



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE
ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO
POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD IRAPUATO

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOQUÍMICA

**“Fitorremediación asistida por microorganismos para la remediación de
suelos contaminados con metales pesados en Guadalupe Zacatecas”**

Tesis que presenta

Sergio Abraham Hernández Covarrubias

Para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

En la especialidad de

Biología de Plantas

Director de tesis:

Dr. Juan José Peña Cabrales

Irapuato, Gto., México

Enero de 2018

El presente trabajo se realizó gracias al apoyo brindado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**Conacyt**) y fue financiado como parte del proyecto **“La Fitorremediación como Alternativa para Atenuar la Contaminación por Metales Pesados y Compuestos Organoclorados en Zacatecas” (FOINS-214108)**.

Este proyecto fue realizado en el **Laboratorio de Microbiología Ambiental** del Departamento de Biotecnología y Bioquímica de la Unidad Irapuato del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (**Cinvestav**), bajo la dirección del **Dr. Juan José Peña Cabriales**.



DEDICATORIA

A mis padres:

Por todo el amor que me han dado, por enseñarme respeto, por ser mis ejemplos de vida.

A mis hermanos:

Por estar siempre conmigo, por todo el apoyo incondicional y motivación para salir adelante.

A mis sobrinos:

Por tanta alegría, por ser el futuro de nuestra familia

A Coyol:

Por todo el amor que siempre me das, por esta vida que estamos construyendo juntos.

Science

If you don't make mistakes,

You're doing it wrong

If you don't correct those mistakes,

You're doing it really wrong

If you can't accept that you're mistaken,

You're not doing it at all

Anonymous

*Why do we know more about distant celestial objects than
we do about the ground beneath our feet?*

Yaalon D.H. (2000) Nature 407

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis el **Dr. Juan José Peña Cabriales**, por abrirme las puertas de su laboratorio, por todas sus enseñanzas a nivel académico y personal, por su amistad, paciencia y todos sus consejos a lo largo de este tiempo.

A mi comité sinodal formado por la **Dra. María Maldonado Vega**, el **Dr. John Paul Délano Frier**, el **Dr. Miguel Ángel Gómez Lim**, y el **Dr. Luis José Delaye Arredondo**, por sus valiosos consejos y aportes para la elaboración de este trabajo.

Al **Dr. Francisco Javier Avelar Martínez** rector de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, por permitirme realizar una estancia en su laboratorio para realizar análisis de metales pesados y por todas las observaciones para la mejora de este documento.

Al **Dr. William J. Broughton**, por su amistad y sus acertados comentarios y sugerencias para mejorar la redacción de los artículos científicos.

Al **Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav)** por haberme aceptado en el programa de Doctorado de Biotecnología de Plantas y toda la ayuda brindada por la institución.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt)** por la beca otorgada (**No. 346871**) para la realización de mis estudios de doctorado.

A la **Universidad Autónoma de Zacatecas (UAZ)** por su apoyo para el financiamiento del artículo de resultados.

Al **M. en C. José Antonio Vera**, por su amistad, sus valiosas sugerencias y por toda la ayuda brindada a lo largo de este tiempo.

Al **IBQ Luis Ernesto Hernández Rodríguez**, por el apoyo brindado y su ayuda con la elaboración de análisis de laboratorio y por ser un buen amigo.

Al **Dr. Armando Flores de la Torre**, por su ayuda en la cuantificación de metales pesados.

A la **Dra. Doralinda Guzmán Ortiz**, por sus valiosos consejos, su apoyo a nivel académico y personal.

A la **M. en C. Laura Yamamoto**, perteneciente al Laboratorio de Estudios Ambientales de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, por la ayuda brindada para la determinación de metales pesados en muestras de suelo y plantas.

A la **M. en C. Coyolxauhqui Barrera**, por todos sus consejos, su apoyo y palabras de ánimo en los momentos difíciles y por estar a mi lado siempre.

A los estudiantes de licenciatura con los que pude compartir y apoyar en sus proyectos: **Carlos Chávez, Alejandro Cornelio, Karla Orellana, Felipe Quintanilla, Ramón Muñiz, Israel Penagos, Jonathan Jaramillo, Marcos Arreola, Manuel Pérez y Omar Avilés.**

A mis compañeros de laboratorio por su amistad y compañerismo: **Mónica Uribe, Conrado Guzmán, David Camarena, Magda Cervantes, Milton Barcos, Paco Saldaña, Isidoro Reyes, Jaime Mendoza, Julio Mojica y Yamili Rossini.**

A **Hugo Lazcano y Juan Vázquez**, por su ayuda y consejos en análisis específicos.

A la familia **Herrera-Reyes** por aceptarme en su hogar durante mi estancia en Aguascalientes, en especial a **Naieli Herrera** muchas gracias por todos los favores y facilidades durante mi estancia.

Un agradecimiento especial a **Antonio Cisneros**, al **M. en C. Enrique Ramírez**, **M. en C. Norma Hernández** y **M. en C. África Islas**, por su gran ayuda, disposición para la realización de este trabajo.

Al **Dr. Lino Sánchez Segura** por su apoyo en la visualización de muestras al microscopio.

A **Dora Elia Anguiano** y **Juan Pablo Jaime** por su ayuda en la realización de trámites y cuestiones administrativas en el CINVESTAV.

A los laboratorios de **Fisiología de la Defensa de Plantas, Micotoxinas, Identidad Celular de Plantas, Fitobioquímica y Bacteriología Molecular**. Por facilitar reactivos y equipo para la realización de este trabajo.

Un agradecimiento sincero a todas las personas que contribuyeron a la elaboración de este trabajo y olvide mencionar.

CONTENIDO

	Pág.
<i>ÍNDICE</i>	IV
<i>ÍNDICE DE FIGURAS</i>	VIII
<i>ÍNDICE DE TABLAS</i>	IX
<i>RESUMEN</i>	X
<i>ABSTRACT</i>	XII
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	2
2.1 Impacto Ambiental de la actividad minera en México	2
2.2 Metales pesados y su efecto en los seres vivos	5
2.3 Dinámica de los metales en suelo y sedimento	6
2.3.1 Textura del suelo	6
2.3.2 pH	7
2.3.3 Materia orgánica (MO)	7
2.3.4 Potencial de óxido reducción	7
2.3.5 Capacidad de intercambio catiónico	8
2.3.6 Salinidad	9
2.4 Interacciones entre microorganismos y metales pesados	9
2.4.1 Biosorción	9
2.4.2 Reducción biológica	10
2.4.3 Biolixiviación (heterotrófica y autotrófica)	11
2.4.4 Biovolatilización	11
2.4.5 Estudios de las comunidades microbianas en suelos contaminados por metales pesados	12
2.5 Remediación de suelos contaminados con metales pesados	12
2.5.1 Fitorremediación	13
2.5.2 Fitorremediación asistida por quelantes químicos	15
2.5.2 El papel de los microorganismos en los tratamientos de fitorremediación	15
2.5.3 Producción de ácido indolacético	16

2.5.4 Producción de ACC desaminasa (1-Amino-ciclopropano-1-carboxilato desaminasa)	16
2.5.5 Fijación biológica de nitrógeno	17
2.5.6 Producción de sideróforos	17
2.5.7 Solubilización de fosfatos	18
2.6.8 Estudios de fitorremediación asistida por microorganismos en México	18
2.6 Caso de estudio laguna de “La Zacatecana”	20
III. JUSTIFICACIÓN	23
IV. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	24
4.1 HIPÓTESIS	24
4.2 OBJETIVO	24
4.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
V. MATERIALES Y MÉTODOS	25
5.1 Sitio de estudio	25
5.2 Muestreo	26
5.2.1 Análisis fisicoquímico del suelo	27
5.2.2 Determinación de bacterias heterótrofas totales de suelo	27
5.2.3 Determinación total de metales pesados en suelo de “La Zacatecana”	28
5.2.4 Índice de geoacumulación	28
5.2.5 Índice de Riesgo Ecológico Potencial	29
5.2.6 Correlación bivariada de los metales pesados analizados	30
5.2.7 Mapas de dispersión de metales	30
5.2.8 Extracción secuencial Pb en suelos	31
5.2.9 Factor de Movilidad	32
5.2.10 Relación entre las propiedades fisicoquímicas del suelo y la presencia de metales pesados	32
5.2.11 Composición química del suelo por Espectrometría de Fluorescencia de Rayos X (FRX)	32
5.3 Análisis microbiológico	33
5.3.1 Aislamiento de microorganismos	33
5.3.2 Caracterización bioquímica de los aislados	33
5.3.3 Producción de compuestos indólicos	33
5.3.4 Solubilización de fosfatos	34
5.3.5 Selección de aislados solubilizadores de fosfato	34

5.3.6 Cuantificación de solubilización de fosfatos	34
5.3.7 Producción de sideróforos	34
5.3.8 Cuantificación de sideróforos	35
5.3.9 Crecimiento en medio libre de nitrógeno	36
5.3.10 Amplificación del gen <i>nifH</i>	37
5.3.11 Identificación molecular de los aislados	37
5.3.12 Extracción de ADN	37
5.3.13 Amplificación del gen 16S ARN ribosomal	38
5.3.14 Análisis de las secuencias	39
5.4 Ensayos <i>in vitro</i> de promoción de crecimiento vegetal	39
5.5 Selección de plantas para los tratamientos de fitorremediación	40
5.5.1 Ensayo de germinación con <i>Amaranthus palmeri</i> y <i>Helianthus annuus</i>	40
5.6 Ensayo de fitorremediación asistida por microorganismos	41
5.6.1 Acumulación de Pb en diferentes tejidos de <i>H. annuus</i> y <i>A. palmeri</i>	42
5.7 Análisis estadísticos	43
VI. RESULTADOS	44
6.1 Análisis fisicoquímicos del suelo	44
6.2 Conteo de bacterias heterótrofas totales de suelo	45
6.3 Contenido total de metales pesados en suelo y sedimento	45
6.3.1 Índice de geoacumulación	48
6.3.2 Índice de Riesgo Ecológico Potencial	49
6.3.3 Correlación bivariada de los metales pesados analizados	50
6.4 Mapas de dispersión de metales	52
6.5 Extracción secuencial de Pb en suelo	53
6.5.1 Factor de movilidad	54
6.6 Análisis de componentes principales	55
6.7 Composición química del suelo por fluorescencia de rayos X (FRX)	55
6.8 Análisis microbiológico	58
6.8.1 Caracterización de los aislados bacterianos	58
6.8.2 Identificación molecular de los aislados	60
6.9 Ensayos <i>in vitro</i> de promoción de crecimiento vegetal	60
6.10 Ensayo de germinación con <i>A. palmeri</i> y <i>H. annuus</i>	63

6.11 Ensayo de fitorremediación asistida por microorganismos	65
6.11.1 Efecto en la altura, CCI y acumulación de biomasa	66
6.11.2 Efecto en la acumulación de Pb en diferentes tejidos de <i>H. annuus</i> y <i>A. palmeri</i>	67
VII. DISCUSION	74
VIII. CONCLUSIONES	81
IX. PERSPECTIVAS	82
X. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	83
XI. ANEXOS	101

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de minas en el territorio nacional.	3
Figura 2. Interacciones entre metales y microorganismos.	10
Figura 3. Comparación de extensiones de la zona metropolitana del Estado de Zacatecas y la Laguna de “La Zacatecana”.	21
Figura 4. Laguna de “La Zacatecana” en diferentes épocas del año. a) lluvias b) estiaje.	22
Figura 5. Ubicación del municipio de Guadalupe en el estado de Zacatecas.	25
Figura 6. Distribución de los puntos de muestreo analizados en este estudio.	27
Figura 7. Tamaño de las unidades experimentales utilizadas en los ensayos de fitorremediación.	42
Figura 8. Conteo de bacteria heterotróficas totales de suelo y sedimento de “La Zacatecana”.	46
Figura 9. Correlograma de concentraciones de metales pesados en suelo y sedimento de la presa de “La Zacatecana”.	51
Figura 10. Dispersión superficial de los diferentes metales en suelo y sedimento de la laguna de “La Zacatecana”.	52
Figura 11. Extracción secuencial de Pb por el método de 5 pasos de Tessier <i>et al.</i> , 1979.	53
Figura 12. Factor de movilidad de Pb en muestras de suelo y sedimento de la presa de “La Zacatecana”.	54
Figura 13. Análisis de Componentes Principales (ACP).	56
Figura 14. <i>Rhodococcus sp.</i> MR317 creciendo en agar nutritivo suplementado con diferentes concentraciones de Pb(NO ₃) ₂ .	60
Figura 15. Árbol filogenético de bacterias promotoras de crecimiento vegetal tolerantes a Pb obtenidas en este estudio.	61
Figura 16. Ensayo <i>in vitro</i> de promoción de crecimiento vegetal.	62
Figura 17. <i>Amaranthus palmeri</i> S. Wats especie seleccionada en este estudio para realizar ensayos de fitorremediación de suelo contaminado con Pb.	64
Figura 18. Efecto en la altura y en el índice de contenido de clorofila (CCI) de los diferentes tratamientos	68
Figura 19. Efecto de los diferentes tratamientos en la acumulación de biomasa de las dos especies vegetales analizadas.	69
Figura 20. Efecto de la adición de EDDS en los tratamientos de fitorremediación.	71
Figura 21. Desarrollo de los diferentes tratamientos de fitorremediación creciendo en suelo de “La Zacatecana”.	72

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Límites máximos permisibles de metales pesados y arsénico en suelos y sedimento (NOM-147-SEMARNAT-SSA1-2004).	3
Tabla II. Lugares de la República Mexicana más afectados por la contaminación de Hg, As y Pb.	4
Tabla III. Coordenadas de los puntos de muestreo de este estudio.	26
Tabla IV. Índice de geoacumulación de Müller.	29
Tabla V. Niveles de riesgo potencial de afectación por metales pesados establecidos por Hakanson (1980).	30
Tabla VI. Taxonomía de las especies vegetales utilizadas en este estudio.	40
Tabla VII. Características fisicoquímicas de las muestras del suelo de “La Zacatecana”.	44
Tabla VIII. Contenido total de metales de cada punto de muestreo.	47
Tabla IX. Valores de los “Igeo Index” de suelo y sedimento de la presa de la Zacatecana.	49
Tabla X. Índice de “Riesgo Ecológico Potencial” Calculado para muestras de suelo y sedimento de la Zacatecana.	50
Tabla XI. Coeficiente de correlación entre los diferentes metales.	51
Tabla XII. Composición química del sitio más contaminado por espectrometría de fluorescencia de rayos X (FRX).	57
Tabla XIII. Características de promoción de crecimiento vegetal y tolerancia a Pb de los aislados bacterianos utilizados en este estudio.	59
Tabla XIV. Efecto de los aislados en el porcentaje de germinación y longitud de la radícula de <i>H. annuus</i> y <i>A. palmeri</i> .	65
Tabla XV. Propiedades fisicoquímicas del suelo de sitio 17N.	66
Tabla XVI. Efecto en la acumulación de Pb en diferentes tejidos de <i>H. annuus</i> por la inoculación microbiana.	70
Tabla XVII. Efecto en la acumulación de Pb en diferentes tejidos de <i>A. palmeri</i> por la inoculación microbiana.	71
Tabla XVIII. Factor de bioconcentración (FBC) y factor de transferencia (FT) de los diferentes tratamientos de fitorremediación con <i>H. annuus</i> .	73
Tabla XIX. Factor de bioconcentración (FBC) y factor de transferencia (FT) de los diferentes tratamientos de fitorremediación con <i>A. palmeri</i> .	73

RESUMEN

La contaminación por metales pesados es un problema que ha ido en aumento debido principalmente a las actividades antropogénicas. La minería destaca como una de las principales causas, debido principalmente al manejo inadecuado de sus residuos denominados “jales mineros”. Éstos ocasionan problemas de contaminación en estados como Zacatecas, San Luis Potosí, Guerrero, Sonora y Guanajuato. En la laguna de “La Zacatecana” localizada en el municipio de Guadalupe, Zacatecas, se encuentran depositadas entre 10 y 20 millones de toneladas de jales mineros acumulados desde la época colonial hasta mediados del siglo XIX. Aunado a lo anterior, la laguna se deseca completamente durante una época del año y es utilizada para la agricultura de humedad, lo que podría representar un vector de contaminación para la población local. El propósito del presente trabajo fue determinar el contenido de metales del suelo y analizar el efecto de las propiedades fisicoquímicas en la disponibilidad del plomo, así como caracterizar la comunidad microbiana y desarrollar un sistema de fitorremediación de suelo contaminado con Pb, basado en el uso de plantas y microorganismos nativos. La relación de abundancia de los diferentes metales en el sistema fue la siguiente: Pb > Cr > As > Ni > Hg > Cd. La mayor cantidad de Pb se registró en el sitio 17N con 3069.85 mg/ kg, dicha concentración está por arriba de los valores permitidos por la norma mexicana (800 mg/ kg). En lo que respecta a el contenido de Cd, Cr y Ni, éste no sobrepasó lo establecido por la norma. La mayor acumulación de Pb, As y Hg se localizó en la zona norte-noroeste de la laguna, disminuyendo hacia la zona sur-sureste. El mayor porcentaje de Pb en el suelo se encontró de forma no disponible, unido principalmente a óxidos de Fe-Mn, a excepción del sitio 17N donde el 30% del Pb se encuentra de forma intercambiable o unido a carbonatos. El análisis de componentes principales indicó que el porcentaje de materia orgánica y el potencial redox son las variables fisicoquímicas que determinan la disponibilidad del Pb en el suelo de la laguna de La Zacatecana. El análisis por espectrometría de fluorescencia de rayos X indicó que el 1.81% de la composición del suelo del sitio 17N corresponde a PbO. En lo que respecta a la comunidad microbiana cultivable, se logró el aislamiento de 26 cepas pertenecientes a 9 géneros, los cuales fueron los siguientes: *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Agrobacterium*, *Ochrobactrum*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Kokuria*, *Arthrobacter* y *Microbacterium*. Del total de cepas aisladas en este

estudio, 9 mostraron producción de ácido indol acético, 8 produjeron sideróforos y 6 mostraron capacidad de solubilizar fosfatos. Todas las cepas tuvieron tolerancia a 0.5 mM de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$. El análisis *in vitro* de promoción de crecimiento vegetal de las cepas, mostró que *Pseudomonas* sp. 52, *Enterobacter* sp. BS6 y *Rhodococcus* sp. MR317 promovieron un incremento en la biomasa de *A. thaliana* creciendo en medio suplementado con $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$. Debido a lo anterior se utilizaron estas cepas junto con las especies vegetales nativas *Helianthus annuus* y *Amaranthus palmeri* para desarrollar un tratamiento de fitorremediación de Pb. *Helianthus annuus* fue la especie que acumuló la mayor cantidad de Pb en su tejido. La adición al suelo de SS-etilendiamino disuccinato (EDDS), incrementó significativamente la cantidad de Pb acumulado en los tejidos de ambas especies. La cepa que mostró el mayor efecto en la acumulación de Pb en *H. annuus* fue *Pseudomonas* sp. 52. Cabe mencionar que esta cepa también fue la que produjo la mayor cantidad de sideróforos con 49.23 μM de Unidades Equivalentes de Mesilato de Deferoxamina (**UDFOM**) y mostró la mayor capacidad de solubilizar fosfatos (278.9 mg/ L), mientras que en *A. palmeri*, la inoculación microbiana tuvo un efecto positivo en la supervivencia de la planta. Los resultados indican que la inoculación de cepas nativas junto con la adición de EDDS al suelo, puede ser una alternativa para el desarrollo de tratamientos de fitorremediación de Pb más eficientes en suelo y sedimento de la laguna “La Zacatecana”.

ABSTRACT

Heavy metal pollution is a growing problem due to anthropogenic activities. Mining activity is one of the main causes due to an inadequate waste management. In Mexico, states such as Zacatecas, San Luis Potosi, Guerrero, and Sonora have elevated levels of heavy metals in soil. One particularly affected area is "La Zacatecana" lagoon, in the municipality of Guadalupe, Zacatecas. In this site, about 20 million tons of mine tailings were deposited during colonial times until the mid-nineteenth century. Furthermore, the lagoon dries completely during a time of the year and is used for agriculture, which may represent an additional exposure pathway of heavy metals to humans. This study focused on: 1) the determination of the heavy metal content and the influence of the physicochemical properties of soil on lead (Pb) availability, and 2) the development of a phytoremediation system of soil contaminated with Pb, based on the use of native plants and soil microorganisms. The concentration ratio of the different metals analyzed was as follows: Pb > Cr > As > Ni > Hg > Cd. The 17N site accumulated the highest amount of Pb (3069.85 mg/ kg), exceeding the values allowed by the Mexican standard (800 mg/ kg), whereas the content of Cd, Cr, and Ni, did not exceed the limits established by the norm. The north-northwest zone of the lagoon showed the highest amount of Pb, As and Hg, decreasing towards the southeast area. Lead in La Zacatecana soil is mostly present in an unavailable form, associated with Fe-Mn oxides. Except for the 17N site where 30% of the Pb is in an interchangeable form or bound to carbonates. Principal component analysis (PCA) indicated that organic matter and redox potential were the physicochemical variables that determined the availability of Pb in the soil of La Zacatecana. X-Ray fluorescence spectrometry analysis (XFR) indicated that 1.81% of the 17N soil composition correspond to PbO. With regards of cultured microbial community, 26 strains belonging to 9 different genera were isolated: *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Agrobacterium*, *Ochrobactrum*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Kokuria*, *Arthrobacter*, and *Microbacterium*. Of the total strains isolated in this study, nine showed indole acetic acid production, eight produced siderophores and six showed phosphate solubilization capacity. All strains showed tolerance to 0.5 mM Pb(NO₃)₂. *In vitro* analysis of plant growth promotion features, showed that *Pseudomonas* sp. 52, *Enterobacter* sp. BS6 and *Rhodococcus* sp. MR317 caused an increase in the biomass of *A. thaliana* growing in medium supplemented

with $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$. We selected these strains, to use as inoculants in a phytoremediation treatment, using *Helianthus annuus* and *Amaranthus palmeri* as experimental models. *H. annuus* accumulated the largest amount of Pb in its tissues. Furthermore, the addition of the SS-ethylenediamine disuccinate (EDDS), increased the amount of Pb accumulated in the tissues of both plants. *Pseudomonas* sp. 52 showed the greatest effect on Pb accumulation in *H. annuus*. This strain also produced the highest amount of siderophores with 49.23 μM Deferoxamine Mesylate equivalents (DFOM eq) and showed the greatest capacity to solubilize phosphates (278.9 mg/L), whereas, the microbial inoculation had a positive effect on the survival of *A. palmeri*. The results indicate that the inoculation of native strains together with the addition of EDDS to the soil may be an alternative for the development of more efficient Pb phytoremediation treatments for soil and sediment of La Zacatecana lagoon.

I. INTRODUCCIÓN

La contaminación por metales pesados en México es un problema que ha ido en aumento debido principalmente a las actividades antropogénicas. La minería destaca como una de las principales causas, debido principalmente al manejo inadecuado de sus residuos denominados “jales mineros”. Ocasionando problemas de contaminación en estados como Zacatecas, San Luis Potosí, Guerrero y Sonora.

En la laguna de “La Zacatecana” localizada en el municipio de Guadalupe, Zacatecas, se encuentran depositadas entre 10 y 20 millones de toneladas de jales mineros acumulados desde la época colonial hasta mediados del siglo XIX. Aunado a lo anterior, la laguna se deseca completamente durante una época del año y es utilizada para la agricultura de humedad, lo que podría representar un vector de contaminación para la población local.

Para lidiar con la contaminación de suelos por metales pesados se han desarrollado una serie de tratamientos de remediación, los cuales consisten en métodos fisicoquímicos y biológicos, siendo los primeros los más utilizados. Sin embargo, estos resultan ser costosos y agresivos con el medio ambiente. En contraparte, los métodos biológicos representan una alternativa a los métodos tradicionales al tener un menor costo y repercusión en el ambiente.

La fitorremediación destaca como uno de los métodos biológicos de remediación de metales pesados con más avances científicos. Durante la fitorremediación se busca que el contaminante sea absorbido por la raíz de las plantas y se transporte hasta los brotes aéreos, para que el residuo pueda ser cosechado y confinado posteriormente. Una manera de mejorar este proceso es mediante la inoculación de microorganismos con capacidades de promoción de crecimiento vegetal y resistentes a metales pesados.

El propósito del presente trabajo fue: **1)** Realiza una caracterización fisicoquímica y del contenido de metales del suelo y sedimento de la laguna de la Zacatecana, así como caracterizar la comunidad microbiana, y **2)** desarrollar un sistema de fitorremediación de suelo contaminado con Pb, basado en el uso de plantas y microorganismos nativos. Lo anterior se realizó asumiendo que el uso de plantas y microorganismos adaptados a las condiciones ambientales locales puede ser una alternativa para reducir la contaminación de suelos afectados por la actividad minera en Zacatecas.

II. ANTECEDENTES

2.1 Impacto Ambiental de la actividad minera en México

En México, la minería constituye una de las actividades con mayor tradición, practicada desde la época prehispánica y reconocida en la historia como un factor de avance y desarrollo económico para el país. Sin embargo, esta actividad tiene un impacto considerable sobre el ambiente ya que genera grandes cantidades de desechos que pueden convertirse en fuentes de metales pesados tóxicos (Romero, Armienta, y González-Hernández 2007).

El ejemplo más común es la contaminación de suelos que ocurre durante el beneficio del oro y la plata, realizado comúnmente por amalgamación con mercurio y cianuración. En ninguno de los dos casos es posible la recuperación total de los compuestos o elementos adicionados, por lo que es común encontrarlos en los residuos del proceso (jales mineros) en forma soluble (Volke-Sepulveda et al., 2005). Debido a lo anterior los jales contienen una gran cantidad de metales residuales que derivan de un proceso de extracción que no es 100 % eficiente.

Los principales metales contaminantes en México, considerando su toxicidad y abundancia son: mercurio (Hg), arsénico (As) y plomo (Pb) (Fernández-Bremauntz et al., 2004, Volke-Sepulveda et al., 2005, Martín-Romero y Gutiérrez-Ruíz ,2010). En la Tabla I se muestran los límites máximos permitidos de estos y otros metales para suelos en México, establecidos en la norma NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004 (SEMARNAT 2007)

En México existe registro de diferentes sitios afectados por esta problemática, ocasionada por la gran cantidad de minas distribuidas en el país (Figura 1). Entre los estados más afectados se encuentran Zacatecas, San Luis Potosí, Guerrero y Sonora. (Cortés-Jiménez et al. 2013; Meza-Figueroa et al. 2009; Mireles et al. 2012; Yáñez et al. 2003). En la Tabla II se muestran algunos casos reportados en la literatura donde existe una problemática por contaminación con metales pesados.

Tabla I. Límites máximos permisibles de metales pesados en suelos y sedimento (NOM-147-SEMARNAT-SSA1-2004).

Metal	Uso agrícola/residencial (mg/ kg)	Uso Industrial (mg/ kg)
Arsénico	22	260
Berilio	150	1900
Cadmio	37	450
Cromo VI	280	510
Mercurio	23	310
Níquel	1600	20000
Plomo	400	750
Selenio	390	5100
Talio	5.2	67
Vanadio	550	7200

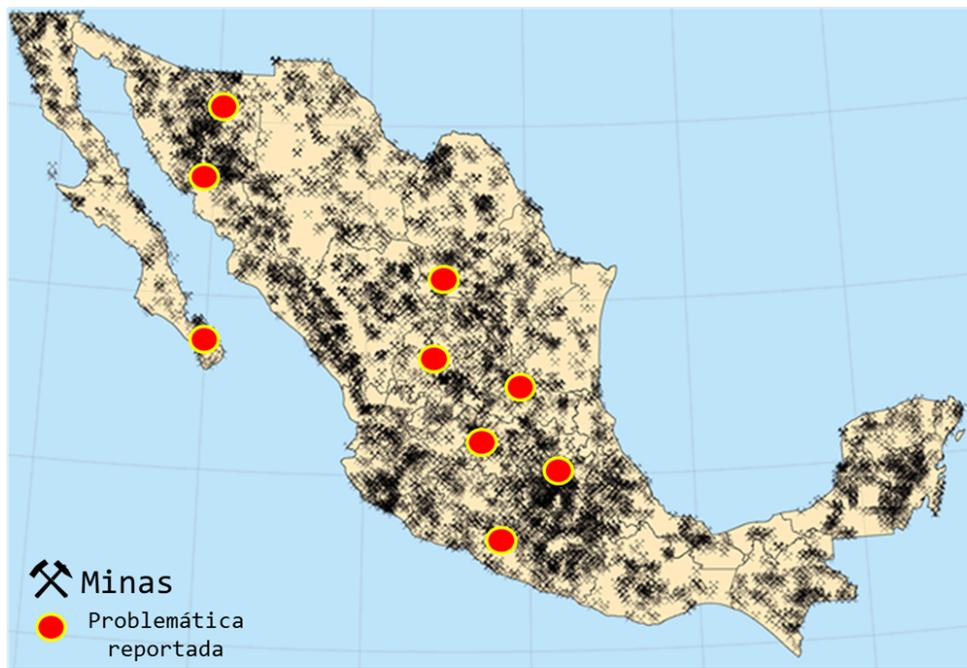


Figura 1. Distribución de minas en el territorio nacional. Los puntos rojos indican donde ha sido reportado una afectación por la presencia de metales pesados en el ambiente.

(Fuente: *modificado del Servicio Geológico Mexicano, 2013*).

Tabla II. Lugares de la República Mexicana más afectados por la contaminación de Hg, As y Pb. En la tabla se indican las concentraciones de los metales, la afectación y la referencia correspondiente.

Lugar	Estado	Metal	Afectación	Referencia
San Felipe, Nuevo Mercurio	Zac	Hg	En suelos (1569 mg/kg) y orina de niños (29.6 µg/gcrt)	Costilla-Salazar et al. 2011
San Joaquín, Sierra Gorda	Qro		En suelo (300 mg/kg) y cultivos de maíz	Martínez-Trinidad et al. 2013; Hernández-Silva et al. 2012
Río Coatzacoalcos	Ver		En agua del río (6.96 mg/L)	Villanueva y Botello 1992
Sistema Lagunar Alvarado	Ver		Acumulación moderada en personas por ingesta de mariscos	Guentzel et al. 2007
Zimapán	Hgo.		En acuífero (1.09 mg/L), suelos (14 700 mg/kg), en cabello de personas (8.55 mg/kg)	Ongley et al. 2007; Espinosa et al. 2009; Armienta, Rodríguez, y Cruz 1997; Armienta et al. 2001
Santa María	SLP		As	En suelos (300 mg/kg)
Villa de la Paz	SLP	En suelos (7200 mg/kg), agua (5.9 mg/L)		Razo et al. 2004; Yáñez et al. 2003
Milpillas, Minatitlán	SLP, Ver	En sangre de niños (SLP: 5.6 µg/dL, Ver: 5.5 µg/dL)		Trejo-Acevedo et al. 2009
Varias comunidades	Chih, SLP, Tlax	Pb	En suelos (400 mg/kg), en sangre de niños (Tlax: 52.3 µg/dL)	Flores-Ramírez et al. 2012
Vetagrande	Zac		En sangre de niños (>10 µg/dL)	Bedolla, Lorena, y Ordaz 2008

2.2 Metales pesados y su efecto en los seres vivos

Los metales pesados son un conjunto de elementos que presentan propiedades metálicas, en el que se incluyen metales de transición, algunos semimetales, lantánidos y actínidos. El criterio más general para su clasificación se basa en la densidad específica, de acuerdo con la cual se incluyen en este grupo elementos con una densidad mayor a 5 g/cm^3 . Sin embargo, algunos autores consideran esta definición como inapropiada, pues la densidad específica no es una referencia en cuanto a la reactividad o toxicidad de un metal (Duffus 2002, Volke-Sepulveda et al. 2005).

Actualmente, el término “metal pesado” es utilizado para referirse de una manera amplia a aquellos metales o metaloides con potencial de causar problemas de toxicidad (Alloway 2013). Los principales mecanismos de toxicidad de estos elementos a nivel molecular son:

- Bloqueo de grupos funcionales esenciales en biomoléculas, debido a la alta afinidad de los cationes metálicos por los grupos sulfhidrilos de las proteínas, específicamente a los residuos de cisteína, lo que ocasiona su desnaturalización (Schützendübel y Polle 2002; Peralta-Videa et al. 2009)
- El desplazamiento de centros catiónicos en enzimas importantes, como es el caso de la ribulosa 1-5 bisfosfato carboxilasa-oxigenasa (rubisco), la cual tiene un centro catiónico de Mg^{2+} que puede ser desplazado en presencia de cationes divalentes como Co^{2+} , Ni^{2+} y Zn^{2+} . Dicho desplazamiento provoca que la enzima pierda su capacidad de fijar CO_2 (Schützendübel y Polle 2002; Smeets et al. 2005)
- Por la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) debido a la autooxidación de metales como Fe^{2+} o Cu^+ , lo que resulta en la formación de H_2O_2 y del radical $\cdot\text{OH}$ vía la reacción de Fenton (Schützendübel y Polle 2002). El radical $\cdot\text{OH}$ es uno de las ERO más reactivas que se conocen, por su capacidad de iniciar reacciones en cadena de radicales libres, que ocasionan modificaciones y daño irreversible a compuestos celulares como carbohidratos, ácido desoxirribonucleico (ADN), proteínas y particularmente lípidos (Mithöfer, Schulze, y Boland 2004).

2.3 Dinámica de los metales en suelo y sedimento

Los metales pesados en el suelo pueden acumularse principalmente por: 1) meteorización natural del material parental y 2) actividad humana directa, como el vertimiento de jales mineros (Boussen et al. 2013), la deposición atmosférica proveniente de emisiones vehiculares (Blake y Goulding 2002) e industriales (Nicholson et al. 2003), la aplicación en cultivos agrícolas como fertilizantes, fungicidas y herbicidas con alto contenido de As, Pb y Cu (Alloway, 2013; Kabata-Pendias y Mukherjee, 2007).

En suelo, una alta concentración de metales pesados no necesariamente significa un problema de toxicidad para los seres vivos, ya que estos pueden encontrarse en diferentes formas y niveles de solubilidad, como: **a)** metales en disolución, **b)** formas intercambiables, **c)** componentes estructurales de las capas de arcillas en el suelo y **d)** formas insolubles o precipitados con otros componentes del suelo. (Alloway, 2013; Tabak et al. 2005).

Solamente las formas químicas de los metales que se encuentran disponibles o solubles resultan tóxicas para los seres vivos (es decir metales en disolución o intercambiables). Por lo tanto, a estas formas también se les llama *biodisponibles*. (Lu, Zhang, y Shan 2005).

La biodisponibilidad de los metales pesados en el suelo está controlada por mecanismos de absorción y desorción (Krishnamurti et al., 1999). Éstos, a su vez, están íntimamente asociados con algunas propiedades del suelo como la textura, pH, conductividad eléctrica (C.E), capacidad de intercambio catiónico (CIC), contenido de materia orgánica y potencial de óxido reducción (Zeng et al. 2011)

2.3.1 Textura del suelo

El término textura se utiliza para representar la constitución granulométrica del suelo y está determinada por la composición mineralógica derivado de su material parental (Alloway, 2013). La clasificación depende de las proporciones de arena, limo y arcilla que contenga el suelo. Las arcillas particularmente tienen una gran capacidad de retener metales en comparación con las arenas, debido a que presentan alta densidad de cargas negativas, gran capacidad de intercambio catiónico y tienen estructuras porosas muy complejas (Violante et

al. 2010; Uddin, 2017) las cuales permiten interacciones físicas y químicas fuertes con los metales.

