

**Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del
Instituto Politécnico Nacional**

UNIDAD IRAPUATO

“Efecto de microorganismos encapsulados sobre la promoción
de crecimiento de plantas en jal minero”

Tesis que presenta:

Naieli Herrera Reyes

Para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias con Especialidad en Biotecnología de Plantas

Director de Tesis:

Dr. Víctor Olalde Portugal

Irapuato, Guanajuato.

Septiembre 2016

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Bioquímica Ecológica del Departamento de Biotecnología y Bioquímica del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional en la Unidad Irapuato.

Se realizó una estancia en el laboratorio de Procesamiento de Materiales Orgánicos y en el laboratorio de Propiedades Fisicoquímicas, pertenecientes al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional en la Unidad Querétaro.

A la vida.

A mi familia y amigos que son parte de ella.

Agradecimientos

A toda la sociedad Mexicana por el apoyo económico para la realización de este posgrado.

A CONACYT por la beca otorgada para el desarrollo de este grado académico.

A CINVESTAV por ser mi hogar durante todo este tiempo.

Al Dr. Víctor Olalde Portugal por permitirme ser parte de su equipo de trabajo.

Al Dr. Miguel Gómez Lim y al Dr. Fernando Martínez Bustos por sus consejos y contribuciones para el éxito del presente proyecto.

Al Dr. Fernando Martínez Bustos por recibirme en la Unidad Querétaro, en especial a la M.C. Verónica Flores Casamayor y al M.T. José Juan Veles Medina por su apoyo técnico, sus consejos y su guía.

Al Dr. Eliazar Escamilla Silva del Instituto Tecnológico de Celaya, por su apoyo con los análisis de espectrofotometría de absorción atómica.

A todas las personas del Cinvestav Unidad Irapuato que gracias a ellas, a su apoyo, trabajo y dedicación puede existir este centro de investigación.

A José Antonio Cisneros Durán por su apoyo fotográfico y de logística en todas las presentaciones.

A Gerardo Daniel Valladolid por su grandiosa labor y apoyo para los experimentos en invernadero.

Al Dr. Lino Sánchez Segura del Departamento de Microscopia, por su apoyo en los análisis realizados.

A Isa, Chayo, Dalí, Mago, Arely, Fany, Rosy, Fabián, Horacio, Kevin y Miguel, compañeros del Laboratorio de Bioquímica ecológica por todo su apoyo y por compartir sus conocimientos y críticas para un mejor trabajo.

A mi familia por estar siempre allí y a mi nueva familia de Irapuato, los amigos que conocí aquí y han sido parte esencial para este viaje.

A mi hermana por su apoyo, por todos esos desvelos y risas.

A mis padres que son y han sido apoyo y motivación cada día.

Índice general

Agradecimientos	I
Índice general	III
Índice de figuras	V
Índice de tablas	VI
Resumen	VII
Abstrac	IX
1. Introducción.....	1
1.1 La minería en México.....	1
1.1.1 Impacto ambiental y a la salud.....	1
1.1.2 Presa de jales	4
1.2 Remediación de sitios contaminados con metales pesados	5
1.2.1 Uso de microorganismos en fitoremediación.....	6
1.2.2 Reforestación de una presa de jales	9
1.3 Micorrizas- hongos micorrízicos arbusculares.....	10
1.4 Bacterias promotoras de crecimiento	12
1.5 Encapsulación de PGPR	14
1.5.1 Secado por aspersión (Spray drying)	16
2. Hipótesis.....	17
3. Objetivo.....	17
4. Objetivos específicos	17
5. Materiales y métodos	17
5.1 Encapsular microorganismos	18
5.1.1 Extracción y modificación del almidón	18
5.1.2 Encapsulación usando secado por aspersión.....	20
5.1.3 Sobrevivencia de <i>Bacillus subtilis</i> MZ en las microcápsulas.....	23
5.1.4 Comportamiento de <i>B. subtilis</i> MZ microencapsulada en dos sustratos.....	24
5.1.5 Determinar la estructura microscópica de las microcápsulas	26

5.2 Crecimiento vegetal en diferentes concentraciones de jal de mina	29
5.2.1 Material vegetal	29
5.2.2 Sustrato	30
5.2.3 Ensayo en invernadero	30
5.3 Efecto de microorganismos encapsulados y hma sobre plantas en jal de mina	32
5.3.1 Colonización de HMA	35
5.3.2 Análisis de metales en el tejido vegetal	36
6. Resultados	37
6.1 Encapsular microorganismos	37
6.1.1 Extracción y modificación del almidón	37
6.1.2 Encapsulación usando secado por aspersión	37
6.1.3 Sobrevivencia de <i>Bacillus subtilis</i> MZ en las microcápsulas	38
6.1.4 Comportamiento de <i>B. subtilis</i> MZ microencapsulada en dos sustratos	40
6.1.5 Estructura microscópica de las cápsulas	42
6.2 Crecimiento vegetal en diferentes concentraciones de jal de mina	44
6.2.1 Ensayo de germinación <i>in vitro</i>	44
6.2.2 Caracterización del jal	44
6.2.3 Ensayo en invernadero	45
6.3 Efecto de microorganismos encapsulados y HMA sobre plantas en jal de mina	48
6.3.1 Colonización de HMA	55
6.3.2 Análisis de metales en el tejido vegetal	57
6.3.3 Análisis multivariado de componentes	61
7. Discusión	65
8. Conclusiones	77
9. Perspectivas	78
10. Referencias bibliográficas	79

Índice de figuras

Figura 1.2.1. Microorganismos asociados a plantas a [Rajkumar et al., 2012]	8
Figura 1.3a. Arbusculos en las células de la raíz de <i>Bouteloua curtipendula</i>	11
Figura 1.3b. Estructuras de HMA presentes en la raíz de <i>Bouteloua curtipendula</i>	11
Figura 1.4 Mecanismos de las PGPR [Kumar et al., 2011].....	14
Figura 5. Diagrama general de la estrategia experimental.	18
Figura 5.1.2 Spray dryer SD-Basic.	23
Figura 5.1.4 Muestra con mezcla general de invernadero.	26
Figura 6.1.4a Sobrevivencia de <i>B. subtilis</i> MZ microencapsulado, ensayo en mezcla general de invernadero.	40
Figura 6.1.4b. Sobrevivencia de <i>B. subtilis</i> MZ microencapsulado, ensayo en jal.	41
Figura 6.1.5a. Estructura microscópica de las microcápsulas	43
Figura 6.1.5b. Fotografía <i>Bacillus subtilis</i> MZ.....	44
Figura 6.2.3. <i>Bouteloua curtipendula</i> en un sustrato con diferentes concentraciones de jal.	46
Figura 6.2.3a. Peso seco de raíz de <i>Bouteloua curtipendula</i> en un sustrato con diferentes concentraciones de jal.	46
Figura 6.2.3b. Peso seco de la parte foliar de <i>Bouteloua curtipendula</i> en un sustrato con diferentes concentraciones de jal.	47
Figura 6.3a. Comportamiento de la germinación de <i>Bouteloua curtipendula</i>	49
Figura 6.3b. Peso fresco foliar de <i>B. curtipendula</i>	52
Figura 6.3c. Peso fresco raíz de <i>B. curtipendula</i>	53
Figura 6.3d. Altura de <i>B. curtipendula</i>	54
Figura 6.3.1a. Colonización por HMA en raíces de <i>B. curtipendula</i> , 60 % de jal.....	56
Figura 6.3.1b. Colonización por HMA en raíces de <i>B. curtipendula</i> , 100 % de jal.....	57
Figura 6.3.2.Factor de traslocación de Zinc en <i>B. curtipendula</i>	59
Figura 6.3.3a. Porcentaje de varianza explicada por cada uno de los componentes principales del análisis multivariado.	61
Figura 6.3.3c. Comportamiento de las muestras con respecto a los puntajes de cada uno de los componentes principales, agrupados por concentración de jal en el sustrato.....	62
Figura 6.3.3d. Comportamiento de las muestras con respecto a los puntajes de cada uno de los componentes principales, agrupados por inóculo de HMA.....	63
Figura 6.3.3d. Comportamiento de las muestras con respecto a los puntajes de cada uno de los componentes principales, agrupados por el factor composta.	63
Figura 6.3.3f. Comportamiento de las muestras con respecto a los puntajes obtenidos de cada uno de los componentes principales agrupados por tratamiento.....	64

Índice de tablas

Tabla 1.1.1a. Proceso minero y el ambiente [INE, 2007].	2
Tabla 1.1.4b. Concentraciones máximas permisibles por tipo de uso de suelo.	4
Tabla 6.1.2. Rendimientos del proceso de secado por aspersión.	37
Tabla 6.1.3. Unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de microcápsula y sobrevivencia de <i>B. subtilis</i> MZ al proceso de secado por aspersión	39
Tabla 6.2.1. Sobrevivencia de semillas de <i>Bouteloua curtipendula</i>	44
Tabla 6.2.2. Concentración en mg/kg de Cd, Cr, Cu, Pb y Zn del jal de mina.....	45
Tabla 6.3.3. Factor de traslocación de metales en la planta.	60

Resumen

La contaminación del suelo por metales pesados es uno de los tipos más frecuentes de contaminación. Generan un impacto negativo en la flora y fauna de los ecosistemas, además de que pueden implicar un riesgo en la salud humana.

Esta situación se presenta en las presas de jales, donde se depositan los desechos sólidos de la industria minera que contienen altas concentraciones de metales pesados. En el distrito minero del estado de Guanajuato, en México, las presas de jales cubren una superficie de 81.9 hectáreas.

Se determinó mediante espectrofotometría de absorción atómica la concentración de ciertos metales pesados del jal proveniente de la mina “El cubo”, localizada en el estado de Guanajuato, México. Los valores obtenidos para Cd, Cr, Cu y Pb, se encuentran dentro de los límites máximos permisibles de acuerdo a la norma NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004. Sin embargo, la concentración del Zn excedió los niveles recomendados en un 132.5 %.

El crecimiento vegetal bajo estas condiciones se ve comprometido. Se evaluó el pasto forrajero “Banderita” (*Bouteloua curtipendula*) en el jal, y efectivamente, el crecimiento se vio afectado negativamente a medida que aumentó la concentración del jal.

Las especies vegetales que se emplean para la reforestación y la fitoremediación de estos sitios presentan una disminución en la viabilidad de la planta, e incluso llegan a inhibir su crecimiento.

Una propuesta alternativa es utilizar bacterias promotoras de crecimiento y hongos micorrízicos arbusculares, microorganismos que se asocian a las plantas para promover su crecimiento e incrementar su tolerancia a estos factores adversos. Sin embargo, la presencia de metales pesados en el suelo, puede producir considerables modificaciones en las comunidades microbianas y sus actividades. Para prevenir o disminuir este efecto, se optó por microencapsular una bacteria promotora de crecimiento (*Bacillus subtilis* MZ), en una matriz de almidón modificado mediante secado por aspersión.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de microorganismos microencapsulados sobre plantas creciendo en jal de mina. Para lo cual, se evaluó la promoción de crecimiento de *Bouteloua curtipendula*, en el jal proveniente de la mina “El cubo”; inoculado con microcápsulas de *Bacillus subtilis* MZ y un consorcio de hongos micorrízicos arbusculares (consorcio Selva); en invernadero.

El proceso de secado por aspersión presentó buenos resultados, siendo el almidón succinatado el que aportó una mayor protección a *Bacillus subtilis* MZ. Además, se observó que para el proceso de secado por aspersión la relación entre el inóculo y la concentración de sólidos de la emulsión, así como, la relación entre el inóculo y el tipo de almidón empleado son variables determinantes en la sobrevivencia de la bacteria.

La inoculación de *B. curtispindula* con las microcápsulas y el consorcio Selva de HMA, en un sustrato contaminado con metales pesados, incrementó la germinación, altura y biomasa de la planta.

Abstrac

The pollution of soil by heavy metals is one of the most frequently pollutions in the ecosystems. This have a negative impact in the ecosystems and the living organism in there, as well as representing a risk for human health.

Mine wasted composed by tailings mining have higher concentrations of heavy metals. In the miner district of Guanajuato, in Mexico, the cover space by disturbed area covers a space of almost 81.9 hectares.

We used atomic absorption spectrophotometry to determined the heavy metal concentration in mine wasted, from the mine “El cubo”, wich is located in the state of Guanajuato, Mexico. Cd, Cr, Cu and Pb concentrations are into maxim permissible limits, according to the Official Mexican Norm NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004. However, Zn concentration was 132.5% above the recommended levels.

Greenhouse assays were developed to observe the growth response of “Banderita” (*Bouteloua curtipendula*) growing in mine wasted from the “El cubo” mine. We observed that Banderita growth was negatively affected as the concentration of mine wasted increases, in greenhouse assays.

Revegetation of mine tailings and other waste material is one way to contain metals. Nevertheless, the vegetal species employed in reforestation and phytoremediation of sites contaminated by heavy metals, suffer a viability decrease and growth inhibition.

One alternative method is the use of growth promoting bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi. These plant-associated microbes improve the plant growth and enhance heavy metal tolerance. The heavy metals in soil can modify the microbial activities and communities presented in the environment. To prevent or decrease this effect, we microbread to growth promoting bacteria *Bacillus subtilis* MZ into of modified starch matrix by spray drying.

The objective of this project was evaluated the effect of microorganism’s microbreads in plants growing in mine wasted. We evaluated the growth promoting effect of *Bouteloua curtipendula* growing in mine wasted from the “El cubo” mine, while being inoculated with *Bacillus subtilis* MZ microbreads and an arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) consortia (consortia Selva). The experiments were conducted in greenhouse.

The spray drying process had good results. The succinylated modified starch presented the best protection for *Bacillus subtilis* MZ. For spray drying process, we observed that the relations between the inocul and the solids concentration emulsion and the relation between the inocul and the starch type were variables which determined the bacteria survival.

The growth of *Bouteloua curtipendula* growing in a polluted soil, was improved by the co-inoculation with *Bacillus subtilis* MZ microbeads and an AMF consortia (consortia Selva) increased the ratio of germination, the height and the biomass of plant.

1. Introducción

1.1 La minería en México

Los metales son uno de los elementos fundamentales para el desarrollo de nuestra actual sociedad, además, muchos de ellos son esenciales para el funcionamiento de nuestras vidas [Salomons *et al.*, 1995].

La minería es una de las actividades económicas de mayor tradición en México, desde la época prehispánica se ha valorado el uso de minerales. Se ha observado su participación en el desarrollo del país como un factor importante de modernización al suministrar insumos para prácticamente todas las industrias, entre las que destacan las de la construcción, la metalúrgica, la siderúrgica, la química y la electrónica [INE, 2007].

México es el primer productor de plata a nivel mundial [Philips *et al.*, 2014; SE, 2015; SGM, 2013]. Se ubica entre los 10 principales productores de 16 diferentes minerales: oro, plomo, zinc, cobre, bismuto, fluorita, celestita, wollastonita, cadmio, diatomita, molibdeno, barita, grafito, sal, yeso y manganeso, principalmente [SE, 2015].

El estado de Guanajuato, en México, es productor de oro, plata, plomo, zinc, entre otros minerales [SGM, 2013].

