



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

FITORREMEDIACIÓN DE RELAVES MINEROS CON
HELIANTHUS ANNUUS ASISTIDA POR CONSORCIOS
BACTERIANOS PROMOTORES DEL CRECIMIENTO
VEGETAL.

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIATURA EN INGENIERÍA AMBIENTAL

PRESENTA:
MARÍA FERNANDA VÁSQUEZ CONTRERAS

DIRECTOR DE TESIS:
DR. JOSÉ CARLOS MENDOZA HERNANDEZ

ASESORA:
DRA. JUANA DEYSI SANTAMARÍA JUÁREZ

PUEBLA, PUE. JUNIO DE 2023

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| INTRODUCCIÓN | 5 |
| PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA..... | 6 |
| JUSTIFICACIÓN | 7 |
| OBJETIVOS | 9 |
| Objetivo general | 9 |
| Objetivos específicos..... | 9 |
| HIPÓTESIS | 9 |
| CAPITULO I. ANTECEDENTES..... | 10 |
| MARCO TEÓRICO | 10 |
| 1.1 Relaves mineros..... | 10 |
| 1.2 Metales Pesados..... | 11 |
| 1.2.1 Hierro | 12 |
| 1.2.2 Cobre | 12 |
| 1.2.3 Manganeso | 12 |
| 1.2.4 Cromo | 12 |
| 1.2.5 Cadmio | 13 |
| 1.2.6 Plomo | 13 |
| 1.2.7 Arsénico | 14 |
| 1.3 Efectos adversos de los metales pesados en las plantas..... | 14 |
| 1.4 Especies reactivas de oxígeno (ROS)..... | 15 |
| 1.5 Biorremediación..... | 16 |
| 1.6 Fitorremediación..... | 18 |
| 1.7 Mecanismos de acción de las plantas ante metales pesados | 20 |
| 1.9 Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (BPCV)..... | 21 |
| 1.9.1 Fijación de nitrógeno | 22 |
| 1.9.2 Solubilización de fosfato | 23 |
| 1.9.3 Producción de fitohormonas | 23 |
| 1.9.4 Auxinas | 24 |
| 1.9.5 Citoquininas | 24 |
| 1.9.6 ACC desaminasa | 24 |
| 1.9.7 Sideróforos | 25 |

| | |
|---|----|
| 1.10 La fitorremediación y las Bacterias Promotoras del crecimiento vegetal (BPCV) | 25 |
| CAPITULO II. METODOLOGÍA | 27 |
| 2.1 Caracterización y selección de las cepas bacterianas promotoras del crecimiento vegetal | 27 |
| 2.2 Preparación del inoculo | 27 |
| 2.3 Diseño experimental | 28 |
| 2.4 Preparación de maceta..... | 30 |
| 2.5 Preparación de semillas | 31 |
| 2.6 Siembra en maceta | 31 |
| 2.7 Medición de las plantas | 31 |
| 2.8 Monitoreo de Helianthus annuus | 32 |
| 2.9 Medición de raíces | 32 |
| 2.10 Extracción de plantas | 33 |
| 2.11 Determinación de metales | 33 |
| 2.12 Determinación de los factores de translocación y bioacumulación..... | 35 |
| 2.13 Análisis estadístico..... | 36 |
| CAPITULO III. RESULTADOS..... | 37 |
| 3.1 Análisis de la longitud de tallo y raíz | 37 |
| 3.2 Análisis de hojas..... | 40 |
| 3.3 Concentración de metales en los relaves mineros. | 40 |
| 3.4 Concentración de metales en los diferentes tratamientos | 41 |
| 3.4.1 Concentración de cadmio | 42 |
| 3.4.2 Concentración de plomo | 43 |
| 3.4.3 Concentración de cromo | 44 |
| 3.4.4 Concentración de cobre | 45 |
| 3.4.5 Concentración de hierro | 46 |
| 3.4.6 Concentración manganeso..... | 46 |
| 3.4.7 Concentración arsénico..... | 47 |
| 3.5 Factor de translocación | 48 |
| 3.6 Factor de bioacumulación | 49 |
| 3.7 Factor de Transferencia en la parte aérea y raíces | 49 |
| 3.7 DISCUSIÓN DE RESULTADOS..... | 51 |
| CONCLUSIONES..... | 53 |

BIBLIOGRAFÍA..... 54

INTRODUCCIÓN

La minería es la actividad económica que más se ejerce en México, es fundamental para el desarrollo industrial debido a la riqueza minera que hay dentro del país. Esto convierte a México en el número 10 de los productores de minerales a nivel internacional, debido a que cubre gran parte de la demanda requerida por otros países, su tasa de rentabilidad incrementa cada vez más , ya que la industria minera es cuatro veces superior a cualquier otro proceso industrial, puesto que produce cerca de 16 minerales con alta demanda como el oro, plata, cobre, plomo y el zinc, estos son los principales minerales que México exporta a otras partes del mundo, los cuales son extraídos de estados mineros como Sonora, Zacatecas, Coahuila, Hidalgo, San Luís Potosí, entre otros, donde Sonora es el principal productor de Cobre y oro del país, con el 34% y 81.3% , Zacatecas por su parte es el principal productor de plata, lo cual esto aumenta el desarrollo socioeconómico del país, generando empleos que benefician a la población.

La actividad minera aumenta el desarrollo económico del país, pero a pesar de eso, muchos pobladores que habitan cerca de las minas, suelen estar en desacuerdo por los impactos que se generan desde su construcción hasta su operación, estas industrias mineras se caracterizan por usar grandes cantidades de agua y energía para la extracción de minerales, además de una gran generación de residuos (relaves mineros) en el proceso de extracción, después de separar los minerales de interés. La generación de estos residuos genera impactos importantes para el ecosistema como su destrucción, pero hay otras situaciones que generan afectaciones, como los derrames, causantes de envenenamiento a fuentes agua, ocasionando daño a la salud de los pobladores que se encuentran alrededor de estas minas. La extracción de estos afecta la salud, el bienestar

de los trabajadores y de la población en general, así como la fauna (Azamar, 2021; Martín *et al.*, 2016).

Es de suma importancia dar a conocer los riesgos e impactos que genera la extracción de estos minerales, ya que las repercusiones al medio ambiente serán cada vez mayor a medida que aumente la actividad industrial en el país.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En México la minería es una de las actividades con mayor importancia en diferentes aspectos para el desarrollo económico y social, puesto que produce la materia prima que es utilizada en la mayoría de los procesos industriales, convirtiendo a México en un país productor a nivel mundial en los metales industriales y preciosos (SGM, 2013). Esta actividad minera extrae los minerales y posteriormente por diferentes procesos, separan los minerales valorizables, produciendo residuos tóxicos como relaves mineros que se encuentran en depósitos a cielo abierto, lo que traen consigo impactos ambientales notorios, destacando: la contaminación de acuíferos con metales pesados por lixiviación, drenaje ácido, la contaminación de suelo por la remoción de la cubierta vegetal y generación de altas cantidades de escombros contaminantes (Moran, 2000; WRI, 2004). Estos impactos suelen ser cada vez mayor, generando un aumento de áreas afectadas en todo el mundo a causa de la creciente urbanización e industrialización (Ali *et al.*, 2013). El impacto del entorno ecológico se puede dar de dos formas principales: por dispersión eólica donde las fracciones finas de los relaves mineros (siendo menores de 2.5 μm), que permanecen en el aire en forma de partículas suspendidas, movilizándose hasta cientos de kilómetros, la segunda es la lixiviación, donde se lleva a cabo una disolución de los metales en un líquido, dando como resultado elementos tóxicos que contaminan

fuentes de abastecimiento de agua, donde estos abastecimientos contaminados al ser ingeridos por el hombre, trae consigo daños a la salud, afectando la calidad de vida de los seres humanos.

Además la contaminación de suelo por relaves mineros perjudica a los microorganismos que habitan en él, debido a la reducción de ejemplares y por ende a la actividad benéfica que se produce en el suelo. Asimismo es una amenaza importante para el ecosistema, producción agrícola y la salud humana por que pueden transferirse a la cadena trófica, lo cual representa un riesgo a consecuencia de la alta toxicidad de los metales (Briffa *et al.*, 2020). En los seres humanos esta exposición aguda a los metales provoca efectos nocivos para la salud como: cáncer, daños al sistema circulatorio, lesiones cutáneas, sistema nervioso, daño cerebral y renal, ansiedad, enfermedades autoinmunes, depresión, enfermedades respiratorias, entre otras. Estos efectos se deben a la unión de metales en sitios activos que fisiológicamente son ocupados por metales esenciales, desactivando moléculas como enzimas y cambiando la formación de moléculas biológicas como proteínas y ácidos nucleicos; de esta manera, alteran la integridad de células y membranas, haciéndolas inactivas (Jjemba, 2004), creando un estrés oxidativo en las células, además de acumularse en el organismo (bioacumulación), lo cual hace imposible la expulsión de los metales por el mismo organismo.

JUSTIFICACIÓN

Para tratar la contaminación de sitios por los relaves mineros se han implementado alternativas fisicoquímicas como biológicas que ayuden a remediar el sitio. Las fisicoquímicas, suelen tener un alto costo y su desgastante manejo no suelen ser de gran eficacia, a comparación de las biológicas como lo es la fitorremediación.

La fitorremediación a comparación de los métodos fisicoquímicos, suele ser una alternativa a un menor costo, que contribuye a la fijación de CO₂ atmosférico, es impulsada por la energía solar y es respetuosa con el medio ambiente para la recuperación de sitios contaminados como lo son los relaves mineros. Esta fitotecnología se hace más efectiva cuando se inoculan bacterias promotoras del crecimiento vegetal que habitan en la rizósfera, debido a que alivian la fitotoxicidad y ayudan en la disponibilidad de nutrientes minerales mejorando la biomasa en suelos contaminados. Estos beneficios se atribuyen, a la interacción de las raíces con microorganismos, que promueven acciones benéficas las cuales conducen a un mejor desempeño de crecimiento de las plantas, lo que resulta en un proceso de fitorremediación más rápido y eficiente. Esto suele darse por procesos como; la captación de agua por la planta, liberación de compuestos orgánicos al suelo por las raíces y la captura de nutrientes por parte de los microorganismos.

Las bacterias pueden apoyar en la inmovilización de los metales (Gadd, 2000) puesto que sintetizan vitaminas, aminoácidos, auxinas, citoquininas y gibelinas, que aumentan la germinación y ayudan en el desarrollo de pelos radicales (Brown 1976). La producción de ácido indolacético (AIA) de las bacterias estimula el crecimiento de la raíz. Además muestran antagonismo hacia patógenos de las plantas por la producción de antibióticos y aumentan el fósforo produciendo ácidos, liberando formas solubles de fosfatos.

Los beneficios analizados en los últimos años de la relación microorganismo- planta en procesos ambientales, suele ser muy ilimitada, por lo que es necesario seguir analizando los efectos de planta – microorganismo para la biorremediación de sitios contaminados.

OBJETIVOS

Objetivo general

Realizar un sistema de fitorremediación de relaves mineros con *Helianthus annuus* asistida por consorcios de bacterias promotoras del crecimiento vegetal.

Objetivos específicos

1. Evaluar el desarrollo de las plantas en relaves mineros con y sin BPCV.
2. Analizar las concentraciones de los metales (As, Cd, Cu, Pb, Fe, Cr, Mn) por absorción atómica en la zona aérea y en las raíces de la planta.
3. Analizar los factores de transferencia y bioacumulación en las plantas de *Helianthus annuus*.
4. Analizar las concentraciones de metales en los relaves mineros.

HIPÓTESIS

La fitorremediación asistida por consorcios de BPCV con *Helianthus annuus* mejorará el crecimiento de las plantas ante el estrés y modificara los factores de transferencia y acumulación de los metales pesados.

CAPITULO I. ANTECEDENTES

MARCO TEÓRICO

1.1 Relaves mineros

En la industria minera, los minerales son extraídos y se concentran al utilizar métodos físicos, donde se separan los materiales valorizables y los residuos que contienen metales pesados con una alta concentración en forma de lodos conocidos como relaves mineros, los cuales son depositados al aire libre sin ningún tratamiento. Durante este proceso se genera una cifra de 850 kg de relaves mineros (Cortinas, 2013), siendo una cantidad muy grande de residuos que contiene metales pesados, por una cantidad muy pequeña de materia prima obtenida en el proceso. La descarga anual de relaves mineros en el mundo supera los 10 mil millones de toneladas (Adiansyah *et al.*, 2015).

Los estanques donde son depositados los relaves mineros, no solo dañan recursos terrestres locales, producen una grave contaminación ambiental, provocando efectos nocivos en los ecosistemas como la inhibición de raíces, clorosis en las hojas y una menor producción de biomasa (Jadia *et al.*, 2009), afectando el crecimiento de las plantas, lo que conduce a la muerte celular (Schmidt, 2003).

