



**Benemérita
Universidad Autónoma de Puebla**

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

**“ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN PROCESOS DE
FITORREMEDIACIÓN DE JALES MINEROS ASISTIDA
CON BACTERIAS”**

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el Título de:

Licenciatura en Ingeniería Ambiental

Presenta:

KAREN EDITH DEL ROSARIO DE JESUS

Director de Tesis:

Dra. Maribel Castillo Morales

Co-director de Tesis:

Dr. José Carlos Mendoza Hernández

Puebla, Pue. Febrero 2020

INDICE

INTRODUCCIÓN	viii
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	ix
JUSTIFICACIÓN.....	x
OBJETIVOS.....	xi
General:	xi
Específicos:.....	xi
HIPÓTESIS	xi
Nula:.....	xi
Alternativa:	xi
ANTECEDENTES.....	1
1.1 La minería en México	1
1.1.1 Tipos de yacimientos explotados	1
1.1.1.1 <i>Yacimientos epitermales</i>	2
1.1.1.2 <i>Yacimiento de metasomatismo de contacto o skarn</i>	2
1.1.1.3 <i>Yacimientos sulfuros masivos vulcanogenéticos</i>	2
1.1.1.4 <i>Yacimientos del tipo pórfido cuprífero</i>	3
1.2 Jales mineros	4
1.3 Elementos potencialmente tóxicos	5
1.4 Fitorremediación	6
1.4.1 Tecnologías de la fitorremediación	8
1.4.1.1 Fitoextracción o fitoacumulación	8
1.4.1.2 Fitovolatilización	8
1.4.1.3 Fitodegradación.....	8

1.4.1.4 Fitoimmobilización	9
1.4.1.5 Fitoestabilización	9
1.4.1.6 Rizofiltración	9
1.4.2 Ventajas y desventajas de la fitorremediación.....	9
1.5 Bacterias promotoras del crecimiento vegetal	11
1.5.1 Principales grupos de BPCV	12
1.6 Actividad enzimática	13
1.7 Especies Reactivas de Oxígeno (EROs)	13
1.8 Movilidad de EPT	14
1.9 Extracción química secuencial.....	16
CAPITULO II.....	17
METODOLOGÍA.....	17
2.1 Preparación de Inóculo Bacteriano.....	17
2.2 Preparación de semillas.....	17
2.3 Diseño experimental.....	18
2.4 Preparación de macetas.....	18
2.5 Ensayos en macetas.....	19
2.6 Determinación de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y peroxidasa.....	19
2.7 Determinación de Glutación Reductasa	21
2.8 Extracción secuencial de EPT	21
2.9 Extracción total de EPT.....	23
2.11 Análisis estadístico	24
CAPITULO III.....	25
RESULTADOS Y DISCUSIONES	25

3.1 Resultados	25
3.1.1 Tiempo de germinación de las semillas	25
3.1.2 Promedio de plantas totales	26
3.1.3 Altura promedio de las plantas	27
3.1.4 Longitud promedio de raíces	28
3.1.5 Determinación de peróxido de hidrógeno (H₂O₂)	30
3.1.5.1 Determinación de H ₂ O ₂ en parte aérea	30
3.1.5.2 Determinación de H ₂ O ₂ en raíz	31
3.1.6 Determinación de enzima Peroxidasa	32
3.1.6.1 Determinación de enzima Peroxidasa en parte aérea	32
3.1.6.2 Determinación de enzima Peroxidasa en raíz	33
3.1.7 Determinación de enzima Glutación Reductasa	34
3.1.7.1 Determinación de enzima Glutación Reductasa en parte aérea	34
3.1.7.2 Determinación de enzima Glutación Reductasa en raíz	35
3.1.8 Extracción secuencial	36
3.1.8.1 Plomo (Pb)	36
3.1.8.2 Níquel (Ni)	37
3.1.8.3 Cobre (Cu)	38
3.1.8.4 Manganeso (Mn)	39
3.2 Discusión de resultados	41
Conclusiones	43
Referencia bibliográfica	45

Índice de imágenes

Imagen 1. Al fondo las presas de jales, Zimapán Hidalgo (Fuente: propia)	4
Imagen 2. Fitorremediación. Fuente: (Buchanan, Gruissem, & Jones, 2000)	7
Imagen 3. Frutos frescos de higuera (Ricinus communis)	17
Imagen 4. Preparación de maceteros	18
Imagen 5. Monitoreo de variables de altura	19
Imagen 6. Extracción enzimática del H ₂ O ₂	20
Imagen 7. Extracción enzimática de Peroxidasas.....	20
Imagen 8. Extracción enzimática de Glutathion Reductasa	21
Imagen 9. Extracción química secuencial	23
Imagen 10. Digestión ácida para la extracción total.....	24

Índice de tablas

Tabla 1. Ventajas y desventajas de la fitorremediación	10
Tabla 2. Diseño experimental.....	18

Índice de gráficos

Gráfica 1. Días promedio de germinación de semillas	25
Gráfica 2. Número promedio de plantas	26
Gráfica 3. Altura de las plantas	27
Gráfica 4. Longitud de raíces	28
Gráfica 5. Determinación de H_2O_2 en parte aérea de las plantas	30
Gráfica 6. Determinación de H_2O_2 en raíz.....	31
Gráfica 7. Determinación de enzima Peroxidasa en parte aérea	32
Gráfica 8. Determinación de enzima Peroxidasa en raíz	33
Gráfica 9. Determinación de la enzima Glutación Reductasa en parte aérea.....	34
Gráfica 10. Determinación de enzima Glutación Reductasa en raíz.....	35
Gráfica 11. Movilidad de plomo.....	36
Gráfica 12. Movilidad de níquel.....	37
Gráfica 13. Movilidad del cobre.....	38
Gráfica 14. Movilidad del Manganeso	40

**ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN
PROCESOS DE FITORREMEDIACIÓN
DE JALES MINEROS ASISTIDA CON
BACTERIAS**

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de actividades industriales a través del tiempo ha traído consigo el aumento de los residuos; la minería es uno de los problemas más señalados por la sociedad a nivel mundial, ya que contribuye al deterioro de los recursos naturales y genera una gran diversidad de contaminantes tóxicos en el agua, la atmósfera, el suelo y subsuelo; lo que conlleva a un irremediable deterioro del ambiente. En México la minería es una de las actividades de mayor importancia que ha prevalecido a través del tiempo y fue fuente de expansión económica.

En la actualidad existen diversos estudios que buscan resolver la contaminación originada por elementos potencialmente tóxicos presentes en agua, suelo y subsuelo; mediante el uso de fitorremediación en donde la principal característica es la capacidad que tienen las plantas para acumular compuestos orgánicos e inorgánicos que resultan tóxicos en el medio en donde se encuentran. El uso de estas técnicas ha alcanzado importancia por su bajo costo, el impacto regenerativo que logran los lugares donde se aplica y la capacidad de extracción debido al crecimiento vegetal que se mantiene en la zona.

Con base a los puntos anteriores la presente investigación plantea una solución a la contaminación por residuos mineros denominados jales, utilizando la planta de *Ricinus communis*, para evaluar la movilidad de los elementos potencialmente tóxicos en las diferentes fracciones del suelo mediante el uso de bacterias promotoras del crecimiento vegetal propias de ambientes mineros.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los problemas de contaminación local, nacional e internacional a los que nos enfrentamos hoy en día van aumentando radicalmente teniendo un impacto negativo en los ecosistemas y a lo largo del tiempo llegan a ser parte del deterioro de los mismos; principalmente, afectando la salud de la población que se encuentra cercana.

El problema ambiental de mayor impacto en México es ocasionado por la minería, una de las actividades económicas de mayor importancia y tradición por muchos años en diferentes zonas del país, la cual conlleva a la acumulación de residuos generados por esta actividad; los jales, que representan efectos tóxicos en el aire, cuerpos de agua, suelo y subsuelo por la presencia de elementos potencialmente tóxicos (EPT).

De los problemas que enfrentamos con este tipo de residuo es que son transportados fácilmente por el viento; de su depósito original a zonas cercas y debido al tamaño de partícula muy fina; menor a PM_{10} , ocasiona problemas de salud a la población por los largos periodos de exposición a los que se encuentran; ya que los EPT se acumula en los órganos vitales y pueden causar problemas en el tracto respiratorio, riñón, páncreas, así como, efectos cardiovasculares, irritación en la piel, irritación en los ojos y daños gastrointestinales.

La alta cantidad de EPT que se van al aire; seguido de la generación de lixiviados que ocasionan un drenaje ácido y la contaminación visual de los depósitos mineros debido a la ausencia de restauración son problemas acumulables, los cuales por su manejo y disposición inadecuada son desplazados a partes más bajas de los valles, hasta llegar a mantos acuíferos y finalmente al agua de consumo cercana a las zonas mineras que en la actualidad han sido urbanizadas teniendo un problema de salud para los habitantes.

JUSTIFICACIÓN

En la actualidad existen diferentes métodos empleados para la descontaminación del suelo, el empleo de la fitorremediación es considerada una alternativa viable para la restauración de un ambiente deteriorado; como los suelos mineros con presencia de EPT. La diversidad microbiana asociada a ambientes mineros existe y la técnica de fitorremediación del suelo asistida con microorganismos; como las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV), buscan incrementar el rendimiento de la planta, a través de la puesta en acción de mecanismos por parte de la misma; buscando un equilibrio en la producción enzimática ya que es afectada por la presencia de EPT que aumentan la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) cuando la planta se encuentra bajo estrés por algún contaminante.

Los contaminantes modifican el equilibrio entre producción y eliminación de EROs e inducen a un estrés oxidativo en las plantas que pueden mostrar reacciones de defensa, la enzima de glutatión reductasa funge como sistema regulador alcanzando un balance en la disminución de los niveles tóxicos del peróxido de hidrogeno y el estrés oxidativo; así también, permite la sobrevivencia de las plantas en el proceso de simbiosis con los microorganismos y que exista un mayor crecimiento vegetal.

La activación enzimática frente a la presencia de contaminantes es un sistema regulador al suprimir o eliminar EROs reduciendo el oxígeno molecular a formas menos tóxicas. Las principales vías de remoción de EROs incluyen enzimas que favorecen los procesos metabólicos de las plantas para que mediante el incremento de la actividad enzimática los niveles de toxicidad disminuyan. Por lo tanto, la fitorremediación juega un papel importante para la recuperación o detoxificación de suelos, en la remoción o eliminación de contaminantes evitando que estos se infiltren a las aguas subterráneas o se volatilicen y provoquen daños al ecosistema y a la salud de los habitantes que se encuentran cercanos a las zonas mineras.

OBJETIVOS

General:

Analizar la actividad enzimática de peroxidasa y glutatión reductasa en presencia de bacterias promotoras de crecimiento en procesos de fitorremediación por contaminación de elementos potencialmente tóxicos

Específicos:

- Evaluar el crecimiento de las plantas en presencia de bacterias promotoras del crecimiento con dos tipos de sustrato, comercial y jal de minas
- Analizar la actividad enzimática de Peroxidasa y Glutatión Reductasa en el tejido vegetal con bacterias promotoras de crecimiento en ambos sustratos
- Analizar la actividad enzimática de Peroxidasa y Glutatión Reductasa en el tejido vegetal sin bacterias promotoras de crecimiento en ambos sustratos
- Analizar la distribución de elementos potencialmente tóxicos en el suelo durante el proceso de fitorremediación

HIPÓTESIS

Nula: En la fitorremediación de jales de minas asistida por bacterias promotoras del crecimiento vegetal no se ven disminuidas las EROs, el estrés oxidativo ni incrementada la actividad de la Peroxidasa y Glutatión reductasa causadas por la presencia de elementos potencialmente tóxicos.

Alternativa: En la fitorremediación de jales de minas asistida por bacterias promotoras del crecimiento vegetal se ven disminuidas las EROs, el estrés oxidativo e incrementada la actividad de Peroxidasa y Glutatión reductasa causadas por la presencia de elementos potencialmente tóxicos.

CAPITULO 1

ANTECEDENTES

1.1 La minería en México

La minería es aquella actividad productiva en la que se extraen, explotan y/o benefician los minerales depositados en el suelo y en el subsuelo. De acuerdo con sus características físicas y químicas los minerales se clasifican en metálicos, no metálicos y energéticos (INEGI, 2014). La corteza terrestre está formada por minerales de todo tipo, pero solamente en ciertas partes estos elementos se concentran y permiten, por su volumen, que se realicen explotaciones de valor económico. Los yacimientos, depósitos o criaderos minerales corresponden a dos situaciones fundamentales: los que se han formado al mismo tiempo que la roca que los contiene, o sea la roca encajonante, denominados yacimientos singenéticos, y aquellos que se formaron después de que se originó la roca encajonante, resultado de las fisuras y fracturas. (Coll, Sánchez, & Morales, 2002)

La minería es una de las actividades económicas de mayor tradición en México, era practicada desde la época prehispánica y fue fuente de la expansión regional desde la Colonia. En 2018, la minería en México se ubicó como la sexta generadora de divisas, debajo del sector automotriz, el electrónico, las remesas, el petróleo, el turismo y solo por encima de la actividad agroindustrial, con 17 mil 489 millones de dólares (CAMIMEX, 2018). Desde su inicio las actividades extractivas han estado supeditadas a los intereses y al patrón de desarrollo de otras naciones.

México se ha caracterizado por la riqueza de yacimientos mineros, lo que lo ha ubicado en un primer plano de economía a nivel mundial; por la variedad de estos en el país.

1.1.1 Tipos de yacimientos explotados

Entre los principales tipos de yacimientos que se han explotado destacan los epitermales (ubicados principalmente en Taxco, Guanajuato, Pachuca, Zacatecas, Santa Bárbara, etc.), los de metasomatismo de contacto o skarn (Charcas,

Zimapán, La Paz, San Martín, etc.), los sulfuros masivos vulcanogenéticos (Tizapa, Rey de Plata, etc), y yacimientos del tipo pórfido cuprífero (La Caridad, Cananea, etc) (Martín Romero & Gutiérrez Ruíz, 2010).

1.1.1.1 Yacimientos epitermales

El ambiente epitermal, tal como indica la propia etimología de este término, se halla a escasa profundidad en referencia a la superficie terrestre y, en concreto, define la parte superior de los sistemas hidrotermales naturales. Se caracteriza este tipo de depósitos minerales en función de la mineralogía de las menas (mineral en abundancia para ser aprovechado) y de sus características texturales, así como en sus propias reconstrucciones geológicas (Camprubí & Albinson , 2006). Es la tipología de mayor interés ya que son yacimientos principalmente de oro y plata; siendo México uno de los principales productores de plata debido a este tipo de yacimientos.

1.1.1.2 Yacimiento de metasomatismo de contacto o skarn

Los yacimientos de tipo skarn se encuentran entre los más estudiados desde el punto de vista metalogenético. Económicamente hablando, la tipología de los skarns abarca numerosos depósitos ricos en Cu, Pb, Zn, Au, Fe, W y Sn, así como en otros minerales industriales (wollastonita, grafito, asbesto, talco, fluorita, etc.) (Pérez Segura & Gonzáles Partida, 2010).

1.1.1.3 Yacimientos sulfuros masivos vulcanogenéticos

Los depósitos de sulfuros masivos vulcanogénicos (conocidos como depósitos VMS; de "volcanogenic massive sulfide") corresponden a cuerpos estratiformes o lenticulares de sulfuros presentes en unidades volcánicas o en interfases volcánico-sedimentarias depositadas originalmente en fondos oceánicos. A menudo, los depósitos consisten en un 90% en pirita masiva, aunque la pirrotina está presente en algunos de ellos, pero contienen cantidades variables de Cu, Pb, Zn, Ba, Au y Ag; siendo típicamente depósitos polimetálicos (Barrie & Hannington, 2019).

1.1.1.4 Yacimientos del tipo pórfido cuprífero

Los pórfidos cupríferos son esencialmente depósitos minerales de baja ley y gran tonelaje. Se denominan pórfidos porque frecuentemente, pero no exclusivamente, se asocian con rocas ígneas intrusivas con fenocristales de feldespato en una masa fundamental cristalina de grano fino. Más del 50% de la producción de Cu mundial proviene de este tipo de depósitos. Los tres productos metálicos más importantes por valor en todo el mundo en los pórfidos cupríferos son el Cu (cobre), Mo (molibdeno) y Au (oro) (Maldonado , 2019).

El estado de Hidalgo es rico en yacimientos de oro, plata, cobre, zinc y mercurio, que se envían a otras entidades de México y al extranjero, para su industrialización. En el estado, las compañías mineras Real del Monte, Pachuca, S.A. y Minera Autlán son las más importantes. La ciudad de Pachuca, Hidalgo, tiene jales de mina que resultaron de la acumulación de más de 200 años de actividad extractiva; el método de beneficio empleado en este distrito minero para la extracción de Au y Ag fue principalmente por amalgamación con Hg y por cianuración.