2.3.2 pH

El pH es el parámetro más importante para definir la movilidad de los diferentes componentes minerales en el suelo. En general, los suelos con pH alcalinos presentan una mayor capacidad de adsorción de cationes metálicos (Mclean y Bledsoe 1992), y a medida que el pH desciende ($\text{pH} < 5$), se pueden encontrar una mayor cantidad de metales en solución, lo cual se debe al incremento en la concentración de protones y la competencia de estos y con los ligandos. Cabe mencionar que no todos los metales presentan una mayor solubilidad a pH ácidos; algunos, como el As, Mo, Cr y Se presentan mayor solubilidad en pH alcalinos, mientras que en el caso del Pb, Cd, Zn y Cu ocurre en pH ácidos (Chuan, Shu, y Liu 1996).

2.3.3 Materia orgánica (MO)

Junto con el pH, la materia orgánica presente en el suelo es uno de los principales factores que determinan la biodisponibilidad de los metales pesados. La materia orgánica contribuye en gran medida a que los suelos retengan una gran cantidad de metales en forma intercambiable (Zeng et al. 2011). El tipo y la cantidad de materia orgánica presente en el suelo afecta la solubilidad de los metales debido a procesos de acomplejamiento y quelación (Sherene 2010). Generalmente, enmiendas con alto contenido de materia orgánica disminuyen la disponibilidad de metales pesados mediante la formación de complejos con las sustancias húmicas insolubles presentes en ella (Clemente, Escolar, y Bernal 2006). Sin embargo, los metales también pueden llegar a formar complejos con moléculas orgánicas solubles, incrementando como resultado la disponibilidad de metales pesados para las plantas (Peng et al. 2009).

2.3.4 Potencial de óxido reducción (redox)

El potencial redox (Eh) de un ambiente dado determina en gran medida la especiación de los metales. El potencial redox es establecido por las reacciones de óxido-reducción que ocurren

en el suelo, las cuales tienden a ser limitadas. Sin embargo, la actividad microbiana puede incrementar la velocidad de estas reacciones (Olaniran, Balgobind, y Pillay 2013). La tasa a la cual decrece el Eh del suelo es también determinada por la disponibilidad de fuentes de carbono, la cantidad de oxígeno y la disponibilidad de aceptores de electrones alternativos (Young, 2013).

Condiciones reductoras (i. e., Eh negativos) resultan en la precipitación de los metales con la materia orgánica del suelo y ocurren generalmente cuando el suelo se encuentra anegado. Por el contrario, bajo condiciones oxidativas (i. e., Eh positivos), los metales se encontrarán de preferencia en formas iónicas libres, lo cual incrementa su solubilidad en agua. (Chuan, Shu, y Liu 1996; Olaniran, Balgobind, y Pillay 2013). Sin embargo, algunos metales como el Hg son más estables bajo condiciones oxidantes, ya que a Eh negativos el Hg orgánico e inorgánico tienden a ser reducidos a Hg elemental, el cual es más susceptible a unirse a un grupo alquilo por procesos bióticos o abióticos, tornándolo mucho más tóxico por su alta solubilidad en agua. (Wuana y Okieimen 2011).

2.3.5 Capacidad de intercambio catiónico

La capacidad de intercambio catiónico es una medida de la capacidad total del suelo de retener cationes intercambiables. Indica, además, la carga total negativa presente en una unidad de suelo y es también una forma de acomplejamiento externo entre los metales y las partículas cargadas del suelo que ocurre a través de enlaces covalentes débiles. (Bradl 2004; Mitchell et al. 2016).

La capacidad del suelo para retener o liberar macro elementos y metales traza se encuentra en mayor medida determinada por la capacidad de intercambio catiónico. (Vega, Covelo, y Andrade 2009). Un incremento en la capacidad de intercambio catiónico significa que más cationes metálicos son atraídos a los sitios con carga negativa de las partículas sólidas, reduciendo por lo tanto la disponibilidad de metales en la solución del suelo (Mitchell 2016).

2.3.6. Salinidad

La salinidad se encuentra relacionada directamente con la movilización de metales en el suelo. La movilización de Pb, Cd, Cu y Zn se encuentra regulada principalmente por la capacidad de los metales de formar complejos con los aniones derivados de las sales, y por la competencia entre los cationes derivados de las sales y los metales por los sitios de adsorción en la fase sólida del suelo (Acosta et al. 2011).

2.4 Interacciones entre microorganismos y metales pesados

En el caso de sitios contaminados por metales pesados, los microorganismos pueden modificar la disponibilidad de estos elementos en el ambiente, mediante la modificación en las características físicas o químicas de los metales (**Figura 2**). A continuación, se presentan algunas de las más importantes.

2.4.1 Biosorción

Los metales pesados pueden ser absorbidos pasivamente a los componentes celulares de los microorganismos debido a atracciones electrostáticas. Al tener los metales carga positiva, son atraídos por las cargas negativas de los grupos carboxilo, fosforilo y amino presentes en las paredes celulares, membranas y material extracelular de bacterias y hongos (Gadd 2004; Kirchman 2012). Una vez adheridos a la superficie celular, algunos metales pesados se internalizan en la célula, donde los cationes metálicos pueden ser ligados o precipitados dentro de vacuolas u otras estructuras para minimizar su toxicidad.

Los hongos filamentosos pueden adsorber metales pesados en soluciones acuosas. Su capacidad de biosorción depende del pH, la concentración de biomasa y los metales presentes en la solución (Narsi R. Bishnoi y Garima 2005). Algunos géneros fúngicos utilizados con éxito para remover cadmio (Cd), Pb y cobre (Cu) son *Rhizopus*, *Penicilium* y *Phanerochaete* (Say, Denizli, y Yakup Arica 2001).

2.4.2 Reducción biológica

Ciertos metales pesados pueden ser inmovilizados eficientemente debido a la acción de bacterias con la capacidad de reducir su estado redox, disminuyendo a su vez la biodisponibilidad de estos elementos (Valls y De Lorenzo 2002). Este fenómeno se conoce como reducción biológica, y es reconocido como un proceso metabólico importante que controla el transporte y el destino de los metales pesados en el suelo (Tabak et al. 2005; Volke-Sepúlveda et al. 2005).

La reducción biológica ocasiona que formas oxidadas de metales multivalentes pasen rápidamente a formas reducidas que se precipitan fácilmente en una solución acuosa. En este sentido, un grupo bacteriano muy importante es el de las bacterias sulfato reductoras (o BSR), ya que son usadas de manera común para el tratamiento de suelos y aguas contaminados con metales pesados (White, et al, 1998).

Bajo condiciones anaeróbicas, las BSR pueden oxidar compuestos orgánicos simples al utilizar sulfato como aceptor de electrones produciendo sulfuro (S^{2-}) e incrementando el pH en el proceso. Este sulfuro puede reaccionar con los metales disueltos y formar precipitados metal-sulfuro, los cuales, por lo general, tienen una toxicidad muy baja (Jong y Parry 2003).

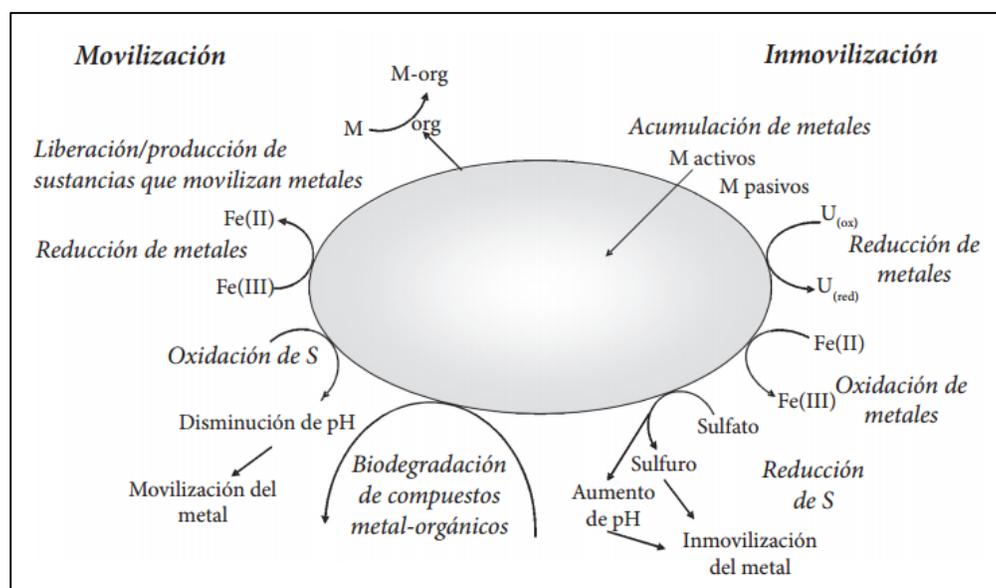


Figura 2. Interacciones entre metales y microorganismos. (Tomada de Volke-Sepúlveda 2005; Original de Ledin 2000)

2.4.3 Biolixiviación (heterotrófica y autotrófica)

El proceso de biolixiviación heterotrófica consiste en la acidificación del medio por la movilización de protones a través de la membrana plasmática, ocasionando una liberación de metales a través de varias rutas. Por ejemplo, debido a la competencia entre protones y metales en un complejo metal-anión o cuando se encuentran en una forma asimilada con algún otro elemento, lo cual genera una liberación de cationes metálicos. También el metabolismo heterotrófico puede ocasionar lixiviación debido a la producción de ácidos orgánicos y sideróforos (Gadd 2004).

Generalmente, la biolixiviación autotrófica es llevada a cabo por bacterias quimiolitotróficas y acidófilas, las cuales fijan bióxido de carbono y obtienen energía de la oxidación de compuestos férricos y sulfuro reducidos, ocasionando la producción de fierro (Fe III) y ácido sulfúrico (H₂SO₄) (Rawlings y Silver, 1995; Schippers y Sand 1999). Los microorganismos involucrados en este proceso incluyen a las bacterias que oxidan azufre (S) y fierro como *Thiobacillus thiooxidans*, *Thiobacillus ferrooxidans* y *Leptospirillum ferrooxidans* (Donati y Sand 2007), como resultado de la oxidación de compuestos férricos y del azufre, el pH decrece resultando en una solubilización de otros compuestos metálicos.

2.4.4 Biovolatilización

Algunas bacterias y hongos pueden llevar a cabo la metilación de metales pesados y metaloides como el Hg, As y Se. Los compuestos metilados difieren en su solubilidad, toxicidad y volatilidad (Tabak et al. 2005). Los metales metilados pueden ser reducidos a otras formas por medio de reacciones enzimáticas bacterianas, como es el caso del metil mercurio, el cual puede ser reducido a una forma menos tóxica y más volátil como el Hg⁰; mediante la acción de la enzima mercurio reductasa (Valls y De Lorenzo 2002), reportada en algunas especies bacterianas como *Pseudomonas putida*, *Escherichia coli* y *Deinococcus radiodurans* (Brim et al. 2000; Cursino et al. 2000; Okino et al. 2000) y en géneros como *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Shewanella*, *Staphylococcus* y *Stenotrophomonas*. Mientras que algunos géneros fúngicos como *Alternaria*, *Scopulariopsis*, *Fusarium*, *Acremonion*, *Penicillium* y *Ulocladium* tienen la capacidad de volatilizar metales, lo cual

ocurre a través de una primera reducción de las especies químicas de Se a Se^{2-} , seguido de una metilación (Frankenberger y Karlson 1995).

2.4.5 Estudios de las comunidades microbianas en suelos contaminados por metales pesados

Las comunidades microbianas son el grupo de organismos más diverso y abundante en el planeta. Desempeñan un papel fundamental en la reutilización de nutrientes a través de los diferentes ciclos biogeoquímicos. Por consiguiente, existe un especial interés en estudiar la respuesta de las comunidades microbianas a los diferentes factores de estrés de origen antropogénicos como lo es la acumulación de metales pesados en el suelo (Singh et al. 2014).

La acumulación de metales pesados en el suelo puede ocasionar reducción en la biomasa y en la actividad de los microorganismos, afectando la diversidad y la estructura de las comunidades microbianas. (Chodak et al. 2013). Estudios de las comunidades microbianas en suelos contaminados por metales pesados han mostrado que existe una reducción y un cambio en la diversidad debido a la presencia de los metales. (Kaplan et al. 2014; Singh et al. 2014; Yin et al. 2015). Lo anterior trae como consecuencia un desbalance en las funciones clave del ecosistema como lo es, por ejemplo, la pérdida de la capacidad de fijar nitrógeno por las comunidades microbianas (Singh et al. 2014).

2.5 Remediación de suelos contaminados con metales pesados

A diferencia de los contaminantes orgánicos, los metales no pueden descomponerse por vía biológica, física o química, de manera que la remediación de suelos contaminados con metales pesados se limita al confinamiento de estos residuos o a la alteración de su solubilidad, movilidad y/o toxicidad (Volke-Sepúlveda et al. 2005) a través de cambios en su estado de valencia, lo que favorece su inmovilización (quelación) y/ o movilización (disolución) (Bosecker 1999; Stephen y Macnaughton 1999).

Dependiendo de su naturaleza, los métodos de remediación de suelos contaminados con metales pesados se clasifican en: **1) fisicoquímicos**, aquéllos que utilizan las propiedades físicas y químicas de los contaminantes o del medio contaminado para transformar, separar

o inmovilizar el contaminante (Dermont et al. 2008; Volke-Sepúlveda et al. 2005), y 2) *biológicos*, también denominados *biorremediadores*, que son aquéllos que aprovechan el potencial metabólico de organismos vivos (bacterias, hongos y/ o plantas) para limpiar ambientes contaminados (Gadd 2010; Watanabe 2001).

2.5.1 Fitorremediación

En general, las plantas adquieren los nutrientes y elementos esenciales del suelo en respuesta a un gradiente de concentración inducido por la absorción selectiva de iones a través de la raíz, o por la difusión de los elementos en el suelo (Violante et al. 2010). De la misma manera pueden acumular los metales pesados en su tejido. Sin embargo, el nivel de acumulación de los metales variará dependiendo de la especie de la planta y el metal específico al que es expuesta.

De acuerdo a su comportamiento al ser expuestas a metales pesados, Baker (1981) sugiere que las plantas pueden clasificarse en tres categorías:

- a) Excluyentes: son aquellas plantas donde la acumulación de metales en la parte aérea está restringida, hasta que la concentración de metales del suelo sobrepasa un nivel crítico, después del cual ocurre un transporte raíz-tallo, sin restricciones.
- b) Acumuladoras: aquellas plantas donde la acumulación de metales ocurre en el tejido aéreo.
- c) Indicadoras: se refiere a aquellas donde la toma y el transporte de metales al tallo está en equilibrio. Por lo tanto, la concentración interna de la planta refleja las concentraciones del suelo.

Con base en la clasificación anterior y dependiendo del proceso de remediación que se desee utilizar, la fitorremediación de suelos contaminados por metales pesados presenta dos vertientes: la fitoestabilización y la fitoextracción.

En la fitoestabilización se buscan especies del tipo excluyente, que acumulen gran cantidad de metales en la raíz, evitando que estos puedan transferirse a la parte aérea y así estar disponibles para otros seres vivos. En cambio, en la fitoextracción se buscan especies del tipo acumuladoras, donde el contaminante sea transportado desde la raíz hasta los brotes aéreos,

para que después puedan ser cosechados y confinados. La fitoextracción es hasta la fecha uno de los campos con mayores avances científicos y tecnológicos (Volke-Sepulveda et al. 2005).

Para determinar si una especie vegetal podría ser utilizada en un tratamiento de fitorremediación, se tienen que tomar en cuenta los siguientes parámetros: el factor de bioconcentración (**FBC**) y el factor de translocación (**FT**) (Olguín y Sánchez-Galván 2012; Ali, Khan y Anwar 2013).

El **FBC** determina la eficiencia de la planta para acumular el metal proveniente del suelo en su tejido y se calcula de la siguiente manera:

$$\text{FBC} = \frac{\textit{Concentración de metal en tejido}}{\textit{Concentración de metal en el suelo}} \quad (1)$$

Mientras que el **FT** indica la eficiencia para transportar el metal de la raíz a su parte aérea; se calcula de la siguiente manera:

$$\text{FT} = \frac{\textit{Concentración de metal en la parte aérea}}{\textit{Concentración de metal en la raíz}} \quad (2)$$

Una planta puede considerarse acumuladora si su $\text{FT} \geq 1$, mientras aquellas que tienen la capacidad de acumular desde 5 hasta 500 veces más que el promedio se les denomina “hiperacumuladoras” (Pilon-Smits 2005; Rascio y Navari-Izzo 2011). A nivel mundial se conocen cerca de 400 especies de plantas hiperacumuladoras de metales, destacando la familia Brassicaceae, por contar con varias especies que pueden acumular más de un tipo de metal (Prasad y De Oliveira Freitas 2003; Gratão et al. 2005).

2.5.2 Fitorremediación asistida por quelantes químicos

A pesar de que la fitorremediación representa una alternativa a los métodos tradicionales de remediación de metales pesados, uno de los impedimentos es la poca disponibilidad de los metales en el suelo. En este sentido una estrategia para aumentar su disponibilidad es mediante la utilización de quelantes que formen complejos con los metales.

En este contexto, el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) es hasta la fecha el quelante más utilizado en los tratamientos de fitorremediación, debido a su alta eficiencia para movilizar los metales pesados del suelo (Pedron et al. 2014). Sin embargo, el EDTA puede representar un problema de toxicidad debido a que es poco biodegradable y presenta una alta persistencia en el suelo (Epelde et al. 2008). Además, se ha reportado que la cantidad de metales movilizados es generalmente mucho mayor que la cantidad que pueden tomar las plantas (Kos y Leštan 2003).

Una alternativa al uso del EDTA es el SS-etilendiamino disuccinato o EDDS el cual se degrada más fácilmente que el EDTA, y al igual que el EDTA, forma complejos fuertes con los metales del suelo. Además, su tasa de solubilidad es menor, por lo cual resulta ser menos tóxico para las plantas y los microorganismos del suelo (Epelde et al. 2008).

2.5.2 El papel de los microorganismos en los tratamientos de fitorremediación

Algunas desventajas de la mayoría de las especies vegetales acumuladoras de metales, es que son de lento crecimiento y producen poca biomasa (de-Bashan, Hernandez, y Bashan 2012). Por ello, se han buscado estrategias para incrementar su rendimiento en la fitoextracción de metales. Una manera de mejorar el proceso es mediante la inoculación con microorganismos del suelo (Glick 2003; Lebeau, Braud, y Jézéquel 2008; Rajkumar et al. 2010).

El uso de hongos y bacterias ha sido señalado como una alternativa para mejorar los tratamientos de fitorremediación de metales pesados. Mediante algunos procesos (metilación, sorción, lixiviación y precipitación) y la producción de ciertos metabolitos (sideróforos, metalotioneínas, fitoquelatinas y exopolisacáridos), se puede incrementar o mejorar la tasa de extracción de metales (Ma et al. 2011; Rajkumar et al. 2012). A

continuación, se describen las características más importantes de los microorganismos utilizados en procesos de fitorremediación.

2.5.3 Producción de ácido indolacético

El ácido indolacético (AIA) es una de las fitohormonas más estudiadas. Es producida por diferentes géneros de rizobacterias y se ha demostrado que desempeña un papel importante en el crecimiento de plantas en sitios contaminados con metales pesados, ya que promueve directamente la elongación radical y división celular, además, de alterar la expresión de algunos genes (Ma et al. 2011; de-Bashan, Hernandez, y Bashan 2012; Rajkumar et al. 2012).

Algunos géneros bacterianos productores de AIA como *Burkholderia* sp., *Pseudomonas fluorescens* y *Microbacterium* sp., al ser inoculados en mostaza india, tomate y maíz ocasionaron un incremento en la altura de la planta y en la concentración de Pb y Cd acumulada en raíz y tallo (Jiang et al. 2008; Sheng et al. 2008).

2.5.4 Producción de ACC desaminasa (1-Amino-ciclopropano-1-carboxilato desaminasa)

El etileno es una fitohormona que se encarga de modular el crecimiento y el metabolismo celular de las plantas. Puede producirse en respuesta a la exposición a diferentes tipos de estrés (bióticos y abióticos) ocasionando generalmente una reducción en el crecimiento de la planta (Burd, Dixon, y Glick 2000). Es sabido que la exposición a altas concentraciones de metales pesados puede inducir la sobreproducción de esta enzima, lo que afecta el crecimiento radicular y por consiguiente el desarrollo de la planta.

En este sentido algunas rizobacterias son capaces de reducir el efecto negativo causado por el etileno, mediante la producción de la enzima 1-amino-ciclopropano-1-carboxilato desaminasa (Glick 2003). Dicha enzima se encarga de hidrolizar la molécula precursora del etileno en α cetobutirato y amonio. El 1-amino-ciclopropano-1-carboxilato (ACC) es exudado por las raíces de las plantas y metabolizado en la rizósfera por la actividad de la ACC desaminasa bacteriana. Las bacterias con esta capacidad son utilizadas en los

tratamientos de fitorremediación como inoculantes microbianos (Grichko, Filby, y Glick 2000; Arshad, Saleem, y Hussain 2007).

2.5.5 Fijación biológica de nitrógeno

Es frecuente que los suelos contaminados con metales pesados presenten un bajo estatus nutrimental (Navarro-Noya et al. 2012). En este sentido, una opción para incrementar el contenido de nitrógeno disponible en el suelo es a través de la fijación biológica de nitrógeno (FBN) atmosférico. Dicha actividad puede ser llevada a cabo por bacterias en simbiosis estricta con leguminosas o de vida libre.

Entre los géneros de bacterias simbióticas fijadoras de N_2 se encuentran: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Mesorhizobium*. Mientras que entre los géneros de vida libre destacan *Azospirillum*, *Herbaspirillum* y *Frankia* (Gamalero et al. 2009).

Aunque se sabe que altas concentraciones de metales pesados como Al, Cr y Cd pueden inhibir la FBN (Bishnoi, Chugh, y Sawhney 1993; Balestrasse et al. 2003), también se ha reportado la formación de nódulos funcionales por poblaciones rizobiales adaptadas a altas concentraciones de metales pesados (Purchase et al. 1997; Carrasco et al. 2005).

Arora et al. (2010) reportan un efecto inhibitorio en la actividad de la nitrogenasa de cepas de *Sinorhizobium* y *Bradyrhizobium* debido a altas concentraciones de Al en condiciones *in vitro*. Sin embargo, en el caso de Fe y Mo reportan un aumento en la actividad de esta enzima, el cual puede deberse a que la nitrogenasa posee un átomo de Mo en su centro activo, además de centros de Fe y S, necesarios para la reducción del nitrógeno atmosférico.

2.5.6 Producción de sideróforos

Los sideróforos son compuestos de baja masa molecular (500-1000 Da) que actúan como acarreadores de Fe^{+3} a través de las membranas de diferentes microorganismos. Los sideróforos se pueden agrupar de acuerdo con sus sitios de unión con el Fe^{+3} en tres tipos: hidroxamatos, catecolatos y alfa-hidroxicarboxilatos (Kirchman 2012).

Los sideróforos además de su capacidad de unirse al Fe, también pueden formar complejos con otros metales como Al, Cd, Cu, Pb y Zn, lo que ocasiona un incremento en la solubilidad de estos metales en el suelo (Rajkumar et al. 2010). Adicionalmente, la presencia de dichos metales estimula la producción de sideróforos por parte de las rizobacterias (Ma et al. 2011), siempre y cuando las concentraciones de metales en el medio no sobrepasen el límite de tolerancia de las bacterias (Kraemer et al. 2002; Naik y Dubey 2011).

2.5.7 Solubilización de fosfatos

Algunas bacterias rizosféricas tienen la capacidad de solubilizar fosfatos debido a la producción de ácidos orgánicos de bajo peso molecular (Gupta, Meyer, y Goel 2002), entre los cuales están los ácidos fórmico, acético, succínico, tartárico y oxálico (Li, Ye, y Wong 2010). Se ha demostrado que los ácidos orgánicos secretados por las bacterias rizosféricas también tienen efecto en la movilización de metales como el Pb, Ni, Cu, Cd y Zn (Fasim et al. 2002; Arwidsson et al. 2010; Li, Ye, y Wong 2010). Esto se asume debido a que la secreción de los ácidos orgánicos al suelo ocasiona una disminución del pH (Sheng y Xia 2006), que a su vez libera los cationes metálicos al medio.

2.6.8 Estudios de fitorremediación asistida por microorganismo en México

En México, las investigaciones se han enfocado al proceso de fitoextracción partiendo de la utilización de plantas nativas acumuladoras de metales y del conocimiento de la diversidad microbiana de cada zona particular, buscando aislados que promuevan el crecimiento vegetal y ayuden al proceso de fitorremediación al ser inoculados en las plantas.

El estudio de los humedales como tecnología para el tratamiento de metales pesados cuenta con avances científicos significativos. Al respecto, Mauricio-Gutiérrez, Peña-Cabriales, y Maldonado-Vega (2010), estudiaron las comunidades microbianas asociadas a la rizósfera de *Scirpus americanus* donde identificaron géneros bacterianos como *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Microbacterium*, *Curtobacterium*, *Rhodococcus*, *Xanthomonas* y *Pseudomonas* con la capacidad de reducir Cr (IV) a Cr (III).

Asimismo, otra especie vegetal que ha resultado eficiente en la eliminación de Cr de efluentes contaminados es *Typha* sp., que al ser utilizada en combinación con *S. americanus* logró reducir hasta 99 % de Cr en efluentes de una curtiduría, además de disminuir 99 % de la concentración de sulfuros y 92 % de sulfatos en el agua (Pacheco-Aguilar, Peña-Cabriales, y Maldonado-Vega 2008). Dicha reducción en compuestos de S se atribuye a la comunidad de bacterias sulfuro-oxidantes presentes en el estanque, donde algunos géneros como *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Ochrobactrum* y *Pseudomonas* presentaron la capacidad de oxidar compuestos de azufre.

Debido a que los suelos contaminados con jales mineros son a menudo pobres en nutrientes, se busca el uso de microorganismos que puedan aportar los elementos necesarios para el crecimiento de las plantas y que a su vez tengan la capacidad de crecer en concentraciones altas de metales pesados. En este sentido se han estudiado y caracterizado bacterias fijadoras de N₂, tanto de vida libre como simbióticas provenientes de sitios contaminados con metales pesados. Especies como *Azospirillum lipoferum*, *Bradyrhizobium japonicum* y *Paenibacillus* sp., con tolerancia a Cd, Cr y Zn, fueron aisladas de la rizósfera de plantas creciendo en jales mineros en Zacatecas. Estas especies mostraron una alta actividad de nitrogenasa en presencia de metales (Navarro-Noya et al. 2012).

Otras especies de plantas nativas que se han utilizado para fitorremediación son *Eleocharis macrostachya*, *Schoenoplectus americanus* y *Baccharis salicifolia* (Alarcon-Herrera et al. 2013), que se adaptaron a un sustrato contaminado con As, siendo *S. americanus* la que presentó un mayor desarrollo comparado con las demás. Los valores de **FT** (1.73) y **FBC** (59.74) obtenidos para esta especie indican su potencial para ser utilizada con fines de fitorremediación.

En un estudio más reciente, Arias et al. (2015), evaluaron el efecto de la inoculación de un consorcio de hongos micorrícicos arbusculares (HMA) en la absorción de Pb, Fe, Na y Ca por parte de girasol (*Helianthus annuus* L. y cebada (*Hordeum vulgare* L.) al ser cultivadas en un suelo adicionado con diferentes concentraciones de escorias industriales. Los autores reportaron que la inoculación de HMA incrementó la acumulación de Pb en tallo y raíz de ambas plantas, además de promover un incremento en la biomasa de las plantas inoculadas comparadas contra las no inoculadas.

Sin embargo, el tratamiento de fitorremediación no termina cuando el metal es acumulado en el tejido de las plantas, ya que se necesita una disposición final de los contaminantes. Es por eso que se busca generar tratamientos integrales que incluyan opciones para el manejo de los residuos. Al respecto Nuñez-Lopez et al. (2008), establecieron un sistema para la recuperación de plomo a partir del tejido de *Eichhornia crassipes*, el cual consistió en dos etapas: una lixiviación química con oxalato de amonio y una segunda etapa con una recuperación electroquímica del plomo a partir del lixiviado, con lo que se obtuvo una eficiencia de recuperación del 95 %.

2.6 Caso de estudio: laguna de “La Zacatecana”

Uno de los sitios más afectados por la contaminación de metales pesados en México es la laguna “La Zacatecana”, ubicada en el municipio de Guadalupe, Zacatecas (**Figura 3**). En esta zona desde la época virreinal hasta finales del siglo XIX, fueron depositados a través de los ríos que desembocaban en el área, los desechos del proceso de amalgamación de la plata, los cuales contenían altas concentraciones de plomo, arsénico y mercurio (Santos Santos et al. 2006). Estos desechos se acumularon en la laguna, la cual se deseca completamente durante una época del año y es aprovechada para la agricultura, representando un posible vector de contaminación (**Figura 4**).

La laguna cuenta con una extensión aproximada de 120 ha y ha sido objeto de diferentes estudios para determinar el grado de afectación de los metales pesados en suelo (Iskander et al. 1994). Cálculos recientes estiman que a la fecha existen en el lugar entre 10 y 20 millones de toneladas de residuos mineros acumulados (Zetina Rodríguez 2011). Además, la laguna ha sido considerada como un pasivo ambiental prioritario por el Sistema Informático de Sitios Contaminados (SISCO) y uno de los 635 sitios más contaminados de México. (SEMARNAT, 2010).

Debido a los altos niveles de Hg, Pb y As en suelos reportados para esta zona, los gobiernos federal y estatal llevaron a cabo acciones para contener la contaminación. En 2002, elaboraron el **“Plan de acción de la presa la Zacatecana para la contención de metales pesados”**, en respuesta al cual diferentes instituciones de investigación presentaron trabajos donde se realizaron estimaciones de los niveles de contaminación y el riesgo para la

población aledaña. También, en el 2002 la SEMARNAT publicó el *“Proyecto de contención del impacto ambiental de los lameros de la presa el Pedernalillo en la comunidad la Zacatecana Municipio de Guadalupe, Zacatecas”*, donde se expone un plan en 3 fases para la reubicación, compactación y recubrimiento de los jales mineros. Sin embargo, éste no fue llevado a cabo.



Figura 3. Comparación de las extensiones de los municipios de Zacatecas y Guadalupe y de la laguna de La Zacatecana

Actualmente en esta zona se cultivan importantes productos agrícolas de consumo humano como frijol y maíz, de los cuales existen reportes que indican la acumulación de arsénico y plomo (González-Dávila, Gómez-Bernal, y Ruíz-Huerta 2011). Asimismo, se ha reportado la presencia de niveles elevados de plomo y cadmio en sangre, así como arsénico en orina de niños del lugar (Trejo-Acevedo et al. 2009). Más recientemente, García-Berumen (2015) realizó un análisis de la concentración de metales en suelo y agua del lugar, encontrando concentraciones de Pb en suelo y Hg en agua por arriba de los máximos establecido por las normas mexicanas.



Figura 4. Laguna de la Zacatecana en diferentes épocas del año. **a)** En temporal de lluvias y **b)** en estiaje

A pesar de los estudios realizados sobre la contaminación por metales pesados en la laguna de La Zacatecana, hasta la fecha no existen reportes de estudios microbiológicos en la zona, así como tampoco se registran intentos de desarrollar o implementar tratamientos de fitorremediación, aprovechando el potencial de las plantas y microorganismos nativos mejor adaptados a las condiciones ambientales del sitio.

III. JUSTIFICACIÓN

La contaminación de suelos por metales pesados es un problema que tiene implicaciones ambientales y de salud pública. Específicamente en el municipio de Guadalupe, Zacatecas, existen altas concentraciones de Pb, As y Hg en suelos de uso agrícola. Las técnicas fisicoquímicas actuales de remediación de suelos tienen altos costos de operación y un mayor impacto ambiental. En este sentido, la fitorremediación asistida por microorganismos podría representar una alternativa biológica de bajo costo comparada con los procesos tradicionales de remediación.

IV. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4.1 HIPÓTESIS

El uso conjunto de plantas y microorganismos resistentes a metales pesados aislados de jales mineros de la presa La Zacatecana, ayudara a reducir los niveles de plomo en suelos afectados por la actividad minera en el municipio de Guadalupe, Zacatecas.

4.2 OBJETIVO

Evaluar el uso de plantas y microorganismos nativos en el tratamiento de fitorremediación de suelos contaminados por metales pesados provenientes de la laguna de “La Zacatecana” del municipio de Guadalupe, Zacatecas.

4.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar fisicoquímicamente el sitio de estudio y determinar la concentración y distribución de metales pesados en él suelo.
2. Aislar y seleccionar microorganismos con características de resistencia a metales y promoción de crecimiento vegetal.
3. Caracterizar y seleccionar plantas endémicas para su uso en los tratamientos de remediación.
4. Evaluar los tratamientos de fitorremediación inoculados con diferentes microorganismos endémicos.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Sitio de estudio

La laguna “La Zacatecana” se encuentra ubicada en el ejido de La Zacatecana en el municipio de Guadalupe, en el estado de Zacatecas (**Figura 5**), entre las coordenadas 22°44'1.2" longitud norte y 102°27'46.7" latitud oeste; la altitud promedio es de 2,280 msnm. La zona se caracteriza por tener un clima árido subtropical a lo largo del año. El promedio anual de temperatura es de 17 °C, siendo la temperatura máxima promedio de 30 °C y ocurre en el mes de mayo, mientras que la mínima promedio es de 3 °C y se registra durante el mes de enero. La precipitación media estatal es de 510 mm anuales presentándose las lluvias en los meses de junio a septiembre (INEGI 2017).

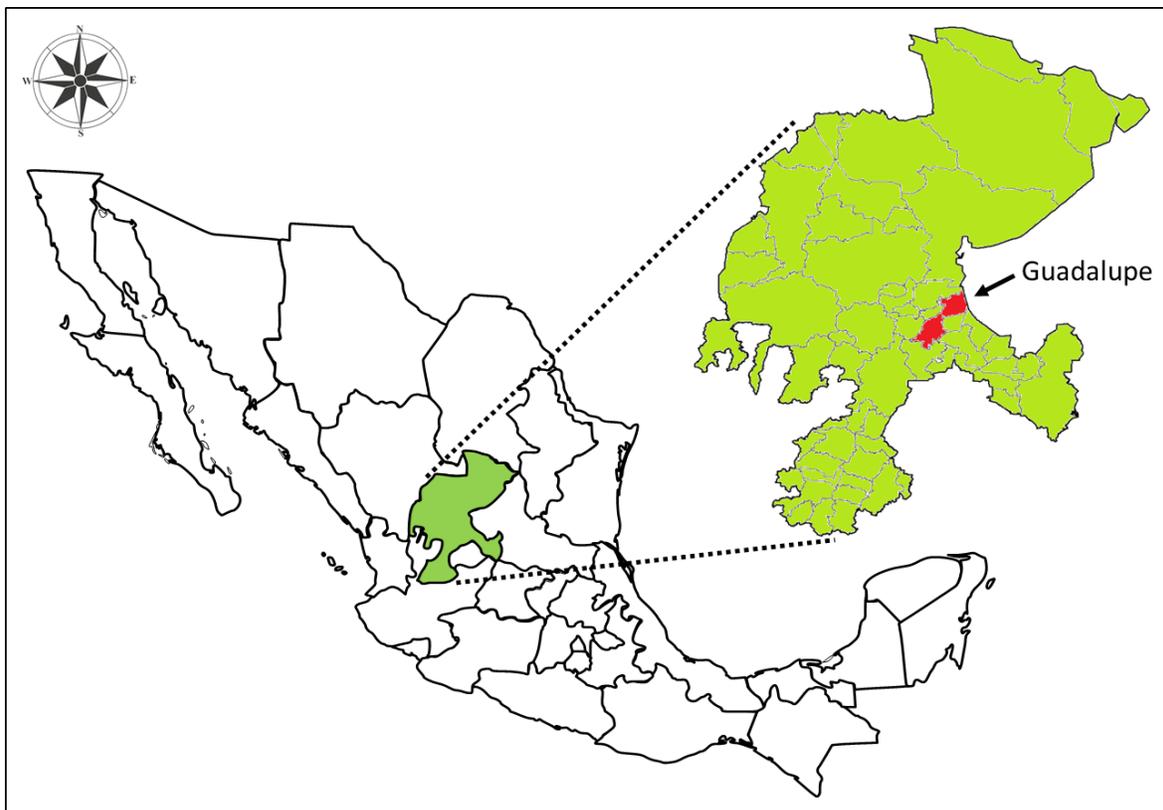


Figura 5. Ubicación del municipio de Guadalupe en el estado de Zacatecas, México.