El sector minero-metalúrgico contribuye con el 4% del Producto Interno Bruto nacional [SE, 2015].

1.1.1 Impacto ambiental y a la salud

La actividad minera no solo llama la atención por su importante aportación económica al país, sino también, porque es una actividad que impacta gravemente al medio ambiente pues conlleva a la contaminación del suelo, aire e incluso mantos acuíferos y además, ocasiona daños en la salud humana. La generación de grandes cantidades de residuos resulta en una alta tasa de degradación en la calidad ambiental y en la salud humana [Curaqueo *et al.*, 2014]. El impacto de la minería sobre el ambiente y la salud humana se relaciona con la composición del mineral, el tipo de explotación, el proceso de beneficio, la escala de las operaciones y las características del entorno [Cobb *et al.*, 2000]. En la Tabla 1.1.1a se describen algunos de los impactos ambientales en los diferentes procesos del aprovechamiento de minerales.

Tabla 1.1.1a. Proceso minero y el ambiente [INE, 2007].

Fases	Descripción	Impacto ambiental
Prospección	Estudios de gravimetría, geología superficial, geoelectrica, de susceptibilidad magnética y densidad.	Son procedimientos no invasivos que no generan impactos ambientales significativos.
Exploración	Barrenación a diamante, obras y perforaciones directas (tajos, zanjos, etc.), construcción de caminos, planillas de barrenación instalación de campamentos.	Las modificaciones que puede generar, en algunos casos como la destrucción de la vegetación, suelen ser mitigables o, en su mayoría, sujetas a procedimientos de protección y compensación ambiental.
Explotación	Transformación necesaria del ambiente para los objetivos mineros: construcción y obras diversas (tiros, socavones, casa de máquinas, patios de depósito temporal de minerales, zona de descarga de material estéril, etc.).	Destacan los riesgos asociados a la operación de presas de jales, que pueden generar escurrimientos y arrastre de residuos minero-metalúrgicos peligrosos, de alto impacto ambiental, así como la descarga de aguas residuales en cuerpos receptores.
Fundición y refinación	Uso de hornos industriales para obtener metales y sus aleaciones hasta conformarlos como materias primas para uso industrial. Eliminación de impurezas en los metales obtenidos para alcanzar una alta ley contenido.	Los contaminantes que producen se centran en las emisiones a la atmósfera, aunque también se generan residuos peligrosos y aguas residuales.

Las presas de jales son un riesgo latente, ya que es en este estrato edáfico donde crecen las gramíneas y hierbas las cuales son consumidas por los animales y algunos de estos a su vez por los humanos, entrando así los metales a la cadena trófica [Puga *et al.*, 2006]; debido a la capacidad que tienen las plantas de acumular metales pesados de diferentes ecosistemas y suelos contaminados, esto representa un gran riesgo para la salud humana y para el medio ambiente [Cobb *et al.*, 2000].

La introducción en el ambiente de metales pesados, en varias de sus formas, puede producir considerables modificaciones en las comunidades microbianas y sus actividades [Hassen *et al.*, 1998]. Existe un mayor nivel de riesgo en las áreas cercanas a las presas de jales [Puga *et al.*, 2006].

Los jales son tóxicos para los organismos vivos y son inhibidores de factores ecológicos, algunos de los efectos que ocasionan en las plantas son la inhibición de crecimiento, daños estructurales, decline en las actividades fisiológicas y bioquímicas, alteraciones en sus funciones, entre otros [Cheng, 2003; Salomons *et al.*, 1995].

La toxicidad de los metales en el suelo, su distribución en los perfiles del suelo y su biodisponibilidad, dependen de muchos factores, como lo son las propiedades intrínsecas del metal (la especie de elementos) y las características de los suelos (condiciones ambientales, pH, sustancias orgánicas del medio) [Cheng, 2003; Puga *et al.*, 2006]. La toxicidad de los metales depende no sólo de su concentración, sino también de su movilidad y reactividad con otros componentes del ecosistema [Abollino *et al.*, 2002].

En el país, existe legislación en el marco ambiental para prevenir el daño que las actividades proactivas ocasionan en los ecosistemas, así como las actividades equivalentes necesarias para reparar el impacto negativo de las minas. El desarrollo y modernización de este sector, como el de la mayor parte de la industria, lleva implícitas perturbaciones en los ecosistemas, que no deben ser soslayadas en el diseño y ejecución de las políticas para su desarrollo. Se ha cambiado la perspectiva del objetivo principalmente correctivo en materia de cuidado del ambiente, que predominó en el pasado, a uno esencialmente preventivo, orientado hacia el desarrollo sustentable de esta actividad [INE, 2007].

Considerando que la biodisponibilidad de algunos metales pesados y su bioacumulación pueden generar riesgos a la salud y al medio ambiente, y, que las concentraciones de los elementos químicos normados, para la remediación de los suelos, están sustentadas en la metodología de evaluación de riesgo, a través de la cual se determina la probabilidad o posibilidad de que se produzcan efectos adversos a la salud de la población o al ambiente, como consecuencia de su exposición a los suelos contaminados, y entre otras necesidades, se expidió la Norma Oficial

Mexicana NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004 “Que establece criterios para determinar las concentraciones de remediación de suelos contaminados por arsénico, bario, berilio, cadmio, cromo hexavalente, mercurio, níquel, plata, plomo, selenio, talio y/o vanadio”.

En la Tabla 1.1.4b se pueden observar las concentraciones requeridas para el cumplimiento de la norma NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004 en una superficie igual o menor a 1000 m². En la norma mencionada se describe entre otros aspectos, el cálculo para obtener estas concentraciones en el caso de suelos afectados con una superficie mayor.

Tabla 1.1.4b. Concentraciones máximas permisibles por tipo de uso de suelo (*EPA: Environmental Protection Agency) [NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004].

Contaminante	Uso agrícola / residencial/ comercial (mg/kg)	Uso industrial (mg/kg)
Arsénico	22	260
Bario	5400	67000
Berilio	150	1900
Cadmio	37	450
Cromo Hexavalente	289	510
Mercurio	23	310
Níquel	1600	20000
Plata	390	5100
Plomo	400	800
Selenio	390	5100
Talio	5.2	67
Vanadio	78	1000
Zinc		200-400ppm *EPA

1.1.2 Presa de jales

Durante la fase de explotación, en las operaciones primarias de separación y en la concentración de minerales se generan residuos sólidos denominados jal [NOM-141-SEMARNAT-2003]. Como en ningún proceso de concentración se logra una recuperación del 100%, los desechos mineros (colas o jales) siempre contienen residuos del mineral, existiendo el riesgo de impactar

gravemente al medio ambiente y a la salud humana [Cobb *et al.*, 2000]. Los jales mineros presentan uno de los principales riesgos para el medio ambiente durante la operación de la mina [Curaqueo *et al.*, 2014].

Estos residuos se depositan en una presa de jales para su almacenamiento o disposición final, cuya construcción y operación ocurren simultáneamente [NOM-141-SEMARNAT-2003].

Debido a la importancia y trascendencia de estos impactos existen Nomas oficiales mexicanas para regular y minimizar estos impactos. Estas normas establecen parámetros y controles a los que debe sujetarse esta actividad. Por parte de la Secretaria del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) se publicó en septiembre de 2003 la norma NOM-141-SEMARNAT-2003 “Que establece el procedimiento para caracterizar los jales, así como las especificaciones y criterios para la caracterización y preparación del sitio, proyecto, construcción, operación y postoperación de presas de jales”.

Uno de los criterios que indica la norma durante la postoperación de la presa de jales, es que se debe recubrir la superficie del depósito con el suelo recuperado o con materiales que permitan la fijación de especies vegetales. Las especies vegetales que se utilicen para cubrir el depósito deben ser originarias de la región, para garantizar la sucesión y permanencia con un mínimo de conservación [NOM-141-SEMARNAT-2003].

1.2 Remediación de sitios contaminados con metales pesados

La rehabilitación de suelos contaminados por actividades mineras, es un proceso complejo y de alto costo. En las últimas décadas, ha emergido un gran número de estrategias para remediar ambientes contaminados por la actividad minera. Incluyendo entre estas estrategias mecanismos físicos, químicos y biológicos [Curaqueo *et al.*, 2014]. En México, una de las actividades a las que están obligadas las empresas mineras, es reforestar el sitio afectado. Uno de los principales problemas que se presentan en las actividades de reforestación, es que las especies que se utilizan para este fin son plantas ajenas al ecosistema, y por lo tanto no están aclimatadas a la región. El mecanismo más viable para recuperar zonas erosionadas o con poca vegetación herbácea es convertirlos en ecosistemas estables a través de la aceleración de procesos de sucesión natural acoplada a la introducción de organismos preferentemente nativos [Allen, 1989].

Fitoremediación es el uso de plantas para extraer, degradar o estabilizar sustancias peligrosas presentes en el medio ambiente. Las plantas usadas en la fitoremediación deben ser capaces de acumular grandes cantidades de contaminante, y también de producir altas cantidades de biomasa. [Cheng, 2003; Lucy *et al.* 2004]. La acumulación de metales en las plantas depende de la especie a la que pertenezca, la especie química de los contaminantes y de las condiciones del suelo [Cobb *et al.*, 2000]. El uso de especies vegetales tolerantes a altos niveles de metales en suelos y agua, permite actividades de restauración con mejores resultados [Allen, 1989]. Se han estudiado dos diferentes aspectos de la interacción de las plantas y los metales pesados. El primero, que los metales producen un efecto negativo en las plantas. El segundo, que las plantas tienen su propio mecanismo de resistencia contra los efectos de toxicidad y para la desintoxicación por contaminación con metales pesados [Cheng, 2003]. Existen algunas plantas capaces de tolerar el exceso de metales pesados mediante procesos que involucran el secuestro del metales pesados en vacuolas, empleando ácidos orgánicos y péptidos detoxificantes inducidos por la exposición a los mismos [Khan *et al.*, 2000].

La fitoremediación de suelos contaminados por metales pesados puede llevarse a cabo mediante diferentes mecanismos: fitoextracción, la absorción y concentración de metales del suelo hacia el interior de la raíz y de la parte aérea de la planta; rizofiltración, el uso de las raíces de las plantas para remover metales de efluentes contaminados; fitoestabilización, el uso de las plantas para reducir el movimiento de los metales en el medio ambiente [Glick, 2003; Ma *et al.*, 2012]. Las plantas tienen mecanismos constitutivos (presentes en la mayoría de los fenotipos) y mecanismos adaptativos (presentes solamente en fenotipos tolerantes) para la acumulación o tolerancia a altas concentraciones de contaminantes en la rizósfera [Khan *et al.*, 2000].

1.2.1 Uso de microorganismos en fitoremediación

Existen un gran número de especies de plantas capaces de hiperacumular en sus tejidos metales pesados; sin embargo, la fitoremediación presenta severas restricciones en su desarrollo debido a la concentración y diversidad de los contaminantes presentes en el sitio [Glick, 2003; Wu *et al.*, 2006].

Solo una fracción de los metales pesados en el suelo contaminado se encuentran biodisponibles, solo esta fracción puede ser tomada por las plantas [Khan *et al.*, 2000]. Se han implementado diferentes mecanismos para aumentar la biodisponibilidad de los metales para la planta, uno de ellos es la adición de agentes quelantes inorgánicos de baja toxicidad, como lo es el EDTA; con el aumento en la biodisponibilidad de los metales se ha incrementado la acumulación de metales

en la parte aérea de la planta. Sin embargo, es necesario tomar medidas precautorias, debido a que con la adición de agentes quelantes la movilidad de los metales incrementa, lo que puede ocasionar se lixivie hacia los sistemas hidrológicos [Khan *et al.*, 2000]. Micorrizas y rizobacterias aumentan la biodisponibilidad de los metales en la rizósfera, mediante la modificación del sistema raíz-rizósfera [Khan *et al.*, 2000]. El uso de microorganismos benéficos presenta grandes ventajas ante el uso de compuestos químicos, debido a que los metabolitos producidos por los microorganismos son biodegradables, de menor toxicidad y pueden ser producidos *in situ*, en la rizósfera [Rajkumar *et al.*, 2012]. Además de que en un ecosistema natural sin perturbaciones, así como en un ecosistema contaminado, los microorganismos asociados a plantas juegan un papel estratégico en la adaptación de la planta ante cambios y alteraciones en el ecosistema [Ma *et al.*, 2012].

Los microorganismos asociados a plantas resistentes a metales potencializan la adquisición de nutrientes, reducen la toxicidad del metal, inmovilizan o movilizan los metales pesados en el suelo, reciclan nutrientes, mejoran la salud de la planta y ayudan a controlar patógenos (Figura 1.2.1) [Rajkumar *et al.*, 2012]. Diferentes procesos biogeoquímicos mediados por microorganismos asociados a plantas se ven involucrados, como lo son traslocación, transformación, quelación, inmovilización, solubilización, precipitación y formación de complejos de metales pesados [Ma *et al.*, 2012; Rajkumar *et al.*, 2012]. Las actividades de los microorganismos en la raíz/rizósfera aumentan la efectividad de los procesos de fitoremediación de suelos contaminados con metales pesados por dos mecanismos complementarios: (i) promoción directa, fitoextracción y fitoestabilización; y (ii) promoción indirecta, en la cual los microorganismos confieren tolerancia a la planta y/o aumentan la producción su biomasa [Rajkumar *et al.*, 2012].

La disminución en el crecimiento y viabilidad de las plantas pueden ser resultado de efectos inhibitorios ocasionados por altas concentraciones de metales en su interior. Esto debido a que, en presencia de altos niveles de metales algunas plantas (i) como respuesta al estrés sintetizan etileno y (ii) se reduce severamente el contenido de hierro. Las bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR) pueden ser usadas para mitigar la toxicidad de los metales para la planta. Esto podría resultar de dos diferentes formas. La primera, las PGPR puede emplear la enzima ACC-desaminasa para disminuir el nivel de etileno en la planta. La segunda forma, la planta puede aprovechar el complejo de hierro y sideróforos, creado por la bacteria. Se ha demostrado que causan un efecto real y positivo cuando se une a la planta correcta y en la situación ambiental correcta [Glick, 2003; Lucy *et al.* 2004].