Muchos habitantes de la ciudad no perciben el problema ambiental; considerando que las condiciones meteorológicas (vientos que alcanzan velocidades de 65 kph y que se presentan hasta nueve meses al año) favorecen la dispersión de partículas finas que se encuentran en la superficie de los jales. Existen algunos reportes que señalan la problemática ambiental que representa para el hombre los residuos de minería, motivo de las condiciones normales de operación de los depósitos o presas de jales mineros, y como consecuencia de tormentas y derrames de líquidos en las presas, donde puede ocurrir la contaminación de los cuerpos de abastecimiento de agua con el posible deterioro de su calidad, sobre todo si los jales tienen pH o contenido de metales que pueden volver el agua temporal o permanentemente no apta para el consumo. (Hernández E. , Mondragón, Cristobal, Rubiños, & Robledo, 2009). Sin embargo, estos residuos, producto de la actividad minera son usualmente depositados a cielo abierto, en

donde sufren procesos de intemperismo por largos periodos de tiempo, sin tener un control adecuado de los mismos causando un impacto al medio ambiente y la salud de los habitantes.

1.2 Jales mineros

Los jales son los depósitos de residuos mineros también conocidos como presas de jales y son apilamientos de rocas molidas que quedan después de que los minerales de interés han sido extraídos de las rocas que los contienen (Moreno, 2008).



Imagen 1. Al fondo las presas de jales, Zimapán Hidalgo (Fuente: propia)

El principal problema ambiental asociado a los jales está relacionado con la generación de drenaje ácido y su dispersión a través de los escurrimientos superficiales que, al transportarse, se convierten en un problema ambiental severo al contaminar suelos, sedimentos, aguas superficiales y aguas subterráneas. La absorción y posterior acumulación dependen en primera instancia del movimiento (movilidad de las especies) de los metales desde la solución del suelo hasta la raíz de la planta (Prieto, Gonzáles, Román, & Prieto, 2009).

Debido a que los jales están expuestos al intemperismo, los minerales que contienen pueden ser afectados por diferentes procesos, como reacciones de

óxido–reducción, de ácido-base, hidrólisis, adsorción–desorción, etc., que pueden modificar la movilidad, biodisponibilidad y toxicidad de los metales contenidos, derivando en su liberación y subsecuente acumulación e infiltración al subsuelo. La movilidad de los metales es afectada por diversos parámetros fisicoquímicos, especialmente por el pH, salinidad, textura, capacidad de intercambio catiónico, potencial redox y composición mineralógica (Ramos, Avelar, & Medel, 2012).

Generalmente, estos jales contienen sulfuros metálicos residuales como pirita (FeS_2), pirrotita (Fe_{1-x}S), galena (PbS), esfalerita (ZnS), calcopirita (CuFeS_2) y arsenopirita (FeAsS), que son la fuente de elementos potencialmente tóxicos (EPT) como el As, Cd, Pb, Cu, Zn, Fe, etc (Romero, Armienta, & González-Hernández, 2007).

1.3 Elementos potencialmente tóxicos

Se define a los elementos potencialmente tóxicos (EPT) como elementos de elevado peso atómico, que se emplean en procesos industriales e incluso en bajas concentraciones, pueden ser nocivos para las plantas y los animales. Sus características más comunes son: persistencia, bioacumulación, biotransformación y elevada toxicidad, lo cual hace que se encuentren en los ecosistemas por largos periodos, ya que su degradación natural es difícil (Medisan, 2017).

En general, los elementos potencialmente tóxicos son acumulados en el suelo superficial y se reducen lentamente mediante la lixiviación, el consumo por las plantas, la erosión y la deflación; teniendo la capacidad de ser transferidos a la cadena alimenticia humana. Las aplicaciones domésticas, agrícolas, industriales, tecnológicas y médicas de los EPT han llevado a la contaminación global en todos los entornos (McKinley, McLellan, Gagné, & Quinn, 2019). Dentro de la lista de EPT se encuentra el As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb y Zn (Yotova, Padareva, & Hristova, 2018).

Los EPT han sido utilizados ampliamente en actividades, tales como, la agricultura, la minería, la fundición, la galvanoplastia y el refinado del oro; con lo

que, se han documentado serios problemas asociados a la contaminación de los suelos en estas actividades, afectando al medio ambiente y principalmente a las plantas. La acumulación de EPT en las plantas inhibe o activa algunos procesos enzimáticos que afectan su productividad tanto cualitativa como cuantitativamente. El plomo (Pb), el arsénico (As), el cadmio (Cd) y el zinc (Zn) entre otros, pueden ser absorbidos por las plantas hasta concentrarse en sus tejidos a niveles tóxicos; tal situación puede ser una posible vía de entrada de estos metales en la cadena alimentaria a través del consumo de plantas, directa o indirectamente por los seres humanos (Ortiz & Trejo, 2009).

Los EPT pueden perturbar grupos esenciales de enzimas, destruir la integridad de biomoléculas importantes, modificar algunas macromoléculas, reemplazar iones metálicos esenciales de fórmulas estructurales de biomoléculas y alterar los mecanismos de defensa antioxidante como resultado de la producción de EROs (Sarwar, Imran, Rashid, & Ishaque, 2017) causando toxicidad severa en las plantas.

Los niveles de contaminación por EPT y su impacto en el medio ambiente son mayores y requieren de alternativas de descontaminación que mantengan las propiedades biológicas y la estructura física del suelo contaminado sin generar un mayor impacto. Siendo la fitorremediación un conjunto de estrategias para hacer frente a la toxicidad de los EPT para contribuir a ciertos mecanismos de tolerancia y así remediar los suelos contaminados.

1.4 Fitorremediación

La presencia de EPT en el suelo es una de las preocupaciones ambientales de mayor importancia. Es por ello que se están utilizando varias técnicas físicas, químicas y biológicas para eliminar EPT de los suelos; ya que representan un daño perjudicial a las plantas y a los animales al originarse en procesos naturales y antropogénicos, lo que ocasiona en la planta la reducción de su crecimiento disminuyendo las tasas de fotosíntesis y contenidos de clorofila (Sarwar, Imran, Rashid, & Ishaque, 2017).

El término fitorremediación hace referencia a una serie de tecnologías que se basan en el uso de plantas para limpiar o restaurar ambientes contaminados, como aguas, suelos, e incluso aire.

Esta tecnología utiliza las plantas para remover, reducir, transformar, mineralizar, degradar, volatilizar o estabilizar contaminantes, de una manera sostenible. Se han identificado una amplia diversidad de especies que se emplean para este fin; algunas de ellas, debido a su gran capacidad para acumular EPT, reciben el nombre de híper acumuladoras (Delgadillo, Gonzáles, & Prieto, 2011). La tolerancia a EPT es un requisito previo para el proceso de fitorremediación, ya que cuanto más tolera la planta el estrés del metal, mayor será la acumulación de este en los tejidos de la planta con los efectos adversos mínimos sobre su salud (Sarwar, Imran, Rashid, & Ishaque, 2017).

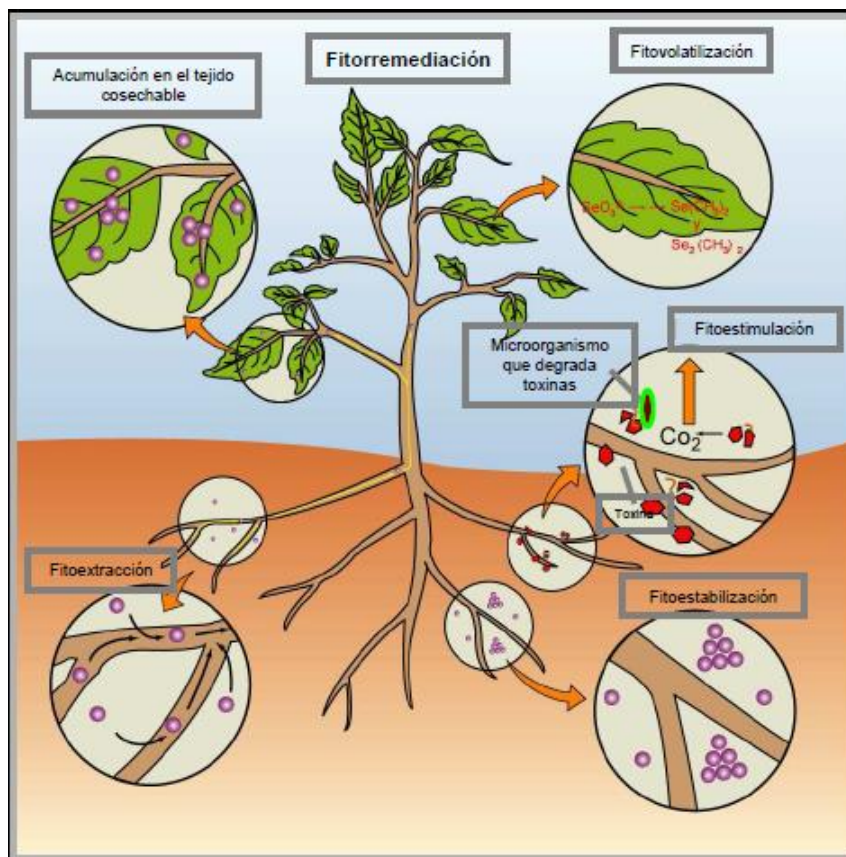


Imagen 2. Fitorremediación. Fuente: (Buchanan, Grussem, & Jones, 2000)

1.4.1 Tecnologías de la fitorremediación

Como señala (Thangavel & Subbhuraam, 2004) dependiendo del tipo de contaminante, las condiciones del sitio y el nivel de limpieza requerido; las tecnologías de fitorremediación se pueden utilizar como medios de inmovilización o eliminación de contaminantes.

1.4.1.1 Fitoextracción o fitoacumulación

En ella se explota la capacidad de algunas plantas para tolerar y acumular contaminantes en sus raíces, tallos o follaje para que su cosecha se dé fácilmente. Dentro de las consideraciones de esta técnica esta la selección de la especie de planta más adecuada para los contaminantes presentes (Delgadillo, Gonzáles, & Prieto, 2011).

1.4.1.2 Fitovolatilización

Se produce a medida que los árboles y plantas en crecimiento tienen la capacidad de absorber, metabolizar y transportar contaminantes orgánicos e inorgánicos de su raíz a partes superiores; llegando a las hojas para evaporarse o volatilizarse en la atmósfera en formas menos tóxicas o relativamente menos peligrosas a las iniciales (Delgadillo, Gonzáles, & Prieto, 2011).

1.4.1.3 Fitodegradación

Se basa en el uso de plantas para degradar o transformar en sustancias menos tóxicas diversos tipos de contaminantes orgánicos principalmente, como hidrocarburos aromáticos polinucleares, hidrocarburos totales del petróleo, plaguicidas (herbicidas, insecticidas y fungicidas), compuestos clorados, explosivos y surfactantes (detergentes). A través de reacciones enzimáticas que llevan a cabo plantas y microorganismos asociados en la rizósfera o compuestos orgánicos que se movilizan a través de la planta (Núñez López , Meas Vong, Ortega Borges , & J.Olguín , 2004).

1.4.1.4 Fitoimmobilización

La fitoimmobilización provoca la sujeción y reducción de la biodisponibilidad de los contaminantes mediante la producción de compuestos químicos en la interfaz suelo-raíz, los que inactivan las sustancias tóxicas, ya sea por procesos de absorción, adsorción o precipitación (Carpena & Bernal, 2007).

1.4.1.5 Fitoestabilización

Mediante esta estrategia las plantas desarrollan un denso sistema de raíz, lo cual les permite inmovilizar contaminantes del suelo a través de su absorción y acumulación en las raíces o bien, por precipitación en la zona de la rizosfera (Delgadillo, Gonzáles, & Prieto, 2011). Este proceso reduce la movilidad de los contaminantes y su biodisponibilidad evitando su migración a las aguas subterráneas e incluso al aire. Las plantas ejercen un control hidráulico en el área contaminada; puesto que mantiene una humedad constante en la zona de la rizosfera que favorece la inmovilidad del contaminante. La fitoestabilización presenta mayor efectividad en suelos de textura fina con alto contenido de materia orgánica (Padmavathiamma, Li, Chen, & Ru, 1994).

1.4.1.6 Rizofiltración

Utiliza a las plantas para eliminar contaminantes del medio hídrico a través de la raíz (Dushenkov, Kumar, Motto, & Raskin, 1995). Cuando el sistema radicular está bien desarrollado, las plantas se introducen en el agua contaminada con metales, en donde las raíces los absorben y acumulan. A medida que las raíces se van saturando, las plantas se cosechan y se disponen para su uso final (Delgadillo, Gonzáles, & Prieto, 2011).

1.4.2 Ventajas y desventajas de la fitorremediación

En la tabla 1 se muestran las principales ventajas y limitaciones de la fitorremediación en comparación con otras tecnologías convencionales. Las tecnologías se emplean y son principalmente útiles en grandes superficies, con contaminantes relativamente inmóviles o con niveles de contaminación bajo, y deben considerarse procesos de recuperación a largo plazo.

Tabla 1. Ventajas y desventajas de la fitorremediación

Ventajas	Desventajas
Es eficiente tanto en contaminantes orgánicos e inorgánicos	Restringido a sitios con poca profundidad de contaminación dentro de la zona de enraizamiento de plantas remediadoras
Su aplicación es posible <i>in situ</i> y <i>ex situ</i>	Puede tardar varios años para remediar un sitio contaminado
La aplicación disminuye el daño del suelo en comparación de métodos convencionales	Restringido a los sitios con bajas concentraciones de contaminantes
Reduce la cantidad de residuos que se depositan a vertederos (hasta un 95%). Ya que permite el reciclado de recursos (agua, biomasa, metales)	La biomasa vegetal que se cosecha de la fitoextracción puede ser clasificada como residuo peligroso, por lo tanto, la disposición debe ser adecuada
En el lugar de la aplicación disminuye la propagación de contaminantes a través del aire y agua	Las condiciones climáticas son un factor importante y en algunas ocasiones una limitante
No requiere equipo costoso o personal altamente especializado	La introducción de especies no nativas pueden afectar la biodiversidad
En aplicaciones a gran escala la energía potencial almacenada puede utilizarse para generar energía	El consumo/ utilización de biomasa vegetal contaminada causa preocupación
Puede ser aceptada por la población al ser estéticamente amigable	No todas las plantas son tolerantes o bioacumuladoras
Actúa positivamente en el suelo, mejorando las características físicas y químicas, por la presencia de cubierta vegetal	

Fuente: (Ghosh & Singh, 2005)

Con lo anterior, se sabe que algunas técnicas de fitorremediación logran una mayor efectividad a través de la manipulación de microorganismos que favorezcan la adaptación de las plantas a los contaminantes, teniendo una mayor capacidad

de remediación y siendo más óptima. El estudio de la diversidad microbiana y de la dinámica de sus poblaciones en consorcios biodegradadores, está creciendo notablemente en el área de la ecología microbiana, lo cual ha permitido profundizar en el conocimiento acerca de la composición de las comunidades presentes en suelos contaminados, así como su evolución durante los procesos de biodegradación, para determinar cuáles son los microorganismos capaces de adaptarse y de explorar los hábitats contaminados; considerando la función metabólica de los microorganismos en los sistemas contaminados, sistemas naturales y sus interacciones metabólicas complejas, con la participación de diferentes microorganismos, por lo que es necesario estudiar las poblaciones microbianas presentes en el suelo de la forma más representativa posible (Pérez, Camacho, & Gómez, 2008).

1.5 Bacterias promotoras del crecimiento vegetal

La rizosfera es un ambiente único formado por la interfaz de las raíces de las plantas y el suelo circundante. Multitudes de microorganismos viven, compiten y prosperan en este ambiente. Dichos microorganismos pueden influir en el crecimiento y desarrollo de las plantas, de manera perjudicial o benéfica. Un subconjunto de las bacterias rizosféricas son capaces de colonizar y prosperar en el interior de los tejidos vegetales (raíz y tejidos aéreos), a estas bacterias se les denomina endófitas, a condición de que no tengan un efecto negativo en el crecimiento de la planta, y se asume que su efecto en la planta es más bien de simbiosis o de protooperación (Aviles, Flores, & Hernández, 2016). Es así como las BPCV proporcionan múltiples beneficios en la agricultura al mejorar la productividad de los cultivos y el contenido de nutrientes suprimiendo el crecimiento de patógenos.

Muchas bacterias asociativas son consideradas bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV), debido a su capacidad para estimular directamente el crecimiento de las plantas, a través de diversos mecanismos, como el aporte de nitrógeno por el proceso de fijación biológica de nitrógeno atmosférico, producción

de sustancias reguladoras del crecimiento, solubilización de minerales y nutrimentos, incremento en el volumen de la raíz, inducción de resistencia sistémica a patógenos, inhibición del crecimiento de organismos antagónicos e interacción sinérgica con otros microorganismos del suelo (Loredo, López, & Espinosa, 2004).

Y aunque es mayor las ocasiones en las que se ha tenido un mayor impacto en el crecimiento vegetal; en otras ocasiones su impacto puede llegar a ser nulo y esto se debe a las diferentes habilidades de las bacterias inoculadas para competir y sobrevivir dentro de las comunidades bacterianas autóctonas de la rizosfera donde son introducidas (Aviles, Flores, & Hernández, 2016).

1.5.1 Principales grupos de BPCV

Los principales grupos de BPCV pertenecen a Proteobacterias y Firmicutes. En el filo Firmicutes, *Bacillus* sp. son las bacterias predominantes con actividad promotora del crecimiento de las plantas. En el phylum Proteobacteria, la clase Gammaproteobacteria incluye los géneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Serratia*, *Pantoea*, *Psychrobacter*, *Enterobacter* y *Rahnella* (Ramakrishna, Yadav, & Li, 2019).

