



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN PARA
EL DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
UNIDAD OAXACA

DOCTORADO EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y
APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES

BIORREMEDIACIÓN DE JALES CON PRESENCIA DE
METALES PESADOS EN LA COMUNIDAD SAN
JERÓNIMO TAVICHE

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

HUGO ADALBERTO VON THADEN UGALDE

DIRECTOR DE TESIS:

DR. CELERINO ROBLES PÉREZ

Oaxaca, México, Junio 2019



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Oaxaca siendo las 13:00 horas del día 22 del mes de Mayo del 2019 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR OAXACA

para examinar la tesis titulada:

Biorremediación de jales con presencia de metales pesados en la comunidad San Jerónimo Taviche

Presentada por el alumno:

Von Thaden
Apellido paterno
Nombre(s) Hugo Adalberto

Ugalde
Apellido materno

Con registro:

B	1	5	0	5	4	6
---	---	---	---	---	---	---

Doctorado en Ciencias en Conservación y Aprovechamiento de Recursos Naturales

Después de intercambiar opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Director(a) de tesis

Dr. Celerino Robles Pérez

Dr. Jaime Ruiz Vega

Dr. Rafael Pérez Pacheco

Dr. Mario Enrique Fuente Carrasco

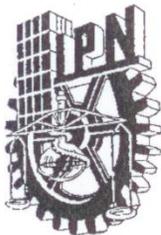
Dr. Teodulfo Aquino Bolaños

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. Salvador Isidro Belmonte Jiménez



CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN PARA EL DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
C.I.I.D.I.R.
CIUDAD OAXACA
I.P.N.



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D.F. el día 11 del mes de junio del año 2019, el (la) que suscribe Hugo Adalberto Von Thaden Ugalde alumno (a) del Programa de Doctorado en Ciencias en Conservación y Aprovechamiento de Recursos Naturales, con número de registro B150546, adscrito(a) al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Oaxaca, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dr. Celerino Robles Pérez y cede los derechos del trabajo intitulado **“Biorremediación de jales con presencia de metales pesados en la comunidad San Jerónimo Taviche”**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección hugovon_2@hotmail.com Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


Hugo Adalberto Von Thaden Ugalde
Nombre y firma del alumno(a)


CENTRO INTERDISCIPLINARIO
DE INVESTIGACIÓN PARA EL
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
C.I.I.D.I.R.
UNIDAD OAXACA
I.P.N.

RESUMEN

El abandono de la minería es un tema que ha pasado inadvertido en el debate nacional desde mediados del siglo XX, así como en su normatividad. El presente estudio evalúa la situación socio-ambiental en San Jerónimo Taviche, Oaxaca, México, donde empresas transnacionales generaron grandes volúmenes de jales. Se identifican, además, los mecanismos por los cuales algunos microorganismos nativos, asociados a especies vegetales también nativas, son capaces de reducir los contenidos o la actividad de metales tóxicos en los jales de minería. Para evaluar el ambiente, se analizaron 10 muestras de cuerpos de agua y 13 muestras de suelo, en las que, por espectrofotometría de absorción atómica, se cuantificó el nivel de concentración de los metales tóxicos totales: Cadmio (Cd), Cobre (Cu), Mercurio (Hg), Plomo (Pb) y Zinc (Zn). Para evaluar el aspecto social se realizaron entrevistas semiestructuradas a los mineros, alumnos de la telesecundaria y médicos del centro de salud, donde se registraron las condiciones laborales, los procesos de extracción de los metales de interés y las enfermedades más comunes en los mineros. Se reporta que existen concentraciones de Pb, Hg, Cd, Cu, y Zn que sobrepasan los límites establecidos por la normatividad mexicana vigente. Las entrevistas muestran que las personas no conocen los riesgos ante el problema de la contaminación proveniente de los jales. Para realizar una propuesta de biorremediación de los jales mineros, se identificaron rizobacterias asociadas a la rizosfera de plantas que lograron colonizar los jales: *Acacia pennatula*, *Ipomoea violácea*, *Bouteloua dimorpha*, *Nicotiana glauca*, *Aloe vera*, *Agave angustifolia* y *Barkleyanthus salicifolius*. Para la identificación de las rizobacterias se utilizó el marcador 16s rRNA. Se determinó la ubicación taxonómica de las rizobacterias identificadas en cinco géneros por secuenciación parcial del fragmento ARNr 16S: *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Brevibacterium*, *Curtobacterium* y *Anthrobacter*. Las secuencias fueron comparadas en la base de datos NCBI. Para determinar la especie se utilizó el programa Mega 7.0 a partir de los sitios variables de las secuencias. Las secuencias fueron cortadas y alineadas, se infirió su filogenia con el método Maximum likelihood con un bootstrap con 500 réplicas. Las rizobacterias fueron inoculada a *N. glauca* e *Indigofera conzattii* en un sustrato compuesto por jal y lombricomposta. Para determinar el efecto de las cepas en ambas plantas, se colectó tejido vegetal aéreo (tallo y hojas), tejido radical y sustrato para obtener concentraciones totales de Pb y Arsénico (As) por espectrometría de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente. En las muestras de sustrato se midió también su fracción extraíble con DTPA. Se demuestra que las rizobacterias si tienen efectos sobre estas variables. Además, *I. conzattii* demostró ser estabilizadora de Pb en el sustrato, a diferencia de *N. glauca*, que tiende a translocar el Pb hacia la parte aérea. Siguiendo la misma metodología, se evaluaron seis especies vegetales que colonizaron los jales: *N. glauca*, *I. conzattii*, *Bidens odorata*, *Dyssodia decipiens*, *Cynodon dactylon* y *Salvia amarissima*, y se inocularon con consorcios de seis especies de rizobacterias y con siete hongos de micorriza arbuscular (HMA). En todas las variables de crecimiento de las seis plantas se observa un claro efecto de los microorganismos rizosféricos. La especie *C. dactylon* inoculada con el consorcio de HMA es la que mejor estabiliza el Pb en el sustrato. La inoculación con rizobacterias genera la mayor biomasa en *N. glauca*, la mayor absorción de Pb del sustrato, y en consorcio con HMA reduce drásticamente la biodisponibilidad del Pb.

Palabras clave: jales, San Jerónimo Taviche, plomo, hongos de micorriza arbuscular, rizobacterias

ABSTRACT

Abandonment mining is an issue that has been unnoticed in the national debate since the mid-twentieth century, as well as in its normativity. This study evaluated the socio-environmental situation in San Jerónimo Taviche, Oaxaca, Mexico, where transnational companies generated large volumes of mine tailings. Also, we identify the mechanisms by which some native microorganisms associated with native plant species, are able to reduce the contents or activity of toxic metals in the mining tailings. To evaluate the environment, 10 samples of water bodies and 13 soil samples were analyzed, in which, by atomic absorption spectrophotometry, the concentration level of the total toxic metals was quantified: Cadmium (Cd), Copper (Cu), Mercury (Hg), Lead (Pb) and Zinc (Zn). Social aspect was evaluated with semi-structured interviews are presented to the miners, students of telesecundaria and physicians of the health center, where the working conditions, extraction processes of the metals of interest and the most common diseases in the miners are recorded. It is reported that there are concentrations of Pb, Hg, Cd, Cu, and Zn that exceed the limits established by the Mexican regulations in force. The interviews show that people do not know the risks when faced with the problem of pollution from the tailings. To make a bioremediation proposal for the mine tailings, rhizobacteria were identified in the rhizosphere of some plants that may colonize the tailings: *Acacia pennatula*, *Ipomoea violacea*, *Bouteloua dimorpha*, *Nicotiana glauca*, *Aloe vera*, *Agave angustifolia* y *Barkleyanthus salicifolius*. For the identification of rhizobacteria, the 16s rRNA marker was used. The rhizobacteria were identified in five genera by partial sequencing of the 16S rRNA fragment: Bacillus, Pseudomonas, Brevibacterium, Curtobacterium and Anthrobacter. The sequences were compared in the NCBI database. To determine the species, the Mega 7.0 software was used from the variable sites of the sequences. Sequences were cut and aligned, their phylogeny was inferred with the Maximum likelihood method with a bootstrap of 500 replics. Rhizobacterias were inoculated to *N. glauca* and *Indigofera conzattii* in a substrate composed of tailing and vermicompost. In order to determine the effect of the strains in both plants, aerial tissue, radical tissue and substrate were analyzed to obtain the totals of Pb and Arsenic (As) by optical emission spectrometry of inductively coupled plasma. In the substrate samples, its extractable fraction with DTPA was also measured. It is shown that rhizobacteria do have effects on these variables. In addition, *I. conzattii* proved to be a stabilizer of Pb in the substrate, unlike *N. glauca*, which tends to translocate Pb towards the aerial part. Following the same methodology, six plant species that colonize the tailings were evaluated: *N. glauca*, *I. conzattii*, *Bidens odorata*, *Dyssodia decipiens*, *Cynodon dactylon* and *Salvia amarissima*, and were inoculated with consortia of six rhizobacteria and seven fungi of arbuscular mycorrhiza (AMF). In all the growth variables of the six plants a clear effect of the rhizospheric microorganisms is observed. The species *C. dactylon* inoculated with the consortium of AMF is the best treatment that stabilizes the Pb in the substrate. Inoculation with rhizobacteria generates the highest biomass in *N. glauca*, the highest absorption of Pb from the substrate and, in the consortium with AMF drastically reduces the bioavailability of Pb.

Keywords: minw tailings, San Jerónimo Taviche, lead, arbuscular mycorrhizal fungi, rhizobacteria

CONTENIDO

RESUMEN	1
ABSTRACT	4
ÍNDICE DE FIGURAS	8
INTRODUCCIÓN	9
REFERENCIAS	12
CAPÍTULO I	13
LA ACTIVIDAD MINERA DEL SIGLO XX EN EL VALLE DE OAXACA: RIESGOS DE SALUD PÚBLICA DE HOY.....	14
INTRODUCCIÓN	14
CONTEXTO.....	16
Antecedentes históricos de la actividad minera en Oaxaca y en Taviche	16
Los jales como reservorios de metales pesado.....	18
Metales pesados e impacto para la salud	18
MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
Técnica. Estudios de contenido de metales pesados	20
Aspectos Sociales	22
RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	22
CONCLUSIONES	29
REFERENCIAS	30
CAPÍTULO II.....	35
RIZOBACTERIAS NATIVAS DE JALES MINEROS CONTAMINADOS CON PLOMO. CAPACIDAD DE PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO VEGETAL Y POTENCIAL PARA LA REMEDIACIÓN, ASOCIADAS A DOS ESPECIES VEGETALES NATIVAS	36
INTRODUCCIÓN	36
MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
Muestreo	38
Características del sustrato.....	38
Aislamiento de las rizobacterias.....	38
Extracción de ADN	39
Clonación	39
Análisis de las secuencias	40
Análisis estadístico	40

Aislamientos resistentes al Pb y Hg	41
Crecimiento de las plantas <i>Nicotiana glauca</i> y <i>Indigofera conzattii</i>	42
Diseño experimental y variables de respuesta	42
Determinación de concentración de los metales tóxicos	43
Factores de bioconcentración y translocación	43
RESULTADOS	44
Aislamiento y riqueza de PGPR.....	44
Características del sustrato.....	44
Selección de PGPR.....	45
Concentración de metales tóxicos	48
Factores de translocación y bioconcentración	50
DISCUSIÓN.....	52
CONCLUSIONES	55
REFERENCIAS	56
CAPÍTULO III	61
ESPECIES SILVESTRES COLONIZADORAS DE JALES MINEROS, ASOCIADAS A MICROORGANISMOS RIZOSFÉRICOS, CON POTENCIAL PARA FITOREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON PLOMO.....	62
INTRODUCCIÓN	62
MATERIALES Y MÉTODOS.....	64
Reproducción de organismos rizosféricos	64
Crecimiento de las plantas	65
Determinación de concentración de los metales tóxicos	66
Diseño experimental y variables de respuesta	66
Factores de eficiencia de extracción, bioconcentración y translocación	67
RESULTADOS	67
Concentración de metales tóxicos	70
Factores de translocación, bioconcentración y eficiencia de extracción	71
DISCUSIÓN.....	72
CONCLUSIONES	75
REFERENCIAS	76
CONCLUSIONES GENERALES.....	80

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO I. CONDICIONES DE LA MINERÍA EN SAN JERONIMO TAVICHE DESCRITA POR SUS MINEROS.....	23
CUADRO II. CONCENTRACIONES DE METALES PESADOS EN JALES Y SUELO DE ZONAS CIRCUNDANTES CON CTMP	24
CUADRO III. CONCENTRACIONES DE METALES PESADOS EN JALES Y SUELO DE ZONAS CIRCUNDANTES CON DTPA.....	25
CUADRO IV. CONCENTRACIÓN DE METALES PESADOS EN CUERPOS DE AGUA.....	26
CUADRO V. PRINCIPALES ENFERMEDADES REPORTADAS EN EL CENTRO DE SALUD DE SAN JERONIMO TAVICHE	27
CUADRO VI. MICROORGANISMOS IDENTIFICADOS CON EL MARCADOR 16S RRNA DE JALES EN SAN JERÓNIMO TAVICHE	46
CUADRO VII. CARACTERÍSTICAS DE <i>N. glauca</i> INOCULADO CON DIFERENTES CEPAS Y CULTIVADAS EN JALES MINEROS ENMENDADOS CON LOMBRICOMPOSTA EN UN INVERNADERO	49
CUADRO VIII. CARACTERÍSTICAS DE <i>I. conzattii</i> INOCULADO CON DIFERENTES CEPAS Y CULTIVADAS EN JALES MINEROS ENMENDADOS CON LOMBRICOMPOSTA EN UN INVERNADERO	49
CUADRO IX. CONCENTRACIONES DE Pb EN <i>I. conzattii</i> INOCULADO CON DIFERENTES CEPAS Y CULTIVADAS EN JALES MINEROS ENMENDADOS CON LOMBRICOMPOSTA EN UN INVERNADERO	50
CUADRO X. CONCENTRACIONES DE Pb EN <i>N. glauca</i> INOCULADO CON DIFERENTES CEPAS Y CULTIVADAS EN JALES MINEROS ENMENDADOS CON LOMBRICOMPOSTA EN UN INVERNADERO	50
CUADRO XI. CONCENTRACIONES DE Pb EN EL SUSTRATO DE <i>N. glauca</i> INOCULADO CON DIFERENTES CEPAS Y CULTIVADAS EN JALES MINEROS ENMENDADOS CON LOMBRICOMPOSTA EN UN INVERNADERO	51
CUADRO XII. CONCENTRACIONES DE Pb EN EL SUSTRATO DE <i>I. conzattii</i> INOCULADO CON DIFERENTES CEPAS Y CULTIVADAS EN JALES MINEROS ENMENDADOS CON LOMBRICOMPOSTA EN UN INVERNADERO	51
CUADRO XIII. FACTORES DE TRANSLOCACIÓN Y BIOCONCENTRACIÓN DE <i>I. conzattii</i> Y <i>N. glauca</i>	51
CUADRO XIV. VARIABLES DE CRECIMIENTO DE SEIS ESPECIES VEGETALES INOCULADAS CON DIFERENTES CONSORCIOS DE RIZOBACTERIAS Y HMA, CULTIVADAS EN JALES MINEROS ENMENDADOS CON LOMBRICOMPOSTA, EN UN INVERNADERO	68
CUADRO XV. CONCENTRACIONES DE PB (mg/Kg) EN SUSTRATO DE SEIS ESPECIES VEGETALES INOCULADAS CON CONSORCIOS DE RIZOBACTERIAS Y/O HMA, CULTIVADAS EN JALES MINEROS ENMENDADOS CON LOMBRICOMPOSTA, EN UN INVERNADERO	69
CUADRO XVI. CONCENTRACIONES DE PB (MG/KG) EN SEIS ESPECIES VEGETALES INOCULADO CON DIFERENTES CONSORCIOS DE MICORRIZAS Y RIZOBACTERIAS.	

CULTIVADAS EN JALES MINEROS ENMENDADOS CON LOMBRICOMPOSTA EN UN INVERNADERO	70
CUADRO XVII. FACTORES DE TRANSLOCACIÓN, BIOCONCETRACIÓN Y EFICIENCIA DE EXTRACCIÓN DE SEIS ESPECIES VEGETALES QUE HAN COLONIZADO LOS JALES DE SAN JERÓNIMO TAVICHE	71

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. LOCALIZACIÓN DE LOS SITIOS DE MUESTREO EN EL MUNICIPIO DE SAN JERÓNIMO TAVICHE, OAXACA, MÉXICO.....	21
FIGURA 2. DENDROGRAMA GENERADO POR EL MÉTODO FLEXI DE RIZÓSFERAS EN RELACIÓN CON RIZOBACTERIAS AISLADAS BASADO EN EL COEFICIENTE DE SIMILITUD DE JACCARD, CON UN BOOTSTRAP DE 1,000 REPLICACIONES.	45
FIGURA 3. RESISTENCIA DE LAS CEPAS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE Pb. 47	
FIGURA 4. RESISTENCIA DE RIZOBACTERIAS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE Hg	48

AGRADECIMIENTOS

A mi madre Leticia Ugalde Ríos por formarme con amor, ser mi inspiración en la vida y mi orgullo.

A mi abuelo Adalberto Ugalde Cano por estar siempre apoyándome y darme sus lecciones de vida.

A mi pareja Sofia del Pozo Calderón por su amor incondicional y estar conmigo en este camino.

A mi hermano Juan José Von Thaden Ugalde por siempre apoyarme en mi vida.

A Jonás Álvarez Lopeztello y Artemio Méndez Matías por su amistad y el apoyo en mi investigación.

A Juvenal Aragón Parada por su amistad y el apoyo en la identificación de las especies vegetales de esta investigación.

A Eduardo Aguilar Reyes por su amistad y su gran ayuda en el laboratorio.

A Loida Eunice Ramírez Montes por su amistad y su gran apoyo en esta investigación.

A los integrantes de mi comité tutorial: Dr. Mario Fuente Carrasco, Dr. Teodulfo Aquino Bolaños, Dr. Jaime Ruiz Vega y el Dr. Rafael Pérez Pacheco, que me brindaron todo su apoyo y por inculcarme un pensamiento reflexivo.

Especialmente al Dr. Celerino Robles Pérez por brindarme su experiencia y dedicación a la dirección de esta investigación. Además de su gran ejemplo como persona.

INTRODUCCIÓN

En los últimos 200 años, la actividad minera mexicana ha sido un factor de desarrollo económico (Gaytán y Benita 2014). Oaxaca cuenta con depósitos de minerales de interés económico. El porfiriato (1870-1910) impulsó la modernización de los procesos de minería y la introducción del Ferrocarril Mexicano del Sur, lo que generó un gran auge en el distrito de Ocotlán (Chassen 1986). A partir del año 1905, San Jerónimo Taviche, población ubicada en el Valle de Ocotlán, presentó la mayor actividad minera, promovida por el establecimiento de la compañía American Smelting and Refining Company (ASARCO). Sin embargo, ASARCO cerró operaciones a principios del siglo XX por las características físicas del suelo, que hacían incosteable su procesamiento (Sánchez 1993).

La actividad minera generó jales: residuos de la separación mineral, que a menudo contienen metales tóxicos (As, Cd, Cu, Pb, Hg, Cr, Se y Zn). La disposición inadecuada de estos residuos ocasiona enfermedades a los habitantes de las poblaciones en donde se encuentran (Ramos-Arrollo et al. 2004), contaminación de cuerpos de agua e intoxicación de la fauna silvestre (Utgikat et al. 2002). También se caracterizan por provocar poca o nula vegetación (Puga et al. 2006), ya que ocasionan bajo o nulo contenido de materia orgánica, valores extremos de pH, bajos niveles de nutrientes y baja agregación del suelo (Danielson 1991).

Los tratamientos fisicoquímicos y biológicos pueden mitigar los daños generados por los jales. Los primeros generan residuos, que deben tratarse nuevamente (Volke-Sepúlveda et al. 2002). Los segundos utilizan organismos vivos que no ocasionan efectos secundarios en el ambiente, técnicas conocidas globalmente como biorremediación. La técnica de fitorremediación consiste en el empleo de plantas. La exitosa descontaminación de suelos contaminados con metales tóxicos requiere de plantas capaces de concentrar metales tóxicos

del 1 al 2% de su biomasa. Estas concentraciones matarían a plantas no acumuladoras. En contraste, las plantas hiperacumuladoras toleran grandes concentraciones de metales, tal es el caso de *Pteris vittata*, que llega a almacenar 22,630 mg Kg⁻¹ de As en sus tejidos (Narula et al. 2012).

Sin embargo, la eficacia de la fitorremediación es influida por la concentración de los metales y por la actividad de los microorganismos de la rizósfera (Khan 2005). La interacción planta y microorganismo rizosférico ocasiona la transformación, movilización, solubilización y precipitación de los metales tóxicos (Narula et al. 2012). Por tal motivo, es indispensable identificar los mecanismos por los cuales algunos microorganismos nativos, asociados a especies vegetales también nativas, son capaces de reducir los contenidos o la actividad de metales tóxicos en jales de minería.