Dentro de los relaves mineros podemos encontrar metales pesados como el zinc, cadmio, plomo, níquel, selenio, molibdeno, telurio y arsénico (Remon *et al.*, 2005), los cuales no pueden degradarse de forma natural o biológica ya que no tienen funciones metabólicas específicas para los seres vivos (Abollino *et al.*, 2002) y persisten durante siglos después de su introducción en suelos (Bolan *et al.*, 2004).

1.2 Metales Pesados

La introducción de los metales pesados en el medio ambiente, puede ser por eventos naturales como erupciones volcánicas, incendios forestales, o por actividades antropogénicas como operaciones mineras, efluentes industriales y aplicación de fertilizantes (Ati-Hellal *et al.*, 2021). Son caracterizados por su alta masa atómica y su toxicidad para los organismos vivos, estos son importantes en la contaminación ambiental, ya que son letales para los organismos y pueden volverse fuertemente tóxicos al mezclarse con diferentes elementos ambientales, como el agua, suelo y aire. Las concentraciones de metales pesados están relacionados por el tipo de suelo y el genotipo de planta (Mitra *et al.*, 2022).

El grado de disponibilidad de los metales pesados (MP) depende del pH, potencial de óxido- reducción, y de la composición química del material, además de las condiciones climáticas de la región, lo cual determina el desarrollo y la velocidad de los procesos físicos y químicos que influyen en la liberación y retención (Armienta *et al.*, 2005). Están considerados como peligrosos por su toxicidad, y por su tasa a bioacumularse e inducir estrés oxidativo en las células aumentando las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en ingles). Los MP aumentan la producción de ROS por la generación de radicales libres y la inhibición de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD).

Los metales pesados causan cierta toxicidad en órganos como neurotoxicidad, hepatotoxicidad, toxicidad cardiovascular, entre otras (Mitra *et al.*, 2022), debido a que no son biodegradables, tienen vida media prolongada y los organismos no pueden

descomponerlos, por lo que permanecen en las partes del cuerpo, representando un riesgo para la salud.

Los metales se pueden clasificar según su efecto biológico; esencial por tener una función biológica en el sistema y los metales no esenciales por no tener un papel beneficioso en la función biológica. Los metales esenciales como el cobre, hierro y manganeso, forman complejos con compuestos orgánicos como aminoácidos, proteínas y péptidos sin embargo a grandes concentraciones son altamente tóxicos para los organismos. Los no esenciales incluyen el cadmio, plomo y mercurio (Ati-Hellal *et al.*, 2021)

1.2.1 Hierro

En el organismo se encuentra como compuestos hemo (hemoglobina o mioglobina), ayuda en el transporte de oxígeno, respiración, regulación de genes y síntesis del ADN (Ati-Hellal *et al.*, 2021).

1.2.2 Cobre

El cobre es esencial para la actividad enzimática, la regulación de la expresión de génica, el crecimiento, producción de células sanguíneas y transporte de hierro (Ati-Hellal *et al.*, 2021).

1.2.3 Manganeso

La exposición a una gran cantidad de manganeso puede provocar complicaciones neurológicas, como el Alzheimer, Parkinson y muerte celular (Goldhaber, 2003).

1.2.4 Cromo

En el medio ambiente se encuentra en dos estados de oxidación: cromo (III) y cromo (VI) (VI). El cromo (III) es la forma menos peligrosa de cromo. La conversión de cromo (VI) en cromo (III) es menos dañina para el medio ambiente por su menor toxicidad (Mitra *et al.*, 2022). El cromo (VI) aumenta los niveles de ROS, peroxidación de lípidos,

supresión de síntesis de ADN, ARN y proteínas, disminución de enzimas antioxidantes, detención de crecimiento celular, ocasionado por la hepatotoxicidad por cromo (VI) (Hassanein *et al.*, 2019).

1.2.5 Cadmio

El cadmio es un elemento no esencial altamente tóxico, presente en los minerales de plomo, cobre, así como en fosfatos naturales, está asociado con el zinc, este puede encontrarse en la sangre, orina, cabello y uñas como biomarcadores de exposición a cadmio (Ati-Hellal *et al.*, 2021; Achparaki *et al.*, 2012). Se acumula en el hígado causando disfunciones hepáticas, provocando insuficiencia hepática, aumentando el riesgo de cáncer (Hyder *et al.*, 2013). La exposición moderada a cadmio produce hipertensión (Tellez – Plaza *et al.*, 2008) diabetes (Schwart *et al.*, 2003), accidente cerebrovascular e insuficiencia cardíaca (Peters *et al.*, 2010). Además de afectar órganos como riñones, pulmones y próstata (Satarug *et al.*, 2003). Este metal muestra una tasa alta de transferencia del suelo a la planta, (Fennema O *et al.*, 2002) por lo que facilita su acumulación por las plantas y animales, llegando a los humanos a través de la cadena alimenticia.

1.2.6 Plomo

El plomo es un elemento tóxico acumulativo, presente en formas inorgánicas (acetatos, nitratos, carbonatos, sulfatos y cloruros (Ati-Hellal *et al.*, 2021). Su principal mecanismo es interactuar con proteínas e inhibir la actividad enzimática, al competir con cationes metálicos esenciales por sitios de unión (Tchounwou *et al.*, 2012). Daña el mecanismo de reparación del ADN, genes reguladores de tumores celulares, la estructura celular cromosómica al liberar ROS (Silbergeld *et al.*, 200). En células hepáticas suelen ser dañadas a la exposición de plomo, aumenta el estrés oxidativo que resulta en daño

hepático (Mitra *et al.*, 2022), su exposición aguda puede provocar cirrosis crónica (Hegazy *et al.*, 2014). Este representa un aumento de alergias, enfermedades infecciosas y autoinmunidad, así como el cáncer (Dietert *et al.*, 2004; Hsiao *et al.*, 2011), además de cáncer de pulmón, estómago y vejiga (Rousseau *et al.*, 2007; Steenland *et al.*, 2000). La exposición al plomo se detecta en los riñones, sistema nervioso, órganos reproductivos masculinos y femeninos, tejidos blandos y huesos (Achparaki *et al.*, 2012)

1.2.7 Arsénico

El arsénico por su actividad tóxica es considerado uno de los contaminantes más peligrosos, los estados de oxidación más toxicológicos son As (III) y As (V), estos desactivan el sistema enzimático (Achparaki *et al.*, 2012). El As causa deterioro cognitivo, enfermedades neurológicas y neurodegenerativas, afectaciones del equilibrio de los neurotransmisores (Garza Lombó *et al.*, 2019) y riesgo de cáncer al unirse a proteínas de unión al ADN (García Esquinas *et al.*, 2013). La exposición crónica promueve enfermedades en la piel, como la hiperpigmentación y varios tipos de cáncer de piel (Mitra *et al.*, 2022), en mujeres el consumo de arsénico aumenta el riesgo de cáncer de endometrio (Salnikow *et al.*, 2008).

1.3 Efectos adversos de los metales pesados en las plantas.

La toxicidad de los metales en las plantas varía según la especie de la planta, el metal específico, la concentración, composición del suelo y el pH (Kumar *et al.*, 2016). La respuesta a la toxicidad de metales en las plantas es la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) tras la exposición a altos niveles de metales pesados (Yadav *et al.*, 2010). Las consecuencias de los metales en las plantas dependen del tipo y la concentración de metal, por ejemplo; el cobre ayuda a asimilar el CO₂ y la síntesis de proteínas pero en concentraciones altas, retrasa el crecimiento de las plantas y la clorosis

de las hojas, la exposición de cobre en las plantas genera un estrés oxidativo y ROS (Stadtman *et al.*, 1991); el hierro a una concentración alta provoca una reducción de la fotosíntesis, afecta el rendimiento de la planta, aumenta el estrés oxidativo, reduce la actividad de peroxidasa de ascorbato, su toxicidad se lleva a cabo por la absorción de Fe^{+2} por parte de las raíces y su transporte a las hojas, a través de la corriente de transpiración, además el exceso de Fe^{+2} provoca radicales libres que alteran la estructura celular de forma irreversible y dañan membranas, ADN y proteínas; el cromo induce estrés oxidativo, degrada los pigmentos fotosintéticos provocando una disminución del crecimiento (Kumar *et al.*, 2016), clorosis en las hojas, desequilibrio de nutrientes y daño a las raíces (Chatterjee, 2000; Dixit *et al.*, 2002; sharma *et al.*, 2003); el manganeso se transporta fácilmente de la raíz al brote a través de la transpiración, provocando manchas marrones en las hojas, oscurecimiento en los tejidos, clorosis e inhibe la síntesis de clorofila (Ako *et al.*, 2014); el plomo ejerce efectos perjudiciales sobre morfología, crecimiento, procesos fotosintéticos, germinación de semillas, alargamiento de raíces y tallos (Kumar *et al.*, 2016); cadmio daña la clorosis, inhibe el crecimiento, provoca oscurecimiento, afecta la fotosíntesis, afecta el transporte de nutrientes y agua, reduce la longitud de brotes y raíces además de la germinación de semillas (Ahmad *et al.*, 2012); el arsénico causa retraso en el crecimiento, clorosis, marchitez, reduce germinación de semillas y disminuye la altura de las plántulas (Kumar *et al.*, 2016).

1.4 Especies reactivas de oxígeno (ROS)

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son moléculas reactivas, que contienen oxígeno, actúan como señalización redox y poseen una fuerte capacidad oxidante, las ROS más conocidas son el superóxido, el peróxido de hidrógeno y el oxígeno (Gill *et al.*,

2010). Esta formación de ROS se da principalmente en órganos subcelulares como los cloroplastos, mitocondrias y peroxisomas. Estos orgánulos producen ROS a través de la fotosíntesis, la fotorespiración y/o la respiración (Foyer *et al.*, 2003). El exceso de ROS provoca la oxidación, modificación de aminoácidos celulares, proteínas, lípidos de la membrana y ADN, reduciendo el crecimiento y desarrollo de las plantas (Ogawa *et al.*, 2001).

La generación excesiva de estas moléculas, satura el sistema de defensa, lo que trae como consecuencia estrés oxidativo, daño celular y la muerte celular, la concentración de las ROS determina el estado tóxico o beneficioso, ya que a bajas concentraciones estas suelen ser medidores de procesos de señalización intracelular. Al crearse un estrés oxidativo las moléculas biológicas, el ADN, las proteínas y los lípidos de la membrana pueden resultar dañados en forma irreversible (Carlos, s. f.) Para tratar las especies reactivas de oxígeno existen enzimas como la superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa, además de compuestos no enzimáticos como la vitamina E, ascorbato, entre otros.

1.5 Biorremediación

La biorremediación es una rama de la biotecnología que utiliza organismos, algas, plantas o, enzimas microbianas o vegetales para transformar o eliminar contaminantes del medio ambiente, su objetivo es reducir los niveles de contaminantes hasta niveles indetectables, no tóxicos o aceptables.

El proceso de biorremediación aumenta la tasa de degradación microbiana natural de los contaminantes al complementar los microorganismos autóctonos (bacterias u hongos) con nutrientes, fuentes de carbono o donantes de electrones (bioestimulación,

biorrestauración) o al añadir un cultivo enriquecido de microorganismos que tienen características específicas que les permiten degradar el contaminante deseado a una tasa más rápida (bioaumentación) (Mackay *et al.*, 2000). Hay distintos métodos en la cual se puede llevar a cabo, como por ejemplo:

- 2 Micorremediación: Es el uso de hongos para tratar sitios contaminados, a través del cuerpo vegetativo (micelios), son comúnmente conocidos por descomponer la materia orgánica en cualquier ecosistema, lo cual le otorga a los micelios la facultad de transformar hidrocarburos en fertilizante orgánico.
- 3 Fitorremediación: proviene del griego *fito* que significa planta o vegetal y *remediare* del latín, que significa poner remedio al daño por medio del uso de plantas para limpiar o restaurar ambientes contaminados a partir de procesos bioquímico realizados por las plantas y microorganismos.
- 4 Bioventilación: Se suministra el aire al terreno contaminado para promover la actividad de los microorganismos presentes en el subsuelo y biodegradar los hidrocarburos.
- 5 Biopilas: Es un tratamiento que consiste en la reducción de la concentración de contaminantes derivados del petróleo en suelos excavados mediante el uso de la biodegradación a partir de la construcción de un sistema cerrado que permita controlar lixiviados e hidrocarburos por medio de pilas de material biodegradables, en el fondo cuenta con aislante con geomembranas para el control de lixiviados.
- 6 Bioaumentación: Es la introducción de microorganismos aclimatados o incluso modificados genéticamente en el medio, los microorganismos deben sobrevivir a los

depredadores y competir con éxito con la población autóctona antes de ocupar nichos potenciales.