5.2 Estrategia de muestreo

Se recolectaron muestras de suelo y sedimento entre 0 y 30 cm de profundidad en diferentes sitios de la laguna durante los meses de mayo de 2014 y mayo de 2015. Aproximadamente 1 kg de muestra de cada punto fue colocado en bolsas y frascos de plástico previamente esterilizados por radiación ultravioleta (UV). Las muestras destinadas para análisis físicoquímicos, determinación de metales pesados y para el aislamiento de microorganismos fueron almacenadas a 4 °C hasta su procesamiento, mientras que las muestras destinadas para análisis moleculares fueron almacenadas a -20 °C.

En la **Tabla III** – se indican las coordenadas exactas de cada punto de muestreo analizado durante el presente estudio. En la **Figura 6** se muestra la distribución de los puntos de muestreo en la superficie de la laguna de la Zacatecana.

Tabla III. Localización geográfica de los puntos de muestreo de este estudio

Puntos de muestreo	Coordenadas	
1N	22°43'47.0"N	102°28'14.1"O
3N	22°43'43.4"N	102°28'16.6"O
5N	22°43'40.2"N	102°28'09.8"O
7N	22°43'37.2"N	102°28'06.2"O
9N	22°43'25.4"N	102°27'58.7"O
11N	22°43'38.8"N	102°27'47.6"O
13N	22°43'52.5"N	102°27'23.4"O
17N	22°44'28.7"N	102°27'42.8"O
1S	22°44'13.9"N	102°28'07.8"O
3S	22°44'32.9"N	102°28'03.4"O
M2	22°44'5.46"N	102°28'7.98"O
M4	22°44'36.78"N	102°27'58.98"O
M6	22°44'11.46"N	102°27'23.76"O
M12	22°44'0.12"N	102°27'46.68"O

Nomenclatura: N = Norte, S = Sur y M = Mayo.

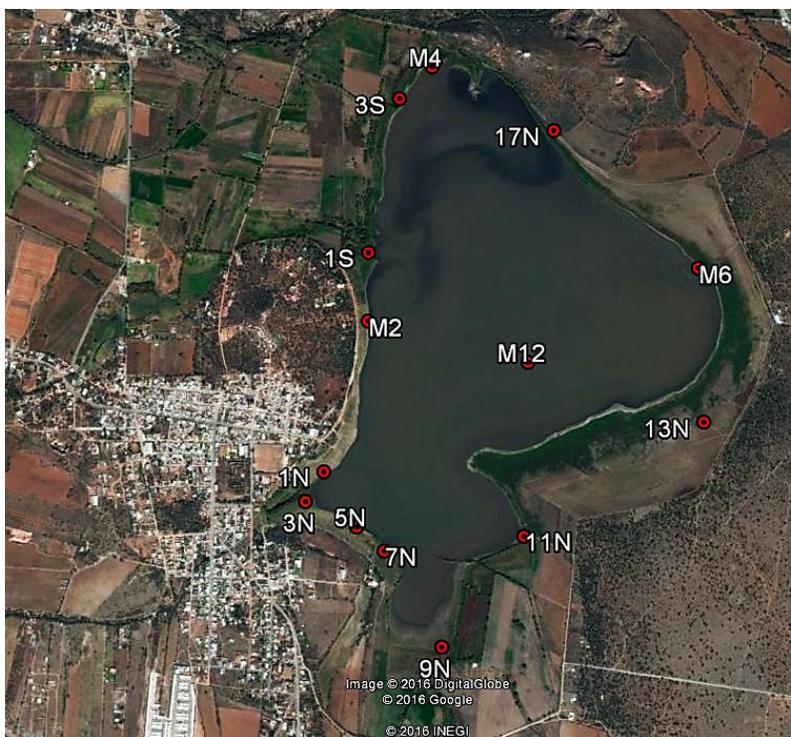


Figura 6. Distribución de los puntos de muestreo en la superficie de la laguna “La Zacatecana”.

5.2.1 Análisis fisicoquímico del suelo

Se determinaron las siguientes características fisicoquímicas del suelo: humedad por el método gravimétrico (Fernández Linares et al. 2006), contenido de materia orgánica por el método titulométrico de Walkley y Black (1934), pH, conductividad eléctrica y potencial redox por el método potenciométrico (Fernández Linares et al. 2006).

El análisis fisicoquímico y nutrimental completo de la muestra de suelo que resultó con la mayor concentración de metales pesados fue realizado por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) Campo Experimental Bajío.

5.2.2 Determinación de bacterias heterótrofas totales de suelo

Se realizó un análisis de la cantidad de bacterias heterótrofas totales en suelo y sedimento de la Zacatecana. Se depositaron 10 g de suelo de cada sitio de muestreo en matraces Erlenmeyer con 90 mL de NaCl 0.85% estéril. Las muestras se agitaron a 120 rpm y 28 °C durante 2 h.

Al finalizar el período de incubación se tomó una alícuota de 1 mL y se realizaron diluciones seriadas sembrando por extensión con asa de Drigalski en cajas de Petri con agar nutritivo. Las cajas fueron incubadas a 28 °C durante 48 h. Al final se determinaron las unidades formadoras de colonia (UFC/ g de suelo) para cada muestra.

5.2.3 Determinación total de metales pesados en suelo de la Zacatecana

Las muestras compuestas fueron secadas a temperatura ambiente por 5 días a la sombra. Una vez secas, las muestras fueron cribadas en un tamiz No. 14 para obtener un material con un tamaño de partícula homogéneo. Para la determinación del total de metales en suelo se tomaron 3 alícuotas de 0.5 g de suelo seco de cada sitio. Las alícuotas se colocaron en matraces Erlenmeyer de 150 mL a los cuales se les adicionó 10 mL de ácido nítrico al 75%. Las muestras fueron digeridas a una temperatura de 120 °C por 3 h en un sistema de reflujo abierto. A cada muestra se le determinó la concentración total de Pb, As, Hg, Cr, Cd y Ni, mediante espectrometría de absorción atómica siguiendo el protocolo establecido por la USEPA (2007).

5.2.4 Índice de Geo acumulación

Una vez determinadas las concentraciones totales de metales en el suelo, se procedió a estimar el índice de geo acumulación (I_{geo}) propuesto por Müller (1979), el cual es utilizado como un estimado de la contaminación en suelos y sedimentos. Se calcula con la siguiente ecuación:

$$I_{geo} = \log_2 \left(\frac{C_n}{1.5B_n} \right) \quad (3)$$

Donde C_n es la concentración del metal en la muestra; B_n es el valor de fondo del metal y 1.5 es una constante que compensa las fluctuaciones de origen antropogénico. Los valores calculados con la ecuación fueron comparados contra las 7 clases propuestas por Müller

(1979) para determinar el grado de contaminación de un suelo y se muestran en la **Tabla IV**. Los valores de fondo utilizados en este estudio fueron los estimados por Taylor y McLennan (2001) para Pb (20 ppm), Ni (40 ppm), Cr (74 ppm), Cd (0.9 ppm), As (1.5ppm); y por Turekian y Whedepool (1961) para Hg (0.19 ppm). Además, se calculó el Igeo utilizando los valores reportados por García-Berumen (2015) para Pb (13 ppm), Hg (8 ppm) y As (2.7 ppm) de un sitio sin impacto de actividad minera en Zacatecas.

Tabla IV. Índice de geo-acumulación de Müller

Valor I_{geo}	Clasificación	Grado de contaminación del suelo/sedimento
<0	0	No contaminado
0-1	1	No contaminado a moderadamente contaminado
1-2	2	Moderadamente contaminado
2-3	3	Moderadamente a fuertemente contaminado
3-4	4	Fuertemente contaminado
5-6	5	Fuertemente contaminado a extremadamente contaminado
>6	6	Extremadamente contaminado

5.2.5 Índice de Riesgo Ecológico Potencial

Con las concentraciones totales de metales en suelo se procedió a estimar el índice de Riesgo Ecológico Potencial (E_{RI}). Este índice fue propuesto inicialmente por Hakanson (1980) como una herramienta de diagnóstico para calcular los efectos tóxicos potenciales de la contaminación por metales pesados en un determinado sitio. El ERI se obtiene a partir de la siguiente ecuación:

$$E_r^i = T_r^i \times \frac{C^i}{C_0^i} \quad (4)$$

$$E_{RI} = \sum_{i=1}^7 E_r^i \quad (5)$$

Donde E_r^i es el monomio del índice de riesgo ecológico potencial; C^i y C_0^i corresponden a la concentración específica del metal en la muestra y al valor de referencia para el sedimento respectivamente; T_r^i es el factor de toxicidad del metal (los valores para Pb, As, Hg, Cd, Cr y Ni son 5, 10, 40, 30, 2 y 5, respectivamente) (Wang et al. 2011). Los valores obtenidos con este índice fueron comparados con la **Tabla V** para determinar el grado de riesgo ambiental.

Tabla V. Niveles de riesgo potencial de afectación por metales pesados establecidos por Hakanson (1980).

Bajo riesgo	$E_r^i < 30; E_{RI} < 100$
Riesgo moderado	$30 < E_r^i < 50; 100 < E_{RI} < 150$
Riesgo considerable	$50 < E_r^i < 100; 150 < E_{RI} < 200$
Alto riesgo	$100 < E_r^i < 150; 200 < E_{RI} < 300$
Muy alto riesgo	$E_r^i > 150; E_{RI} > 300$

5.2.6 Correlación bivariada de los metales pesados analizados

Para determinar si los metales pesados presentes en el sistema provienen de una posible fuente común, se realizó un análisis de correlación bivariada de *Spearman* entre las concentraciones de metales de los diferentes sitios de muestreo. Una correlación positiva ($p < 0.05$ o $p < 0.01$) indica que los metales podrían derivar de la misma fuente de contaminación o del mismo proceso de migración.

5.2.7 Mapas de dispersión de metales

Para representar la distribución de metales en suelo y sedimento de La Zacatecana, se realizaron mapas de isocurvas de predicción de los diferentes metales analizados utilizando el método de Kriging. Los análisis y mapas se generaron en el programa Surfer 9 de Golden Software.

5.2.8 Extracción secuencial de metales pesados en suelos

La extracción secuencial de metales pesados en muestras de suelo se llevó a cabo usando el método modificado de Tessier (Tessier, Campbell, y Bisson 1979). En el cual 1 g de muestra de suelo homogenizada se procesó de la siguiente manera:

- Fracción intercambiable (**F1**): a 1 g de suelo seco se le adicionaron 8 mL de una solución de cloruro de magnesio (MgCl_2 1 M pH 7). Luego, la mezcla se colocó en agitación continua (50 rpm) durante 1 h a temperatura ambiente.
- Fracción unida a carbonatos (**F2**): al residuo de la fracción anterior se le agregaron 8 mL de acetato de sodio (CH_3COONa 1 M) ajustado a pH 5 con ácido acético glacial. La mezcla se colocó en agitación continua (50 rpm) durante 5 h a temperatura ambiente.
- Fracción unida a óxidos e hidróxidos de Fe y Mn (**F3**): al residuo de la fracción anterior se le agregaron 20 mL de clorhidrato de hidroxilamina ($\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ 0.04 M) acidificado con ácido acético glacial al 25 % (v/v). Luego, la mezcla se colocó en agitación continua por 6 h a una temperatura de 85 °C.
- Fracción unida a materia orgánica y sulfuros secundarios (**F4**): al residuo de la fracción anterior se le adicionaron 3 mL de HNO_3 0.02 M más 5 mL de peróxido de hidrógeno (H_2O_2 al 30%, pH 2). La mezcla se colocó en baño maría a 85 °C por 2 h. Una vez transcurrido el tiempo de digestión se le adicionó otros 3 mL de H_2O_2 al 30 % pH 2 y se continuó con la digestión a la misma temperatura por otras 3 h. Una vez terminada la digestión se dejó enfriar la solución y se le adicionaron 5 mL de acetato de amonio 3.2 M ($\text{CH}_3\text{COO}^-\text{NH}_4^+$) y se dejó en agitación continua (50 rpm) durante 30 min a temperatura ambiente.
- Fracción residual (**F5**): la concentración total de metales se determinó en la fracción residual. Se realizó una digestión durante 3 h a 120 °C añadiendo a la muestra 15 mL de una mezcla de ácido nítrico-perclórico (5:1 v/ v). Una vez que la temperatura disminuyó, la muestra fue aforada a 30 mL con HNO_3 al 8.8 %.

Concluido el tiempo de extracción en cada una de las fracciones, se procedió a centrifugar a 5000 rpm por 30 min. El sobrenadante separado en cada fracción se acidificó con 100 μL de

HNO₃ concentrado y se filtró utilizando papel filtro Whatman No. 50. El contenido de metales pesados se determinó a continuación por espectrometría de absorción atómica.

5.2.9 Factor de Movilidad

Con los datos obtenidos de la extracción secuencial de metales se procedió a estimar el factor de movilidad (**MF**), el cual representa el porcentaje del metal contenido en la muestra que pudiera movilizarse y entrar en la cadena trófica (Gasparatos et al. 2015; Shaheen y Rinklebe 2014). El **MF** se calcula a partir de la siguiente ecuación:

$$\mathbf{MF} = \frac{F1+F2}{F1+F2+F3+F4+F5} \times 100 \quad (6)$$

Donde *F1* equivale a la concentración del metal en la fracción 1, *F2* a la fracción 2 y así consecutivamente.

5.2.10 Relación entre las propiedades fisicoquímicas del suelo y la presencia de metales pesados

Para determinar las correlaciones entre los metales analizados (Pb, As, Hg, Cd, Cr y Ni) y las propiedades fisicoquímicas del suelo (pH, conductividad eléctrica, porcentaje de materia orgánica y potencial redox), se realizó un análisis de componentes principales (PCA).

5.2.11 Composición química del suelo por Espectrometría de Fluorescencia de Rayos X (FRX)

El análisis de compuestos químicos presentes en la muestra de suelo más contaminado se llevó a cabo por un método semi-cuantitativo basado en el uso de espectrometría de fluorescencia de Rayos X (FRX) con dispersión de longitud de onda. El análisis se realizó en un equipo marca BRUKER modelo S4 PIONNER, provisto con una fuente de excitación de 4 kW. La interpretación de los datos se realizó utilizando el software SPECTRA plus. El análisis fue realizado en el Laboratorio de Análisis Químico del Centro de Investigación y

de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), Unidad Saltillo, Saltillo, Coahuila, México.

5.3 Análisis microbiológico

5.3.1 Aislamiento de microorganismos

Para el aislamiento de microorganismos resistentes a metales pesados se tomaron 10 g de suelo, los cuales fueron colocados en un matraz Erlenmeyer que contenía 90 mL de solución salina estéril (0.85 % p/ v). Posteriormente se agitaron por 2 ha temperatura ambiente y se realizaron diluciones seriadas las cuales se sembraron en medio LB suplementado con 0.5 mM de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (Barcos, 2014). Las cajas de incubaron a 28 °C hasta observar crecimiento. Se seleccionaron aquellas colonias que presentaron morfologías diferentes.

5.3.2 Caracterización bioquímica de los aislados

5.3.3 Producción de compuestos indólicos

Los aislados bacterianos tolerantes a Pb fueron inoculados en matraces Erlenmeyer con 50 ml de caldo nutritivo adicionado con 100 $\mu\text{g}/\text{L}$ de L-triptofano (Sigma-Aldrich, St. Lois, MO, EUA.). Los cultivos fueron incubados en oscuridad a 28 °C durante 3 días a 120 rpm. Posteriormente, 1 mL de cada cultivo se centrifugó a 10, 000 rpm durante 5 min; al sobrenadante obtenido se le agregaron 2 mL de reactivo de Salkowski (50 mL HClO_4 35 % + 1 mL de FeCl_3 0.5 M). La reacción fue incubada durante 20 min a temperatura ambiente (Glickmann y Dessaux 1995). La cuantificación de grupos indólicos (formación de color rojo) fue determinada a una longitud de onda de 540 nm en un espectrofotómetro TECAN modelo GENios (Salzburgo, AT). Este ensayo fue realizado con tres réplicas independientes. Para determinar la concentración de grupos indólicos en la muestra se comparó la absorbancia obtenida del cromógeno contra una curva patrón con diferentes concentraciones (0,10, 20, 30. 40 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de ácido indolacético comercial (Sigma Aldrich, St. Luis, MO, EUA).

5.3.4 Solubilización de fosfatos

5.3.5 Selección de aislados solubilizadores

Se determinó la capacidad de los aislados bacterianos para solubilizar fosfatos utilizando el medio sólido Pikovskaya (PVK) el cual contiene una fuente de fósforo insoluble. La técnica se basa en la formación de un halo de solubilidad alrededor de la colonia bacteriana que presenta dicha actividad (Nautiyal 1999).

Las bacterias fueron inoculadas por punción en el centro de las cajas de Petri que contenían el medio (PVK). Las cajas fueron incubadas a 28 °C durante 15 días. Al final del periodo de incubación, se seleccionaron aquellas bacterias que presentaron un halo de solubilización alrededor de la colonia. Este ensayo fue realizado con tres réplicas independientes para cada aislado. La composición exacta del medio PVK se muestra en el **Anexo I**.

5.3.6 Cuantificación de solubilización de fosfatos

Para cuantificar la solubilización exacta de fosfato, se seleccionaron aquellos aislados que dieron positivo para la prueba anterior. Se incubó una asada de inóculo bacteriano en 50 mL de medio PVK líquido durante 4 días a 28 °C y 120 rpm. Posterior al periodo de incubación, se midió el pH de los cultivos y se eliminó la biomasa bacteriana por centrifugación (10, 000 rpm 15 min). Se determinó la cantidad de fósforo soluble en el sobrenadante mediante el método del ácido ascórbico de Watanabe y Olsen (1965). La absorbancia de las muestras se midió en un lector de placas (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) a 880 nm. Para determinar la concentración exacta de fósforo se compararon los valores de las absorbancias de cada muestra contra los obtenidos por una curva estándar de fósforo (KH_2PO_4). Se realizaron diluciones de aquellas muestras que presentaron valores arriba del rango de la curva de calibración. La solubilidad de fosfatos fue expresada en mg/ L de fósforo disuelto.

5.3.7 Producción de sideróforos

La capacidad productora de sideróforos de los aislados se determinó utilizando el medio específico Cromo Azurol Sulfonato (CAS-agar). Esta técnica se basa en la formación de un

halo naranja alrededor de la colonia bacteriana que presenta dicha actividad. (Schwyn y Neilands 1987). La composición del medio CAS-agar se describe a continuación:

Solución indicadora de Fe-CAS (**solución 1**): 10 mL FeCl₃ 1 mM (disuelto en HCl 10 mM), 50 mL de una solución CAS (1.21 mg/ mL). Esta última solución fue añadida lentamente con movimiento constante a 40 mL de una solución de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HDTMA 1.82 mg/ mL). Solución buffer (**solución 2**): disolución de 30.24 g PIPES (ácido piperazina-N,N-bis[2-etanosulfónico]) en 750 mL de una solución salina: 0.3 g KH₂PO₄, 0.5 g NaCl y 1.0 g NH₄Cl a pH 6.8 utilizando KOH 50 % (p/v), aforada a 800 mL, adicionada con 15 g de agar. **Solución 3**: 2 g glucosa, 2 g manitol, 493 mg MgSO₄, 11 mg CaCl₂, 1.17 mg MnSO₄, 1.4 mg H₃BO₃, 0.04 mg CuSO₄, 1.2 mg ZnSO₄ y 1.0 mg Na₂MoO₄ en 70 mL de agua destilada. Dichas soluciones fueron esterilizadas en autoclave a 121 °C y 15 lb de presión durante 15 min. Después de enfriar hasta 50 °C, las tres soluciones anteriores se mezclaron agitándose lentamente para evitar la formación de burbujas; finalmente se agregaron 30 mL de una solución de casaminoácidos 10 % (p/v) (**solución 4**). Dicha solución fue filtrada previamente a través de una membrana de celulosa de 0.22 µm (Alexander y Zuberer 1991).

Las bacterias fueron inoculadas por punción en el centro de las cajas de Petri que contenían el medio CAS-agar, y fueron incubadas a 28 °C durante 7 días. Las bacterias que presentaron el halo naranja rodeando la colonia fueron seleccionadas como posibles productoras de sideróforos.

5.4.8 Cuantificación de sideróforos

Para la cuantificación de los sideróforos producidos por las bacterias que dieron positivo en la prueba de CAS-agar, se utilizó el método del Cromo Azurol Sulfonato (CAS) en solución.

Para la obtención de sobrenadante libre de células (SLC) de cada cultivo bacteriano, se incubó una asada de cada aislado bacteriano en 50 mL de medio mínimo M9 libre de Fe (**Anexo I**) a 28 °C y 120 rpm. Después de 48 h de crecimiento, las células fueron separadas del medio de cultivo por centrifugación (10, 000 rpm durante 15 min). El sobrenadante obtenido se filtró a través de una membrana de Millex GV de 0.22 µm (Carrigwohill, Co, Cork, RU).

La solución indicadora se preparó disolviendo 21.9 mg de HDTMA en 25 mL de agua en agitación constante y con ligero calentamiento. En un contenedor diferente se mezclaron 1.5 mL de 1 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (en 10 mM HCl) con 7.5 mL de CAS 2 mM. Esta solución fue agregada lentamente al HDTMA en agitación y la mezcla resultante fue transferida a un matraz volumétrico de 100 mL. Se preparó una solución amortiguadora disolviendo 9.76 g de MES en 50 mL de agua; el pH fue ajustado a 6.8 con KOH 50 % y esta solución fue añadida al matraz volumétrico que contenía la solución colorante. Finalmente, se agregó agua para aforar al volumen correspondiente (Alexander y Zuberer 1991).

La concentración de sideróforos en el sobrenadante fue determinada mezclando 500 μL de solución CAS indicadora con 500 μL de SLC filtrado (realizando diluciones en caso de ser necesarias) y se agregaron a la reacción 10 μL de ácido 5-sulfosalicílico 0.2 M como catalizador. Después de estabilizarse la reacción por 60 min, se leyó la absorbancia a 630 nm en un lector de microplacas (Bio-Rad).

La curva de calibración se realizó utilizando deferroxamina B (Sigma-Aldrich) como estándar, mientras que para la solución de referencia o blanco se utilizó medio M9 estéril. La curva fue preparada midiendo la absorbancia de cada solución estándar dividida entre la absorbancia de la solución de referencia ($\text{Abs}_{\text{std}} / \text{Abs}_{\text{ref}}$) como función de la cantidad de sideróforos en la solución (Alexander y Zuberer 1991; Payne 1994). La concentración de sideróforos en las muestras fue expresada en μM UDFOM).

5.3.9 Crecimiento en medio libre de nitrógeno

Para identificar posibles bacterias fijadoras de nitrógeno, se inoculó una asada de biomasa bacteriana en cajas de Petri con medio LGI libre de nitrógeno (**Anexo I**) el cual contiene azul de bromotinol como solución indicadora de pH. Posteriormente las cajas fueron incubadas durante 10 días a 28 °C. Al término del periodo de incubación, se seleccionaron aquellas cajas donde ocurrió un viraje en el color del medio de verde (alcalino) a amarillo (ácido). El cambio de color en el medio fue tomado como un indicador positivo de crecimiento microbiano.

5.3.10 Amplificación del gen *nifH*

Para verificar la capacidad de fijación de nitrógeno de los aislados seleccionados en el punto anterior se realizó una amplificación del gen de la enzima nitrogenasa. Se realizó una extracción de ADN genómico de los aislados siguiendo las indicaciones del punto 5.4.12. A partir del ADN extraído se realizó una amplificación del gen *nifH* a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando como templado los oligos Pol R (5'-ATSGCCATCATYTCRCCGGA-3') como cebador "forward" y Pol F (5'-TGCGAYCCSAARGCBGACTC-3') como cebador reverso (Jha et al. 2009). Para la amplificación del gen, se utilizó el siguiente programa: ciclo inicial de desnaturalización de 95 °C por 3 min, seguido de 35 ciclos de 94 °C por 60 s, 55 °C por 60 s y 72 °C por 2 min y un paso de elongación final de 72 °C por 5 min. Para verificar la amplificación del gen deseado se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1 % (35 min, 100 volts) con los productos de PCR. Como control positivo se utilizó una cepa del género *Rhizobium* perteneciente a la colección de microorganismos del Laboratorio de Microbiología Ambiental.

5.3.11 Identificación molecular de los aislados

5.3.12 Extracción de ADN

La identificación de las cepas seleccionadas se realizó a partir de la extracción del ADN total de los aislados por el método de fenol-cloroformo (Green y Sambrook 2012). Cada una de las cepas fue incubada durante 24 h a 100 rpm y 28 °C en tubos de ensayo que contenían 10 mL de caldo nutritivo. Un alícuota de 1 mL de cada cultivo fue centrifugado a 10,000 rpm por 5 min para separar la biomasa bacteriana del medio de cultivo. Al "pellet" obtenido se añadieron 100 µL de buffer TE 1x. El contenido de cada tubo fue transferido a tubos eppendorff de 2 mL que contenían perlas de vidrio. Después de agregar 200 µL de fenol: cloroformo (1: 1 v/ v) y 200 µL de solución Winston (**Anexo I**), fueron agitados vigorosamente durante 15 min. Se añadieron 200 µL de buffer TE 1x, se homogenizó la muestra durante 1 min en un agitador tipo vortex y se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 min. El sobrenadante obtenido fue recuperado cuidadosamente y colocado en un nuevo tubo. A éste se añadieron 200 µL de la mezcla fenol: cloroformo (1: 1), se agitó durante 3 min y

se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 min; este proceso se repitió tres veces. Una alícuota de 300 µL de cloroformo se añadió a cada tubo y se centrifugaron a 13,000 rpm por 5 min a 4 °C. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo y se agregaron 25 µL de NaCl 5 M y 2 mL de etanol absoluto. Después de mezclar por inversión, se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante y se secaron los tubos invertidos a temperatura ambiente. El pellet obtenido fue disuelto en 100 µL de buffer TE (pH 8.0) y 1.23 µL de ribonucleasa (20 µM/ mL en buffer TE pH 8.0). Después de incubar durante 30 min a 37 °C se agregaron a la mezcla 40 µL de acetato de amonio 5 M y 250 µL de isopropanol. Los tubos se incubaron nuevamente durante 10 min a temperatura ambiente para después ser centrifugados a 13,000 rpm por 10 min. El sobrenadante fue descartado y el “pellet” fue lavado dos veces con 500 µL de etanol (70 %) centrifugando durante 5 min a 12,000 rpm y descartando siempre el sobrenadante. Después de secar los tubos a temperatura ambiente, el ADN obtenido fue resuspendido en 50 µL de buffer TE 1x. La concentración fue determinada espectrofotométricamente en un equipo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Dallas, TX, EUA.). Las muestras fueron almacenadas a -20 °C para su posterior utilización.

5.3.13 Amplificación del gen 16S ARN ribosomal

El gen 16S ARNr fue amplificado por PCR utilizando como templado el ADN total obtenido con la técnica anteriormente descrita. Se usaron los oligos universales para bacterias 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'), como cebador “forward” y 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') como cebador reverso (Lane 1991). Para la amplificación, se utilizó el siguiente programa: ciclo inicial de desnaturalización de 95 °C por 3 min, seguido de 35 ciclos de 95 °C por 30 s, 48 °C por 30 s y 72 °C por 1.5 min y un paso de elongación final de 72 °C por 2 min. Los productos de PCR que contenían los fragmentos de gen 16S ARNr fueron purificados usando el paquete comercial PureLink™ Quick PCR (Invitrogen Life Technologies Baltics, Vilna, LT.) y enviado a secuenciar al Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (**Langebio**), en el **Cinvestav**-Unidad de Genómica Avanzada.

5.3.14 Análisis de las secuencias

Las secuencias generadas fueron editadas manualmente y analizadas utilizando el programa CLC Sequence Viewer 7 (CLC Bio). Para identificar las bacterias cada secuencia fue alineada utilizando el programa BLAST (Altschul et al. 1990). Los análisis filogenéticos se realizaron con el método de máxima verisimilitud con el programa MEGA versión 6 (Tamura et al. 2007). Se utilizó la herramienta “Find best model” para evaluar los modelos de sustitución. Para evaluar la repetibilidad de los resultados se realizaron 1000 réplicas de “bootstrap”.

5.4 Ensayos *in vitro* de promoción de crecimiento vegetal

Para identificar aquellos aislados con potencial de crecimiento vegetal se realizó un ensayo de co-cultivo en placa de agar utilizando la planta modelo *Arabidopsis thaliana* de acuerdo al protocolo de Castro, García, y Bucio (2013) con modificaciones. Brevemente, semillas de *A. thaliana* (ecotipo Col-0) fueron esterilizadas superficialmente con etanol al 95% (vol/ vol) por 5 min y con hipoclorito de sodio al 20% por 7 min. Después de 5 lavados con H₂O destilada estéril, las semillas fueron germinadas en cajas de Petri con medio Murashige-Skoog (Sigma), adicionado con 0.5 mM de Pb(NO₃)₂ y agar-agar como agente solidificante (5 plantas por placa). Las cajas fueron colocadas en una cámara de crecimiento a una temperatura de 25 °C con un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad, la intensidad luminosa se ajustó a 100 μmol·m²/ s.

Cuando la raíz de las plantas presento un 1 cm de longitud se realizó la inoculación de los diferentes aislados bacterianos en el lado opuesto de la caja de Petri a 5 cm de las puntas de las raíces. Las plantas fueron crecidas en presencia del inóculo bacteriano por 7 días. Las cajas sin inóculo fueron utilizadas como controles. Al final del experimento se determinó el peso fresco (parte aérea y radicular) en una balanza analítica (Ohaus Corp; NJ, EUA.). Los aislados que mostraron las mejores características de promoción de crecimiento vegetal fueron seleccionados como inóculos en los tratamientos de fitorremediación.

5.5 Selección de plantas para los tratamientos de fitorremediación

Para identificar y seleccionar posibles especies vegetales con potencial de fitorremediación se realizó un estudio florístico y una descripción de la vegetación de la zona aledaña al sitio más contaminado de La Zacatecana. Se realizó una exploración sistemática de un área de aproximadamente 9 ha, se tomaron fotografías y se colectaron muestras de material vegetal de las diferentes plantas observadas. Para la identificación taxonómica se tomaron como referencia las fichas técnicas de la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), además de revisar la base de datos del Herbario de la Unidad Académica de Agronomía de la Universidad Autónoma de Zacatecas.

Por su abundancia en el sitio de estudio se seleccionó a *Amaranthus palmeri* como una de las especies vegetales para los tratamientos de fitorremediación, así como a *Helianthus annuus* por ser un organismo modelo en estudios de fitorremediación de suelos contaminados por metales pesados. En la **Tabla VI** se muestra la taxonomía de las especies seleccionadas.

Tabla VI. Taxonomía de las especies vegetales utilizadas en este estudio

Taxonomía		
Reino	Plantae	Plantae
División	Magnoliophyta	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida	Magnoliopsida
Orden	Asterales	Caryophyllales
Familia	Asteraceae	Amaranthaceae
Género	<i>Helianthus</i>	<i>Amaranthus</i>
Género y especie	<i>Helianthus annuus</i> L., 1753	<i>Amaranthus palmeri</i> S. Wats.

5.5.1 Ensayo de germinación con *Amaranthus palmeri* y *Helianthus annuus*

Con los aislados seleccionados se realizó un ensayo de germinación de *A. palmeri* y *H. annuus in vitro*. En cajas de Petri de vidrio previamente esterilizadas se colocó una cama de algodón esterilizado y humedecido con 20 mL de H₂O estéril. Se colocaron sobre el algodón un promedio de 10 semillas por caja. En la superficie de cada semilla fueron inoculados 200

μL de una solución salina con una concentración de 1×10^6 UFC/ mL. Las cajas fueron incubadas durante 4 días a 28°C . Al final del experimento se determinó el porcentaje de germinación y se cuantificó la longitud de la radícula mediante fotografías utilizando la extensión SmartRoot del software Image J.

5.6 Ensayo de fitorremediación asistida por microorganismos

Se realizó un ensayo de fitorremediación de Pb en suelo proveniente de La Zacatecana, con las plantas y bacterias seleccionadas en este estudio. Semillas de *H. annuus* y *A. palmeri* fueron esterilizadas previamente con gas cloro. Estas fueron sembradas en unidades experimentales independientes (**Figura 7**) con 800 gr de suelo proveniente de La Zacatecana (sitio 17N) (5 unidades por tratamiento). El ensayo se llevó a cabo en una cámara de crecimiento a 27°C , con un fotoperiodo largo, y un porcentaje de humedad del 50 %. Tuvo una duración de 11 semanas a partir de la geminación de las semillas. Las plantas fueron regadas diariamente y se fertilizaron semanalmente con 10 mg de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Después de una semana de haber germinado las plantas, fueron inoculadas con los diferentes microorganismos a una concentración de 1×10^9 UFC/ kg de suelo. A continuación, se describen los diferentes tratamientos para cada especie vegetal:

Los tratamientos evaluados para *H. annuus* fueron los siguientes: **Control** (sin inoculación de microorganismos), **52** (i. e., inoculado con *Pseudomonas* sp. 52), **MR3.17** (i. e., inoculado con *Rhodococcus* sp. MR317), y **52 + MR3.17** (i. e., inoculado con una concentración igual de *Pseudomonas* sp. 52 y *Rhodococcus* sp. MR317). De igual manera se repitieron todos los tratamientos, esta vez agregando ácido etilen-diamino-*N,N'*-di-succínico (**EDDS**) a una concentración de 5 mM/ kg suelo para incrementar la biodisponibilidad de Pb en el suelo. El EDDS se agregó después de 5 semanas de haber germinado las semillas. Los tratamientos fueron: **Control + EDDS**, **52 + EDDS**, **MR317 + EDDS** y **52 + MR317 + EDDS**.

Los tratamientos evaluados para *A. palmeri* fueron los siguientes: **Control** (i. e., sin inoculación de microorganismos), **BS6** (i. e., inoculado con *Enterobacter* sp. BS6), **MR3.17** (i. e., inoculado con *Rhodococcus* sp. MR317), y **BS6 + MR3.17** (i. e., inoculado con una concentración igual de *Enterobacter* sp. BS6 y *Rhodococcus* sp. MR317). De igual manera

se repitieron todos los tratamientos agregando EDDS. (**Control + EDDS, BS6 + EDDS, MR317 + EDDS y BS6 + MR317 + EDDS**).