REFERENCIAS

- Chassen, F. (1986). El desarrollo económico de Oaxaca a finales del Porfiriato. *Revista Mexicana de Sociología*. 48 (1), 285-305.
- Danielson R.M. (1991). Temporal changes and effect of amendments on the occurrence of sheating (ecto-) mycorrhizas of conifers growing in oil sands tailings and coal spoil. *Agriculture Ecosystems Environmental*. 35 (2-3), 261-281. DOI: 10.1016/0167-8809(91)90054-2
- Gaytán E., Benita F. (2014). La industria minera en México: patrones de desempeño y determinantes de eficiencia. *Lect. Econ.* (80), 103-131.
- Khan A.G. (2005). Role of soil microbes in the rhizospheres of plant grown in trace metals contaminated soils in phytoremediation. *J. Trace. Elem. Med. Biol.* 18 (4). 355–364 DOI: 10.1016/j.jtemb.2005.02.006
- Narula N., Reinicke M., Haferburg G, Kothe E. y Behl R.K. (2012). Plant-Microbe interaction in heavy- metal-contaminated soils. En: *Bio-Gep Interactions in metal-contaminated soils*. (Varma, A. y Kothe E., Ed.). Springer. Noida, India, pp 143-162 DOI: 10.1007/978-3-642-23327-2
- Puga S., Sosa M., de la Mora A., Pinedo C., Jiménez J. (2006). Concentraciones de As y Zn en vegetación nativa cercana a una presa de jales. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 22 (2), 75-82.
- Ramos-Arroyo Y., Prol-Ledesma R.M. y Siebe-Grabach C. (2004). Características geológicas y mineralógicas e historia de extracción del Distrito de Guanajuato, México. Posibles escenarios geoquímicos para los residuos mineros. *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas*. 21 (2), 268-284.
- Sánchez A. (1993). Territorio y minería en Oaxaca: La exploración de minerales metálicos al inicio de los noventa. *Investigaciones Geográficas* 1 (26). DOI: 10.14350/rig.59018
- Utgikar V. P., Harmon S.M., Chaudhary N., Tabak H., Govind R. y Haines JR. (2002). Inhibition of sulfate-reducing bacteria by metal sulfide formation in bioremediation of acid mine drainage. *Environ. Toxicol.* 17 (1), 40-48. DOI: 10.1002/tox.10031
- Volke-Sepúlveda T. y Velasco-Trejo J.A. (2002). Tecnologías de remediación para suelos contaminados. Instituto Nacional de Ecología (INE-SEMARNAT). D.F. México, 62 pp.

CAPÍTULO I

LA ACTIVIDAD MINERA DEL SIGLO XX EN EL VALLE DE OAXACA: RIESGOS DE SALUD PÚBLICA DE HOY

INTRODUCCIÓN

En México, las actividades de minería han adquirido una amplia relevancia en el debate nacional. Por una parte, se destaca su contribución al aumento del Producto Interno Bruto, en la inversión extranjera directa (Guevara 2016). También, se ha apreciado el alto potencial de México como exportador de minerales, pero con un alto costo socioambiental (Delgado 2010). Asimismo, se destacan avances en materia legislativa y regulatoria (INECC 2016).

En contraparte, otros autores se han enfocado en analizar el tema de la generación de conflictos distributivos, tanto económicos como socioambientales (Composto 2012, Azamar y Ponce 2015). En este sentido, por ejemplo, enfatizan la importancia de nuevos derechos (humanos y de pueblos indígenas) como mecanismos de la sociedad para definir la pertinencia o no de proyectos mineros en sus territorios. El estado de Oaxaca no ha sido la excepción en este debate. Dada su riqueza mineral y su alta diversidad biológica y cultural, el tema ha sido intensamente discutido. El proyecto minero de Capulálpam de Méndez en la región Sierra Norte, y el de San José del Progreso en la región Valles Centrales, son dos casos ampliamente analizados y discutidos del debate estatal (Sigüenza 1996, Fuente y Barkin 2013, Azamar y Ponce 2014).

El análisis (político y académico) realizado sobre el papel de la minería presenta un contrasentido. Por un lado, existe una amplia discusión sobre las implicaciones (positivas y negativas) del desarrollo de la industria minera del siglo XXI; por otro lado, las implicaciones y riesgo para la salud de la actividad minera abandonada en el siglo XX está ausente en el debate nacional y estatal. Hay evidencias de la existencia de reservorios de residuos de

minería (jales) a lo largo de la República Mexicana, pero no existen mecanismos jurídicos ni estudios que valoren esta situación como potenciales generadores de riesgo. En este sentido, se propone abrir una línea de investigación que permita generar un mayor conocimiento sobre la relación entre un problema de contaminación heredado del siglo pasado (XX) a las generaciones presentes y futuras (XXI). Los estudios de Martín y Gutiérrez (2010) proporcionan antecedentes relevantes en esta exploración al señalar que las técnicas de flotación y cianuración para extraer grandes cantidades de metales preciosos han sido las causantes de la generación de enormes volúmenes de jales.

Como se puede evidenciar, se trata de un tema relevante no sólo desde el punto de vista académico, sino y sobre todo de política pública. No es un estudio histórico-académico orientado hacia evaluación retrospectiva del impacto que tuvo la actividad minera del siglo pasado; es un asunto preventivo de salud pública y ambiental. Específicamente de identificar los riesgos a la salud para las generaciones presentes y futuras de los habitantes de comunidades que albergaron la actividad minera. Concretamente, de la exposición de los habitantes a la presencia y dispersión de metales pesados en los llamados jales como reservorios de residuos industriales. Desde el punto de vista de política pública y ambiental se evidencia la necesidad de contar con información empírica de problemas de contaminación sui generis (los jales) como insumos para desarrollar e incluir nuevos principios ambientales en los instrumentos jurídicos. El referente empírico se desarrolla en la población de San Jerónimo Taviche, ubicada en la región de los Valles Centrales del estado de Oaxaca.

A partir del análisis de la situación local, se propone una interrogante desde el ámbito de las responsabilidades públicas: ¿quién es responsable de atender este problema de contaminación? La falta de atención a este asunto de salud pública puede considerarse

jurídicamente como una violación a los derechos humanos conforme al artículo cuarto de la Constitución mexicana, en el que explícitamente se indica la responsabilidad del Estado para mantener un ambiente saludable.

El abordaje metodológico tiene un carácter interdisciplinario. Abarca tanto aspectos de tipo técnico para identificar los contenidos en metales pesados en los jales, y en el suelo y agua en contacto con ellos, como de tipo social, en el que se exploran algunos componentes sociodemográficos. Estos temas se exponen desde tres ejes de análisis: en el primero se proporcionan algunos antecedentes del sector minero en el periodo del inicio de la época colonial hasta mediados del siglo XX; en el segundo eje se hace una descripción técnica del potencial de contaminante de los jales, y su relación con el tema de los riesgos a la salud; en el tercer, se realiza una descripción del referente empírico (San Jerónimo Taviche) y su actividad minera durante el siglo XX. Finalmente se formula una hipótesis de trabajo sobre el potencial riesgo a la salud de los habitantes de la población (pasado, presente y futuro) de los jales ubicados en su territorio. El objetivo de esta investigación es conocer el metal más tóxico en los jales de la población de San Jerónimo Taviche, y como han contaminado cuerpos de agua y suelos aledaños a estos, identificando las concentraciones de metales tóxicos de estos sitios. Además, conocer la actual legislación mexicana de los jales para atender esta problemática.

CONTEXTO

Antecedentes históricos de la actividad minera en Oaxaca y en Taviche

El territorio oaxaqueño, y la región de los Valles Centrales en particular, posee una amplia riqueza de recursos mineros, principalmente se extraen oro y plata, de acuerdo al Sistema Integral de Administración Minera (SIAM 2015). Por ello, la historia y situación actual de la

entidad no pueden comprenderse de una forma amplia sin la inclusión del análisis del papel de la minería. Desde la época prehispánica, los zapotecas cribaban el fondo arenoso de sus arroyos para extraer minerales preciosos; mientras que en la colonia son frecuentes las reseñas en las que se destacan la importancia de los Valles de Oaxaca en las encomiendas de oro y los descubrimientos de grandes yacimientos de plata (Sigüenza 1996). En esta historia del desarrollo minero, la población de San Jerónimo Taviche es emblemática, con una alta importancia durante el siglo XX en la extracción de oro y plata (Sánchez 1993).

En los inicios de la explotación minera colonial en San Jerónimo Taviche, la extracción de minerales, así como la posesión de los medios de producción, estuvieron bajo control de la monarquía española. Se estableció una población creciente de zapotecas, donde los hombres y menores de edad trabajaban en las minas. A raíz de la actividad minera, y sin una fundación formal, se establece la población de San Jerónimo Taviche, probablemente en el año 1600. Para finales del siglo XIX se consolidó un nuevo sistema de económico en la población, se introduce la primera empresa de capital estadounidense: American Smelting and Refining Company (ASARCO). Los mineros que en esa época laboraron en las minas fueron principalmente zapotecas. Casi al finalizar el siglo XIX, el presidente Porfirio Díaz introduce el Ferrocarril Mexicano del Sur, que comunicó a la capital de la República con la ciudad de Oaxaca, derivando desde esta última un ramal dirigido expresamente a San Jerónimo Taviche, con la finalidad de hacer más ágil y costeable el transporte de los minerales extraídos (Sigüenza 1996).

Los registros de las condiciones laborales son escasos, en su mayoría son relatos. Algunos mineros que trabajaron en ASARCO fueron los padres y abuelos de los mineros que, durante la primera mitad del siglo XX, trabajaron en las empresas Minerales de Taviche y Minerales

de Oaxaca, ambas con capital canadiense. En todas estas empresas, las condiciones laborales eran precarias

Los jales como reservorios de metales pesado

En México, la industria minera ha removido grandes cantidades de rocas que han sido pulverizadas para la extracción de oro y plata por medio de procesos como la cianuración, que fue uno de los procesos de extracción más utilizado (Salinas et al. 2004). En dicho proceso se combinan la oxidación a presión y el anión cianuro (Parga y Carrillo 1996). La gran maquinaria minera generó una enorme cantidad de jales, residuos de la separación mineral, que a menudo contienen metales pesados (As, Cd, Hg, Mn, Cu, Pb, y Zn) que se dispersan con una gran facilidad en el ambiente (Teodoro 2014).

Metales pesados e impacto para la salud

Los metales pesados son un potencial riesgo para la salud. Ocasionan un estrés oxidativo por la generación de peróxido de hidrógeno y radicales libres que desencadenan mutaciones del ADN y alteran las estructuras de carbohidratos, proteínas y lípidos (Xu et al. 2008). Algunos de los metales pesados más tóxicos son Pb y Hg.

Recientemente, Bjørklund et al. (2017) reportan que las especies mono-metiladas del As son potentes inductores de lesiones bioquímicas que, por su toxicidad y su potencial, pueden causar cáncer de piel, pulmón, hígado y riñón. En el mismo sentido, Ordóñez et al. (2003) evaluaron a 750 niños de Ciudad Juárez (Chihuahua, México) que residían cerca de una fundición en El Paso, Texas. Los niños que habitaban a menos de una milla de la fundición presentaron una media de 38.66 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ de Pb en sangre, a diferencia de los que habitaban una distancia de 6.1 a 8 millas, con una media de 27.71 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ de Pb en sangre. En

muestras de suelo de la población de Morales en el estado de San Luis Potosí (México), Carrizales et al. (2006) registraron que el 90 % de las muestras tuvieron valores mayores a 400 mg/kg de Pb y a 100 mg/kg de As; pero además mostraron sus impactos en la población infantil de la siguiente forma: el grupo de niños entre 3 y 6 años fueron los más vulnerables, al reportar que el 90 % de ellos presentan una concentración mayor de 10 µg/dl de Pb en sangre; mientras que los niños de 8 y 9 años presentaron la mayor exposición al As, con una media de 80 µg/g de creatinina urinaria. Peters et al. (2014) han mostrado que la concentración de creatinina urinaria está positivamente asociada con el porcentaje del ácido dimetilarsinico ($C_2H_7AsO_2$) y negativamente asociado con As inorgánico excretados en orina.

Diversos autores han destacado los riesgos de salud por presencia de metales pesados. Canfield et al. (2003) destaca un asunto epidemiológico relevante: los niños son los más susceptibles al Pb, los deterioros neurológicos comienzan a partir de 10 µg/dl de Pb en sangre. En el mismo sentido, Needleman (2004) identifica que cuando el Pb supera los 60 µg/dl, los niños manifiestan síntomas como dolores abdominales, artralgia y encefalopatías. El Pb se fija en la superficie de la membrana celular, donde la permeabilidad y el transporte activo de la membrana son alterados. Batoool et al. (2017) son contundentes al afirmar que el Pb tiene la capacidad de interactuar con las proteínas al imitar las funciones del Ca.

Los niveles normales de Hg en la sangre rara vez superan los 1.5 mg/dl (Graeme y Pollack 1998). Sin embargo, estudios epidemiológicos en las Islas Feroe han mostrado que se genera un desarrollo neurológico deficiente luego de la exposición a largo plazo de pequeñas cantidades de metilmercurio (Grandjean et al. 1997). Genchi et al. (2017) mencionan que tienen efecto para alterar la función mitocondrial, disminuyen la síntesis de ATP, reducen el

glutación y aumentan la peroxidación de fosfolípidos, proteínas y ADN. Sus efectos se relacionan con la generación de enfermedades cardíacas y cerebrales.

Definición de riesgo y la importancia del principio precautorio

La evaluación del riesgo es un instrumento que identifica las posibles consecuencias negativas de algún evento (Alfie 2007). A menudo, las investigaciones no llegan a concluir algún tipo de riesgo. El principio precautorio indica que no necesariamente deben existir pruebas concluyentes sobre daños potenciales para establecer la normatividad necesaria para prevenir riesgos perjudiciales (Cózar 2001).

MATERIALES Y MÉTODOS

El lugar de estudio es el municipio de San Jerónimo Taviche, pertenece al distrito de Ocotlán, en el estado de Oaxaca, México. Se encuentra aproximadamente a 46 km al sur de la ciudad de Oaxaca, en las coordenadas 16° 42' 48.7" N, 96° 35' 39.5" O, con una altitud media de 1700 msnm.

Técnica. Estudios de contenido de metales pesados

Las muestras compuestas de suelo y jales se extrajeron de una profundidad de 0-15 cm. Para obtener las muestras de agua se hizo una excavación hasta una profundidad de 30 cm en el caudal del arroyo para acumular el agua (**Fig. 1**). A las muestras se les agregó ácido nítrico y se refrigeraron a 4 °C hasta su análisis.

Las muestras de suelo y jal se secaron a 95 °C hasta peso constante. Para determinar el contenido total de metales pesados (CTMP) se utilizó 0.5 g de suelo (tamizado a 2 mm) y se realizó la digestión en mezcla de ácido nítrico, peróxido de hidrogeno y agua (HNO₃:H₂O₂:H₂O 3:2:10) durante 30 minutos en autoclave a 15 psi. El filtrado se enrazó a

50 ml (Moreno 2010). Para la fracción extraíble con ácido Dietilentriaminopentaacético (DTPA), desarrollado por Lindsay y Norvell (1978), se utilizaron 10 g (jal y suelo) y 10 ml (agua) de muestra por 20 ml de DTPA (0.005 M DTPA, 0.1 M trietanolamina y 0.01 M cloruro de calcio, con pH de 7.3). Para las muestras de agua se siguieron las indicaciones de la NOM-001-SEMARNAT-1996 (SEMARNAT 1996).

Tanto las muestras como los blancos se analizaron por triplicado. Las lecturas de metales pesados se realizaron por espectrofotometría de absorción atómica (Perkin Elmer AAnalyst).

Se cuantificaron Cd, Cu, Hg, Pb y Zn.

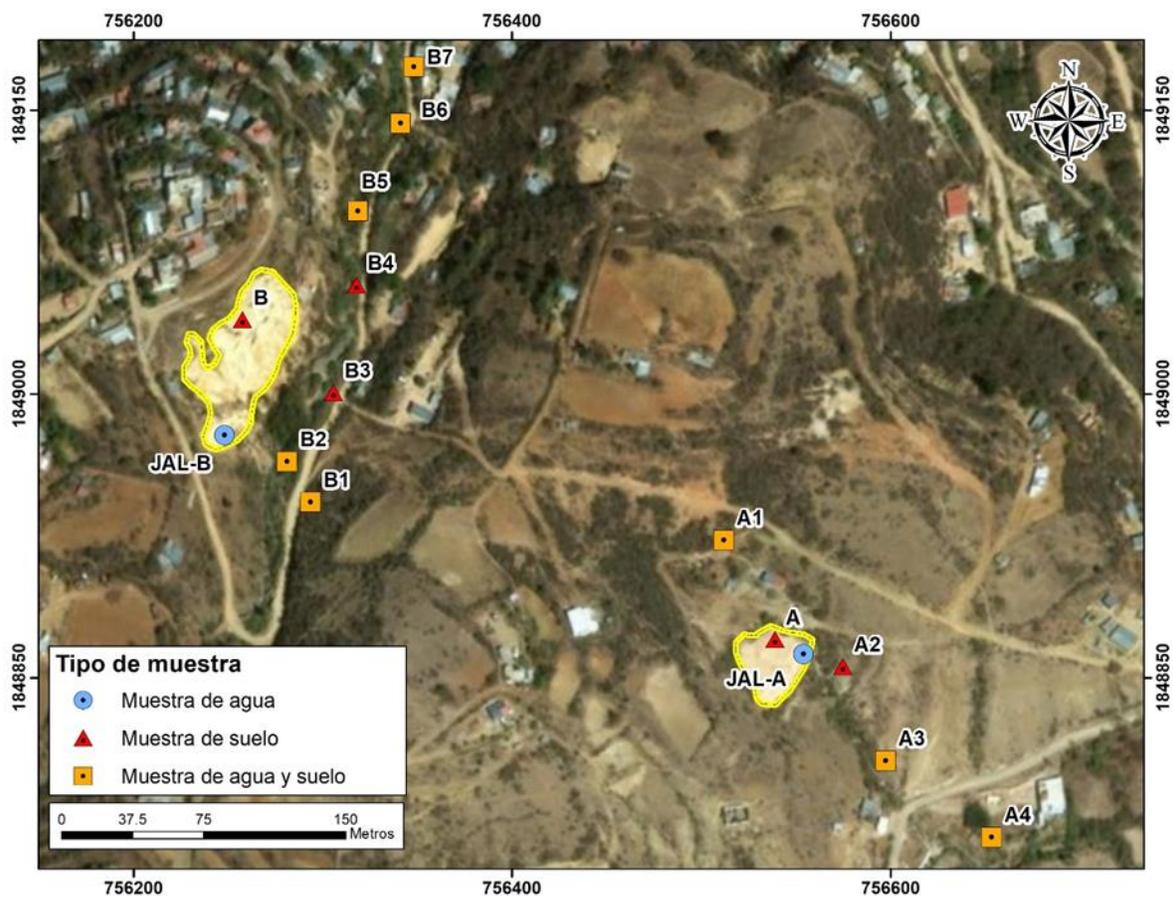


FIGURA 1. LOCALIZACIÓN DE LOS SITIOS DE MUESTREO EN EL MUNICIPIO DE SAN JERÓNIMO TAVICHE, OAXACA, MÉXICO.

Aspectos Sociales

Se realizaron entrevistas semiestructuradas a dos grupos sociales en la población: a todos los mineros sobrevivientes que trabajaron en la empresa Minerales de Taviche (siete personas), y a 51 estudiantes de la telesecundaria de San Jerónimo Taviche. Para estos últimos, el cuestionario trato de dar a conocer su percepción sobre la problemática ambiental de su comunidad en general, y en particular sobre los jales. Fue relevante indagar dos asuntos sobre los jales: su contacto en la infancia y los problemas de salud que más los aquejan.

Además, se visitó el centro de salud para conocer sobre las enfermedades de los habitantes. La finalidad no fue generalizar los problemas de salud de población, sino tener un panorama similar a un estudio de línea de base.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Los resultados de la investigación proporcionan una aproximación a la problemática salud-ambiental asociada a los jales que se presentan en San Jerónimo Taviche.

Los mineros recuerdan de una manera clara una mayor incidencia de problemas respiratorios en las personas dedicadas a la extracción. Solo un pequeño grupo de mineros sobrevive actualmente en la población, con edades entre los 60 a los 72 años (promedio = 68 años; desviación estándar = 5.04). Relatan que estuvieron expuestos directa e indirectamente a Hg, Pb, Cianuro (CN⁻) y As, y describen la situación laboral en las empresas que recuerdan personalmente o por relatos de sus abuelos y padres (**Cuadro I**). La mayor problemática de salud relatada es la relacionada con las vías respiratorias. Perforaban las rocas protegidos únicamente con un paliacate para cubrir las vías respiratorias, por consiguiente, inhalaban cristales de sílice por largos periodos de tiempo. La inhalación constante de estos cristales

ocasiona silicosis, para diagnosticarla es suficiente con conocer la historia laboral de exposición al sílice cristalina (Rees y Murray 2007). Es una enfermedad pulmonar que puede desencadenar cáncer pulmonar, problemas renales y tuberculosis (Martínez et al. 2010).