1.6 Fitorremediación

La fitorremediación proviene del griego phyto (planta) y el latín remedium (corregir o eliminar un mal) y es el uso de plantas y microorganismos asociados, que ayudan a reducir concentraciones o efectos tóxicos de los contaminantes *in situ* o *ex situ*, los mecanismos pueden ser: físicos (filtración, volatilización, etc.) y químicos (precipitación, reacciones de óxido–reducción). Las especies de plantas utilizadas en un proceso de fitorremediación deben ser capaces de tolerar altos niveles de metales y condiciones extremas del suelo, como alta acidez, salinidad o alcalinidad (Wu *et al.*, 2013). En caso de fitorremediación en relaves mineros estas deben soportar o adaptarse a la sequía.

Se utiliza para la eliminación de metales pesados y radionúclidos, además de contaminantes orgánicos, es una técnica novedosa, eficiente, y puede mejorar la fertilidad del suelo. El costo puede ser menos del 5% de los métodos físicos y químicos ya que suelen ser más costosos, además de dificultarse por mano de obra intensiva, cambios irreversibles en las propiedades del suelo, la alteración microflora del suelo y pueden ocasionar una contaminación secundaria al generar residuos.

Las técnicas de fitorremediación dependen de la naturaleza del contaminante, incluyen la fitoextracción, fitofiltración, fitoestabilización, fitovolatilización y fitodegradación (Alkorta *et al.*, 2004).

La fitoestabilización o fitomovilización, estabiliza o inactiva contaminantes potencialmente tóxicos en combinación con aditivos del suelo (Vangronsveld *et al.*, 2009) y se utiliza para reducir la movilidad y biodisponibilidad de los contaminantes en el medio

ambiente, evitando así su migración a las aguas subterráneas o su entrada a la cadena trófica (Erakhrumen, 2007). Estas plantas inmovilizan los metales pesados en los suelos a través de la absorción por las raíces, la precipitación o la reducción de la valencia del metal en la rizósfera (Barceló *et al.*, 2003; Ghosh *et al.*, 2005; Yoon *et al.*, 2006; Wuana *et al.*, 2011). Las plantas excretan enzimas redox especiales, que ayudan a reducir el estado de los metales a uno menos tóxico, disminuyendo el daño potencial al medio ambiente (Wu *et al.*, 2010), suele ser la que más se beneficia al ser asistida con bacterias promotoras del crecimiento vegetal y la más viable para mitigar los sitios contaminados por metales. Las características de las plantas seleccionadas para la fitoestabilización deben ser fáciles de cultivar, establecer cubiertas densas y sistemas de raíces Las plantas utilizadas en la fitoestabilización no solo suelen ser tolerantes ante los metales y brindar una cobertura vegetal del suelo al poseer un sistema de raíces extenso que ayuda a inmovilizar los metales, estas ayudan a reducir la translocación de los metales de la raíz al brote, disminuyendo la probabilidad de que estos metales lleguen a la cadena trófica.

Las ventajas de la fitoestabilización son que alivia la erosión del suelo, la lixiviación, (Montiel. Rozas *et al.*, 2015) minimiza la disponibilidad y migración de metales pesados hacia los mantos acuíferos (Barajas- Aceves *et al.*, 2015).

La fitoextracción o fitoacumulación, elimina metales tomando en cuenta la capacidad de las plantas, para acumular, absorber o translocar contaminantes. En esta técnica las raíces absorben los contaminantes junto con otros nutrientes y agua y los almacenan en varias partes de las plantas, esta puede realizarse por acumulación o hiperacumulación

de metales en la biomasa vegetal aérea. Los contaminantes se almacenan en las partes que pueden ser cosechables por lo que deben tratarse como residuos peligrosos o incinerarse para la recuperación de los metales (Wang *et al.*, 2017)

En la fitovolatilización se pueden eliminar compuestos orgánicos volátiles (Burken *et al.*, 2006; Padmavathiamma *et al.*, 2007) y se lleva a cabo al absorber agua junto con contaminantes orgánicos e inorgánicos, que llegan hasta hojas para evaporarse en la atmósfera (Prasad *et al.*, 2003). Esta implica el uso de plantas que solas o en asociación con rizobacterias eliminan los metales del suelo, convirtiéndolos biológicamente en formas volátiles dentro de la planta y los liberan a la atmósfera, lo que no suele ser muy recomendable ya que algunos contaminantes como el As, sus formas gaseosas son muy tóxicas y generan un impacto a la salud y al ecosistema.

1.7 Mecanismos de acción de las plantas ante metales pesados

Ante la toxicidad de los metales las plantas han desarrollado mecanismos para combatir el estrés provocado por los metales como el bombeo de los metales en la membrana plasmática, a través de quelación de los metales pesados, uniéndolos a compuestos de tiol en el citosol, secuestrándolos en las vacuolas, además de mecanismos antioxidantes. La más importante es la producción de tioles de bajo peso molecular como lo es el glutatión (GSH, por sus siglas en inglés) y la cisteína (Bricker *et al.*, 2001). El GSH es un tripéptido que participa en procesos como la defensa contra las ROS, se encuentra en compartimentos celulares como el citosol, retículo endoplásmico, vacuola y mitocondria (Yadav *et al.*, 2010). Participa en el control de H₂O₂ de las células vegetales (Foyer *et al.*, 2005; Shao *et al.*, 2005), lo que actúa como antioxidante, reduciendo la

mayoría de las ROS (Millar *et al.*, 2003; Foyer *et al.*, 2005; Shao *et al.*, 2008). El aumento de biosíntesis de GSH mejora la tolerancia al Cd y aumenta la acumulación de Cd en los brotes (Zhu *et al.*, 1999; Freeman *et al.*, 2004). Además es el precursor de la síntesis de fitoquelatinas (PC) (Yadav *et al.*, 2010).

Las fitoquelatinas son pequeños polipéptidos ricos en cisteína que forman complejos con iones metálicos tóxicos en el citosol y lo transportan a la vacuola (Salt *et al.*, 1995), por lo que son responsables de la desintoxicación de metales pesados. Estas se sintetizan a partir de GSH mediante la actividad de la fitoquelatina sintasa (PCS).

1.8 *Helianthus annuus*

Helianthus annuus, llamado comúnmente girasol gigante, es una planta originaria de América del Norte, resistente al estrés por sequía, presenta una tolerancia alta al frío, se adapta a diferentes condiciones climáticas, se desarrolla mejor en ambientes con buen drenaje y sol (Gómez- Arnau, 2004), es de gran importancia por su alto contenido de aceite en su semilla (Luévanos *et al.*, 2010), además es de fácil cultivo, de menos requerimientos nutricionales e hídricos (Criollo, 2022).

Helianthus annuus pertenece a la familia de las Asteráceas, estas se han reportado que toleran altos niveles de metales pesados, capacidad de acumular metales y producir biomasa radicular (Chico-Ruiz *et al.*, 2012).

1.9 Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (BPCV)

La fitorremediación de metales puede ser facilitada por el uso de bacterias promotoras del crecimiento vegetal del suelo, ya que mejoran el crecimiento de las plantas (Shilev *et al.*, 2001). Las bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (BPCV) son

microorganismos de diferentes especies que habitan en la rizosfera, colonizan la raíz de la planta y pueden clasificarse según sus propiedades funcionales en:

- Biofertilizantes por que aumentan la disponibilidad de nutrientes primarios en las plantas.
- Fitoestimulantes debido a que promueven el crecimiento y desarrollo de las plantas a causa de las fitohormonas.
- Biopesticidas ya que generan un control de enfermedades contra patógenos, mediante la síntesis de antibióticos.

Los mecanismos de acción de las BPCV se dividen en dos: Los directos que ocurren dentro de las plantas afectando directamente su metabolismo, como lo son: la fijación de nitrógeno, la solubilización de fosfato, la producción de fitohormonas, y los indirectos como la producción de sideróforos y la producción de antibióticos.

1.9.1 Fijación de nitrógeno

Bacterias como la *Azospirillum* y *Azotobacter*, son fijadoras de nitrógeno, asociadas a la rizosfera que utilizan los exudados de las raíces para fijar el nitrógeno atmosférico, gracias a enzimas nitrogenasas, estos microorganismos se pueden dividir en dos grupos: en bacterias fijadoras de N₂ simbióticas que infectan la raíz para producir nódulos y las bacterias fijadoras de nitrógeno no simbióticas que viven cerca de la raíz para que la planta absorba el exceso de nitrógeno que no es consumido por su propio metabolismo (Goswami *et al.* 2016).

1.9.2 Solubilización de fosfato

El proceso de solubilización del P por las BPCV es uno de los mecanismos más importantes, ya que el P es uno de los macronutrientes más esenciales para el crecimiento y el desarrollo de las plantas. En la solubilización de fosfato, las bacterias toman los exudados de las raíces y lo metabolizan, secretando ácidos que sirven como quelantes de cationes de calcio, a consecuencia, liberan fosfatos a partir de compuestos de fosfatos insolubles. Otro proceso es mediante enzimas conocidas como fosfatasas que son capaces de solubilizar el fosfato por hidrólisis (Alexander; 1977), estudios han sugerido que cationes como Ca^{2+} , Fe^{3+} y Al^{3+} , forman complejos estables como resultados de la quelación de ácidos orgánicos, resultando una liberación de fosfatos en los suelos (Montenegro et al., 2002). Las bacterias solubilizadores de fosfato pueden solubilizar los metales insolubles y estables mediante la secreción de ácidos orgánicos, lo que facilita la biodisponibilidad de los metales para su absorción por las plantas, ayudando en la fitoextracción de metales pesados (Ahemad, 2014; Castro *et al.*, 2011). Las bacterias *Azotobacter*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* y *Serratia* han sido reportadas como bacterias solubilizadoras de fosfato.

1.9.3 Producción de fitohormonas

La síntesis de fitohormonas mejora el crecimiento y el desarrollo de las plantas, lo que les ayuda a tener una mejor respuesta ante el estrés a las plantas en ambientes contaminados, producen fitohormonas como las auxinas, el etileno, las citoquininas y giberelinas que ayudan en el crecimiento, la división celular y la extensión de raíz (Benjumeda Muñoz 2017).

1.9.4 Auxinas

El indol-3-ácido acético (IAA), es el tipo de auxina más abundante que aporta el aumento de elongación, la división celular, regulan la longitud de pelos absorbentes, aumenta el número de raíces radicales, superficie total de la raíz (Salazar *et al*, 2016) que ayuda a absorber los nutrientes y la iniciación de la raíz lateral. El IAA rizosferico sintetizado por plantas y bacterias ayuda a la producción de antibióticos, que son efectivos contra organismos fitopatogenos, protegiendo a la planta de estos organismos (Matsuka *et al*, 2007). La producción de IAA modula la expresión de proteínas relacionadas con el crecimiento y el metabolismo de la planta (Rajkumar *et al.*, 2012). Algunos géneros productores de IAA reportados en diferentes investigaciones son *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* y *Mycobacterium* (Herrera-Quiterio *et al.*, 2020).

1.9.5 Citoquininas

Las citoquininas regulan el transporte de metabolitos, la división celular, la síntesis de proteínas formación de cloroplastos, ayudan en el funcionamiento de la parte aérea de la planta, la activación de membranas y la síntesis de enzimas (Frugier, *et al*, 2008; Hussain *et al*, 2011; Romanov, 2009). Además ayudan a tolerar la sequía y el estrés abióticos. Se han detectado citoquininas en células de *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Bacillus* y *Azospirillum* (Tsavkelova *et al*. 2006).

1.9.6 ACC desaminasa

El ACC desaminasa puede facilitar el crecimiento y desarrollo de las plantas a través de la conversión de Cetobutirato y amoníaco, reduciendo los niveles de etileno de las plantas, evitando la inhibición del crecimiento causada por metales pesados, (Gamalero

et al, 2012; Lugtenberg *et al*, 2009) lo que facilitan la fitorremediación de relaves mineros, al reducir el estrés provocado por el etileno.

1.9.7 Sideróforos

Son moléculas de bajo peso molecular que ayudan en la solubilización del hierro a partir de minerales. Estos forman complejos estables con iones metálicos como Al, Cd, Cu y Pb (Kiss *et al*, 1998; Neubauer *et al.*, 2000). Lo que contribuye a la acumulación o inmovilización de metales, mejorando el crecimiento de las plantas. La eficiencia para la acumulación o inmovilización de estos contaminantes por parte de los sideróforos, depende de la concentración del metal, la especie de planta como la composición del suelo (Rajkumar *et al.*, 2010)

Los sideróforos estimulan el crecimiento de las plantas al disponer el Fe o indirectamente al inhibir la actividad de los patógenos de las plantas en la rizosfera al limitar la disponibilidad de hierro (Beatriz *et al.*, 2008; Ma, Prasad, *et al.*, 2011).