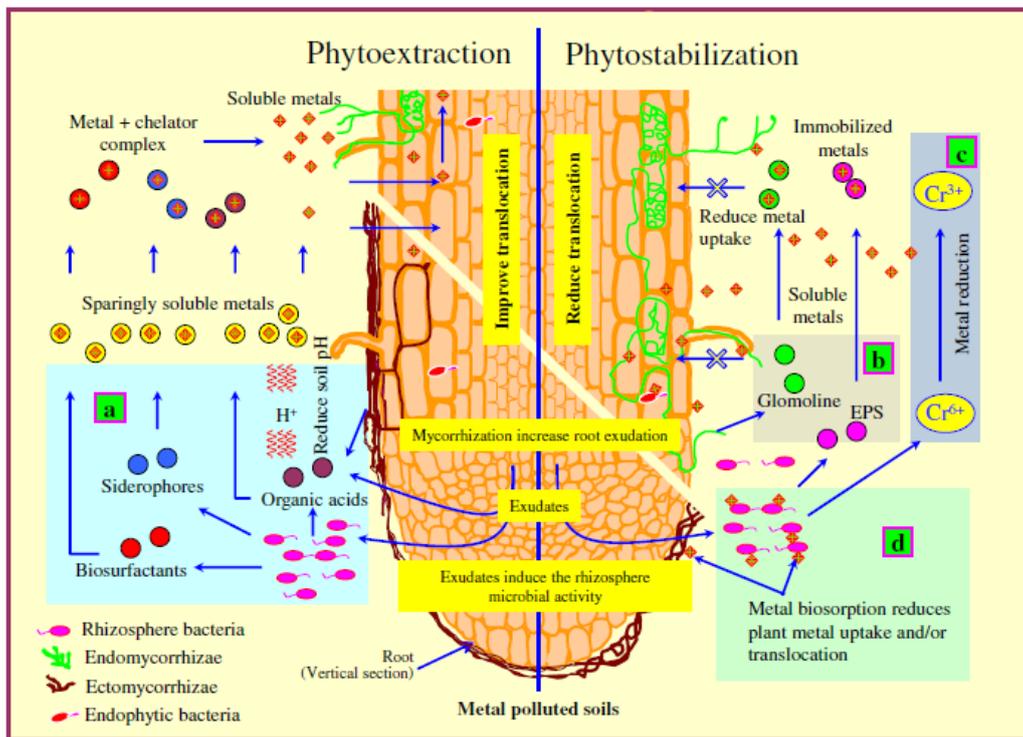


Figura 1.2.1. Microorganismos asociados a plantas aceleran el proceso de fitoremediación en suelos contaminados con metales pesados aumentando la movilización/inmovilización del metal. (a) Microorganismos asociados a plantas que secuestran al metal mediante la producción de quelatos para la movilización del metal. (b) Producción de metabolitos que inmovilizan al metal. (c) reducción del metal (d) Biosorción del metal. EPS: sustancias poliméricas extracelulares. [Rajkumar et al., 2012]

Las bacterias promotoras de crecimiento facilitan la proliferación de varias plantas, especialmente en condiciones de estrés [Glick, 2003]. Los metabolitos liberados por PGPR (sideróforos, biosurfactantes, ácidos orgánicos, reguladores de crecimiento, etc.) pueden alterar la captura de metales pesados directa e indirectamente, (i) indirectamente, a través de los efectos provocados en las dinámicas de crecimiento de las plantas; (ii) directamente, mediante la acidificación, quelación, precipitación, inmovilización/movilización y reacciones de oxidoreducción en la rizósfera [Ma *et al.*, 2012]. Algunas ventajas que aportan las PGPR a la planta son el incremento en la biomasa, mayor tasa de acumulación de metales, así como en factores de nutrición y salud de la planta [Lucy *et al.* 2004; Ma *et al.*, 2012]. El desarrollo de nuevas áreas para el uso de bacterias promotoras de crecimiento incluyen la reforestación y la fitoremediación de suelos contaminados [Lucy *et al.* 2004].

La simbiosis micorrízica arbuscular con un gran grupo de plantas y hongos, puede ser uno de los componentes esenciales para restaurar ecosistemas dañados [Allen, 1989]. La combinación de HMA y la microflora presente en el suelo en ecosistemas dañados podría contribuir

positivamente a la salud y crecimiento de la planta [Mohumad *et al.*, 2012]. Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) mejoran la resistencia de las comunidades de plantas contra estreses ambientales, incluyendo deficiencia de nutrientes, sequía y disturbios en el suelo [Allen, 1989; Curaqueo *et al.*, 2014]. HMA potencializan la resistencia de la planta a metales pesados, la intensidad en la respuesta y el tipo de respuesta de una planta micorrizada depende de la planta, la especie del hongo y de condiciones ambientales [Allen, 1989; Cheng, 2003]. Los metales son inmovilizados en la raíz de la planta con HMA bajo condiciones de suelos contaminados, reduciendo su translocación a la parte aérea de la planta [Smith *et al.*, 2008]. La contaminación de suelos por metales pesados también presenta efectos adversos para microorganismos en severas formas: (1) reducción de biomasa de las comunidades, (2) decremento de poblaciones específicas, y (3) cambios en la estructura de las comunidades [Hassen *et al.*, 1998, Zhuang *et al.*, 2007]. Las actividades de los microorganismos se ven afectadas también por la composición y nutrientes del suelo, así como, de las características de la rizósfera [Rajkumar *et al.*, 2012]. La colonización y sobrevivencia de los microorganismos inoculados, es uno de los factores más importantes para aumentar el crecimiento de la planta y una exitosa fitoremediación de suelos contaminados por metales pesados empleando microorganismos [Rajkumar *et al.*, 2012].

1.2.2 Reforestación de una presa de jales

La reforestación de una presa de jales es una forma de contener los metales evitando el incremento de sitios contaminados [Cobb *et al.*, 2000]. La reforestación de una presa de jales presenta un reto interesante, debido a que no solo presentan contaminación por metales pesados, sino que también presentan una deficiencia de elementos esenciales, notablemente fósforo y nitrógeno, e incluso ausencia total de materia orgánica [Cobb *et al.*, 2000]. Existen evidencias en la reforestación de jales de mina, en donde se apoya a las plantas con HMA, las plantas micorrizadas presentan mayor sobrevivencia y productividad que las plantas no micorrizadas después de 8 años [Allen, 1989].

El tiempo de observación que requiere un suelo contaminado reforestado es muy importante, Wang [1991], indicó que el crecimiento de raíz como punto final de lectura, es más sensible a la toxicidad que la germinación de semillas.

1.3 Micorrizas- hongos micorrízicos arbusculares

La simbiosis que se presenta entre hongos micorrízicos arbusculares (HMA) y plantas es una de las simbiosis más antiguas. Se han encontrado evidencias de estructuras típicas de los HMA, como lo son arbusculos y esporas de hace aproximadamente 400 millones de años. Se cree que ayudaron a las plantas vasculares a colonizar el planeta Tierra. Las micorrizas arbusculares (MA) es la asociación entre hongos pertenecientes al filo Glomeromycota y plantas vasculares [Smith *et al.*, 2008; Parniske, 2008]. Endomicorrizas incluyen diferentes tipos morfológicos, el más común es el HMA [Allen, 1989]. Los HMA han sido reconocidos como simbioses obligados de un amplio rango de especies de plantas, necesitan un hospedero para completar su ciclo de vida [Parniske, 2008; Smith *et al.*, 2008]. Se ha descrito a los HMA como generalistas, que se pueden asociar a un amplio rango de plantas, aunque, existe evidencia de especificidad o selectividad de algunas especies de plantas por un hongo en particular [Smith *et al.*, 2008].

La simbiosis es comúnmente mutualista, la mayor parte de las interacciones están basadas en la transferencia bidireccional de nutrientes entre los simbioses; el hongo apoya a la adquisición de agua y nutrientes como fósforo y nitrógeno, mientras que la planta brinda carbohidratos y protección al hongo. Algunas veces confiere otros beneficios, como tolerancia a sequía o a enfermedades [Mohamad *et al.*, 2012; Parniske, 2008; Smith *et al.*, 2008]. Alrededor del 20% de los fotosintatos de la planta son transferidos al hongo [Parniske, 2008]. Las MA se conforman por tres principales componentes: la raíz, las estructuras de MA en las células de la raíz y el micelio extraradical en el suelo [Smith *et al.*, 2008].

Los arbusculos son el resultado del desarrollo subcelular coordinado entre las células de la planta y el HMA, el transporte de nutrientes se lleva a cabo por medio de estas estructuras (Figura 1.3a.) [Parniske, 2008]. Las ramificaciones hifales, penetran las células más internas del cortex hasta llegar a las membranas plasmáticas, siendo en estas áreas donde se forman los arbusculos [Mohamad *et al.*, 2012]. El trabajo de las hifas es especialmente tomar los nutrientes y el agua [Parniske, 2008].

Durante la colonización de la raíz, se lleva a cabo por parte del HMA la formación de vesículas que juegan un rol significativo en la propagación a través de la raíz. Las vesículas son importantes órganos de almacenamiento, contienen abundantes lípidos, generalmente desarrolladas en los extremos de las hifas [Mohamad *et al.*, 2012; Smith *et al.*, 2008].

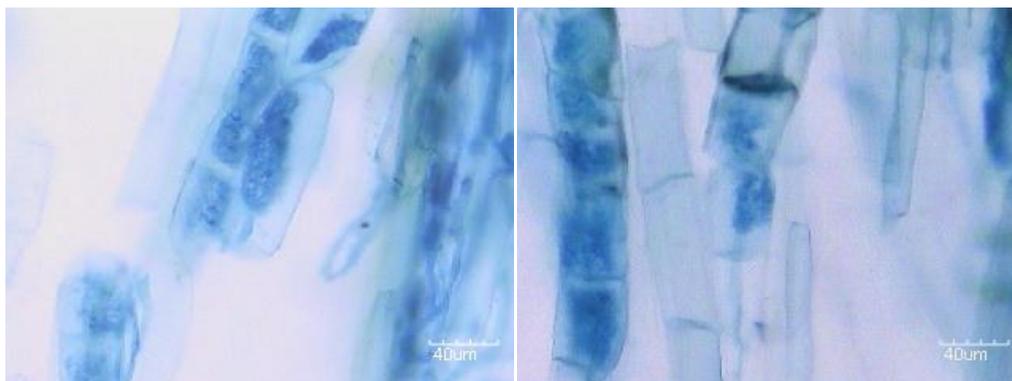


Figura 1.3a. Arbúsculos en las células de la raíz de *Bouteloua curtipendula*, tinción con azul de tripano.

En la fotografía de la Figura 1.3b se puede observar una raíz de *Bouteloua curtipendula*, el procedimiento que se usó para su tinción se describe más adelante en el capítulo de Métodos y Materiales. En la fotografía se señalan las principales estructuras de las MA.

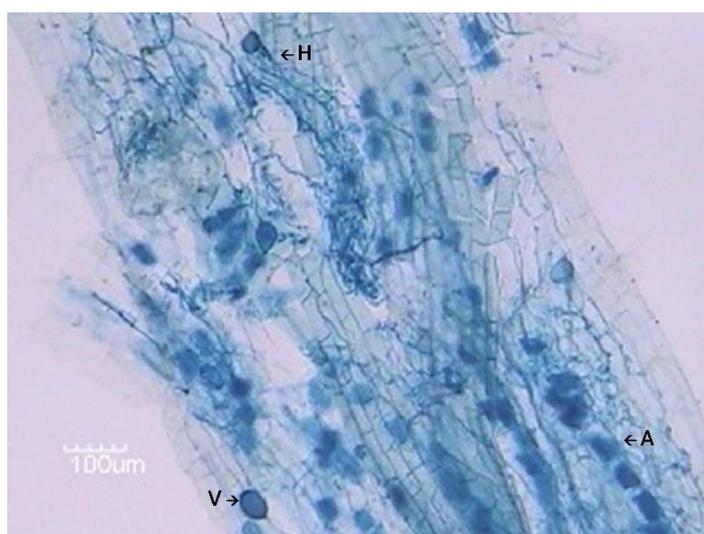


Figura 1.3b. Estructuras de HMA presentes en la raíz de *Bouteloua curtipendula*, tinción con azul de tripano. Se observan arbúsculos (A), vesículas (V) e hifas (H).

La bio-comunicación en el suelo es una señal crítica y fundamental para el establecimiento de relaciones entre plantas, hongos y microorganismos. Los exudados de las raíces son necesarios para el crecimiento del hongo y su colonización en la raíz [Mohumad *et al.*, 2012]. La micorriza arbuscular (MA) puede subsistir en suelos altamente contaminados con metales pesados; sin embargo, la colonización a menudo es reducida en esas condiciones. Varios metales pesados son fungitóxicos, en razón de la cual reducen la germinación de las esporas, el crecimiento micelial y, consecuentemente, la colonización micorrízica [Smith *et al.*, 2008].

1.4 Bacterias promotoras de crecimiento

En general existen dos tipos de bacterias que proveen beneficios a las plantas, las que forman una relación simbiótica con la planta y las bacterias de vida libre que se encuentran en el suelo, aunque se localizan frecuentemente cerca, o incluso en la raíz de las plantas [Glick, 1995].

Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR, por sus siglas en inglés plant growth promoting rhizobacteria) son bacterias benéficas de vida libre en el suelo [Glick, 1995; Lucy *et al.* 2004]. PGPR pueden modificar la fisiología y el funcionamiento de la planta en tejidos localizados a distancia de los sitios de colonización [Vacheron *et al.*, 2013]. Las raíces de las plantas exudan una gran diversidad de nutrientes orgánicos (ácidos orgánicos, fitosideroforos, azúcares, vitaminas, amino ácidos, nucleosidos, mucilago) y señales que atraen a las poblaciones microbianas [Glick, 1995]. Ser competitivas en la rizósfera es un requisito indispensable para las PGPR. Permite una efectiva colonización de la raíz, combinada con la habilidad de sobrevivir y proliferar durante el crecimiento de la raíz en presencia de la microbiota endógena del ecosistema [Kumar *et al.*, 2011].

Entre los beneficios que las PGPR aportan a la planta se encuentra el incremento en la germinación, crecimiento de la raíz, área de las hojas, contenido de clorofila, contenido de magnesio, contenido de proteína, actividad hidráulica, mayores rendimientos, tolerancia a sequía, aumento de masa en meristemos y raíz, retraso en la senescencia de las hojas, resistencia a enfermedades [Lucy *et al.* 2004]. Un gran número de reportes sugieren que las PGPR estimulan el crecimiento de la planta facilitando el aprovechamiento de minerales por la planta, particularmente fosfato, [Glick, 1995]. Las PGPR pueden afectar el crecimiento de la planta de dos diferentes formas: (i) directa o (ii) indirectamente [Glick, 1995; Glick *et al.* 1997; Vacheron *et al.*, 2013].

(i) La promoción directa del crecimiento de la planta es debido a que las PGPR proveen a la planta con componentes que son sintetizados por la bacteria o facilita el aprovechamiento de ciertos nutrientes del ambiente [Glick, 1995]. Las PGPR pueden fijar nitrógeno atmosférico y suministrarlo a las plantas, pueden producir sideróforos capaces de solubilizar o secuestrar el hierro del suelo y proveerlo dentro de las células de la planta, sintetizan diferentes fitohormonas que pueden actuar como intensificadoras de varios estadios del crecimiento de la planta, como lo son las auxinas, citocianinas y giberelinas, disminución en el nivel de etileno de la planta, pueden tener mecanismos de solubilización y movilización de minerales como lo es el fósforo y para que pueda ser aprovechado por la planta, y pueden sintetizar compuestos de bajo peso molecular o enzimas que pueden modular el crecimiento y

desarrollo de la planta. Una PGPR en particular puede afectar el crecimiento y desarrollo de la planta usando uno o más de estos mecanismos [Glick, 1995; Kumar *et al.*, 2011; Vacheron *et al.*, 2013].