CUADRO I. CONDICIONES DE LA MINERÍA EN SAN JERONIMO TAVICHE DESCRITA POR SUS MINEROS.

Empresa	Periodo aproximado	Minerales que explotaban	Condiciones laborales	Enfermedades
ASARCO	1900-1910	Se desconoce qué se extraía porque toda la roca era transportada en ferrocarril a las instalaciones de ASARCO en Monterrey.	No tenían ninguna medida de seguridad, utilizaban guaraches de tres correas y para protegerse en las vías respiratorias, utilizaban un paliacate.	Problemas respiratorios
Minerales de Taviche	1950 a 1962	Oro, plata y plomo	Contaban con guaraches de tres correas, un paliacate y una lámpara de carburo.	La piel se les tornaba de color amarillo, tosían mucho, vomitaban sangre y a las pocas semanas fallecían.
Minerales de Oaxaca	1965 a 1993	Oro y plata	Les proporcionaban ámpara de baterías, casco de plástico, botas y guantes	Problemas respiratorios

A partir de la década de los 50's del siglo XX, la empresa canadiense Minerales de Taviche generó dos jales a cielo abierto en la población, antes de la publicación de la Ley Minera de 1992 y de la NOM-141-SEMARNAT-2003 (SEMARNAT 2003), donde se establece por

primera vez el marco normativo de la concesión del aprovechamiento minero y de la planeación y ejecución de las presas de jales, respectivamente.

CUADRO II. CONCENTRACIONES DE METALES PESADOS EN JALES Y SUELO DE ZONAS CIRCUNDANTES CON CTMP

Muestra	Cadmio (mg kg⁻¹)	Cobre (mg kg⁻¹)	Mercurio (mg kg⁻¹)	Plomo (mg kg⁻¹)	Zinc (mg kg⁻¹)
A	0	15.929	0	735.278*	16.922
A1	0	0.622	0	2.544	6.338
A2	0	10.163	59.086*	2628.506*	46.982
A3	0	7.164	0.035	864.564*	105.574
A4	0	2.262	0	155.238	25.206
B	0	5.881	0	161.385	33.759
B1	0	1.187	0	0	8.419
B2	0	1.148	0	2.196	8.353
B3	0.772	4.304	0	20.825	6.338
B4	0.284	2.838	0	0	203.222
B5	0.117	2.25	0	0	238.143
B6	0	2.098	0	0	175.747
B7	0.073	2.206	0	0	125.197

*: valores que sobrepasan la concentración de referencia total de la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004

Son muchas las localidades que tienen jales depositados de manera incontrolada en México. Romero et al. (2008) reportan las concentraciones de metales pesados en las regiones de Santa Barbara, Chihuahua; Zimapán, Hidalgo; Taxco de Alarcón, Guerrero. Llegaron a encontrar hasta 6669 mg/kg de Pb en Santa Bárbara. San Jerónimo Taviche presenta la misma problemática. Los dos jales mencionados tienen un pH menor a 6 (Teodoro 2014). El pH es el responsable de las reacciones de hidrólisis de los cationes ocasionando una alta movilidad

de los metales (Ramos-Gómez et al. 2012). Con un pH bajo se incrementa la adsorción de los iones metálicos en la superficie de los minerales, y a un pH alto disminuye. En ambos jales, Teodoro (2014) encontró porcentajes bajos de materia orgánica (<1.3), componente que regula la adsorción de iones metálicos (Warren y Haack 2001). La descomposición de materia orgánica es el principal impulsor del carbono orgánico disuelto y la movilidad del metal en el suelo. La movilización del cobre depende del carbono orgánico disuelto, mientras que la movilización del zinc depende principalmente del calcio y en menor medida del carbono orgánico disuelto (Zhao et al. 2007).

CUADRO III. CONCENTRACIONES DE METALES PESADOS EN JALES Y SUELO DE ZONAS CIRCUNDANTES CON DTPA

Muestra	Cadmio (mg kg⁻¹)	Cobre (mg kg⁻¹)	Mercurio (mg kg⁻¹)	Plomo (mg kg⁻¹)	Zinc (mg kg⁻¹)
A	^a N/D	0.112	0	N/D	6.495
A1	N/D	0.236	0	0.730	0.682
A2	N/D	5.340	0	776.506*	49.016
A3	N/D	4.433	0	402.332*	13.182
A4	N/D	1.227	0	452.941*	3.114
B	N/D	N/D	0	79.939	6.284
B1	N/D	N/D	0	6.522	3.169
B2	N/D	N/D	0	7.483	3.169
B3	2.562	1.244	0	8.005	357.330
B4	1.658	1.728	0	4.800	222.715
B5	1.359	0.881	0	6.667	111.716
B6	0.685	1.504	0	6.478	95.264
B7	0.665	1.541	0	6.619	95.264

*: valores que sobrepasan la concentración de referencia total de la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004

^a: valores no determinados, porque no se alcanza el límite inferior de detección

En los cuadros II y III se reportan concentraciones de Pb y Hg que sobrepasan la referencia total de la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004 (SEMARNAT 2004) en los jales y los diferentes sitios de muestreo de suelo (Fig. 1). El sitio A2 presento la mayor concentración de Hg y Pb. El jal B y los sitios de muestreo aledaños no muestran contaminación por Hg. En la muestra A2, la concentración total de Pb fue 29.23 % mayor a la que se reporta en estudios realizados en los jales de Zimapán, Hidalgo (Romero et al. 2008).

CUADRO IV. CONCENTRACIÓN DE METALES PESADOS EN CUERPOS DE AGUA

Muestra	Cadmio (mg L ⁻¹)	Cobre (mg L ⁻¹)	Plomo (mg L ⁻¹)	Zinc (mg L ⁻¹)
Primaria	0	0.027	0.725*	0.576
Tanque	0	0.004	0.725*	0.504
A1	0	0.004	0.725*	0.084
A3	0.033	0.117	2.207*	6.127
A4	0	0.004	0.725*	0.066
B1	0	0.207	0.59*	1.604
B2	4.509*	10.323*	0.456	1112.286*
B5	0.16	0.681	0.281	60.426*
B6	0.541*	0.979	0.281	27.063*
B7	0	0.245	0.281	12.603*

*: valores que sobrepasan la concentración de referencia total de la NOM-001-SEMARNAT-1996

No existe una correlación de las concentraciones de los metales pesados entre los sitios de muestreo y los jales. Puga et al. (2006) encontraron que no siempre existe esa homogeneidad en la relación de profundidad, distancia y concentración de los metales pesados. Ya que los jales al carecer de materia orgánica no proporcionan una retención de los metales pesados, éstos se infiltran a los cuerpos de agua con mayor facilidad. Simón et al. (1999) afirman que la infiltración de los metales pesados generalmente tiende a disminuir entre 10 y 30 cm de profundidad en el suelo.

CUADRO V. PRINCIPALES ENFERMEDADES REPORTADAS EN EL CENTRO DE SALUD DE SAN JERONIMO TAVICHE

Enfermedad	Posibles causas
Diarrea	Con exposiciones prolongadas de plomo, aparecen síntomas gastrointestinales como diarrea ¹ .
Problemas auditivos	La exposición al plomo puede causar en los niños problemas de aprendizaje y sordera ² .
Cefaleas	En concentraciones de 40 a 120 µg/Dl, el plomo puede causar cefaleas ² .
Microcefalia	El metil mercurio por su liposolubilidad atraviesa con facilidad la barrera placentaria, y hay riesgo de que el feto presente microcefalia ³ .

¹: Ramírez, 2005, ²: Poma 2008, ³: Ibrahim et al. 2006

Para corroborar si los metales pesados son transportados a las zonas de acuíferos de la población, se realizaron análisis de agua en los arroyos que se encuentran cercanos a los jales (**Fig. 1**). El jal B contaminó el agua y suelo del arroyo aledaño con cadmio, cobre y zinc en mayor medida que el jal A. Sin embargo, el jal A contaminó más el agua y suelo del arroyo con Pb (**Cuadro IV**). En los estados de Puebla y Veracruz, Mancilla-Villa et al. (2012) reportan algunos valores mayores a los límites máximos permisibles para Pb, Cd y Hg en agua utilizada para riego. Las concentraciones promedio de los metales respectivos fueron 0.008, 0.01 y 0.005 mg/l. Las concentraciones de estos metales en los cuerpos de agua de Taviche son mayores (**Cuadro IV**). Esta diferencia se debe a la contaminación recibida desde los jales depositados de forma incontrolada en la comunidad.

La contaminación de las corrientes de agua por los jales ha generado un impacto negativo en el ambiente y en la salud de la población, como ya ha sucedido en otros estados de México (Moreno et al. 2012, Ortiz-Ortiz et al. 2017). Esto se ve reflejado en el porcentaje de hijos fallecidos de las mujeres de 15 a 49 años. A nivel nacional el porcentaje es de 2.7, sin embargo, San Jerónimo Taviche presenta un porcentaje del 4.3 (INEGI 2015). El Centro de

Salud de la comunidad informa que las enfermedades que a menudo aquejan a la comunidad (**Cuadro V**). Son problemas estomacales y dolores de cabeza que se presenta en época de lluvias. La población consume agua directamente de las tomas domiciliarias y comunales, agua que no recibe tratamientos previos de ningún tipo. Es preocupante debido a que el tanque de agua está contaminado con Pb (**Cuadro IV**). La intoxicación crónica de Pb no presenta síntomas específicos, lo que complica un diagnóstico preciso (Beigel et al. 1998).

Los resultados de la percepción de los jóvenes muestran que sólo el 4 % percibe a los jales como el principal problema ambiental en su comunidad. Asimismo, el 11.32 % de los estudiantes perciben otro tipo de problemas, como la pérdida de la diversidad biológica y la contaminación del agua. Perciben que los cuerpos de agua que presentan problemas de contaminación son los ríos que colindan con los jales. Sorprende que el 34 % identifique a los jales como un atractivo turístico. El 67 % admite que ha jugado en los jales. Esto indica el desconocimiento de la problemática por parte de la población y de la escasa información existente. Los alumnos presentan una alta tasa de ausencias a clases a causa de enfermedades. El 27 % menciona que a menudo presenta problemas estomacales, de ellos, 79 % bebe el agua directamente de las tomas públicas o domiciliarias. Las enfermedades respiratorias son las más recurrentes, con un 75 % de incidencia.

No es intención en estas encuestas encontrar una relación directa entre la concentración de metales pesados en los jales y problemas de salud. Un estudio de tal naturaleza requiere la aprobación de las autoridades correspondientes y de la población para realizar una serie de actividades metodológicas; entre ellas análisis de sangre. El propósito es iniciar un banco de datos que permitan servir como un estudio de línea de base. Un punto relevante que arroja la encuesta es el alto nivel de desinformación de la comunidad. Sin embargo, la carencia de

datos epidemiológicos no debería impedir la aplicación de ciertas medidas precautorias que eviten riesgos a la salud de la población. Las investigaciones de riesgo deben incluirse en la política pública y la toma de decisiones.

En la Legislación Ambiental Mexicana se contemplan algunos instrumentos que promueven la prevención de impactos al ambiente. Para la autorización de las concesiones mineras, el artículo 43 de la ley minera señala que la concesión será suspendida cuando: “Pongan en peligro la vida o integridad física de los trabajadores o de los miembros de la comunidad.”; “Causen o puedan causar daño a bienes de interés público, afectos a un servicio público o de propiedad privada”. La sociedad tiene ahora los instrumentos políticos y normativos para declinar cualquier concesión minera, pero no existen antecedentes sobre normas ambientales para las actividades mineras abandonadas del periodo histórico citado. Otro asunto más grave: no existen disposiciones normativas para monitoreo, y en su caso, para la aplicación de acciones de mitigación y remediación de actividades mineras pasadas. Esto genera una pregunta ética: ¿de quién es la responsabilidad de dar seguimiento a este riesgo ambiental y de salud?

Por último, habrá que señalar que de acuerdo a los datos de la SIAM (2015), la empresa minera canadiense Arco Resources Corp tiene la concesión minera en el territorio de San Jerónimo Taviche, y está actualmente en fase de exploración.

CONCLUSIONES

El Pb es el metal pesado con mayor presencia en las muestras de suelo y agua. Sus valores exceden la normatividad mexicana. La ingesta de este metal pesado por los pobladores representa el principal riesgo.

El desarrollo del presente trabajo posibilitó identificar uno de los principales riesgos en la comunidad. Sin embargo, la actual legislación minera mexicana ha justificado la asignación de concesiones desde una perspectiva de desarrollo sustentable que consiste en la preservación del equilibrio ecológico, protección del ambiente y aprovechamiento de recursos naturales (DOF 2015). El estudio identifica un área débil en materia de política ambiental y del papel del Estado por promover un ambiente sano: los jales de las minas abandonadas. Al otorgar una concesión, se confía que el desarrollo tecnológico reducirá los daños hacia el ambiente. Sin embargo, no existe la legislación que promueva la remediación de la contaminación provocado por empresas mineras que extrajeron los minerales y ya no poseen la concesión.

La investigación presenta algunas limitaciones, ya que no profundiza en análisis clínicos en los habitantes. No obstante, esta investigación es un acercamiento para entender como los jales contaminan y la percepción de la población. Es necesario continuar con monitoreos y diagnósticos para generar conciencia, y colocar la problemática en la agenda pública con carácter de urgencia

REFERENCIAS

- Alfie M. (2007). Una nueva gestión ambiental: El riesgo y el principio precautorio. *Espacio abierto* 16 (2), 209-222.
- Azamar A. y Ponce J.I. (2014). Extractivismo y desarrollo: Los recursos minerales en México. *Probl. Desarrollo* 45 (179), 137–158. DOI: 10.1016/S0301-7036(14)70144-0
- Azamar A. y Ponce J.I. (2015). El neoextractivismo como modelo de crecimiento en América Latina. *Econ. y Desarrollo* 154 (1), 185-198.
- Batool Z., Yousafzail N.A., Murad M.S., Shahid S. y Iqbal A. (2017). Lead toxicity and evaluation of oxidative stress in humans. *PSM Biol. Res.* 2 (2), 79-82.
- Beigel Y., Ostfeld I. y Schoenfeld N. (1998). A leading question. *N. Engl. J. Med.* 339 (12), 827-830. DOI: 10.1056/NEJM199809173391208

- Bjørklund G., Aaseth J., Chirumbolo S., Urbina M.A. y Uddin R. (2017). Effects of arsenic toxicity beyond epigenetic modifications. *Environ. Geochem. Hlth.* 40 (3), 955-965. DOI: 10.1007/s10653-017-9967-9
- Canfield R.L., Henderson C.R., Cory-Slechta D.A., Cox C., Jusko T.A. y Lanphear B.P. (2003). Intellectual impairment in children with blood lead concentrations below 10 µg per deciliter. *N. Engl. J. Med.* 348 (16). DOI: 10.1056/NEJMoa022848
- Carrizales L., Razo I., Téllez-Hernández J.I., Torres-Nerio R., Torres A., Batres L.E., Cubillas A.C. y Díaz-Barriga F. (2006). Exposure to arsenic and lead of children living near a copper-smelter in San Luis Potosi, Mexico: Importance of soil contamination for exposure of children. *Environ. Res.* 101 (1), 1-10. DOI: 10.1016/j.envres.2005.07.010
- Composto C. (2012). Acumulación por despojo y neoextractivismo en américa latina. Una reflexión crítica acerca del estado y los movimientos socio-ambientales en el nuevo siglo. *Astrolabio* (8), 323-352.
- Cózar J.M. (2005). Principio de precaución y medio ambiente. *Rev. Esp. Salud Public.* 79 (2), 133-144. DOI: 10.1590/S1135-57272005000200003
- Delgado G.C. (2010). América Latina y el Caribe como reservas estratégicas de minerales. En: *Ecología política de la minería en América Latina.* (G.C. Delgado-Ramos, Ed.). UNAM, Edo. de México, México, pp. 17-57.
- DOF (2015). Ley general del equilibrio ecológico y la protección al ambiente. Diario Oficial de la Federación [en línea]. <http://biblioteca.semarnat.gob.mx/janium/Documentos/Ciga/agenda/DOFsr/148.pdf> 18/02/2019
- Fuente M.E. y Barkin D. (2013). La minería como factor de desarrollo en la Sierra Juárez de Oaxaca: Una valoración ética. *Probl. Desarrollo* 44 (172), 123-144. DOI: 10.1016/S0301-7036(13)71865-0
- Genchi G., Sinicropi M.S., Carocci A., Lauria G. y Catalano A. (2017). Mercury exposure and heart diseases. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 14 (1), 74. DOI: 10.3390/ijerph14010074
- Graeme K.A. y Pollack C.V. (1998). Heavy metal toxicity, Part I: arsenic and mercury. *J. Emerg. Med.* 16 (1), 45-56. DOI: 10.1016/S0736-4679(97)00241-2
- Grandjean P., Weihe P., White R.F., Debes F., Araki S., Yokoyama K., Murata K., Sørensen N., Dahl R. y Jørgensen P.J. (1997). Cognitive deficit in 7-year-old children with prenatal exposure to methylmercury. *Neurotoxicol. Teratol.* 19 (6), 417-428. DOI: 10.1016/S0892-0362(97)00097-4
- Guevara B.X. (2016). La inversión extranjera directa en la minería en México: el caso del oro. *Análisis Económico* 31 (77), 85-113.
- Ibrahim D., Froberg B., Wolf A. y Rusyniak D.E. (2006). Heavy metal poisoning: clinical presentations and pathophysiology. *Clin. Lab. Med.* 26 (1), 67-97. DOI: 10.1016/j.cll.2006.02.003

- INECC (2016). Metodología de valoración económica del daño del medio ambiente por contingencias del sector minero. Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático. Ciudad de México, México, 136 pp.
- INEGI (2015). Banco de indicadores. Instituto Nacional de Estadística y Geografía [en línea]. <https://www.inegi.org.mx/app/indicadores/> 18/02/2019
- Lindsay W.L. y Norvell W.A. (1978). Development of a DTPA soil zinc, iron, manganese and copper. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 42 (3), 421-428. DOI: 10.2136/sssaj1978.03615995004200030009x
- Mancilla-Villa O., Ortega-Escobar H., Ramírez-Ayala C., Uscanga-Mortera E., Ramos-Bello R. y Reyes-Ortigoza A. (2012). Metales pesados totales y arsénico en el agua para riego de Puebla y Veracruz, México. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 28 (1), 39-48.
- Martín F. y Gutiérrez M. (2010). Estudio comparativo de la peligrisidad de jales en dos zonas mineras localizadas en el sur y centro de México. *B. Soc. Geol. Mex.* 62 (1), 43-53. DOI: 10.18268/BSGM2010v62n1a3
- Martínez C., Prieto A., García L., Quero A., González S. y Casan P. (2010). Silicosis, una enfermedad con presente activo. *Arch. Bronconeumol.* 46 (2), 97–100. DOI: 10.1016/j.arbres.2009.07.008
- Moreno E. (2010). Recuperación de suelos mineros contaminados con arsénico mediante fitotecnologías. Tesis de Doctorado. Departamento de Química Agrícola, Universidad Autónoma de Madrid. Madrid, España, 207 pp.
- Moreno R., Téllez J. y Monroy M.G. (2012). Influencia de los minerales de los jales en la bioaccesibilidad de arsénico, plomo, zinc y cadmio en el distrito minero Zimapán, México. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 28 (3), 203-218.
- Needleman H. (2004). Lead poisoning. *Annu. Rev. Med.* 55, 209-222. DOI: 10.1146/annurev.med.55.091902.103653
- Ordóñez B.R., Ruiz L. y Mora R. (2003). Investigación epidemiológica sobre niveles de plomo en la población infantil y en el medio ambiente domiciliario de Ciudad Juárez, Chihuahua, en relación con una fundición de El Paso, Texas. *Rev. Salud Pública Méx.*, 45 (supl. 2), 281–295.
- Ortiz-Ortiz E., García-Nieto E., Juárez-Santacruz L., Gómez-Camarillo M.A., García-Gallegos E. y Limón-Huitrón P. (2017). Lead exposure: pottery impact in Tlaxcala, México. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 33 (1), 57-64. DOI: 10.20937/RICA.2017.33.01.05
- Parga J.R. y Carrillo F.R. (1996). Avances en los métodos de recuperación de oro y plata de minerales refractarios. *Rev. Metal. Madrid* 32 (4), 254-261. DOI: 10.3989/revmetalm.1996.v32.i4.907
- Peters B.A., Hall M.N., Liu X., Neugut Y.D., Pilsner J.R., Levy D., Ilievski V., Slavkovich V., Islam T., Factor-Litvak P., Graziano J.H. y Gamble M.V. (2014). Creatinine, arsenic metabolism, and renal function in an arsenic-exposed population in Bangladesh. *Plos One* 9 (12), 1-22. DOI: 10.1371/journal.pone.0113760

- Poma P.A. (2008). Intoxicación por plomo en humanos. *An. Fac. Med.* 69 (2), 120-126.
DOI: 10.15381/anales.v69i2.1155
- Puga S., Sosa M., Lebgue T., Quintana C. y Campos A. (2006). Contaminación por metales pesados en suelo provocada por la industria minera. *Ecol. Apl*, 5 (1-2), 149-155.
DOI: 10.21704/rea.v5i1-2.329
- Ramírez A.V. (2005). El cuadro clínico de la intoxicación ocupacional por plomo. *An. Fac. Med.* 66 (1), 57-70. DOI: 10.15381/anales.v66i1.1352
- Ramos-Gómez M., Avelar J., Medel-Reyes A., Yamamoto L., Godinez L., Ramirez M., Guerra R. y Rodríguez F. (2012). Movilidad de metales en jales procedentes del distrito minero de Guanajuato, México. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 28 (1), 49-59.
- Rees D. y Murray J. (2007). Silica, silicosis and tuberculosis. *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.* 11 (5), 474-484.
- Romero F.M., Armienta M.A., Gutiérrez M.E. y Villaseñor G. (2008). Factores geológicos y climáticos que determinan la peligrosidad y el impacto ambiental de jales mineros. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 24 (2), 43-54.
- Salinas E., Rivera I., Carrillo F.R., Patiño F., Hernández J. y Hernández L.E. (2004). Mejora del proceso de cianuración de oro y plata, mediante la preoxidación de minerales sulfurosos con ozono. *Rev. Soc. Quím. Méx.* 48 (4), 315-320.
- Sánchez A. (1993). Territorio y minería en Oaxaca: La exploración de minerales metálicos al inicio de los noventa. *Investigaciones Geográficas* 1 (26). DOI: 10.14350/rig.59018
- SEMARNAT (1996). Norma Oficial Mexicana NOM-001- SEMARNAT-1996. Establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. Secretaría de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca. *Diario Oficial de la Federación*. 23 de abril de 2003.
- SEMARNAT (2003). Norma Oficial Mexicana NOM-141- SEMARNAT-2003. Requisitos para la caracterización del sitio, proyecto, construcción, operación y postoperación de presas de jales. Secretaría de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca. *Diario Oficial de la Federación*. 14 de enero de 2004.
- SEMARNAT (2004). Norma Oficial Mexicana NOM-147- SEMARNAT-2004. 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. Secretaría de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca. *Diario Oficial de la Federación*. 2 de marzo de 2007.
- SIAM (2015). Portafolio de proyectos. Sistema de administración minera [en línea]. http://www.siam.economia.gob.mx/es/siam/p_Portafolio_de_Proyectos 18/02/2019
- Sigüenza S. (1996). Minería y comunidad indígena: el mineral de Natividad, Ixtlán, Oaxaca (1900-1940). Centro de Investigaciones y Estudios Superiores en Antropología Social. Ciudad de México, México. 157 pp.