Al final del experimento, fueron determinadas las siguientes variables: peso húmedo y seco de tallo y raíz, altura de planta y longitud de la raíz, contenido de clorofila (usando el “CCM-200 plus Chlorophyll content Meter”; ADC BioScientific; Ltd; Herts, U.K), así como la acumulación de Pb en los diferentes tejidos de las plantas. También se determinó el porcentaje de materia orgánica en el suelo de los diferentes tratamientos por el método de Walkley-Black (1934).

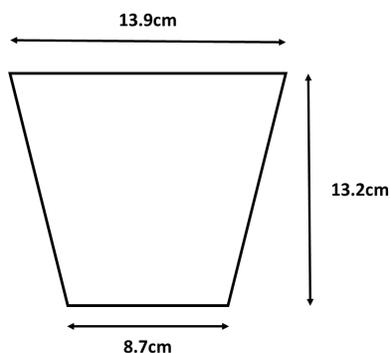


Figura 7. Tamaño de las unidades experimentales (i. e., macetas de plástico) utilizadas en los ensayos de fitorremediación

5.6.1 Acumulación de Pb en diferentes tejidos de *H. annuus* y *A. palmeri*

La acumulación de Pb en raíz, tallo y hoja en los diferentes tratamientos de fitorremediación se determinó de la siguiente manera: el material vegetal fue secado a temperatura ambiente hasta masa seca constante por aproximadamente 5 días. Posteriormente, 500 mg de masa seca se transfirieron a un tubo de digestión de 100 mL de capacidad (Tecator-FOSS, Hillerod, DK.) con 15 mL de una solución de ácido nítrico: perclórico en relación 5: 1 v/ v (Vera et al., 2006). Las muestras fueron digeridas a una temperatura de 120 °C (Unidad de digestión Tecator 40) por aproximadamente 3 h. Una vez terminado el tiempo de digestión las muestras se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se aforaron a un volumen de 30 mL con ácido nítrico al 8.8%. La solución resultante fue filtrada y el contenido de Pb se determinó por

espectrometría de absorción atómica (PinAAcle 900H Atomic Absortion Spectrometer PerkinElmer; Connecticut, EUA) de acuerdo al método EPA-6010.

Con los valores obtenidos de la acumulación de Pb en los diferentes tratamientos se determinaron los factores de bioconcentración (**BCF**) y transferencia (**TF**) para evaluar los mejores tratamientos.

5.7 Análisis estadísticos

Los datos de las variables de interés fueron analizados por un procedimiento estándar de análisis de varianza (ANOVA) y una prueba *post hoc* de Tukey HSD o Fisher LSD con un nivel de significancia $p \leq 0.05$, utilizando el software XLSTAT (v2015.6.01.23953, Addinsoft NY, USA).

VI. RESULTADOS

6.1 Análisis fisicoquímicos del suelo

Las características fisicoquímicas del suelo y sedimento de “La Zacatecana” mostraron un comportamiento variable. En la **Tabla VII** se muestran los resultados de las características fisicoquímicas del suelo y sedimento para cada punto de muestreo.

El pH, en general, estuvo en niveles de ligeramente alcalinos a alcalinos para todas las muestras, siendo los puntos **13N**, **17N** y **3S** los que mostraron el pH más bajo con unos valores de 7.7, 7.75 y 7.78 respectivamente. Mientras que el valor más alto se presentó en el punto **5N** con un valor de 9.6, seguido de sitio **8N** con un valor de 9.01. Todos los demás sitios estuvieron en un rango de pH de 8.03 a 8.88.

Tabla VII. Características fisicoquímicas de las muestras del suelo de “La Zacatecana”

Punto de muestreo	pH	Conductividad Eléctrica (dS/m)	Contenido de Materia Orgánica (%)	Potencial Redox (mV)
1N	8.69 ± 0.08 cd	1.67 ± 0.04 b	4.27 ± 0.16 a	-120.7 ± 19.4 h
3N	8.50 ± 0.03 de	0.70 ± 0.02 f	1.47 ± 0.04 ef	11.9 ± 5.9 fg
5N	9.60 ± 0.03 a	1.19 ± 0.06 d	1.74 ± 0.07 e	14.2 ± 5.3 fg
8N	9.01 ± 0.08 b	1.70 ± 0.04 b	1.47 ± 0.08 ef	194.2 ± 12.6 bc
9N	8.30 ± 0.00 e	1.02 ± 0.05 e	2.91 ± 0.07 c	26.2 ± 6.6 f
11N	8.46 ± 0.01 de	1.34 ± 0.04 c	2.59 ± 0.11 cd	22.5 ± 3.9 fg
13N	7.70 ± 0.08 g	0.43 ± 0.03 g	2.29 ± 0.14 d	85.8 ± 27.1 e
17N	7.75 ± 0.09 g	1.98 ± 0.00 a	1.58 ± 0.10 ef	307.5 ± 0.3 a
1S	8.03 ± 0.03 f	1.01 ± 0.02 e	3.92 ± 0.09 ab	108.5 ± 3.3 de
3S	7.78 ± 0.02 fg	1.60 ± 0.04 b	3.57 ± 0.09 b	148.6 ± 6.2 cd
M2	8.88 ± 0.02 bc	1.26 ± 0.00 cd	1.23 ± 0.05 f	271.2 ± 5.9 a
M4	8.87 ± 0.01 bc	0.78 ± 0.00 f	2.36 ± 0.04 d	202.2 ± 6.0 b
M6	8.88 ± 0.01 bc	1.88 ± 0.01 a	3.45 ± 0.11 b	-6.5 ± 8.8 fg
M12	8.85 ± 0.03 bc	0.92 ± 0.01 e	1.20 ± 0.04 f	-26.3 ± 9.7 g

Diferentes letras minúsculas representan diferencias significativas entra los sitios para cada variable en una prueba de ANOVA de una vía seguido de un análisis *post-hoc* de *Tukey* a $p \leq 0.05$.

En lo que respecta a la conductividad eléctrica, los sitios mostraron valores relativamente bajos de C.E (< 2), indicando que no corresponden a suelos salinos. Los valores más altos se registraron en los sitios **17N** con 1.98 dS/ m y **M6** con 1.88 dS/ m, mientras que los menores valores fueron de 0.43, 0.7 y 0.78 dS/ m para los sitios **13N**, **3N** y **4M** respectivamente.

Al igual que las demás variables analizadas, el contenido de materia orgánica mostró gran variación registrándose el valor mínimo en la muestra del sitio **M12** con un porcentaje de 1.2 %. Por el contrario, la mayor cantidad de M.O se obtuvo en el punto **1N**, con 4.27 %.

De todas las variables fisicoquímicas analizadas el potencial redox, fue donde se observaron las mayores diferencias entre los sitios de muestreo. Siendo la muestra **1N** la que resultó más reducida con un valor de -120.7 mV y la muestra **17N** la más oxidada con un valor de 307.5 mV.

6.2 Conteo de bacterias heterótrofas totales de suelo

Se determinó la cantidad total de UFC*g de suelo para las muestras de suelo y sedimento de La Zacatecana (**Figura 8**). La mayor cantidad de bacterias se obtuvo en el sitio **8N** con una concentración de 2.86×10^6 UFC/ g de suelo seguido del sitio **3S** con 1.62×10^6 UFC/ g de suelo; ambos sitios mostraron diferencias significativas respecto a los demás. Por otro lado, la menor concentración de bacterias se presentó en el punto **3N** con 4.4×10^4 UFC/ g de suelo. La concentración de los demás sitios estuvo entre las 3.07×10^5 y 1.14×10^6 UFC/ g de suelo.

6.3 Contenido total de metales pesados en suelo y sedimento

Se determinó la cantidad total de Pb, As, Hg, Cd, Cr y Ni por espectrometría de absorción atómica para cada muestra de suelo. La relación de abundancia de los diferentes metales en el sistema fue el siguiente: **Pb > Cr > As > Ni > Hg > Cd**, siendo el Pb el elemento que se encontró en mayor abundancia en el sistema. Las concentraciones específicas de metales para cada punto de muestreo se especifican en la **Tabla VIII**.

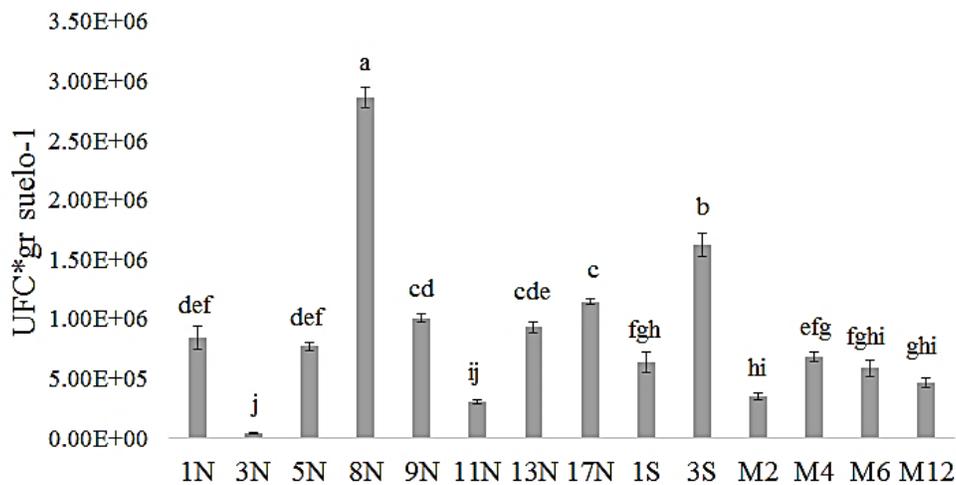


Figura 8. Conteo de bacterias heterotróficas totales de suelo y sedimento de “La Zacatecana”. Diferentes letras minúsculas sobre las barras representan diferencias significativas entre los sitios para una prueba de ANOVA de una vía seguido de un análisis *post-hoc* de Tukey a $p \leq 0.05$.

En lo que respecta a la concentración de **Pb** en el sistema, tres sitios mostraron concentraciones de Pb por encima del máximo permitido por la NOM 147 para este metal en suelos de uso agrícola (i. e., 400 mg/ kg), siendo estos los sitios **1S**, **3S** y **M4**. La mayor acumulación de Pb se registró en el punto **17N** con una concentración de 3069.85 mg/ kg de Pb. Dicha concentración sobrepasa el máximo permitido por la norma mexicana tanto para suelo de uso agrícola, como industrial (i. e., 800 mg/ kg). La menor concentración de Pb fue reportada en el sitio **13N** con 37 mg/ kg.

La concentración de **As** en el sistema mostró diferencias significativas entre los puntos de muestreo, encontrándose la máxima acumulación en el sitio **M4** con 101.46 mg/ kg. Esta concentración sobrepasa lo establecido por la norma para suelos de uso agrícola (i. e., 22 mg/ kg), además del sitio **M4**, los puntos **1N**, **3N**, **17N**, **1S**, **3S** y **M12** mostraron concentraciones por encima de la norma para suelo de uso agrícola. Mientras que la menor concentración de As se registró, al igual que con el Pb, en el sitio **13N** con 9.3 mg/ kg de As.

Tabla VIII. Contenido total de metales de cada punto de muestreo. Los valores en negritas indican concentraciones de metales por encima de los valores máximos permisibles por la NOM 147 SEMARNAT para suelo de uso agrícola. Los valores en rojo señalan una concentración por encima de los máximos permisible para suelo de uso industrial por la misma norma.

Punto de muestreo	Pb	As	Hg	Cd	Cr	Ni
1N	¹ 94.06 ± 4.03 e*	29.93 ± 0.87 cd	38.18 ± 2.87 abc	16.4 ± 0.02 b	74.01 ± 2.44 a	75.85 ± 1.63 a
3N	161.96 ± 42.02 de	26.73 ± 1 de	41.40 ± 10.8 bc	ND	19.32 ± 0.85 efg	19.88 ± 0.99 d
5N	120.90 ± 2.66 de	21.01 ± 1.39 efg	14.89 ± 4.75 bcd	ND	32.22 ± 0.7 d	23.39 ± 1.16 d
8N	71.74 ± 1.83 e	19.42 ± 0.83 fg	18.38 ± 4.27 bcd	20.53 ± 0.05 a	63.5 ± 0.36 b	60.27 ± 0.7 b
9N	59.58 ± 9.43 e	17.18 ± 1.27 g	12.44 ± 6.26 cd	² ND	17.7 ± 0.86 efg	14.67 ± 0.51 e
11N	48.05 ± 4.76 e	15.61 ± 2.1 gh	7.89 ± 3.98 d	ND	22.14 ± 0.59 efg	9 ± 0.13fg
13N	28.5 ± 1.15 e	9.3 ± 1.06 h	7.73 ± 1.28 d	ND	19.43 ± 0.6 efg	9.23 ± 0.18 fg
17N	3069.85 ± 20.31 a	28.01 ± 1.35 cde	10.10 ± 0.28 cd	ND	17.49 ± 1.4 efg	5.66 ± 0.19 g
1S	544.93 ± 44.27 c	35.14 ± 1.21 c	46.83 ± 11.15 a	ND	17.18 ± 1.0 6fg	10.35 ± 0.25 ef
3S	741.72 ± 62.01 b	79.64 ± 1.38 b	47.49 ± 8.18 a	ND	15.42 ± 1.42 g	14.23 ± 0.50 e
M2	88.42 ± 3.2 e	17.62 ± 0.4 g	9.08 ± 0.09 d	ND	24.65 ± 1.02 def	23.76 ± 0.53 d
M4	759.54 ± 71.4 b	101.46 ± 2.76 a	23.62 ± 0.18 abcd	8.49 ± 0.07 c	66.96 ± 3.58 ab	73.81 ± 1.39 a
M6	87.34 ± 6.33 e	17.02 ± 0.8 g	8.26 ± 0.11 d	ND	25.47 ± 0.7 de	22.43 ± 0.24 d
M12	280.04 ± 31.2 d	25.60 ± 1.26 de	12.16 ± 0.26 cd	ND	44.19 ± 0.91 c	41.59 ± 0.68 c

¹Valores establecidos en mg/ kg de suelo seco. ²ND valor debajo del límite mínimo de detección del equipo. *Diferentes letras minúsculas representan diferencias significativas entre los sitios para una prueba de ANOVA de una vía seguido de un análisis *post-hoc* de Tukey a $p \leq 0.05$. Valores máximos permitidos por la NOM-147: Pb 400 mg/ kg, As 22 mg/ kg, Hg 23 mg/ kg, Cd 37 mg/ kg, Cr IV 280 mg/ kg, Ni 1600 mg/ kg..

En cuanto a la concentración de **Hg**, la máxima acumulación fue para los sitios **1S** y **3S** con **46.83** y **47.49** mg/ kg de Hg, respectivamente. En este caso, hubo 4 sitios que sobrepasaron el máximo establecido por la norma para suelos de uso agrícola (22 mg/ kg) los cuales fueron **1S**, **3S**, **1N** y **3N**. La mínima cantidad se registró en los puntos **11N** y **13N**.

Para los metales Cd, Cr y Ni no se registró ningún sitio que sobrepasara los máximos permitidos por la norma mexicana para estos elementos en suelo de uso agrícola e industrial.

6.3.1 Índice de Geo acumulación

Con las concentraciones totales de metales para cada sitio se procedió a calcular el índice de Geo acumulación (o “Igeo Index”) con la **Ecuación 3**. Este índice es utilizado como un estimador del grado de contaminación del suelo. Debido a que para calcular el Igeo Index se utiliza el valor de fondo para cada metal, en el presente estudio se realizaron estimaciones dobles para Pb, As y Hg utilizando los valores de fondo internacionales propuestos por Taylor y McLennan (2001), para Pb (20 ppm), As (1.5 ppm), y por Turekian y Whedepool (1961) para Hg (0.19 ppm). A su vez, se emplearon valores reportados por García-Berumen (2015) para Pb (13 ppm), As (2.7 ppm) y Hg (8 ppm) para un sitio “control” en el estado de Zacatecas en el cual no existen reportes de impacto de actividad minera.

En la **Tabla IX** se muestran los valores de Igeo Index para las muestras de suelo y sedimento de La Zacatecana. En el caso de Pb, el sitio más contaminado corresponde al **17N** con un valor de 6.9 (internacional) y 7.3 (nacional) los cuales al comparar valores con los de tablas (**Tabla IV**), indican que es un punto extremadamente contaminado. En el caso de As, los sitios más contaminados corresponden a los puntos **M4** y **3S**, con valores de 5.5, 5.1 (internacional), y 4.66 y 4.31 (nacional), respectivamente.

El Igeo Index para Hg muestra grandes diferencias al comparar los resultados obtenidos con diferentes valores de referencia. Siendo los sitios **1S** y **3S** los más contaminados con in Igeo de 7.4 al calcular con el valor de referencia internacional, mientras que, al calcular con el valor de referencia interno, el Igeo calculado disminuyó considerablemente a 1.94 y 1.96, respectivamente.

Tabla IX. Valores de los Igeo Index de suelo y sedimento de la presa de La Zacatecana. **A)** Índices calculados utilizando los valores de referencia internacionales. **B)** Índices calculados utilizando los valores de referencia obtenidos por García-Berumen (2015) para Pb, As y Hg.

Índice de Geo Acumulación (Igeo Index)									
Sitio	A						B		
	Pb	As	Hg	Cd	Cr	Ni	Pb	As	Hg
1N	1.9	3.7	7.1	3.6	-0.6	0.3	2.27	2.9	1.64
3N	2.7	3.6	7.2	ND	-2.5	-1.6	3.05	2.74	1.76
5N	2.2	3.2	5.7	ND	-1.8	-1.4	2.63	2.39	0.28
8N	1.5	3.1	6	3.9	-0.8	0	1.88	2.28	0.59
9N	1.2	2.9	5.4	ND	-2.6	-2	1.61	2.1	0.03
11N	0.9	2.8	4.8	ND	-2.3	-2.7	1.3	1.96	-0.63
13N	0.2	2	4.8	ND	-2.5	-2.7	0.55	1.22	-0.66
17N	6.9	3.6	5.1	ND	-2.7	-3.4	7.3	2.81	-0.28
1S	4.4	4	7.4	ND	-2.7	-2.5	4.8	3.13	1.94
3S	4.9	5.1	7.4	ND	-2.8	-2.1	5.25	4.31	1.96
M2	1.8	3	5	ND	-2.2	-1.3	2.18	2.14	-0.43
M4	4.9	5.5	6.4	2.6	-0.7	0.3	5.28	4.66	0.95
M6	1.8	2.9	4.9	ND	-2.1	-1.4	2.16	2.09	-0.57
M12	3.5	3.5	5.4	ND	-1.3	-0.5	3.84	2.68	-0.01

Igeo <0 = suelo no contaminado

Igeo 4> = suelo fuertemente contaminado

En el caso del Cd solo se obtuvieron valores de Igeo en los sitios **1N**, **8N** y **M4**, los cuales entran en la clasificación “4” de tablas, indicando un nivel de contaminación de moderado a fuerte. Para Cr y Ni, los valores de Igeo obtenidos fueron negativos, lo cual indica que no hay contaminación por estos elementos en el lugar.

6.3.2 Índice de Riesgo Ecológico Potencial

Al igual que el Igeo, se calculó el Índice de Riesgo Ecológico Potencial (E_{RI}) utilizando los valores de referencia internacionales e internos (**Tabla X**). Al utilizar los valores de referencia internacionales, todos los sitios mostraron valores de E_{RI} muy por encima de los establecidos por la **Tabla V** para sitios con alto riesgo (i.e., $E_{RI} > 300$). En cambio, al obtener los E_{RI} utilizando los valores de referencia internos solamente los sitios **1N**, **3N**, **8N**, **17N**,

1S, 3S y M4 mostraron E_{RI} considerados de alto riesgo. Siendo el sitio **17N** el más alto, con un valor de 1336.4.

Tabla X. Índice de Riesgo Ecológico Potencial calculado para muestras de suelo y sedimento de La Zacatecana. **A)** Índices calculados utilizando los valores de referencia internacionales. **B)** Índices calculados utilizando los valores de referencia obtenidos por (García 2015) para Pb, As y Hg.

Sitio	Índice de Riesgo Ecológico Potencial (E_{RI})	
	A	B
1N	8822.6	893.9
3N	8944.0	368.6
5N	3313.5	202.0
8N	4713.8	884.2
9N	2754.0	150.6
11N	1781.7	117.4
13N	1699.4	85.4
17N	3216.8	1336.4
1S	10255.2	572.8
3S	10748.5	818.8
M2	2058.2	148.2
M4	6167.3	1082.2
M6	1880.5	141.3
M12	2819.4	269.7

6.3.3 Correlación bivariada de los metales pesados analizados

Se realizó una prueba de correlación de *Spearman* para determinar si los metales pesados presentes en el suelo podrían provenir del mismo origen. En la **Tabla XI**, se muestran los coeficientes de correlación entre los diferentes metales. Se presentó una correlación significativa entre el Pb, As y Hg al igual que entre el Cd, Cr y Ni. La **Figura 9** corresponde a un correlograma, donde se aprecia la formación de dos grupos de correlación diferentes.

Tabla XI. Coeficiente de correlación entre los diferentes metales analizados

Variables	Pb	As	Hg	Cd	Cr	Ni
Pb	1					
As	0.861	1				
Hg	0.522	0.591	1			
Cd	-0.109	0.239	0.229	1		
Cr	-0.191	0.008	0.015	0.739	1	
Ni	0.119	0.320	0.260	0.729	0.857	1

Los valores en negrita son diferentes de 0 con un nivel de significación alfa ≤ 0.05

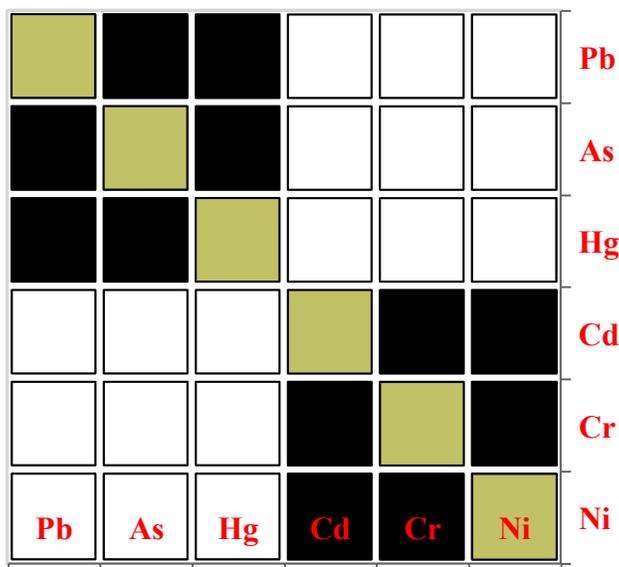


Figura 9. Correlograma de concentraciones de metales pesados en suelo y sedimento de la presa La Zacatecana. El color negro representa correlaciones positivas, mientras que el color arena representa la diagonal.

6.4 Mapas de dispersión de metales

Con las concentraciones totales de metales pesados analizados, se realizaron mapas de isocurvas de dispersión de metales los cuales se presentan en la **Figura 10**.

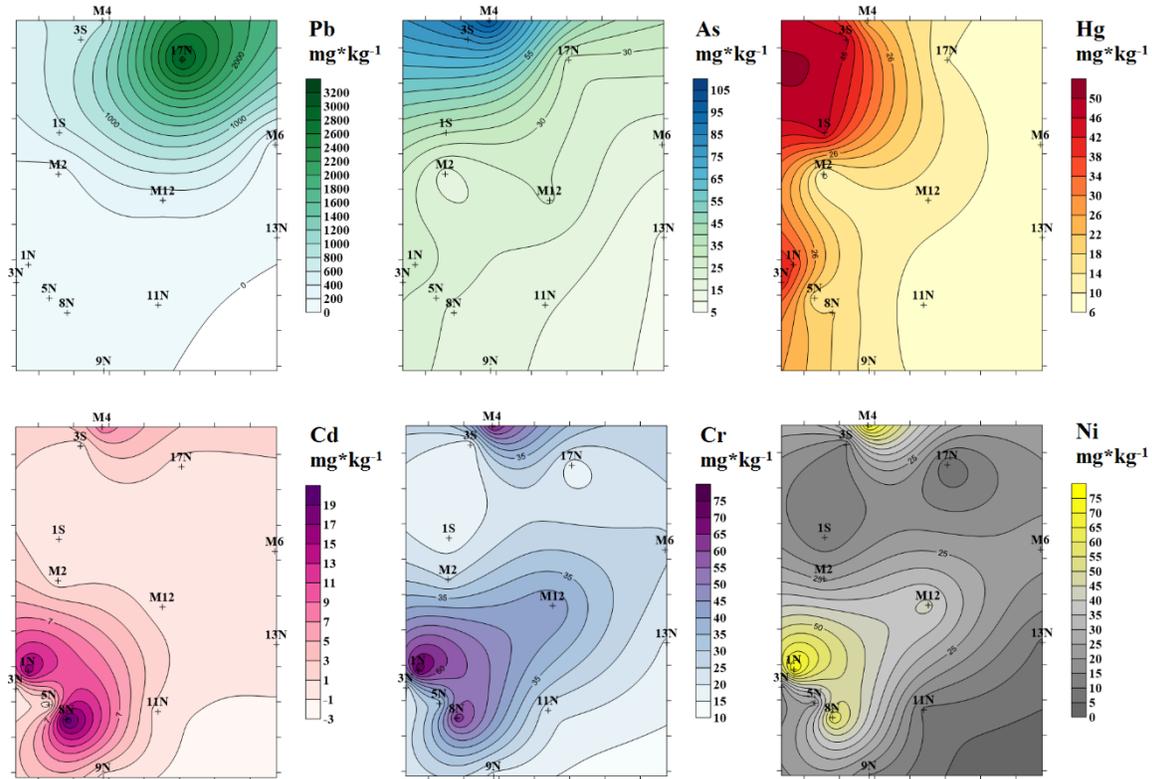


Figura 10. Dispersión superficial de los diferentes metales en suelo y sedimento de la laguna de La Zacatecana. Los valores están expresados en mg/kg de suelo seco.

La dispersión de metales en suelo mostró un patrón similar para Pb, As y Hg, indicando una mayor acumulación de metales en la zona norte-noroeste y disminuyendo hacia la zona sur-sureste de la laguna. Para los metales Cd, Cr y Ni la acumulación de metales se presentó en la parte suroeste, específicamente en los puntos **1N** y **8N**, aunque también se aprecia en la figura una acumulación de metales en la zona norte en el punto **M4**. Los mapas de distribución de metales coinciden con las pruebas de correlación de *Spearman*, donde se aprecia que los metales forman dos grupos, uno en el que se encuentran el Pb, As y Hg y otro con el Cd, Cr y Ni.

6.5 Extracción secuencial Pb en suelo

Debido a que el Pb es el metal que se encontró en mayor proporción en el sitio, se procedió a realizar una extracción secuencial de este elemento en las muestras de suelo para determinar su biodisponibilidad.

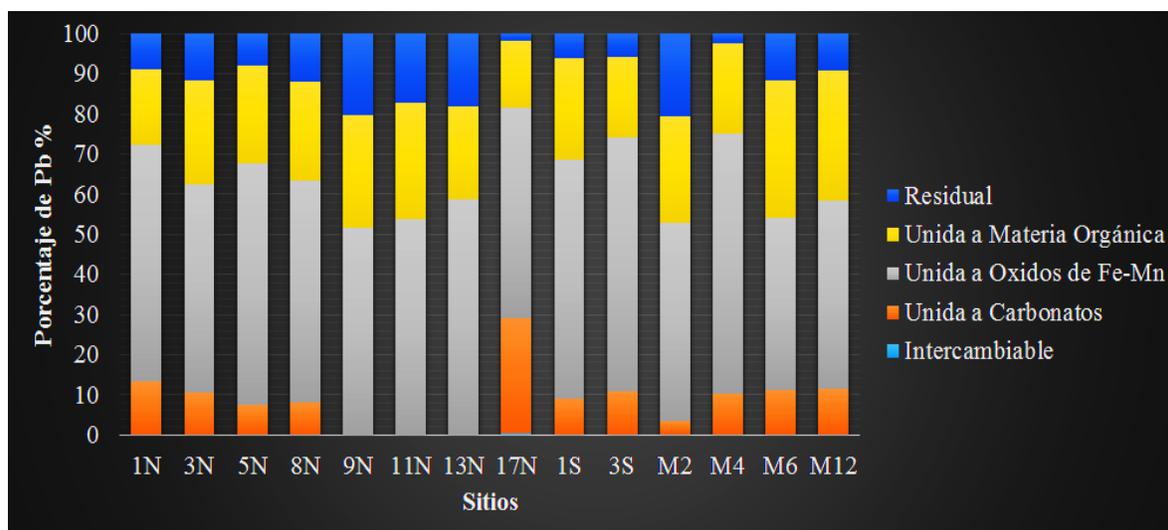


Figura 11. Extracción secuencial de Pb por el método de 5 pasos de Tessier *et al.* (1979). Los valores de la gráfica están expresados en porcentaje. Los porcentajes de cada fracción corresponden a la media de tres mediciones independientes.

El porcentaje de acumulación de Pb por fracción en el sistema fue la siguiente: $F3 > F2 \sim F4 > F5 > F1$ Siendo la F3 o fracción unida a óxidos de Fe-Mn la que obtuvo el mayor porcentaje de acumulación, mientras que la F1, o fracción intercambiable, fue la que mostró el menor porcentaje.

Cabe mencionar que solamente la muestra **17N** mostró acumulación de Pb en la fracción F1 o intercambiable con un porcentaje del 0.27 % del total de Pb en ese sitio. La fracción F2 o unida a carbonatos fue la segunda de todas las fracciones que acumuló mayor porcentaje de Pb, aunque no hubo registro de esta para los sitios **9N**, **11N** y **13N**. En la **Figura 11** se muestra la gráfica con los porcentajes de Pb por fracción para cada sitio de muestreo.

6.5.1 Factor de movilidad

A partir de la extracción secuencial de Pb se procedió a determinar el factor de movilidad de este elemento en las muestras de La Zacatecana. El factor de movilidad se calculó con la **Ecuación 6** y representa el porcentaje de Pb de la muestra que pudo movilizarse y entrar a la cadena trófica. En la **Figura 12**, se muestra el factor de movilidad de Pb para cada sitio específico.

Las muestras **9N**, **11N** y **13N** no presentaron este valor, pues no se registró la presencia de Pb en sus fracciones F1 y F2. El sitio que presentó el factor de movilidad más alto fue **17N** con un valor de 29.24%. Los demás sitios mostraron valores variables entre 3.58%, para el sitio **M2** y 13.21%, para el sitio **1N**.

El factor de movilidad de la muestra **17N** significa que la cantidad de plomo que podría movilizarse bajo diferentes circunstancias específicas podría alcanzar hasta los 920.95 mg/kg. Lo cual se encuentra por encima del máximo establecido por la NOM-147 para suelos destinados a actividad agrícola e industrial.

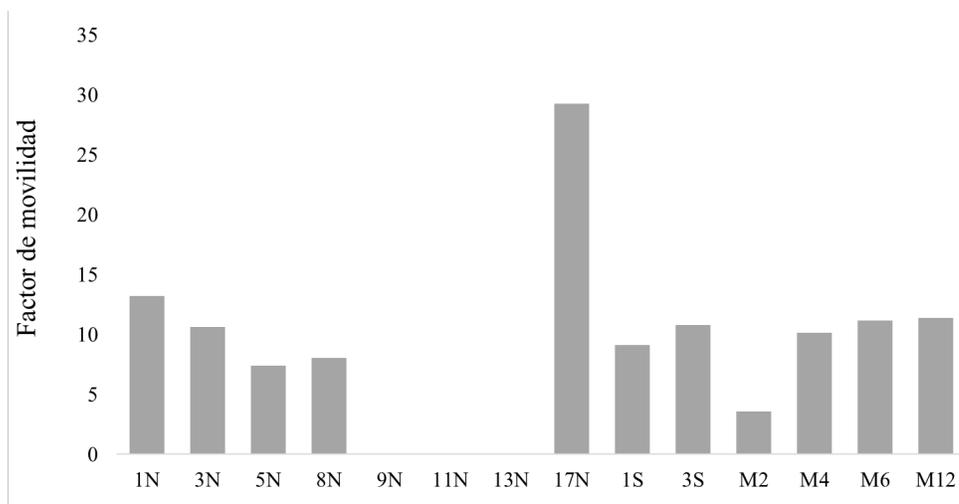


Figura 12. Factor de movilidad de Pb en muestras de suelo y sedimento de la presa de La Zacatecana.

6.6 Análisis de componentes principales

Se realizó un análisis de componentes principales (ACP) con los resultados de las variables fisicoquímicas y el contenido de metales de cada punto de muestreo. En la **Figura 13**, se muestra el resultado para este análisis. Al considerar las variables fisicoquímicas y el contenido de metales pesados, el ACP explica el 52.4 % de la variabilidad de las muestras (**Figura 13a**). En el análisis se observa una correlación positiva entre el Pb y el potencial redox como a su vez una relación negativa de estas variables con el pH. También se observa una correlación positiva entre el contenido de Cd, Cr y Ni. En lo que respecta a las demás variables, se muestra una correlación positiva entre el contenido de As y Hg con el porcentaje de MO, el número de bacterias y la CE del suelo. Sin embargo, la longitud de los vectores en la **Figura 13a** para estas variables indica que no se encuentran bien representadas comparadas con las demás variables en los factores F1 y F2 que se utilizaron para hacer la gráfica.

Al realizar un ACP considerando solamente el contenido de metales en las muestras, el porcentaje de variabilidad explicado aumentó al 74.41% (**Figura 13b**). En el análisis se aprecia que Cd, Cr y Ni guardan una fuerte correlación positiva. Por otra parte, el análisis indica que a su vez el contenido de As y Hg se encuentran correlacionados entre ellos y en menor medida con el Pb. Se realizó también una ACP de las variables fisicoquímicas y la extracción secuencial de Pb (**Figura 13c**), en la figura, se observa que el pH y la materia orgánica son las variables que tienen más influencia en la disponibilidad del Pb en La Zacatecana. El análisis explicó el 68.28% de la variabilidad.

6.7 Composición química del suelo por fluorescencia de rayos X (FRX)

Se determinó la composición del suelo del sitio 17N por fluorescencia de rayos X. Se eligió este punto por ser el más contaminado, además de mostrar el factor de movilidad más alto de Pb. El análisis mostró un alto contenido de oxígeno debido a que la mayoría de los metales se encuentran en forma de óxidos, siendo las fracciones mayoritarias: O_2 , Al_2O_3 , Fe_2O_3 , pirofosfato inorgánico (PPi) y CaO equivalentes a 51.83, 10.94, 9.6, 7.67, 6.24% respectivamente (**Tabla XII**). Otros 14 compuestos se encontraron en proporciones por debajo 5%, entre los que destaca el PbO con un porcentaje 1.81%.

