



**Benemérita
Universidad Autónoma de Puebla**

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

**“Análisis del efecto de la movilidad de
elementos potencialmente tóxicos en
jales de minas mediante el uso de bacterias
promotoras del crecimiento”**

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el Título de:

Licenciatura en Ingeniería Ambiental

Presenta:

Pamela Alejandra Urbina Trinidad

Director de Tesis:

Dr. José Carlos Mendoza Hernández

Puebla, Pue. Noviembre, 2015



BUAP

Oficio No. FIQ/AC/1107/2015
Asunto: Registro de Tema de Tesis

**C. PAMELA ALEJANDRA URBINA TRINIDAD
PASANTE DE LA LICENCIATURA
EN INGENIERÍA AMBIENTAL
P R E S E N T E:**

Por medio del presente me permito informarle, de la aprobación del Registro de Tema de Tesis de la Licenciatura en Ingeniería Ambiental cuyo título es el siguiente:

“ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA MOVILIDAD DE ELEMENTOS POTENCIALMENTE TÓXICOS EN JALES DE MINAS MEDIANTE EL USO DE BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO”

Con el siguiente contenido:

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1	ANTECEDENTES
CAPÍTULO 2	METODOLOGÍA
CAPÍTULO 3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**CONCLUSIONES
BIBLIOGRAFÍA**

Director de Tesis: Dr. José Carlos Mendoza Hernández
Co-Director de Tesis: Mtro. Ángel Silveti Loeza (UTP)

Lo cual me permito comunicarle para su conocimiento y fines consiguientes aclarando que la vigencia de este tema será **ÚNICAMENTE POR UN AÑO**.

ATENTAMENTE
“Pensar Bien, Para Vivir Mejor”
H. Puebla de Z., 07 de Octubre del 2015


M.I.C. MA. GPE. TITA VAZQUEZ E. DE LOS MONTEROS
SECRETARIA ACADÉMICA



C.c.p. Director de Tesis: Dr. José Carlos Mendoza Hernández
Co-Director de Tesis: Mtro. Ángel Silveti Loeza (UTP)
Minutario Facultad de Ingeniería Química

Facultad
de Ingeniería
Química

Av. San Claudio s/n, Col. San
Manuel, Ciudad Universitaria,
Puebla, Pue. C.P. 72570
01 (222) 229 55 00
Ext. 7250 y 7251



**Benemérita Universidad Autónoma de
Puebla**
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

CIUDAD UNIVERSITARIA

C.P. José Juan Morales Rodríguez
Director de la Administración Escolar
De la BUAP.
Presente

ASUNTO:
AUTORIZACIÓN
IMPRESIÓN DE TESIS

Por este conducto me permito presentar a Ud. al C. pasante de la carrera de Ingeniería Ambiental

Pamela Alejandra Urbina Trinidad

Quién presenta como tema de tesis:

Análisis del efecto de la movilidad de elementos potencialmente tóxicos en jales de minas mediante el uso de bacterias promotoras del crecimiento

La cual ha sido debidamente revisada y se autoriza para su impresión correspondiente.

Sin otro particular y para los fines que se estimen conducentes reitero mi distinción.

ATENTAMENTE

“Pensar Bien, para Vivir Mejor”

H. Puebla de Z., a 25 de noviembre de 2015

Director de Tesis
Dr. José Carlos Mendoza Hernández

AGRADECIMIENTOS

**Al Gran “YO SOY”
por permitirme realizar este trabajo.**

**“Porque de él, y por él y para él, son todas las cosas”
Romanos 11:36**

Mamá y Papá,
por apoyarme siempre,
sin importar lo que tuvieron que sacrificar en el camino.

Potter,
por tus consejos y la confianza que me ayudaste a desarrollar.
Y la hipnopedia.

Ferdy,
por apoyarme en momentos de crisis.

Fernando,
por creer en mí aun cuando yo misma dudaba.

Sara,
por tu oportuna intervención en la redacción del trabajo
y en toda mi vida.

A Vida Estudiantil,
por todo lo que me dieron y que jamás podré olvidar.

Luis Pomares,
por ayudarme a cumplir las metas más importantes.

Jessica,
compartir conmigo los tiempos de angustia
e influenciarme en lo bueno, casi siempre.

Richy,
escucharme en el momento preciso.

Lic. Juan Rosas,
por haber creído que valía la pena
aceptar mis papeles fuera de tiempo.

ÍNDICE

Índice de figuras	3
Índice de imágenes	4
Índice de tablas	4
Introducción	5
Planteamiento del problema	6
Justificación	7
Objetivos	7
Objetivo general	7
Objetivos específicos	8
Hipótesis	8
CAPÍTULO I Antecedentes	9
I.1 La minería	9
I.2 Residuos de la minería	12
I.3 Normatividad Mexicana	13
I.4 Mineralogía de los jales	15
I.5 Movilidad de los elementos	17
I.6 Aspectos Biológicos	18
I.7 Alternativas para la remediación	21
I.8 Bacterias Promotoras del Crecimiento	22
CAPÍTULO II Metodología	25
II.1 Muestreo	25
II.2 Preparación de las muestras	26

II.3 Preparación del inóculo bacteriano26
II.4 Inoculación de las muestras27
II.5 Extracción Secuencial27
II.6 Análisis de las muestras29
CAPÍTULO III. Resultados y Discusión30
III.1 Resultados30
III.1.1 Hierro30
III.1.2 Manganeso32
III.1.3 Níquel34
III.1.4 Zinc36
III.1.5 Cobre38
III.1.6 Cadmio40
III.1.7 Plomo42
III.1.8 Arsénico44
III.2 Discusión47
Conclusiones53
Bibliografía55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Producción de Plata (Kg) del estado de Hidalgo y del municipio de Zimapán de 2014.	10
Figura 2. Producción de Plomo (Ton) del estado de Hidalgo y del municipio de Zimapán de 2014.	10
Figura3. Producción de Zinc (Ton) del estado de Hidalgo y del municipio de Zimapán de 2014.	11
Figura 4. Producción de Cobre (Ton) del estado de Hidalgo y del municipio de Zimapán de 2014.	11
Figura 5. Gráfica de concentración de Hierro en mg/kg en las diferentes fracciones de la extracción secuencial.	31
Figura 6. Gráfica de concentración de Manganeso en mg/kg en las diferentes fracciones de la extracción secuencial.	33
Figura 7. Gráfica de concentración de Níquel en mg/kg en las diferentes fracciones de la extracción secuencial.	35
Figura 8. Gráfica de concentración de Zinc en mg/kg en las diferentes fracciones de la extracción secuencial.	37
Figura 9. Gráfica de concentración de Cobre en mg/kg en las diferentes fracciones de la extracción secuencial.	39
Figura 10. Gráfica de concentración de Cadmio en mg/kg en las diferentes fracciones de la extracción secuencial.	41
Figura 11. Gráfica de concentración de Plomo en mg/kg en las diferentes fracciones de la extracción secuencial.	43
Figura 12. Gráfica de concentración de Arsénico en mg/kg en las diferentes fracciones de la extracción secuencial.	46

ÍNDICE DE IMÁGENES

Imagen 1. Vista satelital de “Jales de Santa María”, Zimapán, Hidalgo.25
Imagen 2. Secado de jales a temperatura ambiente.26
Imagen 3. Incubación de los tratamientos a 30°C durante 5 días.27
Imagen 4. Preparación de las muestras para análisis por Absorción Atómica.29

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Límites máximos permisibles para los constituyentes tóxicos en el extracto PECT de la NOM-052-SEMARNAT-2005.14
Tabla 2. Concentraciones de referencia totales (CR _T) por tipo de uso de suelo de la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004.15
Tabla 3. Mecanismos que utilizan las bacterias para efectuar cambios en la especiación y movilidad de los metales.20

INTRODUCCIÓN

Una de las principales actividades económicas de México es la minería, según la Secretaría de Economía, México ocupa el 1^{er} lugar en producción de plata a nivel mundial y se ubica entre los 10 principales productores de 16 diferentes minerales: oro, plomo, zinc, cobre, bismuto, fluorita, celestita, wollastonita, cadmio, diatomita, molibdeno, barita, grafito, sal, yeso y manganeso. El estado de Hidalgo es una de las entidades federativas más importantes en este rubro, desde 2009 ha incrementado su explotación de plata, cobre, plomo, manganeso y zinc (Servicio Geológico Mexicano, 2014^a) que son extraídos en diferentes municipios, entre ellos Zimapán, y para 2010 contaba con seis empresas de explotación instaladas y seis en proceso de exploración (Servicio Geológico Mexicano, 2011).

La minería es fundamental de la economía del país, pero también representa un riesgo a la salud humana, como en el caso del arsénico, que ha sido asociado con hipopigmentación, hiperpigmentación e hiperqueratosis, casos descubiertos en la región de Zimapán debido a las cantidades de arsénico de hasta 16% en peso (Ongley L., *et al.*, 2007). Por lo que es necesario implementar métodos que permitan evaluar la movilidad de estos elementos y que de esta forma generen información que limite el riesgo a la salud de las comunidades expuestas.

La metodología más utilizada para el análisis de la contaminación en suelo es la obtención de la concentración total del contaminante, sin embargo ésta no brinda información como la biodisponibilidad o lixiviación potencial de los elementos, por lo que en los últimos años, se ha optado por el uso de la técnica de extracción secuencial, ya que con esta se permite conocer la concentración de los elementos en diferentes formas químicas y por lo tanto evaluar su toxicidad potencial.

Otras investigaciones han utilizado la extracción secuencial como herramienta para evaluar la disponibilidad de los metales para las plantas (Lubomir S. y Vardan S., 2008), sin embargo poco se ha logrado con el fin de evaluar el impacto que los

microorganismos tienen en la movilidad de los metales y por lo tanto su influencia en la disponibilidad metales-plantas.

Por esta razón el presente trabajo pretende evaluar el comportamiento de la movilidad de As, Pb, Cu, Fe, Zn, Mn, Cd y Ni existentes en los jales de minas en presencia de bacterias promotoras del crecimiento vegetal.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Uno de los principales factores de contaminación de la explotación de minas corresponde a los residuos, se estima que alrededor del 80% del volumen de extracción corresponde a relaves (jales), éstos contienen grandes cantidades de metales que no se pudieron extraer y ya no representan valor económico, sin embargo son altamente tóxicos y generan serios problemas a la salud de los habitantes en zonas aledañas, primeramente porque son partículas de suelo tan finas que ingresan en el sistema respiratorio y pueden causar problemas en los pulmones y diversos padecimientos, por otra parte, su alto contenido en metales y otros elementos los convierten en tóxicos y pueden causar problemas en la piel, el sistema nervioso, e incluso problemas en el desarrollo embrionario.

Es indispensable manejar procesos de biorremediación entre los que se encuentran la fitorremediación, para poder minimizar considerablemente estos riesgos. Sin embargo debido a la toxicidad y a la movilidad de los elementos por los diferentes factores ambientales es necesario estudiar con una mayor profundidad la interrelación microorganismo-planta y su relación con estos elementos.

JUSTIFICACIÓN

Las interacciones entre los microorganismos-metales han sido más estudiadas en los últimos años por el potencial que los microorganismos tienen como atenuadores de la contaminación en suelos, ya que tiene la capacidad de modificar la composición de los elementos por ejemplo llevándolos de un estado soluble a insoluble o viceversa (Hullebusch E., *et al.*, 2005). Aún más, algunos microorganismos realizan actividades más específicas como las bacterias promotoras del crecimiento vegetal que estimulan el crecimiento de las plantas mediante procesos de fijación de minerales y solubilización de nutrientes. Este tipo de microorganismos tienen el potencial de estimular los procesos de fijación de elementos tóxicos.

Es necesario analizar el efecto que los microorganismos tienen en la movilidad de los elementos potencialmente tóxicos y así establecer una mejor estrategia para los procesos de rehabilitación de suelos contaminados, por ejemplo la fitorremediación, que en el caso de los suelos contaminados por metales o semimetales, se presenta en dos extremos, la fitoextracción y la fitoestabilización. Ambas estrechamente ligadas con la dinámica de las plantas y los microorganismos asociados a estas.

OBJETIVOS:

OBJETIVO GENERAL:

Analizar la movilidad de elementos potencialmente tóxicos en las diferentes fracciones de los jales de minas debido a la acción de bacterias promotoras del crecimiento vegetal.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Analizar la influencia de las bacterias promotoras del crecimiento (*Serratia k120*, *Serratia Mc119*, *Klebsiella Mc173*, *Enterobacter Mc156* y *Lysinibacillus Mc188*) en la distribución de los metales en los jales de minas.
- Cuantificar los elementos potencialmente tóxicos en las diferentes fracciones de los jales de minas realizadas mediante extracción secuencial por absorción atómica.

HIPÓTESIS

H₀ Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal no influyen la movilidad para lograr la estabilización de los elementos potencialmente tóxicos existentes en los jales de minas.

H₁ Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal influyen la movilidad para lograr la estabilización de los elementos potencialmente tóxicos existentes en los jales de minas.

CAPITULO I

ANTECEDENTES

I.1 La minería

México es reconocido a nivel mundial por las actividades de extracción de minerales que realiza, según el Servicio Geológico Mexicano (2014^b) la producción de minerales metálicos del país en 2013 lo posicionó en 1^{er} lugar en producción de Plata (Ag) con el 22.1 % de producción a nivel mundial, así como 4^o lugar en producción de Plomo (Pb) con el 4.7%, 4^o lugar en Cadmio (Cd) con 6.7%, 6^o en Zinc (Zn) con el 4.8%, 8^o en Oro (Au) con 4.2%, 9^o en producción de Manganeso (Mn) con el 1.3% de la producción mundial, así como el 10^o y 14^o lugar en producción de Cobre (Cu) y Hierro (Fe) con el 2.7 y 0.7% respectivamente. El estado de Hidalgo aumentó su producción de Ag, Cd, Cu, Pb, Mn y Zn de 2009 a 2013 de manera continua y para 2010 existían 11 empresas en proceso de exploración o explotación dentro del estado de las cuales 6 se encontraban en el municipio de Zimapán con producción de hasta 1000 toneladas al día principalmente de Ag, Pb, Zn y Cu (Servicio Geológico Mexicano, 2011).

De acuerdo con las estadísticas del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI, 2015) del año 2014, la producción de plata del estado de Hidalgo generó un promedio de 23.15 millones de pesos mensuales, siendo Zimapán responsable de la producción promedio de 2,750 kg Ag/mes (más del 79% de la producción del estado). La Figura1 muestra la producción en peso de plata en 2014 del estado de Hidalgo y la producción del municipio de Zimapán.

En cuanto a la producción de plomo INEGI reporta como único productor a Zimapán con 316 ton Pb/mes (Figura 2), representando un ingreso de casi 7 millones de pesos al mes.