- Simón M., Ortiz I., García I., Fernández E., Fernández J., Dorronsoro C. y Aguilar J. (1999). Pollution of soil by the toxic spill of a pyrite mine (Aznalcóllar, Spain). *Sci. Total Environ.* 242 (1-3), 105-115. DOI: 10.1016/S0048-9697(99)00378-2
- Teodoro M. (2014). Estudio de la comunidad vegetal presente en sitios con residuos de minas de plata y su capacidad fitoremediadora. Tesis de Maestría. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Oaxaca. Instituto Politécnico Nacional. Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca, México. 53 pp.
- Warren L.A. y Haack E.A. (2001). Biogeochemical controls on metal behavior in freshwater environments. *Earth-Sci. Rev.* 54 (4), 261–320. DOI: 10.1016/S0012-8252(01)00032-0
- Xu J., Lian L.J., Wu C., Wang X.F., Fu W.Y. y Xu L.H. (2008). Lead induces oxidative stress, DNA damage and alteration of p53: Bax and Bcl-2 expressions in mice. *Food Chem. Toxicol.* 46 (5), 1488-1494. DOI: 10.1016/j.fct.2007.12.016
- Zhao L.Y.L., Schulin R., Wenig L.P. y Nowack B. (2007). Coupled mobilization of dissolved organic matter and metals (Cu and Zn) in soil columns. *Geochim. Cosmochim. Ac.* 71 (14), 3407–3418. DOI: 10.1016/j.gca.2007.04.020

CAPÍTULO II

RIZOBACTERIAS NATIVAS DE JALES MINEROS CONTAMINADOS CON PLOMO. CAPACIDAD DE PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO VEGETAL Y POTENCIAL PARA LA REMEDIACIÓN, ASOCIADAS A DOS ESPECIES VEGETALES NATIVAS

INTRODUCCIÓN

La presencia en el ambiente de metales tóxicos se ha convertido en un grave problema de contaminación debido a su toxicidad, persistencia y bioacumulación (Fu et al. 2014). Esta contaminación se debe principalmente a actividades antropogénicas, de manera relevante la minería (Tang et al. 2014).

Cuando los metales tóxicos son diseminados en el ambiente, se acumulan en los organismos con los que están en contacto (Skaldina et al. 2018). Los jales mineros a menudo presentan altas concentraciones de metales tóxicos, bajos niveles de nutrientes y partículas finas (<2 μm) que dificultan o impiden la colonización de las plantas (Ginocchio et al. 2017).

San Jerónimo Taviche fue, hasta principios de la década de 1990, una comunidad minera que se localiza en Oaxaca, México. Las empresas mineras explotaban principalmente oro y plata. Se generaron tres jales con una superficie total de 18,160.3 m². Uno de los jales presenta altas concentraciones de Pb que sobrepasan la NOM-147-SEMARNAT (Teodoro 2014). Uno de los efectos inmediato del Pb hacia las plantas es la inhibición del desarrollo de las raíces (Leal-Alvarado et al. 2016). En las células vegetales, el Pb ocasiona la generación de especies reactivas de oxígeno como super óxidos (O^{-2}) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Liu et al. 2010). El Pb posee una gran facilidad de interaccionar con proteínas, lo que ocasiona que altere las enzimas, sitios estructurales y el transporte celular. Además, desplaza cationes esenciales que provoca desequilibrios en la nutrición vegetal (Sharma y Dietz 2009).

Existen estrategias de fitorremediación donde las plantas remueven, transfieren o estabilizan los metales tóxicos. Sin embargo, es necesario que las plantas logren acumular del 1 al 2 % del metal tóxico de su biomasa. No obstante, la estabilización del metal tóxico está limitada por la capacidad de las plantas para extraer y tolerar solo una cantidad finita de los metales (Narula et al. 2012). Estas plantas suelen albergar, en su rizosfera, bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) que contribuyen al establecimiento de plantas en sitios contaminados con metales tóxicos, así como acumular y/o transformar los metales en formas menos tóxicas (Wani et al. 2008). Las PGPR de los jales mineros en San Jerónimo Taviche se han estado adaptando a las condiciones que generan los metales tóxicos por más 70 años, lo que hace que sean potencialmente útiles en la biorremediación de los sitios.

Navarro-Noya et al. (2010) realizó estudios de metagenómica de rizobacterias en jales mineros de Zacatecas, México, y encontraron siete Phyla. Gupta et al. (2017) reportan 11 Phyla en jales de Malanjkhand, India. Sibanda et al. (2019) reportan 11 Phyla en jales de Roodepoort, Sudáfrica. Sin embargo, la gran mayoría de estos filotipos bacterianos no son cultivables, lo que limita su potencial uso para la remediación. Existen otros trabajos que identificaron rizobacterias cultivables asociadas a la rizosfera de plantas que han colonizado jales y suelos contaminados con metales tóxicos. En general se han detectado cuatro Phyla: Actinobacteria, Proteobacteria, Firmicutes y Bacteroides (Dell'Amico et al. 2005, Yu et al. 2014, Belimov et al. 2005).

El objetivo de este trabajo es el aislamiento y caracterización taxonómica, utilizando el marcador 16s rRNA, y funcional, de PGPR asociadas a especies vegetales que han logrado colonizar espontáneamente jales de minería en San Jerónimo Taviche, y determinar el efecto

de la inoculación de algunas de estas cepas sobre el crecimiento y acumulación de Pb de *Nicotiana glauca* y *Indigofera conzattii*,

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo

En dos jales de San Jerónimo Taviche, denominados jal 1 y jal 2, se recolectaron muestras rizosféricas de siete especies vegetales reportadas con capacidades de tolerar altas concentraciones de metales tóxicos. Por las características fisicoquímicas del jal, existe un bajo número de plantas de cada especie, generalmente están aisladas. Con ayuda de una pala, se excavo a lado de cada planta hasta encontrar la raíz. Las muestras se colocaron en bolsas de polietileno de primer uso rotuladas, posteriormente se transportaron al laboratorio para almacenarlas a 4°C. En el jal 1 (16°42'30.4"N 96°35'39.2"W), se recolectaron muestras de *Acacia pennatula*, *Ipomoea violacea*, *Bouteloua dimorpha* y *Nicotiana glauca*. En el jal 2 (16°42'36.1"N 96°35'48.4"W), se recolectaron muestras de: *Aloe vera*, *Agave angustifolia* y *Barkleyanthus salicifolius*.

Características del sustrato

El pH de los dos jales se determinó utilizando un electrodo de vidrio en una suspensión jal:agua 1:2.5 (p/v) con cinco repeticiones. Para el contenido de materia orgánica se siguieron las indicaciones de la NOM-021-SEMARNAT-2000 (SEMARNAT 2002).

Aislamiento de las rizobacterias

Las muestras homogeneizadas de jal rizosférico se suspendieron en una solución salina isotónica (NaCl al 0.9%) para hacer diluciones decimales en serie y sembrar en el medio

Luria-Bertuni: 10 g triptona, 5 g extracto de levadura, 5 g NaCl. A partir de la dilución 10^{-4} se plaquearon las rizobacterias, se incubaron por 24 horas a 28°C. Las colonias bacterianas se agruparon de acuerdo con la morfología y tinción de Gram.

Extracción de ADN

Para extraer el ADN genómico se utilizó el protocolo de fenol-cloroformo (Nicholson et al. 2001), a partir de células incubadas por 24 horas en medio Tryptic Soy Broth (TSB): hidrolizado pancreático de caseína 17.0 g, hidrolizado pancreático de harina de soya 3.0 g, dextrosa 2.5 g, cloruro de sodio 5.0, fosfato dipotásico 2.5 g. El ADN extraído se lavó con etanol al 70%, se secó y se resuspendió en TE para cuantificar una concentración mayor a 250 ng/ μ l.

La amplificación del marcador 16S se llevó a cabo con los cebadores 27F (5'-AGA GGT TTG ATC CTG GTC AG-3') y R1494 (5'-TAC GGR TAC CTT GTT ACG AC-3'). La mezcla de la reacción se compone de 2 μ l de ADN, buffer de reacción a una concentración final de 1X, dNTPs a 0.2 mM (Invitrogen, CA, USA), $MgCl_2$ a 2.5 mM, DMSO a 0.5% (v/v), cada cebador oligonucleotídico a 0.2 μ M y 1 unidad de ADN Taq polimerasa (QIAGEN, NH, USA). La PCR se realizó con un termociclador T100 (Bio-Rad Laboratories, Inc.) de la siguiente manera: una etapa inicial de desnaturalización a 94 °C durante 5 minutos, seguido de 25 ciclos térmicos (30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 59.7 °C y 1 minuto a 72 °C) y una última etapa a 72 °C durante 7 minutos. Se comprobó la calidad del producto de PCR en un gel de agarosa al 1%.

Clonación

Para la clonación se utilizó el vector pJET1.2/blunt y el kit de clonación PCR CloneJET (Thermo Scientific, MA, USA). Se siguieron las instrucciones de Thermo Scientific CloneJET PCR Cloning Kit #K1232 (<http://101.200.202.226/files/prod/manuals/201210/18/449454001.pdf>) para los procesos de ligación, transformación, análisis de clonación recombinante, clones recombinantes 16S, la PCR y la extracción de ADN plasmídico. La integridad del ADN plasmídico se verificó en un gel de agarosa al 1%. La transformación se logró usando células quimiocompetentes de *Escherichia coli* DH5 α . La secuenciación se realizó en el Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO) del CINVESTAV Unidad Irapuato.

Análisis de las secuencias

Se realizó una búsqueda en BLAST de NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) con el fin de obtener las secuencias más semejantes a los 37 aislamientos analizados. Para determinar la especie se utilizó el programa Mega 7.0 (Tamura et al. 2013) a partir de los sitios variables de las secuencias. Las secuencias fueron cortadas, alineadas y comparadas aproximadamente con 20 secuencias parecidas a cada cepa con al menos 1100 pb de longitud. Posteriormente se infirió su filogenia con el método Maximum likelihood, con un bootstrap de 500 réplicas.

Análisis estadístico

Para determinar la similitud de las especies vegetales con respecto a las rizobacterias que comparten, se generó una matriz con datos binarios (presencia o ausencia de las rizobacterias en cada especie vegetal). Para ello, se utilizó el análisis clúster con un coeficiente de similitud de Jaccard, y fueron agrupados con el método Ward, corroborado con el análisis bootstrap con 1,000 repeticiones, usando el programa NTSYS-PC v2.21 (Rohlf 2002).

Aislamientos resistentes al Pb y Hg

Se examinó la resistencia de las cepas al Pb y Hg (Tabla 1). Se utilizó el medio propuesto por Roane (1999), con la siguiente composición: 0.5g de $C_6H_5O_7Na_3$ (citrato de sodio), 0.1g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1.0g de $(NH_4)_2SO_4$, 1.0g de $C_6H_{12}O_6$ (glucosa) y 0.1g de $Na_5O_{10}P_3$ (tripolifosfato de sodio), ajustado a un pH 6.0 con $C_8H_5O_4K$ (ftalato ácido de potasio). Este pH evita la formación de fosfato inorgánico. El Pb se añadió como $Pb(NO_3)_2$, y el Hg como $HgCl_2$, a las concentraciones 0, 0.1, 0.3, 0.6, 1.2 y 2.5 mM.

Para cada especie de rizobacteria, y el consorcio que incluye las siete rizobacterias, se midió la dinámica de crecimiento celular a diferentes concentraciones de Hg y Pb en el medio de cultivo, utilizando la absorbancia a 800 μm como medida indirecta de la densidad celular. Se realizó una curva de calibración relacionando el crecimiento celular y la densidad óptica del medio (Arciniega et al. 2017). La ecuación de mejor ajuste sirvió para reportar el número de unidades formadoras de colonias por unidad de volumen en el medio de cultivo líquido (UFC mL^{-1}).

$$Curtobacterium\ citreum \quad y_{abs} = 0.0012x_{abs/ufc/ml} + 0.0008_{abs}$$

$$Bacillus\ pumilus \quad y_{abs} = 0.0039x_{abs/ufc/ml} - 0.0006_{abs}$$

$$Bacillus\ safensis \quad y_{abs} = 0.0034x_{abs/ufc/ml} - 0.0015_{abs}$$

$$Arthrobacter\ niigatensis \quad y_{abs} = 0.0087x_{abs/ufc/ml} - 0.0054_{abs}$$

$$Brevibacterium\ frigoritolerans \quad y_{abs} = 0.0018x_{abs/ufc/ml} - 0.0004_{abs}$$

$$Arthrobacter\ aurescens \quad y_{abs} = 0.0039x_{abs/ufc/ml} + 0.0007_{abs}$$

$$Curtobacterium\ citreum \quad y_{abs} = 0.0182x_{abs/ufc/ml} - 0.0076_{abs}$$

Consortio

$$y_{\text{abs}} = 0.0085x_{\text{abs}/\text{ufc}/\text{ml}} + 0.0026_{\text{abs}}$$

Crecimiento de las plantas *Nicotiana glauca* y *Indigofera conzattii*

Las semillas de *N. glauca* e *I. conzattii* se colectaron en el jal 1, fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio al 5% por cinco minutos.

El sustrato base para el crecimiento de las plantas fue el material depositado en el jal 1. Se trazaron dos parcelas de 100 m², se tomaron aleatoriamente 25 submuestras de la capa superior de 30 cm. Las 25 muestras se mezclaron para obtener un total de 160 kg.

Las plantas se establecieron el 15 de marzo del 2018. La unidad experimental fue una maceta con 1.2 Kg de mezcla jal-lombricomposta en una proporción 3:1. Después de la emergencia, a cada plántula se le adicionaron 20 mL de cultivo líquido de la cepa correspondiente, con una densidad celular estimada de 10⁸ CFU/mL. Las macetas se colocaron en un invernadero, aplicando riegos cada tercer día, con agua corriente.

Diseño experimental y variables de respuesta

El diseño experimental fue completamente al azar, con tres repeticiones y con cinco tratamientos. Tres de ellos consistieron en inocular las plantas con las cepas: *A. niigatensis*, *B. pumilus* y *C. citreum*. El cuarto tratamiento consistió en un consorcio constituido por: *B. pumilus*, *B. safensis*, *A. niigatensis*, *Brevibacterium frigoritolerans*, *Arthrobacter aurescens* y *C. citreum*. El quinto tratamiento no recibió inoculación, se consideró el tratamiento testigo. A los 70 días después de la inoculación se midió, de ambas especies, altura, número de hojas, peso seco de raíz, peso seco de la parte aérea y peso seco total. Además, se determinó la concentración de los metales pesados del tejido vegetal aéreo (tallo + hojas), tejido radical y

el sustrato de cada maceta. Las diferencias significativas de las medias de cada variable de respuesta se determinaron mediante el análisis de varianza (ANAVA) y para crear intervalos de confianza para todas las diferencias entre medias se utilizó la prueba de Tukey. Los datos se analizaron con el paquete estadístico Infostat (Infostat 2002).

Determinación de concentración de los metales tóxicos

El tejido vegetal se lavó con agua corriente y jabón neutro, posteriormente con abundante agua desionizada. Se secó a 40°C hasta peso constante y se molió. Para determinar el contenido total de metales tóxicos se utilizó 0.5 g de planta y sustrato (tamizado a 150 µm), y se realizó la digestión con 9 ml de HNO₃, 2 ml de H₂O₂ y 1 ml de HCl (González-Terreros et al. 2018). El tejido vegetal se digirió a 180°C por una hora y media, en tanto que el sustrato se digirió a 180°C por dos horas. Para la fracción extraíble con DTPA en sustrato se utilizaron 10 g de muestra. Se adicionaron 20 mL de extractante DTPA (0.005M DTPA, 0.1M trietanolamina y 0.01M CaCl₂, con pH de 7.3), se agitó durante 2 h a 180 rpm, se filtró con papel cuantitativo Ahlstrom® (Lindsay y Norvell 1978). Para control se realizaron tres replicas por cada muestra.

El Pb y el As se midieron mediante el espectrómetro de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) marca Perkin Elmer modelo Optima series 7000 DV.

Factores de bioconcentración y translocación

Para estimar los valores de los factores de bioconcentración (FBC) y de translocación (FT) se utilizaron los valores de concentración de Pb en las partes área y radical, así como en el sustrato. El FT es el coeficiente de la concentración del metal en la parte área entre la concentración en la raíz (Tu et al. 2003, Rizzi et al. 2004, Ruiz y Armienta 2012). Un FT

mayor a uno indica que la planta transporta metales efectivamente desde la raíz hasta la parte aérea (Baker y Brooks 1989). Las plantas con FT menor a uno pueden considerarse aptas para la fitoestabilización, mientras que las plantas con un FT mayor a uno son más adecuadas para la recolección del metal, por la facilidad de cosechar la parte aérea (Abreu et al. 2008, Prasad y Freitas 2003). El FBC muestra la relación entre el contenido de metal acumulado en la planta y el disponible contenido en el suelo (Salt et al. 1995). Este se calculó dividiendo la concentración del Pb en la raíz entre la concentración del Pb de la fracción extraíble con DTPA en el sustrato. De acuerdo con Ma et al. (2001), el FBC se utiliza para clasificar las plantas como acumuladoras ($FBC > 1$) o no acumuladoras ($FBC < 1$).

RESULTADOS

Aislamiento y riqueza de PGPR

En el **cuadro VI** se reportan las PGPR's identificadas con el marcador 16s. Las búsquedas en BLAST y el análisis filogenético muestran que las 37 PGPR seleccionadas pertenecen a cuatro géneros. El grupo genérico más grande (21 PGPR) corresponde a *Bacillus*, mientras que nueve cepas son de *Arthrobacter*, cinco de *Curtobacterium* y dos de *Brevibacterium*. El análisis cluster revela dos grupos de plantas, de acuerdo a la similitud en la composición de las PGPR's asociadas a ellas (**Fig. 2**). Cada grupo contiene plantas de jales distintos. *Bouteloua dimorpha* y *A. angustifolia* son las que contiene la mayor riqueza de PGPR's.

Características del sustrato

El pH del jal 1 tiene un valor medio de 3.46, con una desviación estándar de 0.21. En el jal 2 esta variable tiene un valor medio de 3.18, con una desviación estándar de 0.12. En el jal 1 el contenido de materia orgánica es de 0.67%, y en el jal 2 no hay un valor detectable.

Selección de PGPR

Los 37 aislados bacterianos fueron cultivados en medio con diferentes concentraciones de Pb y Hg. Hay una relación inversa entre la concentración de los metales tóxicos y el crecimiento celular y el número de aislados que continúa su crecimiento. De los 37 aislados originalmente incluidos en la evaluación, solo siete logran sobrevivir a una concentración de 1 mM de Pb. Solamente para las rizobacterias que lograron sobrevivir a este metal, se evaluó su resistencia a Hg. Sólo el 25.9% de estos aislados creció en el medio suplementado con 0.3 mM de Pb y Hg.