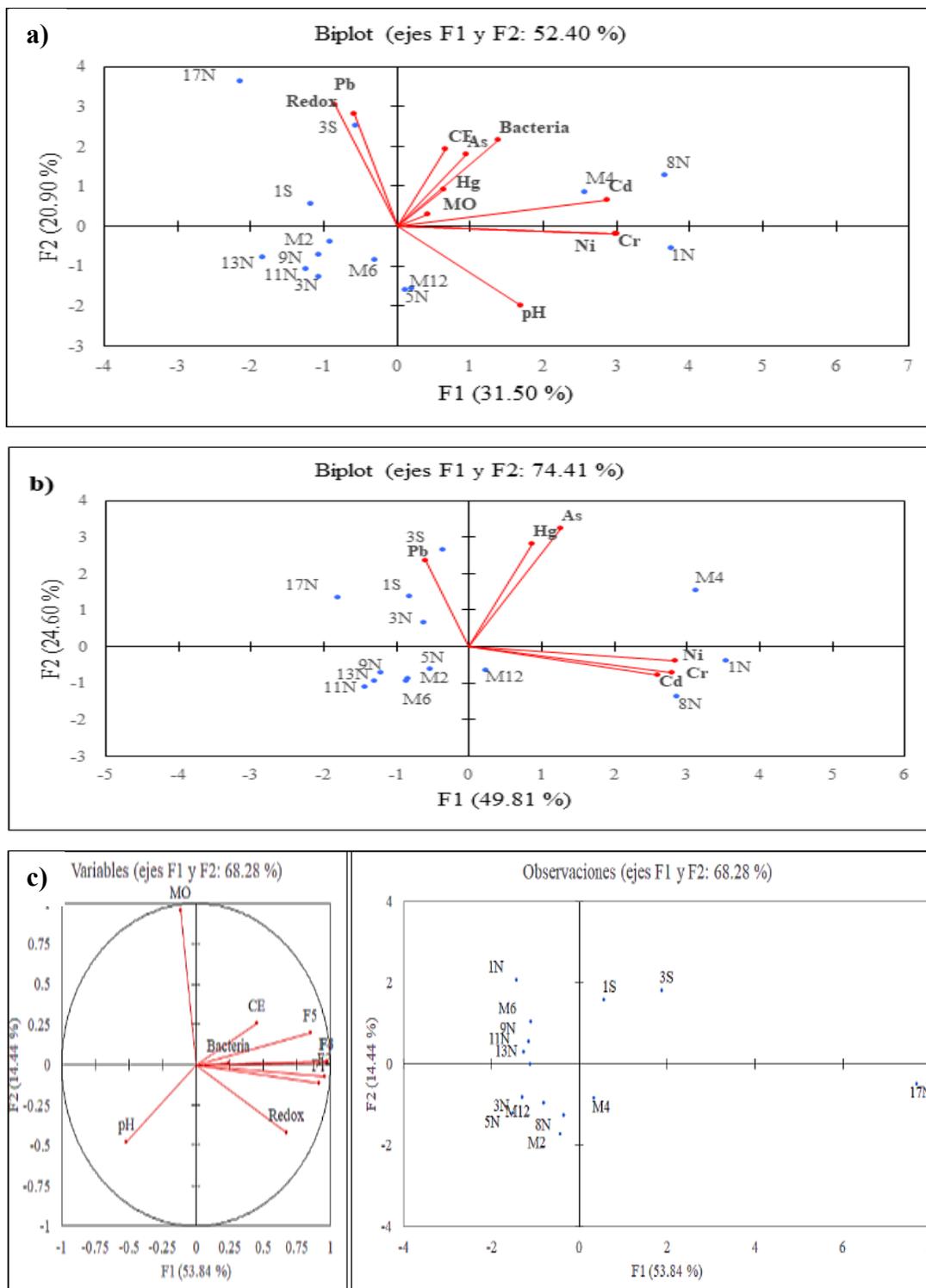


Figura 13. Análisis de Componentes Principales (ACP). **a)** Grafica de observaciones de las propiedades fisicoquímicas y el contenido total de metales pesados. **b)** Grafica de observaciones del contenido de metales pesados y **c)** Graficas de correlación y de observaciones de las variables fisicoquímicas y la extracción secuencial de Pb.

Tabla XII. Composición química del suelo del sitio 17N identificado como de alta contaminación por metales y analizado por espectrometría de fluorescencia de rayos X (FRX).

Compuesto	Masa
SiO ₂	51.83 %
Al ₂ O ₃	10.94 %
Fe ₂ O ₃	9.60 %
PPi	7.67 %
CaO	6.24 %
SO ₃	4.04 %
K ₂ O	2.77 %
MgO	1.82 %
PbO	1.81 %
ZnO	1.14 %
TiO ₂	0.69 %
Na ₂ O	0.35 %
BaO	0.32 %
MnO	0.27 %
P ₂ O ₅	0.25 %
CuO	0.21 %
SrO	0.02 %
ZrO ₂	0.02 %
NiO	0.01 %

6.8 Análisis microbiológico

6.8.1 Caracterización de los aislados bacterianos

Se obtuvieron, en primera instancia, 150 aislados bacterianos de muestras de suelo, sedimento y rizósfera provenientes de diferentes puntos de la laguna La Zacatecana con la capacidad de crecer en agar nutritivo suplementados con 0.5 mM de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$. A partir de dichos aislados, se seleccionaron aquellos que mostraron diferentes morfologías coloniales, a los cuales se les realizaron pruebas bioquímicas, de promoción de crecimiento vegetal, y moleculares, para reducir la selección a un total de 26 aislados. En la **Tabla XIII** se muestran un resumen de los resultados de las características de promoción de crecimiento encontradas en los aislados.

Seis aislados resultaron positivos a la prueba de solubilización de fosfato; las cepas más destacadas fueron *Pseudomonas* sp. 52 (278.9 mg/ L), y *Pseudomonas* sp. M1.5 (113.7 9 mg/ L). Cabe mencionar que la mayoría de las cepas que mostraron esta capacidad pertenecen al género *Pseudomonas*, a excepción del aislado *Enterobacter* sp. BS6, el cual fue también el que solubilizó la menor cantidad de fosfato con 2.1 mg/ L.

Se obtuvieron 8 cepas productoras de sideróforos, todas pertenecientes al género *Pseudomonas*. Los aislados que mostraron la mayor producción fueron *Pseudomonas* sp. 52 y *Pseudomonas* sp. M3A.6 con 49.23 y 49.63 μM DFOM respectivamente. La menor cantidad de sideróforos se reportó para el aislado *Pseudomonas* sp. M3A.4 con 17.02 μM DFOM. Los sideróforos producidos por los aislados corresponden al tipo hidroxamato.

Se obtuvieron 8 cepas con la capacidad de producir ácido indol acético (AIA) de las cuales 5 pertenecientes al género *Pseudomonas* (M1.5, M1.12, M3A.6, 1, 12), produjeron la menor cantidad de AIA en las cepas analizadas, dentro de un rango de 2.7 a 5.39 $\mu\text{g/ mL}$. Las cepas que presentaron la mayor producción de AIA fueron *Enterobacter* sp. BS6 con 47.5 $\mu\text{g/ mL}$ y *Arthrobacter* sp. RQL7 con 40.9 $\mu\text{g/ mL}$.

No se encontró la presencia del gen de la nitrogenasa (*nifH*) en los aislados analizados. Únicamente el aislado *Agrobacterium* sp. 26 amplificó un fragmento de ADN del tamaño del correspondiente a *nifH*.

Tabla XIII. Características de promoción de crecimiento vegetal y tolerancia a Pb de las cepas bacterianas aisladas de suelo y sedimentos de la laguna La Zacatecana.

Cepa	Solubilización de Pi (mg/ L)	Producción de sideróforos (μ M DFOM)	Producción de AIA (μ g/ mL)	Tolerancia a 0.5 mM de $Pb(NO_3)_2$
<i>Pseudomonas</i> sp. 52	278.9 \pm 11.5	49.23 \pm 1.2	-	+
<i>Pseudomonas</i> sp. M1.5	113.7 \pm 1.53	-	2.7 \pm 0.6	+
<i>Pseudomonas</i> sp. M1.7	88.6 \pm 3.48	-	-	+
<i>Pseudomonas</i> sp. M1.12	-	17.24 \pm 1.8	5.39 \pm 1.5	+
<i>Pseudomonas</i> sp. M.20	114.1 \pm 4.2	51.25 \pm 0.9	-	+
<i>Pseudomonas</i> sp. 68	-	-	-	+
<i>Pseudomonas</i> sp. 69	-	-	-	+
<i>Pseudomonas</i> sp. M1.10	57.3 \pm 13.6	-	-	+
<i>Pseudomonas</i> sp. M3A.4	-	17.02 \pm 0	-	+
<i>Pseudomonas</i> sp. M3A.6	-	49.63 \pm 0.35	5.06 \pm 1.8	+
<i>Pseudomonas</i> sp. 1	-	26.56 \pm 0.7	5.2 \pm 0.3	+
<i>Pseudomonas</i> sp. 12	-	26.56 \pm 0.35	4.6 \pm 0.6	+
<i>Pseudomonas</i> sp. 16	-	28.56 \pm 0.35	-	+
<i>Enterobacter</i> sp. BS6	2.1 \pm 0.5	-	47.5 \pm 6.9	+
<i>Agrobacterium</i> sp. 26	-	-	-	+
<i>Ochrobactrum</i> sp. M1.2	-	-	-	+
<i>Bacillus megaterium</i> 57	-	-	-	+
<i>Bacillus</i> sp. M3A.1	-	-	-	+
<i>Bacillus pumilus</i> 72	-	-	-	+
<i>Rhodococcus</i> sp. MR3.18	-	-	-	+
<i>Rhodococcus</i> sp. MR3.17	-	-	-	+
<i>Kokuria</i> sp. 65	-	-	-	+
<i>Arthrobacter</i> sp. RQL7	-	-	40.9 \pm 7.9	+
<i>Microbacterium</i> sp. 39	-	-	-	+
<i>Microbacterium</i> sp. 40	-	-	7.4 \pm 2.4	+
<i>Microbacterium</i> sp. 43	-	-	5.6 \pm 1.8	+

Adicionalmente se observó que la cepa *Rhodococcus* sp. MR317 mostró un cambio de color significativo como respuesta a la presencia de diferentes concentraciones de $Pb(NO_3)_2$ en el medio (**Figura 14**). El cambio en el color de la biomasa bacteriana, se presentó mediante un oscurecimiento de rosa a café correspondiente al aumento en la concentración de $Pb(NO_3)_2$ (i. e., 0, 0.5 y 1.0 mM).



Figura 14. *Rhodococcus sp.* MR317 creciendo en agar nutritivo suplementado con diferentes concentraciones de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$: **a)** 0 mM **b)** 0.5 mM **c)** 1.0 mM.

6.8.2 Identificación molecular de los aislados

Se identificaron molecularmente los aislados mediante la secuenciación del gen 16S de ARN ribosomal, logrando identificar a nivel de género todos los aislados. Se encontraron 9 géneros diferentes los cuales fueron: *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Agrobacterium*, *Ochrobactrum*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Kokuria*, *Arthrobacter* y *Microbacterium*. Los 9 géneros estuvieron distribuidos en 4 phylas distintos los cuales fueron: γ -proteobacteria, α -proteobacteria, firmicutes y actinobacterias. La **Figura 15** muestra el árbol filogenético de los aislados realizado mediante el método de máxima verosimilitud con un análisis de bootstrap de 1000 réplicas.

6.9 Ensayos *in vitro* de promoción de crecimiento vegetal

Como criterio de selección para los aislados a utilizar en los tratamientos de fitorremediación se realizó un ensayo *in vitro* de promoción de crecimiento vegetal, utilizando la planta modelo *A. thaliana* ecotipo Col-0 creciendo en medio MS suplementado con 0.5 mM de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$. En el ensayo se determinó la producción de biomasa aérea y radicular de los diferentes tratamientos inoculados con bacterias. Los resultados de este ensayo se presentan en la **Figura 16**.

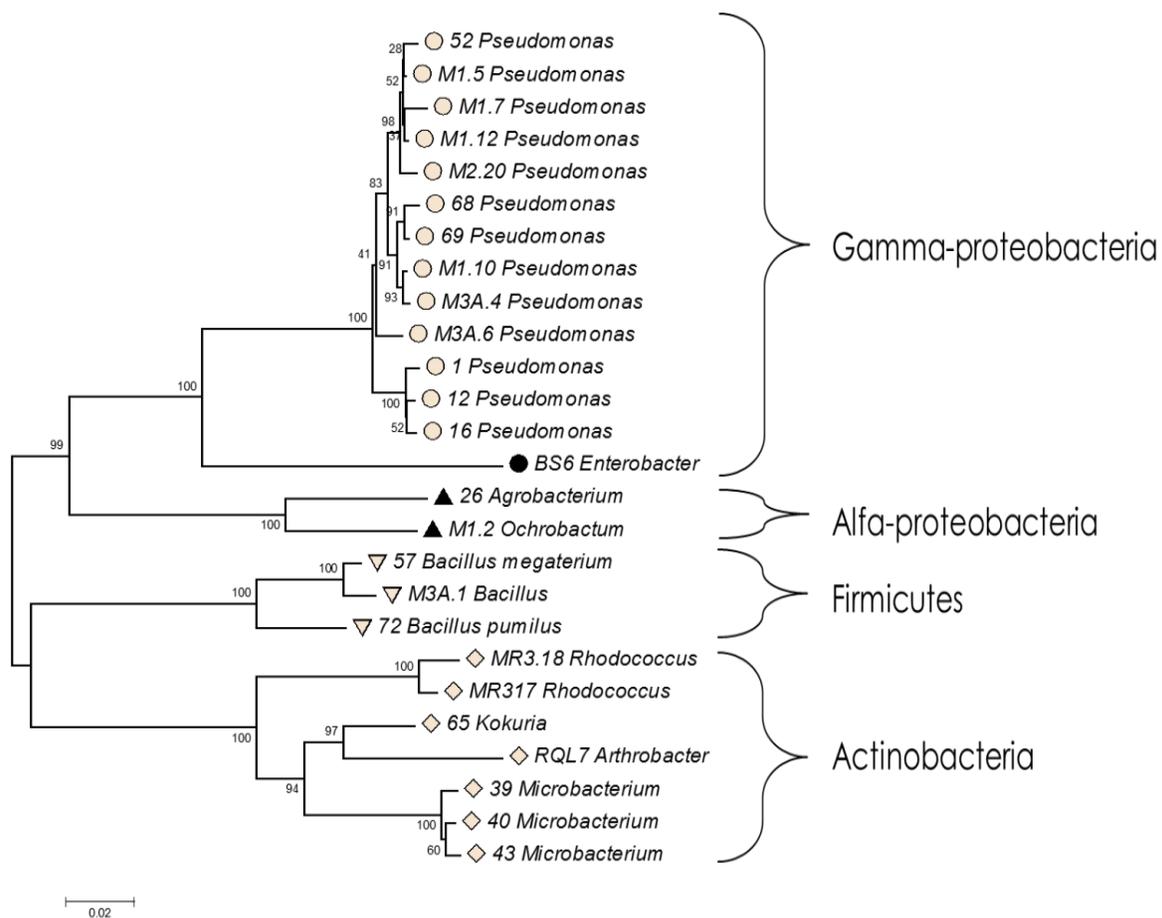


Figura 15. Árbol filogenético de bacterias promotoras de crecimiento vegetal tolerantes a Pb obtenidas en este estudio. Árbol inferido por el análisis del gen 16S ARNr mediante el método de máxima verosimilitud. Los números mostrados sobre las ramas indican el porcentaje de recuperación del nodo para 1000 bootstrap. Las figuras antes de los nombres indican diferentes phylas: ○ , ● Gamma-proteobacteria; ▲ Alfa-proteobacteria; ▽Firmicutes; ◇Actinobacteria.

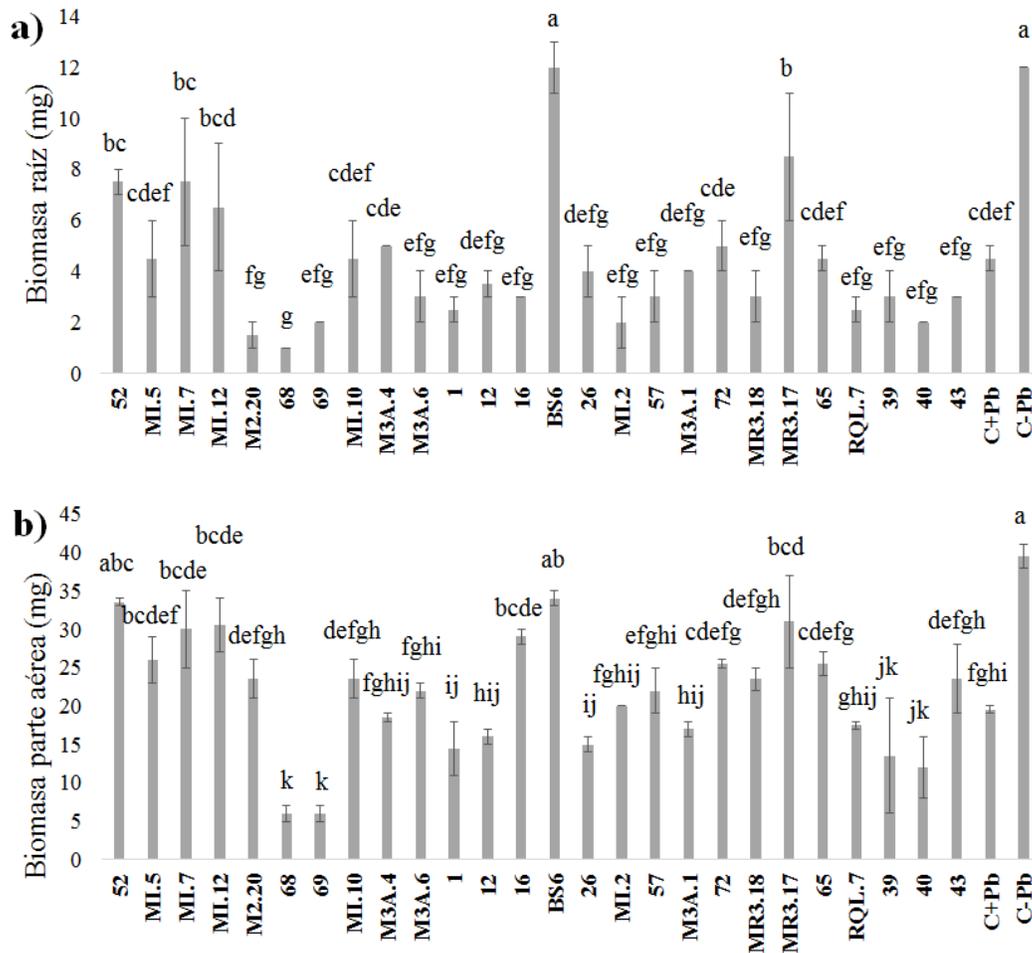


Figura 16. Ensayo *in vitro* de promoción de crecimiento vegetal. Los resultados indican: **a)** biomasa radicular, y **b)** biomasa aérea. Los tratamientos C + Pb y C - Pb corresponden a los controles sin inocular, en suelo contaminado con Pb y sin Pb, respectivamente. Diferentes letras minúsculas representan diferencias significativas para una prueba de ANOVA de una vía seguido de un análisis *post-hoc* de Fisher (LSD) a $p \leq 0.05$.

Los tratamientos donde se presentó una mayor acumulación de biomasa radicular corresponden al control sin Pb (C-Pb) y a plantas inoculadas con *Enterobacter* sp. BS6 seguidos de aquellas tratadas con *Rhodococcus* sp. MR317 y los aislados correspondientes al género *Pseudomonas* sp. 52, M1.5, M1.7 y M1.2. Todos los tratamientos mencionados acumularon una biomasa significativamente mayor que la del control adicionado con Pb (C + Pb). Por el contrario, los tratamientos inoculados con *Pseudomonas* sp. 68 y *Pseudomonas* sp. 69 tuvieron un efecto negativo en el crecimiento de la planta, ocasionando una producción de biomasa menor a la del tratamiento C + Pb (**Figura 16a**).

Al igual que en la biomasa radicular, el C-Pb fue el tratamiento donde se produjo más biomasa para la parte aérea de la planta. Éste fue seguido de *Enterobacter* sp. BS6, *Pseudomonas* sp. 52 y *Rhodococcus* sp. MR317. A su vez, *Pseudomonas* sp. 68 y *Pseudomonas* sp. 69 también ocasionaron un efecto negativo en el desarrollo de la parte aérea de la planta al ser los tratamientos donde se acumuló la menor cantidad de biomasa.

6.10 Ensayo de germinación con *A. palmeri* y *H. annuus*

A partir de los ensayos *in vitro* con *A. thaliana* se seleccionaron las cepas *Pseudomonas* sp. 52, *Enterobacter* sp. BS6 y *Rhodococcus* sp. MR317 para utilizarlas como inóculos microbianos y evaluar los procesos de fitorremediación asistida por microorganismos.

Antes, se realizó un ensayo de germinación utilizando las plantas y las cepas seleccionadas. En dicho ensayo se determinó el efecto de los diferentes aislados seleccionados sobre el porcentaje de germinación y en la elongación de la radícula *H. annuus* y *A. palmeri*. Los resultados del ensayo de germinación se aprecian en la **Tabla XVI**.



Figura 17. *Amaranthus palmeri* S. Wats. Una de las especies vegetales seleccionadas en este estudio para realizar ensayos de fitorremediación de suelo contaminado con Pb proveniente de La Zacatecana

Tabla XIV. Efecto de los aislados en el porcentaje de germinación y longitud de la radícula de *Helianthus. annuus* y *Amaranthus. palmeri*.

Tratamiento	% de germinación		Longitud de la radícula (cm)	
	<i>H. annuus</i>	<i>A. palmeri</i>	<i>H. annuus</i>	<i>A. palmeri</i>
Control	77.7	56.56	0.47 ± 0.08a	1.33 ± 0.1a
<i>Pseudomonas</i> sp. 52	16.6	8.3	0.33 ± 0.17a	0.58 ± 0.24b
<i>Rhodococcus</i> sp. MR317	100	46.37	0.69 ± 0.12a	1.45 ± 0.13a
<i>Enterobacter</i> sp. BS6	50	55.84	0.66 ± 0.14a	1.54 ± 0.11a

La cepa *Rhodococcus* sp. MR317 mostró un porcentaje de germinación de 100 % en *H. annuus*, el cual fue mayor a lo obtenido en el tratamiento control (77.7%). *Enterobacter* sp. BS6 mostró un porcentaje de germinación de 50 % mientras que el aislado *Pseudomonas* sp. 52 obtuvo el menor porcentaje (16.6%). No se observaron diferencias significativas en la longitud de la radícula por efecto de los diferentes tratamientos.

En el caso de *A. palmeri*, el tratamiento control fue donde se obtuvo el mayor porcentaje de germinación (56.56 %), mientras que en los tratamientos inoculados con las cepas *Enterobacter* sp. BS6, *Rhodococcus* sp. MR317 y *Pseudomonas* sp. 52 se obtuvieron porcentajes de 55.84, 46.37 y 8.3 % respectivamente. En cuanto al crecimiento radicular no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos, a excepción de *Pseudomonas* sp. 52 donde se reportó un crecimiento significativamente menor de la radícula.

6.11 Ensayo de fitorremediación asistida por microorganismos

Se determinó el efecto de los diferentes tratamientos sobre la altura, índice de contenido de clorofila (CCI), biomasa aérea y radicular, así como en la acumulación de Pb en hoja, tallo y raíz de *H. annuus* y *A. palmeri*. El ensayo se realizó en un cuarto de crecimiento vegetal, utilizando como sustrato suelo proveniente del sitio 17N de la laguna de la Zacatecana. Las propiedades fisicoquímicas de este suelo se muestran en la **Tabla XV**.

Tabla XV. Propiedades fisicoquímicas del suelo de sitio 17N

Parámetro	Valores
<i>Tipo de Suelo</i>	Franco
<i>pH</i>	7.01
<i>Conductividad Eléctrica</i>	1.98 dS/ m
<i>Contenido de Materia Orgánica</i>	2.10 %
<i>N-Inorg</i>	10.1 ppm
<i>Fosforo disponible (P-Bray)</i>	38.1 ppm
<i>Potasio</i>	438 ppm
<i>Calcio</i>	7460 ppm
<i>Magnesio</i>	561 ppm
<i>Sodio</i>	190 ppm
<i>Hierro</i>	6.34 ppm
<i>Capacidad de Intercambio Catiónico</i>	43.9

6.11.1 Efecto de los tratamientos en la altura, contenido de clorofila y la acumulación de biomasa en las especies vegetales

No se encontraron diferencias significativas en la altura de *H. annuus* por efecto de los diferentes tratamientos (**Figura 18a**). Se presentó un comportamiento similar en los resultados correspondientes a contenido de clorofila (CCI) donde sólo el tratamiento inoculado con *Pseudomonas* sp. 52 y adicionado con EDDS mostró un menor CCI respecto a los demás tratamientos (**Figura 18b**). Por el contrario, en el caso de *A. palmeri* el tratamiento *Enterobacter* sp. BS6 + EDDS fue donde se registraron los mayores valores de la altura de la planta y el CCI, siendo significativas las diferencias con respecto al control (**Figura 18c**). Los demás tratamientos también mostraron valores promedios más altos que los controles. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas a $p \leq 0.05$.

Se observó un efecto en la acumulación de biomasa de los diferentes tratamientos para *H. annuus*, encontrando una menor acumulación en los tratamientos con EDDS, tanto en la parte radicular como aérea de la planta (**Figura 19a, b**). Mientras, en *A. palmeri* el tratamiento donde se obtuvo la mayor acumulación de biomasa radicular correspondió al inoculado con

la cepa *Enterobacter* sp. BS6, mostrando diferencias significativas con los demás tratamientos. No se observaron diferencias entre tratamientos sobre la biomasa en la parte aérea de *A. palmeri*.

6.11.2 Efecto en la acumulación de Pb en diferentes tejidos de *H. annuus* y *A. palmeri*

La acumulación de Pb en *H. annuus* mostró un comportamiento variable (**Tabla XVI**). La mayor acumulación de Pb en tejido foliar se observó en los tratamientos con EDDS añadido. Aunque no se encontraron diferencias significativas entre éstos, se encontraron concentraciones en un intervalo entre 17.99 y 23.46 mg/ kg de Pb para los tratamientos MR317 EDDS y Control EDDS respectivamente. Los tratamientos donde no se agregó EDDS mostraron la menor acumulación de Pb. No se detectó presencia de Pb en los tratamientos inoculados con la mezcla de *Rhodococcus* sp y *Enterobacter* sp.

Para el tallo en *H. annuus* solamente se registró acumulación de Pb en los tratamientos donde se agregó EDDS, siendo el consorcio 52 + MR317 donde hubo la mayor concentración de Pb con 42.51 mg/ kg de Pb. Por otra parte, la menor acumulación se observó al inocular únicamente a *Rhodococcus* sp. MR317, con 15.55 mg/ kg.

En general, la mayor acumulación de Pb en *H. annuus* ocurrió en el tejido radicular de la planta, donde los valores variaron entre 141.69 mg/ kg y 308.61 mg/ kg. Los tratamientos donde se acumuló la menor cantidad de Pb fueron aquellos en los que las plantas se inocularon con *Rhodococcus* sp. MR317 y consorcio 52 + MR317.

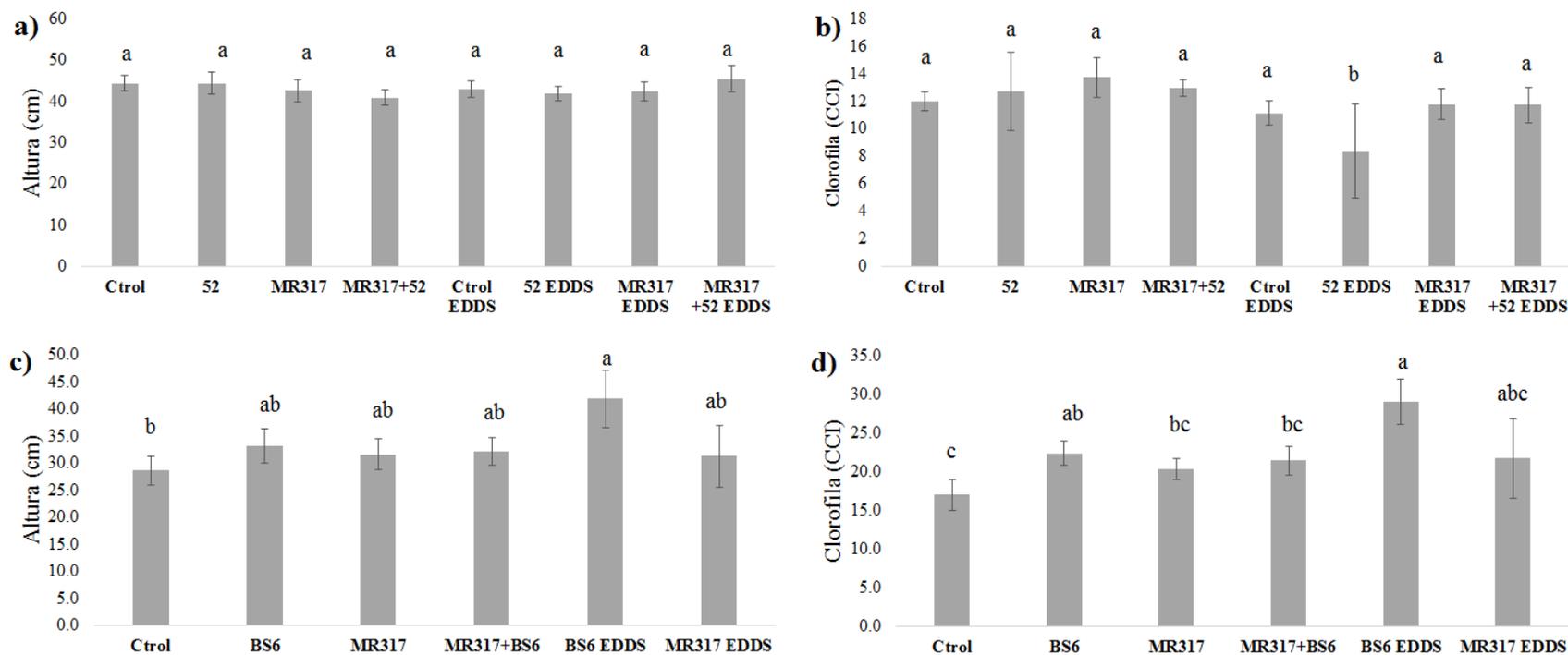


Figura 18. Efecto en la altura y en el índice de contenido de clorofila (CCI) de los diferentes tratamientos. **a)** Altura en *H. annuus*; **b)** CCI en *H. annuus*; **c)** altura en *A. palmeri*, y **d)** CCI en *A. palmeri*. Diferentes letras minúsculas sobre las barras representan diferencias significativas entre tratamientos con una prueba de ANOVA de una vía seguido de un análisis *post-hoc* de Fisher (LSD) a $p \leq 0.05$

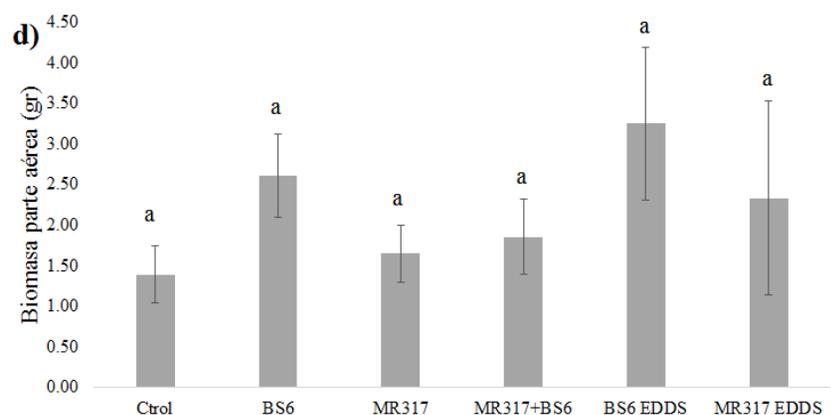
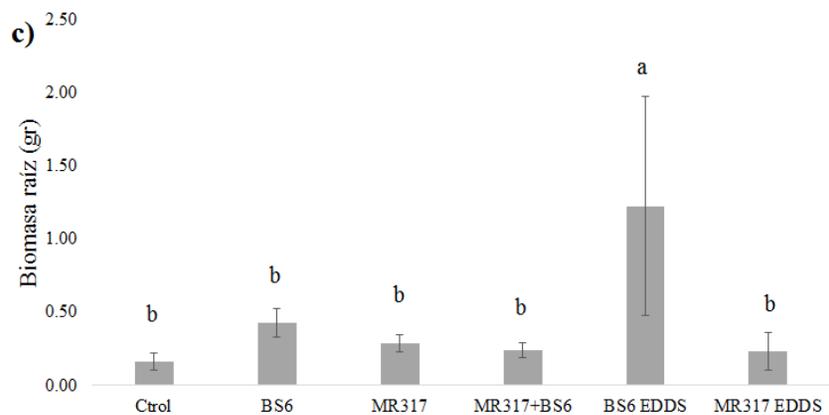
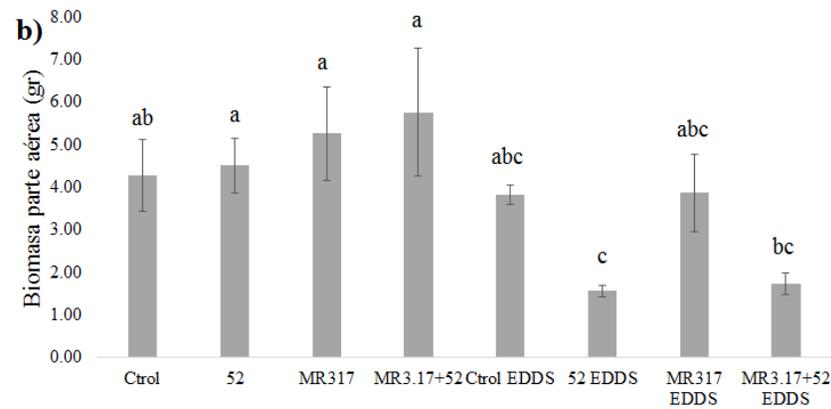
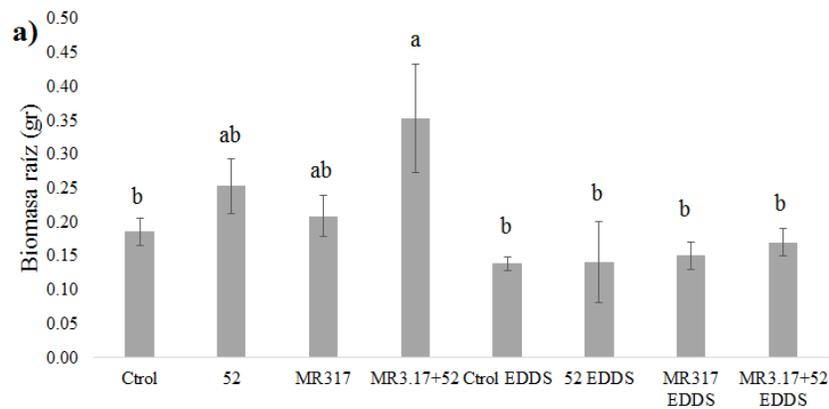


Figura 19. Efecto de los diferentes tratamientos. en la acumulación biomasa en: **a)** Raíz de *H. annuus*; **b)** parte aérea en *H. annuus*; **c)** raíz de *A. palmeri*, y **d)** parte aérea en *A. palmeri*. Diferentes letras minúsculas sobre las barras representan diferencias significativas entre tratamientos con una prueba de ANOVA de una vía seguido de un análisis *post-hoc* de Fisher (LSD) a $p \leq 0.05$.

Tabla XVI. Efecto en la acumulación de Pb en diferentes tejidos de *Helianthus annuus* por la inoculación microbiana.