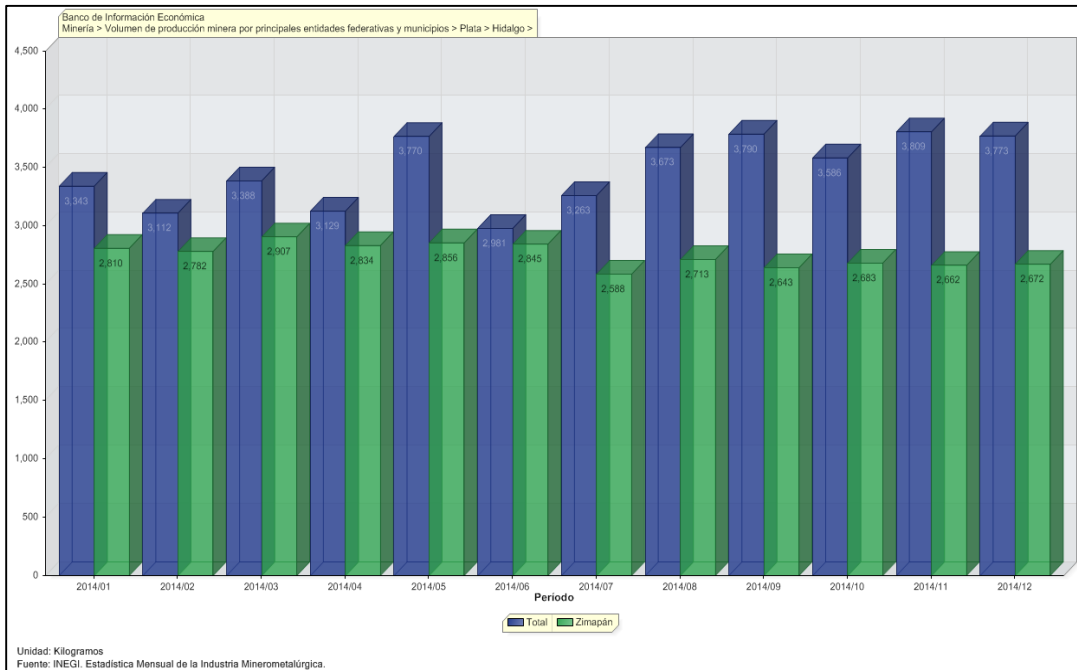


Figura 1. Producción de Plata (kilogramos) en 2014 del estado de Hidalgo en color azul. Producción de Plata del municipio de Zimapán en color verde. Fuente: INEGI 2015

De igual forma en producción de Zn el municipio representó el 100% de la producción del estado con un promedio de 653 ton Zn/mes (Figura 3) equivalente a casi 14 millones de pesos mensuales.

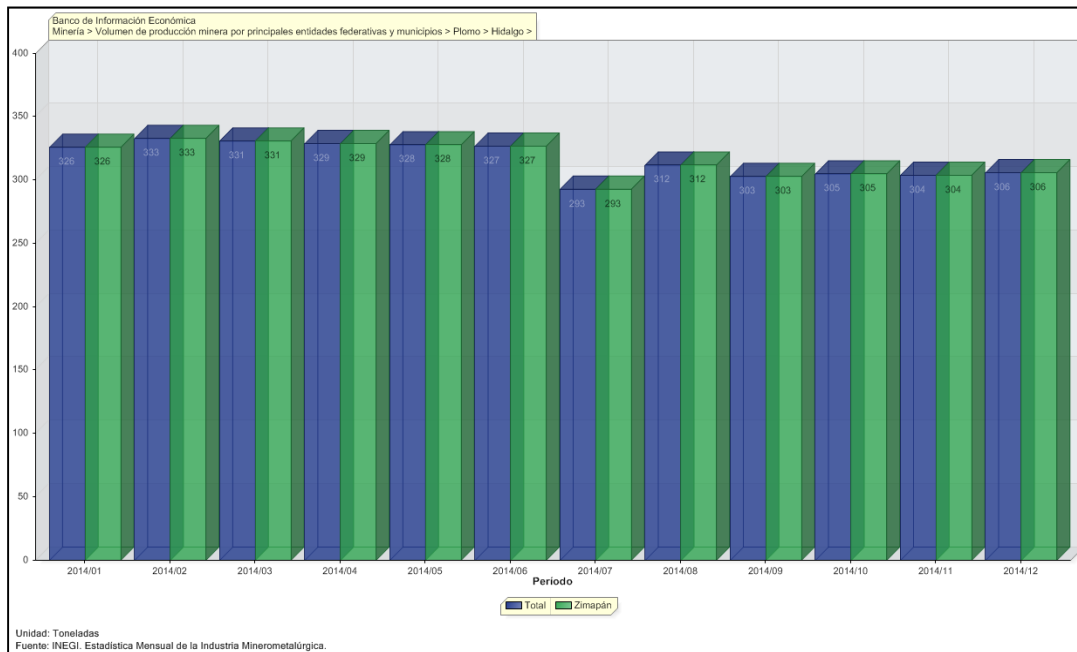
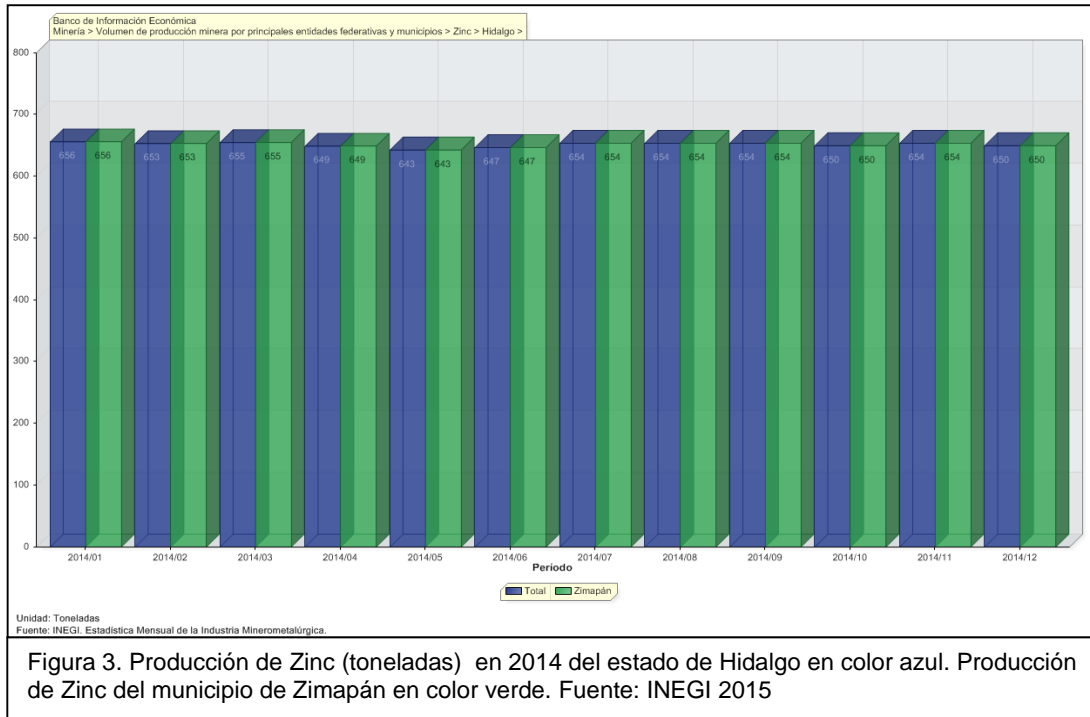
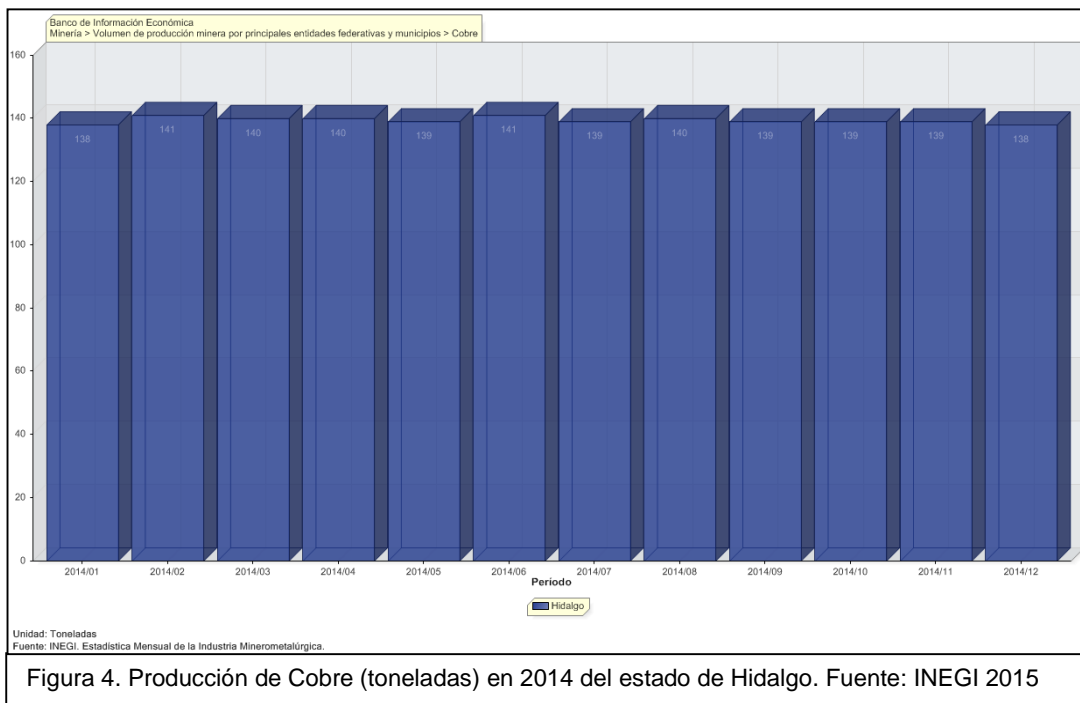


Figura 2. Producción de Plomo (toneladas) en 2014 del estado de Hidalgo en color azul. Producción de Plomo del municipio de Zimapán en color verde. Fuente: INEGI 2015



En el caso de cobre, Zimapán participa en la generación del estado, sin embargo su contribución es generalizada en la suma total del estado, el cual tuvo una media de producción mensual de 139 toneladas (Figura 4), equivalente a 11.16 millones de pesos.



La minería es el sustento de la población del municipio, se considera que alrededor del 80% de la población vive de manera directa o indirecta de esta actividad. Sin embargo el proceso de explotación de los minerales tiene también efectos indeseables ya que conlleva a la generación de residuos de extracción, conocidos como jales de minas.

I.2 Residuos de la minería

Los jales mineros o relaves son producidos al separar el mineral de interés mediante la molienda de la roca donde éste se encuentra y aplicar un proceso de extracción, según el Instituto Nacional de Ecología por cada tonelada de mineral procesado se genera alrededor de 850 kg de residuos sólidos (jales) (Nava C., 2007), los cuales tienen una concentración baja del mineral de interés, otros Elementos Potencialmente Tóxicos (EPT) y en algunos casos cianuro (que se utiliza para separar el mineral de la roca). Por ello los relaves son considerados peligrosos y deben disponerse de manera adecuada en represas capaces de contener los residuos en zonas alejadas de la población.

El riesgo a la salud humana por la exposición a jales de minas se debe principalmente a su dispersión vía aerosol pues contienen partículas de polvo finas que pueden ser ingeridas o inhaladas. La ingestión puede ocasionarse mediante la deposición de partículas en alimentos o agua, siendo absorbidas por el cuerpo durante el proceso de digestión, también por consumir agua con altas concentraciones del EPT (Duker A., *et al.*, 2005). La inhalación sucede en partícula menores a 10 μm (PM_{10}), donde, los individuos expuestos a estas por largos periodos de tiempo pueden desarrollar enfermedades respiratorias y daños en los pulmones (US-EPA, 2015).

Los relaves contienen elementos como **plomo**, que está relacionado con daños en el sistema nervioso, especialmente en niños, produciendo letargo, vómito, irritabilidad, pérdida de apetito y mareo, en adultos puede causar presión alta; **cadmio**, asociado con padecimientos como náuseas, vómito, dolor abdominal, irritación en la nariz y

garganta, tos, mareo y debilidad, hasta problemas cardiovasculares y del esqueleto (U.S. Department of Health & Human Services, s.f.).

Otro elemento abundante en los jales es **arsénico**, los compuestos solubles del arsénico pueden ser absorbidos por el tracto gastrointestinal y puede interactuar en los procesos bioquímicos del cuerpo, se considera que el arseniato puede inhibir más de 200 enzimas en el cuerpo y como su estructura es muy parecida al fosfato, puede sustituir al fósforo de cuerpo en especial en los huesos (Duker A., *et al.*, 2005). La exposición aguda a otros compuestos de arsénico puede producir fiebre, agrandamiento del hígado, anorexia e incluso la muerte, mientras que en exposición crónica está asociado con gangrena, daños al hígado, piel y pulmones, cáncer y otros trastornos del sistema nervioso (U.S. Department of Health & Human Services, s.f.).

Un aspecto poco estudiado es el efecto del arsénico en el sistema inmunológico, Duker A., *et al.* (2005) exponen algunos de los resultados obtenidos al analizar los efectos en animales y humanos. Experimentos con ratones expuestos a compuestos de arsénico y después contagiados con bacterias patógenas mostraron efectos como susceptibilidad enfermedades respiratorias y aumento en mortalidad; algunos experimentos mostraron efectos inmunosupresivos (por lo tanto aumentando la susceptibilidad a infecciones), incluso distorsión en la hormona glucocorticoide, que ayuda a regular el sistema inmune, sistema nervioso central y el uso de glucosa, almidón, grasas y proteínas por el cuerpo. En el estudio con humanos Duker reporta investigaciones han ligado la ingesta de As con la deficiencia de micronutrientes como Zinc que es esencial para el sistema inmunológico y Selenio que con vitamina E protegen a las células de daños por oxidación; incluso muestra investigaciones que han relacionada la intoxicación de arsénico con la susceptibilidad a contagio con Virus de Papiloma Humano.

I.3 Normatividad Mexicana

Dado que los residuos de la minería representan riesgo a la salud humana y comprometen la estabilidad de los ecosistemas donde se almacenan existe normatividad que pretende regular la disposición de estos residuos. La norma oficial mexicana NOM-141-SEMARNAT-2003 establece criterios para evaluar la toxicidad de los jales, el análisis de impacto ambiental (que incluyen en análisis de uso de suelo, hidrología, impacto para especies en riesgo y otras) y las características estructurales de la construcción de presas para su contención, para asegurar que los daños que los residuos puedan generar sean mínimos.

La norma anterior se relaciona con la norma NOM-052-SEMARNAT-2005 que establece las características, identificación (por fuente de generación), clasificación y los listados de los residuos peligrosos. Si la comparación del análisis de jales y los límites máximos de contaminantes permitidos en esta ley demuestra la toxicidad del residuo, éste debe tener un manejo específico de acuerdo con la NOM-141-SEMARNAT-2003. En la tabla1 se hace referencia a la norma 052 donde se enlista los límites máximos permisibles para diferentes metales.

LIMITES MAXIMOS PERMISIBLES PARA LOS CONSTITUYENTES TOXICOS EN EL EXTRACTO PECT		
No. CAS¹	Contaminante	LMP² (mg/L)
CONSTITUYENTES INORGANICOS (METALES)		
7440-38-2	Arsénico	5.0
7440-39-3	Bario	100.0
7440-43-9	Cadmio	1.0
7440-47-3	Cromo	5.0
7439-97-6	Mercurio	0.2
7440-22-4	Plata	5.0
7439-92-1	Plomo	5.0
7782-49-2	Selenio	1.0

Tabla 1. Información referida a la NOM-052-SEMARNAT-2005

Por otro lado la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004 contiene la determinación de concentraciones de contaminantes para suelos, lo que define las concentraciones máximas que deben tener los suelos que han sido contaminados y deben someterse a

un proceso de remediación, la tabla 2 expresa las concentraciones totales de acuerdo al tipo de uso de suelo y está enfocada a la protección de la salud humana.

