plants*. Granada, España: Springer.
- Gutiérrez, M. (2003). *Minería Union de Grupos Ambientalistas*. Obtenido de union.org.mx: <http://www.union.org.mx/guia/actividadesyagravios/mineria.htm>
- Hall, G., Vaive, J., Beer, R., & Hoashi, M. (1995). Selective leaches revisited, with emphasis on the amorphous Fe oxyhydroxide phase extraction. *Journal of Chemical Exploration*, 59-78.
- INEGI. (1 de Diciembre de 2017). *La minería en México*. Recuperado el 2018 de Enero de 7, de inegi.org.mx: <http://www.beta.inegi.org.mx/app/biblioteca/ficha.html?upc=702825067069>
- Instituto Nacional de Ecología. (1995). *Taller para el Desarrollo Sustentable Residuos Peligrosos*. (F. J. Garfias y Ayala, & B. W. Luis, Edits.) México D.F.: Inédita S.A.
- Kidd, P., Barceló, J., Bernal, M., Navari-Izzo, F., Poschenrieder, C., Shilev, S., Monterroso, C. (2009). Trace element behaviour at the root-soil interface: Implications in phytoremediation. *Environmental and Experimental Botany*, 243-259.
- Kiran, B., & Prasad, M. (2017). *Ricinus communis* L. (Castor bean) a potential multi-purpose environmental crop for improved and integrated phytoremediation. *The eurobiotech journal*, 16.
- Kong, Z., & Glick, B. R. (2017). The role of plant growth-promoting bacteria in metal phytoremediation. *Advances in microbial physiology*, 36.
- Kumar, D., Poonam, Baudh, K., Tiwari, J., Singh, D., & Kumar, N. (2017). *Ricinus communis*: An ecological engineer and a biofuel resource. En K. Baudh, B. Singh, & J. Korstad, *Phytoremediation Potential of Bioenergy Plants* (págs. 139-167). Singapore: Springer.
- Learita Prince, L. S. (Julio de 2015). Una estrategia para la rehabilitación de las presas de jales abandonadas en el municipio de Zimapán, Hidalgo. *Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias en Estudios Ambientales y de la Sustentabilidad*. México, D.F.: Instituto Politécnico Nacional.

- Li, X., Coles, B., Ramsey, M., & Thornton, I. (1995). Sequential extraction of soils for multielement analysis by ICP-AES. *Cehm. Geol.* 124, 109-123.
- López Sánchez, L. R. (2013). Residuos Mineros y la Generación de Drenaje ácido: pruebas de laboratorio y su aplicación en el diseño, construcción y operación de depósitos. *Tesis profesional para obtener el título de Ingeniería de Minas y Metalurgia*. D.F., México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Mahmud, R., Inoue, N., Kasajima, S.-y., & Shaheen, R. (2008). Assessment of potential indigenous plant species for the phytoremediation of arsenic-contaminated areas of Bangladesh. *International Journal of Phytoremediation* 10, 119-132.
- Malarkodi, M., Krishnasamy, R., & Chitdeshwari, T. (2008). Phytoextraction of Nickel Contaminated Soil using Castor Phytoextractor. *Journal of Plant Nutrition*, 219-229.
- Manahan, S. E. (2013). *Fundamentals of Environmental and toxicological chemistry*. New York: CRC Press Taylor & Francis Group.
- Margeson, R., & Schinner, F. (2005). *Manual for Soil Analysis - Monitoring and Assessing Soil Bioremediation*. Germany: Springer.
- Martínez, Y., & Rivero, C. (2005). Evaluación de diferentes métodos para determinar las fracciones de metales pesados presentes en el suelo. *Ingeniería UC*, 14-20.
- Meena, K. K., Sorty, A. M., Bitla, U. M., Choudhary, K., Gupta, P., Pareek, A., Minhas, P. S. (2017). Abiotic stress responses and microbe-mediated mitigation in plants: The omics strategies. *Frontiers in plant science*, 8.