El Hg es, para estas rizobacterias, más tóxico que el Pb. *Bacillus pumilus*, *C. citreum*, *A. niigatensis* y el Consorcio fueron las cepas con mayor resistencia (**Fig. 3 y 4**).

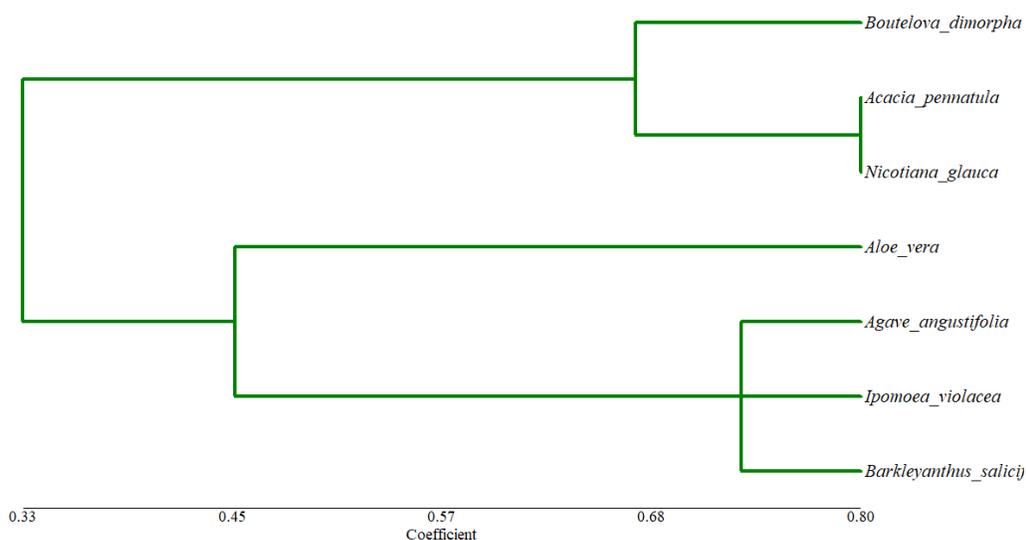


FIGURA 2. DENDROGRAMA GENERADO POR EL MÉTODO FLEXI DE RIZÓFERAS EN RELACIÓN CON RIZOBACTERIAS AISLADAS BASADO EN EL COEFICIENTE DE SIMILITUD DE JACCARD, CON UN BOOTSTRAP DE 1,000 REPLICACIONES.

CUADRO VI. MICROORGANISMOS IDENTIFICADOS CON EL MARCADOR 16S RRNA DE JALES EN SAN JERÓNIMO TAVICHE

Cepa	Especie	Porcentaje similitud	de	Planta donde fue aislado	Ubicación
Bd1	<i>Bacillus pumilus</i>	97%		<i>Boutelova dimorpha</i>	Jal 1
Bd3	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	97.30%		<i>Boutelova dimorpha</i>	Jal 1
Bd8	<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	97%		<i>Boutelova dimorpha</i>	Jal 1
Bd9	<i>Arthrobacter niigatensis</i>	98.20%		<i>Boutelova dimorpha</i>	Jal 1
Bd10	<i>Bacillus thuringiensis</i>	97.20%		<i>Boutelova dimorpha</i>	Jal 1
Bd15	<i>Bacillus pumilus</i>	98.70%		<i>Boutelova dimorpha</i>	Jal 1
Bd16	<i>Brevibacterium frigoritolerans</i>	97.90%		<i>Boutelova dimorpha</i>	Jal 1
Ap18	<i>Bacillus pumilus</i>	97.50%		<i>Acacia pennatula</i>	Jal 1
Ap21	<i>Bacillus safensis</i>	97.50%		<i>Acacia pennatula</i>	Jal 1
Ap31	<i>Bacillus thuringiensis</i>	97.30%		<i>Acacia pennatula</i>	Jal 1
Ap33	<i>Arthrobacter</i> sp.	97.30%		<i>Acacia pennatula</i>	Jal 1
Ap34	<i>Bacillus thuringiensis</i>	97.50%		<i>Acacia pennatula</i>	Jal 1
Av37	<i>Brevibacterium frigoritolerans</i>	97.60%		<i>Aloe vera</i> 5	Jal 2
Av41	<i>Bacillus cereus</i>	97.40%		<i>Aloe vera</i>	Jal 2
Av46	<i>Arthrobacter</i> sp.	96.50%		<i>Aloe vera</i>	Jal 2
Av49	<i>Arthrobacter aurescens</i>	97.20%		<i>Aloe vera</i>	Jal 2
Av53	<i>Bacillus pumilus</i>	97.80%		<i>Aloe vera</i>	Jal 2
Av54	<i>Curtobacterium citreum</i>	97.00%		<i>Aloe vera</i>	Jal 2
Aa55	<i>Bacillus pumilus</i>	97.90%		<i>Agave angustifolia</i>	Jal 2
Aa56	<i>Bacillus toyonensis</i>	97.50%		<i>Agave angustifolia</i>	Jal 2
Aa57	<i>Arthrobacter aurescens</i>	97.00%		<i>Agave angustifolia</i>	Jal 2
Aa60	<i>Bacillus safensis</i>	99.50%		<i>Agave angustifolia</i>	Jal 2
Aa61	<i>Arthrobacter nicotinovorans</i>	97.70%		<i>Agave angustifolia</i>	Jal 2
Aa63	<i>Curtobacterium citreum</i>	97.90%		<i>Agave angustifolia</i>	Jal 2
Aa64	<i>Bacillus pumilus</i>	97.30%		<i>Ipomoea violacea</i>	Jal 1
Iv70	<i>Bacillus toyonensis</i>	97.60%		<i>Ipomoea violacea</i>	Jal 1
Iv71	<i>Curtobacterium citreum</i>	99.00%		<i>Ipomoea violacea</i>	Jal 1
Iv76	<i>Bacillus wiedmannii</i>	97.30%		<i>Ipomoea violacea</i>	Jal 1
Ob77	<i>Arthrobacter niigatensis</i>	98.70%		<i>Nicotiana glauca</i>	Jal 2
Ob80	<i>Bacillus pumilus</i>	97.90%		<i>Nicotiana glauca</i>	Jal 2
Ob81	<i>Bacillus toyonensis</i>	98.10%		<i>Nicotiana glauca</i>	Jal 2
Ob83	<i>Arthrobacter</i> sp.	92.00%		<i>Nicotiana glauca</i>	Jal 2
Ob85	<i>Bacillus thuringiensis</i>	86.25%		<i>Nicotiana glauca</i>	Jal 2
Bs87	<i>Curtobacterium citreum</i>	97.40%		<i>Barkleyanthus salicifolius</i>	Jal 2
Bs89	<i>Bacillus</i> sp.	86.63%		<i>Barkleyanthus salicifolius</i>	Jal 2
Bs90	<i>Arthrobacter oxydans</i>	75.48%		<i>Barkleyanthus salicifolius</i>	Jal 2
Bs94	<i>Bacillus</i> sp.	86.20%		<i>Barkleyanthus salicifolius</i>	Jal 2

Crecimiento de *Nicotiana glauca* e *Indigofera conzattii*

Nicotiana glauca e *I. conzatti* crecen mejor en el jal enmendado con composta. Las plantas que se establecieron en el jal sin enmienda orgánica tienen un pobre crecimiento, su producción de biomasa no alcanzó valores de 0.01 gramos de peso seco. Ambas especies vegetales logran sobrevivir en todos los tratamientos. La variable altura, en ambas plantas,

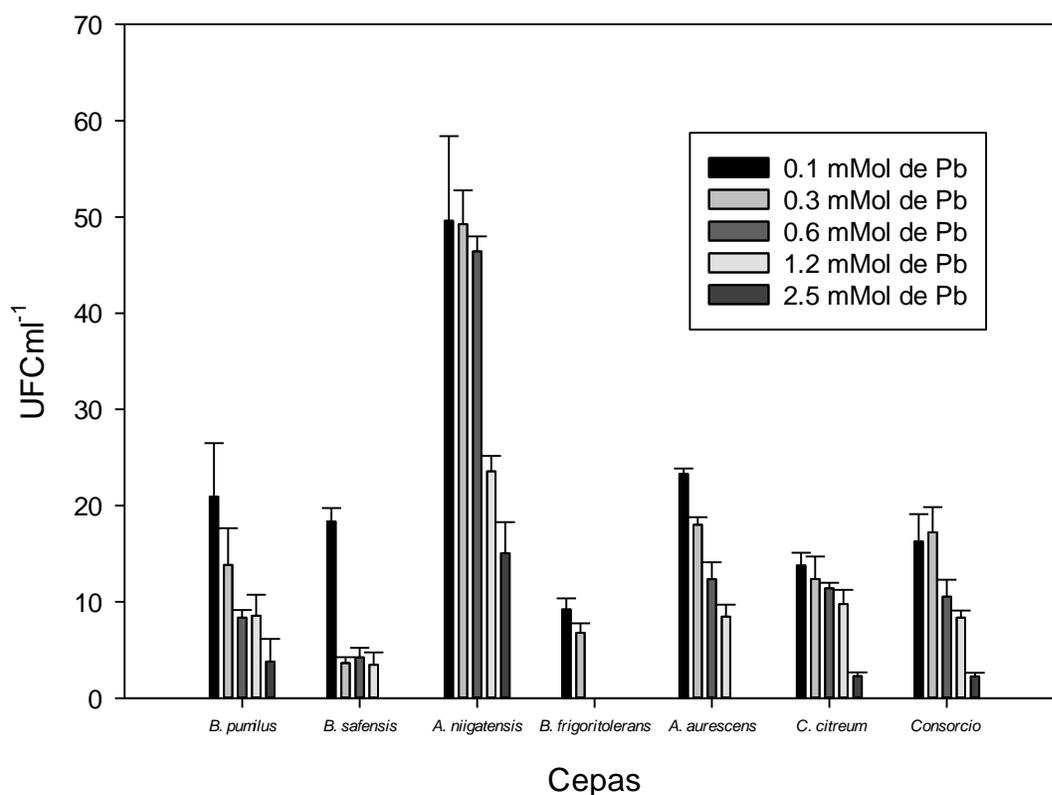


FIGURA 3. RESISTENCIA DE LAS CEPAS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE Pb

presenta diferencias significativas a los tratamientos. En *N. glauca* con el consorcio se reporta un valor superior del tratamiento control. En *I. cozattii* todos los tratamientos con inoculación de PGPR´s promueven valores de altura significativamente mayores que el control. En ambas especies, no hay efecto significativo de las PGPR´s sobre la longitud de las raíces. Para la variable número de hojas, en *N. glauca* no hay efectos significativos de la inoculación,

mientras que en *I. conzatti*, solamente la inoculación con el consorcio tiene valores similares al del testigo. Con respecto al peso seco, ambas plantas presentan los mismos patrones (Cuadros VII y VIII).

Concentración de metales tóxicos

Solo se reporta arsénico en el sustrato en el que se inocularon las cepas *B. pumilus* y consorcio en ambas plantas, y en el testigo de *N. glauca* (n=15, Media=0.17, D.E.= 0.08). Los valores de concentración de Pb extraíble con DTPA son mayores en el jal, mostrando claramente

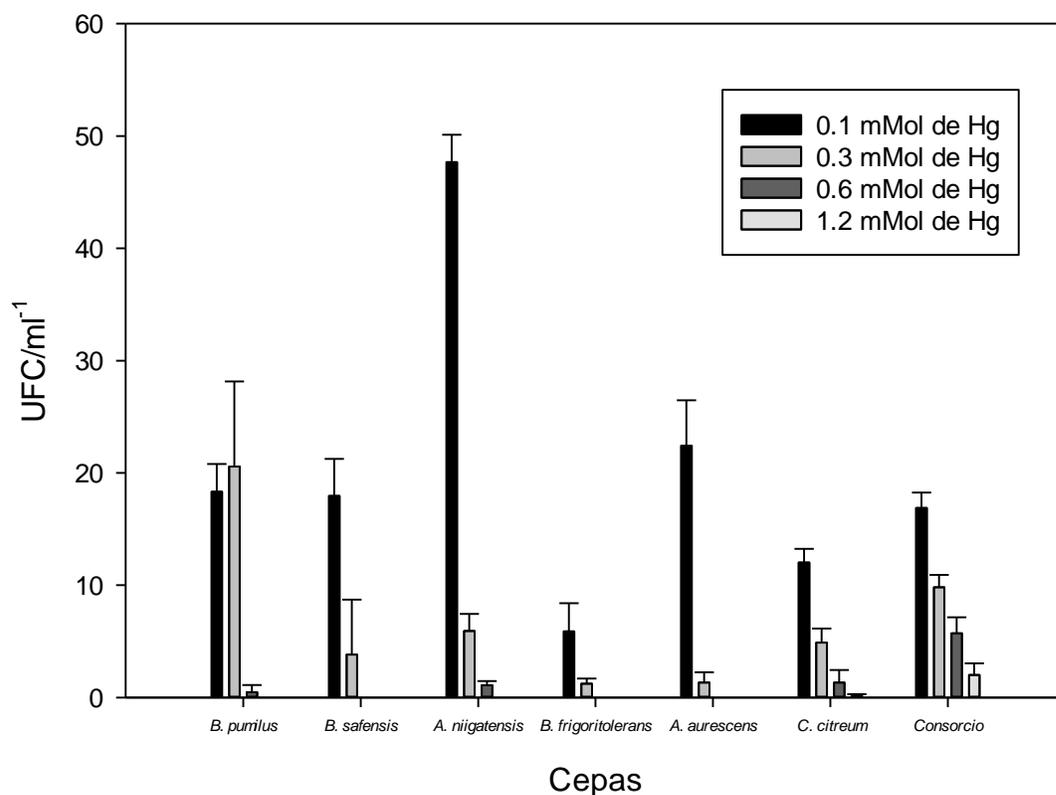


FIGURA 4. RESISTENCIA DE RIZOBACTERIAS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE Hg

el efecto de todas las PGPR's, ya que reducen la biodisponibilidad del Pb, a diferencia de las concentraciones totales que no muestra un efecto claro (**Cuadro XI y XII**).

Con respecto a las concentraciones de Pb en el tejido vegetal aéreo, en *I. conzattii* la concentración de Pb es significativamente diferente al testigo ($p < 0.006$), en tanto que en *N. glauca* no hay diferencia significativa. En esta última especie, se observa el mismo comportamiento en el tejido radical, mientras que en *I. Conzattii* si hay diferencias significativas, con el tratamiento de inoculación con la cepa *C. citreum* con el valor medio de concentración más alto (**Cuadro IX y X**).

CUADRO VII. CARACTERÍSTICAS DE *N. glauca* INOCULADO CON DIFERENTES CEPAS Y CULTIVADAS EN JALES MINEROS ENMENDADOS CON LOMBRICOMPOSTA EN UN INVERNADERO

Cepa ^e	Altura (cm)	Longitud de raíz (g)	Número de hojas	Peso aéreo (g)	Peso raíz (g)	Peso total (g)
<i>B. pumilus</i>	30.83 ^{f a^g}	19.83 a	9.67 a	0.69 a	0.46 a	1.15 a
Consortio	40.83 a	23.67 a	10.33 a	1.27 ab	0.8 ab	2.08 ab
Testigo	42.83 a	27 a	13.67 a	1.46 b	0.88 ab	2.4 ab
<i>A. niigatensis</i>	43.67 a	21.33 a	14 a	1.93 b	0.75 ab	2.21 ab
<i>C. citreum</i>	62.83 b	28.5 a	15 a	1.52 b	1.07 b	3 b
P value	<0.0009	<0.3243	<0.0431	<0.004	<0.0689	<0.0091

^fMedia de 3 plantas (n = 3), ^gValores con la misma letra no son significativamente diferentes.

CUADRO VIII. CARACTERÍSTICAS DE *I. conzattii* INOCULADO CON DIFERENTES CEPAS Y CULTIVADAS EN JALES MINEROS ENMENDADOS CON LOMBRICOMPOSTA EN UN INVERNADERO

Cepa ^e	Altura (cm)	Longitud de raíz (g)	Número de hojas	Peso aéreo (g)	Peso raíz (g)	Peso total (g)
<i>B. pumilus</i>	22.83 ^{f a^g}	37.83 a	6.67 a	0.59 a	0.37 a	0.96 a
Consortio	30.67 b	44.67 a	9 ab	1.16 a	0.57 ab	1.74 ab
Testigo	33 b	55 a	11.33 b	1.04 a	0.72 ab	1.76 ab
<i>A. niigatensis</i>	35.33 b	41 a	11.33 b	1.7 a	0.99 b	2.69 ab
<i>C. citreum</i>	35.83 b	33.33 a	11.33 b	1.75 a	1.01 b	2.75 b
P value	<0.0004	<0.5057	<0.0190	<0.0514	<0.0286	<0.0372

^fMedia de 3 plantas (n = 3), ^gValores con la misma letra no son significativamente diferentes.

Factores de translocación y bioconcentración

La habilidad de ambas plantas para translocar los metales hacia la parte aérea es baja, porque ninguna tiene valores de FT superiores a 0.15. Es *N. glauca* la que tiene los valores más altos. Los FBC para ambas plantas son inferiores a 2.2, las plantas que fueron tratadas con la cepa *A. niigatensis* tienen valor del coeficiente similares en ambas plantas (**Cuadro XIII**).

CUADRO IX. CONCENTRACIONES DE Pb EN *I. conzattii* INOCULADO CON DIFERENTES CEPAS Y CULTIVADAS EN JALES MINEROS ENMENDADOS CON LOMBRICOMPOSTA EN UN INVERNADERO

Cepa ^e	Parte aérea	Raíz
<i>B. pumilus</i>	0.67 ^f a ^g	14.36 a
Consortio	0.91 ab	20.73 ab
Testigo	0.98 ab	23.58 ab
<i>A. niigatensis</i>	1.32 bc	28.51 ab
<i>C. citreum</i>	1.74 c	32.85 ab
P value	<0.0006	<0.023

^fMedia de 3 plantas (n = 3), ^gValores con la misma letra no son significativamente diferentes.

CUADRO X. CONCENTRACIONES DE Pb EN *N. glauca* INOCULADO CON DIFERENTES CEPAS Y CULTIVADAS EN JALES MINEROS ENMENDADOS CON LOMBRICOMPOSTA EN UN INVERNADERO

Cepas ^e	Parte aérea	Raíz
<i>B. pumilus</i>	0.84 ^f a ^g	14.68 a
Consortio	1.13 a	14.24 4
Testigo	1.17 a	14.63 a
<i>A. niigatensis</i>	1.44 a	16.47 a
<i>C. citreum</i>	1.85 a	14.59 a
P value	<0.8021	<0.8912

^fMedia de 3 plantas (n = 3), ^gValores con la misma letra no son significativamente diferentes.

CUADRO XI. CONCENTRACIONES DE PB EN EL SUSTRATO DE *N. glauca* INOCULADO CON DIFERENTES CEPAS Y CULTIVADAS EN JALES MINEROS ENMENDADOS CON LOMBRICOMPOSTA EN UN INVERNADERO

Sustratos ^e	CTM	DTPA
<i>A. niigatensis</i>	11.14 ^f a ^g	7.97 a
<i>C.citreum</i>	18.9 ab	16.29 ab
<i>B. pumilus</i>	22.69 abc	30.76 bcd
Consorcio	25.79 abc	28.9 bc
Testigo	32.83 bc	32.01 cd
Jal	41.01 c	41.01 d
P value	<0.0106	<0.0002

^fMedia de 3 plantas (n = 3), ^gValores con la misma letra no son significativamente diferentes

CUADRO XII. CONCENTRACIONES DE PB EN EL SUSTRATO DE *I. conzattii* INOCULADO CON DIFERENTES CEPAS Y CULTIVADAS EN JALES MINEROS ENMENDADOS CON LOMBRICOMPOSTA EN UN INVERNADERO

^e Sustrato	CTM	DTPA
<i>B. pumilus</i>	30.15 ^f a ^g	49.81 a
Consorcio	25.76 a	33.57 a
<i>C.citreum</i>	56.12 ab	49.82 a
<i>A. niigatensis</i>	57.16 ab	50.21 a
Testigo	75.87 b	88.98 b
Jal	135.93 c	136.60 c
P value	<0.0001	<0.0001

^fMedia de 3 plantas (n = 3), ^gValores con la misma letra no son significativamente diferentes.