Se han realizado estudios del efecto de la producción de fitohormonas, enfocados en el rol de las auxinas. La más común y más caracterizada es el ácido 3-indol acético (IAA), que estimula la división y diferenciación de las células, también estimula la elongación de las células, entre otras respuestas de las plantas [Glick, 1995; Kumar *et al.*, 2011]. Se incrementa el aprovechamiento de los nutrientes como una consecuencia del incremento en el área de la superficie de la raíz provocado por la colonización de PGPR [Vacheron *et al.*, 2013]. El fósforo presente en el suelo se encuentra de diferentes formas, no todas ellas disponibles para las plantas, el fósforo necesita ser solubilizado (fósforo insoluble) o mineralizado (fósforo inorgánico) por microorganismos, para ser aprovechable por las plantas [Vacheron *et al.*, 2013].

(ii) La promoción indirecta ocurre cuando la bacteria disminuye o previene efectos deletorios de uno o más organismos patógenos por diferentes mecanismos [Glick, 1995]. Las PGPR se involucran en la protección contra patógenos, reducción de hierro en la rizósfera disponible para patógenos, síntesis de enzimas que lisan las células de la pared de los hongos, competición con organismos por sitios de la raíz [Lucy *et al.* 2004]. Uno de los mecanismos más efectivos que las PGPR emplean para prevenir la proliferación de fitopatógenos es la síntesis de antibióticos. [Glick, 1995; Kumar *et al.*, 2011; Vacheron *et al.*, 2013]. Se ven involucradas también en la inducción de la respuesta sistémica de la planta [Kumar *et al.*, 2011; Vacheron *et al.*, 2013].

En la Figura 1.4 modificada de Kumar y colaboradores [2011], se ilustran algunos de los mecanismos conocidos para la promoción del crecimiento de la planta por las PGPR.

Diversas poblaciones de bacterias aeróbicas formadoras de endoesporas se encuentran en suelos agrícolas y contribuyen con la productividad de la cosecha directa o indirecta mente [Kumar *et al.*, 2011]. La promoción de crecimiento por las PGPR en campo, requiere de la coordinación de múltiples fenómenos. La sobrevivencia y sucesión de las bacterias promotoras de crecimiento es esencial, independientemente del fin para el que se empleen.

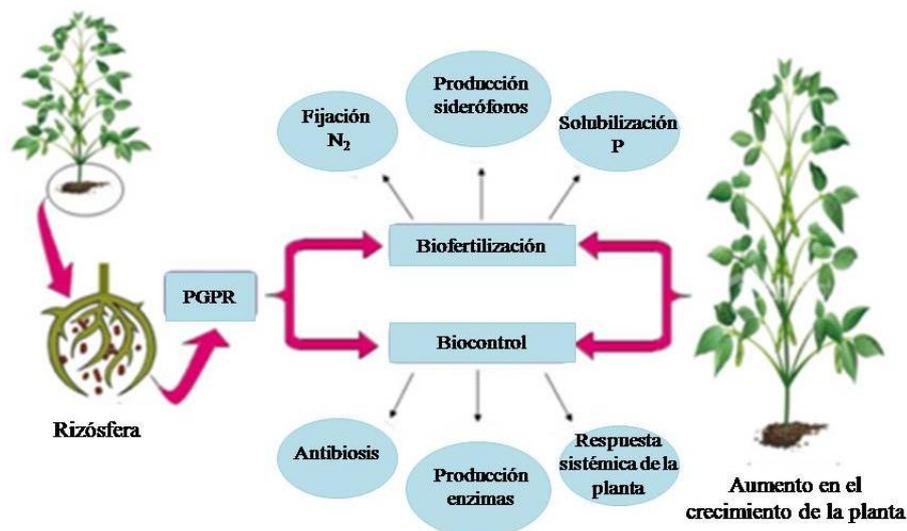


Figura 1.4 Mecanismos de las PGPR para la promoción de crecimiento de plantas [Kumar *et al.*, 2011]

1.5 Encapsulación de PGPR

La colonización de la raíz de la planta por la inoculación directa de células de PGPR en el suelo no es fácil, debido a que estas son susceptibles a variantes ambientales, como condiciones del suelo, fluctuación de pH y temperatura, humedad, depredación de protozoarios, estrés salino, entre otros [Doelman *et al.*, 1994; Schoebitz *et al.*, 2013].

El encapsulamiento de células vivas, protege a los microorganismos contra los estreses ambientales y permite su liberación en el suelo gradualmente cuando los microorganismos degradan el polímero usado como material de pared [Bashan *et al.*, 2002; Schoebitz *et al.*, 2013]. Han sido desarrolladas cápsulas sintéticas como acarreadores de bacterias para inocular plantas [Bashan, 1986], la supervivencia de las células puede aumentar mediante la inmovilización dentro de acarreadores biodegradables [Schoebitz *et al.*, 2013].

Inmovilización y encapsulación de diferentes compuestos son técnicas que han sido usadas en la agricultura, en la industria farmacéutica, alimenticia y otras industrias, para proveer una estructura protectora o cápsula logrando la inmovilización, protección, liberación y funcionalidad de ingredientes activos [Schoebitz *et al.*, 2013]. Se han encapsulado diferentes materiales desde compuestos sintéticos, fragancias, enzimas, células, anticuerpos, entre otros [Bashan, 1986; García *et al.*, 2014]. Existen diferentes procesos para la producción de microcápsulas. Procesos físicos como secado por aspersión, liofilizado, spray chilling/cooling,

extrusión, lecho fluidizado. Procesos químicos: cristalización, inclusión molecular, polimerización interfacial, absorción y adsorción Procesos físico-químicos: coacervación, liposomas y solidificación inversa [Schoebitz *et al.*, 2013].

La bioencapsulación de inoculantes microbianos se desarrolla comúnmente en tres etapas. La primera etapa involucra la incorporación de un ingrediente activo dentro de una matriz (líquida o sólida). La segunda etapa es una operación mecánica que involucra la dispersión o solución de partículas sólidas bajo agitación mecánica. Y por último, la estabilización por procesos químicos de polimerización o procesos termo-físicos (solidificación y coacervación) y físicos (evaporación y solidificación) [Schoebitz *et al.*, 2013]. La eficiencia de la encapsulación depende de varios factores, pero los que merecen mayor atención es el proceso y el agente encapsulante.

Se emplean diferentes compuestos como materiales de pared en la producción de cápsulas y microcápsulas. Cada uno de los materiales ofrecen diferentes características al encapsulado, como lo son la protección, el espesor de la cápsula y la densidad de las cápsulas [Cai *et al.*, 2000]. Los acarreadores usados suelen ser materiales convenientes (con diferentes características dependiendo del proceso de encapsulación) y económicos, los cuales permiten la liberación de la bacteria en condiciones de alta calidad fisiológica, conteniendo una o más bacterias benéficas [Schoebitz *et al.*, 2013].

Algunos materiales usados para la encapsulación de microorganismos son alginato, alginato de sodio, goma arábiga, dextrosa, azúcares, almidones, almidones modificados, maltodextrinas, β -ciclo dextrinas, metil celulosa, entre otros [Cai *et al.*, 2000; García *et al.*, 2014; Schoebitz *et al.*, 2013]. Los almidones modificados reducen su viscosidad e incrementan la solubilidad en agua, tienen una viscosidad limitada en solución, excelentes propiedades emulsificantes y buenas propiedades de secado [Cai *et al.*, 2000; Murúa *et al.*, 2009; Falfán *et al.*, 2014]. El almidón fosfatado y succinatado aumentan el índice de solubilidad en agua y absorción [Murúa *et al.*, 2009]. La encapsulación de microorganismos puede mejorarse incorporando nutrientes esenciales para el crecimiento de las bacterias, transformando a las cápsulas en bioreactores, logrando incrementar el número de bacterias encapsuladas inoculadas en el suelo [Schoebitz *et al.*, 2013], así como con aditivos, para aumentar la materia seca, y la sobrevivencia de las bacterias durante el proceso.

Las cápsulas contienen un amplio reservorio de bacterias que se liberan de forma lenta y constante. La resistencia de las cápsulas, la tasa de liberación de las bacterias, y el tiempo de supervivencia en el suelo de las bacterias puede ser controlado [Bashan, 1986; Schoebitz *et al.*,

2013]. La liberación de las bacterias encapsuladas que migran hacia el suelo, permite su competencia contra la microflora nativa [Bashan *et al.*, 2002]. Los requerimientos recomendados para encapsular microorganismos son: obtener una alta calidad del producto final, estabilidad durante su almacenamiento y sobrevivencia de los organismos en el encapsulado.

1.5.1 Secado por aspersión (Spray drying)

El secado por aspersión es un proceso continuo, con bajos costos de operación, es adaptable, económico y con buenos rendimientos. Las microcápsulas obtenidas mediante este proceso son de alta calidad, rápida solubilidad, pequeños tamaños y alta estabilidad [Schoebitz *et al.*, 2013].

En el proceso de secado por aspersión, son necesarias altas temperaturas en la alimentación del aire, para lograr la evaporación del agua en muy poco tiempo. Como resultado, ocurre la inactivación de algunas células por el incremento de temperatura, a pesar de que el tiempo de residencia es corto [Boza *et al.*, 2004; Murúa *et al.*, 2009], no es un proceso recomendable para bacterias que no son capaces de formar esporas [Schoebitz *et al.*, 2013]. Este método involucra la dispersión de células bacterianas en un material acarreador formando una emulsión, la emulsión perfectamente homogénea se atomiza dentro de una cámara de secado logrando la evaporación del solvente y consecuentemente el desarrollo de las microcápsulas [Schoebitz *et al.*, 2013]. Los materiales de pared óptimos para este proceso incluyen aquellos con alta solubilidad en agua, baja viscosidad a altas concentraciones, buenas propiedades emulsificantes, de buenas características como encapsulante, características no higroscópicas, eficientes propiedades de secado y deben ser materiales no reactivos [Murúa *et al.*, 2009; Schoebitz *et al.*, 2013].

2. Hipótesis

Los microorganismos promotores de crecimiento vegetal microencapsulados favorecen el crecimiento vegetal en un suelo contaminado con metales pesados.

3. Objetivo

Evaluar el efecto de microorganismos encapsulados sobre plantas creciendo en jal de mina.

4. Objetivos específicos

- Adaptar un método para encapsular la cepa de *Bacillus subtilis* MZ, mediante secado por aspersión.
- Determinar la sensibilidad de *Bouteloua curtipendula* en jal de mina.
- Evaluar si incrementa la tolerancia al jal de mina de *Bouteloua curtipendula* inoculado con microorganismos benéficos de la rizósfera.

5. Materiales y métodos

En el diagrama de la Figura 5 se observa un esquema general de la estrategia abordada. Los materiales y métodos del presente trabajo se describen a continuación por cada objetivo específico antes mencionado.

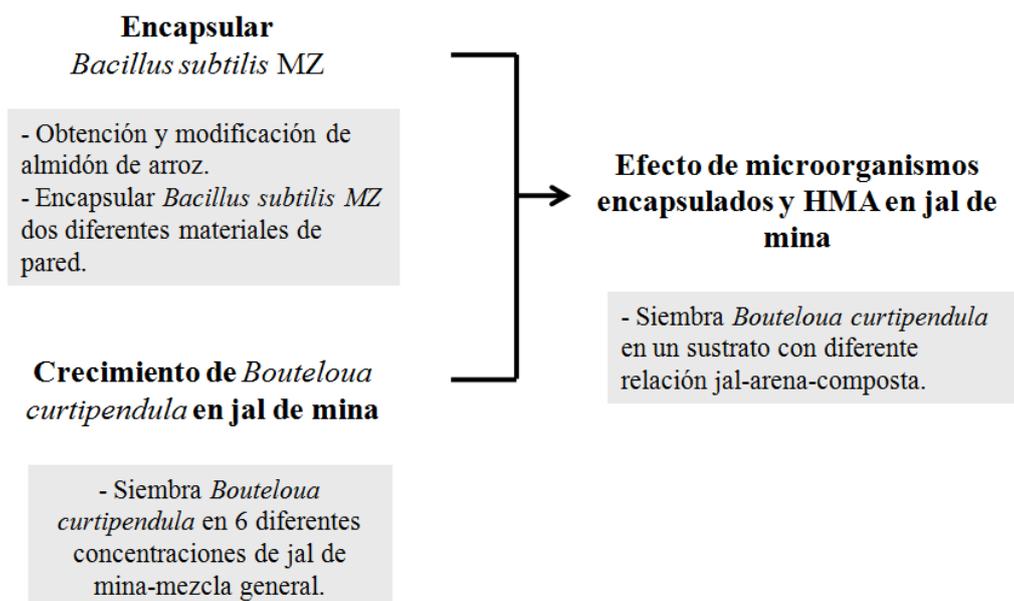


Figura 5. Diagrama general de la estrategia experimental.

5.1 Encapsulación microorganismos

Se encapsuló *Bacillus subtilis* MZ empleando como material de pared dos tipos de almidón modificado.

5.1.1 Extracción y modificación del almidón

i) Extracción del almidón

Se realizó la extracción del almidón de arroz empleando la metodología de Falfán y colaboradores [2014], con algunas modificaciones, se describe a continuación.

- 1.- Se molió el grano en molino mini Pulvex modelo 100.
- 2.- Se dejó reposar en NaOH 5 N durante 24 horas, en una relación 2 lt NaOH 5 N por cada kilogramo de arroz.
- 3.- Se molió en húmedo usando un molido de piedras Fumasa.
- 4.- El molido se tamizó empleando las cribas descrita más adelante, repitiendo esta actividad dos veces para el tamiz No. 60.

No. 14	1.41 mm
No. 40	0.42 mm
No. 60	250 μm
No. 100	149 μm
No. 200	74 μm
No. 250	62 μm

5.- Se enjuagó el residuo con bisulfito de sodio 0.1 N (NaHSO_3).

6.-Se dejó sedimentar por gravedad separando el almidón sedimentado de la fase líquida.

7.- Se sometió a secado en un horno marca Felisa a una temperatura de 40 °C.

8.- Para reducir el tamaño de partícula se molió el almidón posteriormente a su secado en un molino mini Pulvex modelo 100.

9.- Se tamizó con las cribas empleadas en el paso número cuatro.

ii) Pretratamiento del almidón

Para aumentar la eficiencia en el grado de sustitución y aumentar la solubilidad se sometió el almidón extraído del arroz a una hidrólisis ácida empleando la metodología recomendada por Zambrano y Camargo [2001], descrita a continuación.

1.- Se preparó el almidón en una solución con un 40% de sólidos suspendidos. Se agregó 3.4 gr de HCl por cada 100 gr de almidón, para obtener una solución de 3.4 % HCl en base a los sólidos suspendidos.

2.- Se dejó reposar durante un periodo de seis horas.

3.- Se ajustó a pH 5 con NaOH 4M.

4.- Para separar el almidón hidrolizado se centrifugó a 6000 rpm durante 10 minutos, se realizaron dos lavados del sedimento con agua destilada.

5.- Se sometió a secado en un horno marca Felisa, a una temperatura de 45 °C durante 24 horas.

6.- Se molió y tamizó por una criba de 250 μm para homogenizar el tamaño de partícula.

iii) Fosfatación del almidón

Una vez hidrolizado el almidón se continuó la modificación del almidón mediante fosfatación como se indica en el trabajo de Murúa y col. [2009], descrita a continuación.