- Meers, E., Samson, R., Tack, F., Ruttens, A., Vandeghechuchte, M., Vangronsveld, J., & Verloo, M. (2007). Phytoavailability assessment of heavy metals in soils by single extractions and accumulation by *Phaseolus vulgaris*. *Environmental and experimental Botany*, 385-396.
- Melo, E., Costa, E., Guilherme, L., Faquin, V., & Nascimento, C. (2009). Accumulation of arsenic and nutrients by castor bean plants grown on an As-enriched nutrient solution. *Journal of Hazardous Materials*, 479-483.
- Melo, É., Guilherme, L., Nascimento, C., & Penha, H. (2012). Availability and accumulation of arsenic in oilseeds grown in Contaminated Soil. *Water Air Soil Pollution*, 233-240.
- Mendez, M., & Maier, R. (2008). Phytostabilization of mine tailings in arid and semiarid environments- An emerging technology. *Environmental Health Perspectives*, 278-283.
- Mendoza Benítez, I., de la Rosa Álvarez, M., & Cruz Jiménez, G. (2008). Identificación de especies vegetales relacionadas con jales mineros del Distrito Minero de Guanajuato. *Biológicas*, 94-99. Obtenido de Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Mendoza Hernández, J. C., Perea Vélez, Y. S., Arriola Morales, J., Martínez Simón, S. M., & Pérez Osorio, G. (2016). Assessing the effects of heavy metals in ACC deaminase and IAA production on plant growth-promoting bacteria. *Microbiological Research*, 53-61.

- Moreno Tovar, R., Téllez Hernández, J., & Monroy Fernández, M. (2012). Influencia de los minerales de los jales en la bioaccesibilidad de Arsénico, Plomo, Zinc y Cadmio en el distrito minero Zimapán, México. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 28, 203-218.
- Moreno, T., Barbanson, L., & Coreño, A. (2009). *Neoformación mineralógica en residuos mineros (jales) del distrito minero Zimapán, estado de Hidalgo*. México: Minería y Geología.
- Ng, J., Juhasz, A., Smith, E., & Naidu, R. (2015). Assessing the bioavailability and bioaccesibility of metals and metalloids. *Environmental Science and Pollution Research* 22, 8802-8825.
- NMX-AA-132-SCFI-2006. Muestreo de suelos para la identificación y cuantificación de metales y metaloides, y manejo de la muestra. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. México. D.F.
- NOM-021-SEMARNAT-2000. (Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 7 de Diciembre del 2001). Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis. *Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales* . México, D.F.
- NOM-052-SEMARNAT-2005. (Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 23 de junio de 2006). Que establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de residuos sólidos peligrosos. *Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales*, 32 pp. México, D.F.
- NOM-053-SEMARNAT-1993. (Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 23 de abril de 2003). Que establece el procedimiento para llevar a cabo la prueba de extracción para determinar los constituyentes que hacen a un residuo peligroso por su toxicidad al ambiente. *Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales*, 20 pp. México, D.F.
- NOM-141-SEMARNAT-2004. (Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 19 de septiembre del 2004). Que establece el procedimiento para caracterizar los jales, así como especificaciones y criterios para la caracterización y preparación del sitio, proyecto, construcción y operación y post-operación de presas de jales. *Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales*, 30 pp. México, D.F.
- NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004. (Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 11 de Noviembre del 2005). Que establece criterio para determinar las concentraciones de remediación de suelos contaminados por arsénico, bario, berilio, cadmio, cromo hexavalente, mercurio, níquel, plata, plomo, selenio, talio y/o vanadio. *Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales*, 69 pp. México, D.F.
- NOM-157-SEMARNAT-2009. (Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 30 de agosto del 2011). Que establece los elementos y procedimientos para instrumentar planes de manejo de residuos mineros. *Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales*, 25 pp. México, D.F.