CUADRO XIII. FACTORES DE TRANSLOCACIÓN Y BIOCONCENTRACIÓN DE *I. conzattii* Y *N. glauca*

Especie/cepa	FBC	FT
<i>I. conzattii/B. pumilus</i>	0.572	0.046
<i>I. conzattii/ Consorcio</i>	0.618	0.044
<i>I. conzattii/ Testigo</i>	0.369	0.053
<i>I. conzattii/A. niigatensis</i>	0.470	0.041
<i>I. Conzattii/C.citreum</i>	0.288	0.047
<i>N. glauca/ Consorcio</i>	0.477	0.079
<i>N. glauca/ C.citreum</i>	0.493	0.127
<i>N. glauca/ B. pumilus</i>	0.457	0.057
<i>N glauca/A. niigatensis</i>	2.066	0.088
<i>N. glauca/Testigo</i>	0.896	0.080

DISCUSIÓN

En este trabajo, las rizobacterias fueron aisladas de la rizosfera de especies vegetales que han colonizado espontáneamente los jales mineros de San Jerónimo Taviche. Teodoro (2014) reporta para el jal 1 una alta concentración de Pb (1999.16 mg/Kg), en el jal 2 la concentración es menor (307.55 mg/Kg). Las concentraciones de Pb en jal 1 son más altas que las permitidas por la NOM-147-SEMARNAT.

Los microorganismos autóctonos de la rizosfera influyen en la movilidad y disponibilidad del metal tóxico del suelo a la planta (Rusinowski et al. 2018). En este trabajo, la evidencia señala que no están influyendo en la composición florística, ya que ambos jales no comparten especies vegetales. El análisis clúster permite observar que no todas las rizobacterias presentan una selectividad hacia su hospedero, ya que en especies vegetales diferentes se encuentran rizobacterias comunes. Son varios los estudios que demuestran esta relación rizobacteria-planta (Kim et al. 2011, Navarro-Noya et al. 2010, Haiyambo et al. 2015).

Al igual que en este trabajo, muchos otros estudios han reportado un bajo contenido de materia orgánica en jales mineros (Dhal y Sar 2014, Navarro-Noya et al. 2010), que no es inesperado porque el ambiente carece de nutrientes para las plantas o debido a la naturaleza ácida de los jales, lo que limita la cantidad de materia orgánica en el suelo (Ngole-Jeme y Fantke 2017).

Los metabolitos liberados por el sistema radical influyen en la riqueza y abundancia de las rizobacterias (Nihorimbere et al. 2011). Sin embargo, el ambiente del suelo (pH y carbón orgánico) tiende a modelar la diversidad bacteriana de la rizosfera (Callender et al. 2016). Los datos en este trabajo indican que los valores de los parámetros fisicoquímicos en la

rizosfera no afectan significativamente la distribución de las rizobacterias cultivables, por lo que plantas de diferentes jales comparten rizobacterias.

Por medio de análisis de ADN metagenómico, Roesch *et al.* (2007) predicen un rango de 53,533 a 26,140 especies de rizobacterias por gramo de suelo, y que la contaminación por metales tóxicos reduce la diversidad bacteriana drásticamente debido a los altos efectos tóxicos (Gans *et al.* 2005). En *B. dimorpha* se reportan siete especies de rizobacterias cultivables. *B. dimorpha* es considerada una planta acumuladora, porque tiene altas concentraciones de metales tóxicos en sus raíces (Teodoro 2014). Trabajos previos han descrito que la riqueza bacteriana del suelo es mayor que en la rizosfera de *Thlaspi caeurulescens* y variedades de crisantemos, posiblemente porque los exudados de las plantas promueven la actividad bacteriana y, en consecuencia, aumentan la movilización y concentración de metales tóxicos disponibles en la rizosfera (Delorme *et al.* 2001).

Las rizobacterias han desarrollado diversos mecanismos de resistencia para tolerar los efectos nocivos de los metales tóxicos (Silver y Phung 2005), por ejemplo, los que involucran: a) componentes celulares que capturan a los iones, neutralizando su toxicidad; b) enzimas que modifican el estado redox de los metales, convirtiéndolos en formas menos perjudiciales, y c) transportadores de la membrana que expulsan las especies nocivas del citoplasma celular (Cervantes *et al.* 2006).

El metal más tóxico es el Hg. En el consorcio de rizobacterias es en donde se reportan los menores efectos de toxicidad, posiblemente porque logran la formación y desarrollo de estructuras que pueden secuestrar o inmovilizar a los metales pesados. Moléculas y/o estructuras cuya presencia se reporta en la superficie de la pared celular pueden interactuar con los iones metálicos, tales como los exopolisacáridos, epoxi-polímeros y una superficie

paracristalina. Dichas estructuras se encuentran presentes en algunos integrantes de la familia Bacillaceae, cuya capacidad de acumular grandes cantidades de metales pesados se atribuye al ordenamiento de las proteínas de la superficie paracristalina que rodea a la célula (Allievi et al. 2011).

Las rizobacterias pueden promover el crecimiento, la nutrición y la salud de las plantas (Philippot et al. 2013). En este trabajo, se reportan estos efectos promotores de las rizobacterias en *N. glauca*. El efecto más notable se observa en la producción de biomasa, donde la inoculación con el consorcio de las rizobacterias resulta en los valores medios más altos. Dary et al. (2010) reportan que, bajo contaminación moderada por metales pesados, el rendimiento de la planta y el contenido de nitrógeno aumentan. Reportan una disminución significativa de los metales acumulados en los tejidos de las plantas en las raíces y en los brotes. Con respecto a *N. glauca*, *C. citreum* es la rizobacteria con mayor efecto en el desarrollo. Según Kukla et al. (2014), esta rizobacteria presenta una alta producción de ácido indolacético (32.4 g mL^{-1}), que estimula el crecimiento de los meristemos apicales.

Nicotiana glauca e *I. conzattii* generalmente tienen bajas concentraciones de Pb en la raíz y parte aérea cuando no son inoculadas con las rizobacterias. La utilización de rizobacterias puede llegar a reducir la concentración del Pb en los tejidos vegetales porque actúan como un biosorbente metálico eficiente (Malik 2004, Volesky 2007). Gracias a que las rizobacterias impiden que las plantas absorban el Pb, ya que los metales pueden unirse a la superficie bacteriana (Dary et al. 2010)

Los valores de FBC y FT ayudan a decidir cuál es la planta idónea para la remediación, dependiendo de la finalidad del procedimiento. Si la finalidad es estabilizar los metales en el suelo, *I. conzattii* inoculada con *A. niigatensis* debe seleccionarse, porque tiene valores que

inferen que realiza una menor translocación hacia la parte aérea. En contraste con otras especies vegetales que se encontraban en sustratos menos contaminados, Núñez-Montoya et al. (2007) reportó valores de FT superiores: *Eleocharis macrostachya* (0.18 – 0.20), *Schoenoplectus americanus* (0.64 - 2.09) y *Sporobolus airoides* (0.44 - .01). *N. glauca* inoculada con *A. niigatensis* presenta una mayor acumulación de Pb en la parte aérea, lo que permite una recolección con mayor facilidad del Pb. Este fenómeno no es habitual, ya que en plantas hiperacumuladoras tienden translocar los elementos en forma proporcional a la concentración en el sustrato (Ma et al. 2001).

CONCLUSIONES

Se reporta la presencia de cuatro géneros (*Bacillus*, *Arthrobacter*, *Curtobacterium* y *Brevibacterium*) en la rizosfera de especies vegetales que logran colonizar los jales de San Jerónimo Taviche, el de mayor riqueza es *Bacillus*.

Los resultados de este experimento muestran la importancia de la inoculación de PGPR a *N. glauca* e *I. conzattii* para la fitoestabilización del Pb en los jales mineros. *I. conzattii* inoculada con *C. citreum* es la combinación más adecuada para la estabilización de los metales tóxicos en el suelo, además de presentar un mayor desarrollo vegetal. Sin embargo, *N. glauca* inoculada con *A. niigatensis* es la combinación planta-rizobacteria con la que se presenta mayor reducción en la biodisponibilidad del Pb en el sustrato.

REFERENCIAS

- Abreu M.M., Tavares M.T. y Batista M.J. (2008). Potential use of *Erica andevalensis* and *Erica australis* in phytoremediation of sulphide mine environments: São Domingos, Portugal. *J. Geochem. Explor.* 96, 210–222. DOI: 10.1016/j.gexplo.2007.04.007
- Allievi M.C., Sabbione F., Prado-Acosta M., Palomino M. M., Ruzal, S. y Sanchez-Rivas C. (2011). Metal Biosorption by Surface-Layer Proteins from *Bacillus* Species. *J. Microbiol. Biotechnol.* 21(2), 147-153. DOI: 10.4014/jmb.1009.09046
- Arciniega J., Mafla S., Monroy A., Haro L. y Arteaga V. (2017). Acción in vitro de la Apitoxina en enterobacterias de mayor prevalencia patógena procedentes de cobayos. *Rev. electrón. vet.* 18 (9), 1-40.
- Baker A.J.M. y Brooks R.R. (1989). Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements - a review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery* 1(2): 81-126
- Belimov A.A., Hontzeas N., Safronova V.I., Demchinskaya S.V., Piluzza G., Bullitta S. y Glick B.R. (2005). Cadmium-tolerant plant growth-promoting bacteria associated with the roots of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern.). *Soil Biol. Biochem.* 37 (2), 241-250. DOI: 10.1016/j.soilbio.2004.07.033
- Callender K.L., Roy S., Khasa D.P., Whyte L.G. y Greer C.W. (2016). Actinorhizal alder phytostabilization alters microbial community dynamics in gold mine waste rock from northern Quebec: a greenhouse study. *PLoS One* 11, 1–25. DOI: 10.1371/journal.pone.0150181.
- Cervantes C., Espino A.E., Acevedo F., León I.L., Rivera M.E., Avila M., Wróbel K., Wróbel K., Gutiérrez J.F., Rodríguez J.S. y Moreno R. (2006). Interacciones microbianas con metales pesados. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 48 (2), 203-210.
- Dary M., Chamber-Pérez M.A., Palomares A.J. y Pajueloa E. (2010). “In situ” phytostabilisation of heavy metal polluted soils using *Lupinus luteus* inoculated with metal resistant plant-growth promoting rhizobacteria. *Journal of Hazardous Materials* 177, 323–330. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2009.12.035
- Dell’Amico E., Cavalca L. y Andreoni V. (2005) Analysis of rhizobacterial communities in perennial Gramineae from polluted water meadow soil, and screening of metalresistant, potentially plant growth-promoting bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* 52, 153–162. DOI: 10.1016/j.femsec.2004.11.005
- Delorme T.A., Gagliardi J.V., Angle J.S. y Chaney R.L. (2001). Influence of the zinc hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* J. and C. Presl. and the nonmetal accumulator *Trifolium pratense* L. on soil microbial populations. *Can J Microbiol.* 47, 773–776. DOI: 10.1139/cjm-47-8-773
- Dhal P.K. y Sar P. (2014). Microbial communities in uranium mine tailings and mine water sediment from Jaduguda U mine, India: a culture independent analysis. *J. Environ. Sci Health A Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.* 49, 694–709. DOI: 10934529.2014.865458
- Fu J., Zhao C., Luo Y., Liu C., Kyzas G.Z., Luo Y., Zhao D., An S. y Zhu H. (2014). Heavy metals in surface sediments of the Jialu River. China: Their relations to

- environmental factors. *J. Hazard. Mater.* 270, 102–109. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2014.01.044
- Gans J., Wolinsky M. y Dunbar J. (2005). Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. *Science* 309 (5739), 1387–1390. DOI: 10.1126/science.1112665
- Ginocchio R., León-Lobos P., Arellano E.C., Anic V., Ovalle J.F. y Baker A.M. (2017). Soil physicochemical factors as environmental filters for spontaneous plant colonization of abandoned tailing dumps. *Environ Sci Pollut Res Int.* 24 (15), 13484-13496. DOI: 10.1007/s11356-017-8894-8. Epub 2017 Apr 7.
- González-Terreros E., Ruíz-Valdiviezo V.M., Galván-Velázquez A., Franco-Hernández M.O., Luna-Guido M. y Dendooven L. (2018). Heavy Metals in Mine-Tailing Soil Mixtures Cultivated with *Ricinus communis* L. *Pol. J. Environ. Stud.* 27 (5), 2007-2022. DOI: 10.15244/pjoes/78923
- Gupta A., Dutta A., Sarkar J., Paul D., Panigrahi M. K., y Sar P. (2017). Metagenomic exploration of microbial community in mine tailings of Malanjkhand copper project, India. *Genomics data* 12, 11-13. DOI: 10.1016/j.gdata.2017.02.004
- Haiyambo D.H., Chimwamurombe P.M. y Reinhold-Hurek B. (2015). Isolation and Screening of Rhizosphere Bacteria from Grasses in East Kavango Region of Namibia for Plant Growth Promoting Characteristics. *Curr. Microbiol.* 71 (5), 566-571 DOI 10.1007/s00284-015-0886-7
- Infostat. 2002. Versión 3.0. Grupo Infostat/ FCA. Universidad Nacional de Córdoba, Ed.Brujas. Córdoba, Argentina.
- Kim W., Cho W.K., Kim S., Chu H., Ryu K., Yun J., y Park C. (2011). Genetic diversity of cultivable plant growth-promoting rhizobacteria in Korea. *J. Microbiol. Biotechnol.* 21 (8), 777-90. DOI: 10.4014/jmb.1101.01031
- Kukla M., Płociniczak T. y Piotrowska-Seget Z. (2014). Diversity of endophytic bacteria in *Lolium perenne* and their potential to degrade petroleum hydrocarbons and promote plant growth. *Chemosphere.* 117, 40-46. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2014.05.055
- Leal-Alvarado D.A., Espadas-Gil F., Sáenz-Carbonell L., Talavera-May C. y Santamaría J.M. (2016). Lead accumulation reduces photosynthesis in the lead hyperaccumulator *Salvinia minima* Baker by affecting the cell membrane and inducing stomatal closure. *Send to Aquat Toxicol.* 171, 37-47. DOI: 10.1016/j.aquatox.2015.12.008
- Lindsay W.L. y Norvell W.A. (1978). Development of a DTPA soil zinc, iron, manganese and copper. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 42 (3), 421-428. DOI: 10.2136/sssaj1978.03615995004200030009x
- Liu, N., Lin, Z. F., Lin, G. Z., Song, L. Y., Chen, S. W., Mo, H., et al. (2010). Lead and cadmium induced alterations of cellular functions in leaves of *Alocasia macrorrhiza* L. Schott. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 1238–1245. doi:10.1016/j.ecoenv.2010.06.017
- Ma L.Q., Komar K.M., Tu C., Zhang W., Cai Y. y Kennelley E. (2001). A fern that hyperaccumulates arsenic. *Nature.* 409 (6820), 579. DOI: 10.1038/35054664

- Malik A. (2004). Metal bioremediation through growing cells. *Environ. Int.* 30 (2), 261–278. DOI: 10.1016/j.envint.2003.08.001
- Narula N., Reinicke M., Haferburg G, Kothe E. y Behl R.K. (2012). Plant-Microbe interaction in heavy- metal-contaminated soils. En: *Bio-Gep Interactions in metal-contaminated soils.* (Varma, A. y Kothe E., Ed.). Springer. Noida, India, pp 143-162 DOI: 10.1007/978-3-642-23327-2
- Navarro-Noya, Y.E., Jan-Roblero J., González-Chávez D.C., Hernández-Gama R. y Hernández-Rodríguez C. (2010). Bacterial communities associated with the rhizosphere of pioneer plants (*Bahia xyloperda* and *Viguiera linearis*) growing on heavy metals-contaminated soils. *Anton. Leeuw. Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 97, 335–349. DOI: 10.1007/s10482-010-9413-9.
- Ngole-Jeme V.M. y Fantke P. (2017). Ecological and human health risks associated with abandoned gold mine tailings contaminated soil. *PLoS One* 12, 1–24. DOI: 10.1371/journal.pone.0172517.
- Nicholson T.P., Rudd B.A., Dawson M., Lazarus C.M., Simpson T.J. y Cox R.J. (2001). Design and utility of oligonucleotide gene probes for fungal polyketide synthases. *Send to Chem Biol.* 8 (2), 157-78. DOI: 10.1016/S1074-5521(00)90064-4
- Nihorimbere V. Ongena M., Smargiassi M. y Thonart P. (2011). Beneficial effect of the rhizosphere microbial community for plant growth and health. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment.* 15 (2), 327-337.
- Núñez-Montoya G.O., Alarcón-Herrera M.T., Melgoza-Castillo A., Rodríguez-Almeida F.A., Royo-Márquez M.H. (2007). Evaluación de tres especies nativas del desierto chihuahuense para uso en fitorremediación. *Terra Latinoamericana* 25 (1), 35-41.
- Philippot L., Raaijmakers J.M., Lemanceau P. y van der Putten W.H. (2013). Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nat. Rev. Microbiol.* 11 (11), 789-799. DOI: 10.1038/nrmicro3109
- Prasad M.N.V. y Freitas H.M. (2003). Metal hyperaccumulation in plants. Biodiversity prospecting for phytoremediation technology. *Electr. J. Biotechnol.* 6 (3), 287–321. DOI: 10.2225/vol6-issue3-fulltext-6
- Rizzi L., Petruzzelli G., Poggio G. y Vigna Guidi G. (2004). Soil physical changes and plant availability of Zn and Pb in a treatability test of phytostabilization. *Chemosphere.* 57, 1039-1046.
- Roane T.M. (1999). Lead Resistance in Two Bacterial Isolates from Heavy Metal–Contaminated Soils. *Microb Ecol.* 7:218–224 DOI: 10.1007/s002489900145
- Roesch L.F., Fulthorpe R.R., Riva A., Casella G., Hadwin A.K., Kent A.D., Daroub S.H., Camargo F.A., Farmerie W.G., Triplett E.W. (2007). Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *ISME J.* 1 (4), 283–290. DOI: 10.1038/ismej.2007.53
- Rohlf F.J. (2002). *NTSYS-pc: Numerical Taxonomy System (version 2.1)*; Exeter Publishing, Ltd.: Setauket, NY. USA.
- Ruiz E.A. y Armienta M.A. (2012). Acumulación de arsénico y metales pesados en maíz en suelos cercanos a jales o residuos mineros. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 28 (2), 103-117

- Rusinowski S., Szada-Borzyszkowska A., Zieleźnik-Rusinowska P., Małkowski E., Krzyżak J., Woźniak G., Sitko K., Szopiński M., McCalmont J.P., Kalaji H.M. y Pogrzeba M. (2018). How autochthonous microorganisms influence physiological status of *Zea mays* L. cultivated on heavy metal contaminated soils? *Environ. Sci. Pollut. Res.* 26(5), 4746-4763. DOI: 10.1007/s11356-018-3923-9
- Salt D.E., Blaylock M., Kumar N.P.B.A., Dushenkov V., Ensley B.D., Chet I. y Raskin I. (1995). Phytoremediation: A Novel Strategy for the Removal of Toxic Metals from the Environment Using Plants. *Nature* 13, 468 – 474.
- SEMARNAT (2002). Norma Oficial Mexicana NOM-021- SEMARNAT-2003. Establece las especificaciones de fertilidad, salinidad, y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis. Secretaría de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca. Diario Oficial de la Federación. 31 de diciembre de 2002.
- Sharma S.S., y Dietz K.J. (2009). The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. *Trends Plant Sci.* 14, 43–50. DOI: 10.1016/j.tplants.2008.10.007
- Sibanda T., Selvarajan R., Msagati T., Venkatachalam S. y Meddows-Taylor S. (2019). Defunct gold mine tailings are natural reservoir for unique bacterial communities revealed by high-throughput sequencing analysis. *Sci Total Environ.* 650 (Pt 2), 2199-2209. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.09.380
- Silver, S., Phung, L.T. (2005). A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 32, 587-605. DOI: 10.1007/s10295-005-0019-6
- Skaldina O., Peräniemi S. y Sorvari J. (2018). Ants and their nests as indicators for industrial heavy metal contamination. *Environ Pollut.* 240, 574-581. DOI: 10.1016/j.envpol.2018.04.134.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A. y Kumar S. (2013). MEGA 6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725 – 2729. DOI: 10.1093/molbev/mst197
- Tang W., Shan B., Zhang H., Zhang W., Zhao Y., Ding Y., Rong N. y X. Zhu. (2014). Heavy Metal Contamination in the Surface Sediments of Representative Limnetic Ecosystems in Eastern China. *Nature.* 4, 7152. DOI: 10.1038/srep07152
- Teodoro M. (2014). Estudio de la comunidad vegetal presente en sitios con residuos de minas de plata y su capacidad fitoremediadora. Tesis de Maestría. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Oaxaca. Instituto Politécnico Nacional. Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca, México. 53 pp.
- Tu C., Ma I.Q. y Bondada B. (2003). Arsenic accumulation in the hyperaccumulator Chinese brake and its utilization potential for phytoremediation. *J. Environ. Qual.* 31, 1671-1675.
- Volesky B. (2007). Biosorption and me, *Water Res.* 41 (18), 4017–4029. DOI: 10.1016/j.watres.2007.05.062
- Wani P.A., Khan M.S. y Zaidi A. (2008). Chromium reducing and plant growth promoting Mesorhizobium improves chickpea growth in chromium amended soil. *Biotechnol Lett* 30, 159–163.