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	1900
Cadmio	37	450
Cromo Hexavalente	280	510
Mercurio	23	310
Níquel	1 600	20 000
Plata	390	5 100
Plomo	400	800
Selenio	390	5 100
Talio	5,2	67
Vanadio	78	1000

Tabla 2. Información extraída de la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004

I.4 Mineralogía de los jales

El tipo de yacimiento en los suelos de Zimapán es Zn-Pb-Ag-Cu y está asociado con minerales en mayores concentraciones como calcita, yeso y cuarzo. La composición de elementos de mayor presencia corresponde a Al₂O₃, CaO, CaO₃, K₂O, MnO, FeO, Na₂O, P₂O₅, TiO₂, SiO₂ principalmente. Según Moreno R., *et al.* (2009) la composición inicial de los residuos mineros consiste en especies minerales como pirita (FeS₂), pirrotita (Fe_{1-x}S), arsenopirita (AsFeS), calcopirita (CuFeS₂), galena (PbS), boulangerita (Pb₅Sb₄S₁₁) y esfalerita (ZnS) principalmente, los cuales al meteorizarse sufren procesos de oxidación y precipitación dando lugar a una formación secundaria, donde se convierten en óxidos o hidróxidos de hierro así como sulfatos y arseniatos férricos, en algunos casos liberando ciertos metales ya que los procesos de oxidación representan drenaje ácido que en muchas ocasiones contiene elementos tóxicos disueltos, provocando así que los jales adquieran nuevas cualidades toxicológicas.

El mineral más abundante en los jales mineros es la pirita, que al pasar por proceso de oxidación e hidrólisis se presenta en forma de sulfatos férricos, óxidos u oxihidróxidos de hierro, como goethita ($\text{FeO}(\text{OH})$) o jarosita ($\text{KFe}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$), el mismo fenómeno afecta en la transformación de pirrotita.

Otro mineral abundante es la esfalerita, muchas veces con concentraciones altas de Fe, por lo que puede representarse en una variación mineralógica denominada marmatita, también puede contener pequeñas concentraciones de Cd y Mn presentes en forma de incrustaciones que pueden ser liberables por proceso de meteorización representando riesgo ambiental. Lo mismo sucede con la boulangerita, que dentro de su estructura cristalina puede contener incrustaciones de Cd y As, los cuales pueden liberarse cuando el mineral se intemperiza.

La galena, otro mineral abundante en los jales es importante ya que contiene plomo dentro de su estructura, ésta corresponde a sulfuro de plomo, pero mediante oxidación la especie mineral cambia a un sulfato de plomo llamado angelesita (PbSO_4), éste mismo proceso de oxidación puede transformar a la galena en cerusita (PbCO_3). Además puede formar sulfatos férricos de plomo como la plumbojarosita ($\text{Pb}_{0.5}\text{Fe}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$) mediante procesos de oxidación e hidrólisis.

Por otra parte, la arsenopirita también es un mineral de relevancia por su contenido de arsénico. Este mineral forma precipitados (arseniatos férricos) que existen en dos estructuras principales, escordita ($\text{FeAsO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) y simplesita ($\text{Fe}_3(\text{AsO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$), resultado de un proceso de oxidación.

De lo anterior es evidente notar que los procesos que tienen mayor impacto en la transformación de los minerales presentes en los jales de minas es la oxidación e hidrólisis que forman precipitados con nuevas características y durante el proceso pueden liberarse elementos potencialmente tóxicos.

I.5 Movilidad de los elementos

Los efectos que los elementos pueden causar en su entorno dependen en gran medida de su composición. Los metales en suelos no contaminados se encuentran generalmente en especies estables (como silicatos y alúminas), en éstas asociaciones minerales los elementos pueden considerarse inmóviles, que se refiere a un estado donde difícilmente pueden solubilizarse o cambiar de propiedades. Por otro lado en suelos contaminados los EPT se encuentran en gran medida en formas más lábiles también llamadas móviles, lo cual produce efectos tóxicos ya que algunos elementos traza son esenciales para el crecimiento de las plantas, pero si aumenta su concentración generan efectos negativos en ellas (Lubomir S., *et al.*, 2008).

Los esfuerzos por analizar la concentración de elementos potencialmente tóxicos en los suelos está orientado principalmente a la determinación total de elementos, lo cual manifiesta el grado de contaminación del sitio, sin embargo brinda poca información con respecto a procesos biológicos, cómo afecta a las plantas o microorganismos, y de procesos como lixiviación (Martínez Y., y Rivero C., 2005). Por esa razón en las últimas décadas se ha incrementado el interés de investigadores en utilizar un análisis más profundo denominado extracción secuencial, y la metodología más utilizada es la establecida por Tessier en 1979 (Lubomir S., *et al.*, 2008) que consta de 5 fracciones en las que pueden clasificarse los elementos, las cuales son: Intercambiable, enlazada a carbonatos, enlazado a óxidos de Fe-Mn, enlazado a materia orgánica y fracción residual. Otros han añadido fracciones, como hidrosoluble, enlaces con oxihidróxidos de Fe y enlaces con sulfuros (Favas P., *et al.*, 2011; Torres E., y Auleda M., 2013).

La extracción secuencial es una alternativa para el análisis de elementos traza en suelos naturales, contaminados o jales ya que recrea posibles condiciones ambientales que pueden afectar la composición de minerales, por lo tanto tiene variantes en cuanto a las etapas de extracción, así como los solventes utilizados en cada etapa, esto se debe al grado de especificidad que se puede obtener. A pesar de ser criticada por

estas variaciones, aún es la metodología más adecuada para comprender las características específicas de los elementos estudiados.

La extracción secuencial, a diferencia de la extracción total, permite conocer la concentración de un elemento en diferentes asociaciones minerales, lo cual brinda información de sus características, solubilidad, disponibilidad, estabilidad o movilidad, lo cual permite conocer la toxicidad de un elemento y las condiciones que podrían alterarlo y por lo tanto afectar su impacto en el ambiente.

La metodología de 8 pasos consiste en lo siguiente: (1) Fracción soluble y (2) Fracción intercambiable, solubles en agua o en condiciones de ligera acidez, ésta etapa puede considerarse la de mayor impacto ambiental ya que representa la fracción de mayor movilidad de las especies minerales, así como la más biodisponible. La fracción unida a carbonatos (3). Las fracciones unidas a oxihidróxidos y óxidos de Fe (4 y 5) representan la etapa donde los metales existentes podrían ser liberados si las condiciones del medio cambian de óxicas a anóxicas. La etapa siguiente (6) corresponde a la fracción unida a materia orgánica y sulfuros secundarios, mientras que la penúltima etapa (7) corresponde a la fracción enlazada a sulfuros, estas dos etapas pueden dejar libres a los metales si se exponen a una oxidación fuerte. Finalmente la etapa 8 corresponde a la fracción residual, en la cual difícilmente se podría liberar algún metal mediante procesos ambientales normales (Favas P., *et al.*, 2011).

I.6 Aspectos biológicos

La transformación de los elementos de los jales mineros y por lo tanto su impacto en el medio ambiente depende en gran medida de su composición química y de los efectos climáticos, pero también en la influencia de la matriz biológica del medio.

Bajo esta perspectiva, cambios en el medio afectarán la movilidad (existencia en las fases solubles) de los elementos potencialmente tóxicos, por lo cual es necesario considerar diferentes procesos bioquímicos.

Uno de los procesos más importantes es la sorción, que consiste en la fijación de un elemento (como los metales) en la superficie o estructura de otro (minerales), este proceso está limitado por las condiciones del pH, la presencia de ligandos orgánicos o inorgánicos, la presencia de coberturas o biofilms (Ullah A., *et al.*, 2015) que pueden bloquear o promover las zonas de contacto entre los metales y minerales, entre otras condiciones.

Otro proceso importante es la complejación, que se lleva a cabo cuando un metal está en contacto con un ligando (orgánico o inorgánico) formando así complejos. La estabilidad de un complejo dependerá de la facilidad de disociación que tenga. La influencia microbiana en este aspecto es importante, ya que mediante la respiración de las bacterias se produce bicarbonato, uno de los ligandos que pueden participar en este proceso. Otros efectos similares pueden surgir con la degradación de materia orgánica. Lo anterior sugiere que una gran cantidad de metales disueltos podrían formar complejos con ligandos orgánicos, especialmente en la zona de la rizosfera, donde existe una mayor actividad bioquímica (Hullebush E., *et al.*, 2005).

Otras condiciones como el pH y el potencial redox son también importantes, puesto que las formas reducidas de los elementos o minerales son insolubles. Estos aspectos influyen o son influenciados por el desarrollo microbiano. Algunas bacterias tienen afinidad por desarrollarse en pH ácido. Por otro lado, las bacterias afectan las condiciones de óxido reducción ya que participan en el intercambio de electrones y protones, ya sea de manera directa, solubilizando elementos como el Fe por bacterias reductoras de metales (MRB por sus siglas en inglés) o de manera indirecta, promoviendo la unión de compuestos oxidados con elementos reducidos (Hullebush E., *et al.*, 2005; Ullah A., *et al.*, 2015).

La presencia de materia orgánica es de igual forma un factor que determina la movilidad de elementos potencialmente tóxicos. Una de las razones es porque forma complejos con metales, por lo tanto aumenta o disminuye su estado de oxidación. Se considera que las sustancias húmicas promueven interacciones entre los microorganismos o los óxidos férricos, sin embargo los mecanismos y grupos funcionales que participan en dichos procesos no han sido completamente estudiados.

La existencia de microorganismos adaptados a estos ambientes es de gran impacto, ya que generan resistencia a la toxicidad de los elementos (Ullah A., *et al.*, 2015), como al arsénico, donde las bacterias reducen la absorción de arseniato aumentando el transporte de fosfato en sus células, incluso algunos microorganismos son capaces de reducir arseniato a arsenito (más tóxico) lo cual tiene importantes implicaciones en la movilidad de este elemento (Duker A., *et al.*, 2005). Algunos de los mecanismos que los microorganismos utilizan para alterar la composición de los elementos fueron citados por Hullebush E., *et al.* (2005) (Tabla 3).

Mecanismos que utilizan las bacterias para efectuar cambios en la especiación y movilidad de los metales	
Mecanismo	Ejemplo
Destoxificación enzimática	Oxidación de AsO_2^- a AsO_4^{3-}
	Reducción de CrO_4^{2-} a CrO^{3+}
	Reducción de Hg^{2+} a Hg^0
Función de donador o aceptor de electrones:	
Oxidación por quimiolitótrofos	Fe^{2+} a Fe^{3+}
	AsO_2^- a AsO_4^{3-}
Reducción por heterótrofos o autótrofos	Fe^{3+} a Fe^{2+}
	MnO_2 a Mn^{2+}
Promoción o lixiviación por la producción de metabolitos	Ácido sulfúrico producido por bacterias oxidadoras de sulfuros
	Sideróforos producidos por <i>R. metallidurans</i> CH34 que pueden solubilizar metales

Tabla 3. Muestra los mecanismos que utilizan los microorganismos y plantas para afectar la movilidad de algunos metales y radionucleidos. (Hullebush E., *et al.*, 2005).

I.7 Alternativas para la remediación

Con el objetivo de establecer técnicas de mejoramiento de suelos que sean lo menos invasivas posibles, que generen mayor costo-beneficio, y mejor efecto restaurador en la estructura y funcionamiento del suelo (Ullah A., *et al.*, 2015), se ha propuesto la fitorremediación, la cual comparada con las técnicas convencionales con costos que oscilan entre 0.27 a 1.6 millones de dólares, la fitorremediación representa un costo entre 10 y 1000 veces menor (Kidd P., *et al.*, 2009). Esto se debe a que la fitorremediación es un proceso natural, ya que utiliza plantas y sus microorganismos asociados para remover o estabilizar contaminantes, y al mismo tiempo provee al sitio de otras ventajas, como una cobertura vegetal que lo protege de erosión por aire y agua, también reduce la percolación y lixiviación de los contaminantes.

El reto al intentar implementar este tipo de medidas de remediación consiste en la naturaleza de los jales, pues representan un ambiente hostil para las plantas por la combinación de factores como la toxicidad de los metales, el pH ácido, la inadecuada consistencia del suelo, la baja cantidad de nutrientes y el estado de estrés en el que se encuentran las comunidades microbianas (Grandlic C., *et al.*, 2009). Por tal razón se buscan estrategias que permitan mejorar las posibilidades de éxito de la fitorremediación analizando las variables que envuelven la relación microorganismo-planta.

Las plantas utilizan elementos traza para su crecimiento como el Fe, Zn, Cu, Se y Ni, son considerados micronutrientes por lo tanto son esenciales para su correcto desarrollo, el problema existe cuando los elementos rebasan los límites de concentración tolerables puesto que se convierten en tóxicos si se encuentran en formas biodisponibles (Hullebusch E., *et al.*, 2005). Sin embargo, estudios han demostrado que algunas plantas, bajo condiciones adecuadas pueden influenciar la difusión de elementos potencialmente tóxicos, en este principio se basa la fitorremediación, la cual tiene 2 vertientes, la fitoextracción y la fitoestabilización.

La fitoextracción pretende remover el contaminante del suelo mediante su captación por la planta, el metal se puede recuperar mediante ignición de las plantas, e incluso en algunos casos las cenizas se pueden utilizar como fertilizantes. La fitoextracción es más conveniente para sitios contaminados a nivel superficial y mediante el uso de plantas acumuladoras o hiperacumuladoras (Ullah A., *et al.*, 2015). Por su parte la fitoestabilización pretende reducir la movilidad de metales manteniéndolos en la zona de raíces de las plantas, ésta técnica es más útil para sitios amplios y con contaminación de múltiples metales (Kidd P., *et al.*, 2009).

La intervención de microorganismos en procesos de fitorremediación son de amplio interés, la influencia que ejercen en metales suele relacionarse principalmente en procesos de movilidad o inmovilidad. Hullebusch E., *et al.* (2005) en su reseña muestra investigaciones que han revelado efectos en el crecimiento de plantas y por lo tanto aumentos en concentraciones de metales, cambios en biodisponibilidad de elementos, aumento de supervivencia de la planta, aumento en biomasa (Grandlic C., *et al.*, 2009), incluso aspectos como movilidad de Zn (*Enterobacter cancerogenes*), inmovilización de Zn y Cd (*Serratia Marcescens*), o aumento en la concentración de Pb en la fracción intercambiable y un descenso en la fracción enlazada a carbonatos (*Pseudomonas*).