- Novo, L. A., Castro, P. M., Alvarenga, P., & Da Silva, E. (2018). Plant growth-promoting rhizobacteria-assisted phytoremediation of mine soils. En M. Vara Prasad, P. de

- Campos Favas, & S. Kumar Maiti, *Bio-Geotechnologies for Mine Site Rehabilitation* (págs. 281-295). Portugal: Elsevier.
- Núñez López, R. A., Meas Vong, Y., Ortega Borges, R., & Olguín, E. J. (2004). Fitorremediación: fundamentos y aplicaciones. *Academia Mexicana de ciencias*, 69-83.
- Okoro, H. K., Fatoki, O. S., Adekola, F. A., Ximba, B. J., & Snyman, R. G. (2012). A review of Sequential Extraction Procedures for Heavy Speciation in Soil and Sediments. *Open Access Scientific Reports*, 9.
- Orozco Barrenetxea, C., Pérez Serrano, A., González Delgado, M., Rodríguez Vidal, F., & Alfayate Blanco, J. (2008). *Contaminación Ambiental. Una visión desde la química*. Madrid, España: Paraninfo CENGAGE Learning.
- Pérez López, R., Álvarez Valero, A., Nieto, J. M., Sáez, R., & Matos, J. (2008). Use of sequential extraction procedure for assessing the environmental impact at regional scale of the Sao Domingos Mine (Iberian Pyrite Belt). *Applied Geochemistry* 23, 3452-3463.
- Prieto Méndez, J., González Ramírez, C., Román Gutiérrez, A. D., & Prieto García, F. (2009). Contaminación y fitotoxicidad en plantas por metales pesados provenientes de suelos y agua. *Tropical and subtropical agroecosystems*, 29-44.
- Quevauviller, P. (1998). Operationally defined extraction procedures for soil and sediment analysis - I. Standarization. *Trends Anal. Chem. Vol. 17*, 289-298. .
- Rajkumar, M., & Freitas, H. (2008). Influence of metal resistant-plant growth-promoting bacteria on the growth of *Ricinus communis* in soil contaminated with heavy metals. *Chemosphere*, 834-842.
- Rajkumar, M., Ma, Y., & Freitas, H. (2009). Improvements of plant growth and nickel uptake by nickel resistant-plant-growth promoting bacteria. *Journal of Hazardous Materials*, 1154-1161.
- Rajkumar, M., Sandhya, S., Prasad, M., & Freitas, H. (2012). Perspectives of plant-asociated microbes in heavy metal phytoemediation . *Biotechnology Adv*, 1562-1574.
- Rasul Chaudhry, G. (1994). *Biological Degradation and Bioremediation of Toxic Chemicals*. London, UK: Chapman & Hall.
- Rauret, J., López-Sánchez, A., Sahuquillo, R., Rubio, C., Davidson, C., & Quevauviller, P. (1999). Improvement of the BCR three step sequential extraction procedure prior to the certification of new sediment and soil reference material. *Journal of Environmental Monit.*, 67-61.
- Romeiro, S., Lagoa, A., Furlani, P., de Abreu, C., de Abreu, M., & Erismann, N. (2006). Lead uptake and tolerance of *Ricinus communis* L. *J. Plant Physiol*, 483;489.
- Romero, F. M., Armienta, M., Gutiérrez, M., & Villaseñor, G. (2008). Factores geológicos y climáticos que determinan la peligrosidad y el impacto ambiental de jales mineros. *Rev. Int. Contam. Ambient.*, 43-54.

- Ruiz Olivares, A., Carrillo-González, R., & González-Chávez, M. (2013). Potencial of castor bean (*Ricinus communis* L.) for phytoremediation of mine tailings and oil production. *Journal of Environmental Management*, 316-323.
- Ruvalcaba Sil, J. L. (2013). Métodos analíticos para la determinación de metales pesados. En A. Alarcón, *Biorremediación de suelos y aguas contaminadas con compuestos orgánicos e inorgánicos* (pág. 333). México: Trillas.