Yu X., Li Y., Zhang C., Liu H., Liu J., Zheng W., Kang X., Leng X., Zhao K., Gu Y., Zhang X., Xiang Q. y Chen Q. (2014). Culturable Heavy Metal-Resistant and Plant Growth Promoting Bacteria in V-Ti Magnetite Mine Tailing Soil from Panzhihua, China. *Plos One* 9 (9). DOI: 10.1371/journal.pone.0106618

CAPÍTULO III

ESPECIES SILVESTRES COLONIZADORAS DE JALES MINEROS, ASOCIADAS A MICROORGANISMOS RIZOSFÉRICOS, CON POTENCIAL PARA FITOREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON PLOMO

INTRODUCCIÓN

En México, la actividad minera ha dejado un gran número de depósitos de jales con altas concentraciones de metales tóxicos, como el Pb y el Hg (Romero et al. 2008). La presencia de esos elementos ocasiona limitantes físicas y químicas en el suelo que evita el establecimiento de plantas, como pH ácidos, baja capacidad de intercambio catiónico, bajo contenido de materia orgánica y bajo contenido de arcilla (Lago-Vila et al. 2019). Estas características favorecen a la movilidad y la biodisponibilidad de los metales tóxicos (Luo et al. 2018). Al acumularse en los suelos, logran incorporarse en las cadenas tróficas. Afectan la riqueza y diversidad microbianas, incluidas las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR), que promueven el crecimiento de las plantas en la rizosfera y sus actividades metabólicas. Además, la concentración elevada de metales en los suelos y su absorción por las plantas genera un estrés oxidativo que afecta de manera adversa el crecimiento y la simbiosis (Wani et al. 2008).

Existen técnicas fisicoquímicas que logran remediar la toxicidad de los metales, como el lavado de suelos. Sin embargo, estas técnicas generan una gran cantidad de residuos contaminantes (Martínez et al. 2005). Las técnicas de biorremediación pueden transferir o estabilizar los metales tóxicos con plantas y organismos rizosféricos nativos sin generar residuos tóxicos. No todos los organismos son candidatos de ser utilizados en técnicas de biorremediación. Es necesario utilizar plantas que logren acumular del 1 al 2% de su biomasa (Narula et al. 2012), y organismos rizosféricos que toleren el estrés oxidativo que se genera por la presencia de metales tóxicos, suministren nutrientes, estimulen el desarrollo

vegetativo, mejoraren la estructura del suelo y actúen como estabilizadores y/o bioacumuladores de los metales tóxicos (Ehrlich 1990). Es recomendable utilizar organismos nativos de la región, porque están adaptados a los contaminantes y el clima locales.

En San Jerónimo Taviche (Ocotlán, Oaxaca, México) se reporta la presencia de depósitos de jales que se establecieron aproximadamente a partir de 1930 (Sánchez 1993). Las operaciones mineras en la zona tuvieron lugar desde la colonia (siglo XVII). Durante el siglo XX, compañías canadienses extrajeron oro y plata, y empezaron a generar los depósitos no confinados de jales. Los organismos que están colonizándolos tienen más de 60 años adaptándose a las condiciones adversas de los jales. En estas áreas, las plantas pioneras deben acumular una mayor cantidad de metales en las raíces que en la parte aérea, lo que sugiere que estas plantas tienen una capacidad especial para evitar o prevenir la absorción, transporte y almacenamiento de metales en sus tejidos (Li et al. 2013).

Otros trabajos han evaluado el uso potencial del sistema microorganismo-planta para la biorremediación de metales tóxicos. Dary et al. (2010) determinaron la eficiencia de la planta *Lupinus luteus* con dos inóculos, *Bradyrhizobium* sp. y un consorcio que incluye a *Bradyrhizobium* sp., *Pseudomonas* sp. y *Ochrobactrum cytisi*. Con ambos inóculos demuestran el uso potencial de esta planta en la fitoestabilización de metales tóxicos. Sin embargo, la inoculación conjunta de *L. luteus* con el consorcio produjo una mejora adicional en producción de biomasa vegetal. Saadani et al. (2016) evaluaron la capacidad de *Vicia faba*, *Lens culinaris* y *Sulla coronaria* inoculados *in situ* por PGPR resistentes a metales tóxicos. Sus resultados muestran que las plantas inoculadas disminuyeron la disponibilidad de Pb en un 47%, lo que sugiere un efecto positivo de la inoculación de leguminosas por PGPR resistentes a los metales tóxicos.

El objetivo de este estudio es identificar especies vegetales nativas asociadas con consorcios de rizobacterias y hongos de micorriza arbuscular (HMA) más adecuadas para su uso potencial en la remediación de depósitos de jales con presencia de concentraciones elevadas de metales tóxicos, predominantemente Pb.

MATERIALES Y MÉTODOS

En dos jales de San Jerónimo Taviche se recolectaron semillas de seis plantas que colonizan espontáneamente los jales, por lo que se infiere tienen mecanismos para tolerar altas concentraciones de metales tóxicos. Por las características fisicoquímicas del jal, existe un bajo número de plantas que generalmente están aisladas. En el jal 1 (16°42'30.4"N 96°35'39.2"W) se recolectaron semillas de las plantas: *Cynodon dactylon* y *Dyssodia decipiens*. En el jal 2 (16°42'36.1"N 96°35'48.4"W) se recolectaron semillas de las plantas: *Nicotiana glauca*, *Indigofera conzattii*, *Salvia amarissima* y *Bidens odorata*.

Reproducción de organismos rizosfericos

Para este trabajo se cultivó, hasta una densidad celular estimada de 10^8 CFU/mL, un consorcio conformado por *Bacillus pumilus*, *Bacillus safensis*, *Arthrobacter niigatensis*, *Brevibacterium frigoritolerans*, *Arthrobacter aurescens* y *Curtobacterium citreum*, previamente aisladas y caracterizadas (Capítulo 2). Para el cultivo se utilizó el medio propuesto por Roane (1999) con la siguiente composición: 0.5g de $C_6H_5O_7Na_3$ (citrato de sodio), 0.1g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1.0g de $(NH_4)_2SO_4$, 1.0g de $C_6H_{12}O_6$ (glucosa) y 0.1g de $Na_5O_{10}P_3$ (tripolifosfato de sodio), ajustado a un pH 6.0 con $C_8H_5O_4K$ (ftalato ácido de potasio).

Los HMA fueron aislados e identificados por García (2016). El inóculo estaba constituido por *Ambispora gerdemanni*, *Acaulospora mellea*, *Entrophora infrequens*, *Claroideoglossum claroideum*, *Funneliformis geosporum* y *Septoglossum constrictum*. Para la propagación se utilizaron semillas de sorgo (*Sorghum vulgare*) como planta trampa, por su temprana colonización micorrícica y bajos requerimientos nutricionales (Guadarrama-Chávez et al. 2007). Se colocaron las semillas en macetas de 2 L, con arena (pH=7.2) esterilizada en autoclave a 15 PSI por 15 minutos como sustrato para la propagación, utilizando 30 g del inóculo. El cultivo trampa tuvo una duración de siete meses y, una vez finalizado, los inóculos se secaron a temperatura ambiente y se tamizaron a 2 mm, fueron almacenados en bolsas de polietileno a la sombra, en ausencia de humedad.

Crecimiento de las plantas

Las semillas de *N. glauca*, *I. conzattii*, *B. odorata*, *D. decipiens*, y *S. amarissima* se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 5% por cinco minutos. Los esquejes de *C. dactylon* fueron desinfectados con etanol al 70% por 2 minutos y posteriormente con hipoclorito de sodio al 5% por cinco minutos, finalmente lavados con agua estéril. El sustrato para el crecimiento de las plantas fue el material depositado en el jal 1. Se trazaron dos parcelas de 100 m², se tomaron aleatoriamente 25 submuestras de la capa superior de 30 cm. Las 25 muestras se mezclaron para obtener un total de 160 kg.

Las plantas se establecieron el cinco de noviembre del 2018 en macetas con 1.2 Kg de mezcla jal - lombricomposta en una proporción 3:1. Las dosis de inoculación utilizadas fueron: para HMA, 30 g de inóculo por maceta, colocado al momento de la siembra; para rizobacterias, 20 mL de cultivo líquido del consorcio con una densidad celular estimada de 10⁸ CFU/ml,

aplicados a cada plántula emergida. Las macetas se colocaron en un invernadero, aplicando riegos cada tercer día, con agua corriente. La duración del experimento fue de 70 días a partir de la aplicación del inóculo bacteriano.

Determinación de concentración de los metales tóxicos

El tejido vegetal se lavó con agua corriente y jabón neutro, posteriormente con abundante agua desionizada. Se secó a 40°C hasta peso constante, y se molió. Para determinar el contenido total de metales (CTM), se utilizó 0.5 g de planta y sustrato (tamizado a 150 μm), y se realizó la digestión con 9 ml de HNO_3 , 2 ml de H_2O_2 y 1 ml de HCl en una autoclave durante 30 minutos a 15 PSI. Para la fracción extraíble con DTPA en sustrato, se utilizaron 10 g de muestra. Se adicionaron 20 ml de extractante DTPA (0.005M DTPA, 0.1M trietanolamina y 0.01M CaCl_2 , con pH de 7.3), se agitó durante 2 h a 180 rpm, se filtró con papel cuantitativo Ahlstrom® (Lindsay y Norvell 1978). Para control se realizaron cuatro réplicas por cada muestra. El Pb se midió con un espectrómetro de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) marca Perkin Elmer modelo Optima series 7000 DV.

Diseño experimental y variables de respuesta

El diseño experimental fue completamente al azar con cuatro repeticiones. El experimento incluyó cuatro tratamientos: Consorcio de rizobacterias, consorcio de HMA, consorcio de rizobacterias + consorcio de HMA, y el testigo (sin inocular). A la cosecha (70 días después de la inoculación de rizobacterias) se midieron, de las seis especies: altura, número de hojas, peso seco de raíz y peso seco de la parte aérea. Se determinó la concentración de Pb del tejido vegetal aéreo (tallo y hojas), tejido radical y el sustrato de cada maceta. Las diferencias significativas de las medias de la variable de respuesta se determinaron mediante el análisis de varianza (ANAVA) y para crear intervalos de

confianza para todas las diferencias entre medias se utilizó la prueba de Tukey. Los datos se analizaron con el paquete estadístico Infostat (Infostat 2002).

Factores de eficiencia de extracción, bioconcentración y translocación

La eficiencia de extracción (EE) es la cantidad de Pb liberado por el sustrato. Se calcula dividiendo la concentración extraíble con el DTPA del Pb entre concentración total del Pb en el sustrato, y el cociente se multiplica por 100 (Hall y Changyen, 1989). Para estimar los valores de los factores de bioconcentración (FBC) y de translocación (FT) se utilizaron los valores de concentración de Pb en las partes área y radical, así como en el sustrato. El FT es el coeficiente de la concentración del metal en la parte área entre la concentración de la raíz (Tu et al. 2003, Rizzi et al. 2004, Ruiz y Armienta 2012). Un FT mayor a uno indica que la planta transporta metales efectivamente desde la raíz hasta la parte aérea (Baker y Brooks, 1989). Las plantas con FT menor a uno pueden considerarse aptas para la fitoestabilización, Las plantas con un FT mayor a uno son más adecuadas para la recolección del metal, por la facilidad de cosechar la parte aérea (Abreu et al. 2008, Prasad y Freitas 2003). El FBC muestra la relación entre el contenido de metal acumulado en la planta y el disponible contenido en el suelo (Salt et al. 1995). Este se calculó dividiendo la concentración del Pb en la raíz entre la concentración del Pb de la fracción extraíble del DTPA en el sustrato. De acuerdo con Ma et al. (2001), el FBC se utiliza para clasificar las plantas como acumuladoras ($BF > 1$) o no acumuladoras ($BF < 1$).

RESULTADOS

Todas las especies vegetales logran sobrevivir en todos los tratamientos (**Cuadro XIV**). Para la variable altura, en todas las plantas, se reportan diferencias significativas; los tratamientos

CUADRO XIV. VARIABLES DE CRECIMIENTO DE SEIS ESPECIES VEGETALES INOCULADAS CON DIFERENTES CONSORCIOS DE RIZOBACTERIAS Y HMA, CULTIVADAS EN JALES MINEROS ENMENDADOS CON LOMBRICOMPOSTA, EN UN INVERNADERO

Altura de planta (cm)						
	<i>Nicotiana glauca</i>	<i>Indigofera conzatii</i>	<i>Cynodon dactylon</i>	<i>Bidens odorata</i>	<i>Dyssodia decipiens</i>	<i>Salvia amarissima</i>
Testigo	15.25 ^f a ^g	21.18a	94.38a	4.88a	47.75a	20.00a
Consortio de rizobacterias	26.00ab	32.75b	210.25b	80.00b	57.75a	31.28ab
Consortio de HMA	29.53b	30.13b	156.33ab	71.00b	59.50a	48.50b
Consortio de rizobacterias-HMA	22.80ab	36.5b	175.75ab	62.00ab	61.50b	44.38b
P value	0.03	0.0005	0.015	0.004	0.03	0.015
Longitud de raíz (cm)						
Testigo	19.08a	26.25a	15.63a	17.50a	21.50a	16.25a
Consortio de rizobacterias	30.63ab	42.75b	19.03ab	20.13a	30.50b	22a
Consortio de HMA	23.88a	47.5b	28.88b	20.75a	32.25b	18.75a
Consortio de rizobacterias-HMA	39.75b	36ab	25.63ab	20.50a	38.25c	23.75a
P value	0.001	0.001	0.017	0.34	<0.0001	0.1788
Número de hojas						
Testigo	8.75a	12.50a	117.25a	18.50a	62.25a	59.75a
Consortio de bacterias	11.75b	16.25b	210.00b	23.50a	75.50a	65.75ab
Consortio de HMA	11.50b	15.75ab	203.00b	22.00a	157.75b	83.75b
Consortio de rizobacterias-HMA	13.50b	16.75b	202.25b	23.50a	122.25ab	60a
P value	0.0006	0.011	0.003	0.19	0.04	0.005
Peso seco de parte aérea (g)						
Testigo	0.29a	0.25a	0.34a	0.30a	0.65a	0.52a
Consortio de rizo bacterias	0.52b	0.45b	0.60b	0.51b	0.75ab	0.56a
Consortio de HMA	0.48b	0.62c	0.39ab	0.51b	0.93b	0.75a
Consortio de rizobacterias-HMA	0.48ab	0.49bc	0.50ab	0.45ab	0.73ab	0.76a
P value	0.0005	0.0003	0.03	0.0045	0.04	0.14
Peso seco de la raíz (g)						
Testigo	0.14a	0.18a	0.05a	0.05a	0.18a	0.31a
Consortio de rizobacterias	0.47b	0.46b	0.09a	0.22b	0.32bc	0.47a
Consortio de micorriza	0.40b	0.55b	0.14b	0.11ab	0.25ab	0.36a
Consortio de rizobacterias-HMA	0.30ab	0.47b	0.15b	0.12ab	0.40c	0.46a
P value	0.004	<0.0001	0.0002	0.019	0.0003	0.16

^fMedia de 4 plantas (n = 4), ^gValores con la misma letra no son significativamente diferentes.

control tienen el valor medio más bajo. En la mayoría de las plantas, la inoculación con HMA se reportan con los valores medios más altos. En la variable longitud de raíz no se reportan diferencias significativas, excepto para la especie *B. odorata*. En las demás especies vegetales, los valores medios en los tratamientos inoculados con HMA son los más altos. La variable número de hojas presenta el mismo comportamiento que la variable longitud de raíz. La variable peso seco de la parte aérea se reporta con diferencias significativas, solo en *S. amarissima* esto no ocurre. Las medias más altas se obtienen con el consorcio de HMA y el consorcio HMA + rizobacterias, excepto en las especies *N. glauca* y *B. odorata*. Para la variable peso seco de raíz, en *S. amarissima* no se reportan diferencias significativas, en el resto de las especies si las hay.

CUADRO XV. CONCENTRACIONES DE PB (mg/Kg) EN SUSTRATO DE SEIS ESPECIES VEGETALES INOCULADAS CON CONSORCIOS DE RIZOBACTERIAS Y/O HMA, CULTIVADAS EN JALES MINEROS ENMENDADOS CON LOMBRICOMPOSTA, EN UN INVERNADERO

Extracción CTM							
		<i>Nicotiana glauca</i>	<i>Indigofera conzatii</i>	<i>Cynodon dactylon</i>	<i>Bidens odorata</i>	<i>Dyssodia decipiens</i>	<i>Salvia amarissima</i>
Testigo		4.6a	2.77a	14.31a	12.98a	13.17a	14.15a
Consorcio rizobacterias	de	10.83ab	16.99b	16.45ab	13.74a	15.01a	14.96a
Consorcio de HMA		20.32c	17.37b	17.71b	15.46a	13.35a	13.88a
Consorcio rizobacterias-micorriza	de	13.86bc	3.49a	16.45ab	14.57a	13.55a	14.27a
P value		0.002	<0.0001	0.05	0.08	0.51	0.68
Extracción DTPA							
Testigo		1.24a	2.66a	4.31a	1.99a	4.77b	5.94a
Consorcio rizobacterias	de	2.18ab	1.50a	4.61a	2.41a	2.27a	5.11a
Consorcio de HMA		2.24ab	2.82a	4.94a	3.79a	2.52ab	4.71a
Consorcio rizobacterias-HMA	de	2.93b	2.60a	3.55a	2.32a	2.07a	4.68a
P value		0.05	0.08	0.47	0.31	0.02	0.78

^fMedia de 4 plantas (n = 4), ^gValores con la misma letra no son significativamente diferentes.

Concentración de metales tóxicos

Para la concentración de Pb en el sustrato de crecimiento, para todas las especies vegetales los tratamientos testigo tienen las medias más bajas en la fracción extraíble con DTPA y en CTM. Solamente en *N. glauca*, *I. conzatii* y *C. dactylon* se reportan diferencias significativas entre los tratamientos para CTM. Para la fracción extraíble DTPA, en los sustratos con *N. glauca* y *D. decipiens* se reportan diferencias significativas (**Cuadro XV**). Con respecto a las concentraciones de Pb en los tejidos vegetales aéreo y radical, solamente en *I. conzatii* se reportan diferencias significativas (**Cuadro XVI**).

CUADRO XVI. CONCENTRACIONES DE Pb (MG/KG) EN SEIS ESPECIES VEGETALES INOCULADO CON DIFERENTES CONSORCIOS DE MICORRIZAS Y RIZOBACTERIAS. CULTIVADAS EN JALES MINEROS ENMENDADOS CON LOMBRICOMPOSTA EN UN INVERNADERO

Parte aérea							
		<i>Nicotiana glauca</i>	<i>Indigofera conzatii</i>	<i>Cynodon dactylon</i>	<i>Bidens odorata</i>	<i>Dyssodia decipiens</i>	<i>Salvia amarissima</i>
Testigo		6.0a	0.89bc	0.14a	0.59a	1.11a	0.63a
Consortio rizobacterias	de	6.06a	1.13c	0.12a	0.40a	1.02a	0.6a
Consortio de HMA		3.44a	0.72bc	0.24a	0.84a	0.65a	0.74a
Consortio rizobacterias-HMA	de	4.84a	0.32a	0.22 ^a	0.75a	0.57a	0.61a
P value		0.28	<0.0001	0.67	0.26	0.021	0.84
Raíz							
Testigo		6.06a	11.44b	0.68a	0.55a	3.00a	7.90a
Consortio rizobacterias	de	3.44a	8.67b	0.99a	4.36b	5.96a	5.71a
Consortio de HMA		6.00a	11.41b	2.75a	3.28b	3.67a	3.46a
Consortio rizobacterias-HMA	de	4.84a	3.42a	2.92a	4.33b	4.28a	3.36a
P value		0.28	0.0002	0.1316	0.001	0.001	0.04

^fMedia de 4 plantas (n = 4), ^gValores con la misma letra no son significativamente diferentes.

Factores de translocación, bioconcentración y eficiencia de extracción

La capacidad de las seis especies vegetales para translocar el Pb es variable. La planta que logra acumular una mayor cantidad de Pb en su raíz es *N. glauca*, mientras que *C. dactylon* tiene la menor capacidad de absorción y acumulación radical. Con respecto a la bioconcentración, en la mayoría de las plantas se reporta menor concentración con los tratamientos que recibieron inoculación con el consorcio HMA y la combinación de consorcios rizobacterias-HMA. En *S. amarissima*. no se reporta ninguna respuesta a los consorcios. Con respecto a la eficiencia de extracción, en *S. amarissima* se observan los valores más altos (**Cuadro XVII**).