1.8 Bacterias promotoras del crecimiento

Las bacterias que se encuentran en el suelo y promueven el crecimiento de plantas se denominan Bacterias Promotoras del Crecimiento (BPC). Estas utilizan diferentes mecanismos que favorecen el crecimiento de plantas como fijación de nitrógeno atmosférico, producción de sideróforos, solubilización de minerales, producción de fitohormonas, síntesis de compuestos o enzimas, así como metabolitos con propiedades antibióticas o sustancias antifúngicas (Grobelak A., *et al.*, 2015; Ullah A., *et al.*, 2015). Algunos grupos importantes de BPC son *Serratia*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Erwini*, *Burkholderia*, *Klebsiella*, *Beijerinckia*, *Flavobacterium* y *Gluconacetobacter* (Ullah A., *et al.*, 2015).

Un ejemplo actual de las capacidades de estas bacterias fue el expuesto por Grobelak A., *et al.* (2015) quienes realizaron un experimento donde compararon el crecimiento de plantas en suelos contaminados con metales pesados (**Zn, Pb y Cu**) inoculadas con rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal y un blanco sin inoculación. En su investigación demostraron que las BPC son capaces de sobrevivir y desarrollarse en suelos contaminados con altas concentraciones de metales y reducir la intoxicación de plantas expuestas, también reportó que la producción de ACC-desaminasa de plantas y sus bacterias asociadas redujo los efectos negativos de producción de etilenglicol obteniéndose elongación en raíces. En general, el crecimiento de plantas inoculadas con bacterias fue mayor al de plantas sin inoculación.

A pesar de las condiciones desfavorables que representan los jales de minas, las bacterias han desarrollado mecanismos que les permiten colonizar estas zonas de altas concentraciones de metales, y por lo tanto promueven la introducción de plantas tolerantes a los metales que se denominan pseudometalofilas, y de plantas que se han adaptado a los sustratos derivados de depósitos minerales meteorizados que se conocen como metalofilas. Por esta razón las BPC con sus plantas asociadas han sido ampliamente estudiadas para determinar la capacidad que tienen para la estabilización de metales en zonas contaminadas.

En su investigación Becerra-Castro C., *et al.* (2012) analizaron el comportamiento de plantas pseudometalofilas y sus bacterias asociadas para determinar su capacidad de acumulación de metales en una zona minera de **Pb/Zn**. En sus resultados muestran que el efecto que las bacterias tienen en la movilidad de metales y por lo tanto en la fijación o estabilización de estos depende siempre de su especie vegetal asociada, él encontró que las bacterias *Pseudomonas koreensis*, *Rhodococcus erythropolis*, *Streptomyces coelestis* y *Massilia niastensis* podrían tener un efecto positivo sobre gramíneas para efectos de fitoestabilización.

La inoculación de BPC han sido estudiadas para analizar el impacto que tienen en las comunidades bacterianas ya establecidas en la rizósfera de las plantas. Grandlic C., *et al.* (2009) analizaron el impacto de este tipo de bacterias en la optimización de fitoestabilización en jales mineros en Arizona (con concentraciones altas en **As, Cd, Cu, Fe, Mn, Pb y Zn**) y descubrieron que la inoculación de las bacterias tiene un impacto en el desarrollo de las bacterias del sitio, ellos sugieren que en la rizósfera podría desarrollarse una comunidad con características únicas que podrían mejorar el proceso de fitorremediación.

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

II.1 Muestreo:

El muestreo se realizó siguiendo los parámetros establecidos en la NOM-021-RECNAT-2000 y algunas investigaciones (Favas P., *et al.*, 2011; Martínez Y., y Rivero C., 2005; Ongley L., *et al.*, 2007).

Se seleccionó el área de muestreo ubicado en el municipio de Zimapán Hidalgo, denominado “Jales de Santa María” con dirección calle Montserrat, colonia Fas, con coordenadas 20°44'08.2"N 99°23'56.4"W (Imagen 1).



Imagen 1. Vista satelital de “Jales de Santa María”, Zimapán, Hidalgo. En rojo la zona de muestreo, en amarillo los puntos de muestreo.

Las características del muestreo fueron, tipo zig-zag, recolectando 10 submuestras a una profundidad aproximada de 20 cm. Para la recolección de la muestra se utilizó una pala de plástico, bolsas de plástico con capacidad para dos kilogramos de suelo. Una vez recolectadas, las submuestras se transportaron sin contacto con CO₂, O₂, luz solar, calor intenso y humedad.

II.2 Preparación de las muestras:

Se preparó una muestra compuesta de jal y se dejó secar durante 24 horas a temperatura ambiente para retirar el exceso de humedad (Imagen 2). Posteriormente, mediante el método del cuarteo se subdividió procurando submuestras de 1 kg para manejarlas con mayor facilidad. Se tamizó a 2 mm y se guardó en bolsas resellables etiquetadas.



Imagen 2. Secado de jales a temperatura ambiente.

II.3 Preparación del inoculo bacteriano:

Las bacterias se hicieron crecer en caldo Luria Bertani (LB) a 30°C durante 24 h. Posteriormente las bacterias se separaron por centrifugación a 10 000 g por 10 minutos y se resuspendieron en NaCl 0.9% ajustándolas a 0.5 A 600nm.

II.4 Inoculación de las muestras:

Para realizar el experimento se realizó un sistema por bloques utilizando cinco bacterias y dos blancos, todo por triplicado. A 5 gramos de suelo se le agregó 1.5 mL de la suspensión bacteriana y se incubaron a 30°C durante 5 días (Imagen 3). La inoculación se realizó con 5 cepas diferentes, *Serratia K120*, *Serratia M119*, *Klebsiella M173*, *Enterobacter M156* y *Lysinibacillus M188*. Adicionalmente se realizó un blanco con NaCl y uno más solo con el peso del jal. Posteriormente se procedió a la extracción.



Imagen 3. Incubación de los tratamientos a 30°C durante 5 días.

II.5 Extracción secuencial:

El análisis de la presencia de elementos potencialmente tóxicos se realizó mediante la metodología de extracción secuencial, que consiste en determinar la presencia de los elementos en las diferentes formas químicas en las que pueden existir. Las fracciones

son: soluble, intercambiable, enlazada a carbonatos, enlazada a oxihidróxidos de Fe, enlazada a óxidos de Fe, enlazada a materia orgánica, enlazada a sulfuros, y fracción residual. Para esto se colocó 2 g de cada muestra en tubos de polipropileno en los cuales se realizó el ensayo.

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).

Fracción intercambiable: se agregó 16 mL de $MgCl_2$ 1 M y se agitó durante 1 h, posteriormente se centrifugará a 8000 rpm durante 20 minutos.

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.

Para la 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.

Fracción unida a Fe (III)-óxidos: se colocó 40 mL 0.04 M $NH_2OH-HCl_2$ agitándose durante 6 h a 96 °C, y posteriormente se centrifugó durante 30 min.

En la *fracción unida a materia orgánica:* se agregó 6 mL 0.02M HNO_3 más 10 mL H_2O_2 y se agitó durante 2 h a 85°C, posteriormente se le agregó 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 $NH_4 O OCH_3$ y se agitó durante 30 min, después se separó el sobrenadante (Tessier A., et al., 1979; Dold B., y Fontboté L., 2001).

Fracción unida a sulfuros: Se agregó 1.5g 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).

Por último la *fracción residual:* se agregó 10 mL HNO_3 , después 4 mL HCl y 1 mL H_2O_2 , 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).

II.6 Análisis de las muestras:

Tras el proceso de extracción secuencial las muestras se analizaron mediante la técnica de flama en Absorción Atómica, en el equipo *Analyst 400*. Los elementos que se analizaron son Fe, Mn, Ni, Zn, Cu Cd, Pb y As.



Imagen 4. Preparación de las muestras para análisis por Absorción Atómica.

CAPITULO III

RESULTADOS Y CONCLUSIÓN

III.1 Resultados

III.1.1 Hierro

Los resultados para el análisis de concentración de hierro (Figura 5) mostraron valores no detectables para fracción soluble, intercambiable (a excepción del blanco con 1.23 mg/kg), y enlazada a carbonatos.

La fracción enlazada a oxihidróxidos de hierros permitió observar que la concentración de hierro se mantuvo fija para todos los tratamientos y el blanco, sin embargo en la fracción enlazada a óxidos de hierro puede observarse concentraciones por debajo del blanco en todas las cepas, especialmente en el tratamiento con *Lysinibacillus M188*.

En la fracción enlazada a materia orgánica se obtuvieron concentraciones bajas, para el blanco alrededor de 15 mg/kg y con *Serratia K120* valores muy cercanos. *Serratia M119*, *Klebsiella M173* y *Lysinibacillus* arrojaron valores alrededor de 6 mg/kg, mientras que *Enterobacter M156* valores cercanos a 2 mg/kg.

La fracción enlazada a sulfuros muestra que todos los tratamientos resultaron en un descenso en la concentración de hierro en esta etapa, todos alrededor de 50 a 60 unidades con respecto del blanco.

La fracción residual muestra las cepas *Serratia K120* y *Klebsiella M173* con valores muy cercanos al blanco y al testigo, *Enterobacter* y *Serratia M119* con valores por debajo del blanco hasta por alrededor de 40 unidades, sin embargo la influencia más evidente en esta etapa es por *Lysinibacillus M188* que redujo la concentración de Fe en más de 300 unidades.

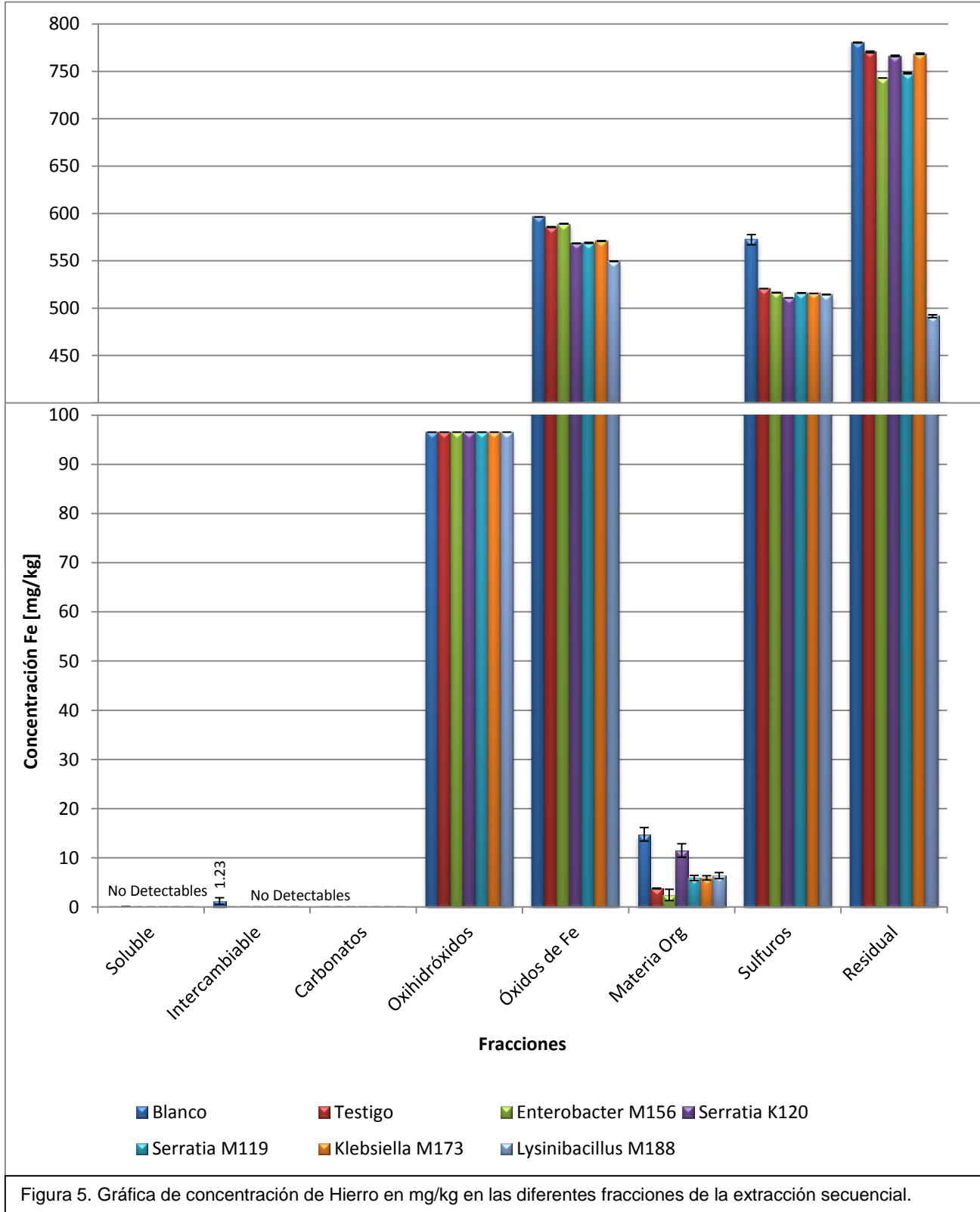


Figura 5. Gráfica de concentración de Hierro en mg/kg en las diferentes fracciones de la extracción secuencial.

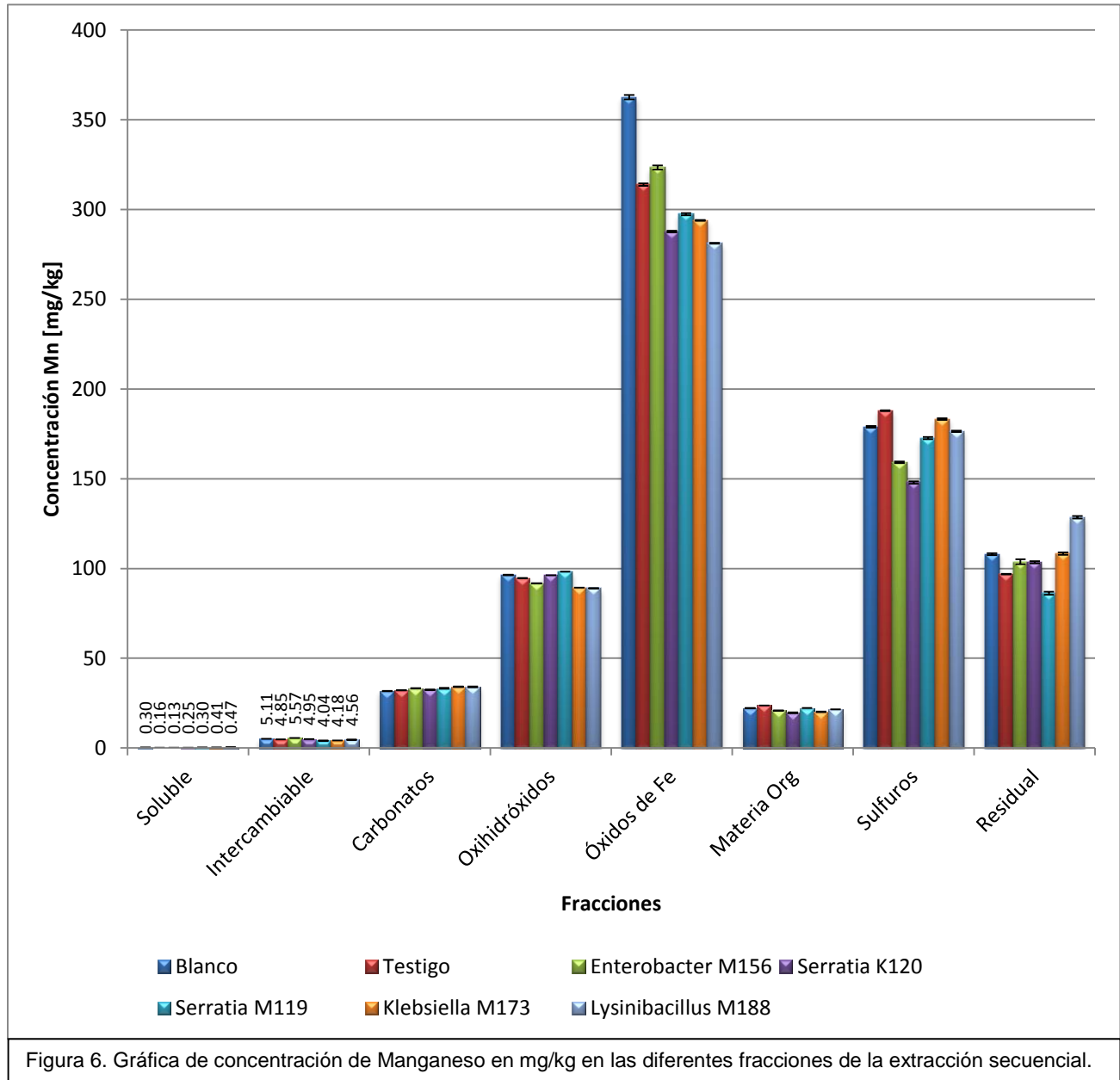
III.1.2 Manganeso

Las concentraciones de Mn (Figura 6) en las fracciones soluble, intercambiable, enlazada a carbonatos y enlazada a materia orgánica parecen no haber sufrido variaciones significativas por los tratamientos. La fracción enlazada a oxihidróxidos de hierro también muestra valores muy cercanos al blanco para todos los tratamientos, sin embargo las cepas *Serratia K120* y *119* indicaron valores ligeramente por encima, mientras que el resto de las cepas indicaron valores inferiores al blanco.