Las BPCV promueven el crecimiento de las plantas generalmente por dos mecanismos: forma directa o indirecta. Los mecanismos directos incluyen facilitar la adquisición de recursos y modular los niveles de hormonas vegetales o la actividad enzimática. Por otro lado, los mecanismos indirectos incluyen la inhibición de varios patógenos que dificultan el crecimiento y el desarrollo de las plantas, actuando como un agente de biocontrol (Glick , 1995). Es así como algunas de las BPCV tienen potencial para la desintoxicación de metales y mitigar el estrés de la planta en un ambiente contaminado. La mejora del crecimiento de las plantas mediante la solubilización de fosfato, producción de ácido indol-3-acético, sideróforos, amoníaco, cianuro de hidrógeno y fijación de nitrógeno son las características principales que poseen este tipo de microorganismo.

1.6 Actividad enzimática

Las propiedades de los suelos varían naturalmente a través del tiempo por factores que determinan su formación como la precipitación, el material parental, los organismos que lo habitan, la actividad antropogénica etc., en consecuencia, no existe una sola medida biológica o química para determinar el estado de salud y calidad de un suelo. Para aproximarse a la comprensión de los ciclos de los nutrientes y a los niveles de actividad microbiana responsables de estos procesos se investigan varias actividades enzimáticas del suelo porque dan cuenta de las reacciones bioquímicas que suceden dentro de este heterogéneo y complejo sistema; además, están estrechamente relacionadas con las propiedades físicas, químicas y biológicas y son sensibles a los cambios generados por su manejo, por ende, las actividades enzimáticas permiten monitorear el funcionamiento del suelo respondiendo a la necesidad de entender los efectos positivos, negativos e interactivos sobre las propiedades y los procesos que suceden dentro de esta matriz y las relaciones entre estos factores, los usos y prácticas de manejo (Cerón & Melgarejo, 2005). La presencia de BPCV con estrés por EPT, tienen la finalidad de realizar actividades enzimáticas que favorezcan a la disminución de las EROs y aumentan como mecanismo de defensa al estrés por los contaminantes; como es el caso de glutatión reductasa que favorece y logra un equilibrio en las plantas.

1.7 Especies Reactivas de Oxígeno (EROs)

Las EROs han existido desde la introducción del oxígeno molecular a la atmósfera. Los intermediarios reactivos de oxígeno o EROs son formas parcialmente reducidas o activadas del oxígeno atmosférico (O_2). Generalmente provienen de la excitación del O_2 para formar al oxígeno singlete (1O_2) o de la transferencia de uno, dos o tres electrones al O_2 para formar, respectivamente, al radical superóxido, al peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o al radical hidroxilo (Rivera, Buentello, Diaz-de-León, & Pérez, 2007).

Las EROs en las plantas son moléculas de señalización en las células vegetales, y por medio de la evolución las plantas han logrado adquirir un alto grado de control

sobre su toxicidad, teniendo un papel clave tanto en defensa de la planta a los patógenos como en la patogénesis, lo que ha llevado a la planta a desarrollar mecanismos protectores antioxidantes para mantener las EROs en su nivel más bajo en las células, lo que disminuye el daño a las paredes celulares y otros orgánulos y componentes celulares (Arfaoui, El-Hadrami, & Daayf, 2018). La producción de EROs en plantas es parte del metabolismo normal de cloroplastos, mitocondrias y peroxisomas; sin embargo, la exposición a restricciones ambientales, como las concentraciones de EPT puede abrumar a los sistemas que protegen las plantas y provocar estrés oxidativo; lo que podría causar daños a la membrana celular y la destrucción de biomoléculas y orgánulos celulares debido al aumento en la producción de EROs en plantas bajo este tipo de estrés (Ekmekci, Tanyolac, & Ayhan, 2008) superando la capacidad de desintoxicación de la planta.

Existen moléculas antioxidantes que se encuentran en las plantas, como el ascorbato y glutatión que son clave en los sistemas enzimáticos específicos (peroxidasas) ya que reaccionan rápidamente con el H_2O_2 y sus formas oxidadas generan alta capacidad reductiva que permiten y favorece el ciclo redox. Los antioxidantes no sólo funcionan para mantener las EROs bajas, sino que también pueden participar en la regulación de la señalización dependiente de EROs (Noctor, Reichheld, & Foyer, 2018) para lograr un equilibrio en la planta.

1.8 Movilidad de EPT

Una vez en el suelo, los EPT pueden quedar retenidos en el mismo, pero además pueden ser movilizados en la solución del suelo o subsuelo mediante diferentes mecanismos biológicos y químicos.

La movilidad de los elementos traza en suelos es de suma importancia en cuanto a su disponibilidad y su potencial para lixiviarse de los perfiles del suelo al agua subterránea y a su vez depende si origen es natural o antropogénico (Solano Marín , 2005).

Los factores que influyen en la movilización de metales pesados en el suelo son:

- Características del suelo: pH, potencial redox, composición iónica de la solución del suelo, capacidad de cambio, presencia de carbonatos, materia orgánica, textura, etc.
- Naturaleza de la contaminación: origen de los metales y forma de deposición.
- Condiciones medioambientales: acidificación, cambios en las condiciones redox, variación de temperatura y humedad, etc.

Los mecanismos por los cuales los elementos traza de los suelos contaminados pueden ser movilizados son (Solano Marín , 2005):

- Acidificación: Resultado de la oxidación de sulfuros minerales y precipitados y de fertilizantes de NH^4 , por la fijación biológica de nitrógeno, por precipitación atmosférica ácida (SO_x y NO_x) sobre los suelos, por descomposición de materia orgánica, por agotamiento de bases por lixiviación y por vertidos de contaminantes ácidos.
- Cambios en las condiciones redox: Condiciones oxidantes pueden causar la oxidación y disolución de sulfuros insolubles. A la inversa, condiciones reductoras pueden conducir a la disolución de óxidos y a la liberación de sus elementos traza coprecipitados en la solución.
- Complejación de especies metálicas con ligandos orgánicos: Los ligandos son constituyentes químicos que se combinan con los metales en un complejo químico.
- Cambios en la composición iónica de la solución del suelo: que pueden tener un marcado efecto en la adsorción de elementos traza y su incorporación en complejos inorgánicos solubles e insolubles.
- Metilación: Metales como As, Hg, Sb, Se y Sn pueden ser transformados en metilespecies.

1.9 Extracción química secuencial

Los procedimientos de extracción química secuencial poseen una metodología común basada en la exposición sucesiva de una misma muestra sólida a soluciones extractantes de fuerza creciente y/o de características diferentes (López Julián & Mandado Collado, Extracciones químicas secuenciales de metales pesados. Aplicaciones en ciencias geológicas. , 2002). Aplicadas para evaluar la movilidad de los metales en sedimentos, suelos y materiales residuales.

El reparto de los elementos traza entre las distintas fracciones de un sólido, permite profundizar en el conocimiento tanto de la potencial movilidad de dichos elementos como de su disponibilidad biológica, lo que constituye una clara aplicación de estas metodologías en disciplinas asociadas a las ciencias ambientales.

Existen protocolos de extracción secuencial que difieren en el número de etapas de ataque, en los reactivos empleados o en las condiciones experimentales bajo las cuales se desarrollan. En algunos casos se emplean con una finalidad meramente descriptiva (determinar la especiación en determinados materiales geológicos), pero en otros se utilizan con un objetivo claramente aplicado y complementando a otras metodologías experimentales (López Julián & Mandado Collado, Extracciones químicas secuenciales de metales pesados. Aplicaciones en ciencias geológicas. , 2002).

En el protocolo de Tessier (Tessier, Campbell, & Bisson, 1980) están expuestas su orden secuencial y los tipos de reactivos que se aplican, teniendo:

- a) Fase intercambiable (electrolitos concentrados)
- b) Fracción carbonatada (ácidos débiles)
- c) Fracción de óxidos y oxihidróxidos metálicos (de Fe y Mn, principalmente) (agentes reductores)
- d) Fracción ligada a la materia orgánica (agentes oxidantes)
- e) Fracción residual (ácidos fuertes)

CAPITULO II

METODOLOGÍA

2.1 Preparación de Inóculo Bacteriano

Las cepas seleccionadas aisladas de la rizósfera de las plantas y previamente caracterizadas como bacterias promotoras de crecimiento vegetal (BPCV), correspondientes a *Serratia K120* y *Serratia MC119* se crecieron masivamente en Caldo Luria Bertani (LB); mientras que *Pantoea 113*, *Pantoea 134* y *Pantoea 135* crecieron masivamente en caldo Rojo Congo, las cuales se tuvieron en incubación a 30°C durante 48 horas. Posteriormente, las cepas bacterianas se separaron por centrifugación a 8000 rpm durante 20 minutos para continuar realizando un ajuste con buffer de fosfatos 0.1 M (pH 7.4) a 0.5Å equivalente a 1×10^9 UFC/mL (Mendoza Hernández, Vázquez Delgado, & Castillo Morales, 2019).

2.2 Preparación de semillas

Se recolectaron frutos frescos de la planta de higuera (*Ricinus communis*), los cuales se secaron al sol durante 3 días y posteriormente a las semillas obtenidas se les realizó un lavado con agua destilada para ser usadas.



Imagen 3. Frutos frescos de higuera (*Ricinus communis*)

2.3 Diseño experimental

Se realizó un ensayo experimental por lotes (con 3 repeticiones) para evaluar el efecto de la inoculación bacteriana. Se tuvieron 5 tratamientos correspondientes al número de cepas y un tratamiento testigo; los tratamientos consistieron en una mezcla de residuos mineros y sustrato, y sólo sustrato comercial; con el testigo se evaluó las condiciones sin inóculo bacteriano.

En la tabla 2 se puede observar el diseño de los tratamientos.

Tabla 2. Diseño experimental

Cepa	Especie	Tratamientos		Replicas
		Sustrato	Jal	
Control	-	1	1	3
MC119	<i>Serratia</i>	2	2	3
K120	<i>Serratia</i>	3	3	3
113	<i>Pantoea</i>	4	4	3
134	<i>Pantoea</i>	5	5	3
135	<i>Pantoea</i>	6	6	3

2.4 Preparación de macetas

Se utilizaron bolsas de invernadero como maceteros. El primer lote de tratamientos fue una mezcla de jal de minas y 20% de sustrato comercial Miracle Grow® y el segundo lote de tratamientos sólo de sustrato comercial Miracle Grow®, la hidratación de cada unidad experimental fue con 100 mL de agua.



Imagen 4. Preparación de maceteros

2.5 Ensayos en macetas

Se sembraron 4 semillas de higuera (*Ricinus communis*) por unidad experimental a una profundidad de 5 cm aproximadamente; posterior a ello se inoculó con 25 mL de suspensión bacteriana a los tratamientos con jales mineros y 10 mL de suspensión bacteriana a los tratamientos con sustrato comercial.

Durante el experimento se monitorearon las variables de tiempo de germinación, número de brotes y altura total de la planta.



Imagen 5. Monitoreo de variables de altura

Para después de 2.5 meses medir la actividad enzimática de peróxido de hidrógeno, peroxidasa y glutatión reductasa presentes y el tamaño de las raíces de las plantas.

2.6 Determinación de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y peroxidasa

El contenido de peróxido de hidrógeno se determinó de acuerdo con (Nxele, Klein, & Ndimba, 2017) con algunas modificaciones, utilizando 250 mg de peso fresco de *Ricinus communis* macerados y homogeneizados con 5 mL de Ácido tricloroacético 0.1% (TCA); posteriormente se centrifugó a 8000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se tomó una alícuota de 0.5 mL de sobrenadante y se le adicionó 0.5 mL buffer de fosfato de potasio 0.1 M pH 7 y 1 mL de KI 1 M. La suspensión se

usó para determinar peróxido de hidrógeno y peroxidasa con el Kit de Ensayo (colorimétrico) OxiSelect™ Hydrogen Peroxide/Peroxidase, mediante espectrofotometría de absorción molecular UV-Visible.

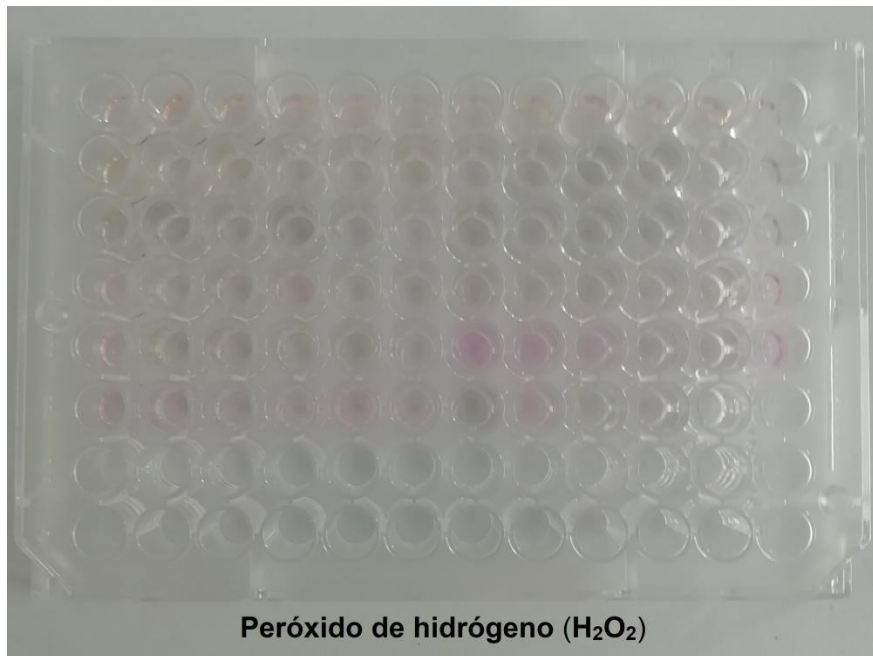


Imagen 6. Extracción enzimática del H₂O₂

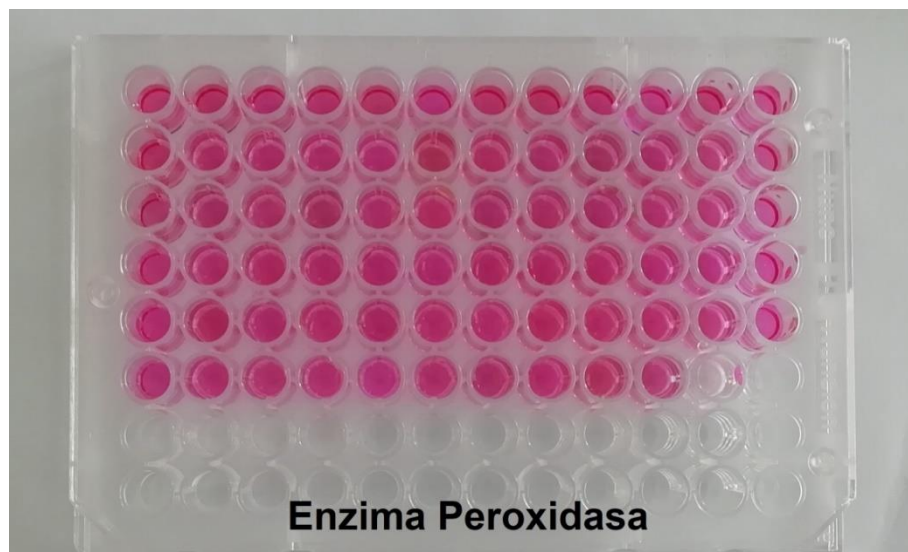


Imagen 7. Extracción enzimática de Peroxidasa

2.7 Determinación de Glutación Reductasa

Se determinó glutatión reductasa de acuerdo con Esfandiari & Shekari, 2007 con algunas modificaciones, homogeneizando 250 mg de hojas frescas de *Ricinus communis* en buffer de fosfato de potasio 0.1 M a pH 7.5 que contiene EDTA 0.5 mM, se procedió a centrifugar a 8000 rpm a 4°C durante 15 minutos. El sobrenadante se usó para determinar glutatión reductasa mediante el Kit de Ensayo OxiSelect™ Glutathione Reductase por espectrofotometría de absorción molecular UV-Visible.