CUADRO XVII. FACTORES DE TRANSLOCACIÓN, BIOCONCETRACIÓN Y EFICIENCIA DE EXTRACCIÓN DE SEIS ESPECIES VEGETALES QUE HAN COLONIZADO LOS JALES DE SAN JERÓNIMO TAVICHE

Factor de translocación						
	<i>Nicotiana glauca</i>	<i>Indigofera conzattii</i>	<i>Cynodon dactylon</i>	<i>Bidens odorata</i>	<i>Dyssodia decipiens</i>	<i>Salvia amarissima</i>
Testigo	0.748	0.896	0.048	0.042	0.228	0.558
Consorcio de rizobacterias	0.560	0.510	0.060	0.317	0.397	0.382
Consorcio de HMA	0.143	0.657	0.155	0.212	0.275	0.249
Consorcio de rizobacterias-HMA	0.349	0.254	0.178	0.297	0.316	0.235
Factor de bioconcentración						
Testigo	0.990	0.078	0.206	1.073	0.370	0.080
Consorcio de rizobacterias	1.762	0.130	0.121	0.092	0.171	0.105
Consorcio de HMA	0.573	0.063	0.087	0.256	0.177	0.214
Consorcio de rizobacterias-HMA	1.000	0.094	0.075	0.173	0.133	0.182
Eficiencia de extracción						
Testigo	26.957	20.830	30.119	15.331	36.219	41.979
Consorcio de rizobacterias	20.129	8.829	28.024	17.540	15.123	34.158
Consorcio de HMA	11.024	16.235	27.894	24.515	18.876	33.934
Consorcio de rizobacterias-HMA	21.140	19.274	21.581	15.923	15.277	32.796

DISCUSIÓN

Los contenidos totales de Pb en los sustratos no rebasan los máximos permisibles por la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004. Sin embargo, el Pb no es un nutriente que favorezca el desarrollo de las plantas, ya que ocasiona un estrés oxidativo y logra bioacumularse en los organismos que consuman la planta y así incorporarse en la red trófica (Sharma y Rama 2005). Además de conocer la concentración total del Pb es necesario conocer la biodisponibilidad de este metal para entender mejor su toxicidad. La disponibilidad de un elemento se ve afectada por la planta, lo que ocurre con *N. glauca* inoculada con el consorcio de HMA, tratamiento en el que se reduce considerablemente la disponibilidad del Pb. La asociación simbiótica de las raíces de plantas con consorcios de HMA puede mejorar (Dosskey y Adriano 1993) o disminuir (Dueck et al. 1986) la toxicidad de los metales en el suelo. Se ha reportado que consorcios bacterianos y micorrícicos degradan los contaminantes de manera más eficiente que una sola especie (Pelz et al. 1999), porque tienen diferentes rutas de degradación catabólica que pueden degradar con mayor facilidad un determinado contaminante (Rahman et al. 2002). Producen, además, fitohormonas que estimulan el crecimiento de las plantas.

Los resultados muestran que la inoculación con microorganismos rizosféricos promueven el desarrollo vegetal en presencia de Pb. El-Meihyab et al. (2019) reportó que el suelo alterado con Cu, Cd, Zn y Pb, causan una disminución significativa en las características de crecimiento de *Sorghum bicolor*. Sin embargo, la inoculación con rizobacterias permitió que las plantas toleraran mejor el estrés oxidativo causado por los metales tóxicos, a través de la producción de biosurfactantes, prolina, ácido salicílico y sideróforos, que quelatan varios iones metálicos y promueven el crecimiento de la planta de sorgo. También, los inóculos de

HMA promueven el desarrollo vegetal atenuando el efecto de los metales tóxicos, además aumentan el pH (Zhan et al. 2019).

Los contenidos de metales tóxicos en las plantas están influenciados por factores climáticos, la especie vegetal, el período vegetativo, la contaminación y otros factores ambientales (Sovljanski et al. 1990). Angelova et al. (2005) demostraron que la distribución de los metales tóxicos entre los órganos de las plantas es selectiva y depende de la parte de la planta y las características de la superficie del órgano de la planta. La distribución de Pb, Zn y Cd en *Salvia officinalis* disminuyó en el orden: hojas > inflorescencias > raíces > tallos. Sin embargo, en *S. amarissima* esto ocurrió de manera inversa, donde la raíz tiene un valor más alto que la parte aérea. Además, Blagojević et al. (2009) muestra que *S. officinalis* presenta una mayor concentración de Pb en sus hojas (2.16 a 10 mg/Kg), a diferencia de *S. amarissima*. Barazani et al. (2004) reporta que *N. glauca* acumula 3.6 ± 1.9 mg/Kg de Pb en hoja, 2.2 ± 1.7 mg/Kg en tallo y 5.6 ± 3.3 en raíz, estos valores son parecidos a los valores que se reportan en este trabajo. Se observa en estos casos que diferentes especies del mismo género tienden a tener diferentes patrones de acumular Pb. *C. dactylon* ha sido reportada como especie fitoextractora de zinc por diferentes autores (Carrillo y González 2006, Franco et al. 2010, Machado et al. 2013). Sin embargo, sólo en un estudio en China se reportan concentraciones importantes que llegan a $3,562$ mg kg⁻¹ en tejido vegetal (Shu et al. 2005). Aunque estos autores no reportan la concentración de Pb, si evidencian la gran capacidad de *C. dactylon* de acumular metales. En este trabajo, *C. dactylon* no se reporta como altamente acumuladora de Pb, ya que no estuvo expuesta a concentraciones muy altas del metal. Los contenidos de Pb en la parte aérea de las seis plantas son considerados normales (0.5–10 mg kg⁻¹) de acuerdo con Kabata-Pendias (2011), sin embargo, el contenido de Pb en la raíz de *I.*

conzattii excede esos límites (27–150 mg kg⁻¹). Inoculada con el consorcio de rizobacterias, *N. glauca* presenta valores más bajos con respecto a los otros tratamientos, lo que muestra el efecto protector del consorcio de rizobacterias. Saadani et al. (2016) estudiaron leguminosas inoculadas con PGPR, demuestran que esos organismos reducen la biodisponibilidad del Pb. Resultados similares se reportan en este trabajo para la especie *I. conzattii*. Este comportamiento se explica porque el consorcio rizobacteriano promueve un efecto protector a las plantas, ya que las rizobacterias absorben el metal en su pared celular, dejándolos no disponibles para la planta (Dary et al. 2010).

Las plantas exhiben una amplia gama de FBC, pero *N. glauca* inoculada con el consorcio de rizobacterias es la especie que presenta el valor más grande, lo que indica su mayor capacidad para bioacumular Pb. Sin embargo, el FBC del Pb va a depender más de la especie vegetal que de la inoculación de algún microorganismo rizosférico. Además, las especies vegetales al crecer en un pH muy ácido y bajo contenido de materia orgánica, van a alterar la capacidad de bioacumular el Pb (Beckers y Rinklebe 2017). Otro factor que altera el FBC es la biodisponibilidad del Pb en el sustrato (Reis et al. 2015). La especie *I. conzattii* inoculada con el consorcio de rizobacterias tiene el valor más bajo de EE, y es la más apropiada para reducir la biodisponibilidad del Pb en el sustrato.

Los valores de FT fueron inferiores a uno en todas las especies vegetales, pero *C. dactylon* y *B. odorata* son las que tienen los menores valores, lo que indica que el Pb se acumula principalmente en las raíces, como ocurre con *Cytisus scoparius* que logra colonizar los suelos de zonas mineras abandonadas (Lago-Vila et al. 2019). Estas especies podrían ser candidatas para las técnicas de fitoestabilización y podrían empezar un proceso de sucesión ecológica secundaria en los jales.

CONCLUSIONES

La especie *C. dactylon* inoculada con el consorcio de HMA tiene la mayor tasa de crecimiento en longitud. Además, es la que mejor estabiliza el Pb en el sustrato. La inoculación con rizobacterias genera la mayor biomasa en *N. glauca*, la mayor absorción de Pb del sustrato, y en consorcio con micorrizas reduce drásticamente la biodisponibilidad del Pb. En general, los consorcios tuvieron efectos positivos en las plantas. Solo en *S. amarissima* no se observan efectos por la inoculación con organismos simbióticos y/o rizosféricos.

REFERENCIAS

- Abreu M.M., Tavares M.T. y Batista M.J. (2008). Potential use of *Erica andevalensis* and *Erica australis* in phytoremediation of sulphide mine environments: São Domingos, Portugal. *J. Geochem. Explor.* 96, 210–222. DOI: 10.1016/j.gexplo.2007.04.007
- Angelova V., Ivanov K. y Ivanova R. (2005). Heavy metal content in plants from family Lamiaceae cultivated in a industrially polluted region. *J. Herbs, Spices, Med. Plants.* 11 (4), 37. DOI: 10.1300/J044v11n04_05
- Baker A.J.M. y Brooks R.R. (1989). Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements - a review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery* 1(2): 81-126
- Barazani O., Sathiyamoorthy P., Manandhar U., Vulkan R. y Golan-Goldhirsh A. (2004). Heavy metal accumulation by *Nicotiana glauca* Graham in a solid waste disposal site. *Chemosphere* 54 (7), 867–872. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2003.10.005
- Beckers F., Rinklebe J. (2017). Cycling of mercury in the environment: source, fate, and human health implications: a review. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 47 (9), 693-794. DOI: 10.1080/10643389.2017.1326277
- Blagojević N., Damjanović-Vratnica B., Vukašinić-Pešić V. y Đurović D. (2009). Heavy Metals Content in Leaves and Extracts of Wild-Growing *Salvia officinalis* from Montenegro. *Pol. J. Environ. Stud.* 18 (2), 167-173.
- Carrillo G.R. y González C.M. (2006). Metal accumulation in wild plants surrounding mining wastes. *Environ. Pollut.* 144 (1), 84-92. DOI: 10.1016/j.envpol.2006.01.006
- Dary M., Chamber-Pérez M., Palomares J. y Pajuelo E. (2010). “*In situ*” phytostabilisation of heavy metal polluted soils using *Lupinus luteus* inoculated with metal resistant plant-growth promoting rhizobacteria. *J. Hazard. Mater.* 177 (1-3), 323–330. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2009.12.035
- Dosskev M.G. y Adriano D.C. (1993) Tracer element toxicity in VA mycorrhizal cucumber & own on weathered coal fly ash. *Soil Biol. Biochem.* 25, 1547-1552.
- Dueck Th.A., Visser P., Ernst W.H.O. y Schat H. (1986). Vesicular-arbuscular mycorrhizae decrease zinc toxicity to grasses growing in zinc-polluted soil. *Soil Biol. Biochem.* 18, 331-333. DOI: 10.1016/0038-0717(86)90070-2
- Ehrlich H.L. (1990). *Geomicrobiology*, 2a ed. Dekker, New York, 646 pp. DOI: 10.4319/lo.1982.27.5.0984
- Franco H.M., Vásquez M.M., Patiño S.A., y Dendooven L. (2010). Heavy metals concentration in plants growing on mine tailings in Central México. *Bioresour. Technol.* 101 (10), 3864-3869. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.01.013
- García G.P. (2016). Diversidad y potencial fitorremediador de hongos de micorriza arbuscular en especies vegetales que colonizan jales mineros. Tesis de Maestría. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Oaxaca. Instituto Politécnico Nacional. Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca, México. 68 pp.

- Guadarrama-Chávez P., Camargo-Ricalde S.L., Hernández-Cuevas L. y Castillo-Argüero S. (2007). Los hongos micorrizógenos arbusculares de la región de Nizanda, Oaxaca, México. *Bol. Soc. Bot. Méx.* (81), 131-137. DOI: 10.17129/botsci.1770
- Hall L. y Changyen, I. (1989). An evaluation of the extraction efficiencies of some common extractants for Fe, Cr, Mn, Ni, Pb and Cu on five grain-size fractionated, tropical marine-sediments. *Environ. Pollut.* 56, 51–63. DOI: 10.1016/0269-7491(89)90121-8.
- Infostat. 2002. Versión 3.0. Grupo Infostat/ FCA. Universidad Nacional de Córdoba, Ed.Brujas. Córdoba, Argentina.
- Kabata-Pendias A. (2011). *Trace Elements in Soils and Plants*. 4a ed. CRC Press, BocaRaton, Florida, 548 pp.
- Lago-Vila M., Arenas-Lago D., Rodríguez-Seijo A., Andrade M.L. y Vega F.A. (2019). Ability of *Cytisus scoparius* for phytoremediation of soils from a Pb/Zn mine: Assessment of metal bioavailability and bioaccumulation. *J. Environ. Manage.* 235, 152-160. DOI: 10.1016/j.jenvman.2019.01.058
- Li Y., Zu Y.Q., Fang Q.X., Chen H.Y. y Schvartz C. (2013). Characteristics of heavy-metal tolerance and growth in two ecotypes of *oxyria sinensis* hemsl. Grown on huize leadzinc mining area in Yunnan Province, China. *Commun. Soil Sci. Plant. Anal.* 44 (16), 2428–2442. DOI: 10.1080/00103624.2013.803559
- Lindsay W.L. y Norvell W.A. (1978). Development of a DTPA soil zinc, iron, manganese and copper. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 42 (3), 421-428. DOI: 10.2136/sssaj1978.03615995004200030009x
- Luo L.Q., Shen Y.T., Wang X.F., Chu B.B., Xu T., Liu Y. Zeng Y. y Liu J. (2018). Phytoavailability, bioaccumulation, and human health risks of metal(loid) elements in an agroecosystem near a lead-zinc mine. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 24111–24124. DOI: 10.1007/s11356-018-2482-4.
- Ma L.Q., Komar K.M., Tu C., Zhang W.H., Cai Y. y Kennelley, E.D. (2001). A fern that hyperaccumulates arsenic. *Nature* 409, 579. DOI: 10.1038/35054664
- Machado E., Calderón J., Moreno S., y Rodríguez Z. (2013). Accumulation of arsenic, lead, copper, and zinc, and synthesis of phytochelatins by indigenous plants of a mining impacted area. *Environ Sci. Pollut Res* 20 (6), 3946-3955. DOI: 10.1007/s11356-012-1344-8
- Martínez V.M., Nuñez R.A., Meas Y., Avelar F.J. y Rodríguez F.J. (2005). Lavado de suelo contaminado con plomo y recuperación electroquímica del Pb. *AIDIS / DIRSA* 1-10 pp.
- Narula N., Reinicke M., Haferburg G, Kothe E. y Behl R.K. (2012). Plant-Microbe interaction in heavy- metal-contaminated soils. En: *Bio-Gep Interactions in metal-contaminated soils.* (Varma, A. y Kothe E., Ed.). Springer. Noida, India, pp 143-162 DOI: 10.1007/978-3-642-23327-2
- Pelz O., Tesar M., Wittich R.M., Moore E.R.B., Timmis K.N. y Abraham W.R. (1999). Towards elucidation of microbial community metabolic pathways; unraveling the network of carbon sharing in a pollutant-degrading bacterial consortium by

- immunocapture and isotopic ratio mass spectrometry. *Environ. Microbiol.* 1 (2), 167-174. DOI: 10.1046/j.1462-2920.1999.00023.x
- Prasad M.N.V. y Freitas H.M. (2003). Metal hyperaccumulation in plants. *Biodiversity prospecting for phytoremediation technology. Electr. J. Biotechnol.* 6 (3), 287–321. DOI: 10.2225/vol6-issue3-fulltext-6
- Rahman K.S., Rahman T., Lakshmanaperumalsamy P. y Banat I.M. (2002). Occurrence of crude oil degrading bacteria in gasoline and diesel station soils. *J. Basic Microbiol.* 42 (4), 284-291. DOI: 10.1002/1521-4028(200208)42:4<284::AID-JOBM284>3.0.CO;2-M
- El-Meihyab R.M., Abou-Alya H.E., Youssef A.M., Tewfikea T.A., El-Alkshara E.A. (2019). Efficiency of heavy metals-tolerant plant growth promoting bacteria for alleviating heavy metals toxicity on sorghum. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 162, 295-301. DOI: 10.1016/j.bcab.2019.101110
- Reis A.T., Lopes C.B., Davidson C.M. Duarte A.C. y Pereira E. (2015). Extraction of available and labile fractions of mercury from contaminated soils: the role of operational parameters. *Geoderma* 259, 213-223. DOI: 10.1016/j.geoderma.2015.06.004
- Rizzi L., Petruzzelli G., Poggio G. y Vigna Guidi G. (2004). Soil physical changes and plant availability of Zn and Pb in a treatability test of phytostabilization. *Chemosphere.* 57, 1039-1046.
- Roane T.M. (1999). Lead Resistance in Two Bacterial Isolates from Heavy Metal–Contaminated Soils. *Microb Ecol.* 7:218–224 DOI: 10.1007/s002489900145
- Romero F.M., Armienta M.A., Gutiérrez M.E. y Villaseñor G. (2008). Factores geológicos y climáticos que determinan la peligrosidad y el impacto ambiental de jales mineros. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 24 (2), 43-54.
- Ruiz E.A. y Armienta M.A. (2012). Acumulación de arsénico y metales pesados en maíz en suelos cercanos a jales o residuos mineros. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 28 (2), 103-117
- Saadani O., Fatnassi I.C., Chiboub M., Abdelkrim S., Barhoumi F., Jebara M y Jebara S.H. (2016). *In situ* phytostabilisation capacity of three legumes and their associated Plant Growth Promoting Bacteria (PGPBs) in mine tailings of northern Tunisia. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 130, 263-269. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2016.04.032
- Salt D.E., Blaylock M., Kumar N.P.B.A., Dushenkov V., Ensley B.D., Chet I. y Raskin I. (1995). Phytoremediation: A Novel Strategy for the Removal of Toxic Metals from the Environment Using Plants. *Nature* 13, 468 – 474.
- Sánchez A. (1993). Territorio y minería en Oaxaca: La exploración de minerales metálicos al inicio de los noventa. *Investigaciones Geográficas* 1 (26). DOI: 10.14350/rig.59018
- Sharma P. y Rama D. (2005). Lead toxicity in plants. *Braz. J. Plant Physiol.* 17 (1), 35-52. DOI: 10.1590/S1677-04202005000100004
- Shu W.S., Ye Z.H., Zhang Z.Q., Lan C.Y. y Wong M.H. (2005). Natural colonization of plants on five lead/zinc mine tailings in southern China. *Restoration ecology.* 13 (1), 49-60. DOI: 10.1111/j.1526-100X.2005.00007.x

- Sovljanski R., Lazic S., Macko V. y Obradovic S. (1990) Heavy metal content in medicinal and spice plants cultivated in Yugoslavia. *Herba-Hung.* 29 (3), 59. DOI: 10.17660/ActaHortic.1992.306.15
- Tu C., Ma I.Q. y Bondada B. (2003). Arsenic accumulation in the hyperaccumulator Chinese brake and its utilization potential for phytoremediation. *J. Environ. Qual.* 31, 1671-1675.
- Wani P.A., Khan M.S., y Zaidi A. (2008). Effect of heavy metal toxicity on growth, symbiosis, seed yield and metal uptake in pea grown in metal amended soil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 81 (2), 152–158. DOI: 10.1007/s00128-008-9383-z
- Zhan F., Li B., Jiang M., Li T., He Y., Li Y. y Wang Y. (2019). Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on the growth and heavy metal accumulation of bermudagrass [*Cynodon dactylon* (L.) Pers.] grown in a lead–zinc mine wasteland. *Int. J. Phytoremediat.* 17, 1-8. DOI: 10.1080/15226514.2019.1577353

CONCLUSIONES GENERALES

Por la actividad minera, San Jerónimo Taviche acumula, dentro de la zona habitada de la población, jales mineros que contienen altas concentraciones de metales tóxicos, y es el Pb el metal con mayor presencia en las muestras de jal, suelo y agua. Sus valores de concentración en estos medios exceden seis veces la normatividad mexicana. La ingesta accidental pero continua de este metal por los pobladores representa el principal riesgo. Además, los pobladores no perciben los jales como un problema ambiental.

El estudio identifica un área débil en materia de política ambiental y del papel del Estado por promover un ambiente sano: los jales de las minas abandonadas. Al otorgar una concesión, se confía que el desarrollo tecnológico reducirá los daños hacia el ambiente. Sin embargo, no existe la legislación que promueva la remediación de la contaminación provocado por empresas mineras que extrajeron los minerales y ya no poseen la concesión.

Para mitigar este daño, se reporta que el uso de diferentes organismos nativos (plantas, HMA y PGPR) constituye una opción viable y eficiente para remediar los jales mineros, ya que tienen más de 60 años adaptándose al estrés oxidativo de los metales tóxicos.

El género *Bacillus* se reporta con el mayor número de especies en la rizosfera de las plantas que colonizan espontáneamente ambos jales. La distribución de las PGPR en la rizosfera de esas especies vegetales está asociada a valores de pH y contenido de materia orgánica en el sustrato.

Bajo las condiciones sociales y ambientales que existen en San Jerónimo Taviche, la propuesta de fitorremediación de los jales mineros y los suelos circundantes que han recibido y acumulado este material por deslave a lo largo de los años cincuenta, debe buscar reducir la escorrentía y la fitoextracción. En este caso, *C. dactylon* es una gramínea de rápido

crecimiento que logra contener el suelo e inoculada con el consorcio de HMA presenta la mayor longitud, además es la que mejor estabiliza el Pb en el sustrato. La especie vegetal que también logra reducir la biodisponibilidad del Pb en el sustrato es *N. glauca*, en simbiosis con el consorcio de HMA inoculado.

La presencia de especies vegetales asociadas con organismos rizosféricos influye de manera positiva en la remediación del suelo contaminado con metales tóxicos. Sin embargo, no existe un arquetipo de planta en asociación con microorganismos rizosféricos para remediar toda clase de contaminación en cualquier circunstancia; las recomendaciones de combinaciones plantas y microorganismos estarán condicionadas al objetivo de estabilizar, recolectar o reducir la biodisponibilidad del metal tóxico. De esta manera se logran generar propuestas adecuadas de remediación que permitan recuperar los mecanismos de autorregulación del ecosistema y la rehabilitación del suelo.