1.10 La fitorremediación y las Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (BPCV)

Estudios sugieren que la fitorremediación es efectiva al inocular estas BPCV a especies de plantas tolerantes a los metales, mejorando el crecimiento y supervivencia de las plantas (Wu *et al.*, 2006; Grandlic *et al.*, 2008). Las BPCV ayudan a la reducción en la absorción de metales por parte de la planta (Vivas *et al.*, 2006) o en las cantidades de estrés inducido por etileno perjudicial (Rajkumar *et al.*, 2006). En áreas como relaves mineros la escasez de nutrientes es una de las principales limitaciones de la fitorremediación, estas bacterias juegan un papel importante en la solubilización de minerales como P y K, aumentan la tolerancia al pH ácido y a los metales, lo que ayuda

al crecimiento de las plantas, facilitando la fitorremediación del sitio contaminado (Schmalenberger *et al.*, 2013). Además alterar la capacidad de acumulación de metales y su translocación, por la resistencia a los metales, la desintoxicación, la transformación, disminuyendo la fitotoxicidad de los metales y alterando la fitodisponibilidad de los metales pesados (Ma *et al.*, 2016)

Por lo tanto la adición de BPCV en la fitorremediación parece ser una estrategia muy prometedora para la remediación de sitios contaminados por relaves mineros gracias a que disminuye la exposición de estos contaminantes, reducen la capacidad de biodisponibilidad de los metales y aumenta la eficiencia de esta técnica.

Se ha demostrado que las BPCV tienen una gran factibilidad para el crecimiento ante condiciones de estrés, en cambio sí son aplicadas en condiciones libre de estrés éstas suelen tener poco o un efecto perjudicial o neutro sobre el crecimiento de las plantas.

CAPÍTULO II. METODOLOGÍA

2.1 Caracterización y selección de las cepas bacterianas promotoras del crecimiento vegetal

Se seleccionaron cepas que fueron previamente aisladas de la rizósfera de las plantas que crecen en los relaves mineros ubicados en Zimapán, Hidalgo, caracterizadas como Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (BPCV), e identificadas como: *Serratia* K120, *Enterobacter* K131, *Klebsiella* MC173, *Enterobacter* N9, *Serratia* MC119 y *Escherichia* N16 (Mendoza-Hernández *et al.*, 2016).

2.2 Preparación del inoculo

Las cepas se sembraron en tubos de 5 ml de Caldo de Luria Bertani (LB), a 30° C por 24 horas. Posteriormente se realizó una propagación masiva de tubo a matraz, donde cada matraz contenía 150 ml de caldo Luria Bertani (LB) y se dejó crecer a 30° C por 24 horas (Imagen 1 a y 1 b).



Imagen 1a .Propagación masiva de cepas



Imagen 1 b .Propagación masiva de cepas

Para su separación, se colocaron en tubos falcón y se centrifugaron a 8000 rpm, por 15 minutos y el sedimento se resuspendió en buffer de fosfatos (0.1M) a pH: 7.4, la suspensión bacteriana se ajustó a 0.5 Å a 600 nm para la obtención de una concentración aproximada de 1×10^9 UFC ml⁻¹ (Mendoza-Hernández *et al.*, 2019) (Imagen 2)



Imagen 2 .Centrifugación de cepas

2.3 Diseño experimental

Se realizaron 4 tratamientos, donde T1-C1 fue una relación de 800 g de relave minero y 200 g de sustrato, se inoculo con el consorcio 1 (C1), T2-C2 tuvo la misma relación 800

g relave minero y 200 g de sustrato pero se inoculo con el consorcio 2 (C2), el T3 tuvo 800 g de relave minero y 200 g sustrato sin inculo, y el T4 una 1 kg del sustrato, como se muestra en la tabla 1. Cada tratamiento tuvo 3 repeticiones.

| Tratamientos | Sustrato | Jal de mina | Consortio 1 | Consortio 2 |
|--------------------------------|----------|-------------|-------------|-------------|
| Testigo Sustrato (T4) | x | | | |
| Testigo jal de mina (T3) | x | x | | |
| Tratamiento consorcio1 (T1-C1) | x | x | x | |
| Tratamiento consorcio2 (T2-C2) | x | x | | x |

Tabla 1. Diseño experimental

Los consorcios quedaron distribuidos de esta manera:

| | |
|-------------|---|
| Consortio 1 | <i>Serratia K120, Enterobacter N9 y Enterobacter K131</i> |
| Consortio 2 | <i>Klebsiella MC173, Escherichia N16 y Serratia MC119</i> |

Tabla 2. Conformación de consorcios



Imagen 3. Diseño experimental

2.4 Preparación de maceta

Para llenar las macetas, se pesó el 80% de relave de mina y posteriormente el 20% de sustrato para los tratamientos T1-C1, T2- C2, para el testigo se pesó relave minero con sustrato y el blanco únicamente sustrato (Imagen 4).



Imagen 4. Preparación de maceta

2.5 Preparación de semillas

Fue necesario hidratar en agua destilada las semillas antes de sembrar por una hora para una pronta germinación.

2.6 Siembra en maceta

Se usaron macetas de plástico de 1 Kg, y se llevó a capacidad de campo cada tratamiento antes de sembrar e inocular.

Por maceta se colocaron 4 semillas de *Helianthus annuus* a una profundidad de 1 cm, con ayuda de pinzas estériles para no contaminar las semillas, la inoculación fue de 10 ml de cada cepa con una jeringa y finalmente se añadió una capa superior de sustrato (Imagen 5 y 6).



Imagen 5. Colocación de semillas.



Imagen 6. Inoculación de maceta

2.7 Medición de las plantas

Para analizar el crecimiento de las plantas, se realizaron mediciones cada dos días de la longitud del tallo y de la longitud de las hojas con el software Image Tool 3,

posteriormente se sometieron a una prueba de varianza para determinar la diferencia entre tratamientos (Imagen 7).



Imagen 7. Medición de hoja y tallo.

2.8 Monitoreo de *Helianthus annuus*

Se regaban las plantas cada dos días con 130 ml de agua cada 48 hrs, además de realizar las mediciones de altura del tallo.

2.9 Medición de raíces

Para la medición de raíces, se extrajo la planta y se limpiaron las raíces con agua destilada, para posteriormente separar las raíces con ayuda de pinzas estériles y agujas, para finalmente medirlas con el software Image Tool 3 (Imagen 8 a y 8 b).



Imagen 8 a .Separación de raíces



Imagen 8 b. Separación de raíces

2.10 Extracción de plantas

Después de 60 días de crecimiento de las plantas, se extrajeron las plantas, se realizó la medición de raíces, se separó la parte aérea de la planta y las raíces, para posteriormente deshidratarlas a 70° C en un horno por 72 horas.

2.11 Determinación de metales

Después de la deshidratación de la biomasa, se trituraron en un mortero para posteriormente realizar la digestión ácida y leer las concentraciones de los metales en un espectro de absorción atómica en llama (AAAnalyst 400, Perkin Elmer) según el método de la EPA 3052.

Para la digestión ácida se pesaron las raíces trituradas en seco para obtener un peso cercano a 0.50 g. La digestión se llevó a cabo con 2ml de H₂O₂, 5 ml de HNO₃ y 3 ml de HCl, dando como resultado un volumen de 10 ml. Al finalizar la digestión se filtró en matraces aforados de 50 ml (Figura 9).

Para la lectura de metales se realizó una curva de calibración multielemental con estándares certificados AccuStandard®.

| Elemento | ($\mu\text{g}/\text{mL}$) |
|----------|-----------------------------|
| Cd | 1000 ± 6 |
| Cr | 1000 ± 6 |
| Cu | 1000 ± 6 |
| Fe | 1000 ± 6 |
| Mn | 1000 ± 20 |
| Pb | 1000 ± 10 |
| As | 1000 ± 24 |

Tabla 3. Estándares certificados.



Imagen 9. Plantas Trituradas

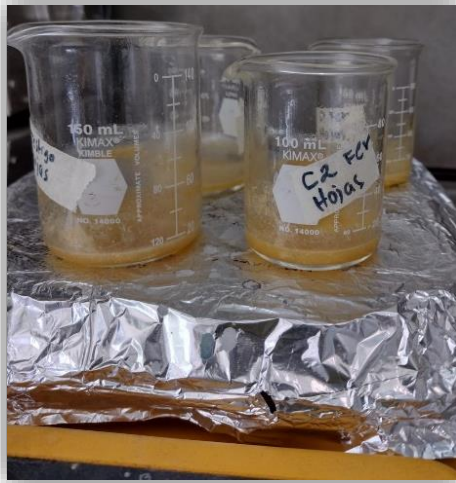


Imagen 10 .Digestión ácida



Imagen 11.Lectura de metales

2.12 Determinación de los factores de translocación y bioacumulación

El factor de translocación (FT) se calculó como la concentración de metales en la parte aérea dividida entre la concentración de metales en la raíz (Tu *et al.* 2003, Rizzi *et al.* 2004, Maldonado *et al.* 2011).

El factor de bioacumulación (*FBC*) que se define como la suma de la concentración de raíces y parte aérea dividida entre los relaves mineros (Mendoza-Hernández *et al.*, 2019).

El factor de transferencia para las raíces es la proporción de la concentración del metal en la raíz, sobre la concentración total en los relaves de minas (T_r) para la parte aérea (T_h) es la concentración de metales en hojas entre la concentración de metales en los relaves mineros (Ganeshkumar *et al.*, 2018; Rehman *et al.*, 2018).

$$FT = \frac{\text{Metales en la parte aérea}}{\text{Metales en las raíces}}$$

$$FBC = \frac{\text{Metales en raíces} + \text{Metales en la parte aérea}}{\text{Metales en el relave minero}}$$

$$T_r = \frac{\text{Metales en la parte de la raíz}}{\text{Metales en el relave minero}}$$

$$T_h = \frac{\text{Metales en la parte aérea}}{\text{Metales en el relave minero}}$$

2.13 Análisis estadístico

El análisis estadístico del crecimiento de raíces, tallos y de las concentraciones de metales en las plantas, se realizó mediante un ANOVA para detectar las diferencias entre tratamientos por una comparación de valores medios mediante la prueba de diferencia honestamente significativa (Hernández Mendoza *et al.*, 2016), utilizando el software Graphpad Prism 9.

CAPÍTULO III. RESULTADOS

3.1 Análisis de la longitud de parte aérea y raíz

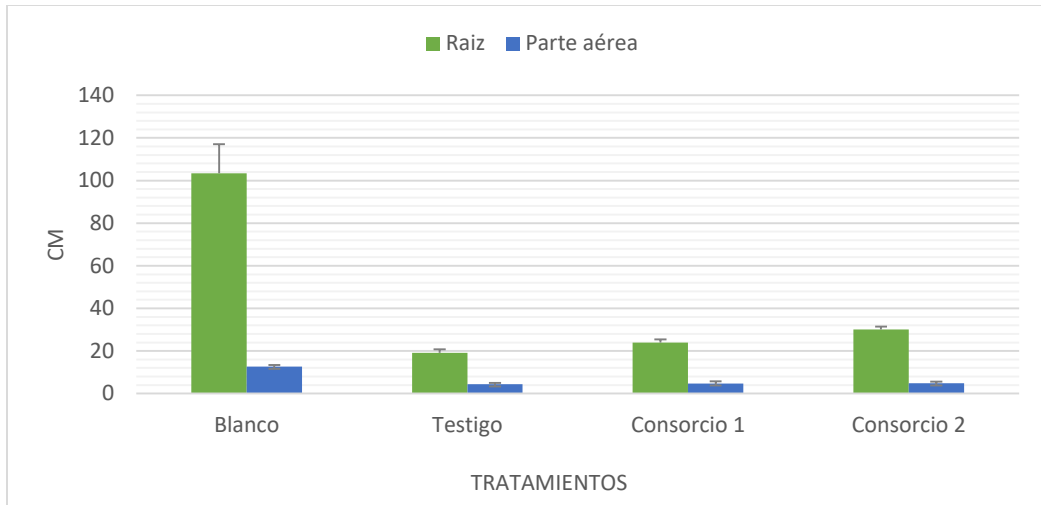
En la tabla 4 y gráfica 1 se muestran los resultados de la longitud en la parte aérea y raíces.