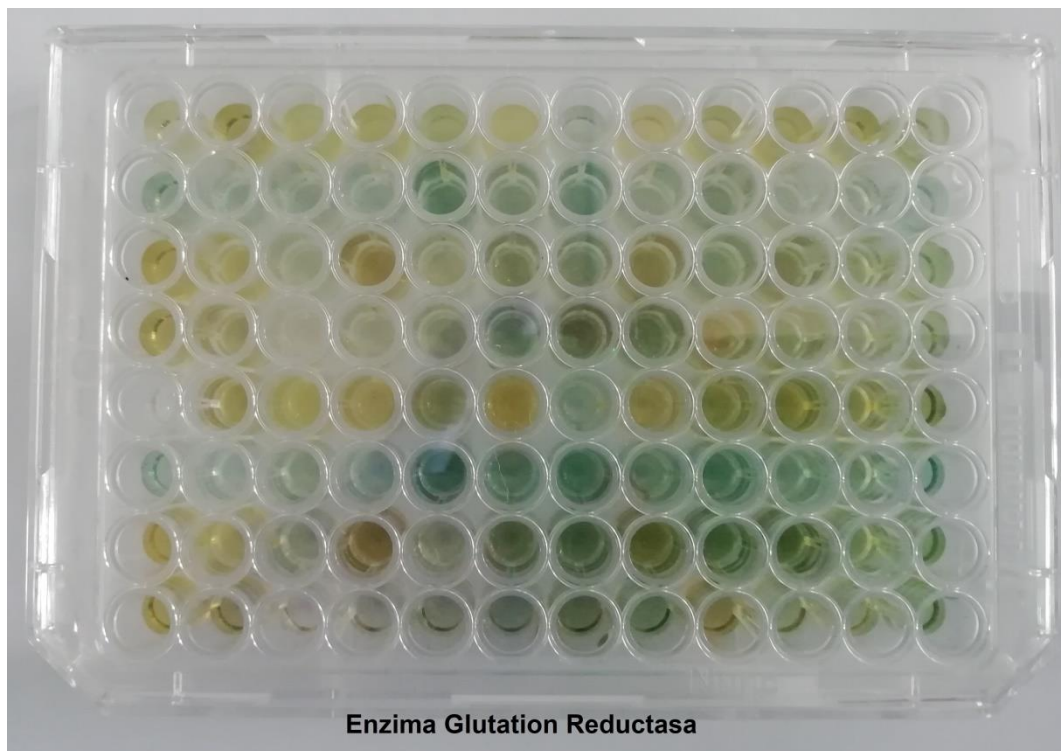


Imagen 8. Extracción enzimática de Glutation Reductasa

2.8 Extracción secuencial de EPT

El análisis de la presencia de elementos potencialmente tóxicos se realizó mediante la metodología de extracción secuencial (López Julián & Mandado Collado, EXTRACCIONES QUIMICAS SECUENCIALES DE METALES PESADOS. Aplicaciones en ciencias geológicas, 2002), que consiste en determinar la presencia de los elementos potencialmente tóxicos en las diferentes

formas químicas en las que pueden existir. Las fracciones que se obtuvieron fueron: soluble (Favas, Pratas, Gomes, & Cala, 2011), intercambiable, enlazada a carbonatos, enlazada a oxihidróxidos de Fe, enlazada a óxidos de Fe, enlazada a materia orgánica (Tessier, Campbell, & Bisson, 1979), enlazada a sulfuros y fracción residual (US-EPA, 1996).

Para esto, se colocaron 2 g de muestra de jal utilizados en los diferentes tratamientos bacterianos en tubos de polipropileno en los cuales se realizó el ensayo.

1. *Fracción soluble*: se agregó 16 mL agua destilada, se agitó durante 30 min y posteriormente se centrifugó a 8000 rpm durante 20 minutos (Favas P., et al., 2011).
2. *Fracción intercambiable*: se agregó 16 mL de $MgCl_2$ 1 M y se agitó durante 1 h, posteriormente se centrifugó a 8000 rpm durante 20 minutos.
3. *Fracción unida a Carbonatos*: se agregó 16 mL de $C_2H_3NaO_2$ 1 M y se agitó durante 10 h, el sobrenadante se separó como el paso anterior.
4. *Fracción unida a Fe (III)-Oxihidróxidos*: se agregó 80 mL de 0.2 M de oxalato de amonio y se agitó 1h en la oscuridad, separando el sobrenadante por centrifugación.
5. *Fracción unida a Fe (III)-óxidos*: se colocaron 40 mL 0.04 M $NH_2OH-HCl_2$ agitándose durante 6 h a 96 °C, y posteriormente se centrifugó durante 30 min.
6. *Fracción unida a materia orgánica*: se agregaron 6 mL 0.02 M HNO_3 más 10 mL H_2O_2 y se agitó durante 2 h a 85°C, posteriormente se le agregaron 6 mL H_2O_2 y se agitó durante 3hr a 85°C, después de lo anterior se le agregó 10 mL 3.2 M NH_4OOCH_3 y se agitó durante 30 min, después se separó el sobrenadante (Tessier A., et al., 1979; Dold B., y Fontboté L., 2001).
7. *Fracción unida a sulfuros*: Se agregó 1.5 g de $KClO_3$, más 10 mL de HCl 12 M, se tapó y agitó en vortex por 30 min, se agregó 20 mL de HNO_3 4M, se

tapó y agitó en vortex durante 20 min a 90°C, se separó el sobrenadante (Hall G., et al., 1996; Favas P., et al., 2011).

8. Finalmente, para *la fracción residual*: se agregó 10 mL HNO₃, después 4 mL HCl y 1 mL H₂O₂, se colocó en microondas a 180°C por 15 min, al término se filtró y diluyó la muestra a 50 mL con agua destilada (US-EPA, 1996).



Imagen 9. Extracción química secuencial

2.9 Extracción total de EPT

El análisis de extracción total de EPT se realizó mediante una digestión ácida con el objetivo de reducir interferencias debido a la presencia mínima de materia orgánica y tener a los metales en una forma en la que se pudieran analizar. Para ello se colocaron 2 g de cada muestra (mezcla de sustrato y jal) en matraces Erlenmeyer adicionando 2 mL de peróxido de hidrogeno (H₂O₂), 5 mL de ácido clorhídrico (HCl) y 10 mL de ácido nítrico (HNO₃) dejando reposar entre cada adición para evitar reacciones exotérmicas fuertes.



Imagen 10. Digestión ácida para la extracción total

Después se procedió a calentar la muestra por 2 h a temperatura de ebullición evitando una evaporación total de la mezcla. Se aforó la muestra restante a 50 mL con agua destilada para posteriormente realizar la lectura mediante espectrofotometría de absorción atómica.

Para la lectura de los EPT se prepararon las curvas de calibración de cada metal y se determinó así la concentración de los EPT por espectrofotometría de absorción atómica en un equipo de la marca PerkinElmer (modelo AAnalyst 400).

2.11 Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico de varianza para detectar las diferencias significativas entre las variables de altura, las concentraciones de las enzimas medidas, así como las concentraciones de los EPT presentes entre los tratamientos mediante una prueba de Tukey con un nivel de significación del 95% ($p=0.05$).

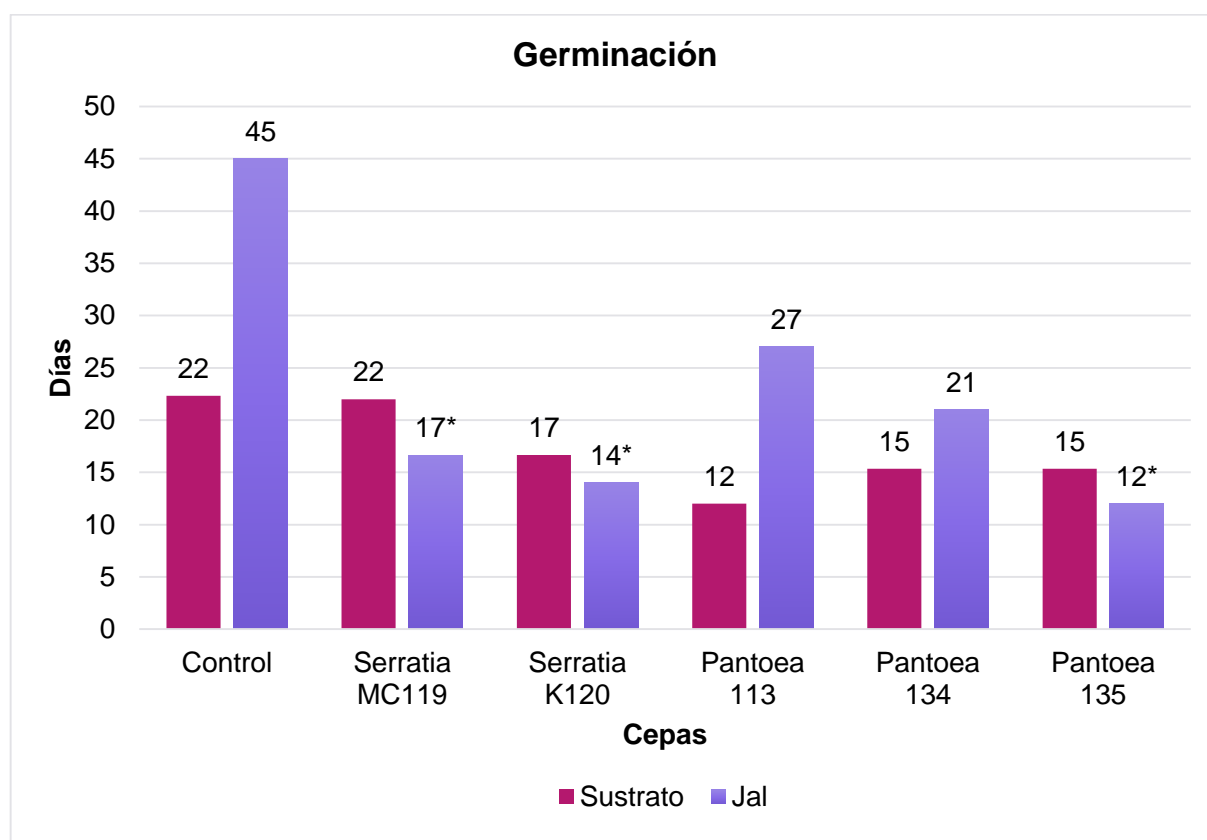
CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1 Resultados

3.1.1 Tiempo de germinación de las semillas

El sembrado de higuierilla (*Ricinus communis*) se llevó a cabo en la segunda semana del mes de agosto de 2019, presentando los primeros brotes a los 12 días de su inoculación con las diferentes cepas bacterianas.



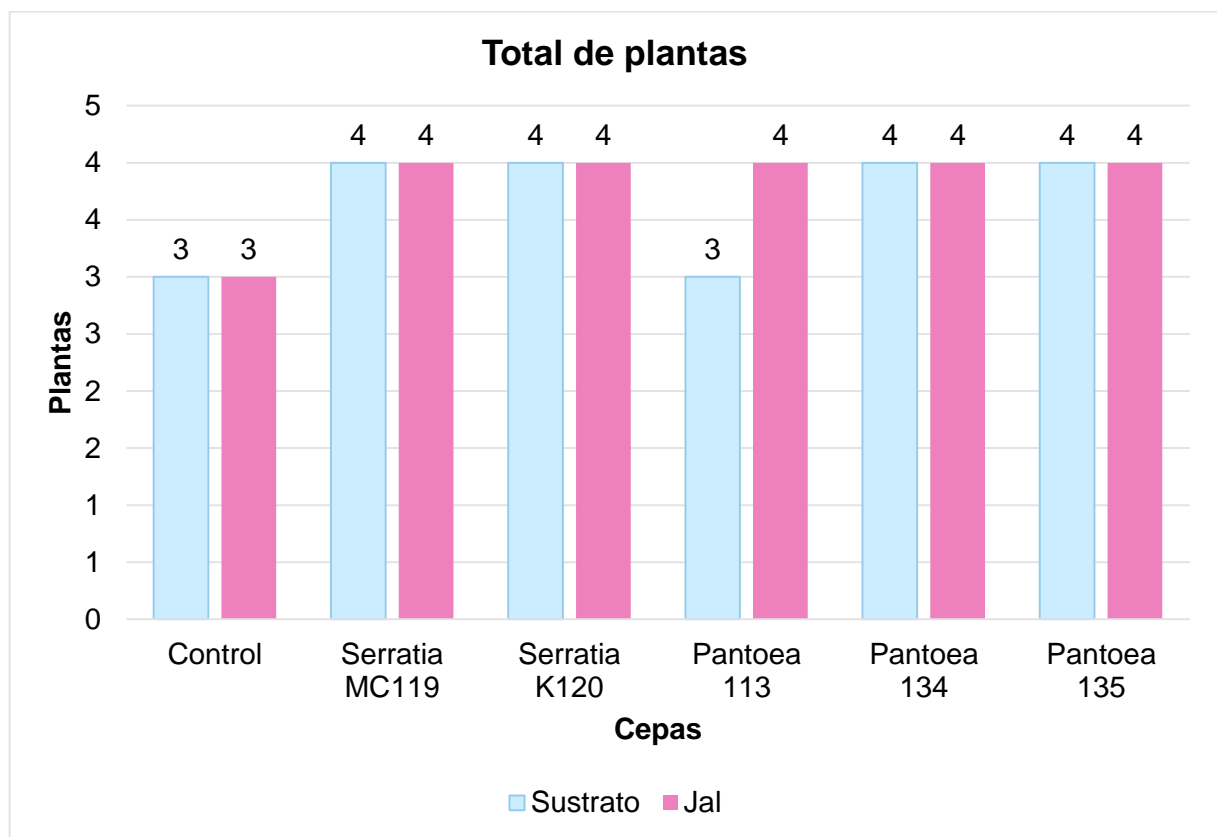
Gráfica 1. Días promedio de germinación de semillas

Existe una diferencia en la disminución de los días promedio de germinación en los tratamientos con sustrato comercial Miracle Grow®, donde la cepa *Pantoea* 113 tuvo un promedio de 12 días de germinación respecto al control con 22 días; sin ser una diferencia significativa, como se observa en la *gráfica 1*.

Para los tratamientos con jal de minas disminuye de manera significativa ($p < 0.05$) el tiempo de germinación de las plantas inoculadas con las bacterias *Pantoea 135* siendo de 12 días, *Serratia K120* 14 días y *Serratia MC119* con 17 días respecto al control que tuvo un promedio de 45 días de germinación, como se observa en la *gráfica 1*.

3.1.2 Promedio de plantas totales

Como se mencionó, el inicio de los brotes se dio a los 12 días posteriores a la inoculación bacteriana, por lo que se obtuvo un promedio del número de plantas existentes en cada tratamiento.



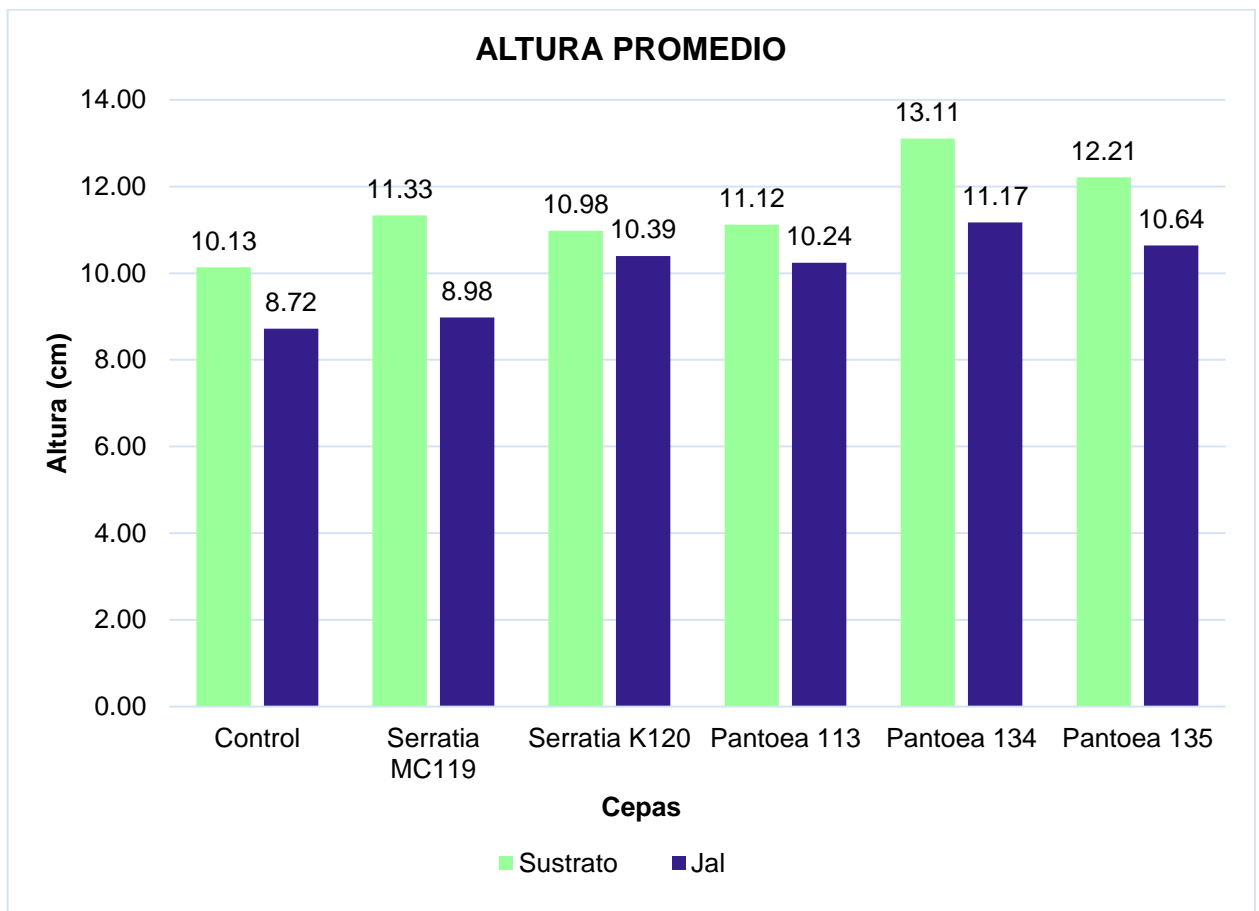
Gráfica 2. Número promedio de plantas

Como se observa (*Gráfica 2*) el número total de plantas que crecieron no presenta un aumento significativo con la inoculación de las bacterias, sin embargo, fue

mayor la cantidad de plantas que crecieron en comparación con el control; para los tratamientos con sustrato y jal.