Acumulación de Pb en <i>H. annuus</i> (mg/ kg)			
Tratamientos	Hoja	Tallo	Raíz
Control	2.48 ± 2.16b	ND	214.04 ± 33.11ab
<i>Pseudomonas</i> sp. 52	6.93 ± 2.16b	ND	209.55 ± 37.24ab
<i>Rhodococcus</i> sp. MR317	7.49 ± 2.41b	ND	141.69 ± 37.23b
Consortio 52 + MR317	ND	ND	154.72 ± 36.43b
Control EDDS	23.46 ± 2.41a	25.82 ± 6.09ab	249.28 ± 32.5ab
<i>Pseudomonas</i> sp. 52 + EDDS	22.08 ± 2.78a	29.93 ± 7.02ab	308.61 ± 29.62a
<i>Rhodococcus</i> sp. MR317 + EDDS	17.99 ± 2.36a	15.55 ± 7.05b	263.47 ± 37.24a
Consortio 52+MR317 + EDDS	ND	42.51 ± 7.02a	252.16 ± 43ab

Diferentes letras minúsculas representan diferencias significativas entre tratamientos para un mismo tejido con una prueba de ANOVA de una vía seguido de un análisis *post-hoc* de Fisher (LSD) a $p \leq 0.05$.

En cuanto a la acumulación de Pb en *A. palmeri*, no se registró la presencia del metal en el tejido foliar para ningún tratamiento (**Tabla XVII**). En tallo, la máxima acumulación fue para el tratamiento MR317 EDDS con 36.57 mg/ kg de Pb seguido del tratamiento BS6 EDDS con 16.78 mg/ kg de Pb. La concentración de Pb en el tratamiento control fue 2.82 mg/ kg de Pb siendo esta la menor cantidad registrada. El tratamiento inoculado con MR317 no mostró acumulación de Pb en el tejido foliar.

En el tejido radicular de *A. palmeri* la máxima concentración de Pb se observó en el tratamiento MR317 + EDDS acumulando 342.52 mg/ kg de Pb, seguido del tratamiento BS6 + EDDS, con 307.06 mg/ kg de Pb. Por el contrario, la menor concentración se obtuvo en el tratamiento del consorcio BS6 + MR317, acumulando 125.96 mg/ kg de Pb. No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos restantes.

En los tratamientos en los que se adicionó EDDS, se observaron síntomas de deterioro, como clorosis y marchitez (**Figura 20**). En la **figura 21**, se muestra una comparación de los diferentes tratamientos al finalizar el ensayo de fitorremediación

Tabla XVII. Efecto en la acumulación de Pb en diferentes tejidos de *Amaranthus palmeri* por la inoculación microbiana.

Acumulación de Pb en <i>A. palmeri</i> (mg/ kg)			
Tratamientos	Hoja	Tallo	Raíz
Control	ND	2.82 ± 3.7c	171.96 ± 48.65abc
<i>Enterobacter</i> sp. BS6	ND	6.11 ± 3.8bc	140.74 ± 56.17bc
<i>Rhodococcus</i> sp. MR317	ND	ND	214.14 ± 68.8abc
Consortio BS6 + MR317	ND	2.6 ± 4.53c	125.96 ± 56.17c
<i>Enterobacter</i> sp. BS6 + EDDS	ND	16.78 ± 3.71b	307.06 ± 56.17ab
<i>Rhodococcus</i> sp. MR317 + EDDS	ND	36.57 ± 3.69a	342.52 ± 68.8a

Diferentes letras minúsculas representan diferencias significativas entre tratamientos para un mismo tejido con una prueba de ANOVA de una vía seguido de un análisis *post-hoc* de Fisher (LSD) a $p \leq 0.05$.



Figura 20. Efecto de la adición de EDDS en los tratamientos de fitorremediación en: **a)** *H. annuus*, inoculada con *Pseudomonas* sp. 52, y **b)** *H. annuus*, inoculada con *Pseudomonas* sp. 52 + EDDS.



Figura 21. Aspecto de los diferentes tratamientos de fitorremediación realizados con plantas crecidas en suelo de La Zacatecana. **A)** Plantas de *H. annuus*: **a)** Control + EDDS; **b)** MR317 + EDDS; **c)** 52 + EDDS; **d)** MR317 + 52 EDDS; **e)** Control; **f)** MR317; **g)** 52; **h)** MR317 + 52. **B)** Plantas de *A. palmeri*: **i)** MR317 + EDDS; **j)** BS6 + EDDS; **k)** Control; **l)** MR317 + BS6; **m)** MR317; **n)** BS6.

Tabla XVIII. Factor de bioconcentración (**FBC**) y factor de transferencia (**FT**) de los diferentes tratamientos de fitorremediación con *Helianthus annuus*.

Tratamientos	FBC	FT
Control	0.23	0.01
<i>Pseudomonas</i> sp. 52	0.23	0.03
<i>Rhodococcus</i> sp. MR317	0.16	0.05
Consorcio 52 + MR317	0.17	ND
Control EDDS	0.32	0.20
<i>Pseudomonas</i> sp. 52 + EDDS	0.39	0.17
<i>Rhodococcus</i> sp. MR317 + EDDS	0.32	0.13
Consorcio 52 + MR317 + EDDS	0.32	0.17

Tabla XIX. Factor de bioconcentración (**FBC**) y factor de transferencia (**FC**) de los diferentes tratamientos de fitorremediación con *Amaranthus palmeri*.

Tratamientos	FBC	FT
Control	0.19	0.02
<i>Enterobacter</i> sp. BS6	0.16	0.04
<i>Rhodococcus</i> sp. MR317	0.23	ND
Consorcio BS6 + MR317	0.14	0.02
<i>Enterobacter</i> sp. BS6 + EDDS	0.35	0.05
<i>Rhodococcus</i> sp. MR317 + EDDS	0.41	0.11

Los tratamientos donde fue adicionado el EDDS mostraron, para ambas especies, un mayor FBC y FT comparados con aquellos en los que este agente quelante no se usó (**Tabla XVIII** y **XIX**). El FBC más alto fue de 0.39, y se registró para *H. annuus* inoculado con *Pseudomonas* sp. 52 + EDDS, mientras que el menor valor de FBC se registró para *A. palmeri* inoculado con el Consorcio BS6 + MR317, con 0.14. En el caso del FT el valor más alto fue para el tratamiento Control + EDDS, mientras que el menor fue para el tratamiento Control, ambos en *H. annuus*.

VII. DISCUSIÓN

En el presente estudio se determinó la concentración de metales pesados en suelo y sedimento de la laguna de La Zacatecana, lugar reconocido por haber recibido los jales mineros del distrito minero de Zacatecas durante la época colonial. Reportes previos indican altas concentraciones de Hg, As y Pb en el sitio (Iskander et al. 1994, Santos-Santos et al. 2006, González-Dávila et al 2012).

En general, el nivel de contaminación encontrado en este estudio muestra una disminución al compararlo con trabajos anteriores en la misma zona. Iskander et al. en 1994, reportan una concentración de 991 mg/ kg de As, mientras que Santos-Santos et al. en 2006, señalan una reducción de cerca del 80% al encontrar 184 mg/ kg de As. Ambas referencias están por arriba de lo reportado en el presente estudio (101.46 mg/ kg de As). Un comportamiento muy similar se presentó para el Hg. Sin embargo, la concentración máxima del Pb fue de 3069.85 mg/ kg, muy por encima de los 511.97 mg/ kg reportados por Santos-Santos et al. (2006).

Lo anterior es explicado por González-Dávila et al. (2012) quienes señalan que se realizó un nuevo depósito de jales en el área de la laguna. De modo que al analizar la concentración de Pb, As y Hg en los “nuevos jales”, reportan concentraciones de 5660.25, 289.9 y 505.9 mg/ kg de Pb, As y Hg respectivamente. La reducción en el nivel de metales de la zona puede deberse a diferentes factores: 1) La acumulación de los metales en el tejido aéreo de las plantas y su posterior entrada a la cadena trófica a través de los animales herbívoros, y 2) cambios en su estado redox, lo cual altera su disponibilidad y solubilidad. Dicho fenómeno puede ser ocasionado por procesos bióticos o abióticos.

En ese sentido García-Berumen (2015) realizó un análisis de la vegetación local de La Zacatecana, encontrando algunas especies como *Amaranthus dubius* y *A. palmeri* capaces de acumular hasta 21.15 mg/ kg de Hg, 10.97 mg/ kg de As y 40.22 mg/ kg de Pb en su parte aérea. En lo que respecta a los cambios en el estado redox de algunos metales, se sabe que el Hg puede ser reducido a Hg⁰ por acción de grupos bacterianos específicos (Ledin 2000). Wiatrowski et al. (2006) señalan que cepas del género *Shewanella*, *Geobacter* y *Pseudomonas* son capaces de reducir Hg^(II) a Hg⁰ a través de una ruta desasimilatoria bajo

condiciones anóxicas. En condiciones aeróbicas la reducción de Hg es llevada cabo por la enzima mercurio reductasa (MerA) presente en bacterias tanto Gram negativas como positivas.

En este sentido, Camarena-Pozos (2009) realizó el aislamiento de bacterias con capacidad de reducción de Hg de muestras de jales mineros de Guanajuato y suelos de zonas aledañas a una mina de Hg en San Joaquín Querétaro, encontrando bacterias con esta capacidad pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Bacillus* y *Shewanella*. La importancia en la reducción microbiana del mercurio radica que el Hg⁰ es un líquido volátil a temperatura ambiente y presenta baja solubilidad en agua, por lo cual se evapora muy fácilmente de agua y sedimento. Bacterias con estas características son comunes en ambientes contaminados por metales pesados, por lo cual pudiera ser una ruta de reducción de los contaminantes en La Zacatecana.

Los cambios en la solubilidad de los metales también pueden ocasionar una migración de estos a través del perfil del suelo, debido a la percolación del agua de lluvia, lo que trae como consecuencia un incremento en la cantidad de metales en las capas más profundas (Neupane y Roberts 2009). Lo anterior no pudo ser corroborado en el presente trabajo debido a que las muestras analizadas corresponden a los primeros 30 cm de profundidad.

Los mapas de dispersión de la laguna muestran una correspondencia con el análisis de correlación (**Tabla XI**) y con el ACP del contenido de metales (**Figura 13b**) donde se distingue la formación de 2 grupos distintos: Pb, As, Hg (grupo 1) y Cd, Ni, Cr (grupo 2). Lo anterior sugiere que la distribución del grupo 2 no se debe a la actividad minera del sitio, y sí a la composición del material parental.

Se determinaron los índices I_{geo} y E_{RI} utilizando los valores de referencia internacionales de cada elemento (Taylor y McLennan 2001; Turekian y Whedepool 1961) y los obtenidos por García-Berumen (2015) del sitio “El Fuerte” como referencia local para Pb, As y Hg debido a que presenta condiciones ambientales muy similares a las de La Zacatecana y no existen reportes de afectación por la actividad minera.

Las comparaciones entre los valores obtenidos con las diferentes referencias mostraron en el caso del I_{geo} grandes discrepancias para el Hg. El valor mínimo registrado con la referencia internacional fue de 4.8 (**sitio 11N**) lo que corresponde a un grado de contaminación fuerte

(**Tabla IV**). Por el contrario, para el mismo sitio con la referencia local el valor fue de -0.63, lo que indica que no hay contaminación por Hg para ese sitio. Respecto a la pertinencia de utilizar valores locales de referencias Karbassi et al. (2008) mencionan que en algunos casos la utilización de referencias internacionales para calcular el grado de contaminación puede llevar a conclusiones equivocadas, específicamente en zonas mineras donde el material parental contiene una gran cantidad de metales, como lo es el estado de Zacatecas.

El Igeo más alto fue de 7.3 (referencia local) para el Pb en el sitio 17N, equivalente a un sitio extremadamente contaminado de acuerdo con la clasificación de Müller, lo que coincide con Mitchell et al. (2016) que reportan un Igeo de 5.8 para Pb en muestras de sedimentos cercanas a un sitio minero en Aguascalientes. Debido a que el sitio 17N resultó ser el más contaminado por Pb, se realizó un análisis elemental por FRX, el cual mostró que el sitio está dominado por óxidos y es corroborado al medir el potencial redox del suelo el cual fue el más alto (307.5 mV). SiO₂ fue el compuesto más abundante con un 51.83% mientras que el PbO fue de 1.81%. Este porcentaje fue menor que el obtenido por Barcos-Arias et al. (2014) para escorias industriales con un 3.48%. Al igual que el presente estudio, la composición elemental de la escoria estuvo dominada por óxidos siendo el Fe₂O₃ y SO₃ los más abundantes con 40.7 y 27.5%, respectivamente.

Debido a que el Pb fue el metal más abundante en la Zacatecana, se realizó una extracción secuencial para determinar su grado de disponibilidad. La mayoría del Pb se encuentra en forma no lixiviable unido a óxidos de Fe y Mn (F3) y materia orgánica (F4). El porcentaje de Pb que pudiera liberarse (F1 y F2) no sobrepasó el 10 % en todas las muestras a excepción del sitio 17N donde alcanzo el 30%. Este porcentaje resulta considerablemente alto si se toma en cuenta la concentración total de Pb en ese sitio (i. e., 3089.8 mg/ kg).

La disponibilidad del Pb puede ser explicada a través de las variables fisicoquímicas del suelo. En este sentido, Steinnes (2013) menciona que el comportamiento del Pb depende en mayor medida del porcentaje de materia orgánica del suelo ya que a valores de pH bajos (< 5) el Pb se encuentra fuertemente unido a los ácidos húmicos (Bunzl et al. 1976; Kendorff y Schnitzer 1980). Lo anterior concuerda con el alto factor de movilidad reportado para el sitio 17N ya que este presentó el menor porcentaje de materia orgánica (1.58%) y además el ACP (**Figura 13c**) muestra un efecto del porcentaje de MO en la variabilidad de las muestras, sin

embargo, el pH mostro un comportamiento neutro-alkalino, al respecto McBride 1994 señala que bajo estas condiciones la solubilidad el Pb puede incrementarse debido a la formación de complejos Pb-hidroxilo.

El Pb en suelo se encuentra por lo general en un estado de oxidación de +2. Sin embargo, bajo condiciones reducidas la mayor proporción de Pb se encuentra como galena (PbS) unida a sulfatos precipitados, lo que pudiera estar ocurriendo en las zonas inundadas de la laguna (sitios **1N**, **M6**, **M12**) donde se encontraron las condiciones más reducidas y el mayor porcentaje de MO.

En el presente trabajo se aislaron 26 cepas bacterianas pertenecientes a 4 phyla distintos, siendo *Pseudomonas* el género más abundante con 13 aislados. Este género perteneciente al phylum γ -proteobacteria destaca por ser muy diverso y presentar una gran flexibilidad metabólica, encontrando miembros en prácticamente todos los ambientes estudiados (Meyer et al., 2004, Palleroni 1993). El segundo grupo bacteriano más abundante en el presente estudio fue el actinobacteria con 7 aislados distribuidos en 5 géneros. Al respecto Gremion et al. (2003) reportan una gran abundancia de este grupo en suelos contaminados por metales pesados, mediante la secuenciación parcial de 282 clonas obtenidas de suelo., Los autores mencionan que el 30% de todos los filotipos encontrados pertenecieron a este género.

Uno de los aislados más destacados de este estudio fue *Rhodococcus* sp MR317 debido, en primer lugar, a que mostró el mayor efecto en la acumulación de biomasa de *A. thaliana* bajo condiciones *in vitro*. Además, mostró la capacidad de cambiar de una pigmentación rosa salmón a una tonalidad más oscura en presencia de concentraciones crecientes de Pb. Al respecto Lima e Silva et al. (2012) reportan un cambio de color en cepas de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aureginosa* al incubarse en medio sólido adicionado con Hg y Cr. En este sentido, se sabe que los pigmentos bacterianos juegan un papel esencial en la protección contra daño fotooxidativo, específicamente los carotenoides (Armstrong 1994). Lo cual es el caso de *Rhodococcus* sp. MR317, como lo reporta Pérez-Hernández. (2016) quien logra identificar la presencia de este compuesto mediante HPLC, obteniendo una mejor definición de los picos del cromatograma en el tratamiento adicionado con 1mM de $Pb_2(NO_3)_2$ comparado con el control, sin Pb. El género *Rhodococcus*, al igual que *Pseudomonas*, es

reconocido por su versatilidad metabólica y por estar adaptado a sitios contaminados, donde se registra su presencia. (Álvarez 2010). Además, se ha reportado la capacidad de algunas especies para la degradación de hidrocarburos como *R. rhodochrus*, *R. ruber*, *R. opacus* y *R. koreensi* (Kuyukina y Ivshina 2010).

En el presente estudio no se logró aislar bacterias con capacidad de fijación biológica de nitrógeno a excepción de *Agrobacterium* sp. 26, lo cual contrasta con lo reportado por Navarro-Noya et al. (2012) que reportan cepas de *Azospirillum lipoferum*, *Paenibacillus durus* y *Bradyrhizobium japonicum* con capacidad de fijación de nitrógeno aisladas de la rizósfera de plantas creciendo en antiguos depósitos de jales mineros del estado de Zacatecas. Cabe resaltar, sin embargo, que los autores mencionan que la capacidad de fijación de los aislados se vio disminuida en la presencia de metales pesados.

La acumulación de Pb en el ensayo de fitorremediación mostró un comportamiento variable. En general, aquellos tratamientos donde se aplicó EDDS al suelo acumularon una mayor cantidad de Pb en el tejido para ambas plantas. Al respecto, Ko et al. (2014) reportan un incremento en la acumulación de Pb por efecto del EDDS en el tejido de *Amaranthus caudatus* L. y *A. viridis* L. registrando un aumento en el FBC de 0.18 a 0.33 para *A. viridis* y de 0.19 a 0.38 para *A. caudatus*. Lo anterior coincide con lo reportado en el presente trabajo, donde el FBC promedio para ambas plantas se incrementó en los tratamientos con EDDS de 0.19 a 0.36.

Sobre la efectividad del EDDS para incrementar la disponibilidad de Pb en suelo, Epelde et al. (2008) determinaron que es menor comparada con el EDTA, aunque este último mostró un efecto negativo en la comunidad microbiana al reducir significativamente la tasa de respiración del suelo. Varios autores mencionan que la baja liberación de Pb por EDDS se debe a la naturaleza del metal que se encuentra fuertemente ligado al suelo, lo que dificulta su liberación. (Meers et al., 2004, Luo et al., 2005 y Ko et al., 2014). Sin embargo, en el presente trabajo no se determinó la cantidad exacta de Pb solubilizado por efecto del EDDS. Al comparar la acumulación de Pb entre las dos especies analizadas, *H. annuus* mostró la mayor cantidad de Pb en su tejido. Un detalle interesante se observa en la acumulación de Pb en tallo, ya que solamente se registró en los tratamientos con EDDS. Mientras que en el caso

de *A. palmeri*, no se detectó la presencia de Pb en el tejido foliar para ninguno de los tratamientos. En este sentido Pourrut et al. (2011) señalan que la baja eficiencia en la transferencia de Pb de la raíz al tejido aéreo representa un problema en los tratamientos de fitoextracción. Arshad et al. (2008) catalogan a las plantas con un FT igual o mayor a 1 como hiperacumuladoras. En el presente trabajo el FT más alto fue para los tratamientos con EDDS y se encontró en un intervalo de 0.05 a 0.2.

En lo que respecta al efecto generado por la inoculación microbiana, en el caso de *H. annuus* se observó una disminución en el contenido de Pb en la raíz en los tratamientos inoculados con la cepa *Rhodococcus* sp. MR317, al contrario de los inoculados con *Pseudomonas* sp. 52 donde se observó un ligero aumento. (Tabla XVI). Lo anterior puede ser explicado debido a la producción de sideróforos y a la solubilización de fosfatos presentada por *Pseudomonas* sp. 52. En este sentido Rajkumar et al. (2009) mencionan la importancia de las bacterias productoras de sideróforos para incrementar la eficacia de los tratamientos de fitorremediación de metales, debido a que además del hierro, los sideróforos pueden formar complejos estables con otros metales como son Al, Cd, Cu, Ga, In, Pb y Zn. incrementando su solubilidad en el suelo.

De igual manera se ha reportado el uso de bacterias solubilizadoras de fosfatos para incrementar la disponibilidad de Pb. Ren et al. (2013) mencionan un incremento en la concentración de Pb en *Brassica juncea* al ser inoculada con cepas de *Acinetobacter calcoaceticus* y *Enterobacter agglomerans*, lo cual según los autores se logra a través de la acidificación del suelo por la producción de ácidos orgánicos. Sin embargo, también puede ocurrir el efecto contrario, como lo reportan Park y Bolan (2013) que observan una reducción en la acumulación de Pb en el tejido de *Lolium perenne* inoculado con *Enterobacter cloacae*, lo cual atribuyen a la liberación de iones PO_4^{-3} por la solubilización de roca fosfórica presente en el suelo, lo que ocasiona la formación de piromorfita ($\text{Pb}_5(\text{PO}_4)_3\text{Cl}$) uno de los minerales de Pb más estable termodinámicamente.

Se observó una disminución en la a biomasa de *H. annuus* en aquellos tratamientos donde fue añadido EDDS tanto en raíz como en la parte aérea. Lo cual coincide con lo reportado por Luo et al. (2005), quienes observaron una disminución en la biomasa de *Zea mays* y *Phaseolus vulgaris* por la adición de EDDS en un tratamiento de fitorremediación. Estos

autores lo atribuyen al incremento de la disponibilidad de metales en el suelo; además, mencionan la aparición de síntomas de clorosis en hojas, lo cual coincide con lo reportado en el presente trabajo (**Figura 20**). Aunque otros autores mencionan que no se encontraron diferencias en lo que respecta a la acumulación de biomasa por efecto del EDDS (Meers et al. 2005, Luo et al. 2015). Al parecer, la diferencia de los efectos de los quelantes químicos se encuentra en función de la especie vegetal utilizada y su tolerancia al estrés ocasionado por metales pesados. (Kabata-Pendias, 2004).

En este sentido, resulta interesante lo observado en el presente trabajo para los tratamientos “Control + EDDS” y “Consortio + EDDS” de *A. palmeri*, donde no sobrevivió ningún ejemplar vegetal después de la adición de EDDS al suelo. Este efecto pudo haberse debido, a que la cantidad de metal disponible fue mayor que el límite de tolerancia de la planta. En este sentido, se sabe que una concentración de 1 mM de Pb, puede inducir fitotoxicidad en *A. lividus* debido a la acumulación de radicales libres ocasionando peroxidación de lípidos (Bhattacharjee, 1997). En el caso de los tratamientos inoculados, las bacterias pudieran estar interactuando con el Pb disponible del suelo convirtiendo el exceso de Pb de vuelta a una forma no biodisponible. Sin embargo, en el presente trabajo no se determinó la cantidad de Pb solubilizado por efecto del EDDS en cada tratamiento.

VIII. CONCLUSIONES

- El Pb fue el metal más abundante en suelo y sedimento de la laguna de La Zacatecana, Asimismo, el índice de geo acumulación indica que su origen es antropogénico (e.g. por actividad minera) y se encuentra correlacionado con el As y Hg.
- Los niveles de Cr, Cd y Ni estuvieron por debajo de los máximos permitidos por la norma mexicana. Los análisis indican que su acumulación no se debe a un proceso antropogénico (e-g., minería). Además, mostraron entre ellos un patrón de distribución semejante.
- El sitio 17N fue donde se observó la mayor acumulación de Pb. Además, fue el sitio con la mayor cantidad de Pb disponible (30%). El ACP indica que la disponibilidad del Pb en las muestras está determinada en primer lugar por el contenido de materia orgánica y los silicatos de Fe y Mn.
- El phylum más abundante fue γ -proteobacteria, seguido de actinobacteria. En lo que respecta al nivel de género el más abundante fue *Pseudomonas*. La mayoría de los aislados de este género mostraron capacidad de solubilización de fosfato inorgánico y producción de sideróforos.
- *H. annuus* fue la especie que acumuló la mayor cantidad de Pb. La adición de EDDS incrementó la eficacia de los tratamientos de fitorremediación. *Pseudomonas* sp. 52 fue la cepa que mostró un mayor efecto en la acumulación de Pb en *H. annuus*. En *A. palmeri* la inoculación microbiana tuvo un efecto positivo en la supervivencia de esta planta en presencia de Pb en el suelo, que tendió a acumularse en el tallo.

IX. PERSPECTIVAS

Determinar la variabilidad vertical de la concentración de metales en suelos a diferentes mayores profundidades (1 m), así como su disponibilidad de los principales contaminantes Pb, Hg y As.

Caracterizar la comunidad microbiana completa del suelo (incluyendo hongos y bacterias) por secuenciación masiva del gen 16S ribosomal y determinar si existe correlación entre la distribución de las comunidades microbianas y la concentración de metales pesados.

Realizar más ensayos de fitorremediación, variando la concentración de EDDS aplicado al suelo. Además, caracterizar la respuesta fisiológica y bioquímica de las plantas a la inoculación bacteriana (e. g., niveles de actividad de enzimas antioxidantes, expresión de genes asociados con estrés, etc.).

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta, J.A., Jansen, B., Kalbitz, K., Faz, A., y Martínez-Martínez S. 2011. Salinity Increases Mobility of Heavy Metals in Soils. *Chemosphere*. 85, 1318–1324.
- Alarcón-Herrera, M.T., Olmos-Márquez, M.A., Valles-Aragon, C., Llorens E., y Martín-Domínguez, I.R. 2013. Assessments of Plants for Phytoremediation of Arsenic-Contaminated Water and Soil. *European Chemical Bulletin*. 2,121–125.
- Alexander, D.B. y Zuberer D.A. 1991. Use of Chrome Azurol S Reagents to Evaluate Siderophore Production by Rhizosphere Bacteria. *Biology and Fertility of Soils*. 12, 39–45.
- Ali, H., Khan, E. y Anwar, M. 2013. "Phytoremediation of Heavy Metals — Concepts and Applications." *Chemosphere*. 91, 869–881.
- Alloway B.J. 2013. Heavy Metals in Soils, Trace Metals and Metalloids in Soils and their Bioavailability. 3ra edición. Springer, Reading, Reino Unido, 587 pp
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.G., y Lipman, D.J. 1990. "Basic Local Alignment Search Tool." *Journal of Molecular Biology* 215,403–410.
- Alvarez, H.M. (Ed.). (2010). *Biology of Rhodococcus* (Vol. 16). Springer Science y Business Media.
- Armienta, M.A., Rodríguez, R., y Cruz, O. 1997. Arsenic Content in Hair of People Exposed to Natural Arsenic Polluted Groundwater at Zimapán, México. 583–589.
- Armienta, M.A., Villaseñor, G., Rodríguez, R., Ongley, L.K., y Mango, H. 2001. The Role of Arsenic-Bearing Rocks in Groundwater Pollution at Zimapán Valley, México. *Environmental Geology*. 40, 571-581.
- Arora, N.K., Khare, E., Singh, S., y Maheshwari, D.K. 2010. Effect of Al and Heavy Metals on Enzymes of Nitrogen Metabolism of Fast and Slow Growing Rhizobia under Explanata Conditions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 26, 811–816.
- Arshad, M., *et al.* 2008. A field Study of Lead Phytoextraction by Various Scented Pelargonium Cultivars. *Chemosphere*. 71, 2187-2192.

- Arshad, M., Saleem, M. y Hussain, S. 2007. Perspectives of Bacterial ACC Deaminase in Phytoremediation. *Trends in Biotechnology*. 25, 356–362.
- Arwidsson, Z., Johansson E., von Kronhelm, T., Allard, B., y van Hees, P. 2010. Remediation of Metal Contaminated Soil by Organic Metabolites from Fungi I-Production of Organic Acids. *Water, Air, and Soil Pollution*. 205, 215–226.
- Baker, A.J. 1981. Accumulators and Excluders – Strategies in the Response of Plants to Heavy Metals. *Journal of Plant Nutrition*. 3, 643–654.
- Balestrasse, K.B., Benavides, M.P., Gallego, S.M., y Tomaro, M.L. 2003. Effect of Cadmium Stress on Nitrogen Metabolism in Nodules and Roots of Soybean Plants. *Functional Plant Biology*. 30, 57–64.
- Barcos-Arias M.S., Peña-Cabriales, J.J., Alarcón, A., y Maldonado-Vega, M, 2015. Enhanced Pb Absorption by *Hordeum vulgare* L. and *Helianthus annuus* L. Plants Inoculated with an Arbuscular Mycorrhizal Fungi Consortium. *International Journal of Phytoremediation*. 17, 405–413.
- Barcos-Arias, M.S. 2014. Estrategias de Biorremediación para el Tratamiento de Escoria Industrial Generada en la Recuperación de Plomo. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Irapuato, Guanajuato, México.
- Bhattacharjee, S. 1997. Membrane Lipid Peroxidation, Free Radical Scavengers and Ethylene Evolution in *Amaranthus* as Affected by Lead and Cadmium. *Biologia Plantarum*. 40, 131-135.
- Bishnoi, N.R. y Garima, A. 2005. Fungus - An Alternative for Bioremediation of Heavy Metal Containing Wastewater: A Review. *Journal of Scientific and Industrial Research*. 64, 93–100.
- Bishnoi, N.R., Chugh, L.K. y Sawhney, S.K. 1993. Effect of Chromium on Photosynthesis, Respiration and Nitrogen Fixation in Pea (*Pisum sativum* L.) Seedlings. *Journal of Plant Physiology*. 142, 25–30.

- Blake, L. y Goulding, K.W.T. 2002. Effects of Atmospheric Deposition, Soil pH and Acidification on Heavy Metal Contents in Soils and Vegetation of Semi-Natural Ecosystems at Rothamsted Experimental Station, UK. *Plant and Soil*. 240, 235–251.
- Bosecker, K. 1999. Microbial Leaching in Environmental Clean-up Programmes. *Process Metallurgy*. 9, 533–536.
- Boussen, S., Soubrand, M., Bril, H., Ouerfelli, K., y Abdeljaouad. 2013. Transfer of Lead, Zinc and Cadmium from Mine Tailings to Wheat (*Triticum aestivum*) in Carbonated Mediterranean (Northern Tunisia) Soils. *Geoderma*. 192, 227–236.
- Bradl, H.B. 2004. Adsorption of Heavy Metal Ions on Soils and Soils Constituents. *Journal of Colloid and Interface Science*. 277, 1–18.
- Brim, H. *et al.* 2000. Engineering *Deinococcus radiodurans* for Metal Remediation in Radioactive Mixed Waste Environments. *Nature Biotechnology* 18, 85–90.
- Bunzl, K., Schmidt, W., y Sansoni, B. 1976. Kinetics of Ion Exchange in Soil Organic Matter. IV. Adsorption and Desorption of Pb^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} and Ca^{2+} by peat. *Journal of Soil Science*. 27, 32–41.
- Burd, G.I., Dixon, D.G y Glick, B.R. 2000. Plant Growth-Promoting Bacteria That Decrease Heavy Metal Toxicity in Plants. *Canadian Journal of Microbiology*. 46, 237–245.
- Camarena-Pozos, D.A. 2009. Reducción Microbiológica de Hg^{+2} en Suelos Asociados a la Actividad Minera. Tesis de Maestría. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Irapuato, Guanajuato, México.
- Carrasco, J.A. *et al.* 2005. Isolation and Characterization of Symbiotically Effective Rhizobium Resistant to Arsenic and Heavy Metals after the Toxic Spill at the Aznalcóllar Pyrite Mine. *Soil Biology and Biochemistry*. 37, 1131–1140.
- Castro-Larragoitia, J., Kramar, U. y Puchelt, H. 1997. 200 Years of Mining Activities at La Paz/San Luis Potosí/Mexico — Consequences for Environment and Geochemical Exploration. *Journal of Geochemical Exploration*. 58, 81–91.

Chodak, M., Golebiewski, M., Morawska-Ploskonka, J., Kuduk, K., y Niklinska, M. 2013. "Diversity of Microorganisms from Forest Soils Differently Polluted with Heavy Metals." *Applied Soil Ecology*. 64, 7–14.

Chuan, M.C., Shu, G.Y. y Liu, J.C. 1996. Solubility of Heavy Metals in a Contaminated Soil: Effects of Redox Potential and pH. *Water, Air, and Soil Pollution*. 90, 543–556.

Clemente, R., Escolar, A. y Bernal, P.M. 2006. Heavy Metals Fractionation and Organic Matter Mineralisation in Contaminated Calcareous Soil Amended with Organic Materials. *Bioresource Technology*. 97, 1894–1901.

Cortés-Jiménez, E. V. *et al.*, 2013. Natural Revegetation of Alkaline Tailing Heaps at Taxco, Guerrero, Mexico. *International Journal of Phytoremediation* 15, 127–141.

Costilla-Salazar, R. *et al.*, 2011. Assessment of Polychlorinated Biphenyls and Mercury Levels in Soil and Biological Samples from San Felipe, Nuevo Mercurio, Zacatecas, Mexico. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 86, 212–216.

Cursino, L. *et al.*, 2000. Capacity of Mercury Volatilization by Mer (from *Escherichia coli*) and Glutathione S-Transferase (from *Schistosoma mansoni*) Genes Cloned in *Escherichia coli*. *Science of the Total Environment*. 261, 109–113.

de-Bashan, L.E., Hernandez, J.P y Bashan, Y. 2012. The Potential Contribution of Plant Growth-Promoting Bacteria to Reduce Environmental Degradation - A Comprehensive Evaluation. *Applied Soil Ecology* 61, 171–189.

Dermont, G., Bergeron, M., Mercier, G., y Richer-Lafleche, M. 2008. Soil Washing for Metal Removal: A Review of Physical/chemical Technologies and Field Applications. *Journal of Hazardous Materials*. 152, 1–31.

Donati, E.R. y Sand, W. 2007. Microbial Processing of Metal Sulfides. UK. Springer

Duffus, J.H. 2002. HEAVY METALS; —A MEANINGLESS TERM? (IUPAC Technical Report). Pure Appl. Chem. National Representatives: Z. Bardodej (Czech Republic J. Park Korea F. J. R. Paumgartten Brazil) 74, 793–807.

- Elavarthi, S. y Martin B. 2010. Cap. 16 Spectrophotometric Assays for Antioxidant Enzymes in Plants. Capítulo de Libro en: Plant Stress Tolerance Methods and Protocols. Sunkar R. ed. Springer.
- Epelde, L., Hernández-Allica, J., Becerril, J.M., Blanco, F., y Garbisu, C. 2008. Effects of Chelates on Plants and Soil Microbial Community: Comparison of EDTA and EDDS for Lead Phytoextraction. *Science of the Total Environment*. 401, 21–28.
- Espinosa, E., Aurora-Armienta, M., Cruz, O., Aguayo, A., y Cenicerros, N. 2009. Geochemical Distribution of Arsenic, Cadmium, Lead and Zinc in River Sediments Affected by Tailings in Zimapán, a Historical Polymetallic Mining Zone of México. *Environmental Geology*. 58, 1467–77.
- Fasim, F., Ahmed N., Parsons, R., y Gadd, G.M. 2002. “Solubilization of Zinc Salts by a Bacterium Isolated from the Air Environment of a Tannery.” *FEMS Microbiology Letters*. 213, 1–6.
- Fernández-Bremauntz A., Yarto-Ramírez M. y Castro-Díaz J. 2004. Las Sustancias Tóxicas Persistentes. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales e Instituto Nacional de Ecología. Ciudad de México, México, 260 pp.
- Fernández-Linares, L.C. *et al.*, 2006. Manual de Técnicas de Análisis de Suelos Aplicadas a La Remediación de Sitios Contaminados. Instituto Nacional de Ecología.
- Flores-Ramírez, R. *et al.*, 2012. Exposición Infantil al Plomo en Sitios Contaminados. *Salud Publica de Mexico*. 54, 383–392.
- Frankenberger, W.T. y Ulrich Karlson. 1995. Volatilization of Selenium from a Dewatered Seleniferous Sediment: A Field Study. *Journal of Industrial Microbiology*. 144, 226–232.
- Gadd, G.M. 2004. Microbial Influence on Metal Mobility and Application for Bioremediation. *Geoderma*. 122, 109–119.
- Gadd, G.M. 2010. Metals, Minerals and Microbes: Geomicrobiology and Bioremediation. *Microbiology*. 156, 609–643.