1.- La fosfatación se realizó con 4 gr de tripolifosfato de sodio (TPS) por cada 100 gr de almidón hidrolizado con una humedad del 25%. El TPS se suspendió en el agua destilada con la que se ajustó la humedad del almidón hidrolizado, se utilizaron gotas de HCl concentrado para diluir el TPS.

2.- Se dejó reposar en bolsas de polietileno durante 12 horas a 4 °C.

3.-Se sometió a extrucción la mezcla de almidón y TPS, el proceso se realizó en un extrusor de bajo cizallamiento (Cinvestav) con una capacidad para 5 kg/h, bajo las siguientes condiciones:

Las temperaturas del barril fueron: la temperatura de alimentación fue de 40 °C, la temperatura de transición de 130 °C y la temperatura de alta presión 170 °C. Con una velocidad de tornillo de 86 rpm, la relación compresión tornillo fue de 3:1. El diámetro del dado de salida fue de 4 mm.

4.-Se sometió a secado a una temperatura de 40 °C durante 24 horas.

5.- Se molió y tamizó por una criba de 250 μm para homogenizar el tamaño de partícula.

5.1.2 Encapsulación usando secado por aspersión

La bacteria microencapsulada fue *Bacillus subtilis* MZ del cepario perteneciente al laboratorio de Bioquímica Ecológica. Se emplearon dos materiales de pared para encapsular a las bacterias, el primero fue el almidón extraído del arroz y posteriormente fosfatado y el segundo un almidón comercial succinatado.

i) Descripción de tratamientos

Se realizaron un total de 6 tratamientos con diferentes porcentajes del inóculo de la bacteria, así también, empleando dos diferentes materiales de pared, de cada uno de ellos se realizaron tres réplicas bajo idénticas concentraciones de las soluciones y mismas condiciones del proceso, se describe el diseño de los experimentos a continuación.

Material de pared almidón fosfatado.

Porcentaje de sólidos 10 %

Tratamiento 1:

Inóculo: 6 % cultivo *Bacillus subtilis* MZ, este 6% se conformó en 50% de bacterias en fase vegetativa y el 50% de esporas.

Tratamiento 2:

Inóculo: 12 % cultivo *Bacillus subtilis* MZ, este 12% se conformó en 50% de bacterias en fase vegetativa y el 50% de esporas.

Tratamiento 3 - CONTROL:

Inóculo: 0 %, se agregó un volumen correspondiente al 6 % del volumen de la muestra con el medio de cultivo sin bacteria.

Material de pared almidón succinatado comercial

Porcentaje de sólidos 30 %

Tratamiento 4:

Inóculo: 6 % cultivo *Bacillus subtilis* MZ, este 6% se conformó en 50% de bacterias en fase vegetativa y el 50% de esporas.

Tratamiento 5:

Inóculo: 12 % cultivo *Bacillus subtilis* MZ, este 12% se conformó en 50% de bacterias en fase vegetativa y el 50% de esporas.

Tratamiento 6 - CONTROL:

Inóculo: 0 %, se agregó un volumen correspondiente al 6 % del volumen de la muestra con el medio de cultivo líquido sin bacteria.

El porcentaje de sólidos totales suspendidos para cada tipo de almidón se determinó en función de su viscosidad en la emulsión, ya que es uno de los requerimientos básicos para poder someterse a secado en el equipo empleado.

ii) Preparación del inóculo

El inóculo de la bacteria consistió como se menciona anteriormente en 50 % de un cultivo en fase vegetativa y 50 % en fase de esporulación, con una concentración total de 2.03×10^8 UFC/ml. para los tratamientos con un inóculo de *B. subtilis* MZ del 6%, y de 4.06×10^8 UFC/ml. para los tratamientos con un inóculo de *B. subtilis* MZ del 12%. Se preparó de la siguiente forma.

- 1.- Para la fase vegetativa se cultivó *Bacillus subtilis* MZ en infusión de papa un día antes de la preparación de las cápsulas, incubado a temperatura ambiente, hasta llegar a un absorbancia de 0.336 en una longitud de onda de 485.5 nm.
- 2.- Para la fase en esporas se uso un cultivo de *Bacillus subtilis* MZ en infusión de papa con una longevidad de 4 días previos a la preparación de las cápsulas, incubado a temperatura ambiente, hasta llegar a un absorbancia de 0.107 a una longitud de onda de 485.5 nm.

iii) Proceso de encapsulación de *Bacillus subtilis* MZ

Una vez diseñados los experimentos se procedió a encapsular a los microorganismos empleando la metodología citada en Bertolini y col. [2001] a continuación descrita.

- 1.- Se prepararon las emulsiones para cada experimento descrito en agua destilada a una temperatura de 40 °C, sin el inóculo de *Bacillus subtilis* MZ.
- 2.- Se homogeneizó la emulsión a 14000 rpm durante 5 minutos.
- 3.- Se filtró la emulsión usando una manta de cielo.

4.- Se procedió a agregar a la emulsión el inóculo de *Bacillus subtilis* MZ o infusión de papa en el caso de los controles.

5.- Se homogeneizó la emulsión con el inóculo a 5000 rpm durante 3 minutos.

6.- Se procedió a secar la muestra en el equipo Spray dryer SD-Basic maraca LAB PLANT (Figura 5.1.2).

Las condiciones de operación se describen a continuación: una temperatura de alimentación del aire de 180°C, la velocidad de alimentación No. 3 aproximadamente de 0.36 l/h, y por último, el diámetro de la boquilla de 0.5 mm.



Figura 5.1.2 Spray dryer SD-Basic.

5.1.3 Sobrevivencia de *Bacillus subtilis* MZ en las microcápsulas

El proceso de secado por aspersion se evaluó en base a los rendimientos del mismo. Con la finalidad de demostrar, cuál es la situación con las células del inóculo de *Bacillus subtilis* MZ después del proceso de secado por aspersion, se realizó el conteo de células viables, se determino el número de unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de cápsula, mediante diluciones decimales.

- 1.- Se tomó 1gr de microcápsulas de los tratamientos 1,2, 4 y 5 (tratamientos con inóculo bacteriano) y se diluyó en 9 ml. de agua destilada estéril.
- 2.-Se realizaron diluciones decimales con agua destilada estéril de la suspensión de microcápsulas en agua (descrita en el punto anterior).
- 3.- Se sembró en placa en superficie, las diluciones por triplicado.
- 4.-Se incubaron a 23°C durante 24 horas.
- 5.- Se realizó el conteo de las unidades formadoras de colonias.

5.1.4 Comportamiento de *B. subtilis* MZ microencapsulada en dos sustratos

Se monitoreó el comportamiento de *Bacillus subtilis* MZ microencapsulada y sin encapsular, inoculada en un sustrato estéril, se incubó a una temperatura de 37 °C durante un periodo de 19-20 días, con la finalidad de observar cómo influye el encapsulado en la sobrevivencia de la bacteria a través del tiempo.

Se evaluó la sobrevivencia de *B. subtilis* MZ microencapsulado y sin encapsular en dos sustratos, mezcla general de invernadero y jal de mina.

i) Descripción de tratamientos

El inóculo para todos los tratamientos se ajustó a una densidad de 1×10^7 unidades formadoras de colonias (UFC). Se describen a continuación los tratamientos.

Tratamiento A: Células de *Bacillus subtilis* MZ.

Tratamiento B: Microcápsulas de *B. subtilis* MZ de almidón fosfatado con un inóculo del 6 %.

Tratamiento C: Microcápsulas de *B. subtilis* MZ de almidón succinatado con un inóculo del 6 %.

ii) Descripción de los sustratos

Los sustratos empleados fueron mezcla general de invernadero y jal de mina. La mezcla general de invernadero está conformada de suelo lama, suelo de hoja, Sunshine Mezcla No. 3, perlita y vermiculita, en proporciones 1:2:3:1:1 respectivamente.

El jal se obtuvo de la presa de jales de la mina “El cubo”, localizada en el estado de Guanajuato. Los principales minerales que se extraídos de esta mina son plata, cobre, plomo y zinc.

Se esterilizaron ambos sustratos durante una hora a 15 psi tres veces, dejando reposar 24 horas entre cada una de ellas. Posteriormente, se ajustó al 75 % de la capacidad de retención de agua (CRA) de cada sustrato.

iii) Descripción de inóculos

El inóculo para el tratamiento A se obtuvo de la siguiente manera:

- 1.- Las bacterias se hicieron crecer en infusión de papa, se incubó a 23°C durante 24 hrs.
- 2.- Se separaron las células mediante centrifugación a 10000 rpm durante un tiempo de 10 minutos a 4°C, el volumen fue el necesario para ajustar la densidad de 1×10^7 UFC/ml. para cada repetición.
- 3.- Se realizaron dos enjuagues con agua destilada estéril, con las mismas condiciones de la centrifuga.
- 4.- Se cosecharon las células y se resuspendieron en el agua destilada estéril con la que se ajustó a 75% de la capacidad de retención de agua.

Para los tratamientos B y C, se inoculó con los gramos de microcápsulas necesarios para ajustar la densidad requerida (1×10^7 UFC/ml).

iv) Procedimiento

Para monitorear el comportamiento de *Bacillus subtilis* MZ bajo condiciones de alta temperatura a través del tiempo, se cuantificaron las UFC a los 0, 1, 3, 5 y 12 días. La medición

final se realizó para los tratamientos con mezcla general al día 19 y para los tratamientos que contenían jal al día 20.

A continuación se describe la metodología empleada.

- 1.- En frascos de dilución de leche estériles, se depositaron 10 gr de sustrato.
- 2.- En los frascos de dilución estériles con el sustrato se añadió el inóculo correspondiente para cada tratamiento (Figura 5.1.4).
- 3.- Se ajustó con agua destilada estéril a 75 % de la CRA de cada sustrato.
- 4.- Se incubaron a 37 °C. Después de 0, 1, 3, 5, 12 y 19-20 días, tres frascos de cada tratamiento fueron seleccionados al azar.
- 5.- A cada frasco se adicionaron 90 ml. de agua destilada estéril y se agitó hasta homogeneizar.
- 6.- Se cuantificaron UFC usando diluciones decimales, como se describe en el apartado 5.1.3 a partir del paso número 2.



Figura 5.1.4 Muestra con mezcla general de invernadero.

5.1.5 Determinar la estructura microscópica de las microcápsulas

En algunos reportes existentes acerca de compuestos microencapsulados mediante secado por aspersión, se analiza la estructura de la cápsula empleando microscopía. En el presente trabajo, el enfoque del análisis microscópico muestra una nueva perspectiva para identificar a los microorganismos encapsulados en la matriz de almidón.

La observación de las muestras se realizó en un microscopio (BX50, Olympus, Japón) utilizando objetivos de 4X/0.10 Plan (α - -) y 20X/0.50, UPlan-FL (α - 0.17). Los métodos de iluminación fueron luz incandescente cuya fuente fue lámpara de halógeno (IOUSH, Japón) y luz ultravioleta con lámpara de vapor de mercurio (OSRAM, México) y filtro de excitación a 350 a 400 nm. La adquisición de imágenes se realizó con una cámara de alta sensibilidad para fluorescencia Infinity3 (Lumenera, Canadá) sincronizada a través del programa Image Pro Premier 9.1 (Media Cybernetics, EUA).

La observación al microscopio se realizó tiñendo las muestras. Para la tinción de las microcápsulas se empleó una modificación de la tinción con naranja de acridina usada por Hobbie y col. [1977], simultáneamente con yoduro de propidio, descrita a continuación.

i) Preparación de las soluciones “stock”

Solución al 0.1% de naranja de acridina en agua destilada estéril.

Solución de 2% de yoduro de propidio en regulador de fosfatos salino como lo mencionan Kenneth y James [1985].

ii) Tinción de cápsulas

1.- Se preparó una solución que se le denominó “solución de tinción” con las soluciones “stock” en relación 1:1. Esta solución se preparó al momento en que se realizó cada una de las observaciones.

2.- A una pequeña muestra de microcápsulas montada en un portaobjetos, se adicionó 10 μ l de la solución de tinción.

3.- Se observaron las muestras al microscopio (BX50, Olympus) a dos longitudes de onda, la primera de 480-510 nm y la segunda de 530-550 nm.

4.- Se realizó un empalme de las fotografías tomadas para las observaciones a ambas longitudes de onda, para apreciar células vivas y células muertas en una misma imagen y observar si co-localizan.

iii) Tinción de *Bacillus subtilis* MZ “Control positivo”

Como control positivo, se observaron células de *Bacillus subtilis* MZ, para realizar las observaciones las células se obtuvieron de la siguiente forma:

1.- Se hizo crecer a *Bacillus subtilis* MZ en infusión de papa, se incubó a una temperatura de 23°C durante 24 horas.

2.- Para eliminar el ruido de fondo en las observaciones al microscopio causadas por el medio de cultivo, se separaron las células mediante centrifugación a 10000 rpm durante un tiempo de 5 minutos a 4°C.

3.- Se realizaron dos enjuagues con agua destilada estéril, bajo las mismas condiciones de centrifugación. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en agua destilada estéril.

4.- Para cosechar las células se centrifugó nuevamente bajo las mismas condiciones de operación. El pellet se resuspendió en 200 µl de la solución de tinción, se dejó reposar durante 3 minutos.

Para la tinción se usaron 200 µl de la solución de tinción por cada 100 µl de muestra del cultivo.

5.- Se separaron las células del colorante mediante centrifugación, de la misma forma que en el paso 1. El pellet se resuspendió en 200 µl de agua destilada estéril.

6.- Se montó en un portaobjetos una alícuota de 7 µl de la muestra, se realizaron las observaciones con el microscopio a dos longitudes de onda, 480-510 nm y 530-550nm.

9.- Se realizó un empalme de las fotografías tomadas para las observaciones a ambas longitudes de onda para apreciar células vivas y células muertas en una misma imagen y ver si co-localizan.

iv) Tinción de esporas de *Bacillus subtilis* MZ “Control positivo”

Como un segundo control positivo, se observaron esporas de *Bacillus subtilis* MZ, las muestras se obtuvieron de la forma descrita en el inciso anterior, a diferencia de que el cultivo de *B. subtilis* MZ se incubó durante 4 días para permitir el mayor número de esporas.

Para cada muestra se realizaron tres tinciones de las cuales, se observaron un total de 5 campos a ambas longitudes de onda mencionadas.

5.2 Crecimiento vegetal en diferentes concentraciones de jal de mina

Para validar el crecimiento de *Bouteloua curtipendula* en el jal de mina, se realizo el experimento que se describe a continuación.

5.2.1 Material vegetal

El cultivar evaluado fue un pasto forrajero conocido como “Banderita” cuyo nombre científico es *Bouteloua curtipendula*. Las semillas de *Bouteloua curtipendula* fueron donadas por el Dr. Ernesto Flores Ancira de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, de la cosecha realizada en 2013.

i) Desinfección de semillas

Las semillas fueron desinfectadas como se menciona a continuación:

- 1.- Se adicionó a las semillas etanol al 70 % durante un minuto.
- 2.- Se retiró el etanol, y se adicionó hipoclorito de sodio al 1 %, dejándolas en este durante 5 minutos.
- 3.- Se realizaron seis enjuagues de las semillas con agua destilada estéril.

ii) Ensayo de germinación *in vitro*

Se realizaron ensayos de germinación para conocer la viabilidad de la semilla de la siguiente forma.