3.1.3 Altura promedio de las plantas

Posterior al brote de las semillas, el crecimiento de las plantas en los tratamientos con presencia de inóculo bacteriano mostró tallos gruesos y fuertes, así como hojas grandes y verdes; respecto a los controles.



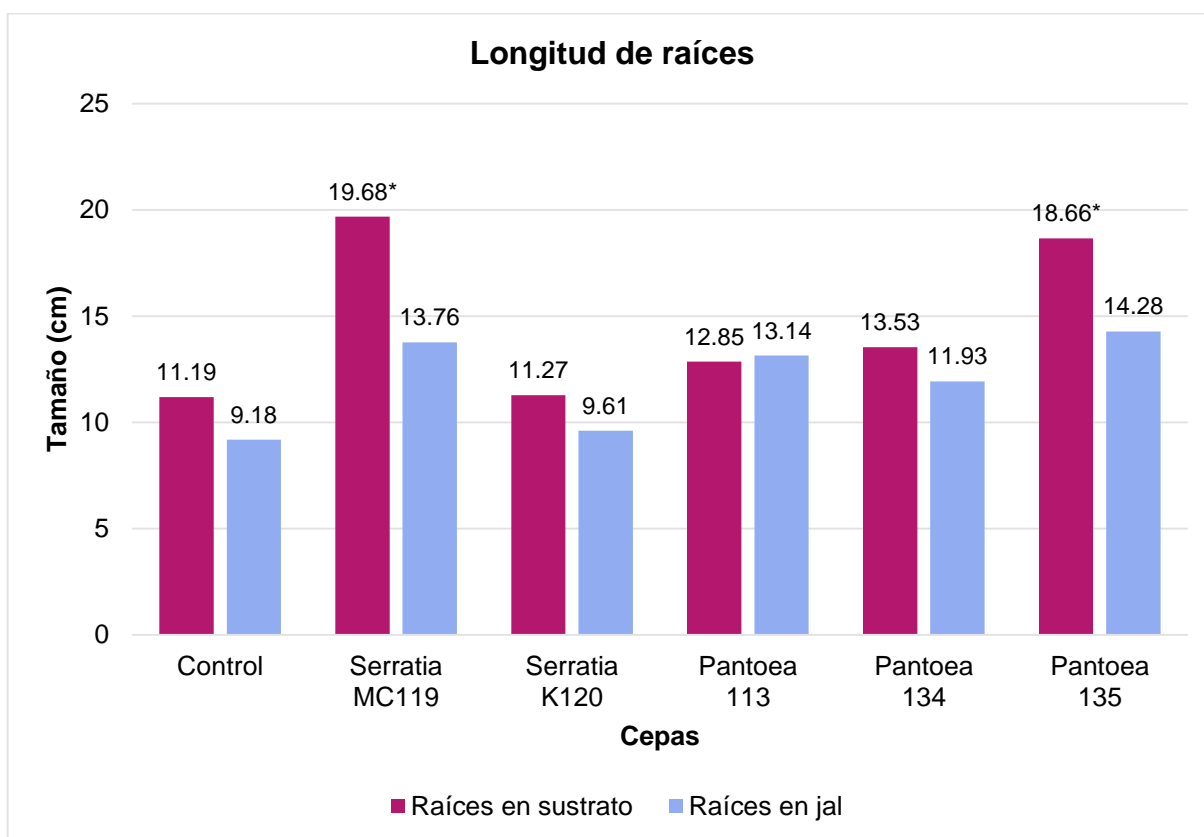
Gráfica 3. Altura de las plantas

La altura promedio de las plantas presentó diferencias sin ser significativa como se observa en la Gráfica 3, el tratamiento de sustrato inoculado con la cepa *Pantoea 134* tuvo una altura de 13.11 cm con respecto al control con una altura de 10.13 cm.

En los tratamientos con jal, la cepa *Pantoea 134* con 11.17 cm presentó mayor altura con respecto al control con 8.72 cm. Aunque la altura de las plantas en el lote de sustrato comercial fue mayor, puede observarse que la diferencia se presenta en un bajo rango respecto a los tratamientos con jal, lo que podría significar que las bacterias a pesar de encontrarse en un medio desfavorable están cumpliendo su función de ayudar al crecimiento de las plantas y al mismo tiempo manteniendo y/o aumentando su rendimiento en esas condiciones.

3.1.4 Longitud promedio de raíces

La longitud de las raíces se midió después de 2.5 meses, para lo que se utilizó el programa Image Tool v. 3.



Gráfica 4. Longitud de raíces

Se puede observar (Gráfica 4) que en los tratamientos de sustrato existe diferencia significativa ($p < 0.05$) en la longitud de las raíces del control con 11.19

cm, respecto de los tratamientos inoculados con las cepas *Serratia MC119* con 19.68 cm y *Pantoea 135* con 18.66 cm.

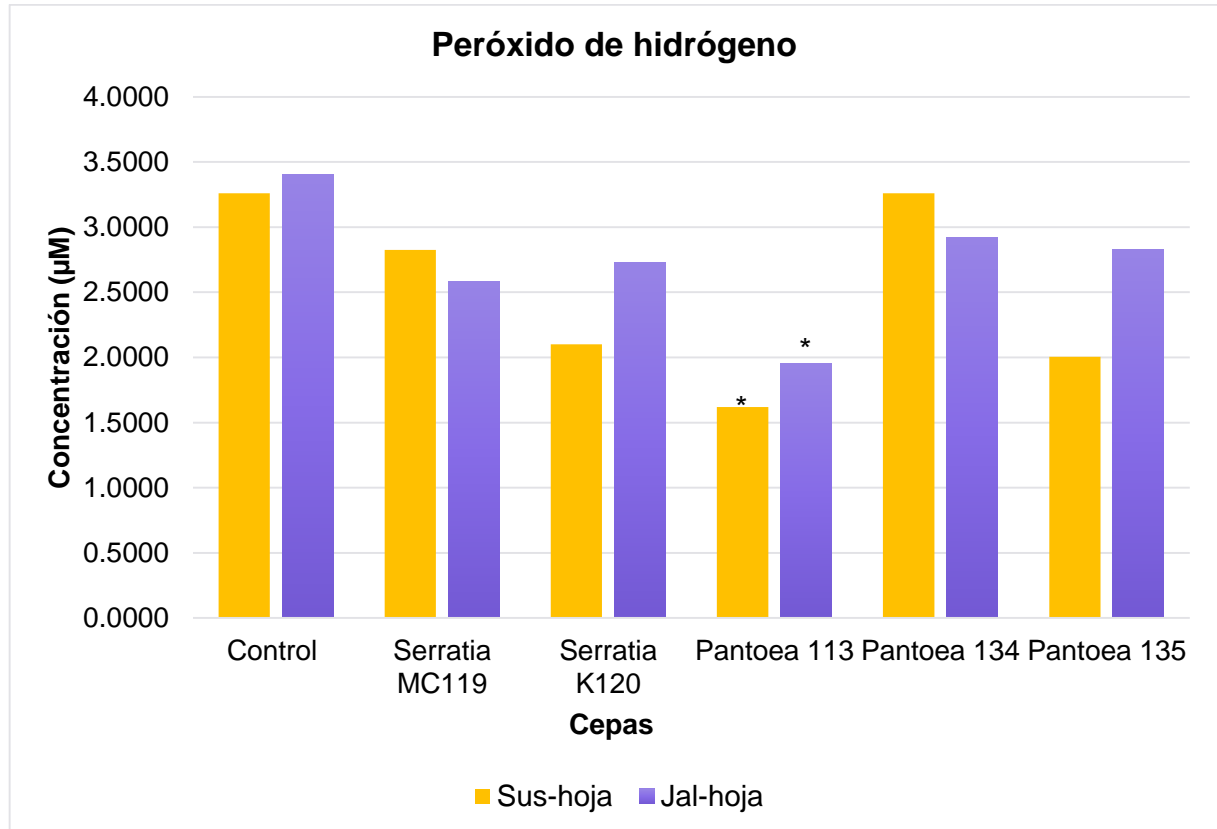
Por otra parte, en los tratamientos con jal existe una diferencia de la longitud de las raíces del control (9.18 cm) y las cepas *Pantoea 113* (13.14 cm), *Serratia MC119* (13.76 cm) y *Pantoea 135* (14.28 cm), sin ser una diferencia significativa.

En los tratamientos con sustrato se notó el crecimiento lateral de las raíces; y mayormente abundante, en las unidades con cepas bacterianas; al presentarse un crecimiento exponencial existió una limitante entre raíces al ser abundantes y un espacio mayor para su crecimiento que no estaba contemplado. Por otro lado, en los tratamientos con jal se presentaron condiciones desfavorables para las plantas por el endurecimiento del jal debido a la acción de contracción-expansión de las partículas, lo que no permitió que las raíces fueran más profundas y a su vez limitó su crecimiento.

3.1.5 Determinación de peróxido de hidrógeno (H₂O₂)

La concentración de peróxido de hidrógeno se determinó mediante extracción enzimática tanto en la parte aérea de las plantas como en sus raíces.

3.1.5.1 Determinación de H₂O₂ en parte aérea



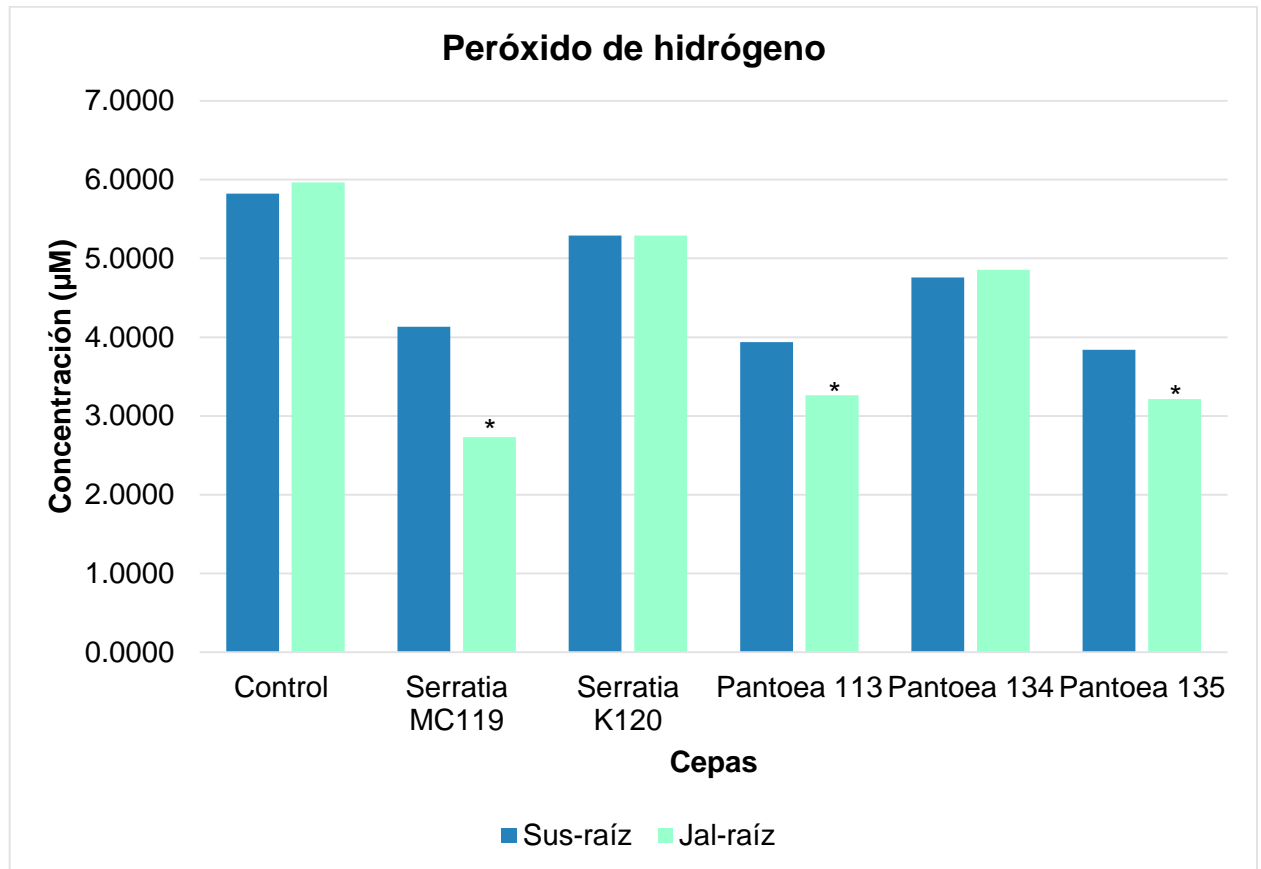
Gráfica 5. Determinación de H₂O₂ en parte aérea de las plantas

Existe una diferencia significativa ($p < 0.05$) en la disminución del H₂O₂ en la parte aérea de las plantas de los tratamientos de sustrato inoculados con bacterias; siendo así que *Pantoea 113* presentó la mayor disminución de H₂O₂ respecto al control, como se observa en la gráfica 5.

En los tratamientos de jal inoculado con bacterias se presentó la disminución del H₂O₂, con una diferencia significativa ($p < 0.05$) en la cepa *Pantoea 113* respecto al control, como se muestra en la gráfica 5. Con lo que podemos inferir que *Pantoea*

113 fue la cepa que presentó mejores resultados en la disminución del H_2O_2 en ambos tratamientos.

3.1.5.2 Determinación de H_2O_2 en raíz



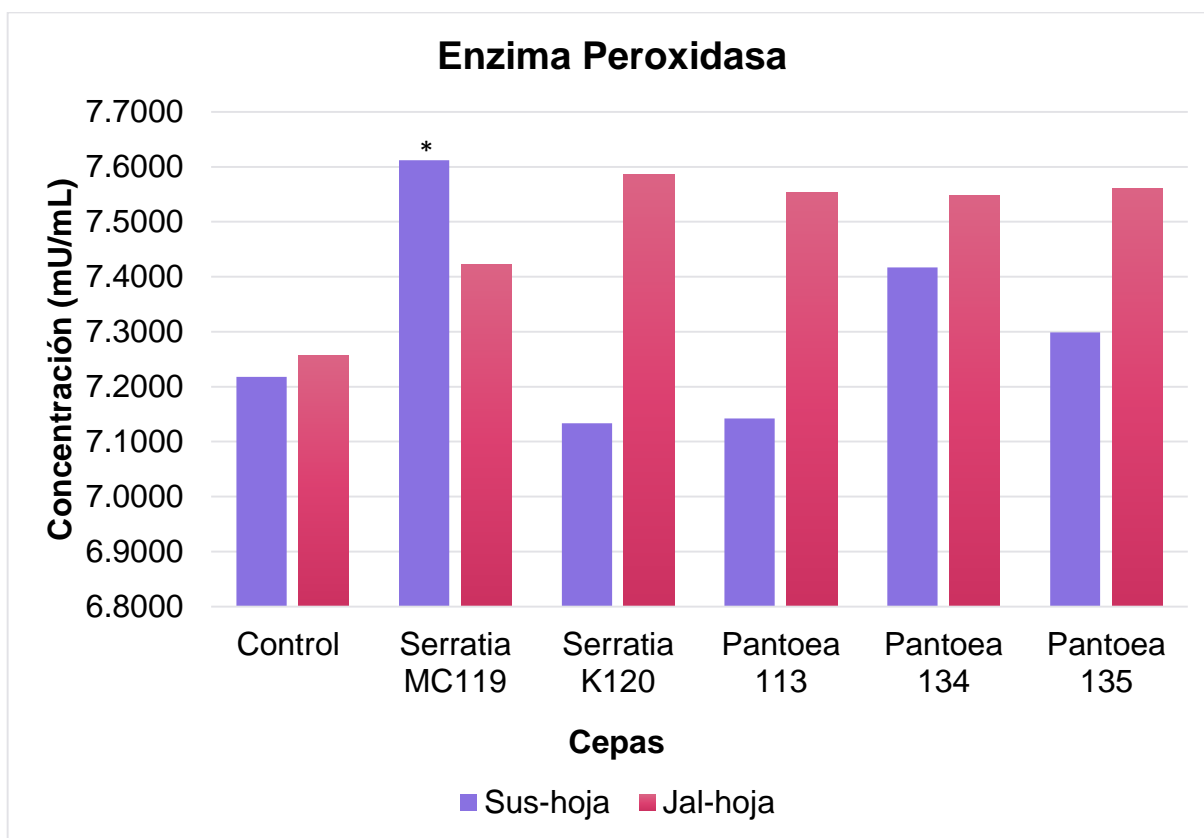
Gráfica 6. Determinación de H_2O_2 en raíz

Examinando las raíces del lote con sustrato comercial, existe una disminución del peróxido de hidrógeno en los tratamientos inoculados con *Pantoea 135* seguido de *Pantoea 113* ambas cepas respecto al control, aunque no es una diferencia significativa (ver gráfica 6).