Gamalero, E., lingua, G., Berta, G., y Glick, B. 2009. Beneficial Role of Plant Growth Promoting Bacteria and Arbuscular Mycorrhizal Fungi on Plant Responses to Heavy Metal Stress. *Canadian Journal of Microbiology*. 55, 501–514.

García-Berumen J.A. 2015. Significancia de la Actividad Microbiana en las Fluctuaciones de Metales Pesados (Hg, Pb, As) en la Laguna “La Zacatecana” Guadalupe, Zacatecas. Tesis de Maestría. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Irapuato, Guanajuato, México.

Gasparatos, D., Mavromati, G., Kotsovilis, P., y Massas, I. 2015. Fractionation of Heavy Metals and Evaluation of the Environmental Risk for the Alkaline Soils of the Thriassio Plain: A Residential, Agricultural, and Industrial Area in Greece. *Environmental Earth Sciences*. 74, 1099–1108.

Glick, B.R. 2003. Phytoremediation: Synergistic Use of Plants and Bacteria to Clean up the Environment. *Biotechnology Advances*. 21, 383–393.

Glickmann, E. y Dessaux Y. 1995. A Critical Examination of the Specificity of the Salkowski Reagent for Indolic Compounds Produced by Phytopathogenic Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 61, 793–796.

González-Dávila O., Gómez-Bernal, J.M. y Ruíz-Huerta, E.A. 2012. Plants and Soil Contamination with Heavy Metals in Agricultural Areas of Guadalupe, Zacatecas, Mexico. Capítulo de libro en: Environmental Contamination. Ed. Dr. Jatin Srivastava. In Tech.

González-Valdez, E., González-Reyes E., Bedolla-Cedeño C., Arrollo-Ordaz, E.L., y Manzanares-Acuña, E. 2008. Niveles de Plomo en Sangre y Factores de Riesgo por Envenenamiento de Plomo en Niños Mexicanos. *Revista de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Antioquia*. 4, 114–119.

Gratão, P.L., Vara-Prasad, M.N., Felipe-Cardoso, P., Lea, P.J., y Antunes-Azevedo, R. 2005. Phytoremediation: Green Technology for the Cleanup of Toxic Metals in the Environment. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 17, 53–64.

Green, M.R. y Sambrook, J. 2012. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press New York.

Gremion, F., Chatzinotas, A., y Harms, H. 2003. Comparative 16S rDNA and 16S rRNA Sequence Analysis Indicates that Actinobacteria Might be a Dominant Part of the Metabolically Active Bacteria in Heavy Metal- Contaminated Bulk and Rhizosphere Soil. *Environmental Microbiology*. 5, 896-907.

Grichko, V.P., Filby, B. y Glick, B.R. 2000. Increased Ability of Transgenic Plants Expressing the Bacterial Enzyme ACC Deaminase to Accumulate Cd, Co, Cu, Ni, Pb, and Zn. *Journal of Biotechnology*. 81, 45–53.

Guentzel, J.L., Portilla, E., Keith, K.M., y Keith, E.O. 2007. Mercury Transport and Bioaccumulation in Riverbank Communities of the Alvarado Lagoon System, Veracruz State, Mexico. *Science of the Total Environment*. 388, 316–324.

Gupta, A., Meyer, J.M y Goel, R. 2002. Development of Heavy Metal-Resistant Mutants of Phosphate Solubilizing *Pseudomonas sp.* NBRI 4014 and their Characterization. *Current Microbiology*. 45, 323–327.

Hakanson, L. 1980. An Ecological Risk Index for Aquatic Pollution Control. A Sedimentological Approach. *Water Research*. 14, 975–1001.

Hernández-Silva, G. *et al.*, 2012. Presencia del Hg total en una relación suelo-planta-atmosfera al sur de la Sierra Gorda de Querétaro, México. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. 15, 5-15.

INEGI. 2017. Página del Instituto Nacional de Estadística y Geografía. “Información por Entidad” Clima Zacatecas. Recuperados el 1 de mayo del 2017, de <http://www.cuentame.inegi.org.mx/monografias/informacion/zac/territorio/clima.aspx?tema=me&e=32>

Iskander F.Y., Vega-Carrillo H.R. y Manzanares-Acuña E. 1994. Determination of mercury and other elements in la Zacatecana Dam sediment in Mexico. *Science of Total Environt.* 148, 45-48.

Jha, B. *et al.*, 2009. Isolation, Partial Identification and Application of Diazotrophic Rhizobacteria from Traditional Indian Rice Cultivars. *European Journal of Soil Biology*. 45, 62–72.

- Jiang, C., Sheng, X, Qian, M., y Wang, Q. 2008. Isolation and Characterization of a Heavy Metal-Resistant *Burkholderia sp.* from Heavy Metal-Contaminated Paddy Field Soil and Its Potential in Promoting Plant Growth and Heavy Metal Accumulation in Metal-Polluted Soil. *Chemosphere*. 72, 157–164.
- Jong, T. y Parry, D.L. 2003. Removal of Sulfate and Heavy Metals by Sulfate Reducing Bacteria in Short-Term Bench Scale Upflow Anaerobic Packed Bed Reactor Runs. *Water Research*. 37, 3379–3389.
- Kabata-Pendias, A., y Mukherjee, A.B. 2007. Trace Elements from Soil to Human. Berlin: Springer-Verlag
- Kaplan, H., Ratering S., Hanauer, T., Feliz-Henningsen, P., y Schnell, S. 2014. Impact of Trace Metal Contamination and *in situ* Remediation on Microbial Diversity and Respiratory Activity of Heavily Polluted Kastanozem. *Biology and Fertility of Soils*. 50, 735–744.
- Karbassi, A.R., Monavari, S.M., Nabi-Bidhendi, Gh.R., Nouri, J., y Nematpour, K. 2008. Metal Pollution Assessment of Sediment and Water in the Shur River. *Environmental Monitoring and Assessment*. 147, 107-116.
- Kerndorff, H., y Schnitzer, M. 1980. Sorption of Metals on Humic Acid. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 44, 1701-1708.
- Kirchman, D.L. 2012. Processes in Microbial Ecology. UK: Oxford University Press.
- Ko, C.H., Chang, F.C., Wang, Y.N., y Chung, C.Y. 2014. Extraction of Heavy Metals from Contaminated Soil by two *Amaranthus spp.* *CLEAN–Soil, Air, Water*. 42, 635-640.
- Kos, B. y Leštan, D. 2003. Influence of a Biodegradable ([S,S]-EDDS) and Nondegradable (EDTA) Chelate and Hydrogel Modified Soil Water Sorption Capacity on Pb Phytoextraction and Leaching. *Plant and Soil*. 253, 403–411.
- Kraemer, S.M., Xu, J., Raymond, K.N., y Sposito, G. 2002. Adsorption of Pb(II) and Eu(III) by Oxide Minerals in the Presence of Natural and Synthetic Hydroxamate Siderophores. *Environmental Science and Technology*. 36, 1287–1291.

- Krishnamurti, G.S.R., Cieslinski, G., Huang, P.M., y Van Rees, K.C.J. 1997. Kinetics of Cadmium Release from Soils as Influenced by Organic Acids: Implication in Cadmium Availability. *Journal of Environmental Quality*. 26, 271-277.
- Kuyukina, M.S., y Ivshina, I.B. 2010. Application of *Rhodococcus* in Bioremediation of Contaminated Environments. In *Biology of Rhodococcus* (pp. 231-262). Springer Berlin Heidelberg.
- Lane, D.J. 1991. 16S/23S rRNA Sequencing. Pp. 115–48 in *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, edited by E. Stackebrandt and M. Goodfellow. Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore: John Wiley & Sons.
- Lebeau, T., Braud, A. y Jézéquel, K. 2008. Performance of Bioaugmentation-Assisted Phytoextraction Applied to Metal Contaminated Soils: A Review. *Environmental Pollution*. 153, 497–522.
- Ledin M. 2000. Accumulation of Metals by Microorganisms-Processes and Importance for Soil Systems. *Earth-Science Reviews*. 51, 1-31.
- Li, W.C., Ye, Z.H. y Wong, M.H. 2010. Metal Mobilization and Production of Short-Chain Organic Acids by Rhizosphere Bacteria Associated with a Cd/Zn Hyperaccumulating Plant, *Sedum alfredii*. *Plant and Soil*. 326, 453–467.
- Lima e Silva, A.A.D. *et al.*, 2012. Heavy Metal Tolerance (Cr, Ag and Hg) in Bacteria Isolated from Sewage. *Brazilian Journal of Microbiology*. 43, 1620-1631.
- Lu, A., Zhang, S. y Shan, X.Q. 2005. Time Effect on the Fractionation of Heavy Metals in Soils. *Geoderma*. 125, 225–234.
- Luo, C., *et al.*, 2015. Effects of EDDS and Plant-Growth-Promoting Bacteria on Plant Uptake of Trace Metals and PCBs from e-Waste-Contaminated Soil. *Journal of Hazardous Materials*. 286, 379-385.
- Luo, C., Shen, Z., y Li, X. 2005. Enhanced Phytoextraction of Cu, Pb, Zn and Cd with EDTA and EDDS. *Chemosphere*. 59, 1-11.

- Ma, Y., *et al.*, 2011. Plant Growth Promoting Rhizobacteria and Endophytes Accelerate Phytoremediation of Metalliferous Soils. *Biotechnology Advances*. 29, 248–258.
- Martínez-Trinidad, S. *et al.*, 2013. Total Mercury in Terrestrial Systems (Air-Soil-Plant-Water) at the Mining Region of San Joaquín, Queretaro, Mexico. *Geofísica Internacional*. 52, 43–58.
- Martín-Romero, F. y Gutiérrez-Ruíz, M. 2010. Estudio Comparativo de la Peligrosidad de Jales en Dos Zonas Mineras Localizadas en el Sur y Centro de México. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana*. 62,43-53.
- Mauricio-Gutiérrez, A, Peña-Cabriales, J.J y Maldonado-Vega, M. 2010. Isolation and Characterization of Hexavalent Chromium-Reducing Rhizospheric Bacteria from a Wetland. *International Journal of Phytoremediation*. 12, 317–34.
- McBride, M.B. 1994. Environmental Chemistry of Soils. New York: Oxford University Press.
- Mclean, J.E., y Bledsoe. B.E. 1992. Behavior of Metals in Soils. USEPA Ground Water Issue. Ada, Oklahoma. USEPA Rep
- Meers, E., Ruttens, A., Hopgood, M., Lesage, E., y Tack F.M.G. 2005. Comparison of EDTA and EDDS as Potential Soil Amendments for Enhanced Phytoextraction of Heavy Metals. *Chemosphere*. 58, 1011-1022.
- Meyer, A.F. Lipson, D.A., Martin, A.P., Schadt, C.W., y Schmidt, S.K. 2004. Molecular and Metabolic Characterization of Cold-Tolerant Alpine Soil *Pseudomonas sensu stricto*. *Applied and environmental microbiology*. 70, 483-489.
- Meza-Figueroa, D. *et al.*, 2009. The Impact of Unconfined Mine Tailings in Residential Areas from a Mining Town in a Semi-Arid Environment: Nacozari, Sonora, Mexico. *Chemosphere*. 77, 140–147.
- Mireles, F. *et al.*, 2012. Assessing Urban Soil Pollution in the Cities of Zacatecas and Guadalupe, Mexico by Instrumental Neutron Activation Analysis. *Microchemical Journal*. 103, 158–164.

- Mitchell, K.N. 2016. Stabilization of Metals in Soils and Sediments Contaminated by Mining Activity Using Biomass. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Aguascalientes.
- Mitchell, K.N. *et al.*, 2016. Evaluation of Environmental Risk of Metal Contaminated Soils and Sediments Near Mining Sites in Aguascalientes, Mexico. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 97, 216–224.
- Mithöfer, A., Schulze, B. y Boland, W. 2004. Biotic and Heavy Metal Stress Response in Plants: Evidence for Common Signals. *FEBS Letters*. 566, 1–5.
- Müller G. 1979. Schwermetalle in den Sedimenten des Rheins Veränderungen seit 1971. *Umschau*. 79, 778-783.
- Naik, M.M. y Kumar-Dubey S. 2011. Lead-Enhanced Siderophore Production and Alteration in Cell Morphology in a Pb-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Strain 4EA. *Current Microbiology*. 62, 409–414.
- Nautiyal, C.S. 1999. An Efficient Microbiological Growth Medium for Screening Phosphate Solubilizing Microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*. 170, 265–270.
- Navarro-Noya, Y.E. *et al.*, 2012. Isolation and Characterization of Nitrogen Fixing Heterotrophic Bacteria from the Rhizosphere of Pioneer Plants Growing on Mine Tailings. *Applied Soil Ecology*. 62, 52–60.
- Neupane, G., y Roberts, S.J. 2009. Quantitative Comparison of Heavy Metals and As Accumulation in Agricultural and Forest Soils Near Bowling Green, Ohio. *Water, Air, and Soil Pollution*. 1971, 289-301.
- Nicholson, F.A., Smith, S.R., Alloway, B.J., Carlton-Smith, C., y Chambers, B.J. 2003. An Inventory of Heavy Metals Inputs to Agricultural Soils in England and Wales. *Science of the Total Environment*. 311, 205–219.
- Núñez-López R.A., Meas, Y., Gama, S.C., Ortega-Borges, R., y Olguín, E.J. 2008. Leaching of Lead by Ammonium Salts and EDTA from *Salvinia minima* Biomass Produced During Aquatic Phytoremediation. *Journal of Hazardous Materials*. 154, 623-632.

- Okino, S., *et al.*, 2000. Development of a Biological Mercury Removal-Recovery System. *Biotechnology Letters* 22, 783–788.
- Olaniran, A.O., Balgobind, A. y Pillay, B. 2013. Bioavailability of Heavy Metals in Soil: Impact on Microbial Biodegradation of Organic Compounds and Possible Improvement Strategies. *International Journal of Molecular Sciences*. 14, 10197–10228.
- Olguín, E.J. y Sánchez-Galván, G. 2012. Heavy Metal Removal in Phytoremediation and Phycoremediation: The Need to Differentiate between Bioadsorption and Bioaccumulation. *New Biotechnology*. 30, 3–8.
- Ongley, L.K., Sherman, L., Armienta, A., Concilio, A., y Ferguson-Salinas C., 2007. Arsenic in the Soils of Zimapán, Mexico. *Environmental Pollution*. 145, 793–799.
- Ortiz-Castro, R., Campos-García, J. y López-Bucio, J. 2013. Rapid Identification of Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria Using an Agar Plate Cocultivation System with *Arabidopsis*. *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere*. 1, 345–353.
- Pacheco-Aguilar, R., Peña-Cabriales, J.J., y Maldonado-Vega, M. 2008. Identification and Characterization of Sulfur-Oxidizing Bacteria in an Artificial Wetland That Treats Wastewater from a Tannery. *International Journal of Phytoremediation*. 10, 359–370.
- Palleroni, N.J. 1993. *Pseudomonas* Classification. A New Case History in the Taxonomy of Gram-Negative Bacteria. *Antonie Leeuwenhoek*. 64, 231–251.
- Park, J. H., y Bolan, N. 2013. Lead Immobilization and Bioavailability in Microbial and Root Interface. *Journal of Hazardous Materials*. 261, 777-783.
- Payne, S.M. 1994. Detection, Isolation, and Characterization of Siderophores. *Methods in Enzymology*. 235, 329–344.
- Pedron, F., Rosellini, I., Petruzzelli, G., y Barbafieri, M. 2014. Chelant Comparison for Assisted Phytoextraction of Lead in Two Contaminated Soils. *Resources and Environment*. 4, 209–214.
- Peng, J.F. Song, Y.H., Yuan, P., Cui Y.X., y Qiu, G.L. 2009. The Remediation of Heavy Metals Contaminated Sediment. *Journal of Hazardous Materials*. 161, 633–640.

- Peralta-Videa, J.R., Lopez, M.L., Narayan, M., Saupe, G., y Gardea-Torresdey J. 2009. The Biochemistry of Environmental Heavy Metal Uptake by Plants: Implications for the Food Chain. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 41, 1665–1677.
- Perez-Hernández M.R. 2016. Caracterización de una Cepa de *Rhodococcus* sp. Con Potencial para Biorremediación de Metales Pesados. Tesina de Licenciatura. Universidad Politécnica de Sinaloa.
- Pilon-Smits, E. 2005. Phytoremediation. *Annual Review of Plant Biology*. 56, 15–39.
- Pourrut, B., Shahid M., Dumat, C., Winterton, P., y Pinelli, E., 2011. Lead Uptake, Toxicity, and Detoxification in Plants. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. 213, 113-136.
- Prasad, M.N.V. y Freitas, H. 2003. Metal Hyperaccumulation in Plants - Biodiversity Prospecting for Phytoremediation Technology. *Electronic Journal of Biotechnology*. 6, 110–146.
- Purchase D., Miles J. R., Young T.W.K. 1997. Cadmium Uptake and Nitrogen Fixing Ability in Heavy-Metal-Resistant-Laboratory and Field Strains of *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii. *FEMS Microbiology Ecology*. 22, 85-93.
- Rajkumar, M., Ae, N., Prasad, M.N.V., y Freitas, H. 2010. Potential of Siderophore-Producing Bacteria for Improving Heavy Metal Phytoextraction. *Trends in Biotechnology*. 28, 142–149.
- Rajkumar, M., Sandhya S., Prasad., M.N.V., y Freitas, H. 2012. Perspectives of Plant-Associated Microbes in Heavy Metal Phytoremediation. *Biotechnology Advances*. 30, 1562–1574.
- Rascio, N., y Navari-Izzo, F. 2011. Heavy Metal Hyperaccumulating Plants: How and Why do they do It? And What Makes them so Interesting? *Plant Science*. 180, 169–181.
- Rawlings, D. E., y Silver, S. 1995. Mining with Microbes. *Biotechnology*. 13, 773-738

- Razo, I., Carrizales, L., Castro, J., Díaz-Barriga, F. y Monroy, M. 2004. Arsenic and Heavy Metal Pollution of Soil, Water and Sediments in a Semi-Arid Climate Mining Area in Mexico. *Water, Air, & Soil Pollution*. 152, 129–152.
- Ren, Y.X., Zhu, X.L., Fan, D.D., Ma, P., y Liang, L.H. 2013. Inoculation of Phosphate Solubilizing Bacteria for the Improvement of Lead Accumulation by *Brassica juncea*. *Environmental Technology*. 34, 463-469.
- Romero, F.M. y Gutiérrez-Ruíz, M. 2010. Estudio Comparativo de La Peligrosidad de Jales En Dos Zonas Mineras Localizadas En El Sur Y Centro de México. *Boletín de La Sociedad Geológica Mexicana*. 62, 43–53.
- Romero, F.M., M.A. Armienta, y G. González-Hernández. 2007. Solid-Phase Control on the Mobility of Potentially Toxic Elements in an Abandoned Lead/zinc Mine Tailings Impoundment, Taxco, Mexico. *Applied Geochemistry*. 22, 109–127.
- Santos-Santos, E., *et al.*, 2006. Analysis of Arsenic, Lead and Mercury in Farming Areas with Mining Contaminated Soils at Zacatecas, Mexico. *Revista de La Sociedad Química de México*. 50, 57–63.
- Sarma P., Srinivas, V., Anil, K., y Podile, A. 2012. “Isolation and Purification of Microbial Community DNA from Soil Naturally Enriched for Chitin.” *Biologia*. 67, 644–648.
- Say, R., Denizli, A. y Arica, M.Y. 2001. Biosorption of cadmium(II), lead(II) and copper(II) with the Filamentous Fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Bioresource Technology*. 76, 67–70.
- Schippers, A. y Sand, W. 1999. Bacterial Leaching of Metal Sulfides Proceeds by Two Indirect Mechanisms via Thiosulfate or via Polysulfides and Sulfur. *Applied and Environmental Microbiology*. 65, 319–321.
- Schützendübel, A. y Polle, A. 2002. Plant Responses to Abiotic Stresses: Heavy Metal-Induced Oxidative Stress and Protection by Mycorrhization. *Journal of Experimental Botany*. 53, 1351–65.
- Schwyn, B., y Neilands, J. 1987. Universal Chemical Assay for the Detection and Determination of Siderophores. *Analytical Biochemistry*. 160, 47-56.

SEMARNAT. 2004. Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-147. Que Establece Criterios para Determinar las Concentraciones de Remediación de Suelos Contaminados por Arsénico, Berilio, Cadmio, Cromo Hexavalente, Mercurio, Níquel, Plomo, Selenio, Talio y Vanadio. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 11 de noviembre de 2005

SEMARNAT. 2010. Programa Nacional de Remediación de Sitios Contaminados. Recuperado el 2 de mayo del 2017 de <http://biblioteca.semarnat.gob.mx/janium/Documentos/Ciga/Libros2011/CD000953.pdf>

Servicio Geológico Mexicano. 2013. “Anuario Estadístico de Minería 2012” Edición 2013. Recuperado el 2 de mayo del 2017, de http://www.sgm.gob.mx/productos/pdf/O_Anuario_2012_Edicion%202013.pdf

Shaheen, S.M. y Rinklebe, J. 2014. Geochemical Fractions of Chromium, Copper, and Zinc and Their Vertical Distribution in Floodplain Soil Profiles along the Central Elbe River, Germany. *Geoderma*. 228–229, 142–159.

Sheng, X.F. Xia, J.J., Jiang, C.Y., He, L.Y., y Qian, M. 2008. Characterization of Heavy Metal-Resistant Endophytic Bacteria from Rape (*Brassica napus*) Roots and Their Potential in Promoting the Growth and Lead Accumulation of Rape. *Environmental Pollution*. 156, 1164–1170.

Sheng, X.F. y Xia, J.J. 2006. Improvement of Rape (*Brassica napus*) Plant Growth and Cadmium Uptake by Cadmium-Resistant Bacteria. *Chemosphere*. 64, 1036–1042.

Sherene T. 2010. Mobility and Transport of Heavy Metals in Polluted Soil Environment. *Biological Forum - An international journal*. 2, 112-121

Singh, B.K. *et al.*, 2014. Loss of Microbial Diversity in Soils Is Coincident with Reductions in Some Specialized Functions. *Environmental Microbiology*. 16, 2408–2420.

Smeets, K. *et al.*, 2005. Induction of Oxidative Stress and Antioxidative Mechanisms in *Phaseolus vulgaris* after Cd Application. *Plant Physiology and Biochemistry*. 43, 437–444.

Steinnes E. 2013. Lead. Capítulo de libro. En: “Heavy metals in soils, trace metals and metalloids in soils and their bioavailability”. Alloway, B.J. 3ra edición. Springer, Reading, Reino Unido, 587 pp

Stephen, J.R. y Macnaughton, S.J. 1999. Developments in Terrestrial Bacterial Remediation of Metals. *Current Opinion in Biotechnology*. 10, 230–233.

Tabak, H.H., Lens, P., van Hullebusch, E.D. y Dejonghe, W. 2005. Developments in Bioremediation of Soils and Sediments Polluted with Metals and Radionuclides - 1. Microbial Processes and Mechanisms Affecting Bioremediation of Metal Contamination and Influencing Metal Toxicity and Transport. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*. 4, 115–156.

Tamura, K. *et al.*, 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*. 24, 1596–1599.

Taylor, S.R., y McLennan, S.M. 2001. Chemical Composition and Element Distribution in the Earth's crust. *Encyclopedia of Physical Science and Technology*.

Tessier, A., Campbell, P.G.C. y Bisson, M. 1979. Sequential Extraction Procedure for the Speciation of Particulate Trace Metals. *Analytical Chemistry*. 51, 844–851.

Trejo-Acevedo, A. *et al.*, 2009. Exposure Assessment of Persistent Organic Pollutants and Metals in Mexican Children. *Chemosphere*. 74, 974–980.

Turekian, K.K., y Wedepohl, K.H. 1961. Distribution of the Elements in Some Major Units of the Earth's Crust. *Geological Society of America Bulletin*. 72, 175-192.

Uddin, M.K. 2017. A Review on the Adsorption of Heavy Metals by Clay Minerals, with Special Focus on the Past Decade. *Chemical Engineering Journal*. 308, 438–462.

USEPA. 2007. Method 7000B Rev. 2. Washington DC: United States Environmental Protection Agency.

Valls, M. y De Lorenzo, V. 2002. Exploiting the Genetic and Biochemical Capacities of Bacteria for the Remediation of Heavy Metal Pollution. *FEMS Microbiology Reviews*. 26, 327–338.

Vega, F.A., Covelo, E.F. y Andrade, M.L. 2009. The Role of Cation Exchange in the Sorption of Cadmium, Copper and Lead by Soils Saturated with Magnesium. *Journal of Hazardous Materials*. 171, 262–267.

- Vera, J.A., *et al.*, 2006. Improving Agriculture Productivity in the Savannah of Tabasco State, Mexico. I. Management of Maize and Sorghum Production Systems. In: International Atomic Energy (IAEA), eds. Management Practices to Improving Sustainable Crop Production in Tropical Acid Soils. 1st ed., Vienna. (Austria) IAEA Proceedings Series. p. 255-272
- Villanueva-F., S. y Botello-V., A. 1992. Metales Pesados En La Zona Costera Del Golfo De México Y Caribe Mexicano: Una Revisión. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 8, 47–61.
- Violante, A, Cozzolino, V., Perolomov, L., Caporale, A.G., y Pigna, M. 2010. Mobility and Bioavailability of Heavy Metals and Metalloids in Soil Environments. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. 10, 268–292.
- Volke-Sepulveda T., Velasco-Trejo J.A. y de la Rosa Pérez D.A. 2005. Suelos Contaminados por Metales y Metaloides: Muestreo y Alternativas para su Remediación. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología. Ciudad de México, México, 144 pp.
- Walkley, A. y Black, I.A. 1934. An Examination of the Degtjareff Method for Determining Soil Organic Matter, and a Proposed Modification of the Chromic Acid Titration Method. *Soil Science*. 37, 29–38.
- Wang, Y. *et al.*, 2011. Assessment of Heavy Metals in Sediments from a Typical Catchment of the Yangtze River, China. *Environmental Monitoring and Assessment*. 172, 407–417.
- Watanabe, F.S. y S.R. Olsen. 1965. Test of an Ascorbic Acid Method for Determining Phosphorus in Water and NaHCO₃ Extracts from Soil. *Soil Science Society of America Journal*. 29, 677.
- Watanabe, K. 2001. Microorganisms Relevant to Bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology*. 12, 237–241.
- White, C., Sharman, A.K., y Gadd, G.M. 1998. An Integrated Microbial Process for the Bioremediation of Soil Contaminated with Toxic Metals. *Nature Biotechnology*. 16, 572-575

Wiatrowski, H.A., Ward, P.M., y Barkay, T. 2006. Novel Reduction of Mercury (II) by Mercury-Sensitive Dissimilatory Metal Reducing Bacteria. *Environmental Science & Technology*. 40, 6690-6696.

Wuana, R.A. y Okieimen, F.E. 2011. Heavy Metals in Contaminated Soils: A Review of Sources, Chemistry, Risks and Best Available Strategies for Remediation. *ISRN Ecology*. 2011, 1–20.

Yáñez, L. *et al.*, 2003. DNA Damage in Blood Cells from Children Exposed to Arsenic and Lead in a Mining Area. *Environmental Research*. 93, 231–240.

Yin, H. *et al.*, 2015. An Integrated Insight into the Response of Sedimentary Microbial Communities to Heavy Metal Contamination. *Scientific Reports*. 5, 14266.

Young, D.S. 2013. Chemistry of Heavy Metals and Metalloids in Soils. Capítulo de libro. En: “Heavy metals in Soils, Trace Metals and Metalloids in Soils and their Bioavailability”. Alloway, B.J. 3ra edición. Springer, Reading, Reino Unido, 587 pp

Zeng, F. *et al.*, 2011. The Influence of pH and Organic Matter Content in Paddy Soil on Heavy Metal Availability and Their Uptake by Rice Plants. *Environmental Pollution*. 159, 84–91.

Zetina Rodríguez, M.C. 2011. La Historia de un Tesoro que se Convirtió en un Desastre Ambiental, La Zacatecana, Ejido de Guadalupe, Zacatecas. *Revista El Colegio de San Luis*. 4, 160–194.

XI. ANEXOS

ANEXO 1. Composición de medios de cultivo utilizados en el presente estudio.

Preparación de medio mínimo M9:

Reactivo	Cantidad (para 1 L)
Na ₂ HPO ₄	6.0 g
KH ₂ PO ₄	3.0 g
NaCl	0.5 g
NH ₄ Cl	1.0 g

Ajustar pH a 6.8 con HCl concentrado y KOH y esterilizar la solución salina en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Agregar:

MgSO ₄ (1.0 M)*	2.0 mL
Glucosa (20%)*	10.0 mL
CaCl ₂ (1.0 M)*	0.1 mL

* Esterilizar por separado en autoclave a 121 °C durante 15 minutos y agregar a la solución salina la cantidad determinada en esterilidad.

Composición de la solución Winston

Reactivo	Cantidad (para 100 mL)
SDS	1 g
Tritón X-100	25 mL
NaCl	584.4 mg
Tris HCl	157.6 mg
EDTA	87.22 mg

Esterilizar por filtración

Composición de medio LGI

Reactivo	Cantidad (para 1 L)
Sucrosa	5 g
K ₂ HPO ₄	0.2 g
KH ₂ PO ₄	0.6 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2 g
CaCl ₂	0.02 g
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.002 g
FeCl ₃	0.01 g
Azul de bromotinol	0.5% en KOH 2 N (5ml)

Ajustar el pH a 6.1 y esterilizar en autoclave

Composición medio PVK (Pikowskaya):

Reactivo	Cantidad (para 1 L)
Glucosa	10 g
Ca ₃ (PO ₄) ₂	5 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5 g
NaCl	0.2 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.1 g
KCl	0.2 g
Extracto de levadura	0.5 g
MnSO ₄ H ₂ O	0.002 g
FeSO ₄ 7H ₂ O	0.002 g

Esterilizar en autoclave

1 **Spatial variability of heavy metals in soils and sediments of “La Zacatecana” Lagoon,**
2 **Mexico.**

3

4 Sergio A. Covarrubias¹, Juan Armando Flores de la Torre^{2,3}, María Maldonado Vega⁴, Javier
5 Avelar González², and Juan José Peña Cabriales^{1*}.

6

7 1. *Laboratorio de Microbiología Ambiental. Departamento de Bioquímica y Biotecnología.*
8 *Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Unidad*
9 *Irapuato.*

10 2. *Universidad Autónoma de Aguascalientes, Avenida Universidad #940, Aguascalientes,*
11 *20231 Aguascalientes, México.*

12 3. *Universidad Autónoma de Zacatecas, Unidad Académica de Ciencias Químicas, Campus*
13 *Siglo XXI, Zacatecas, México.*

14 4. *Dirección de Planeación, Enseñanza e Investigación del Hospital Regional de Alta*
15 *Especialidad del Bajío.*

16

17 Correspondence should be addressed to Juan José Peña Cabriales; jpena@ira.cinvestav.mx

18

19 **Abstract**

20 Anthropogenic activities have greatly increased heavy metal pollution world-wide. Due to
21 inadequate waste management, mining is one of the chief causes. One particularly affected
22 area in Mexico is the "La Zacatecana" lagoon, in the municipality of Guadalupe, Zacatecas.
23 From colonial times until the mid-nineteenth century about 20 million tons of mine tailings
24 were deposited at this site. Here we catalogue the heavy-metal content and their distribution
25 in soils and sediments of La Zacatecana. The mobility of lead in soils was also assayed by
26 sequential extraction. Concentrations of the different metals analysed were as follows: Pb >
27 Cr > As > Ni > Hg > Cd. Site VIII accumulated the highest amount of Pb (3070 mg. kg⁻¹),
28 seven -fold more than the limit established by the Mexican standards for agricultural soils (i.
29 e., 400 mg. kg⁻¹). On the other hand, the contents of Cd, Cr, and Ni were within the levels
30 accepted by the above normativity, set at 37, 280, and 1600 mg. kg⁻¹, respectively.
31 Concentrations of Hg and Pb were highest in the North-northwest zone of the lagoon and
32 decreased towards the southeast. Except for Site VIII where 30 % of the Pb was in an
33 interchangeable form or bound to carbonates, most Pb in La Zacatecana soils was present in
34 an unavailable form, associated with Fe-Mn oxides.

35

36 **1. Introduction**

37 Heavy metal pollution is largely attributable to human activities, especially mining.
38 Extraction and purification of minerals generates vast amounts of solid wastes (also called
39 mine tailings) that degrade soils and render them unsuitable for agriculture. Mining
40 contributes greatly to soil degradation by generating waste which generally occupies large
41 areas [1]. Much mining waste still contains large quantities of heavy metals that move
42 through the environment in changed redox states. Once in soils, metals can enter the trophic
43 chain by via accumulation in plants [2], causing both environmental and animal health
44 problems.

45 Mexico is one of the countries most affected by heavy metal pollution of soils,
46 especially in the state of Zacatecas, the most important producer of silver in the country. The
47 mine tailings from the old mining district of Zacatecas (located in the municipality of
48 Guadalupe, Zacatecas), were deposited in the La Zacatecana lagoon from the beginning of
49 the Colonial period until the early XIX century. From 1920 to 2010, processing of tailings
50 for the recovery of mercury also occurred [3-4]. Since then, this zone has been used for
51 agriculture, especially to cultivate beans and maize, but reports of accumulation of arsenic
52 and lead in tissues of these plants have been published [5].

53 Studies of mercury levels and other toxic metals have been conducted in the La
54 Zacatecana lagoon [6], but detailed assessments of the spatial distribution and the availability
55 of metals, especially lead have not been undertaken. As the impact of toxic metals percolates
56 throughout the food chain, we set out to fill the gaps in knowledge by: (1) determining the
57 total contents and distribution patterns of metals in soils and sediments; (2) evaluating the
58 mobility of lead in soils by sequential extraction techniques, and; (3) assessing the ecological
59 risk of heavy-metal contamination in the La Zacatecana lagoon.

60

61 **2. Material and Methods**

62 *2.1 Site Description.*

63 The ‘‘ La Zacatecana’’ lagoon is located in the municipality of Guadalupe (22°44’50’’ N,
64 102°28’10’’ W) in the South-eastern corner of the state of Zacatecas, Mexico (Figure 1) and
65 has a flood extension area of 200 ha. The nearby town of La Zacatecana has approximately
66 3,200 inhabitants. With an annual average temperature of 16 °C, an average rainfall of 510
67 mm and at an altitude of 2,400 meters above sea level, the climate is dry



68

69 FIGURE 1: The Zacatecas metropolitan area. A. Location of the La Zacatecana lagoon in
70 reference to the cities of Zacatecas and Guadalupe. B. Sampling sites in the La Zacatecana
71 lagoon

72

73 *2.2 Soil Sampling and Characterization*

74 Soil and sediment samples were gathered during the rainy season in May 2015. Fourteen
75 samples from different parts of the lagoon were collected. Before analysis, the samples were
76 air-dried at room temperature, milled, and sieved through a 2 mm nylon mesh. The total
77 concentration of metals was determined according to the EPA Method 7000B [7].
78 Approximately 0.5 g of soil and sediment were digested overnight in 10 mL of HNO₃
79 contained in Erlenmeyer flasks. The samples were then heated at 120 °C for 3 h. After
80 cooling, the samples were filtered through #50 Whatman cellulose filters. Total metal
81 contents of the samples were determined using atomic absorption spectrophotometry and a
82 flame-ionisation detector (PerkinElmer, Waltham, MA, USA - PinAAcle 900H). NIST SRM-
83 2586 (Trace Elements in Soil Containing Lead from Paint) was used as the standard reference
84 material (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA).