- 1.- Se humedeció con agua destilada estéril algodón localizado en una caja petri, todos los materiales se esterilizaron previamente.

2.- Se montaron sobre el algodón 100 semillas de *Bouteloua curtipendula* previamente desinfectadas.

3.- Se incubaron en el cuarto de crecimiento a una temperatura de 24-25 °C y un fotoperiodo de 18 hrs luz – 8 hrs oscuridad.

4.- Se monitoreó durante una semana la cantidad de semillas germinadas.

5.2.2 Sustrato

El presente experimento se realizó usando la combinación de dos sustratos, arena ordinaria y jal de mina. El jal se obtuvo de la presa de jales de la mina “El cubo”, localizada en el estado de Guanajuato.

Se esterilizaron ambos sustratos durante una hora a 15 psi tres veces, dejando reposar 24 horas entre cada una de ellas.

i) Caracterización del jal

Se enviaron las muestras de jal al Instituto Tecnológico de Celaya con el Doctor Eliazar Escamilla Silva, donde determinaron mediante espectrofotometría de absorción atómica la concentración de cadmio (Cd), cromo (Cr), cobre (Cu), plomo (Pb) y zinc (Zn).

5.2.3 Ensayo en invernadero

i) Descripción de tratamientos

Se evaluó el crecimiento de *B. curtipendula* en diferentes concentraciones de jal de mina, en condiciones de invernadero. Se describen a continuación los tratamientos llevados a cabo.

Tratamiento A: Mezcla común de invernadero.

Tratamiento B: 20 % jal – 80 % mezcla común de invernadero.

Tratamiento C: 40 % jal – 60 % mezcla común de invernadero.

Tratamiento D: 50 % jal – 50 % mezcla común de invernadero.

Tratamiento E: 60 % jal – 40 % mezcla común de invernadero.

Tratamiento F: 80 % jal – 20 % mezcla común de invernadero.

Tratamiento G: 100 % jal.

ii) Montaje del experimento

El experimento se realizó en el invernadero No. 13 de CINVESTAV Unidad Irapuato. Se describe a continuación.

- 1.- Se prepararon las mezclas de los sustratos para cada tratamiento, descritas anteriormente y se depositaron en macetas con una capacidad de 300 ml.
- 2.- Se sembraron cinco semillas de *Bouteloua curtipendula* previamente desinfectadas, en cada una de las macetas. Se evaluaron cinco réplicas por cada tratamiento.
- 3.- Las macetas fueron acomodadas en un diseño experimental completamente al azar en el invernadero.

iii) Evaluación de variables

Las plantas se retiraron de la maceta y lavaron cuidadosamente hasta que su raíz quedo libre de suelo y se separó la raíz de la parte aérea de la planta. A continuación se procedió a tomar los siguientes datos:

- a) Peso seco de raíz (gr): Cada raíz se colocó en una bolsa de papel respectivamente etiquetada y posteriormente se colocó en un horno a una temperatura de 70°C por un periodo de 48 horas para su secado.
- b) Peso seco de parte aérea de la planta (gr): Cada raíz se colocó en una bolsa de papel respectivamente etiquetada y posteriormente se colocó en un horno a una temperatura de 70°C por un periodo de 48 horas para su secado.

5.3 Efecto de microorganismos encapsulados y hma sobre plantas en jal de mina

El bioensayo final se realizó con la finalidad de evaluar el efecto en el crecimiento de *B. curtipendula* de las microcápsulas de *B. subtilis* MZ junto a un consorcio de Hongos micorrízicos, en un sustrato con altas concentraciones de metales pesados.

i) Descripción de tratamientos

Se describe a continuación el diseño experimental evaluado.

Tratamiento 1: Sin inóculo bacteriano + HMA.

Tratamiento 2: Sin inóculo bacteriano, sin inóculo HMA.

Tratamiento 3: Inóculo líquido + HMA.

Tratamiento 4: Inóculo líquido, sin inóculo HMA.

Tratamiento 5: Inóculo microcápsulas + HMA.

Tratamiento 6: Inóculo microcápsulas, sin inóculo HMA.

Los seis tratamientos fueron evaluados en 4 mezclas de sustratos diferentes, se describen en el siguiente punto.

ii) Sustrato utilizado

El presente experimento se realizó usando principalmente dos sustratos: arena ordinaria y jal de mina. Se aportó también como apoyo nutricional a algunos tratamientos composta estéril, la cual se esterilizó durante una hora a 15 psi tres veces, dejando reposar 24 horas entre cada una de ellas.

Se manejaron cuatro mezclas de estos sustratos para cada uno de los tratamientos, su composición se describe a continuación.

Mezcla 1: Jal.

Mezcla 2: Jal + composta estéril.

Mezcla 3: 60 % Jal + 40% arena.

Mezcla 4: 60 % Jal + 40% arena + composta estéril.

El porcentaje de arena se definió con los resultados obtenidos del experimento en invernadero en el que se evaluó el crecimiento vegetal de *Bouteloua curtipendula* MZ a diferentes concentraciones de jal-mezcla general de invernadero. Los sustratos 2 y 4 se componen en 1/6 del volumen total de la mezcla por composta estéril.

iii) Descripción de inóculos

El inóculo bacteriano para los tratamientos correspondientes se ajustó a una densidad de 1×10^7 UFC/ml.

Para el inóculo de *Bacillus subtilis* MZ en líquido, las bacterias se hicieron crecer en infusión de papa y se incubó a 23°C durante 24 hrs. El volumen inoculado fue el necesario para ajustar la densidad de 1×10^7 UFC/ml para cada repetición.

Para los tratamientos con inóculo de microcápsulas, se inoculó con los gramos de microcápsulas necesarios para ajustar la densidad requerida (1×10^7 UFC/ml).

Para el inóculo de HMA se utilizó el consorcio Selva, perteneciente a la colección del laboratorio de Bioquímica ecológica. El consorcio está integrado por las siguientes especies: *Glomus constrictum*, *Glomus geosporum*, *Glomus fasciculatum*, *Glomus tortuosum* y *Acaulospora scrobiculata*. El inóculo de HMA para los tratamientos correspondientes fue de 500 esporas por maceta.

iv) Material vegetal

En este ensayo se evaluó al cultivar *Bouteloua curtipendula*. Las semillas fueron desinfectadas como se indica en 5.2.0.

v) Montaje del experimento

El experimento se realizó en el invernadero No. 13 de CINVESTAV Unidad Irapuato. Se describen a continuación las actividades seguidas.

- 1.- Se prepararon las cuatro mezclas de los sustratos para todos los tratamientos y se depositaron en macetas con una capacidad de 4 litros. Se realizaron cinco repeticiones por cada tratamiento, y todos los tratamientos para cada uno de los cuatro sustratos.

- 2.- Se retiró una pequeña capa de sustrato y en su lugar se añadió el inóculo de HMA, únicamente a los tratamientos correspondientes, para los tratamientos no conformados con este inóculo se omitió este paso.
- 3.- Se añadió el inóculo de microcápsulas, solo a los tratamientos correspondientes, para los tratamientos no conformados con este inóculo se omitió este paso.
- 4.- Se colocaron cinco semillas de *Bouteloua curtipendula* previamente desinfectadas en cada una de las macetas y se procedió a cubrirlas con el sustrato que se había retirado en el paso dos.
- 5.- Se añadió el inóculo líquido *B. subtilis* MZ, solo a los tratamientos correspondientes, para los tratamientos no conformados con este inóculo se omitió este paso.
- 6.- Todos los tratamientos fueron acomodados en un diseño experimental completamente al azar en el invernadero.
- 7.- Una vez evaluada la germinación de las semillas en los diferentes tratamientos, se dejó solamente dos plántulas de *B. curtipendula* por maceta.

vi) Evaluación de variables

- 1.- Germinación: Se realizó el conteo las semillas germinadas de *Bouteloua curtipendula* a determinados tiempos, durante 4 semanas aproximadamente.
- 2.- Variables de crecimiento: Se realizó la medición de la altura final de la planta. Posteriormente se retiró la planta integra sin perder fragmentos de la raíz, las raíces se lavaron cuidadosamente hasta que quedaron libres de suelo y se separó la raíz de la parte aérea. A continuación se procedió a tomar los siguientes datos:
 - a) Volumen de raíz (ml): Se introdujo la raíz en una probeta con determinado volumen de agua, se calculó con el volumen desplazado.
 - b) Peso fresco de raíz (gr): Cada raíz se pesó y se registró al momento de cosechar el experimento.
 - c) Peso seco de raíz (gr): Después del pesarse, cada raíz se colocó en una bolsa de papel respectivamente etiquetada y posteriormente se colocó en un horno a una temperatura de 70°C por un periodo de 48 horas para su secado.

d) Peso fresco de la parte aérea de la planta (gr): La parte aérea de la planta se pesó y este valor se registró al momento de cosechar el experimento.

e) Peso seco de parte aérea de la planta (gr): Después de pesarse, la parte aérea de la planta se colocó en una bolsa de papel respectivamente etiquetada y se colocó en un horno a una temperatura de 70°C por un periodo de 48 horas para su secado.

3.- Colonización de HMA: Se tomó una muestra de la raíz una vez lavada al momento de la cosecha, para posteriormente evaluar la colonización por micorrizas. En 5.3.1 se describe la metodología empleada.

4.- Contenido de metales pesados: Una vez que se secó el material vegetal y se registró los valores, se determinó el contenido de cadmio (Cd), cromo (Cr), cobre (Cu), plomo (Pb) y zinc (Zn) presente en las muestras de raíz y parte aérea de la planta. Se aborda en 5.3.2.

5.3.1 Colonización de HMA

La colonización de la raíz por HMA se puede evaluar por las estructuras intraradicales que son desarrolladas al interior de las células vegetales. Para visualizar estas estructuras se realizó la tinción de las raíces con modificaciones del protocolo empleado por Phillips y Hayman [1970], se describe a continuación.

1.- Se decoloraron las raíces, se adicionó KOH al 10% hasta cubrirlas y se sometieron durante 10 minutos a una presión de 10 psi en el autoclave.

2.- Se retiró el exceso de KOH y se enjuagaron las raíces con agua corriente.

3.- Se adicionó la solución de azul de tripano al 0.5 % hasta cubrir las raíces y se sometieron durante 10 minutos a una presión de 10 psi en el autoclave.

4.- Se retiró el exceso de colorante y se enjuagaron las raíces con agua corriente.

5.- Se adicionó acetoglicerol para su preservación.

Preparación de las soluciones empleadas para la tinción:

Acetoglicerol: 400 ml de ácido acético al 85%, 500 ml glicerol, se afora a 1.5 L con agua destilada.

Azul de tripano 0.5 %: 0.5 gr de azul de tripano en 1 L de acetoglicerol.

Una vez teñidas las raíces, para realizar la evaluación de colonización por el método de Intersección con base en lo establecido por McGonigle y col. [1990], se montaron 15 fragmentos de cada raíz con una dimensión de 1 cm en cada portaobjetos, y se tomó la lectura de 3 puntos de cada fragmento de raíz.

Se evaluó el porcentaje de hifas, vesículas y arbuscúlos, así como el total de colonización. Se analizaron 3 réplicas al azar de cada tratamiento, un total de 135 campos de observación para cada réplica, los datos se sometieron a una transformación angular o de Bliss ($\arcsen\sqrt{x/100}$), para realizar el análisis estadístico cumpliendo con una distribución normal [Steel & Torrie, 1996].

5.3.2 Análisis de metales en el tejido vegetal

Después de evaluar el peso seco de la raíz y de la parte aérea de la planta, se enviaron las muestras al Instituto Tecnológico de Celaya con el Doctor Eliazar Escamilla Silva, donde determinaron mediante espectrofotometría de absorción atómica la concentración de cadmio (Cd), cromo (Cr), cobre (Cu), plomo (Pb) y zinc (Zn).

Con las concentraciones obtenidas, se calculó el factor de traslocación (FT) de la forma reportada por Ban y col. [2015], determinado con el valor de la concentración de la parte aérea en relación a la concentración de la raíz de la planta.

$$FT = \frac{C_{foliar}}{C_{raíz}}$$

6. Resultados

6.1 Encapsulación de microorganismos

6.1.1 Extracción y modificación del almidón

El método empleado en este trabajo, permitió un un rendimiento de 36.19 % en la extracción de almidón del arroz.

6.1.2 Encapsulación usando secado por aspersión

Se evaluó el rendimiento del proceso de secado por aspersión para los diferentes tratamientos descritos en la sección de materiales y métodos. El almidón succinatado es el material de pared que presentó mayor rendimiento en el proceso de secado por aspersión

El proceso de secado por aspersión alcanzó un rendimientos del 30 al 45%, como se puede observar en la Tabla 6.1.2. El tratamiento número 5 realizado con un inóculo de 12%, obtuvo un rendimiento de 43.7%, siendo así, el tratamiento que presentó el mayor rendimiento de los seis tratamientos.

Tabla 6.1.2. Rendimientos del proceso de secado por aspersión, los valores corresponden a la media de los datos \pm desviación estándar (Media \pm SD).

	Tratamientos	Rendimiento (%)
Almidón fosfatado	1 Inóculo 6%	34.41 \pm 5.73
	2 Inóculo 12 %	39.10 \pm 3.41
	3 CONTROL	35.96 \pm 5.62
Almidón succinatado	4 Inóculo 6%	41.13 \pm 1.55
	5 Inóculo 12 %	43.70 \pm 1.57
	6 CONTROL	39.23 \pm 2.15

Los mejores rendimientos alcanzados por los tratamientos realizados con almidón succinatado, son debido a que las emulsiones preparadas para realizar las microcápsulas contenían un

porcentaje de sólidos mayor al porcentaje de las emulsiones preparadas para realizar las microcápsulas de almidón fosfatado. El porcentaje de sólidos que se empleó para las microcápsulas de almidón succinatado fue del 30%, mientras que, para las microcápsulas de almidón fosfatado fue del 10%.

6.1.3 Sobrevivencia de *Bacillus subtilis* MZ en las microcápsulas

Después del proceso de secado por aspersión, se analizaron dos variables para evaluar la sobrevivencia de la bacteria. La primera variable, se determinó mediante la cuantificación de unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de microcápsula, y se definió como la cantidad de células presentes en las microcápsulas (UFC/gr). La segunda variable se definió como la sobrevivencia del microorganismo a través del proceso, se determinó mediante el balance entre las UFC en la alimentación del proceso y las UFC cuantificadas en las microcápsulas del producto.

Es indispensable conocer la cantidad de células presentes por gramo de microcápsulas, debido a que, es un índice que describe la calidad de las microcápsulas; así también, es un valor necesario para tener el control de las UFC inoculadas en cada experimento.