Las raíces del lote tratado con jal presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en la disminución de la concentración del peróxido de hidrógeno, en los tratamientos inoculados con la cepa *Serratia MC119*, *Pantoea 113* y *Pantoea 135* respecto al control, como se observa en la gráfica 6.

3.1.6 Determinación de enzima Peroxidasa

3.1.6.1 Determinación de enzima Peroxidasa en parte aérea

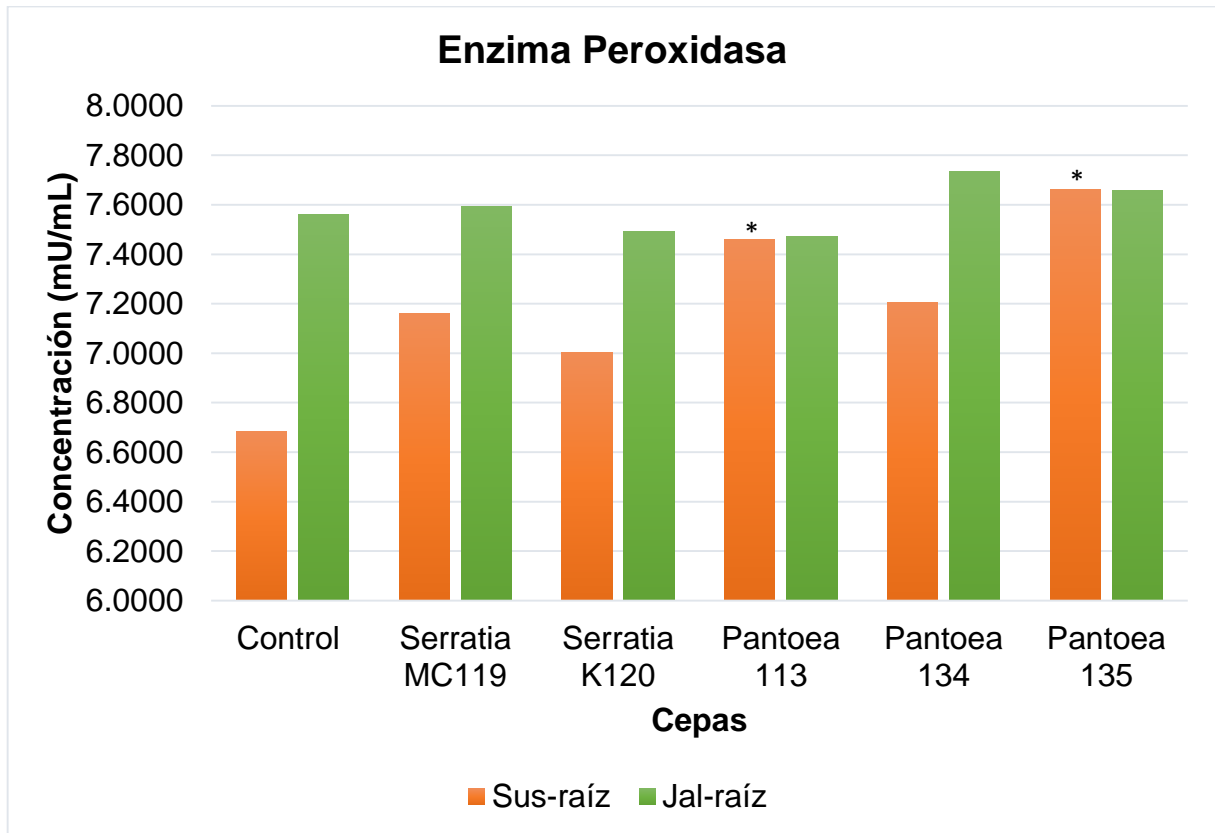


Gráfica 7. Determinación de enzima Peroxidasa en parte aérea

La producción de la enzima Peroxidasa en la parte aérea de las plantas en los tratamientos de sustrato inoculados con bacterias presentó mayoritariamente un incremento, existiendo una diferencia significativa ($p < 0.05$), de forma que *Serratia MC119* presentó el mayor aumento de la enzima respecto al control, como se puede ver en la *gráfica 7*.

Los tratamientos de jal inoculado con bacterias presentaron un aumento de la producción de la enzima Peroxidasa, donde la cepa *Serratia K120* fue la que presentó mayor incremento respecto al control, sin embargo, sin significancia estadística aparente.

3.1.6.2 Determinación de enzima Peroxidasa en raíz



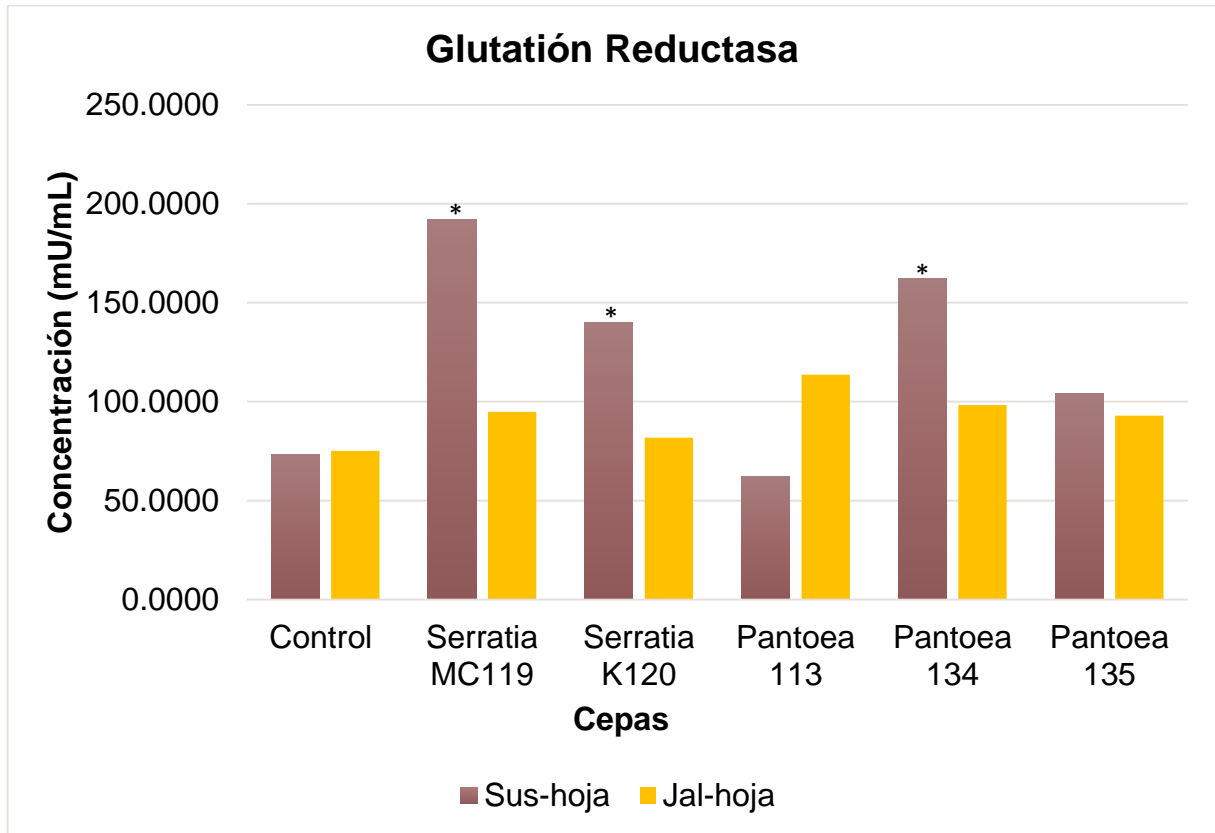
Gráfica 8. Determinación de enzima Peroxidasa en raíz

En la parte de raíces del lote con sustrato comercial existe un aumento de la producción de la enzima Peroxidasa; en los tratamientos inoculados con *Pantoea 135* seguido de *Pantoea 113*, ambas cepas respecto al control, presentándose con una diferencia significativa ($p < 0.05$) (ver gráfica 8).

Por su parte, las raíces del lote tratado con jal presentaron diferencia en el aumento de la producción de enzima Peroxidasa notoria, pero sin significancia en los tratamientos inoculados con la cepa *Pantoea 135* respecto a la concentración del control, como se observa en la gráfica 8.

3.1.7 Determinación de enzima Glutación Reductasa

3.1.7.1 Determinación de enzima Glutación Reductasa en parte aérea

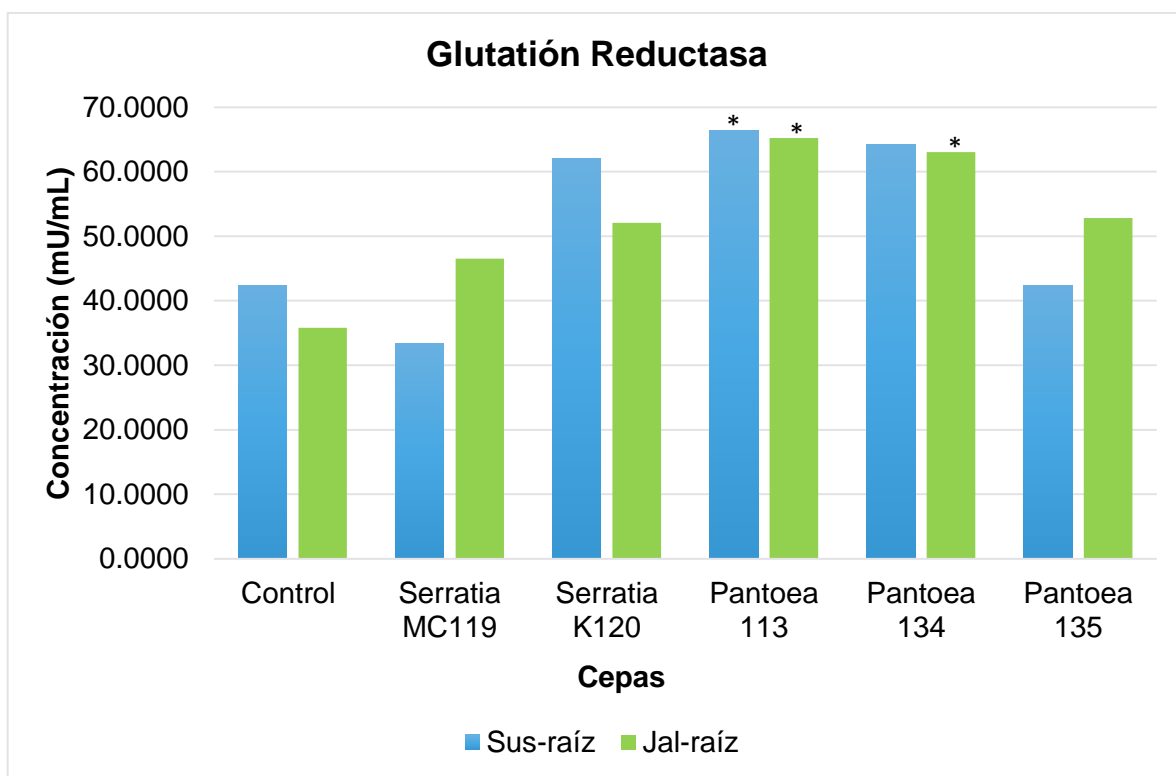


Gráfica 9. Determinación de la enzima Glutación Reductasa en parte aérea

La parte aérea de las plantas presentó diferencia significativa ($p < 0.05$) en el aumento de la producción de la enzima Glutación Reductasa de los tratamientos de sustrato inoculados con bacterias; las cepas *Serratia MC119*, *Serratia K120* y *Pantoea 134* fueron las que presentaron el mayor aumento de la enzima respecto al control (ver gráfica 9).

En la parte aérea de los tratamientos de jal inoculado con bacterias, se presentó el aumento de la producción de la enzima Peroxidasa en todas las cepas, sin diferencia significativa, siendo la cepa *Pantoea 113* la que presentó mayor concentración respecto al control. Como se muestra en la gráfica 9.

3.1.7.2 Determinación de enzima Glutación Reductasa en raíz



Gráfica 10. Determinación de enzima Glutación Reductasa en raíz

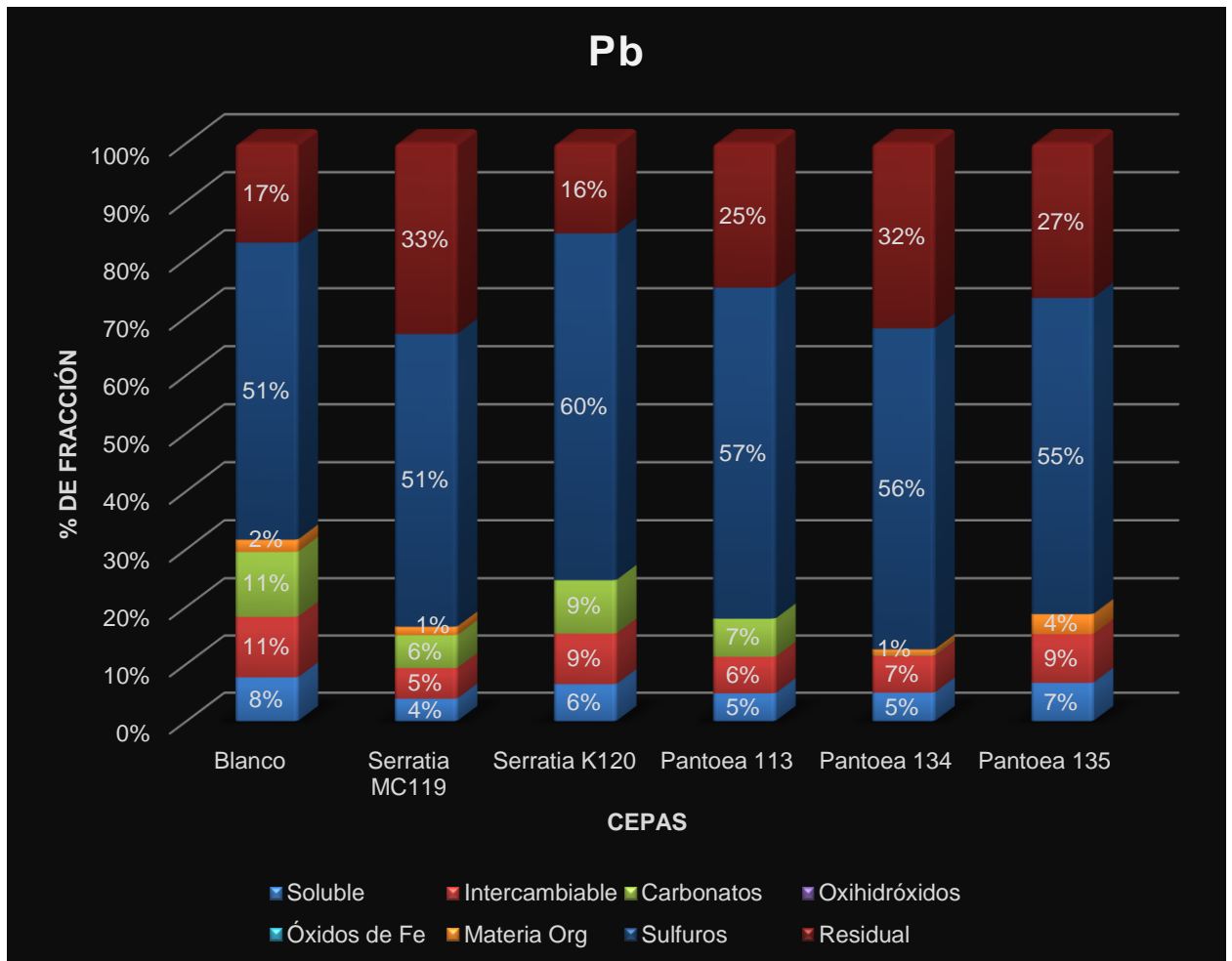
En la parte de raíces del lote con sustrato comercial existe un aumento significativo ($p < 0.05$) de la producción de la enzima Glutación Reductasa, en los tratamientos inoculados con bacterias de *Pantoea 113* con respecto al control, representado en la gráfica 10.

En los tratamientos con jal se presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en el aumento de la producción de la enzima Glutación Reductasa, con las cepas *Pantoea 113* y *Pantoea 134* respecto al control, mientras que las otras cepas tuvieron aumento sin diferencia significativa (ver gráfica 10).

3.1.8 Extracción secuencial

En los procesos de fitorremediación algo importante, es saber el comportamiento de los EPT en las diferentes fracciones del suelo, donde las fracciones disponibles para la planta son: la fracción soluble, intercambiable y carbonatos y las no disponibles corresponden a las fracciones de sulfuros y residual.