El consorcio 2 demostró una diferencia significativamente alta ($p < 0.05$) en raíces respecto al testigo y el consorcio 1, en la parte aérea no se demostró una diferencia significativa ($p < 0.05$) en los tratamientos.

| Tratamiento | Raíz (cm) | Parte aérea (cm) |
|-------------|----------------|------------------|
| Sustrato | 103.34 ± 13.74 | 12.68 ± 0.69 |
| Testigo | 19.078 ± 1.77 | 4.33 ± 0.73 |
| Consorcio 1 | 23.925 ± 1.53 | 4.75 ± 1.07 |
| Consorcio 2 | 30.095 ± 1.40 | 4.84 ± 0.73 |

Tabla 4. Longitud de raíces y parte aérea

El desarrollo de raíces en los diferentes tratamientos fue el siguiente; en el sustrato se observaron raíces largas y producción de raíces radicales (Imagen 12), para el testigo observamos raíces radicales pero no tan largas (Imagen 13), en los tratamientos con ambos consorcios las raíces tuvieron una diferencia significativa ($p < 0.05$) a comparación del testigo, por lo que las bacterias promotoras del crecimiento vegetal ayudaron a la elongación de raíces para una mejor absorción de nutrientes y agua, pues se ha comprobado que ayudan a producir raíces más largas, raíces radicales y una mayor densidad de raíces (Stearns *et al.*, 2005) (Imágenes 14 y 15).



Gráfica 1. Longitud promedio de parte aérea y raíz



Imagen 12 .Raíces sustrato



Imagen. 13 Raíces testigo



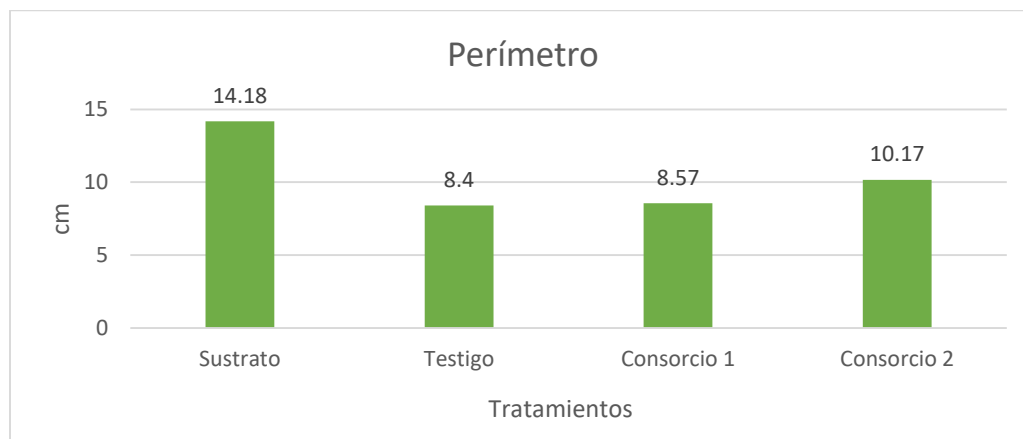
Imagen 14 .Raíces consorcio 1



Imagen 15 .Raíces consorcio 2

3.2 Análisis de hojas

Para el perímetro no se presentó una diferencia significativa ($p < 0.05$) en los tratamientos con ambos consorcios y testigo, como se muestra en la gráfica 2. Durante el proceso de fitorremediación las plantas no presentaron clorosis.



Gráfica 2. Longitud de hojas

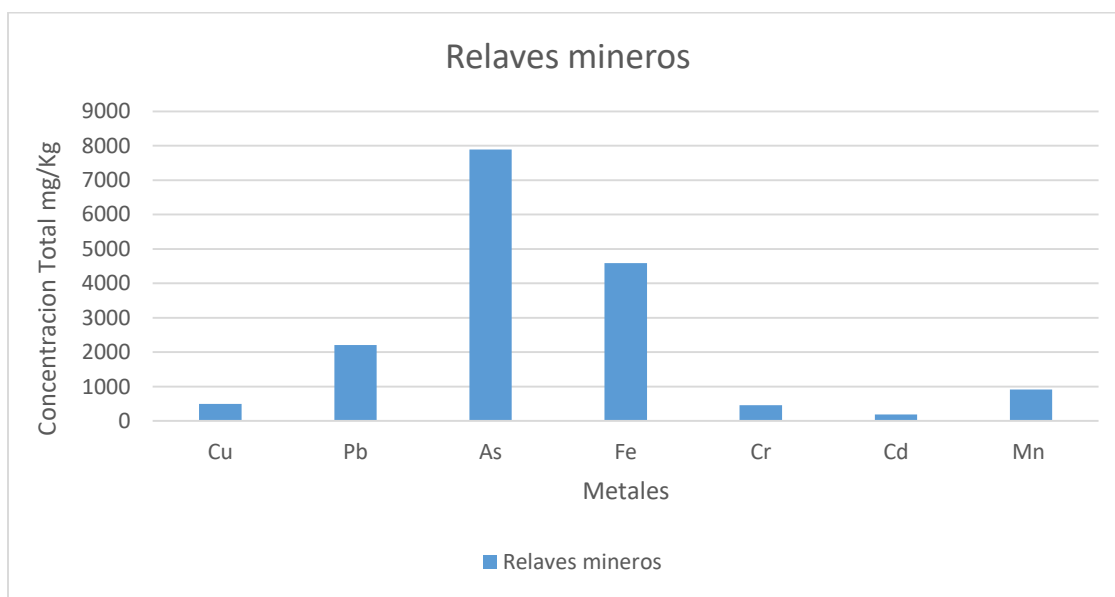
3.3 Concentración de metales en los relaves mineros

Las concentraciones de metales pesados en el relave minero fueron analizadas anteriormente (Mendoza-Hernández *et al.*, 2019), se pueden observar en la Gráfica 3. Donde As (7889.83 mg/Kg) y Fe (4591 mg/Kg) fueron los metales con mayor

concentración, el Cd tuvo la menor concentración con 191.4 mg/Kg. De acuerdo a la NOM-147-SEMARNAT /SSA1-2004, las concentraciones de Pb y As de los relaves mineros rebasaron las concentraciones, Cd y Cr no rebasaron las concentraciones, Fe, Cu y Mn no venían dentro de dicha norma (Tabla 5).

| Metal | Concentración mg/ Kg |
|-------|----------------------|
| Cu | 492.69 ± 34.67 |
| Pb | 2211.60 ± 232.54 |
| As | 7889.83 ± 234.67 |
| Fe | 4591.40 ± 9.98 |
| Cr | 456.90 ± 8.43 |
| Cd | 191.40 ± 7.89 |
| Mn | 917.93 ± 23.45 |

Tabla 5. Concentración de metales en relaves mineros



Gráfica 3. Concentración de los relaves mineros

3.4 Concentración de metales en los diferentes tratamientos

El orden decreciente de las concentraciones en los tratamientos con ambos consorcios en la raíz fue el siguiente: Fe > Pb > Mn > Cu > Cr > As > Cd, para el testigo el orden decreciente fue: Fe > Pb > Mn > Cu > Cr > Cd > As (Tabla 6).

El orden decreciente en el tratamientos con ambos consorcios para la parte aérea fue: Fe > Mn > Cu > Cr > Pb > As > Cd, mientras que para el testigo el orden decreciente fue el siguiente: Fe > Mn > Cu > Cr > As > Pb > Cd (Tabla 7).

| Raíz | | | | | | | |
|------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | Cd mg/Kg | Pb mg/Kg | Cr mg/Kg | Cu mg/Kg | Fe mg/Kg | Mn mg/Kg | As mg/Kg |
| Testigo | 22.29 | 420.49 | 154.78 | 218.21 | 7668.91 | 337.01 | 6.36 |
| Consortio 1 | 16.16 | 369.72 | 149.93 | 182.37 | 2718.79 | 270.53 | 16.23 |
| Consortio 2 | 18.06 | 409.32 | 161.44 | 198.78 | 7709.38 | 297.44 | 27.72 |

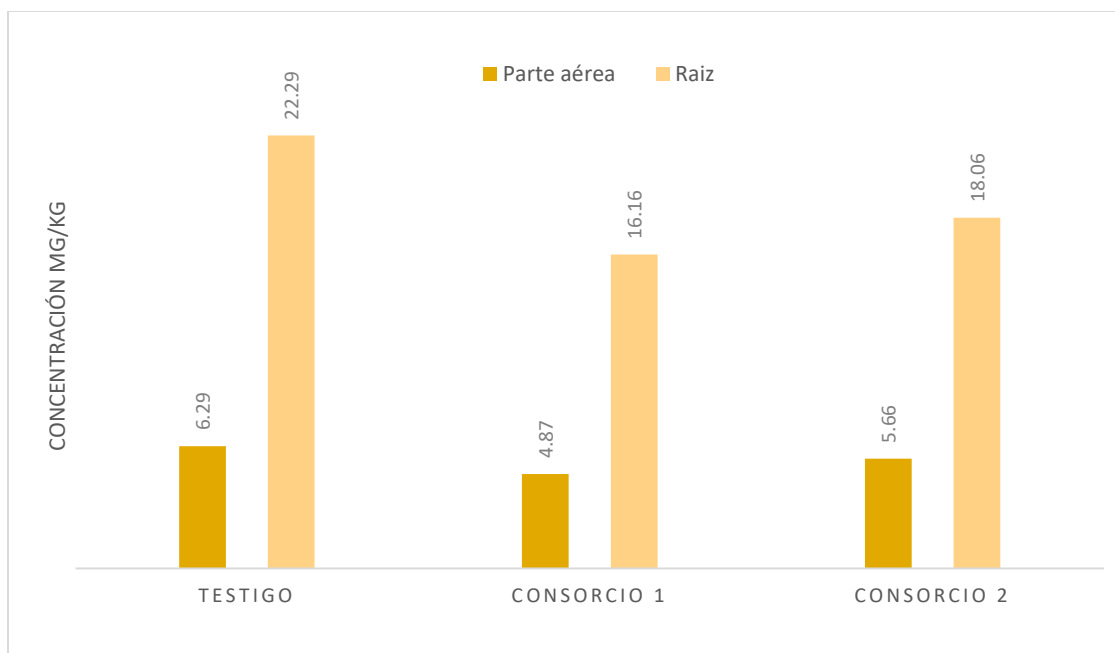
Tabla 6. Concentración de metales en raíz

| Parte aérea | | | | | | | |
|------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | Cd mg/Kg | Pb mg/Kg | Cr mg/Kg | Cu mg/Kg | Fe mg/Kg | Mn mg/Kg | As mg/Kg |
| Testigo | 6.29 | 27.84 | 32.55 | 50.20 | 906.76 | 427.35 | 29.50 |
| Consortio 1 | 4.87 | 26.70 | 29.90 | 48.10 | 713.80 | 186.90 | 25.90 |
| Consortio 2 | 5.66 | 40.40 | 42.60 | 51.90 | 1153 | 236 | 26.45 |

Tabla 7. Concentración de metales en parte aérea

3.4.1 Concentración de cadmio

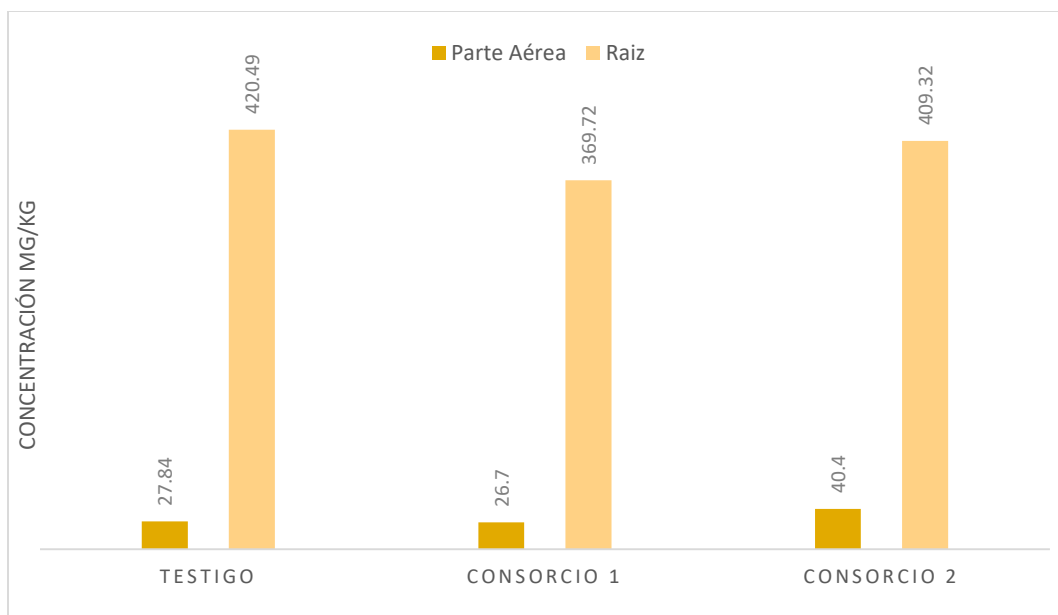
La concentración de Cd fue significativamente alta ($p < 0.05$) en el testigo con respecto a los consorcios tanto en la raíz como en la parte aérea lo que significa que las bacterias promotoras del crecimiento vegetal están llevando a cabo una fitoestabilización de cadmio, la diferencia de concentraciones se puede visualizar en la gráfica 4.