- Santos-Jallath, J., Castro-Rodríguez, A., Huevo-Casillas, J., & Torres-Bustillos, L. (2012). Arsenic and heavy metals in native plants at tailings impoundments in Queretaro, México. *Physics and Chemistry of the Earth*, 10-17.
- Secretaría de Economía. (22 de junio de 2015). *Minería/ Legislación, normatividad y convenios internacionales*. Recuperado el 2 de febrero de 2018, de Secretaría de Economía: <https://www.gob.mx/se/acciones-y-programas/mineria-legislacion-normatividad-y-convenios-internacionales-6986?state=published>
- Secretaría de Economía. (28 de Febrero de 2017). *Manual del Inversionista en el sector minero mexicano*. Recuperado el 4 de enero de 2018, de se.gob.mx: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/195350/MISMM_ESPA_OL_PARTE_1.pdf
- Seoáñez Calvo, M. (1999). *Contaminación del suelo: Estudios, tratamiento y gestión*. México, D.F.: Mundi-Prensa.
- Serna Rueda, A. (27 de abril de 2017). Optimización del método de extracción secuencial BCR para extender su aplicación a residuos mineros. *Tesis para optar al grado de magister en minería*. Chile: Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Departamento de Ingeniería de Minas.
- Servicio Geológico Mexicano. (marzo de 2008). *Inventario físico de los recursos minerales del municipio de Zimapán, Estado de Hidalgo*. Recuperado el 4 de enero de 2018, de sgm.gob.mx: https://mapserver.sgm.gob.mx/InformesTecnicos/InventariosMinerosWeb/T1308SOLJ0004_01.PDF
- Servicio Geológico Mexicano. (diciembre de 2016). *Panorama Minero del Estado de Hidalgo*. Recuperado el 4 de enero de 2018, de sgm.gob.mx: <http://www.sgm.gob.mx/pdfs/HIDALGO.pdf>
- Shi, G., & Cai, Q. (2009). Cadmium tolerance and accumulation in eight potential energy crops. *Biotechnology Advances*, 555-561.
- Shi, G., Xia, S., Ye, J., Huang, Y., Liu, C., & Zhang, Z. (2015). PEG-simulated drought stress decreases cadmium accumulation in castor bean by altering root morphology. *Environmental and Experimental Botany*, 127-134.
- Shiowatana, M., Lopez-Sanchez, J., & Rubio, R. . (2001). Fractionation of arsenic in soil by a continuous-flow sequential extraction method. *J. Environ. Qual.* 30, 1940-1949.
- Simeonov, L., & Sargsyan, V. (2008). *Soil chemical pollution, risk assessment, remediation and security*. Dordrecht, Netherlands: Springer.

- Skoog, D. A., Crouch, S. T., & Holler, F. J. (2008). *Principios de análisis instrumental*. México, D. F.: Cengage Learning.
- SURF. (2009). *Sustainable Remediation White Paper- Integrating Sustainable Principles, Practices, and Metrics into Remediation Projects*. (D. E. Ellis, & P. W. Hadley, Eds.) Recuperado el 29 de Enero de 2018, de Sustainable Remediation Forum: <http://www.sustainableremediation.org/remediation-resources/>
- Taylor, H. E. (2001). *Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry. Practices and Techniques*. New York: USA: Academic Press.
- Tessier, A., Campbell, P., & Bisson, M. (1979). Sequential Extraction Procedure for the Speciation of Particulate Trace Metals. *Analytical Chemistry*, 8.
- Thomas, R. (2004). *Practical Guide to ICP-MS*. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Tlustos, P., Száková, J., Stárková, A., & Pablíková, D. (2005). A comparison of sequential extraction procedures for fractionation of Arsenic, Cadmium, Lead, and Zinc in soil. *Central European Journal of Chemistry*, 830-851.