Las concentraciones más altas de Mn detectadas fueron en la fracción enlazada a óxidos de hierro (o manganeso) con valores por encima de 350 mg/kg en el caso del blanco, sin embargo todos los tratamientos muestran valores inferiores con respecto del blanco, *Enterobacter* presenta los valores más altos, el resto de las cepas muestra valores por debajo de los 300 mg/kg, especialmente *Lysinibacillus M188*.

En la fracción enlazada a sulfuros *Serratia M119* y *Lysinibacillus* muestran valores parecidos al blanco, mientras que *Klebsiella M173* presentó valores ligeramente por encima del blanco, las otras 2 cepas muestran valores menores particularmente *Serratia K120* con valor menor a 150 mg/kg.

En la fracción residual *Enterobacter M156*, *Serratia K120* y *Klebsiella M173* muestran valores muy parecidos al blanco, mientras que *Serratia M119* y *Lysinibacillus M188* presentan valores más significativos, por debajo y por encima del blanco respectivamente.



III.1.3 Níquel

En la fracción soluble puede observarse que todas las cepas muestran un aumento en la concentración de este metal, especialmente en los tratamientos con *Klebsiella M173* y *Lysinibacillus M188* (Figura 7).

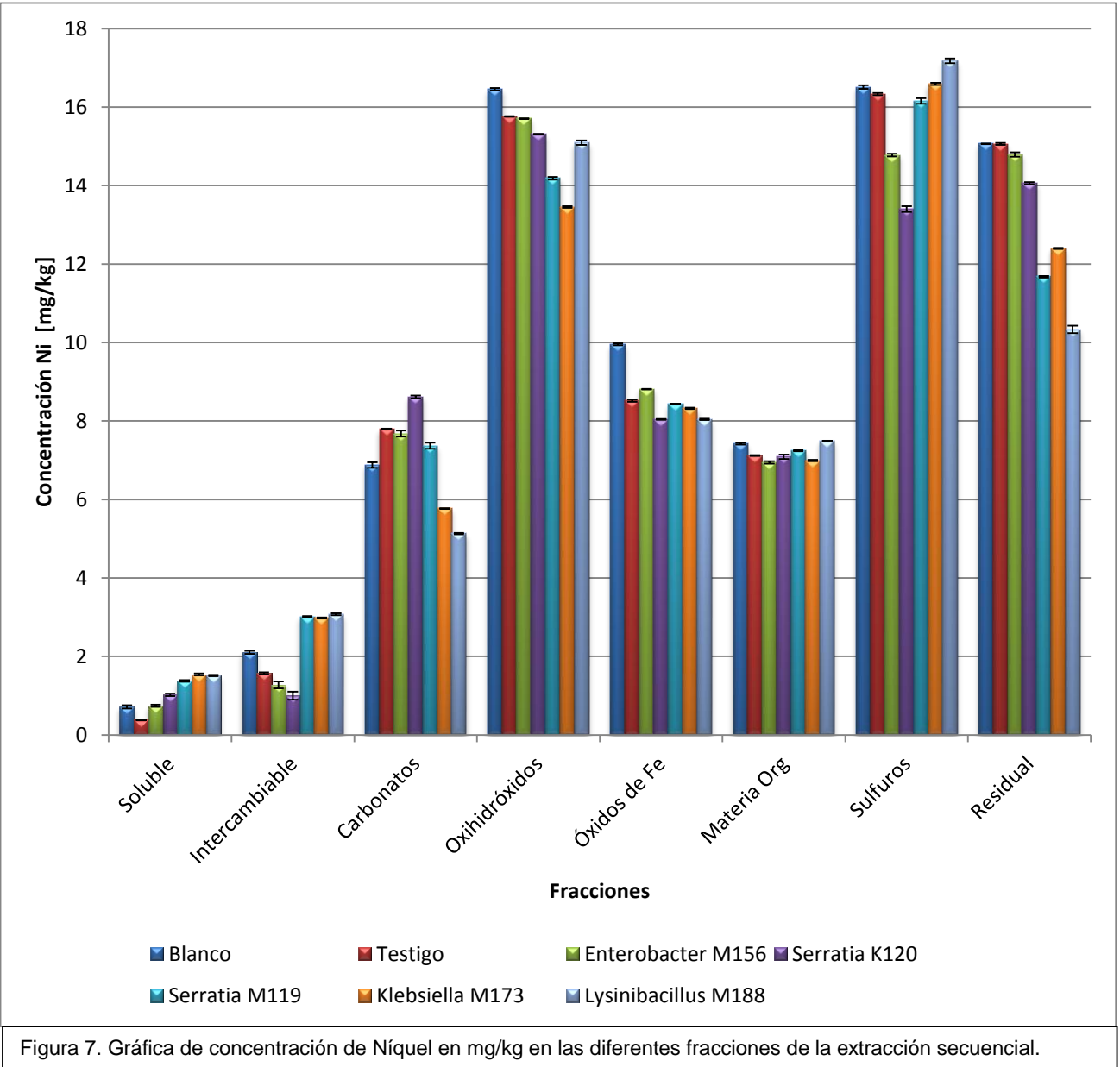
En la fracción intercambiable *Enterobacter M156* y *Serratia K120* mostraron valores inferiores al blanco y al testigo, mientras que *Serratia M119*, *Klebsiella M173* y *Lysinibacillus M188* mostraron valores por arriba del blanco y el testigo.

En al fracción unida a carbonatos se puede apreciar que *Enterobacter M156* y *Serratia M119* mantuvieron valores muy cercanos al testigo, mientras que *Serratia K120* mostro valores por encima del blanco y el testigo, caso contrario fueron los tratamientos con *Klebsiella M173* y *Lysinibacillus M188* que obtuvieron vares por debajo del blanco y el testigo.

En la fracción enlazada a oxihidróxidos de Fe puede observarse que todos los tratamientos muestran vales menores la blanco, especialmente *Klebsiella M173* y *Serratia K119*. La fracción enlazada óxidos de Fe fue muy similar, donde *Serratia K120* mostro la mayor reducción.

En la fracción enlazada a materia orgánica los valores se mantuvieron muy cercanos al blanco y al testigo, mostrando *Lysinibacillus M188* y *Enterobacter M156* el valor más alto y bajo respectivamente.

La fracción enlazada a sulfuros muestra una relación inversa con la fracción residual en casi todas las cepas. A Excepción de *Klebsiella M173*, las cepas que muestran mayor concentración en la fracción de sulfuros son las que muestran menor concentración en la fracción residual y viceversa.

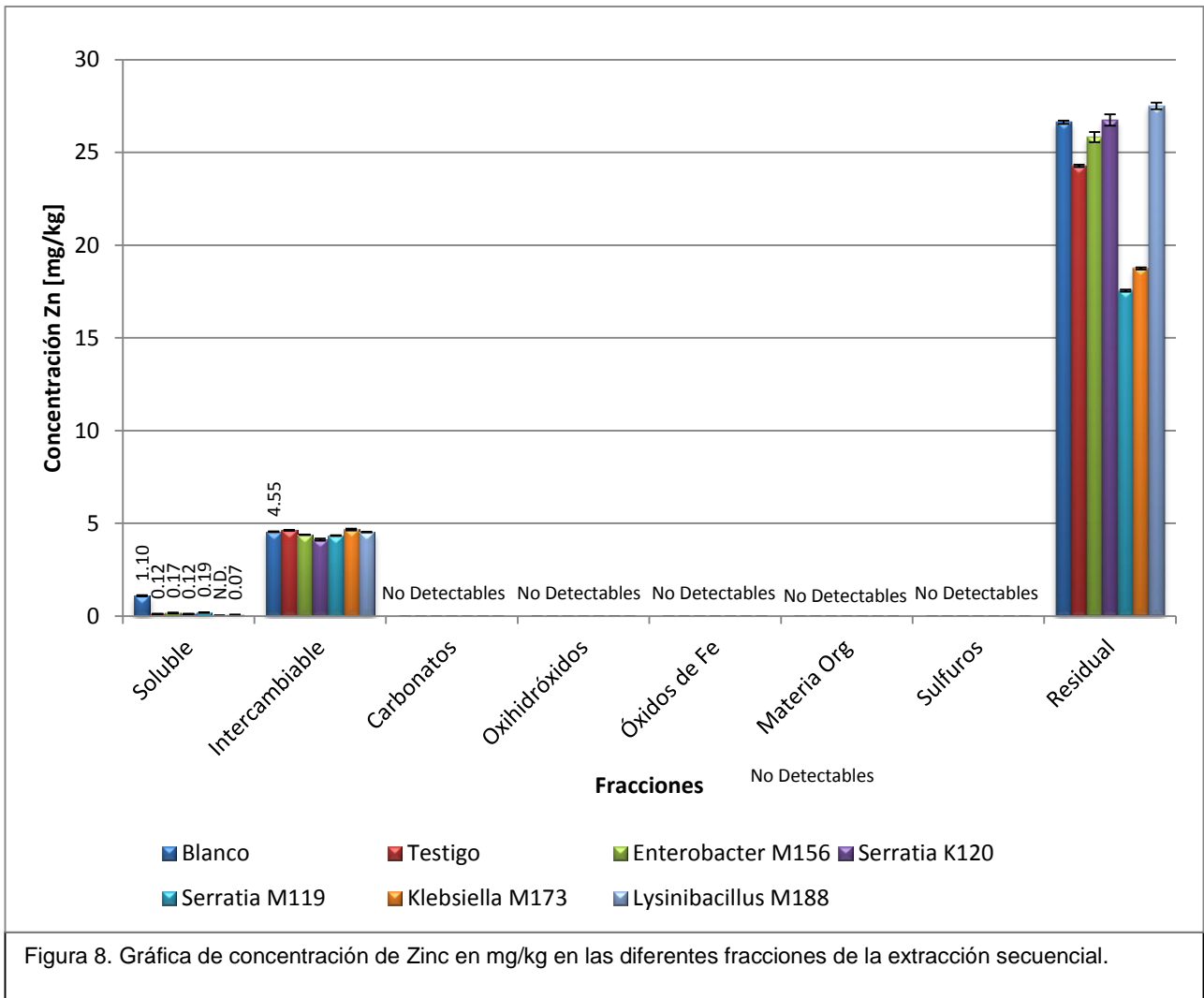


III.1.4 Zinc

En el caso de Zn no se obtuvieron valores detectables para fracción enlazada a carbonatos, oxihidróxidos, óxidos de hierro, materia orgánica ni enlazada a sulfatos (Figura 8). La fracción intercambiable muestra valores muy cercanos entre todos los tratamientos, *Klebsiella M173* con el valor más alto y *Serratia K120* con el más bajo.

La fracción soluble indicó que todos los tratamientos tuvieron influencia en la disminución de la concentración de Zn desde 1.1 mg/kg del blanco a valores entre 0.19 mg/kg hasta no detectables (*Serratia M119* y *Klebsiella M173* respectivamente).

Los resultados para la etapa residual fueron muy variantes, partiendo desde el blanco con concentraciones alrededor de 26 mg/kg, las cepas *Serratia K120* y *Enterobacter M156* obtuvieron valores cercanos por encima y por debajo del blanco respectivamente. *Lysinibacillus M188* indicó valores más altos que el blanco alrededor de 27 mg/kg mientras que *Klebsiella M173* y *Serratia M119* mostraron valores significativamente más bajos de entre 18 y 17 mg/kg.