Gráfica 4. Concentración de Cd en parte aérea y raíz

3.4.2 Concentración de plomo

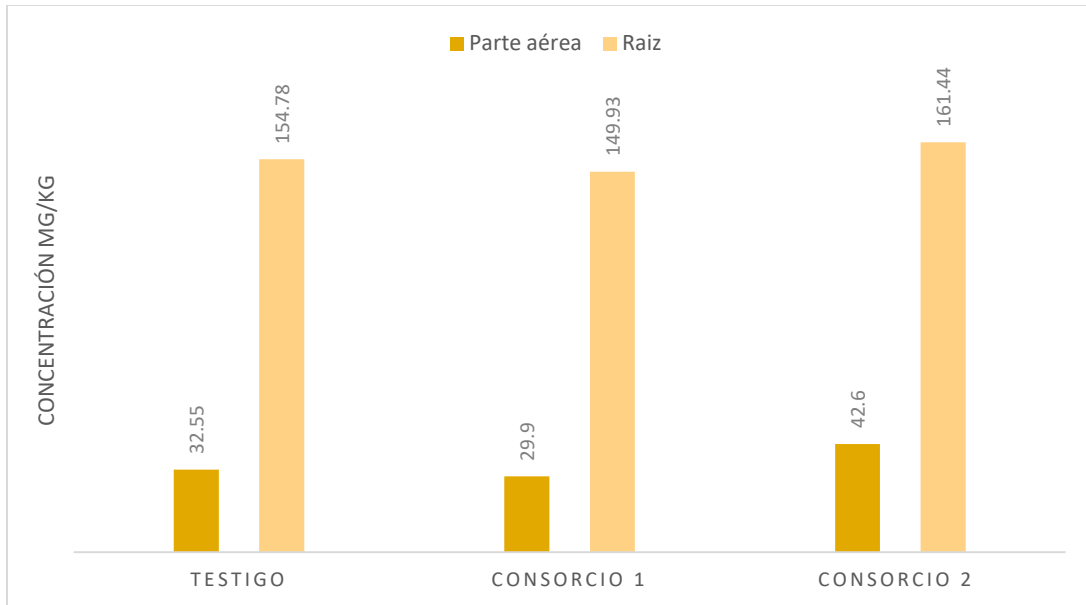
Se obtuvo una concentración de Pb significativamente más alta ($p < 0.05$) en el testigo con respecto a los consorcios en la parte aérea y raíces de la planta (como se muestra en la gráfica 5), por lo tanto se está presentando una menor acumulación de Pb en los tratamientos con ambos consorcios gracias a las bacterias promotoras del crecimiento vegetal.



Gráfica 5. Concentración de Pb en parte aérea y raíz

3.4.3 Concentración de cromo

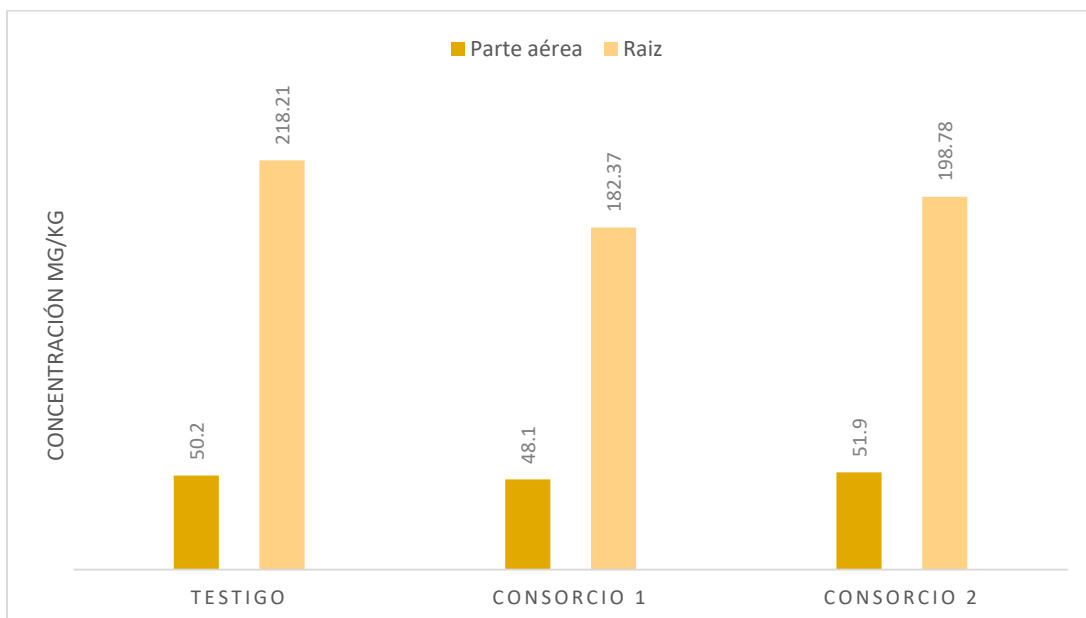
El consorcio 2 demostró una concentración significativamente más alta ($p < 0.05$) en la parte aérea y raíces respecto al testigo, las bacterias promotoras del crecimiento vegetal acumularon el cromo en *Helianthus annuus*, en el caso del consorcio 1 las bacterias promotoras del crecimiento vegetal ayudaron a estabilizar el Cr, como se muestra en la gráfica 6.



Gráfica 6. Concentración de Cr en parte aérea y raíz

3.4.4 Concentración de cobre

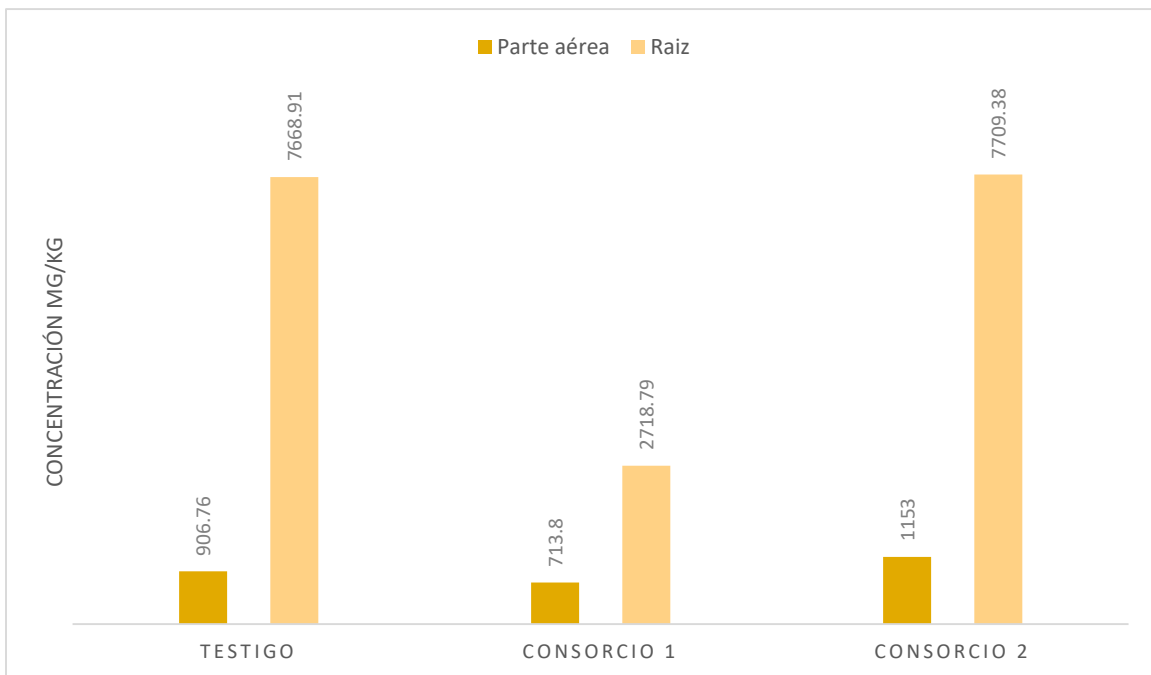
La concentración de Cobre en el testigo en la parte aérea y raíces, tuvo una diferencia significativa con el consorcio 1, la concentración más alta significativamente ($p < 0.05$) en raíces fue en el consorcio 2, con respecto al testigo (Gráfica 7).



Gráfica 7. Concentración de Cu en parte aérea y raíz

3.4.5 Concentración de hierro

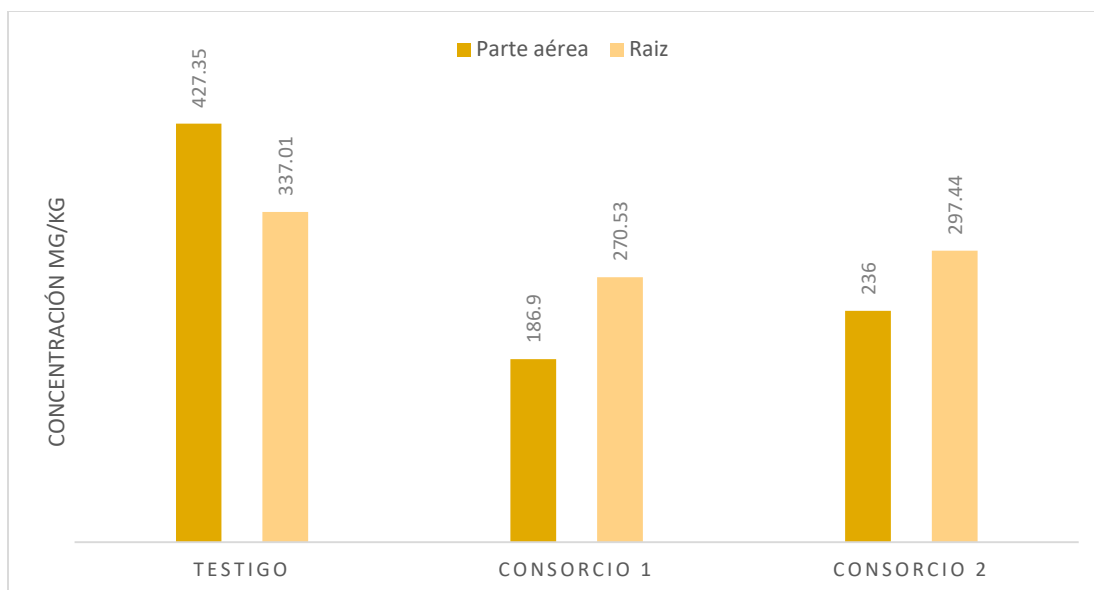
El consorcio 2 tuvo una concentración más alta en raíces y parte aérea a comparación del testigo, donde demostró una diferencia significativa ($p < 0.05$). El consorcio 1 en conjunto con *Helianthus annuus* demuestra que logra una fitoestabilización de los metales, mientras que el consorcio 2 ayuda a la acumulación de metales en la planta (Gráfica 8).



Gráfica 8. Concentración de Fe en parte aérea y raíz

3.4.6 Concentración manganeso

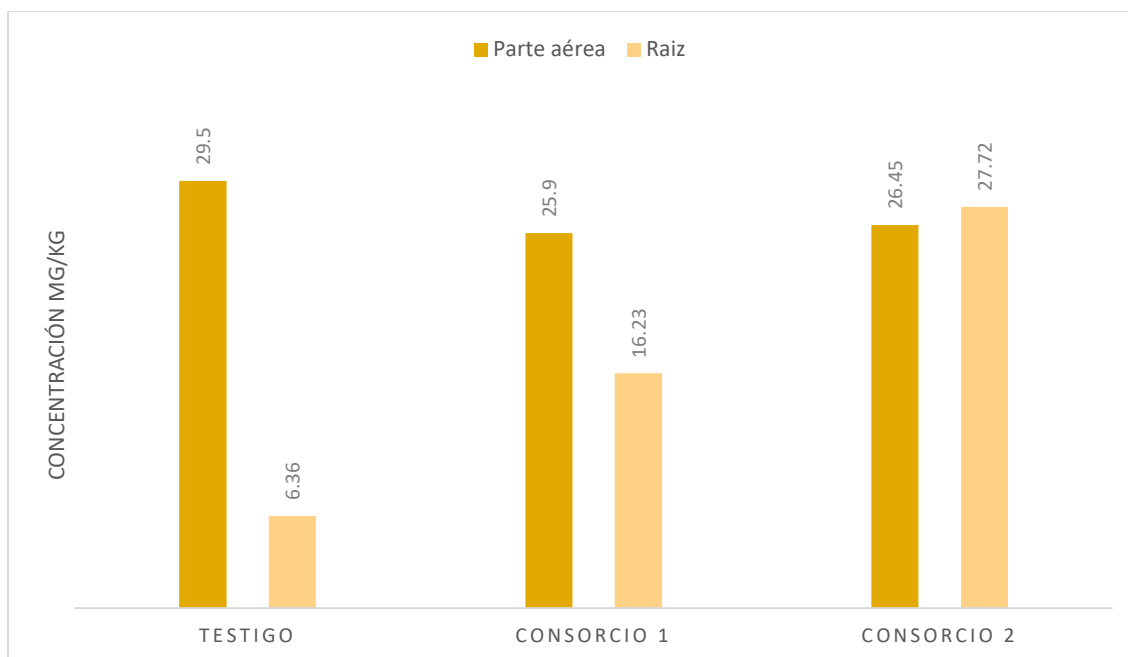
El testigo tuvo una concentración significativamente alta ($p < 0.05$) respecto a los tratamientos con ambos consorcios, (como se muestra en la gráfica 9), por lo que esta vez los dos consorcios ayudaron a una estabilización de Mn, evitando su acumulación en *Helianthus annuus* gracias a las bacterias promotoras del crecimiento vegetal.