- Ullah, A., Heng, S., Hussain Munis, M. F., Fahad, S., & Yang, X. (2015). Phytoremediation of heavy metals assisted by plant growth promoting (PGP) bacteria: A review. *Environmental and Experimental Botany*, 28-40.
- United States Department of Agriculture. (2004). *Soil Survey Laboratory Methods Manual Version 4.0*. (R. Burt, Ed.) Soil Survey Investigations Report No. 42.
- Urbina Trinidad, P. (Noviembre de 2015). Análisis del efecto de la movilidad de elementos potencialmente tóxicos en jales de minas mediante el uso de bacterias promotoras del crecimiento. *Tesis profesional para Obtener el título de Ingeniero Ambiental*. Puebla, México: Facultad de Ingeniería Química, BUAP.
- USEPA. (2000). *Introduction to Phytoremediation*. (N. R. Laboratory, Ed.) Recuperado el 31 de Enero de 2018, de US Environmental Protection Agency: <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPDF.cgi/30003T7G.PDF?Dockey=30003T7G.PDF>
- USEPA. (Junio 1993). *Selecting Remediation techniques for contaminated sediment*. USEPA-823-B93-001: United States Environmental Protection Agency, Office of Water (WH 585).
- Volke Sepúlveda, T., Velasco Trejo, J., & de la Rosa Pérez, D. (2005). *Suelos contaminados por metales y metaloides*. México, D.F.: Instituto Nacional de Ecología/ Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.
- Wan, X., Dong, H., Feng, L., Lin, Z., & Luo, Q. (2012). Comparison of three sequential extraction procedures for arsenic fractionation in highly polluted sites. *Chemosphere* 178, 402-410.
- Wang, L., Ji, B., Hu, Y., Liu, R., & Sun, W. (2017). A review on in situ phytoremediation of mine tailings. *Chemosphere*, 594-600.

- Wang, S., Zhao, Y., Guo, J., & Zhou, L. (2016). Effects of Cd, Cu and Zn on *Ricinus communis* L. growth in single element or co-contaminated soils: Pot experiments. *Ecological Engineering*, 347-351.
- Wenzel, W., Kirchbaumer, N., Prohaska, T., Stingeder, G., Lombi, E., & Adriano, D. (2001). Arsenic fractionation in soils using an improved sequential extraction procedure. *Anal. Chim. Acta*, Vol. 436, 1.15.
- Wheaton, G., Counts, J., Mukherjee, A., Kruh, J., & Kelly, R. (2015). The confluence of Heavy metal Biooxidation and Heavy Metal Resistance: Implications for Bioleaching by Extreme Thermoacidophiles. *Minerals*, 397-451.
- Xiaohai, L., Yuntao, G., Khan, S., Gang, D., Aikui, C., Li, L., Xuecan, W. (2008). Accumulation of Pb, Cu and Zn in native plants growing on contaminated sites and their potential accumulation capacity in Heqing, Yunnan. *Journal of Environmental Sciences* 20, 1469-1474.
- Xiong, P.-p., He, C.-q., Kokyo, O., Chen, X., Liang, X., Liu, X., Shi, Z.-c. (2018). *Medicago sativa* L. enhances the phytoextraction of Cadmium and Zinc by *ricinus communis* L. on contaminated land in situ. *Ecological engineering* 116, 61-66.
- Zeien, H. (1995). *Chemische Extraktionen zur Bestimmung der Bindungsformen von Schwermetallen in Böden*. Bonn: Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Zhi-xin, N., Li-na, S., Tie-heng, S., Yu-shuang, L., & Hong, W. (2007). Evaluation of phytoextracting Cadmium and Lead by sunflower, ricinus, alfalfa and mustard in hydroponic culture. *Journal of Environmental Sciences* 19, 961-967.
- Zimmerman, A., & Weindorf, D. C. (2010). Heavy Metal and trace metal analysis in soil by Sequential Extraction: A review of procedures. *International Journal of Analytical Chemistry*, 7 pp.