3.1.8.1 Plomo (Pb)

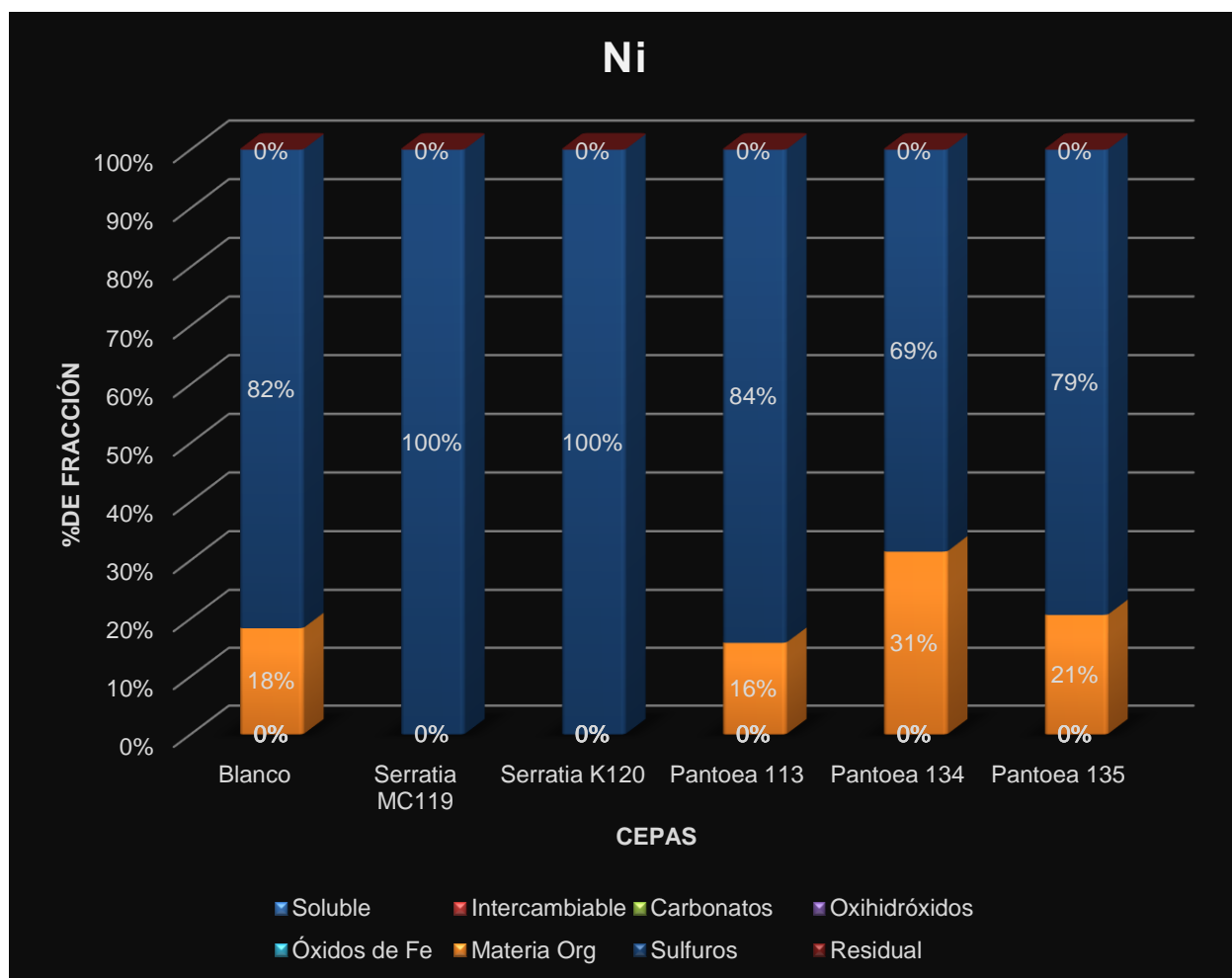


Gráfica 11. Movilidad de plomo

Con respecto al Pb se logró observar que las bacterias contribuyen a la movilización de este EPT, de las fracciones disponibles a las fracciones no disponibles. Las cepas bacterianas lograron una disminución de la fracción biodisponible presente en el control de un 30% a un 15% en *Serratia MC119*, 24%

Serratia K120, 18% *Pantoea 113*, 13% *Pantoea 134* y 20% *Pantoea 135*; correlacionado con lo anterior existe un aumento del EPT a la fracción unida a sulfatos donde aumentó un 9% en la cepa *Serratia K120*, 6% en *Pantoea 113*, 5% *Pantoea 134* y 4% en *Pantoea 135* respecto al control. Para la fracción residual se presentó un aumento del 16% en *Serratia MC119*, 1% en *Serratia K120*, 8% *Pantoea 113*, 15% en *Pantoea 134* y 10% *Pantoea 135* respecto al control.

3.1.8.2 Níquel (Ni)



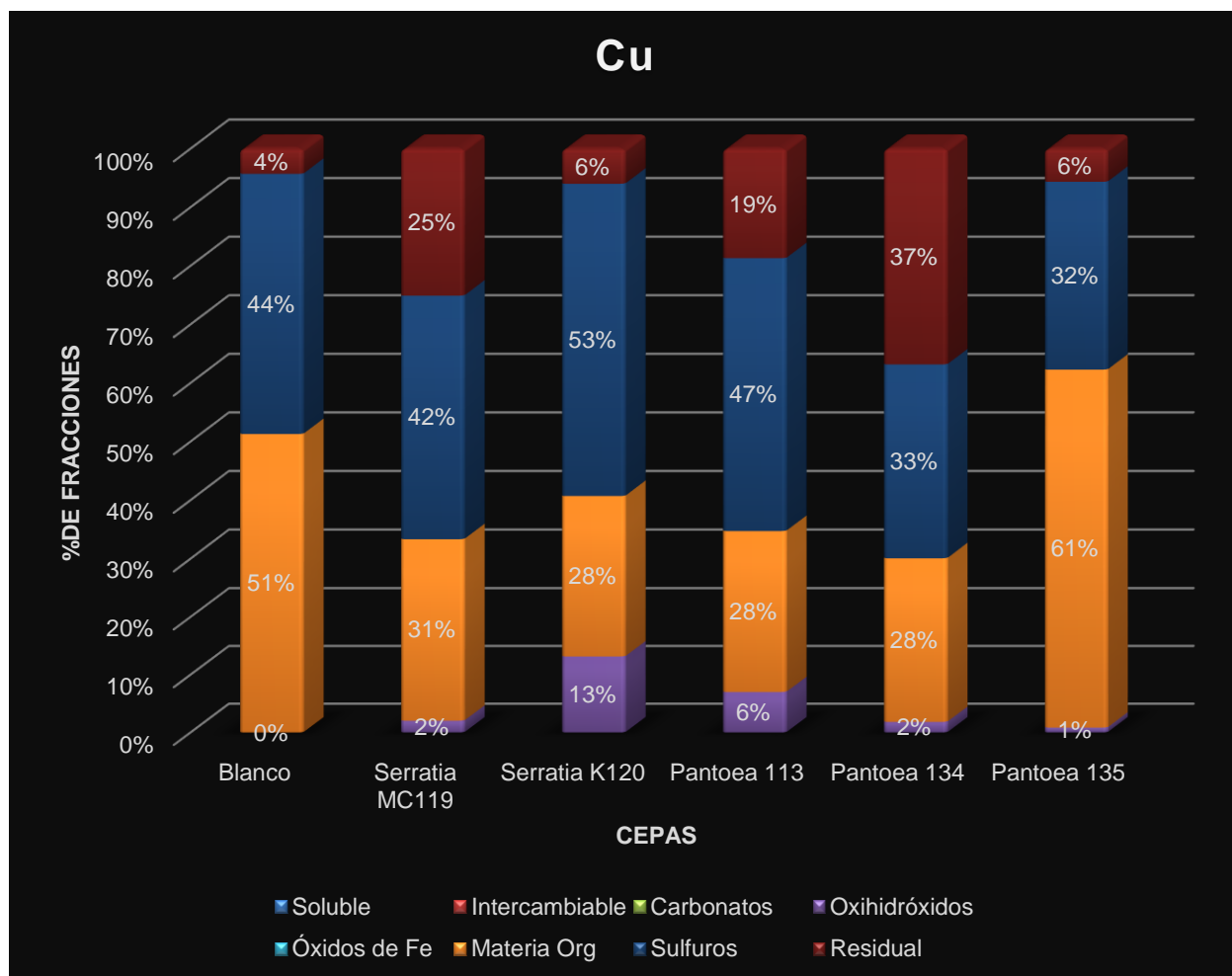
Gráfica 12. Movilidad de níquel

El níquel no se ve presente en fracciones biodisponibles. Existe un aumento de la fracción unida a materia orgánica en las cepas *Pantoea 134* con el 13% y *Pantoea 135* con 3% respecto al control que presenta un 18% de la fracción; el aumento se

puede atribuir a la formación de soluciones complejas del níquel con la materia orgánica, sin presentar niveles de biodisponibilidad en esa fracción.

Se observa también, en la *gráfica 12*, que existe la movilidad del EPT de la fracción unida a materia orgánica hacia la fracción de sulfuros, en los tratamientos inoculados con las cepas, aumentando un 100% en *Serratia MC119*, 100% *Serratia K120* y 84% en *Pantoea 113* respecto al 82% presente en el control.

3.1.8.3 Cobre (Cu)



Gráfica 13. Movilidad del cobre

En el Cu se logró observar que las bacterias contribuyen a la movilización de este EPT, de la fracción unida a materia orgánica a las fracciones de oxihidróxidos, sulfuros y residual.

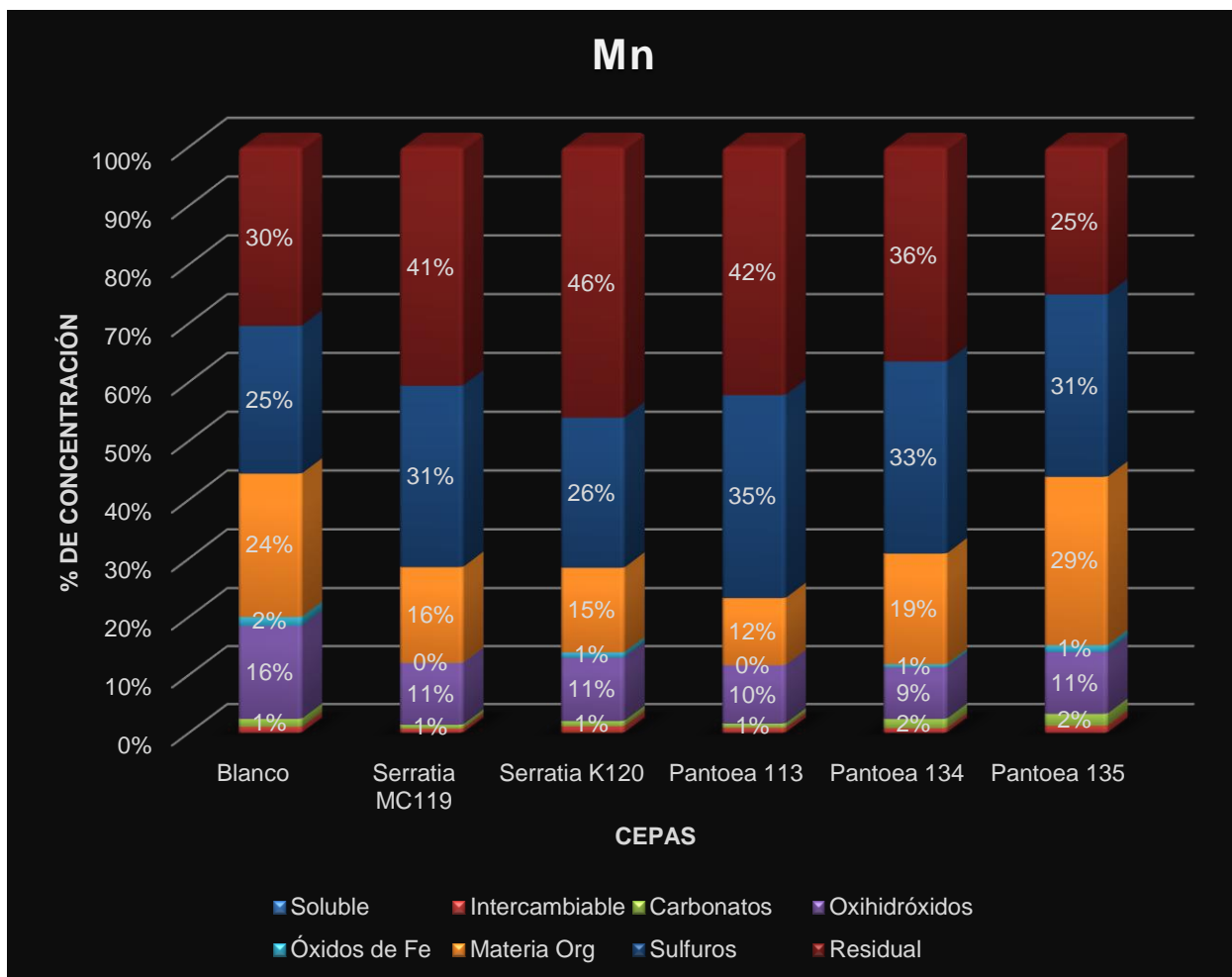
Las cepas bacterianas lograron una disminución de la fracción unida a materia orgánica presente en el control que va del 51% a 31% en *Serratia MC119*, 28% *Serratia K120*, 28% *Pantoea 113* y 28% *Pantoea 134*; correlacionado con lo anterior existe un aumento del EPT a la fracción unida a oxihidróxidos donde aumentó un 2% en la cepa *Serratia MC119*, 13% *Serratia K120*, 6% en *Pantoea 113*, 2% *Pantoea 134* y 1% en *Pantoea 135* respecto al control.

También se vio la movilidad del EPT en el aumento de la fracción unida a sulfuros; que va del control con un 44% a *Serratia K120* con 53% y *Pantoea 113* con 47%. Y a la fracción residual con el aumento del 25% en *Serratia MC119*, 6% en *Serratia K120*, 19% *Pantoea 113*, 37% en *Pantoea 134* y 6% *Pantoea 135* respecto al 4% del control. Con lo que existió movilidad del EPT a otras fracciones no disponibles y así se anula el riesgo de biodisponibilidad.

3.1.8.4 Manganeso (Mn)

Finalmente, con respecto al Mg se logró observar que existe nulo porcentaje de fracciones disponibles en los tratamientos que va del 1 al 2% y que las bacterias contribuyen a la movilidad de este EPT, de las fracciones unidas a oxihidróxidos y materia orgánica a las fracciones unidas a sulfuros y residual, como se observa en la *gráfica 14*.

La disminución que presente la fracción unida a oxihidróxidos va del control con un 16% a 11% en *Serratia MC119*, 11% *Serratia K120*, 10% *Pantoea 113*, 9% *Pantoea 134* y 11% *Pantoea 135*. Por otro lado, la fracción unida a la materia orgánica disminuye del control con 24% a 16% en la cepa *Serratia MC119*, 15% *Serratia K120*, 12% *Pantoea 113* y 19% *Pantoea 134*.



Gráfica 14. Movilidad del Manganeso

A su vez se ve reflejado el aumento en la fracción residual en 31% para *Serratia MC119*, 26% *Serratia K120*, 35% *Pantoea 113*, 33% en *Pantoea 134* y 31% *Pantoea 135* respecto al control que presenta un 25%. De la misma forma el aumento en la fracción residual va del 30% presente en el control a 41% para *Serratia MC119*, 46% *Serratia K120*, 42% *Pantoea 113* y 36% en *Pantoea 134*. Concluyendo que la movilidad de Mn aumenta a fracciones no disponibles en presencia de las bacterias.

3.2 Discusión de resultados

La problemática ambiental de los jales de minas implica que se implementen tecnologías amigables con el medio ambiente como la fitorremediación. Estos procesos de fitorremediación asistidos por bacterias pueden favorecer a un mejor funcionamiento debido a la disminución del estrés en las plantas.

En este estudio la inoculación con BPCV, de los géneros *Serratia MC119*, *Serratia K120*, *Pantoea 113*, *Pantoea 134* y *Pantoea 135*, en las plantas de higuera favoreció el incremento de altura de las plantas y la longitud de las raíces, concordando con lo reportado por Funes Pinter *et al.* (2018) en donde evaluaron la capacidad de las BPCV para reducir la toxicidad del As III en la vid y confirmaron que a su vez favorecen el crecimiento y rendimiento de la fruta, reduciendo los indicadores de toxicidad.

Durante la evaluación se encontró que el tiempo de germinación de las semillas se redujo en los tratamientos inoculados con bacterias, siendo la cepa *Pantoea 113* la mejor con un promedio de 12 días respecto al control con 22 días en el lote tratado con sustrato; y con una diferencia significativa las cepas *Pantoea 135* con 12 días, *Serratia K120* con 14 días y *Serratia MC119* de 17 días respecto al control que fue de 45 días en el lote tratado con jal de minas; para lo cual podemos señalar que las BPCV ya cumplen su función desde la etapa de germinación. En el número de brotes no se obtuvo diferencias significativas; sin embargo, en los tratamientos con los inóculos bacterianos el promedio de la altura fue mayor respecto al control para ambos lotes. Mientras que las raíces presentaron una diferencia significativa en los tratamientos con la cepa *Serratia MC119* en sustrato y con la cepa *Pantoea 135* en jal en comparación a sus controles. Como lo demuestra D.L.B Sobariu *et al.* (2017) en su estudio donde las BPCV promueven el crecimiento de la planta y la tolerancia a la acumulación de metales. Siendo así que la bacteria *Azotobacter sp.* pudo estimular la eficiencia de germinación promedio de *Lepidium sativum* en casi un 7%, la longitud promedio de las raíces en un 22%, la longitud promedio del tallo en un 34% y la biomasa seca en un 53%.