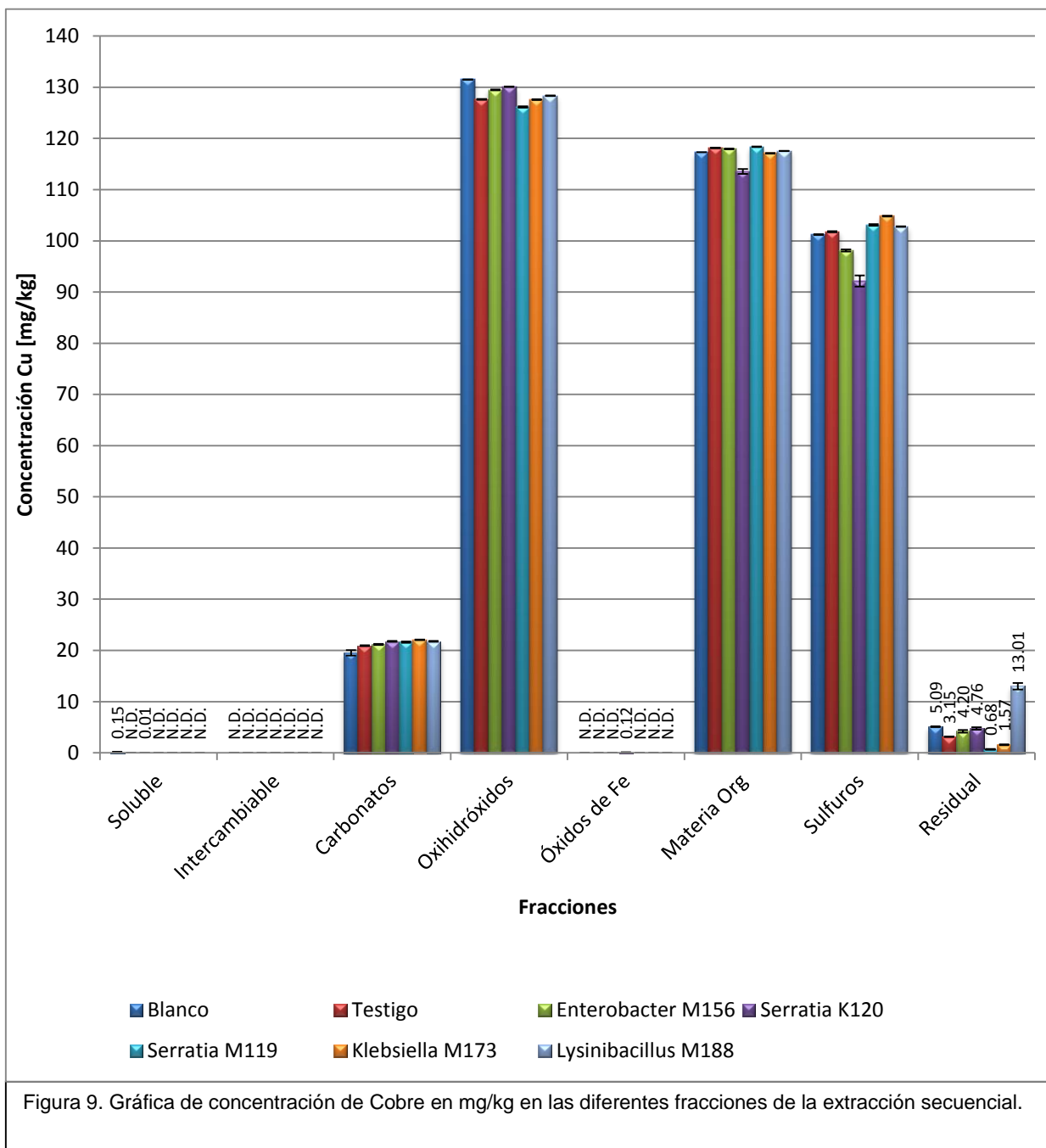
III.1.5 Cobre

Los resultados muestran que existen concentraciones no detectables en casi todos los casos en las fracciones soluble, intercambiable y enlazada a óxidos de hierro (Figura 9). En el caso de la fracción enlazada a carbonatos los valores fueron ligeramente superiores al blanco en todos los casos.

En la fracción enlazada a los oxihidróxidos de hierro los valores de la concentración de cobre fueron menores al blanco para todas las cepas, especialmente para *Serratia M119*.

En la fracción enlazada sulfuros puede observarse que la cepa *Serratia K120* mostró la menor concentración, el resto de las cepas obtuvieron valores muy cercanos al blanco.

La fracción residual muestra resultados variantes, por un lado los tratamientos con *Serratia M119*, *Klebsiella M173* y *Lysinibacillus M188* arrojaron valores por encima del blanco, mientras que los tratamientos con *Enterobacter* y especialmente *Serratia K120* mostraron concentraciones más bajas que el blanco.



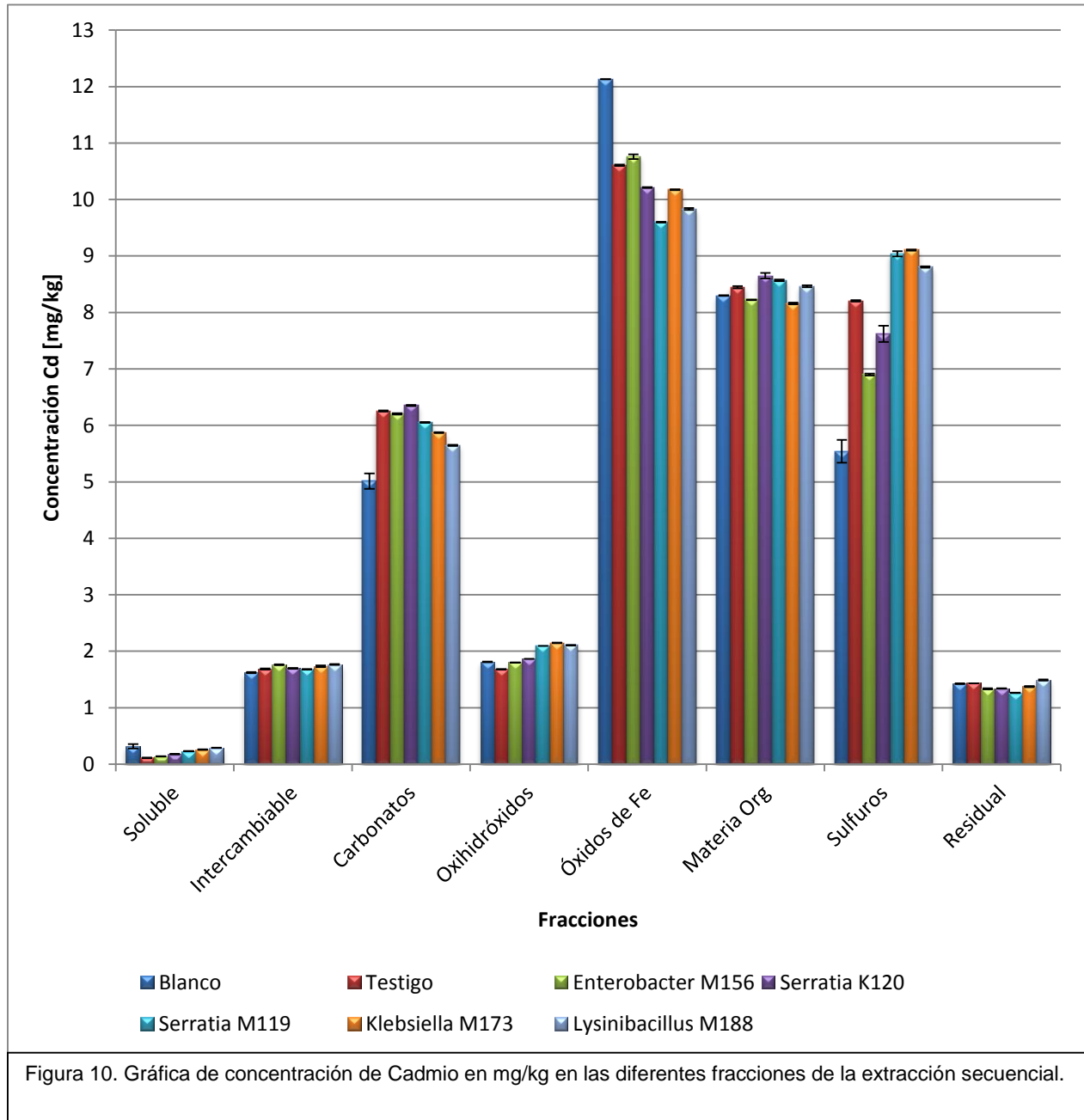
III.1.6 Cadmio

La concentración de Cd en la fracción soluble es muy baja (menos de 1mg/kg) los valores de los tratamientos fueron muy cercanos al blanco y al testigo, la cepa con valores más bajos fue *Enterobacter M156* (Figura 10).

Las fracciones Intercambiable, enlazada a oxihidróxidos de hierro y residual oscilan entre 1 y 2 mg/kg. Los valores más altos fueron por las cepas *Enterobacter M156*, *Klebsiella M173* y *Lysinibacillus M188* para la fracción intercambiable; *Serratia M119*, *Klebsiella M173* y *Lysinibacillus M188* para la fracción enlazada a oxihidróxidos de hierro; y *Lysinibacillus M188* para la fracción residual.

En la fracción enlazada a carbonatos puede observarse que todos los tratamientos indicaron mayor concentración del metal con relación al blanco, la cepa *Serratia K120* muestra el valor más alto, por encima de 6mg/kg y *Lysinibacillus M188* el más bajo. El mismo caso ocurre para la fracción enlazada a sulfuros, donde los valores más altos fueron los obtenidos por las cepas *Lysinibacillus M188*, *Serratia M119* y principalmente *Klebsiella M173*, mientras que los valores más bajos por *Serratia K120* y *Enterobacter M156*, los valores mas altos de los más bajos tiene variaciones de más de 2 mg/kg. Por el contrario, la fracción enlazada a óxidos de hierro muestra en todos los tratamientos una reducción significativa de la concentración (de más de 2 mg/kg en algunos casos) siendo *Serratia M119* la de mayor influencia, seguida de *Lysinibacillus 188*, *Serratia K120* y *Klebsiella M173* mostraron valores menores la testigo mientras que *Enterobacter M156* tuvo concentraciones ligeramente mayores a este.

La fracción enlazada a materia orgánica mostró resultados variantes, *Enterobacter M156* y *Klebsiella M173* indicaron valores ligeramente inferiores a blanco mientras que el resto de las cepas mostraron valores superiores al blanco y al testigo.



III.1.7 Plomo

En la fracción soluble puede observarse que no existe una variación significativa en la concentración de plomo del testigo en comparación con los tratamientos, mismo caso en la fracción unida a carbonatos y en la fracción unida a materia orgánica (Figura 11).

Algunas variaciones pueden observarse en la fracción intercambiable, donde todas las cepas presentan ligeramente menor concentración de plomo que el blanco, especialmente *Lysinibacillus M188*, esta cepa también muestra este efecto en la fracción enlazada a oxihidróxidos.

La inmovilización de plomo sucede de la fracción unida a óxidos de hierro a la fracción unida a sulfuros principalmente por *Serratia M119*.

Para la fracción residual los valores obtenidos fueron no detectables excepto en el caso del tratamiento con *Lysinibacillus M188* que muestra concentración de 0.86 mg/kg.

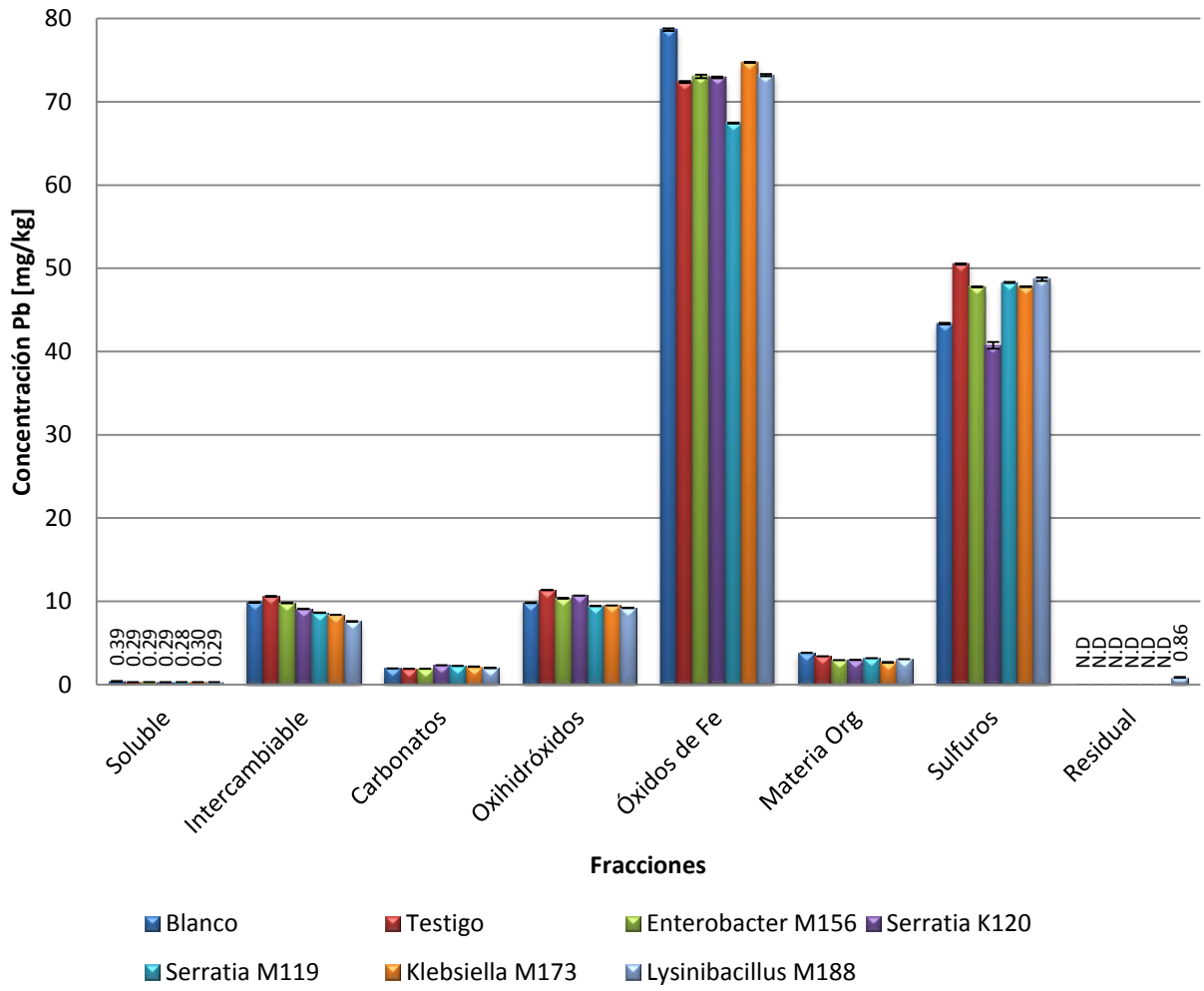


Figura 11. Gráfica de concentración de Plomo en mg/kg en las diferentes fracciones de la extracción secuencial.

III.1.8 Arsénico

En la fracción soluble se puede observar (Figura 12) que *Serratia M119* aumentó la concentración de arsénico, más de 10 veces (2.08 mg/kg a 23.06 mg/kg), así como *Lysinibacillus M188* que aumentó la concentración más de 8 veces con respecto del blanco (2.08 a 16.49 mg/kg), por último *Klebsiella M173* también mostró aumento en esta fracción de más de 7 veces con respecto del blanco (2.08 a 14.24 mg/kg). Por otro lado *Serratia Marcescens K120* así como *Enterobacter M156* muestran una reducción de la concentración de arsénico en esta fracción hasta límites no detectables.

En la fracción intercambiable puede observarse que todas las cepas mostraron concentraciones más bajas que el blanco y que el testigo. *Lysinibacillus M188* fue el que menor reducción de As presentó, con valores muy parecidos al testigo, después de éste *Serratia K120*, que redujo hasta 80 mg/kg con respecto del blanco, caso muy parecido de *Enterobacter M156*, finalmente *Serratia M119* fue la que presentó mayor descenso en la concentración de arsénico, de más de 120 unidades de diferencia con respecto del blanco.

En la fracción enlazada a carbonatos se puede observar que *Klebsiella M173* no presentó mucha influencia en la concentración de arsénico, *Enterobacter M156* y *Serratia K120* presentaron valores del doble de la concentración presentes en el blanco, mientras que *Lysinibacillus M188* presentó concentraciones de casi 5 veces los valores obtenidos para el blanco y el testigo.