Gráfica 9. Concentración de Mn en parte aérea y raíz

3.4.7 Concentración arsénico

La concentración de As en el testigo con respecto a la parte aérea fue significativamente alta ($p < 0.05$) a comparación del tratamiento con ambos consorcios, en las raíces los tratamientos con ambos consorcios tuvieron una diferencia significativamente alta ($p < 0.05$) con respecto al testigo, esto indica que en los tratamientos con consorcios estuvo presente una acumulación de As en *Helianthus annuus*, como se muestra en la gráfica 10.



Gráfica 10. Concentración de As en parte aérea y raíz

3.5 Factor de translocación

El orden decreciente para el factor de translocación fue el siguiente: As > Mn > Cd > Cu > Cr > Fe > Pb. Para Mn y As los valores fueron significativamente ($p < 0.05$) mayores en el testigo en comparación con los tratamientos inoculados presentando $FT > 1$. No obstante, el consorcio 1 presentó valores de $FT > 1$ en As. Por otro lado, en cuanto a Cu, Cd, Fe, Cr y Pb no se mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos y presentaron $FT < 1$. Como se muestra en la tabla 8.

| | T | C1 | C2 |
|--------------|----------|-----------|-----------|
| METAL | FT | FT | FT |
| Cd | 0.2821 | 0.3013 | 0.3133 |
| Pb | 0.0662 | 0.0722 | 0.0987 |
| Cr | 0.2102 | 0.1994 | 0.2638 |
| Cu | 0.2300 | 0.2637 | 0.2610 |
| Fe | 0.1182 | 0.2625 | 0.1495 |
| Mn | 1.2680* | 0.6908 | 0.7934 |
| As | 4.63* | 1.5958 | 0.9539 |

Tabla 8. Factores de translocación

* Diferencia significativa

3.6 Factor de bioacumulación

El factor de bioacumulación se presentó en el siguiente orden descendiente Fe > Mn > Cu > Cr > Pb > Cd > As. Mn demostró una diferencia significativa ($p < 0.05$) en el testigo a comparación de los tratamientos con ambos consorcios. Fe presentó valores de FBC > 1 en el testigo y consorcio 2 mostrando una diferencia significativa en comparación con el consorcio 1. En el caso de Cd, Cu, Pb, Cr y As no se demostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el testigo y los consorcios, presentando un FBC < 1. Como se muestra en la tabla 9.

| | TESTIGO | C1 | C2 |
|-----------|---------|--------|---------|
| METAL | FBC | FBC | FBC |
| Cd | 0.1493 | 0.1098 | 0.1239 |
| Pb | 0.2026 | 0.1792 | 0.2033 |
| Cr | 0.4100 | 0.3935 | 0.4465 |
| Cu | 0.5447 | 0.4677 | 0.5087 |
| Fe | 1.8677* | 0.7476 | 1.9302* |
| Mn | 0.8326* | 0.4983 | 0.5811 |
| As | 0.0045 | 0.0053 | 0.0068 |

Tabla 9. Factores de bioacumulación

*Diferencia significativa

3.7 Factor de Transferencia en la parte aérea y raíces

Los factores de transferencia de los metales que corresponden a la parte aérea se dieron en el siguiente orden decreciente Mn > Fe > Cu > Cr > Cd > Pb > As. Como se muestra en la tabla 10.

La transferencia en la zona de las raíces se obtuvo un orden decreciente Fe > Cu > Cr > Mn > Pb > Cd > As, como se muestra en la tabla 11.

En la parte aérea se mostró una diferencia significativa ($p < 0.05$) para Mn en el testigo en comparación a los tratamientos inoculados con ambos consorcios. Para Fe se mostró una diferencia significativa ($p < 0.05$) en el consorcio 2 en comparación al testigo y consorcio 1. En caso de Cd, Pb, Cr, Cu y As no se mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$). Para todos los metales en la parte aérea se obtuvo un valor de Translocación < 1 .

En las raíces, As presentó valores de transferencia mayores ($p < 0.05$) en el consorcio 2 y consorcio 1 en comparación al testigo, presentó valor de translocación < 1 . Para Fe se mostró una diferencia significativa ($p < 0.05$) en el testigo y consorcio 2 en comparación con el consorcio 1 donde el testigo y consorcio 2 mostraron valores de transferencia > 1 . En el caso de Cd, Pb, Cr, Cu y Mn no se presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$), con valores de translocación < 1 .

| | TESTIGO | C1 | C2 |
|--------------|----------------|-----------|-----------|
| METAL | T_a | T_a | T_a |
| Cd | 0.0328 | 0.0254 | 0.0295 |
| Pb | 0.0125 | 0.0120 | 0.0182 |
| Cr | 0.0712 | 0.0654 | 0.0932 |
| Cu | 0.1018 | 0.0976 | 0.1053 |
| Fe | 0.1974 | 0.1554 | 0.2511* |
| Mn | 0.4655 * | 0.2036 | 0.2571 |
| As | 0.0037 | 0.0032 | 0.0033 |

Tabla 10. Factores de Transferencias en la parte aérea

**Diferencia significativa*

| | TESTIGO | C1 | C2 |
|--------------|----------------|-----------|-----------|
| METAL | T_r | T_r | T_r |
| Cd | 0.1164 | 0.0844 | 0.0943 |
| Pb | 0.1900 | 0.1671 | 0.1850 |
| Cr | 0.3387 | 0.3281 | 0.3533 |
| Cu | 0.4428 | 0.3701 | 0.4034 |
| Fe | 1.6702* | 0.5921 | 1.6790* |
| Mn | 0.3671 | 0.2947 | 0.3240 |
| As | 0.0008 | 0.0020* | 0.0035* |

Tabla 11. Factores de Transferencias en las raíces

*Diferencia significativa

3.7 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El consorcio 1 (*Serratia* K120, *Enterobacter* N9 y *Enterobacter* K131), ayudó en la fitoestabilización de Cd, Pb, Cr, Cu, Fe y Mn en la parte aérea y raíces, excepto en As donde se presentó una fitoextracción en *Helianthus annuus*, estos resultados están en buena concordancia con lo planteado por (Mendoza-Hernández *et al.*, 2016) donde la inoculación de *Enterobacter* N9 y *Enterobacter* K131 en *Helianthus annuus* fomentaron la estabilización de metales, evitando la fitoextracción de estos. Este comportamiento se ha observado previamente en *Helianthus annuus* con BPCV, donde se presentó igual una disminución en el contenido de metales, ayudando en la inmovilización de metales pesados (Marques *et al.*, 2013).

El consorcio 2 (*Klebsiella* MC173, *Escherichia* N16 y *Serratia* MC119) logró una fitoestabilización de Cd y Mn en *Helianthus annuus*, ya que estabilizó los metales en el suelo evitando la movilización a la parte aérea. En metales como Pb, Cr, Cu, Fe y As, se presentó una fitoextracción. Esto concuerda con lo reportado por (Mendoza-Hernández *et al.*, 2016), donde la inoculación de *Klebsiella* MC173 ayudo a una Fitoacumulación en raíces y parte aérea en Fe.

Un estudio realizado por (Hernandez Acosta *et al.*, 2016) de fitorremediación de relaves mineros con *Helianthus annuus* demostró valores de translocación que excedían el límite en Cu, Mn, Cd y Cu, estos resultados no concuerdan con los valores obtenidos de Translocación <1 en *Helianthus annuus* con consorcios de BPVC, lo cual nos indica que

los consorcios de bacterias promotoras del crecimiento vegetal ayudaron a disminuir la concentración de Cd, Pb, Cr, Cu, Mn y As, en la parte aérea y raíces de las plantas.

La disminución en el contenido de metales en *Helianthus annuus* se ha presentado anteriormente donde se observó una disminución en cadmio y zinc por la adición de BPCV (Rajkumar *et al.*, 2008). Esta disminución en el contenido de metales por las bacterias promotoras del crecimiento vegetal nos puede dar indicios de una fitoestabilización, debido a la elongación de las raíces, lo cual son un parámetro importante dentro de la fitorremediación, sin ellas no se podría lograr una fitoestabilización o acumulación de metales (Marques *et al.*, 2013).

La elongación de raíces en los diferentes tratamientos, demostraron una diferencia significativamente ($p < 0.05$) alta en los consorcios respecto al testigo, esto concuerda con los trabajos de (Mendoza Hernández *et al.*, 2017), donde la inoculación de *Enterobacter N9*, *Serratia K120*, mostraron diferencia significativa ($p < 0.05$) en el crecimiento de raíces en las cepas a comparación del testigo en *Helianthus annuus*. Estas bacterias promotoras del crecimiento vegetal aumentan el número de pelos radiculares, raíces laterales y la superficie de la raíz, mejorando la absorción de nutrientes, aumentando el potencial de fitoestabilización, esto incrementa la tolerancia por el estrés de arsénico y cobre (Singh *et al.*, 2015).

Además de la adición de BPCV, se ha demostrado que la aplicación de materia orgánica, reduce la concentración de los metales, evitando la lixiviación a través del suelo, dado el caso de (Marqués *et al.*; .2007) donde la adición de materia orgánica en procesos de fitorremediación de metales, redujo la percolación de metales hasta en un 80%. La

adición de sustrato al sistema de fitorremediación, ayuda a reducir el estrés por los metales pesados, haciendo factible un sistema de fitorremediación.

De igual forma las condiciones climáticas son de gran importancia al llevar a cabo un sistema de fitorremediación, ya que temperaturas extremas suelen afectar el crecimiento de la planta, lo que complica el proceso de fitorremediación, por lo que se debe tener en cuenta este factor al igual que el exceso o falta de riego, ya que este puede afectar el crecimiento de raíces por exceso o falta de humedad.

CONCLUSIONES

- Las cepas del consorcio 2 (*Klebsiella Mc173*, *Escherichia N16* y *Serratia MC119*), ayudaron en el crecimiento de raíces con una diferencia significativa ($p < 0.05$) en comparación del testigo.
- En las hojas no se encontró una diferencia significativa entre testigo y el tratamiento con ambos consorcios, sin embargo hubo una maduración pronta en los consorcios en comparación del testigo.
- Las concentraciones de As y Pb en los relaves mineros rebasaron el límite establecido en la NOM-147-SEMARNAT/SSAI-2004.
- El consorcio 1 (*Serratia K120*, *Enterobacter N9* y *Enterobacter K131*), ayudo a estabilizar los metales, evitando su translocación, transferencia y su bioacumulación en *Helianthus annuus*, excepto en As.
- El consorcio 2 (*Klebsiella MC173*, *Escherichia N16* y *Serratia MC119*) con *Helianthus annuus* demostraron la fitoextracción de Pb, Cr, Cu, Fe y As. En Cd y Mn, se presentó una fitoestabilización de los metales.

- Factores de translocación mayor a 1, se presentaron en el testigo en Mn (1.2680) y As (4.63), y en el consorcio 1 se presentó un FT >1 en As (1.5958).
- En el Factor de bioacumulación se encontraron valores mayores a 1, en Fe para el testigo y consorcio 2.
- La fitorremediación con *Helianthus annuus* muestra un gran potencial para la remediación de relaves mineros por la capacidad que tiene para absorber los metales en mayor cantidad, por lo que se le considera una planta acumuladora, favorable en la fitoextracción de metales pesados.
- La efectividad de un sistema de fitorremediación dependerá de la especie vegetal utilizada y del género de la cepa.
- Estos resultados pueden promover un sistema de fitorremediación asistida con BPCV como una alternativa eficiente para la inmovilización de metales, de bajo costo y amigable con el medio ambiente, lo que puede aumentar su uso en la remediación de los relaves mineros, evitando los procesos fisicoquímicos que suelen ser de un manejo más complicado y costosos.
- La fitorremediación puede ser considerada una estrategia que contribuya al cumplimiento de la agenda 2030 (del programa de Naciones Unidas para el medio ambiente), ayudando a evitar la escasez de alimentos, propiciar el acceso al agua limpia, además de la conservación de los ecosistemas y la salud humana.