Como se puede observar en la Tabla 6.1.3, el tratamiento 1 realizado empleando como material de pared almidón fosfatado e inoculado con un 6 % de células de *Bacillus subtilis* MZ, presentó un conteo 9.90×10^5 UFC por gramo de cápsulas; mientras que, el tratamiento 2 en el que se empleo el mismo material de pared y fue inoculado con un 12 % de células de *Bacillus subtilis* MZ presento una cantidad de 4.85×10^6 UFC por gramo de cápsulas. Así también, el tratamiento 4 fue realizado empleando como material de pared almidón succinatado e inoculado con un 6 % de *B. subtilis* MZ, presentó un promedio de 1.8×10^6 UFC/gr cápsula; mientras que, el tratamiento 5 con el mismo material de pared, con un inóculo del 12% presentó un conteo en promedio de 1.2×10^6 UFC/gr microcápsula.

Se observó que, la cantidad de células de la bacteria en las microcápsulas de almidón fosfatado con un 6% de inóculo fue menor que en las microcápsulas realizadas con un inóculo del 12%; sin embargo, la cantidad de bacterias presentes en las microcápsulas de almidón succinatado con un inóculo del 6% fue mayor que en las microcápsulas de almidón succinatado con un inóculo del 12%. Un comportamiento similar se observó cuando se analizó la sobrevivencia de la bacteria. Los resultados esperados para ambos materiales de pared, es que, en los tratamientos con un inóculo del 12% la cantidad de células de la bacteria presentes en las microcápsulas obtenidas fueran mayores a las células presentes en las microcápsulas con un inóculo del 6%.

Lo anterior nos llevó a considerar que, la relación entre el tipo de almidón empleado, el porcentaje de sólidos suspendidos totales y el porcentaje de inóculo, se ve involucrada en la cantidad de células microencapsuladas mediante secado por aspersión.

Por otro lado, conocer la sobrevivencia de la bacteria a través del proceso de secado por aspersión además de ser un dato esencial, nos ayuda a conocer el comportamiento de la misma y ofrece elementos para la optimización del proceso. Como se aprecia en la Tabla 6.1.3, el material de pared que presentó mayor protección para *Bacillus subtilis* MZ fue el almidón succinatado. Las microcápsulas de almidón succinatado con un inóculo de 6% corresponden a el tratamiento que alcanzó el mayor porcentaje de sobrevivencia de *B. subtilis* MZ, con un valor de 21.9 %. Las microcápsulas de almidón succinatado con una inóculo del 12% presentaron una sobrevivencia promedio de 7.76%. La sobrevivencia que presentó *Bacillus subtilis* MZ en las microcápsulas de almidón fosfatado con un inóculo del 6% fue de 3.36%; mientras que, la sobrevivencia del tratamiento con un inóculo del 12% alcanzo un porcentaje de sobrevivencia promedio de 9.34 %.

Tabla 6.1.3. Unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de microcápsula y sobrevivencia de *B. subtilis* MZ al proceso de secado por aspersión; los valores corresponden a las medias \pm desviación estándar (Media \pm SD).

	Tratamiento	UFC/gr	Sobrevivencia (%)
Almidón fosfatado	1 Inóculo 6%	$9.90 \times 10^5 \pm 4.24E \times 10^4$	3.36 ± 0.14
	2 Inóculo 12 %	$4.85 \times 10^6 \pm 1.06 \times 10^6$	9.34 ± 2.04
	3 CONTROL	0 ± 0	-
Almidón succinatado	4 Inóculo 6%	$1.80 \times 10^6 \pm 8.40 \times 10^5$	21.9 ± 10.22
	5 Inóculo 12 %	$1.20 \times 10^6 \pm 8.49 \times 10^4$	7.76 ± 0.55
	6 CONTROL	0 ± 0	-

6.1.4 Comportamiento de *B. subtilis* MZ microencapsulada en dos sustratos

Los ensayos que se reportan a continuación, se realizaron con la finalidad de observar el comportamiento de *B. subtilis* MZ microencapsulado comparado con la misma bacteria sin encapsular, bajo condiciones de alta temperatura, en dos diferentes sustratos.

Como se observa en la Figura 6.1.4a, en el ensayo en el que se empleó como sustrato mezcla general, las bacterias de los tratamientos con inóculo de microcápsulas fueron capaces no solo de sobrevivir, sino, de crecer de manera sobresaliente; mientras que, el inóculo con únicamente la bacteria los primeros días solo fue capaz de sobrevivir, sin embargo, al tercer día la bacteria es capaz de crecer; lo que indica que metabólicamente la bacteria se comporta de manera diferente.

Los tratamientos con microcápsulas lograron incrementar el conteo de bacterias en por lo menos 2×10^9 UFC/ml al día 19, en este sustrato; así también, el tratamiento inoculado solamente con la bacteria alcanzó un incremento al día 19 de 6.88×10^7 UFC/ml.

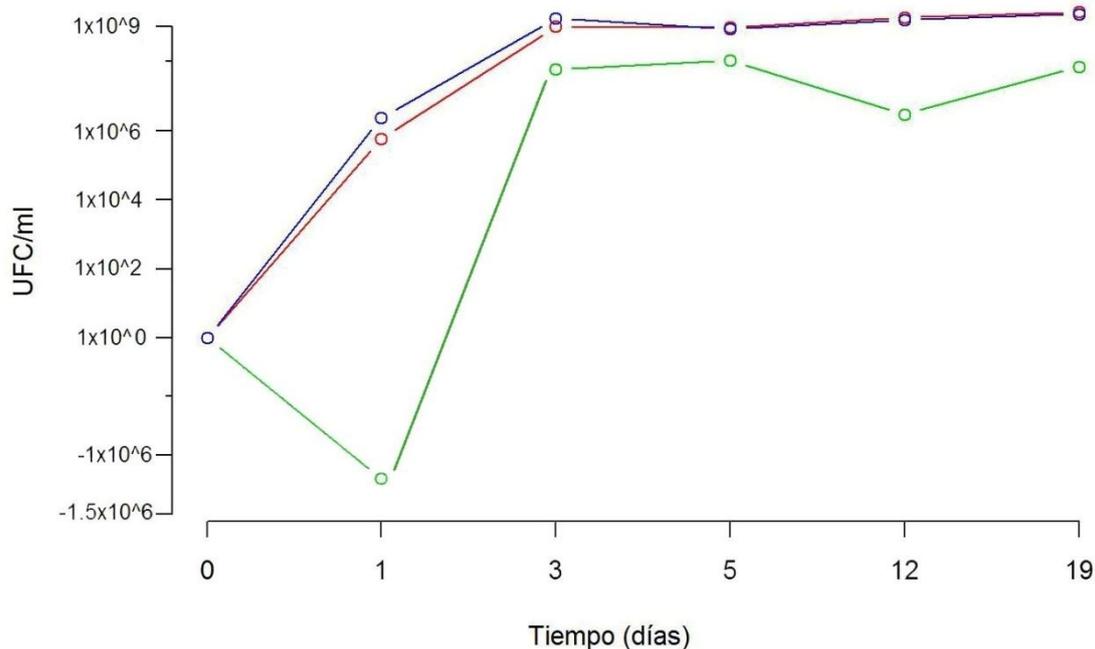


Figura 6.1.4a Sobrevivencia de *B. subtilis* MZ microencapsulado, ensayo en mezcla general de invernadero. Tratamiento con inóculo de células de color verde, tratamiento con inóculo de microcápsulas de almidón fosfatado de color rojo y tratamiento con inóculo de microcápsulas de almidón succinatado de color azul.

Por otra parte, como se puede observar en la Figura 6.1.4b, este comportamiento no se conserva cuando se inoculo la bacteria microencapsulada y sin encapsular en el jal de mina.

Las condiciones del jal, no permiten a la bacteria crecer de la misma forma que lo hace en un sustrato sin metales pesados. Los tres tratamientos lograron incrementar el conteo de bacterias en 10^6 UFC/ml al día 20; esto es 10^3 UFC/ml menor que en el ensayo en mezcla general. Además, cuando la bacteria se encontraba sin microencapsular, los primeros días del experimento sufre dos decesos drásticos y posteriormente un crecimiento muy marcado; este comportamiento se observó al día cinco para la bacteria microencapsulada en almidón succinatado, esto puede deberse a un ajuste en su metabolismo o a que se ven afectadas por la toxicidad del sustrato en el que se encuentra. Sin embargo, la bacteria microencapsulada con almidón fosfatado fue capaz crecer sin los percances que presentan los otros dos tratamientos.

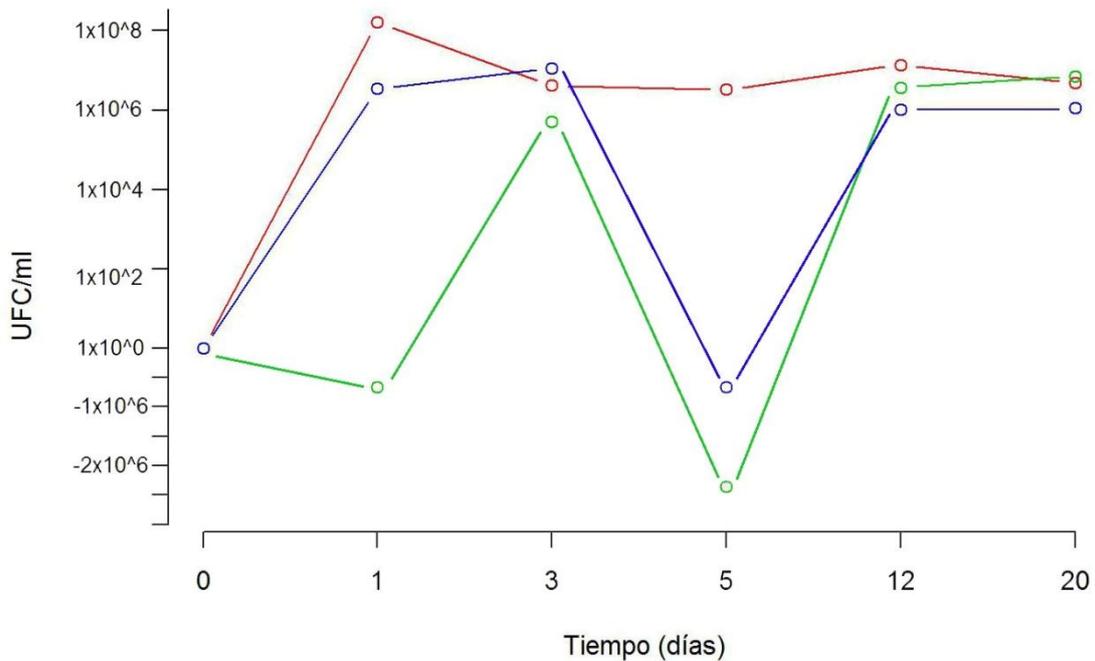


Figura 6.1.4b. Supervivencia de *B. subtilis* MZ microencapsulado, ensayo en jal. Tratamiento con inóculo de células de color verde, tratamiento con inóculo de microcápsulas de almidón fosfatado de color rojo y tratamiento con inóculo de microcápsulas de almidón succinatado de color azul.

Estos resultados indican que, *Bacillus subtilis* MZ microcápsulada presentó un crecimiento mayor que la misma bacteria sin microencápsular, en un sustrato con materia orgánica, poroso y con alto índice de retención de agua, como lo es la mezcla general. A diferencia de esto, en el jal; que es un sustrato con alto contenido de metales pesados, con poca materia orgánica, con un tamaño de partícula muy pequeño que impide la formación de poros y un menor índice de

retención de agua, *B. subtilis* MZ microencapsulado y sin encapsular alcanzan un crecimiento similar entre ellas, sin embargo el crecimiento de la bacteria microencapsulada en almidón fosfatado se mantiene en crecimiento durante todo el periodo, en comparación de las microcápsulas de almidón succinatado y la bacteria sola que presentaron decesos muy marcados en el mismo lapso de tiempo.

6.1.5 Estructura microscópica de las cápsulas

Esta capacidad de sobrevivir de la bacteria se confirmó a través de un análisis al microscopio, para discernir las células vivas de las células muertas y a su vez, de las esporas en los microencapsulados, se realizaron tinciones de las microcápsulas de almidón fosfatado con una combinación de yoduro de propidio y naranja de acridina.

En la Figura 6.1.5a, se puede apreciar en la primera columna las células vivas de los cuatro tratamientos analizados y en la segunda columna las células muertas. En la tercera columna de fotografías se observa el resultado de un empalme realizado con las fotografías tomadas a las diferentes longitudes usando el programa Image Pro Premier 9.1.

En las fotografías tomadas de las muestras de las microcápsulas de almidón fosfatado con inóculo se observan claramente las microcápsulas en las que se encuentran adheridas las bacterias. Se estableció como control positivo un cultivo con alta presencia de esporas de *B. subtilis* MZ, en el cual se observó un gran número de células vivas y muertas, se nombra como CONTROL ESPORAS en la Figura 6.1.5a.

Se observó de color verde a las células vivas, debido a que, el colorante naranja de acridina se une al RNA de la bacteria mediante interacciones electrostáticas. Así también, se observó de color rojo a las células muertas, debido a que el yoduro de propidio pasa a través de membranas dañadas y se intercala con cadenas de DNA, además, este colorante es excluido de membranas intactas, lo que lo hace un colorante efectivo para identificar células no viables [Kenneth *et al.* 1985].

Para discernir entre las células muertas y las esporas, se realizó una tinción Gram y tinción con verde de malaquita- safranina de la misma muestra. En la Figura 6.1.5b se puede observar las esporas de color verde, debido a que el verde de malaquita penetra la membrana de la espora, el uso de safranina es para obtener un contraste con las células en estado vegetativo.

Estos resultados indican que, parte de las células que se tiñen con el yoduro de propidio como células muertas pueden ser esporas de *B. subtilis* MZ.