85 pH was measured in soil suspensions with deionised water. Electrical conductivity
86 (EC) was determined in the soil-water extracts using a conductivity meter (HI 98130, Combo
87 Hanna Instruments, Woonsocket, RI, USA). Organic matter (OM) was determined by the

88 Walkley-Black metric titration method [8]. Redox potential was measured
89 potentiometrically.

90

91 2.3 *Spatial distribution of heavy metals*

92 Spatial distribution maps of metals were generated from *Kringing* interpolation data from
93 sampling sites using Surfer[®] 9 (Golden Software, LLC).

94

95 2.4 *Geo Accumulation Index and Potential Ecological Risk Assessment*

96 Müller [9] proposed the Geo Accumulation Index (*I_{geo}*) to assess metal pollution in soils
97 and sediments. *I_{geo}* was calculated as follows;

98 $I_{geo} = \log_2 \left(\frac{C_n}{1.5B_n} \right)$, where C_n is the measured concentration of metal in soil, B_n is the

99 background value of the metals, in this case, the mean concentration of metals in soil from a

100 control site (without mining activity) in Zacatecas State. The values obtained were 13, 2.7

101 and 8 mg. kg⁻¹ for Pb, As and Hg respectively. High levels of Cr and Ni 74 and 40 (mg. kg⁻¹)

102 were found but the Cd levels (0.9 mg. kg⁻¹) were low. Due to lithogenic effects, 1.5 was

103 the background matrix correction factor. The *I_{geo}* values were compared with the seven

104 classes proposed by Müller (1979) (Table 1).

105

106 TABLE 1: Classification of pollution intensity as proposed by Müller [9]

107

	Class	Pollution intensity
< 0	0	Unpolluted
0 - 1	1	Unpolluted to moderately polluted
1 - 2	2	Moderately polluted
2 - 3	3	Moderately to Heavily polluted
3 - 4	4	Heavily polluted
5 - 6	5	Heavily to extremely polluted
> 6	6	Extremely polluted

108

109 Hakanson [10] introduced the Potential Ecological Risk Assessment (E_{RI}) as a diagnostic tool
 110 for metal polluted environments. E_{RI} is calculated as follows;

111
$$E_r^i = T_r^i \times \frac{C^i}{C_0^i}$$

112

113 $E_{RI} = \sum_{i=1}^7 E_r^i$, where E_r^i is the monomial potential ecological risk factor; C^i is the
 114 concentration of the specific metal (and C_0^i is the background reference value); T_r^i is the metal
 115 toxicity factor (Pb and Ni = 5, As = 10, Hg = 40, Cd = 30, Cr = 2). E_{RI} 's are then categorised
 116 as follows; $E_{RI} < 150$, low ecological risk; $150 < E_{RI} < 300$, moderate ecological risk; $300 <$
 117 $E_{RI} < 600$, considerable ecological risk; $E_{RI} > 600$, very high ecological risk.

118

119 *2.5 Soil Lead Fractionation*

120 Lead fractionation in soils was determined according to the Tessier five-step protocol [11].

121 Exchangeable Pb (F1), Pb bound to carbonate (F2), Pb bound to Fe-Mn oxides (F3), Pb

122 bound to organic matter (F4), and residual PB (F5) were determined on 1 g of soil. The lead
123 content was measured by flame-ionisation atomic absorption spectrometry.

124

125 2.6 Data Analysis

126 The XLSTAT software version 2017.1 was used to calculate the statistics. One-way ANOVA
127 tests were used to determine differences in metal contents between sample sites, followed by
128 Tukey's *post hoc* test. Correlation analyses were applied to seek a possible common source
129 of metals.

130

131 3. Results and Discussion

132 3.1 Total Metal Concentrations and Soil Properties

133 Lead was the most abundant heavy metal found while chromium, arsenic etc. were
134 present in decreasing amounts ($Pb > Cr > As > Ni > Hg > Cd$). 3,070 mg. kg⁻¹ Pb was found
135 at Site VIII which is seven times higher than Mexican reference for agricultural soils (400
136 mg. kg⁻¹). Total metal contents obtained here (Table 2) were compared with the Mexican
137 guideline sNOM-147 [12] and with the Canadian Environmental Quality Guidelines
138 (CEQGs) for agricultural soil, which are as follows: As = 12, Cd = 1.4, Cr = 64, Hg = 6.6,
139 Ni = 45, and Pb = 70 (mg. kg⁻¹) [13]. Hg and Pb and concentrations were higher than Mexican
140 reference values at some sampling sites, while Cd, Cr and Ni concentrations did not surpass
141 the limits set by the same norm (37, 280, and 1600 mg. kg⁻¹ respectively) at any site.
142 Contrariwise, all sampling sites had Hg and As concentrations that surpassed those
143 established by the CEQGs, while Pb levels were within the limit (i. e., 70 mg. kg⁻¹) only in
144 sites V, VI and VII. A similar situation was found for Cd, Cr and Ni concentrations, which
145 exceeded the CEQGs at some sampling points (Table 2).

146 The total concentration of As in La Zacatecana soils was considerably lower than that
147 found at other places. The 991 mg. kg⁻¹ of arsenic found by Iskander et al. [6]) was almost
148 10 times higher than the maximum content of arsenic founded here (101 mg. kg⁻¹). The

149 maximum concentration of Hg in the soil (47 mg. kg⁻¹) was similar to the concentrations
150 founded by Santos-Santos et al. [14] and Gávilan-Garcia et al. [3] with 36 and 48 mg. kg⁻¹
151 respectively.

152 More recently, Gonzalez-Davila, et al. [5] reported the disposal of new tailings in the
153 La Zacatecana lagoon, finding concentrations of Pb, As and Hg of 5660, 290 and 506 mg.
154 kg⁻¹ respectively, near Site VIII. Obviously, recently deposited tailings contain higher
155 concentrations of heavy metals that leach-out over time and migrate through the soil profile
156 to the deeper layers [15]. Since sampling in this study was restricted to a depth of 30 cm, we
157 were not able to analyse this phenomenon.

158 Correlations between Pb, As, and Hg (Table 3) were positive and significant at $p <$
159 0.05 indicating a common source for these elements in the La Zacatecana lagoon soils, which
160 could be anthropogenic due to its higher values comparing to control site. On the other hand,
161 Cd, Cr and Ni also showed a positive correlation which suggested a different origin for these
162 metals. In this regard, Cevik *et al.* [16] and Shafi *et al.* [17] suggested that relationships
163 between metals may vary significantly depending on their geochemical origin, including
164 parent material of the soil and soil type.

165 Alkaline pH conditions prevailed in soils and sediment samples (Table 4.). The
166 highest pH value (9.6) was found at Site III, whereas the minimum value of 7.7 was observed
167 at Site VII. High pH reduces Pb and Cd availability in soils through complex formation with
168 Fe-Mn oxyhydroxides [18]. Salinity, measured as metal conductivity (dS.m⁻¹) in La
169 Zacatecana lagoon soils, was normal based on USDA (2002) classifications.

170 To a large extent, organic matter (OM) content determines the mobility and
171 bioavailability of heavy metals in soils. Metals can form stable complexes with humic
172 substances present in organic matter [19]. Almost 60 % of the sampling sites had high organic
173 matter contents of more than 2 %. Site I was highest amount (OM of 4.6 %), while Site XIV
174 had only 1.2 % OM.

175 Of the parameters measured, redox potential varied the most, ranging from - 121 to
176 308 mV. Based on the findings of others [20-21], most of the Zacatecana lagoon soils and
177 sediments could be classified as reduced or moderately reduced (Eh between - 100 and + 400
178 mV). Only Site I corresponded to a highly reduced soil (Eh - 121 Eh). This is important
179 because under reducing conditions, the availability of metals is reduced due to formation of
180 insoluble compounds with sulphide and the increase of the adsorption of metals on Mn and
181 Fe oxides. [22]. Under oxidizing conditions, the solubility of the metals in water increases as
182 they are more likely to be found in the free ionic form [23].

183 TABLE 2: Means and standard errors of heavy metal concentrations in soils and sediments from the La Zacatecana lagoon. Sites denoted
 184 by different capital letters in the same column differ significantly at $P < 0.05$ in one-way ANOVA, according to Tukey's post hoc
 185 analysis. Metal concentrations are expressed as mg. kg^{-1} .

Sampling site	Pb	As	Hg	Cd	Cr	Ni
I	94 ± 4 e	30 ± 0.9 cd	38 ± 2.9 abc	16 ± 0.02 b	74 ± 2.4 a	76 ± 1.6 a
II	162 ± 42 de	27 ± 1 de	41 ± 11 bc	ND	19 ± 0.9 efg	19.9 ± 1.0 d
III	121 ± 2.7 de	21. ± 1.4 efg	15 ± 4.8 bcd	ND	32 ± 0.7 d	23 ± 1.2 d
IV	72 ± 1.8 e	19 ± 0.8 fg	18 ± 4.3 bcd	21 ± 0.1 a	64 ± 0.4 b	60 ± 0.7 b
V	60 ± 9.4 e	17 ± 1.3 g	12 ± 6.3 cd	ND	18 ± 0.9 efg	15 ± 0.5 e
VI	48 ± 4.8 e	16 ± 2.1 gh	7.9 ± 4 d	ND	22 ± 0.6 efg	9 ± 0.1fg
VII	29 ± 1.2 e	9.3 ± 1.1 h	7.7 ± 1.3 d	ND	19 ± 0.6 efg	9 ± 0.2 fg
VIII	3070 ± 20 a	28 ± 1.4 cde	10 ± 0.3 cd	ND	17 ± 1.4 efg	6 ± 0.2 g
IX	545 ± 44 c	35 ± 1.2 c	47 ± 11 a	ND	17 ± 1.0 fg	10 ± 0.3 ef
X	742 ± 62 b	80 ± 1.4 b	47 ± 8.2 a	ND	15 ± 1.4 g	14 ± 0.5 e
XI	88 ± 3 e	18 ± 0.4 g	9 ± 0.1 d	ND	25 ± 1 def	24 ± 0.5 d
XII	760 ± 71 b	101 ± 2.8 a	24 ± 0.2 abcd	8 ± 0.1 c	67 ± 3.6 ab	74 ± 1.4 a
XIII	87 ± 6.3 e	17 ± 0.8 g	8 ± 0.1 d	ND	25 ± 0.7 de	22 ± 0.2 d
XIV	280 ± 31 d	26 ± 1.3 de	12 ± 0.3 cd	ND	44 ± 0.9 c	42 ± 0.7 c

186 ND = Non-Detected

187

188 TABLE 3. Correlation matrices for metal concentrations.

189

Metals	Pb	As	Hg	Cd	Cr	Ni
Pb	1.00					
As	0.86**	1.00				
Hg	0.52*	0.59**	1.00			
Cd	- 0.11	0.24	0.23	1.00		
Cr	- 0.19	0.01	0.02	0.74**	1.00	
Ni	0.12	0.32	0.26	0.73**	0.86**	1.00

190 * $p < 0.05$

191 ** $p < 0.01$

192

193 TABLE 4: Mean and standard errors of physico-chemical characteristics of soil and
 194 sediments from the La Zacatecana lagoon. Sites denoted by different capital letters in the
 195 same column differ significantly at $P < 0.05$ in one-way ANOVA tests (Tukey's *post hoc*
 196 analysis).

Sampling sites	pH	Electrical conductivity (dS/ m)	Organic matter content (%)	Redox potential (mV)
I	8.7 ± 0.1 cd	1.7 ± 0.1 b	4.3 ± 0.2 a	- 121± 19 h
II	8.5 ± 0.1 de	0.7 ± 0.05 f	1.5 ± 0.05 ef	12 ± 6 fg
III	9.6 ± 0.1 a	1.2 ± 0.1 d	1.7 ± 0.1 e	14 ± 5 fg
IV	9 ± 0.1 b	1.7 ± 0.1 b	1.5 ± 0.1 ef	194 ± 13 bc
V	8.3 ± 0.00 e	1 ± 0.05 e	2.9 ± 0.1 c	26 ± 7 f
VI	8.5 ± 0.01 de	1.3 ± 0.05 c	2.6 ± 0.1 cd	23 ± 4 fg
VII	7.7 ± 0.1 g	0.4 ± 0.05 g	2.3 ± 0.1 d	86 ± 27 e
VIII	7.8 ± 0.1 g	2 ± 0.00 a	1.6 ± 0.10 ef	308 ± 0.3 a

IX	8 ± 0.05 f	1 ± 0.02 e	3.9 ± 0.1 ab	109 ± 3 de
X	7.8 ± 0.05 fg	1.6 ± 0.05 b	3.6 ± 0.1 b	149 ± 6 cd
XI	8.9 ± 0.05 bc	1.3 ± 0 cd	1.2 ± 0.05 f	271 ± 6 a
XII	8.9 ± 0.05 bc	0.8 ± 0 f	2.4 ± 0.05 d	202 ± 6 b
XIII	8.9 ± 0.05 bc	19 ± 0 a	3.4 ± 0.1 b	$- 6.5 \pm 8.8$ fg
XIV	8.9 ± 0.05 bc	0.9 ± 0.01 e	1.2 ± 0.05 f	$- 26 \pm 10$ g

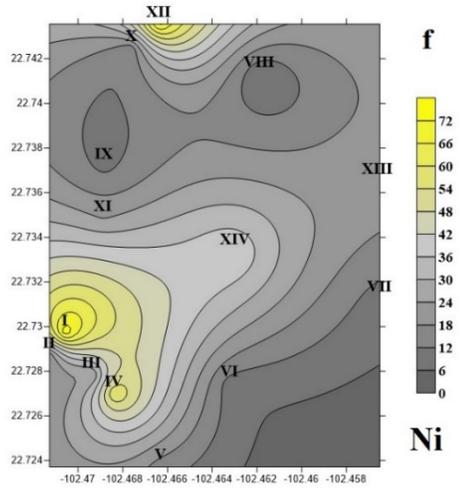
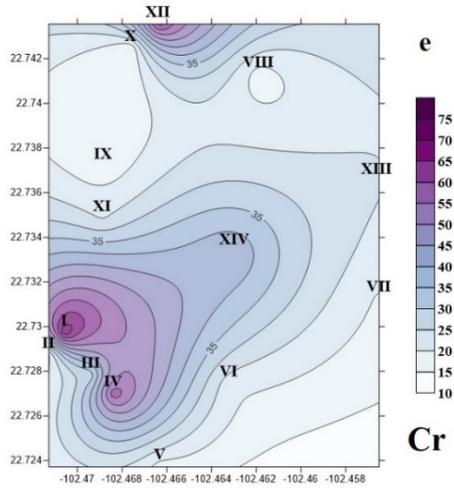
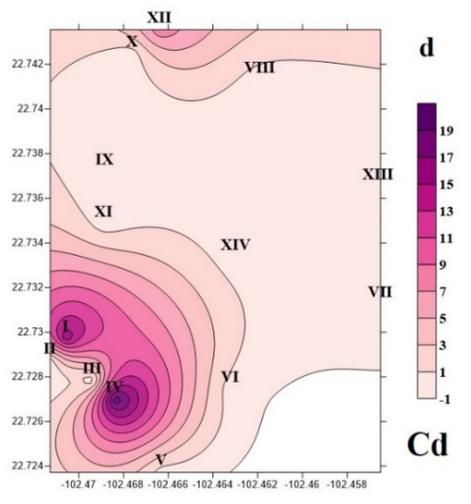
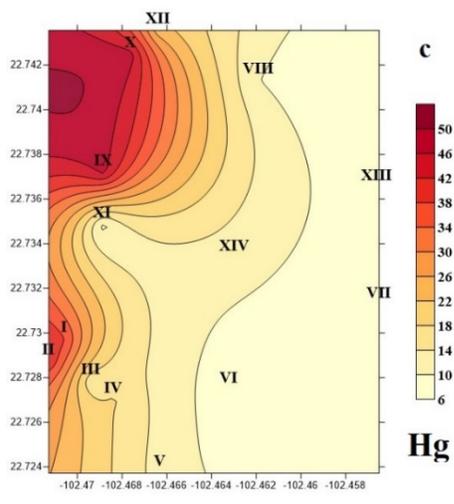
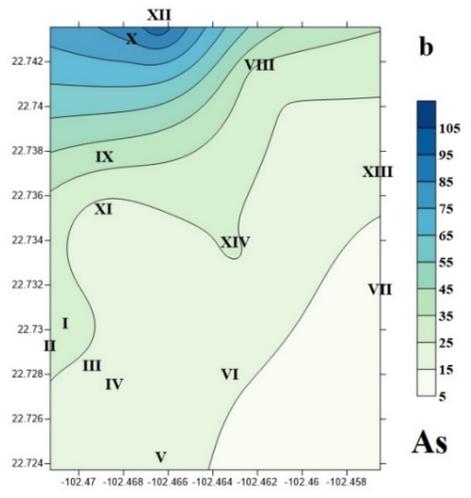
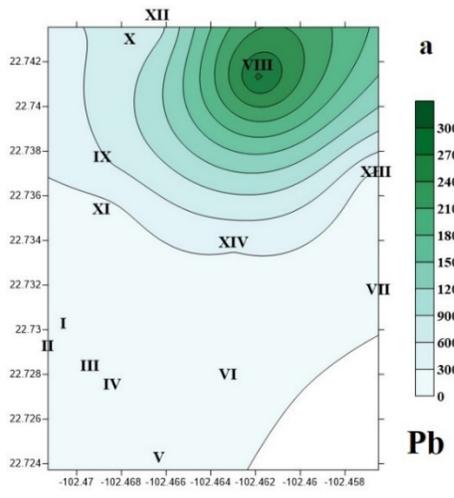
197

198 *3.2 Spatial distribution of metals*

199 Similar patterns of spatial distribution were observed for Pb, As and Hg (Fig. 2). The
200 hot-spot areas for these metals were located in the northern area of the lagoon. This area
201 coincides with the recent disposal of tailings reported by Gonzalez Davila et al [5]. As
202 expected, the distribution of heavy metals declined in the South-westerly direction.
203 Conversely, the maximum concentrations of Cd, Cr and Ni were observed at sites I and IV
204 in the South-east area of the lagoon. As we previously mentioned, Cd, Cr, and Ni were
205 positive correlated, which corresponds with the spatial distribution shown for these metals.

206

207



209 FIGURE 2: Spatial distribution of heavy metal concentrations in the area of the la Zacatecana
210 lagoon. a) Lead, b) arsenic, c) mercury, d) cadmium, e) chromium f) nickel. Values are
211 expressed as mg. kg⁻¹.

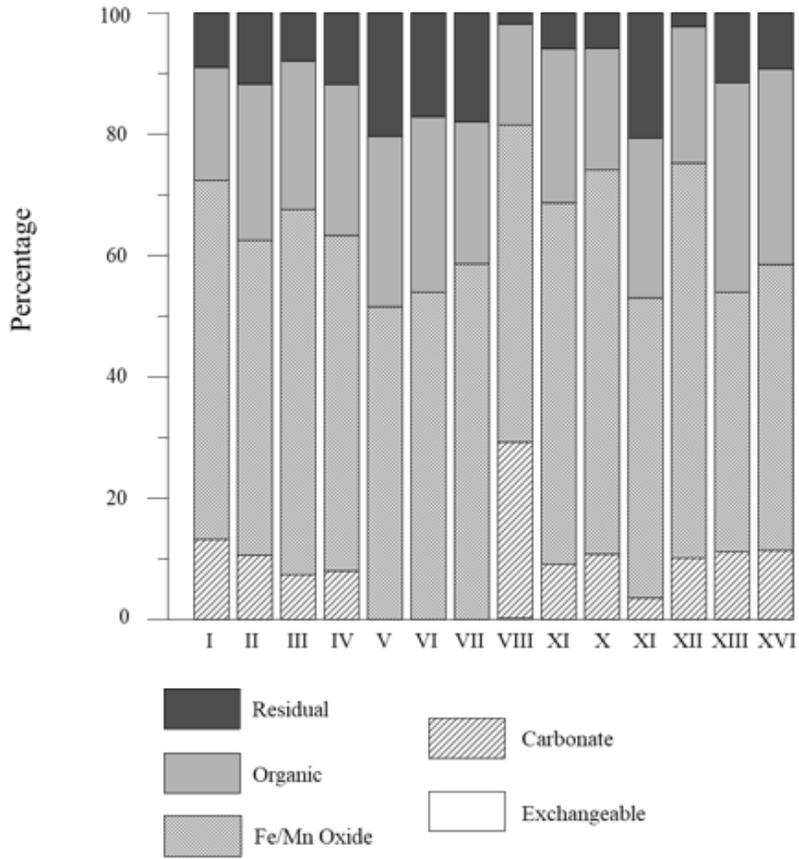
212

213 *3.3 Fractionation of lead in soils*

214 The sequential extraction procedure that was used to determine lead availability in
215 the La Zacatecana samples, showed a predominance of readily mobilisable Pb (F1, F2) over
216 Fe- and Mn-oxide bound fractions (F3), followed by organic matter associated fractions (F4)
217 (57 % and 19 % respectively) (Fig 3). Nineteen percent of the total Pb was bound to carbonate
218 (F2). Significant differences ($p < 0.05$) were found between F4 and F2. Pb associated with
219 the residual fraction (F5) represented 4.5 % of the total whereas the exchangeable fraction
220 (F1) was very low (0.1 %).

221 At 29 %, Site VIII had the highest amount of easily mobilisable Pb (F1, F2)
222 representing 896 mg. kg⁻¹ of Pb that could be released from the soil matrix. Steinnes [24]
223 suggested that Pb availability depends to a large extent on the percent soil organic matter
224 since at low pH (< 5) Pb is strongly bound to humic acids [25]. This hypothesis is in
225 agreement with the data reported for Site VIII which had the lowest percentage of organic
226 matter (1.6 %) and a neutral to slightly alkaline pH. At these pHs, Pb solubility can be
227 increased due to the formation of Pb-hydroxyl complexes (Mcbride [26]).

228



229

230 FIGURE 3: Distribution of lead in soil and sediments of the La Zacatecana lagoon as
 231 determined by sequential extraction.

232

233 3.4 Geo accumulation index and Environmental risk assessment

234 Based on the Müller scale, the calculated *Igeo* values for Cr, Hg and Ni belong to
235 class 0 - 1, indicating that the La Zacatecana lagoon soils are not contaminated by these
236 elements (Table 5). The highest *Igeo* value recorded was 7.3 for Pb at Site VIII, which
237 corresponds to a highly polluted soil. *Igeo* values for As indicated that La Zacatecana soils
238 are moderately to strongly polluted by this element. In contrast, Cd was only detected at sites
239 I, IV, and XIII for which *Igeo* value suggest strong pollution, although the Cd concentration
240 did not exceed the maximum concentration allowed by the Mexican standard (37 mg. kg⁻¹).

241 Hakanson's [10] guidelines suggested that 50 % of the sampling sites with an E_{RI} of
242 less than 300 (Fig. 4) were only at moderate environmental risk. In contrast, the other 50 %
243 of the sampling sites with E_{RI} values ranging from 369 to 1336 lay between considerable
244 ecological risk to very high ecological risk - Site II and Site VIII respectively. Nevertheless,
245 the use of international background values to estimate contamination indices can lead to an
246 overestimation of pollution levels in soil, especially in mining areas where the parent
247 materials contain large numbers of metals (Karbassi et al. [27]). This of course is true of the
248 State of Zacatecas.

249 The results show high concentrations of Pb, As, and to a lesser extent Hg, in the
250 Zacatecana lagoon sediments. However, the metal distribution heat-maps indicate that the
251 accumulation of above metals is mainly localized in the northwest sediments of this water
252 body. Therefore, considering that most crops grown in the bed of the lagoon in the dry season
253 are used for local consumption, care should be exercised to avoid using this particular section
254 for agricultural use. The latter, to avoid the possibility of introducing these contaminants into
255 the food web trophic structure.

256

257

258 TABLE 5: Geo-accumulation index (*Igeo*) values of heavy metals of soils and sediments,
259 from the different sampling sites of the La Zacatecana lagoon.

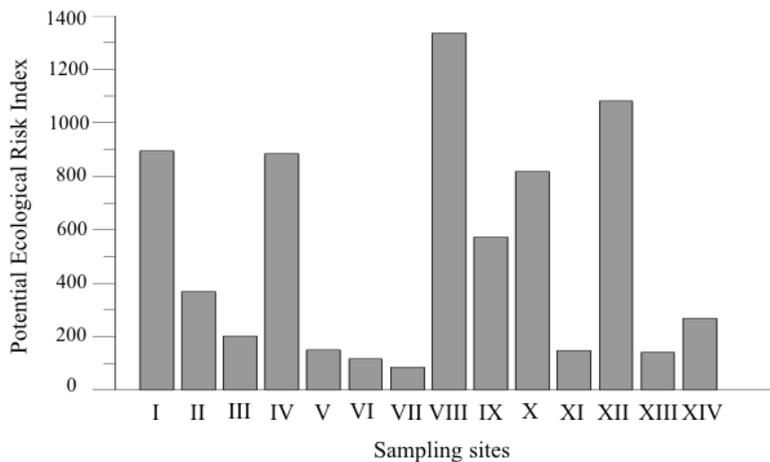
260

Site sampling	Igeo					
	Pb	As	Hg	Cd	Cr	Ni
I	2.3	2.9	1.6	3.6	- 0.6	0.3
II	3.1	2.7	1.8	ND	- 2.5	- 1.6
III	2.6	2.4	0.3	ND	- 1.8	- 1.4
IV	1.9	2.3	0.6	3.9	- 0.8	0
V	1.6	2.1	0.03	ND	- 2.6	- 2
VI	1.3	2.0	- 0.6	ND	- 2.3	- 2.7
VII	0.6	1.2	- 0.7	ND	- 2.5	- 2.7
VIII	7.3	2.8	- 0.3	ND	- 2.7	- 3.4
IX	4.8	3.1	1.9	ND	- 2.7	- 2.5
X	5.3	4.3	2.0	ND	- 2.8	- 2.1
XI	2.2	2.1	- 0.4	ND	- 2.2	- 1.3
XII	5.3	4.7	1.0	2.6	- 0.7	0.3
XIII	2.2	2.1	- 0.6	ND	- 2.1	- 1.4
XIV	3.8	2.7	- 0.01	ND	- 1.3	- 0.5

261 ND= Not-Detected

262

263



264

265

266 FIGURE 4: Potential ecological risk indices of soils and sediments from the sampling sites

267 at the La Zacatecana lagoon.

268

269 **4. Conclusions**

270 Based on Mexican and Canadian reference values for agricultural soils, our results show that
271 soils and sediments of the La Zacatecana lagoon are contaminated with Pb, As and Hg.
272 Highest contamination levels were found in the Northwest zone of the study area. The most
273 abundant metal in the system was Pb, but its high concentrations were probably not as
274 harmful as seems apparent since sequential extraction tests indicated that most of the Pb (76
275 %). was in an unavailable form bound to Fe and Mn oxides as well as organic matter. Based
276 on Igeo and E_{RI} indices, Site VIII was the most contaminated (especially with Pb) of all sites
277 in the sampling areas. High concentrations of available Pb at Site VIII could also be due to
278 the high redox potential and to the low percentage of organic matter found in the soil of this
279 site. The results obtain suggest that the population living around the Zacatecana lagoon
280 should be tested for Hg, As and Pb levels in blood and urine. This is recommended as a safety
281 measure to discard possible health complications due to heavy metal contamination,
282 particularly in children and the elderly, which constitute the most vulnerable segment of the
283 population.

284

285 **Conflicts of interest**

286 The authors declare that there are no conflict of interests regarding publication of this
287 research.

288

289 **Acknowledgments**

290 This research was funded by the *Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología* (CONACYT,
291 México), through project FOINS-214108. The authors thanks Laura Yamamoto Flores from
292 the Universidad Autónoma de Aguascalientes, Luis E. Hernández Rodríguez and José
293 Antonio Vera Nuñez from Cinvestav for technical assistance.

294

295 **References**

- 296 [1] M. Li, "Ecological restoration of mineland with particular reference to the
297 metalliferous mine wasteland in China: a review of research and practice," *Science*
298 *of Total Environment*, vol. 357, no. 1-3, pp. 38-53, 2006.
- 299 [2] A. J. M. Baker, "Accumulators and excluders strategies in the response of plants to
300 heavy metals," *Journal of Plant Nutrition*, vol. 3, no. 1-4, pp. 643-654, 1981.
- 301 [3] I. Gavilán-García, E. Santos-Santos, L. R. Tovar-Gálvez, A. Gávilan-García, S.
302 Suárez, and J. Olmos, "Mercury Speciation in Contaminated Soils from Old Mining
303 Activities in Mexico Using a Chemical Selective Extraction," *Journal of Mexican*
304 *Chemical Society*, vol. 52, no. 4, pp. 263-271, 2008.
- 305 [4] M. A. Salas-Luevano, E. Manzanares-Acuña, C. Letechipia-de Leon, V. M.
306 Hernandez-Davila, and H. R. Vega-Carrillo, "Lead concentration in soil from an
307 old mining town," *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, vol. 289, no.
308 1, pp. 35-39, 2001.
- 309 [5] O. G. Gonzalez-Davila, J. M Gomez-Bernal, and E. A. Ruiz-Huerta, "Plants and Soil
310 Contamination with Heavy Metals in Agricultural Areas of Guadalupe, Zacatecas,
311 Mexico," in *Environmental Contamination*, J. Srivastava, Ed., pp. 37-50, InTech,
312 Rijeka, 2012.
- 313 [6] F. Y. Iskander, H. R. Vega-Carrillo, and E. Manzanares-Acuña, "Determination of
314 mercury and other elements in La Zacatecana Dam sediment in Mexico," *Science of*
315 *Total Environment*, vol. 148, no. 1, pp. 45-48, 1994.
- 316 [7] USEPA, "Flame Atomic Absorption Spectrophotometry (EPA Method 7000B),"
317 2007, <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/7000b.pdf>.
- 318 [8] A. Walkley, and I. A. Black, "An examination of the Degtjareff method for
319 determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid
320 titration method," *Soil Science*, vol. 37, no. 37, pp. 29-38, 1934.

- 321 [9] G. Müller, “Schwermetalle in den Sedimenten des Rheins Veränderungen seit 1971,”
322 *Umschau*, vol. 79, no. 24, pp. 778-783, 1979.
- 323 [10] L. Hakanson, “An ecological risk index for aquatic pollution control. A
324 sedimentological approach,” *Water Research*, vol. 14, no. 8, pp. 975-1001, 1980.
- 325 [11] A. Tessier, P. G. C. Campbell, and M. Bisson, “Sequential Extraction Procedure for
326 the Speciation of Particulate Trace Metals,” *Analytical Chemistry*, vol. 51, no. 7, pp.
327 844-851, 1979.
- 328 [12] DOF. Diario Oficial de la Federación. “NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004”,
329 2005. [http://www.profepa.gob.mx/innovaportal/file/1392/1/nom-147-
semarnat_ssa1-2004.pdf](http://www.profepa.gob.mx/innovaportal/file/1392/1/nom-147-
330 semarnat_ssa1-2004.pdf).
- 331 [13] CCME. Canadian environmental quality guidelines. Canadian Council of Ministers
332 of the Environment, Winnipeg, 2017. <http://ceqg-rcqe.ccme.ca/en/index.html#void>
- 333 [14] E. Santos-Santos, M. Yarto-Ramírez, I. Gavilán-García, J. Castro-Díaz, A. Gavilán-
334 García, R. Rosiles, S. Suárez, and T. López-Villegas, “Analysis of Arsenic, Lead
335 and Mercury in Farming Areas with Mining Contaminated Soils at Zacatecas,
336 Mexico,” *Revista de La Sociedad Química de México*. vol. 50, no. 2, pp. 57–63,
337 2006.
- 338 [15] G. Neupane, and S. J. Roberts, “Quantitative comparison of heavy metals and As
339 accumulation in agricultural and forest soils near Bowling Green, Ohio,” *Water, Air,
340 and Soil Pollution*, vol. 1971, no. 1-4, pp. 289-301, 2009.
- 341 [16] F. Çevik, M. Z. L. Göksu, O. B. Deric, and Ö. Fındık, “An assessment of metal
342 pollution in surf sediments of Seyhan dam by using enrichment factor,

- 343 geoaccumulation index and statistical analyses,” *Environmental Monitoring*
344 *Assessment*, vol. 152, pp. 309-317, 2009.
- 345 [17] N. A. Shafie, A. Z. Aris, M. P. Zakaria, H. Haris, W. Y. Lim, and N. M. Isa,
346 “Application of geoaccumulation index and enrichment factors on the assessment
347 of heavy metal pollution in the sediments,” *Journal of Environmental Science and*
348 *Health, Part A: Toxic/ Hazardous substances and Environmental Engineering*, vol.
349 48, no. 2, pp. 182-190, 2013.
- 350 [18] M. C. Chuan, G. Y Shu, and J.C, Liu, “Solubility of Heavy Metals in a Contaminated
351 Soil: Effects of Redox Potential and pH,” *Water, Air, and Soil Pollution*, vol. 90,
352 no. 3-4, pp. 543–56, 1996.
- 353 [19] R. Clemente, A. Escolar, and P. M. Bernal, “Heavy Metals Fractionation and
354 Organic Matter Mineralisation in Contaminated Calcareous Soil Amended with
355 Organic Materials,” *Bioresource Technology*, vol. 97, no. 15, pp. 1894–1901, 2006.
- 356 [20] S. R. Pezeshki, “Wetland plant responses to soil flooding,” *Environmental and*
357 *Experimental Botany*, vol. 46, no. 3, pp. 299-312, 2001.
- 358 [21] O. Husson, “Redox potential (Eh) and pH as drivers of soil/plant/microorganism
359 systems: a transdisciplinary overview pointing to integrative opportunities for
360 agronomy,” *Plant and Soil*, vol. 362, no. 1-2, pp. 389-417, 2013.
- 361 [22] M. A. Kashem, and B. R. Sing, “Metal Availability in contaminated soils: I. Effects
362 of flooding and organic matter on changes in Eh, pH and solubility of Cd, Ni and
363 Zn,” *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, vol. 61, no. 3, pp. 247-255, 2001.
- 364 [23] A. O. Olaniran, A. Balgobind, and B. Pillay, “Bioavailability of Heavy metals in
365 Soil: Impact on Microbial Biodegradation of Organic Compounds and Possible
366 Improvement Strategies,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 14, no.
367 5, pp. 10197-10228, 2013.

- 368 [24] E. Steinnes, "Lead," in *Heavy metals in soils, trace metals and metalloids in soils*
369 *and their bioavailability*, B.J. Alloway, Ed., pp. 395-409, Springer, Reading, UK,
370 3th edition, 2003.
- 371 [25] H. Kendorff, and M. Schinitzer, "Sorption of metals on humic acid," *Geochimica et*
372 *Cosmochimica Acta*, vol. 44, no. 11, pp. 1701-1708, 1980.
- 373 [26] M. B. McBride, "Environmental Chemistry of Soils," Oxford University Press, NY,
374 USA, 1994.
- 375 [27] A. R. Karbassi, S. M. Monavari, Gh. R. Nabi Bidhendi, J. Nouri, and K. Nematpour,
376 "Metal pollution assessment of sediment and water in the Shur River,"
377 *Environmental Monitoring Assessment*, vol. 147, pp. 107-116, 2008.
- 378
- 379