BIBLIOGRAFÍA

Achparaki, M., Thessalonikeos, E., Tsoukali, H., Mastrogianni, O., Zaggelidou, E., Chatzinikolaou, Fotios, Vasilliades, N., & Raikos, N. (2012). Heavy metals toxicity. *Aristotle University of Thessaloniki, Greece*, 39, https://core.ac.uk/display/267932602?utm_source=pdf&utm_medium=banner&utm_campaign=pdf-decoration-v1

Ahmad, I., Akhtar, MJ, Zahir, Z., & amer, jamil. (2012). EFFECT OF CADMIUM ON SEED GERMINATION AND SEEDLING GROWTH OF FOUR WHEAT (TRITICUM AESTIVUM L.) CULTIVARS. *Pakistan Journal of Botany*, 44.

Ako, T. A., Onoduku, U. S., Oke, S. A., Adamu, I., Ali, S., Mamodu, A., & Ibrahim, A. (2014). Environmental Impact of Artisanal Gold Mining in Luku, Minna, Niger State, North Central Nigeria. *Journal of geosciences and geomatics*, 2(1), 28-37. <https://doi.org/10.12691/jgg-2-1-5>

Ali, H., Khan, E. & Sajad, M. A. (2013). Phytoremediation of heavy metals—Concepts and applications. *Chemosphere*, 91(7), 869-881. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.075>

Alves, AR, Yin, Q., Oliveira, R., Silva, EF y Novo, LA (2022). Bacterias promotoras del crecimiento vegetal en la fitorremediación de suelos contaminados por metales: conocimiento actual y direcciones futuras. *Ciencia del Medio Ambiente Total* , 838 , 156435. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.156435>

Armendáriz Villegas, E. J. (2016). ÁREAS NATURALES PROTEGIDAS Y MINERÍA EN MÉXICO: PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES. [Tesis de Doctorado]. Centro de Investigaciones Biológicas Del Noroeste, S.C. https://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1001/50/1/armendariz_e.pdf

Arshad, M., Saleem, M., & Hussain, S. (2007). Perspectives of bacterial ACC deaminase in phytoremediation. *Trends in Biotechnology*, 25(8), 356-362. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2007.05.005>

Asmat, K. Y. L., López, Y. S. R., Bobadilla, J. L. M., Herrera, M., & Espinoza, R. R. (2016). Fitoextracción De Plomo, Zinc y Cadmio de Relaves Mineros Utilizando *Helianthus annuus* L. (Girasol). *Infinitum*. . . , 6(2). <https://doi.org/10.51431/infinitum.v6i2.38>

Ati-Hellal, M. E., & Hellal, F. (2021). Heavy Metals in the Environment and Health Impact. En *IntechOpen eBooks*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.97204>

Bartha, R., & M. Atlas, R. (2002). *Ecología microbiana y microbiología ambiental* (4.a ed.). Pearson.

Benjumeda Muñoz, D. (2017). Bacterias promotoras del crecimiento vegetal: Mecanismos y aplicaciones. [Trabajo de fin de grado] Universidad de Sevilla.

Carlos, C. C. (s. f.). Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-00152019000100091

Carlos, M. J., Stefani, P. Y., Janette, A., Melani, M. S., & Gabriela, P. (2016). Assessing the effects of heavy metals in ACC deaminase and IAA production on plant growth-promoting bacteria. *Microbiological Research*, 188-189, 53-61. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.05.001>

- Chico-Ruiz, J., Cerna-Rebaza De Chico, L., Rodríguez- Espejo, M., & Guerrero-Padilla, M. (2012). Capacidad remediadora de la raíz de girasol, *Helianthus annuus*, cuando es sometida a diferentes concentraciones de plomo. REBIOL. https://www.researchgate.net/profile/Julio-Chico/publication/327212302_Remedial_capacity_of_sunflower_root_when_submitted_to_different_concentrations_of_lead/links/5b806493a6fdcc5f8b647d80/Remedial-capacity-of-sunflower-root-when-submitted-to-different-concentrations-of-lead.pdf
- Criollo, J. F. C. (2022). Caracterización morfológica y análisis de crecimiento de tres cultivares de *Helianthus annuus* L. para flor de corte. <https://www.redalyc.org/journal/6538/653869372004/html/>
- Delgadillo López, A. E., González Ramírez, C. A., Prieto García, F., Villagómez Ibarra, J. R., & Acevedo Sandoval, O. (2011). FITORREMIEDIACIÓN: UNA ALTERNATIVA PARA ELIMINAR LA CONTAMINACIÓN. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. <https://www.scielo.org.mx/pdf/tsa/v14n2/v14n2a2.pdf>
- De Maria Peña Rivera, F., & Lázaro, E. B. (2022). Aplicación de la fitorremediación en suelos contaminados por metales pesados utilizando *Helianthus annuus* L. en la Estación Experimental El Mantaro. *Prospectiva Universitaria*, 9(1), 31-45. <https://doi.org/10.26490/uncp.prospectivauniversitaria.2012.9.34>
- DUARTE-ZARAGOZA, V., LOZANO-CAMARGO, M. & VEGA-LOYOLA, M. (2019). Implicaciones ambientales y restauración de las presas de jales de la minería metálica. ECORFAN.
- Farooq, M., Niazi, A., Akhtar, J., Saifullah, Farooq, M., Souri, Z., Karimi, N., & Rengel, Z. (2019). Acquiring control: The evolution of ROS-Induced oxidative stress and redox signaling pathways in plant stress responses. *Plant Physiology and Biochemistry*, 141, 353-369. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.04.039>
- Glick, B. R. (2010). Using soil bacteria to facilitate phytoremediation. *Biotechnology Advances*, 28(3), 367-374. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.02.001>
- GONZÁLEZ, H.; FUENTES, N. 2017. Mecanismo de acción de cinco organismos promotores de crecimiento vegetal. *Rev. Cienc. Agr.* 34(1):17 - 31. doi: <http://dx.doi.org/10.22267/rcia.173401.61>
- Gouma, S., Fragoeiro, S., Bastos, A., & Magan, N. (2014). Bacterial and Fungal Bioremediation Strategies. *Microbial Biodegradation and Bioremediation*, 301-323. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-800021-2.00013-3>
- Hernández-Acosta, E., Mondragón-Romero, E., Cristobal-Acevedo, D., Rubiños-Panta, J. E. & Robledo-Santoyo, E. (2009). VEGETACIÓN, RESIDUOS DE MINA Y ELEMENTOS POTENCIALMENTE TÓXICOS DE UN JAL DE PACHUCA, HIDALGO, MÉXICO. *Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*.

Hernández, J. L., Valdez-Morales, M., Grijalva, B. L. G., Muñoz-González, I. M. I., Morales, J. A., Hernández, M. A., & Osorio, G. M. (2017). Evaluación En El Crecimiento Y Nutrición De Las Plantas De Chícharo (*Pisumsativum*), Calabaza (*Cucurbita Pepo*) Y Girasol (*Helianthus Annuus*) Inoculadas Con BPCV. *Journal of agriculture and environmental sciences*, 6(2). <https://doi.org/10.15640/jaes.v6n2a6>

Huachen, J., Contreras, J., Pfuño, J. D. L., Aguilar, L. J., & Vilchez, P. M. (2021). Fitorremediación en suelos contaminados con Cd usando girasol (*Helianthus annuus* L. var. Sunbright). *Acta Agronómica*, 70(2). <https://doi.org/10.15446/acag.v70n2.94208>

Kong, Z., & Glick, B. R. (2017b). The Role of Plant Growth-Promoting Bacteria in Metal Phytoremediation. En *Advances in Microbial Physiology* (pp. 97-132). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2017.04.001>

Kossoff, D., Dubbin, W., Alfredsson, M., Edwards, S., Macklin, M. y Hudson-Edwards, K. (2014). Represas de relaves mineros: características, fallas, impactos ambientales y remediación. *Geoquímica aplicada*, 51, 229–245. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2014.09.010>

Kumar, N., Pichhode, M., & Asat, A. (2016). Effect of Heavy Metals on Plants : An Overview. *International Journal of Application or Innovation in Engineering & Management*, 5. <http://cimfr.csircentral.net/1693/>

Marques, A. C., Moreira, H., Franco, A. R., Rangel, A. O. S. S., & Castro, P. M. L. (2013). Inoculating *Helianthus annuus* (sunflower) grown in zinc and cadmium contaminated soils with plant growth promoting bacteria – Effects on phytoremediation strategies. *Chemosphere*, 92(1), 74-83. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.02.055>

Medel Reyes, A. (2009). CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE JALES MINEROS Y EVALUACIÓN DE BIOSÓLIDOS COMO PROPUESTA DE REMEDIACIÓN. [Tesis de maestría]. Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica, S. C.

Mendoza-Hernández, J. C., Vázquez-Delgado, O. R., Castillo-Morales, M., Varela-Caselis, J. L., Santamaría-Juárez, J. D., Olivares-Xometl, O., Morales, J. A., & Pérez-Osorio, G. (2019). Phytoremediation of mine tailings by *Brassica juncea* inoculated with plant growth-promoting bacteria. *Microbiological Research*, 228, 126308. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.126308>

Mitra, S., Chakraborty, A., Tareq, A. M., Emran, T. B., Nainu, F., Khusro, A., Idris, A. M., Khandaker, M. U., Osman, H., Alhumaydhi, F. A., & Simal-Gandara, J. (2022). Impact of heavy metals on the environment and human health: Novel therapeutic insights to counter the toxicity. *Journal of King Saud University - Science*, 34(3), 101865. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2022.101865>

M, Y., MA, Prasad, M. N. V., Rajkumar, M., & Freitas, H. (2011). Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils.

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.
https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4964569&fecha=02/03/2007#gsc.tab=0

Rosas Ramírez, M. eduardo. (2021). Fitoestabilización de metales pesados provenientes de jales mineros utilizando biocarbón como enmienda orgánica. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS.
<http://riaa.uaem.mx/xmlui/bitstream/handle/20.500.12055/2532/RORMMR05T.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Roy, M., Giri, A. P., Dutta, S., & Mukherjee, P. (2015). Integrated phytobial remediation for sustainable management of arsenic in soil and water. *Environment International*, 75, 180-198. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.11.010>

R. Redacción. (2019, 4 marzo). Biorremediación. ¿Qué es?: Métodos, ejemplos, ventajas y desventajas. Centro Estudios Cervantinos.
<https://www.centroestudioscervantinos.es/biorremediacion/>

RUIZ HUERTA, Esther Aurora, & ARMIENTA HERNÁNDEZ, María Aurora. (2012). Acumulación de arsénico y metales pesados en maíz en suelos cercanos a jales o residuos mineros. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 28(2), 103-117.
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-49992012000200001&lng=es&tlng=es.

Silva Silva, M. J. (2016). ANÁLISIS DE UN MÉTODO DE FITOESTABILIZACIÓN ASISTIDA PARA LA REMEDIACIÓN DE UN SUELO CONTAMINADO CON METALES PESADOS. INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL.
<https://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/27531/MIREYA%20JANETH%20SILVA%20SILVA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Stéphane Compant, Christophe Clément, & Angela Sessitsch. (2010). Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization, *Soil Biology and Biochemistry*, ELSEVIER, 42. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.11.024>

SUAREZ BELTRAN, R. M. (2013). GUÍA DE MÉTODOS DE BIORREMEDIACIÓN PARA LA RECUPERACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS POR HIDROCARBUROS. UNIVERSIDAD LIBRE INSTITUTO DE POSTGRADOS INGENIERIA ESPECIALIZACIÓN EN GERENCIA AMBIENTAL BOGOTÁ D.C.
<https://repository.unilibre.edu.co/bitstream/handle/10901/10607/TRABAJO%20FINAL%20cd.pdf>

Takarina, N. D., & Pin, T. G. (2017). Bioconcentration Factor (BCF) and Translocation Factor (TF) of Heavy Metals in Mangrove Trees of Blanakan Fish Farm. *Makara Journal of Science*, 21(2). <https://doi.org/10.7454/mss.v21i2.7308>

Wang, L., Ji, B., Hu, Y., Liu, R., & Sun, W. (2017). A review on in situ phytoremediation of mine tailings. *Chemosphere*, 184, 594-600. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.06.025>

Yadav, S. R. (2010). Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *South African Journal of Botany*, 76(2), 167-179. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2009.10.007>

Yoav Bashan, Esther Puente, M., E. de-Bashan, L., & Hernandez, J. (2008). Environmental uses of plant growth-promoting bacteria. *Research Signpost*.