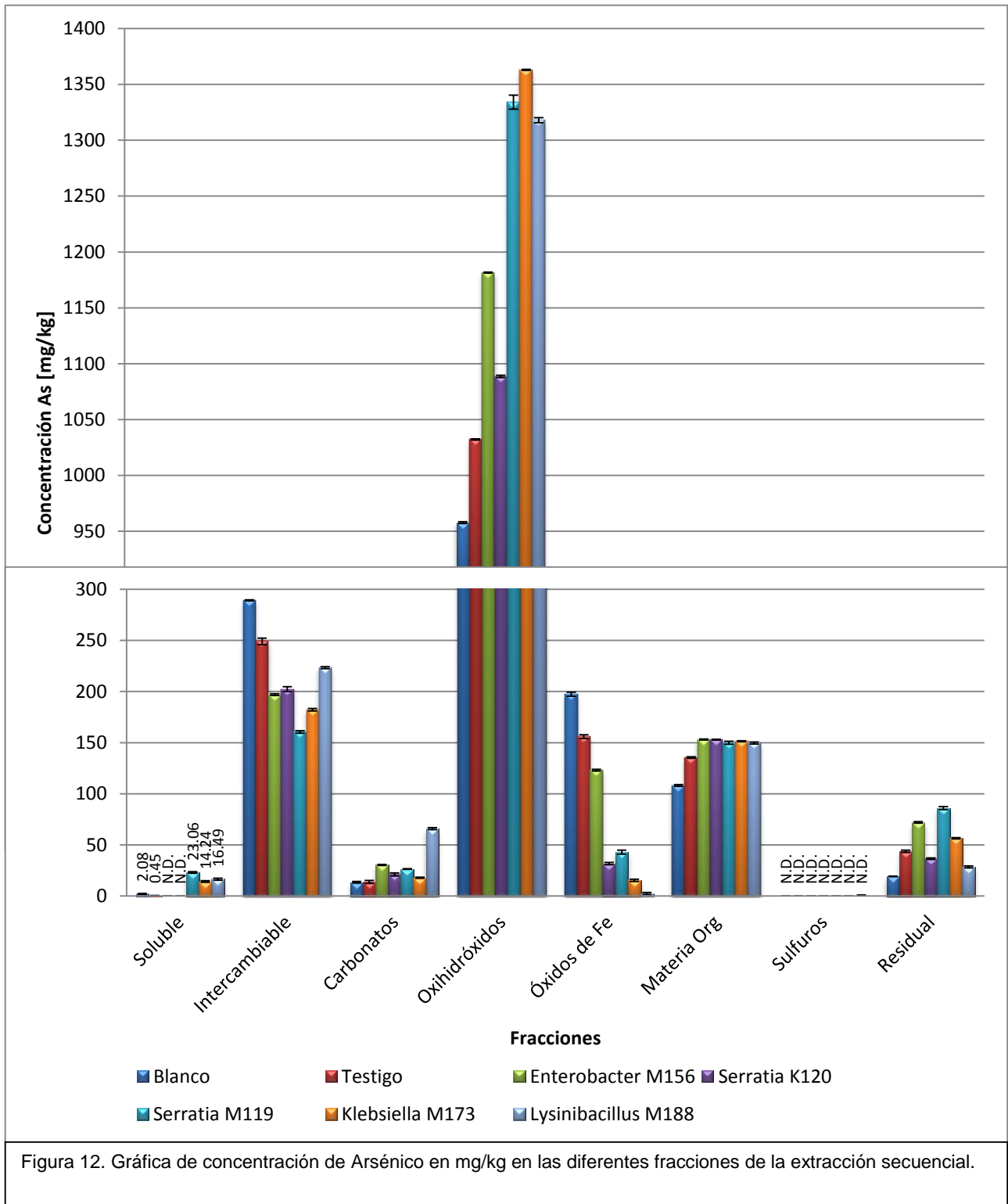
En la fracción enlazada a oxihidróxidos de Fe es donde se observaron mayores variaciones de concentración por las bacterias, todas las cepas mostraron un incremento notable en la concentración de arsénico en esta fracción más que en cualquier otra. También es la fracción que arrojó mayor concentración de arsénico. La cepa con valores más cercanos al blanco fue *Serratia K120*, sin embargo la diferencia es de alrededor de 100 unidades, seguida de esta se encuentra *Enterobacter M156* cuyo aumento de concentración fue de alrededor de 200 unidades. Las cepas que

mostraron mayor influencia en esta fracción fueron *Lysinibacillus M188*, *Serratia M119* y mayormente *Klebsiella M173* con más de 300 unidades de aumento.

Con respecto a la fracción enlazada a óxidos de Fe, sucedió lo inverso, presentando todas las cepas concentraciones menores a las del blanco y el testigo, en especial por *Lysinibacillus M188* que casi redujo por completo la concentración de arsénico en esta fracción, seguido por *Klebsiella M173*, después *Serratia K120* y *M119*, por ultimo *Enterobacter M156*, la cual mostró valores más cercanos al testigo.

En la fracción unida a materia orgánica todas las cepas muestran valores muy parecidos, con concentraciones ligeramente superiores la blanco y al testigo, mientras que en la fracción enlazada a sulfuros no se obtuvieron concentraciones detectables en ninguna de los casos.

En la fracción residual se puede observar una mayor concentración en las cepas *Serratia M119* principalmente y *Enterobacter M156*, seguidas de *Klebsiella M173*, mientras que *Serratia K120* y *Lysinibacillus M188* muestran la menor concentración de arsénico.



III.2 Discusión de resultados

Las pruebas mostraron una clara influencia de las bacterias en la movilidad de los elementos potencialmente tóxicos en diferentes fracciones.

Con respecto a Fe, puede observarse que está presente en altas concentraciones, los valores más altos fueron obtenidos en la fracción residual (casi 800 mg/kg), probablemente por asociaciones formadas con silicatos, seguida de la fracción de óxidos de hierro (entre 550 y 600 mg/kg), después la fracción enlazada a sulfuros con valores alrededor de 500 mg/kg, probablemente por la formación de pirita (FeS_2) (Torres E., *et al.*, 2013; Dold B., *et al.*, 2001; Moreno R., *et al.*, 2009) o calcopirita (CuFeS_2) (Moreno R., *et al.*, 2009) y la fracción de óxidos de Fe (alrededor de 96 mg/kg), en el resto de las fracciones los valores obtenidos fueron muy bajos o no detectables. Torres E. y Auleda M. (2013) mencionan que los elementos más importantes en la transformación de los metales o metaloides es el hierro y el azufre, por su parte Hullebusch E., *et al.* (2005) menciona que uno de los factores más importantes que definen la especiación de los EPT son los óxidos e hidróxidos de Fe.

Con respecto a la influencia de los tratamientos se observa que en la inoculación con *Enterobacter M156* existe movilidad de la fracción de materia orgánica a la fracción de óxidos de Fe, este tratamiento también mostró valores menores a 750 mg/kg en la fracción residual. Los tratamientos con *Serratia K120* y *Klebsiella M173* mostraron capacidad de estas cepas para inmovilizar el metal a la fracción residual.

Manganeso fue uno de los elementos de mayor presencia en ese estudio, reportando valores de hasta 350 mg/kg, los mayores resultados se obtuvieron en la fracción enlazada óxidos (en este caso de manganeso), lo cual coincide con el estudio de Moreno R. *et al.* (2009) que reporta a los óxidos de manganeso como elementos mayoritarios en los jales de Santa María. La presencia de estos compuestos y de los oxihidróxidos de Mn es importante, ya que funciona como quelantes, pues atrapan metales solubles llevándolos a una mayor estabilidad (Kidd, *et al.*, 2009), reduciendo su toxicidad potencial. Hullebusch E., *et al.* (2005) explica que los óxidos de manganeso

son fases secundarias y aceptores de electrones de las bacterias reductoras y son oxidantes relativamente fuertes que pueden oxidar contaminantes reducidos.

Serratia K120 parecen haber influenciado una ligera movilización de Mn, llevándolo de la fracción enlazada a sulfuros a la fracción oxidada, mientras *Lysinibacillus* lo inmovilizó de la fracción oxidada a la residual y *Enterobacter M156* influenció su movilidad de la fracción enlazada a sulfuros a la fracción de óxidos. Por otra parte *Serratia M119* parece haber promovido la movilidad de Mn de la fracción residual a la fracción de óxidos. No pareció haber alteración en las fracciones más biodisponibles, por lo cual puede que este metal no represente riesgo de toxicidad.

Los resultados más altos encontrados para la concentración de Níquel no excedieron de 18 mg/kg, de acuerdo a la NOM-021-SEMARNAT-2000 podría ubicarse en suelos no peligrosos (suelo normal hasta 50 mg/kg).

Puede observarse que para el caso del Níquel la tendencia general de las cepas fue la movilización de este metal, *Enterobacter M156* probablemente de la fracción enlazada a sulfuros a la fracción enlazada a carbonatos, del mismo modo *Serratia K120*, ambas presentaron disminución en la concentración de Ni en la fracción intercambiable. Las otras tres cepas mostraron comportamiento muy parecido, *Serratia M119* mostro movilización de Níquel de la fracción residual a la fracción enlazada a carbonatos y la fracción intercambiable, *Klebsiella M173* mostro movilización de la fracción residual, enlazada a oxihidróxidos de Fe y enlazada a carbonatos a las fracciones soluble e intercambiable, mientras que *Lysinibacillus M188* mostró movilización de la fracción residual y enlazada a carbonatos hacia las fracciones intercambiable y soluble, esto concuerda con la investigación de Ma Y. *et al.* (2009) donde analizando el comportamiento de *Psychrobacter* y dos cepas de *Bacillus* demostró un aumento en la concentración de Ni biodisponible que atribuye a la capacidad de estas bacterias de generar un medio ácido y la producción de sideróforos.

La concentración de Zn para suelos no contaminados se encuentra entre 10 y 300 mg/kg (Marques A. *et al.*, 2013), los valores encontrados en este análisis no sobrepasaron los 30 mg/kg, según la normatividad Mexicana (NOM-021-SEMARNAT) las concentraciones existentes de Zn en los jales podría representar una concentración adecuada como micronutrientes, lo cual permitiría la supervivencia de las plantas. Las mayores concentraciones se obtuvieron en la fracción residual.

Marques A. *et al.*, (2013) sugiere que las BPC pueden utilizar diferentes mecanismos para influenciar la movilidad de Zn y su captación por las plantas, del mismo modo Long X. *et al.*, (2013) demostró que ciertas bacterias pueden utilizarse para la remediación de suelos contaminados con Zn. En los resultados obtenidos el tratamiento con *Klebsiella M173* fue el que presentó mayor concentración en la fracción intercambiable y baja concentración en la fracción residual. *Serratia M119* fue la cepa que presentó menor concentración en la fracción residual, posiblemente debido a una movilización a otras fracciones. *Serratia K120* presentó inmovilización de Zn de la fracción intercambiable a la fracción residual. Por otra parte *Lysinibacillus M188* muestra mayor concentración de Zn en la fracción residual (ligeramente mayor al blanco), posiblemente inmovilizando la fracción soluble, lo cual tiene relación con la investigación de Kuffner M., *et al.*, (2008) que expuso la capacidad de 9 cepas para inmovilizar el Zn en suelos con altas concentraciones de este contaminante.

Con respecto a Cobre, los resultados más altos fueron cercanos a 140 mg/kg en la fracción enlazada a oxihidróxidos de Fe, seguido de su asociación con materia orgánica y la fracción enlazada a sulfuros, probablemente por la existencia de calcopirita (CuFeS_2) (Moreno R. *et al.*, 2009). Si bien el Cu es un micronutriente del suelo y por ende esencial para el desarrollo de la biota si se encuentra en concentraciones cercanas a 0.2 mg/mg (NOM-021-SEMARNAT-2000), Liu W. *et al.* (2014) expone que en concentraciones por encima de 48 mg/kg están asociadas a la reducción de crecimiento en brotes y raíces de plantas de hasta 50%.

A pesar de que existen gran cantidad de artículos publicados con respecto a la capacidad de las bacterias de movilizar Cu (He L., *et al.*, 2010; Sheng X., *et al.*, 2012; Ma Y. *et al.*, 2011; Kidd P., *et al.*, 2009) en esta investigación *Lysinibacillus* muestra una clara inmovilización de Cu, llevándolo hasta la fracción residual. Por otra parte *Serratia M119* y *Klebsiella M173* parecen haber tenido una influencia en la inmovilización de este metal llevándolo de la fracción enlazada a oxihidróxidos de Fe a la fracción enlazada a sulfuros.

El Cadmio es uno de los elementos tóxicos más importantes por sus efectos en la salud humana. Suelos no contaminados por Cd presentan valores menores a 1mg/kg (Marques A., *et al.*, 2013). Los valores encontrados en este estudio superan los 12 mg/kg, según la NOM-021-SEMARNAT-2000 si la concentración se encuentra entre 3 y 5 mg/kg debe considerarse como suelo tóxico para cultivos, sin embargo para la normatividad Mexicana con referencia a las concentraciones totales aún se encuentra dentro de los límites permisibles, a pesar de esto es importante considerar que las condiciones ambientales pueden genera el aumento en las concentraciones de este metal en las fracciones biodisponibles.

Las bacterias utilizadas en este estudio muestran una tendencia general a la movilización del Cd a las fracciones enlazada a carbonatos probablemente proveniente de la fracción enlazada a óxidos de Fe, de esta misma fracción muestran una inmovilización a la fracción enlazada a sulfuros, especialmente por *Klebsiella M173*, *Serratia M119* y *Lysinibacillus M188*. Marques A., *et al.* (2013) expone en su investigación la bacteria promotora *Chrysiobacterium humi* como capaz de reducir la concentración de Cd en las plantas cultivadas en altas concentraciones de este metal, él sugiere que esto se debe a la capacidad de las bacterias de producir quelantes, amonio, bases orgánicas o sideróforos que permiten asociar el metal a otra especie química menos disponible. Por su parte Kuffner M., *et al.*, (2008) mostró en su investigación 9 cepas que fueron capaces de reducir la movilidad de Cd, entre ellas *Serratia Marcescens*, la cual también identificó como productora de sideróforos, sus

resultados son comparables con los de este trabajo puesto que *Serratia M119* fue una de las cepas de mayor influencia en la inmovilización de Cd.

El Plomo es uno de los metales más preocupantes por sus efectos a la salud humana, la normatividad nacional marca límites permisibles para este contaminante en 400 mg/kg para concentración total (NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004) y considerado como peligroso si se encuentra en concentraciones entre 100 y 300 mg/kg (NOM-021-SEMARNAT-2000). Las concentraciones obtenidas para Pb en la fracción enlazada a oxihidróxidos de Fe fue la más alta, con casi 80 mg/kg, si bien se encuentra por debajo de los límites para ser considerado peligroso, no debe descartarse la posibilidad de que, por cambios en el medio, puedan liberarse concentraciones mayores.

La fracción soluble mostró concentraciones bajas de Pb, todos los tratamientos mostraron valores similares. En la fracción intercambiable, todos los tratamientos con bacterias, a excepción de *Enterobacter M156* mostraron concentraciones más bajas que el blanco y el testigo. En la fracción enlazada a carbonatos se midió concentraciones muy parecidas en todos los tratamientos (probablemente se encuentre la especie mineral cerusita $PbCO_3$ (Moreno R., *et al.*, 2009)), resultados parecidos ocurrieron en la fracción enlazada a materia orgánica, donde todos los tratamientos con bacterias mostraron concentraciones semejantes ligeramente menores al blanco y al testigo. La fracción residual arrojó concentraciones no detectables para todos los tratamientos excepto con la bacteria *Lysinibacillus M118* con valores de 0.86 mg/kg.