En la disminución del H₂O₂ para la parte aérea fue la cepa *Pantoea 113* en sustrato y jal la que presentó mayor disminución respecto al control. A su vez en las raíces, de los tratamientos con sustrato *Pantoea 135* y en jal *Serratia MC119*, *Pantoea 113* y *Pantoea 135* fueron las cepas con las cuales se logró un mayor control por estrés oxidativo. Como lo señala Berni *et al.* 2019, la concentración de metales pesados puede abrumar a los sistemas que protegen a las plantas y provocar estrés oxidativo por lo que es importante tener un control sobre el aumento de EROs.

En la actividad enzimática de Peroxidasa para la parte aérea fue la cepa *Serratia MC119* en sustrato y *Serratia K120* en jal las que presentaron un mayor aumento de la enzima respecto al control, de forma similar en las raíces, los tratamientos con aumento de la enzima fueron *Pantoea 113* y *135* en sustrato y *Pantoea 134* en jal; concordando con lo reportado por Funes Pinter *et al.* (2017) donde de acuerdo a la combinación de BPCV (tratamientos), las enzimas antioxidantes se vieron afectadas de manera diferencial y en presencia de NaAsO₂, todas las cepas aumentaron la catalasa; *B. licheniformis* mejoró la ascorbato peroxidasa, mientras que *M. luteus* y *P. fluorescens* aumentaron la actividad de la peroxidasa.

Durante la determinación de actividad enzimática de Glutación Reductasa en la parte aérea, fueron las cepas *Serratia MC119*, *Serratia K120* y *Pantoea 134* en sustrato y *Pantoea 113* en jal las que presentaron un mayor aumento de la enzima respecto al control, mientras que en las raíces fue *Pantoea 113* en sustrato; y *Pantoea 113* y *134* en jal, las cepas con las cuales se logró un mayor aumento de la actividad de la enzima Glutación Reductasa en presencia de BPCV, por lo que retomando lo mencionado por Esfandiari *et al.* 2007 se tiene que las actividades enzimáticas, entre ellas la de la glutatión reductasa ayudan a eliminar radicales superóxido y peróxido de hidrógeno y así disminuir el daño a la membrana por el aumento de EROs.

En el proceso de fitorremediación, la movilidad de los EPT se dio de las fracciones disponibles para la planta a las no disponibles; logrando la inmovilidad de los EPT y favoreciendo el equilibrio del estrés oxidativo. Comparando los datos con el estudio de Chira *et al.* 2010 donde la mayoría de los elementos que estudio no presenta biodisponibilidad que signifique riesgo para la biota, ya que su movilidad se da para fracciones no disponibles, se observa que esto también se cumple.

Conclusiones

- Las BPCV *Serratia MC119* y *Pantoea 135* favorecieron de manera significativa ($p < 0.05$) la disminución del tiempo de germinación de semillas de higuera (*Ricinus communis*) con respecto al control en los tratamientos con jal.
- La BPCV *Pantoea 134* favoreció el crecimiento de higuera respecto al control en los tratamientos con sustrato y jal.
- EL aumento en el tamaño y longitud de raíces aumentó significativamente ($p < 0.05$) por las BPCV *Serratia MC119* y *Pantoea 135* respecto al control; en los tratamientos con sustrato.
- La BPCV *Pantoea 113* presentó diferencia significativa ($p < 0.05$) en la reducción de la concentración del H_2O_2 en la parte aérea de la planta de higuera para los tratamientos con sustrato y jal, respecto al control. Para las raíces, las BPCV *Serratia MC119*, *Pantoea 113* y *Pantoea 135* presentaron diferencia significativa ($p < 0.05$) respecto al control, en la reducción de la concentración del H_2O_2 en la planta de higuera, de los tratamientos con jal.
- La actividad enzimática de Peroxidasa aumentó de forma significativa ($p < 0.05$) en la parte aérea de la planta de higuera con la BPCV *Serratia MC119* en sustrato. Mientras que en raíces fueron *Pantoea 135* y *Pantoea 113* las BPCV que presentaron un aumento significativo ($p < 0.05$) en la producción de la enzima, respecto al control; para los tratamientos con sustrato.

- La actividad enzimática de Glutación Reductasa en el tejido vegetal aumentó significativamente ($p < 0.05$) con las BPCV *Serratia MC119*, *Serratia K120* y *Pantoea 134* respecto al control, en los tratamientos con sustrato. Por su parte en raíces fueron las BPCV *Pantoea 113* (sustrato) y; *Pantoea 113* y *Pantoea 134* (en jal) las que presentaron diferencia significativa, respecto al control; en el aumento de la actividad enzimática de Glutación Reductasa.
- La movilidad de los EPT en el suelo durante el proceso de fitorremediación se dio de las fracciones disponibles a no disponibles en presencia de las BPCV. Fue *Serratia K120* en Pb, *Serratia MC119* y *Serratia K120* en Ni, *Serratia K120* en Cu y Mn las cepas que presentaron mayor movilidad a las fracciones no disponibles.
- Con lo que podemos concluir que la bacteria que presenta mejores resulta con la mayoría de los aspectos analizados fue *Serratia MC119*. Lo que sugiere se pueda usar en los procesos biotecnológicos de Fitorremediación.

Referencia bibliográfica

- Arfaoui, A., El-Hadrami, A., & Daayf, F. (2018). re-treatment of soybean plants with calcium stimulates ROS responses and mitigates infection by *Sclerotinia sclerotiorum*. *ELSEVIER*, 121-128.
- Aviles, M., Flores, I., & Hernández, C. (2016). La rizobacteria promotora del Crecimiento vegetal *Arthrobacter agilis* UMCV2 coloniza endofíticamente una *Medicago truncatula*. *Rev. Argentina de Microbiología*, 342-346.
- Barrie, C., & Hannington, M. (2019, Noviembre 30). Classification of Volcanic-Associated Massive Sulfide Deposits Based on Host-Rock Composition. Ottawa, Ontario, Canada.
- Berni, R., Luyckx, M., & Xu, X. (2019). Reactive oxygen species and heavy metal stress in plants: Impact on the cell wall and secondary metabolism. *ELSEVIER*, 98-106.
- Buchanan, B., Gruissem, W., & Jones, R. (2000). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. USA: Offices.
- CAMIMEX, C. M. (2018). *INFORME ANUAL 2018. La exploración vital para el futuro del sector*. . México: Camimex.
- Camprubí, A., & Albinson, T. (2006). Depósitos epitermales en México: actualización de su conocimiento y reclasificación empírica. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana, Conmemorativo del Centenario*(1), 27-81.
- Carpena, R., & Bernal, M. (2007). Claves de la fitorremediación: fitotecnologías para la recuperación de suelos. . *Ecosistemas*, 1-3 .
- Cerón, L., & Melgarejo, L. (2005). Soil Enzymes: Health and Quality Indicators. *Soil Enzymes: Health and Quality Indicators*, (p. 5). Bogotá.

- Chandra, R., & Yadav, S. (2017). Phytoextraction potential of heavy metals by natives wetland plants growing on chlorolignin containing sludge of pulp and paper industry. *J. Eco. Eng.*, 134-145.
- Chira Fernández , J. (2010). Metales biodisponibles en la cuenca alta del río Torres-Vizcarra, departamentos de Ancash y Huánuco. *Revista de investigación UNMSM*.
- Coll, A., Sánchez, M., & Morales, J. (2002). *LA MINERÍA EN MÉXICO, geografía, historia, economía, economía y medio ambiente*. México: Punto Gráfico.
- Delgadillo, A., Gonzáles, C., & Prieto, F. (2011). PHYTOREMEDIATION: AN ALTERNATIVE TO ELIMINATE POLLUTION. *Tropical and subtropical agroecosystems*, 597-612.
- Dold, B., & Fontboté, L. (2001). Element cycling and secondary mineralogy in porphyry copper tailings as a function of climate, primary mineralogy, and mineral processing. *ELSEVIER*, 3-55.
- Dushenkov, V., Kumar, P., Motto, H., & Raskin , I. (1995). Rhizofiltration: the use of plants to remove heavy metals from aqueous streams. . *Environmental Science & Technology* , 1239-1245.
- Ekmekci, Y., Tanyolac, D., & Ayhan, B. (2008). Effects of cadmium on antioxidant enzyme and photosynthetic activities in leaves of two maize cultivars. *Elsevier*, 600-611.
- Esfandiari, E., & Shekari, F. (2007). The effect of salt stress on antioxidant enzymes activity and lipid peroxidation on the wheat seedling. *Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj*, 1842-4309.
- Esfandiari, E., Reza, M., Mahboob, S., Alyari, H., & Toorchi, M. (2007). Water stress, antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in wheat seedling. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 149-153.

- Favas, P., Pratas, J., Gomes, E., & Cala, V. (2011). Selective chemical extraction of heavy metals in tailings and soils contaminated by mining activity: Environmental implications. *ELSEVIER*, 160-171.
- Funes Pinter , M., Salomon, M., Berli, F., Gil, R., Bottini, R., & Piccoli, P. (2018). Plant growth promoting rhizobacteria alleviate stress by AsIII in grapevine. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 100-108.
- Funes Pinter, I., Salomon, M., Berli, F., Bottini, R., & Piccoli, P. (2017). Characterization of the As(III) tolerance conferred by plant growth promoting rhizobacteria to in vitro-grown grapevine. *Applie Soil Ecology*, 60-68.
- Ganeshkumar, A., Arun, G., Vinothkumar, S., & Rajaram, R. (2019). Bioaccumulation and translocation efficacy of heavy metals by *Rhizophora mucronata* from tropical mangrove ecosystem, Southeast coast of India. *Ecohydrology & Hydrobiology*, 66-74.
- Ghosh, M., & Singh, S. (2005). A review on phytoremediation of heavy metals and utilization of its byproducts. *Applied Ecology and Enviromental Research*, 1-18.
- Glick , B. (1995). The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 109-117.
- Hernández, E., Mondragón, E., Cristobal, D., Rubiños, J., & Robledo, E. (2009). Vegetación, residuo de mina y elementos potencialmente tóxicos de un jal de Pachuca, Hidalgo, México. *Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 109-114.
- Hernández, E., Mondragón, E., Cristobal, D., Rubiños, J., & Robledo, E. (2009). Vegetación, residuo de mina y elementos potencialmente tóxicos de un jal de Pachuca, Hidalgo, México. *Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 109-114.

- INEGI. (2014). *La industria minera ampliada*. México: Censos Económicos. Instituto Nacional de Estadística y Geografía.
- López Julián, P., & Mandado Collado, J. (2002). Extracciones químicas secuenciales de metales pesados. Aplicaciones en ciencias geológicas. . *Estudios Geol.* , 133-144.
- López Julián, P., & Mandado Collado, P. (2002). EXTRACCIONES QUÍMICAS SECUENCIALES DE METALES PESADOS. Aplicaciones en ciencias geológicas. *Estudios Geol.*, 133-144.
- Loredo, C., López, L., & Espinosa, V. (2004). Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas: Una revisión. *Terra Latinoamericana*, 225-239.
- Maldonado , Y. (2019, Septiembre 15). *Geología, ramas y aplicaciones*. Retrieved from <https://geologiaweb.com/yacimientos-minerales/porfido-cuprifero/>
- Martín Romero, F., & Gutiérrez Ruíz, M. (2010). Estudio comparativo de la peligrosidad de jales en dos zonas mineras localizadas en el sur y centro de México. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana*, 62(1), 43-53.
- McKinley, K., McLellan, I., Gagné, F., & Quinn, B. (2019). The toxicity of potentially toxic elements (Cu, Fe, Mn, Zn and Ni) to the cnidarian *Hydra attenuata* at environmentally relevant concentrations. *Science of the total environment*, 848-854.
- Medisan. (2017). *Intoxicación ocupacional por metales pesados*. Retrieved from Scielo: <http://scielo.sld.cu/pdf/san/v21n12/san122112.pdf>
- Mendoza Hernández, J., Vázquez Delgado, O., & Castillo Morales, M. (2019). Phytoremediation of mine tailings by *Brassica juncea* inoculated with plant growth-promoting bacteria. *Microbiological Research*, 126-308.

- Moreno, D. (2008). *The university of Arizona*. Retrieved from https://superfund.arizona.edu/sites/superfund.arizona.edu/files/web_mineros.pdf
- Noctor, G., Reichheld, J., & Foyer, C. (2018). ROS-related redox regulation and signaling in plants. *Elsevier*, 3-12.
- Núñez López , R., Meas Vong, Y., Ortega Borges , R., & J.Olguín , E. (2004). Fitorremediación: fundamentos y aplicaciones . *Revista Ciencia* , 69-82.
- Nxele, X., Klein, A., & Ndimba, B. (2017). Drought and salinity stress alters ROS accumulation, water retention, and osmolyte content in sorghum plants. *South African Journal of Botany*, 261-266.
- Ortiz, H., & Trejo, R. (2009). Fitoextracción de plomo y cadmio en suelos contaminados usando quelite (*Amaranthus hybridus* L) y micorrizas. *Chapingo*, 8.
- Ortiz, H., & Trejo, R. (2009). Fitoextracción de plomo y cadmio en suelos contaminados usando quelite (*Amaranthus hybridus* L.) y micorrizas. *Chapingo*, 8.
- Padmavathiamma, P., Li, L., Chen, Z., & Ru, B. (1994). Expression of mouse metallothionein-I gene confers cadmium resistance in transgenic tobacco plants. *Plant Mol. Biol.*, 341-351.
- Pérez Segura, E., & Gonzáles Partida, E. (2010). Mineralogía de skarn y fluidos asociados a los yacimientos de Cu, Zn, Ni, Co de la Esperanza Sonora, México. *Revista mexicana de ciencias geológicas*, 27(1), 1-17.
- Pérez, R., Camacho, M., & Gómez, J. (2008). Aislamiento y selección de una cepa bacteriandegradadora de hidrocarburos a partir de suelocontaminados con petróleo. *CENIC*.

- Prieto, M., Gonzáles, R., Román, G., & Prieto, G. (2009). *Contaminación y fitotoxicidad en plantas por metales pesados provenientes de suelos y agua. Tropical and Subtropical Agroecosystems*. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=93911243003>
- Ramakrishna, W., Yadav, R., & Li, K. (2019). Plant growth promoting bacteria in agriculture: Two sides of a coin. *Applied Soil Ecology*, 138, 10-18.
- Ramos, M., Avelar, J., & Medel, A. (2012). MOVILIDAD DE METALES EN JALES PROCEDENTES DEL DISTRITO MINERO DE GUANAJUATO, MÉXICO. *Rev.Int. Contam. Ambie*, 49-59.
- Rauret, G. (1998). Extraction procedures for the determination of heavy metals in contaminated soil and sediment. *Talanta*, 449-455.
- Rivera, F., Buentello, B., Diaz-de-León, F., & Pérez, L. (2007). *Especies reactivas de oxígeno en las plantas*. Konigsberg: El Manual Moderno.
- Romero, F., Armienta, M., & Gonzáles-Hernández, G. (2007, January). Solid-phase control on the mobility of potentially toxic elements in an abandoned lead/zinc mine tailings impoundment, Taxco, Mexico. *Elsevier*, 22(1), 109-127. doi:<https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2006.07.017>
- Sarwar, N., Imran, M., Rashid, S. M., & Ishaque, W. A.-K. (2017). Phytoremediation strategies for soils contaminated with heavy metals: Modifications and future perspectives. *ELSEVIER*, 710-721.
- Sobariu, D., Tudorache Fertu, D., Diaconu, M., Vasile, L., Hlihor, R., & Dragoi, E. (2017). Rhizobacteria and plant symbiosis in heavy metal uptake and its implications for soil bioremediation. *New Biotechnology*, 125-134.
- Solano Marín, A. (2005, Noviembre). MOVILIZACIÓN DE METALES PESADOS EN RESIDUOS Y SUELOS INDUSTRIALES AFECTADOS POR LA HIDROMETALURGIA DEL CINC. *Tesis doctoral*. Murcia, España. Retrieved Enero 2020

- Tessier, A., Campbell, P., & Bisson, M. (1979). *Sequential Extraction Procedure for the Speciation of Particulate Trace Metals*. Canada: Analytical Chemistry.
- Tessier, A., Campbell, P., & Bisson, M. (1980). Trace metal speciation in the Yamaska and St. Francois Rivers (Quebec). *Can. J. Earth Sci.*, 90-105.
- Thangavel , P., & Subbhuraam, C. (2004). Phytoextraction: Role of Hyperaccumulatyors in Metal Contaminated Soils. *Proceedings of the Indian National Science Academy* , 109-130.
- US-EPA. (1996). *United States Environmental Protection Agency*. Retrieved from www.epa.gov
- Yotova , G., Padareva, M., & Hristova, M. (2018). Establishment of geochemical background and threshold values for 8 potential toxic elements in the Bulgarian soil quality monitoring network. *Science of The Total Environment*, 1297-1303.