La interacción más evidente fue entre las fases de oxihidróxidos de Fe y sulfuros probablemente por una oxidación e hidrólisis de galena (PbS) (Moreno R., *et al.*, 2009), puede notarse que los tratamientos con *Enterobacter M156*, *Serratia M119*, *Klebsiella M173* y *Lysinibacillus M118* mostraron una clara inmovilización del Pb. Las investigaciones realizadas con respecto a la movilidad del Pb se han orientado al análisis de la acumulación de este metal en diferentes secciones de las plantas utilizadas para fitoextracción (Li K. *et al.*, 2011; Ullah A. *et al.*, 2015; Kidd P., *et al.*,

2009; Zhang Y., *et al.*, 2011), sin embargo en este estudio puede observarse el efecto contrario con las cepas antes mencionadas.

El arsénico es otro de los elementos potencialmente tóxicos más importantes, y en este estudio presentó los valores más altos que cualquier otro de los metales analizados, alcanzando concentraciones de hasta 1360 mg/kg en la fracción enlazada a oxihidróxidos de Fe, también fue uno de los elementos que presentó más cambios en las concentraciones en cada fracción debido a la influencia bacteriana.

Las concentraciones normadas en el país para este EPT son > 5 mg/L (en fracciones más biodisponibles) para ser considerado residuo peligroso (NOM-052-SEMARNAT-2005) y 22 mg/kg si se pretende usar el área para cultivo, vivienda o comercios, valores muy por debajo de los encontrados en los jales.

El análisis de la movilidad demuestra que los tratamientos con *Serratia M119*, *Klebsiella M173* y *Lysinibacillus M188* aumentaron la movilidad del As llevándolo a la fracción soluble, sin embargo en la fracción siguiente (intercambiable) *Serratia M119* y *Klebsiella M173* muestran las concentraciones más bajas, *Lysinibacillus M188* también tiene una concentración menor al blanco incluso sumando la fracción intercambiable y la fracción soluble, el resto de los tratamientos de igual forma muestran menores concentraciones que el blanco, por lo cual, se puede apreciar que las bacterias realmente redujeron la concentración de este elemento en las fracciones más biodisponibles.

En la fracción enlazada a carbonatos se obtuvieron concentraciones bajas, sin embargo el tratamiento con *Lysinibacillus* produjo concentraciones de más del doble del resto de los tratamientos, posiblemente por la movilización de la fracción enlazada a óxidos de Fe. En la fracción enlazada a oxihidróxidos todos los tratamientos presentaron valores por encima de la concentración del blanco, entre 100 y 400 mg/kg más, probablemente provenientes de la inmovilización de la fracción intercambiable y la movilización de la fracción enlazada a óxidos. La fracción enlazada a materia orgánica muestra concentraciones muy parecidas entre los tratamientos, ligeramente mayores al

blanco, mientras que la fracción enlazada a sulfuros no indicó valores detectables. Finalmente la fracción residual mostró que todos los tratamientos presentaron concentraciones más altas que el blanco, especialmente utilizando las cepas *Enterobacter M156*, *Serratia M119* y *Klebsiella M173*.

Da S., *et al.* (2014) estudió la capacidad de doce bacterias resistentes a As, entre ellas *Enterobacter sp.* y *Klebsiella sp.* En su investigación describe a esta última como capaz de oxidar As y por lo tanto hacerlo más estable, lo cual concuerda con esta investigación ya que *Klebsiella M173* fue la que mostró mayor capacidad de asociar As a la fracción de oxihidróxidos de Fe. Armendariz A., *et al.*, (2015) mencionan algunas características importantes para utilización de bacterias para el tratamiento de suelos contaminados, encontradas en *Azospirillum brasilense* como alta tolerancia a As, habilidad para oxidarlo y capacidad para acumularlo. Otras investigaciones con respecto a este semimetal han estado orientadas a la capacidad de las bacterias de acumular este elemento en secciones de la planta, como las raíces o brotes (Ullah A., *et al.*, 2015; Kidd P., *et al.*, 2009)

Conclusión

Las bacterias promotoras de crecimiento vegetal tienen influencia en la movilidad de los elementos potencialmente tóxicos y pueden ser utilizadas para promover la inmovilización de éstos complementando los procesos de fitoestabilización. En los jales de minas de Santa María pudo observarse altas concentraciones de EPT como Cadmio, Cobre y Arsénico, sobrepasando los límites establecidos en la normatividad mexicana convirtiéndolos en una fuente potencial de contaminación al medio ambiente, sin embargo las bacterias promotoras del crecimiento utilizadas (*Enterobacter M156*, *Serratia M119*, *Serratia K120*, *Klebsiella M173* y *Lysinibacillus M188*) en este estudio mostraron la capacidad de inmovilizar los elementos tóxicos de los jales y por lo tanto son buenos candidatos para ser utilizados en procesos de estabilización de metales.

El tratamiento con *Enterobacter M156* movilizó de Hierro, Manganeso y Níquel e inmovilizó de Cadmio, Plomo y Arsénico. Con respecto a la inoculación de la bacteria *Serratia K120* mostró movilización de Níquel y Cadmio mientras que Hierro, Zinc y Arsénico fueron inmovilizados. La bacteria *Serratia M119* influyó en la movilidad de Manganeso, Níquel y Zinc e influyó la inmovilización de Cadmio, Plomo, Cobre y Arsénico. El ensayo realizado con *Klebsiella M173* mostró movilización de Níquel y Zinc e inmovilización de Hierro, Cobre, Cadmio, Plomo y Arsénico. Por último, los resultados muestran que el tratamiento con *Lysinibacillus M188* influyó en la movilización de Níquel y en la inmovilización de Manganeso, Zinc, Cobre, Cadmio, Plomo y Arsénico. *Lysinibacillus M188* y *Klebsiella M173* son las mejores candidatas para promover los procesos de estabilización de metales debido a su capacidad de inmovilización de elementos potencialmente tóxicos principalmente Cobre, Cadmio, Plomo y Arsénico.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Armendariz A., Talano M., Oller A., Medina M. y Agostini E. (2015). Effect of arsenic on tolerance mechanisms of two plant growth-promoting bacteria used as biological inoculants. *JOURNAL OF ENVIRONMENTAL SCIENCES* 33, 203–210.
2. Becerra-Castro C., Monterroso C., Prieto-Fernández A., Rodriguez-Lamas L., Loureiro-Viñas M. *et al.* (2012). Pseudometallophytes colonising Pb/Zn mine tailings: A description of the plant–microorganism–rhizosphere soil system and isolation of metal-tolerant bacteria. *Journal of Hazardous Materials*, 217– 218, 350– 359.
3. Das S., Jean J., Kar S., Chou M. y Chen C. (2014) Screening of plant growth-promoting traits in arsenic-resistant bacteria isolated from agricultural soil and their potential implication for arsenic bioremediation. *Journal of Hazardous Materials*, 272, 112–120.
4. Dold B., y Fontboté L. (2001). Element cycling and secondary mineralogy in porphyry copper tailings as a function of climate, primary mineralogy, and mineral processing. *Journal of Geochemical Exploration*, 74, 3-55.
5. Duker A., Carranza E. y Hale M. (2005). Arsenic geochemistry and health. *Environment International*, 31, 631– 641.
6. Favas P., Pratas, J., Gomes M. y Cala V. (2011). Selective chemical extraction of heavy metals in tailings and soils contaminated by mining activity: Environmental implications. *Journal of Geochemical Exploration*, 111, 160–171.
7. Grandlic C., Palmer M. y Maier R. (2009). Optimization of plant growth-promoting bacteria-assisted phytostabilization of mine tailings. *Soil Biology & Biochemistry*, 41, 1734–1740.
8. Grobelak A., Napora A. y Kacprzak M. (2015). Using plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) to improve plant growth. *Ecological Engineering*, 84, 22–28.

9. Hall G., Vaive J., Beer R. y Hoashi M. (1996). Selective leaches revised, with emphasis on the amorphous Fe oxihydroxide phase extraction. *Journal of Chemical Exploration*, 56, 59-78.
10. He L., Zhang Y., Ma H., Su L., Chen Z., et al. (2010). Characterization of copper-resistant bacteria and assessment of bacterial communities in rhizosphere soils of copper-tolerant plants. *Applied Soil Ecology*, 44, 49–55.
11. Hullebusch E., Lens P., y Tabak, H. (2005). Developments in bioremediation of soils and sediments polluted with metals and radionuclides. 3. Influence of chemical speciation and bioavailability on contaminants immobilization/mobilization bio-processes. *Reviews in Environmental Science & Bio/Technology*, 4, 185–212.
12. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Banco de Información Estadística. Recuperado el día 25 de octubre de 2015. Disponible en: <http://www.inegi.org.mx/Sistemas/BIE/>
13. Kidd P., Barceló J., Bernal M., Navari-Izzo F., Poschenrieder C., Shilev S., et al. (2009). Trace element behaviour at the root–soil interface: Implications in phytoremediation. *Environmental and Experimental Botany*, 67, 243–259.
14. Kuffner M., Puschenreiter M., Wieshammer G., Gorfer M. y Sessitsch A. (2008). Rhizosphere bacteria affect growth and metal uptake of heavy metal accumulating willows. *Plant Soil* 304, 35–44.
15. Liu W., Yang C., Shi S. y Shu W. (2014). Effect of plant growth-promoting bacteria isolated from copper tailings on plants in sterilized and non-sterilized tailings. *Chemosphere*, 97, 47-53.
16. Long X., Chen X., Wong J., Wei Z., y Wu Q. (2013). Feasibility of enhanced phytoextraction of Zn contaminated soil with Zn mobilizing and plant growth promoting endophytic bacteria. *Transaction of Nonferrous Metal Society of China*, 23, 2389–2396.
17. Lubomir S., Vardan S. (Edit). (2008). *Soil Chemical Pollution, Risk Assessment, Remediation and Security*. NATO Science for Peace and Security Series - C: Environmental Security. (pp.95-116).

18. Ma Y., Rajkumar M. y Freitas H. (2009). Improvement of plant growth and nickel uptake by nickel resistant-plant-growth promoting bacteria. *Journal of Hazardous Materials*, 166, 1154–1161.
19. Ma Y., Prasad M., Rajkumar M. y Freitas H. (2010) Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils. *Biotechnology Advances*, 29, 248–258.
20. Marques A., Moreira H., Franco A., Rangel A., y Castro P. (2013). Inoculating *Helianthus annuus* (sunflower) grown in zinc and cadmium contaminated soils with plant growth promoting bacteria – Effects on phytoremediation strategies. *Chemosphere*, 92, 74–83.
21. Martínez Y., y Rivero C. (2005). Evaluación de diferentes métodos para determinar las fracciones de metales pesados presentes en el suelo. *Revista Ingeniería UC* (12) 3, 14-20.
22. Moreno R., Barbanson L. y Coreño O. (2009). Neoformación mineralógica en residuos mineros (jales) del distrito minero Zimapán, estado de Hidalgo, México. *Minería y Geología* (2) 25, 1-31.
23. Nava C. (2007). *Manejo ambiental de los relaves o jales mineros*. Recuperado el día 30 de agosto de 2015. Disponible en:
<http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/gacetas/155/cortinas.html>
24. NORMA Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000, que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis. Recuperado el 10 de octubre de 2015. Disponible en:
http://biblioteca.semarnat.gob.mx/janium-bin/janium_login_opac.pl?find&ficha_no=213663
25. NORMA Oficial Mexicana NOM-052-SEMARNAT-2005 5, Que establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de los residuos peligrosos. Recuperado el 10 de octubre de 2015. Disponible en:
<http://www.semarnat.gob.mx/leyes-y-normas/nom-residuos-peligrosos>
26. NORMA Oficial Mexicana NOM-141-SEMARNAT-2003, Que establece el procedimiento para caracterizar los jales, así como las especificaciones y criterios para la caracterización y preparación del sitio, proyecto, construcción,

operación y postoperación de presas de jales. Recuperado el 10 de octubre de 2015. Disponible en:

http://biblioteca.semarnat.gob.mx/janium-bin/janium_login_opac.pl?find&ficha_no=201543

27. NORMA Oficial Mexicana NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004, Que establece criterios 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. Recuperado el 10 de octubre de 2015. Disponible en:
http://biblioteca.semarnat.gob.mx/janium-bin/janium_login_opac.pl?find&ficha_no=176471
28. Ongley L., Sherman L., Armienta A., Concilio A., y Salinas C. (2007). Arsenic in the soils of Zimapán, Mexico. *Environmental Pollution*, 145, 793-799.
29. Secretaría de Economía. (s.f.). *Comunidad de Negocios-Minería*. Recuperado el día 20 de marzo de 2015. Disponible en:
<http://www.economia.gob.mx/comunidad-negocios/mineria>
30. Servicio Geológico Mexicano. (2011). Panorama Minero del Estado de Hidalgo. Recuperado el día 23 enero de 2015. Disponible en:
<http://www.sgm.gob.mx/pdfs/HIDALGO.pdf>
31. Servicio Geológico Mexicano. (2014^a). Mining Metallurgical Production. *Statistical Yearbook of the Mexican Mining, 2013* (p.63). Hidalgo, México: SE.
32. Servicio Geológico Mexicano. (2014^b). Mining Metallurgical Production. *Statistical Yearbook of the Mexican Mining, 2013* (p.139). Hidalgo, México: SE.
33. Sheng X., Sun L., Huang Z., He L., Zhang W. y Chen Z. (2012) Promotion of growth and Cu accumulation of bio-energy crop (*Zea mays*) by bacteria: Implications for energy plant biomass production and phytoremediation. *Journal of Environmental Management* 103, 58-64.
34. Sheng X., Xia J., Jiang C., He L. y Quian M. (2008). Characterization of heavy metal-resistant endophytic bacteria from rape (*Brassica napus*) roots and their potential in promoting the growth and lead accumulation of rape. *Environmental Pollution*, 156, 1164–1170.

35. Tessier A., Campbell P. G. C., & Bisson M. (1979). Sequential Extraction Procedure for the Speciation of Particulate Trace Metals. *ANALYTICAL CHEMISTRY*, (51) 7, 844-851.
36. Torres E. y Auleda M. (2013). A sequential extraction procedure for sediments affected by acid mine drainage. *Journal of Geochemical Exploration*, 128, 35-41.
37. Ullah A., Heng S., Hussain M., Fahad S. y Yang X. (2015). Phytoremediation of heavy metals assisted by plant growth promoting (PGP) bacteria: A review. *Environmental and Experimental Botany*, 117, 28–40.
38. U.S. Department of Health & Human Services. (s.f.) Survey of Toxic Substances. *Center for Disease Control and Prevention*. 4, 179-204.
39. US-EPA (2015). Particle Pollution (PM). Recuperado el día 10 de septiembre de 2015. Disponible en:
<http://cfpub.epa.gov/airnow/index.cfm?action=aqibasics.particle>
40. US-EPA (1996). Method 3052. Recuperado el día 10 de septiembre de 2015. Disponible en:
www3.epa.gov/epawaste/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3052.pdf
41. Zhang Y., He L., Chen Z., Zhang W., Wang Q., *et al.* (2011) Characterization of lead-resistant and ACC desaminase-producing endophytic bacteria and their potential in promoting lead accumulation of rape. *Journal of Hazardous Materials*, 186, 1720-1725.