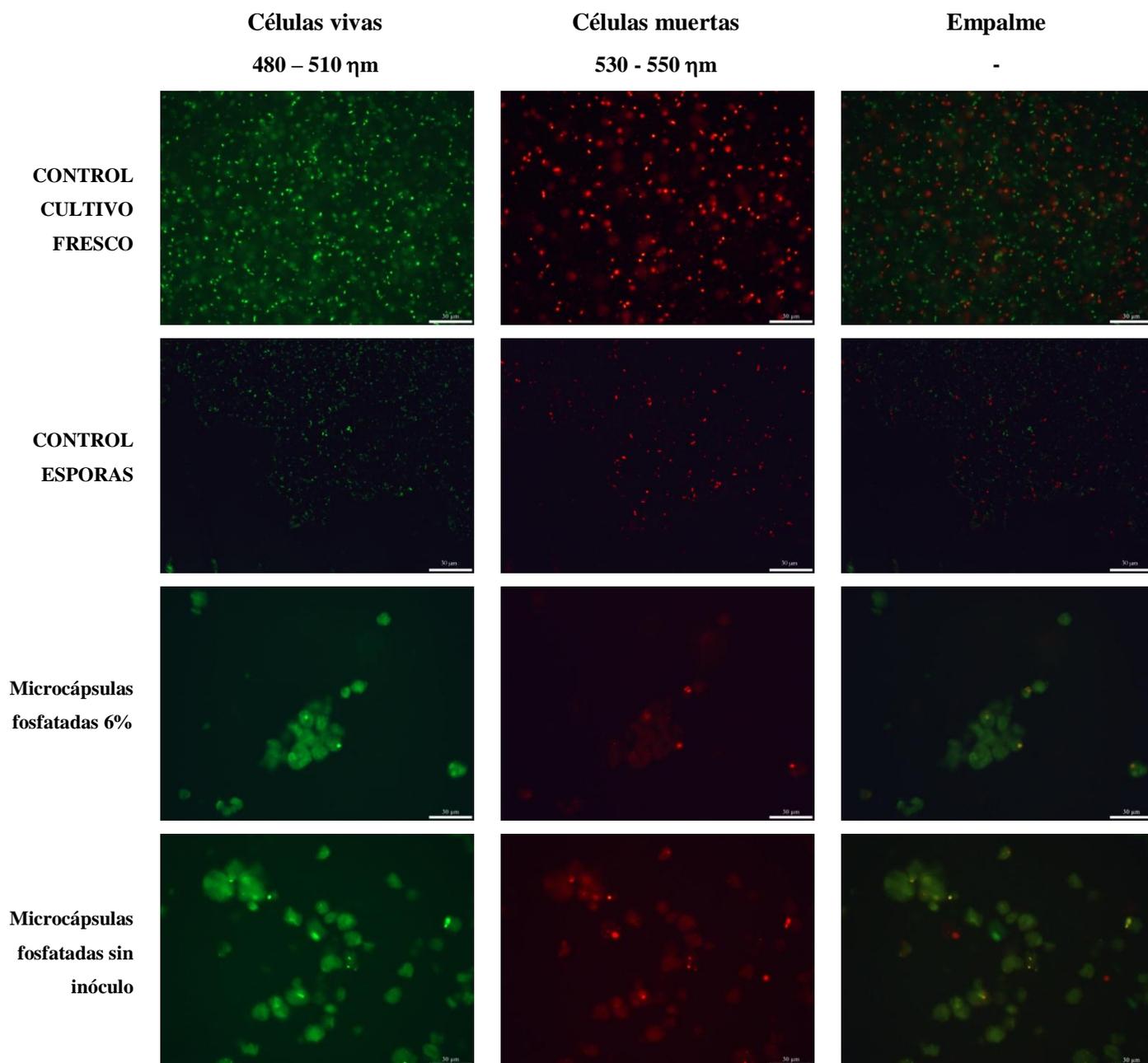


Figura 6.1.5a. Estructura microscópica de las microcápsulas. Fotografías de los resultados obtenidos mediante la tinción de naranja de acridina simultánea con yoduro de propidio.

Las microcápsulas de almidón succinatado comercial no pudieron observarse usando esta técnica. Los almidones modificados tienen diferente punto de solubilidad, y las cápsulas compuestas de este material de pared se disolvían al momento de aplicar la solución de tinción.

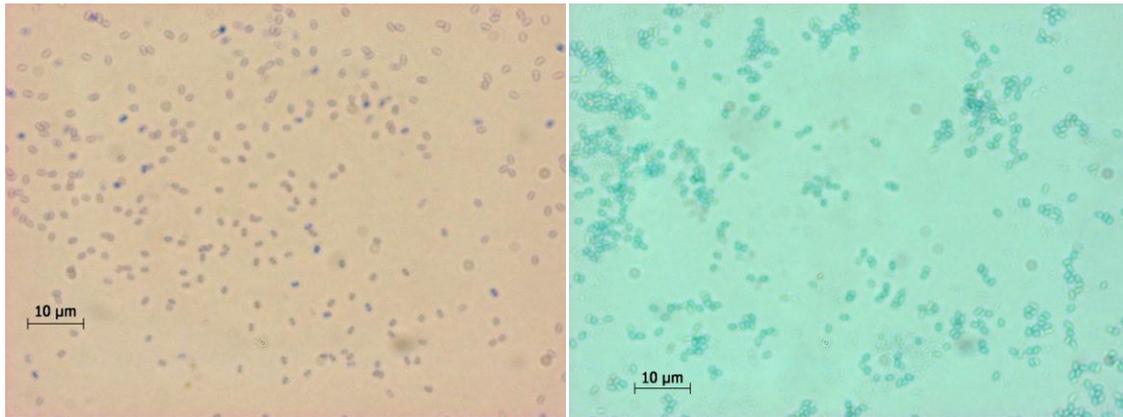


Figura 6.1.5b. Fotografía *Bacillus subtilis* MZ.

6.2 Crecimiento vegetal en diferentes concentraciones de jal de mina

6.2.1 Ensayo de germinación *in vitro*

Se evaluó el porcentaje de germinación de las semillas de *Bouteloua curtipendula*, cosecha 2013. Las cuales presentaron un alto porcentaje de germinación, en el transcurso de 6 días de incubación (di) el porcentaje de semillas germinadas alcanzado fue de 98%. Este resultado indica, una alta viabilidad de la semilla.

Tabla 6.2.1. Sobrevivencia de semillas de *Bouteloua curtipendula*.

Días de incubación	Porcentaje de germinación
3 di	90 %
6 di	98 %

6.2.2 Caracterización del jal

El jal mostró un valor de pH de 8.5 ± 0.4 . A continuación en la Tabla 6.2.2 se reporta la concentración de diferentes metales pesados en el jal, resultados obtenidos mediante espectrofotometría de absorción atómica.

Tabla 6.2.2. Concentración en mg/kg (ppm) de Cd, Cr, Cu, Pb y Zn del jal de mina. Media±SD.

Metales	Concentración (ppm)
Cadmio	3.6 ± 1.5
Cromo	195.1 ± 139.1
Cobre	22.3 ± 31.8
Plomo	ND
Zinc	930 ± 60.8

La concentración de los metales cadmio, cromo, cobre y plomo en el jal, se encuentran dentro de los niveles permisibles establecidos en la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004; sin embargo, la concentración de zinc presente en el jal, excedió los niveles recomendados en un 132.5 %.

6.2.3 Ensayo en invernadero

Con la finalidad de observar el efecto de la concentración de jal de mina sobre el pasto Banderita (*Bouteloua curtipendula*), se evaluó su crecimiento bajo diferentes concentraciones de jal-mezcla general de invernadero, se emplearon siete mezclas diferentes que van desde un 0% de jal hasta un 100% de jal.

El crecimiento de la parte foliar a simple vista evidenció de manera muy clara la diferencia entre las diferentes concentraciones de jal-mezcla general. En la Figura 6.2.3 se observaron los siete tratamientos, donde la concentración de jal fue la siguiente: (A) 0%, (B) 20%, (C) 40%, (D) 50%, (E) 60%, (F) 80% y (G) 100%. Se puede observar en la Figura 6.2.3a y 6.2.3b, los tratamientos con jal tienen un efecto negativo sobre el desarrollo del pasto, el cual es estadísticamente significativo.



Figura 6.2.3. *Bouteloua curtipendula* en un sustrato con diferentes concentraciones de jal.

Se evaluó el peso seco de raíz y el peso seco de parte foliar de la planta, como se indicó en la sección de materiales y métodos. Los tratamientos presentaron diferencias significativas entre ellos en un análisis estadístico de varianzas con una $P < 0.05$ (Rstudio). Para ambas variables se observó que las plantas que se encontraban en mezcla general solamente (tratamiento A) reportaron los valores más altos, siendo las plantas que se encontraban en 100% jale (tratamiento G) las que presentaron los valores menores.

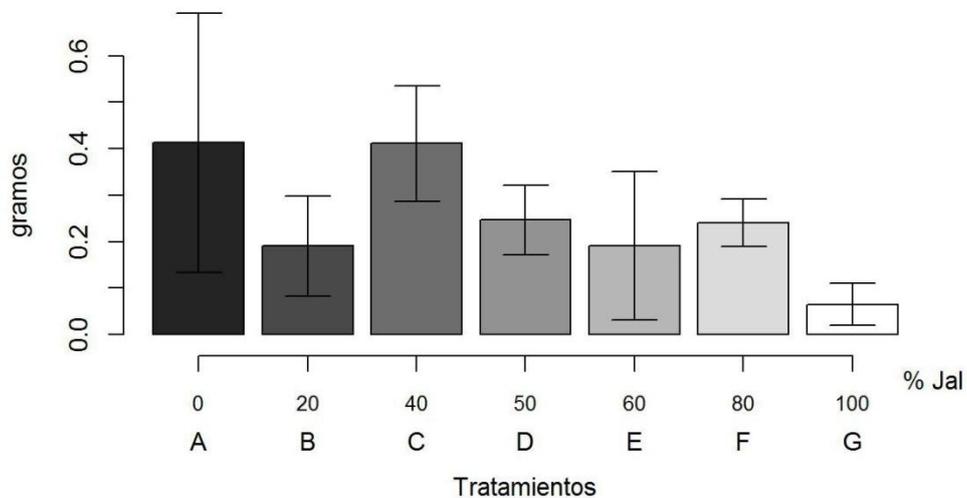


Figura 6.2.3a. Peso seco de raíz de *Bouteloua curtipendula* en un sustrato con diferentes concentraciones de jal. Eje izquierdo denota el peso seco de la raíz en gramos, y el eje derecho la concentración de jale del sustrato.

En la Figura 6.2.3a se reporta la variable de peso seco de raíz de *Bouteloua curtipendula*. En esta se observó como el peso seco de la raíz del tratamiento sin jal (tratamiento A) es mayor por más de 6 veces al peso seco de la raíz de las plantas correspondientes al tratamiento en 100% de jal (tratamiento G). Se observó también el crecimiento de la raíz de la planta no se vio

comprometido gravemente hasta alcanzar una concentración de jal del 100%, las raíces de *B. curtipendula* mostraron una grave disminución en el tratamiento constituido por 100 % jal (tratamiento G).

Los componentes del desarrollo de la planta como lo son follaje y raíz, se ven afectados conforme incrementa la concentración del jal en la mezcla. Las plantas del tratamiento constituido por 80 % jal (tratamiento F) fueron capaces de alcanzar la etapa de floración, etapa que no alcanzaron las plantas del tratamiento en 100 % jal (tratamiento G).

En la figura 6.2.3b se observa la variable de peso seco de la parte foliar de la planta. Se observó que esta variable disminuye al aumentar la concentración de jal. Los valores de peso seco de la parte foliar que presentan las plantas del tratamiento en 0% jal (tratamiento A) son por cerca de 15 veces mayores a los valores obtenidos por los individuos del tratamiento en 100% jal (tratamiento G).

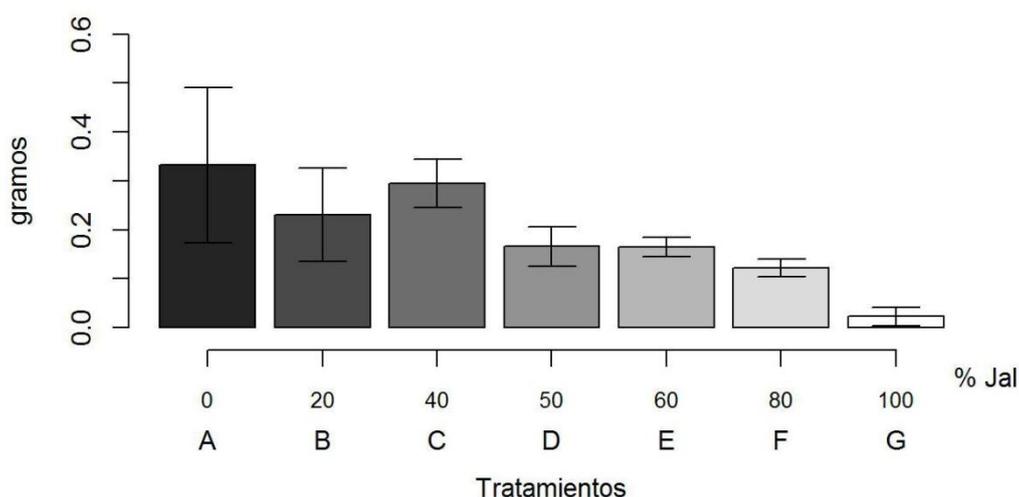


Figura 6.2.3b. Peso seco de la parte foliar de *Bouteloua curtipendula* en un sustrato con diferentes concentraciones de jal. Eje izquierdo denota el peso seco de la raíz en gramos, y el eje derecho la concentración de jale del sustrato.

El tratamiento que uso como sustrato 50 % jal y 50 % mezcla general (tratamiento D), y el tratamiento con una composición de sustrato de 60 % jal y 40 % mezcla general (tratamiento E), no presentaron diferencias estadísticamente significativas para la variable de peso seco de la parte foliar. Con este resultado, se definió el porcentaje de jal a emplear en el ensayo final de invernadero, en el que se evaluó el efecto de microorganismos encapsulados y HMA sobre *B. curtipendula* en jal de mina.

6.3 Efecto de microorganismos encapsulados y HMA sobre plantas en jal de mina

La última etapa del presente estudio, consistió en determinar el comportamiento del pasto *Bouteloua curtipendula* co-inoculado con la bacteria microencapsulada y el consorcio Selva de HMA, en un sustrato con altas concentraciones de metales pesados. Las variables analizadas en este ensayo fueron el porcentaje de germinación, la altura de planta, peso fresco y peso seco foliar, peso fresco, peso seco y volumen de raíz, el porcentaje de colonización de la raíz por HMA, así como, el factor de traslocación de Cd, Cr, Cu y Zn en *B. curtipendula*. Se realizó un análisis de varianza por separado para cada una de las variables evaluadas. Posteriormente, se realizó un análisis multivariado de seis componentes principales con todos los parámetros evaluados a excepción del porcentaje de germinación y del factor de traslocación del metal.

Se puede observar en la Figura 6.3a, el comportamiento descrito por la germinación de *B. curtipendula* durante un periodo de evaluación de 34 días, tiempo en el cual cerca del 30% de las semillas de cada uno de los tratamientos germinaron. Se observó que, la composta es una variable determinante en el porcentaje de germinación de las semillas de *B. curtipendula*. Los tratamientos que incluían composta en su sustrato y con una concentración de jal del 60 %, fueron los que alcanzaron los valores mayores en el porcentaje de germinación. Los tratamientos con un sustrato de 60 % jal y con composta, al sexto día después de siembra alcanzan valores del 32% hasta 72% de germinación, los valores alcanzados al último día de la evaluación son del 44% al 84%.

B. subtilis MZ en conjunto con el consorcio Selva de HMA, en un sustrato con composta, 40% arena y 60% jal, fueron capaces de propiciar el mejor ambiente para que las semillas de *B. curtipendula* germinaran exitosamente, este tratamiento alcanzó el mayor porcentaje de germinación observado, con un valor de 84%.

Los tratamientos con un sustrato de 60 % jal que no contaban con composta, fueron los tratamientos que presentaron menor porcentaje de germinación al sexto día después de su siembra, con valores de germinación de 0% a 48%. A pesar de ello, la tendencia que describen es a aumentar rápidamente, alcanzando valores al último día de la evaluación del 28% hasta un 68% de germinación.

La estructura que proporciona al sustrato los elementos composta, arena y jal, fue un factor importante en el desarrollo de las plantas, pues los tratamientos en un sustrato con 100% de jal, independientemente si tenían composta o no, alcanzaron valores de germinación menores. Lo anterior conduce a considerar que las características del sustrato, la concentración de los metales

pesados y la estructura del suelo, además de la disponibilidad de los nutrientes, limitan el crecimiento vegetal.

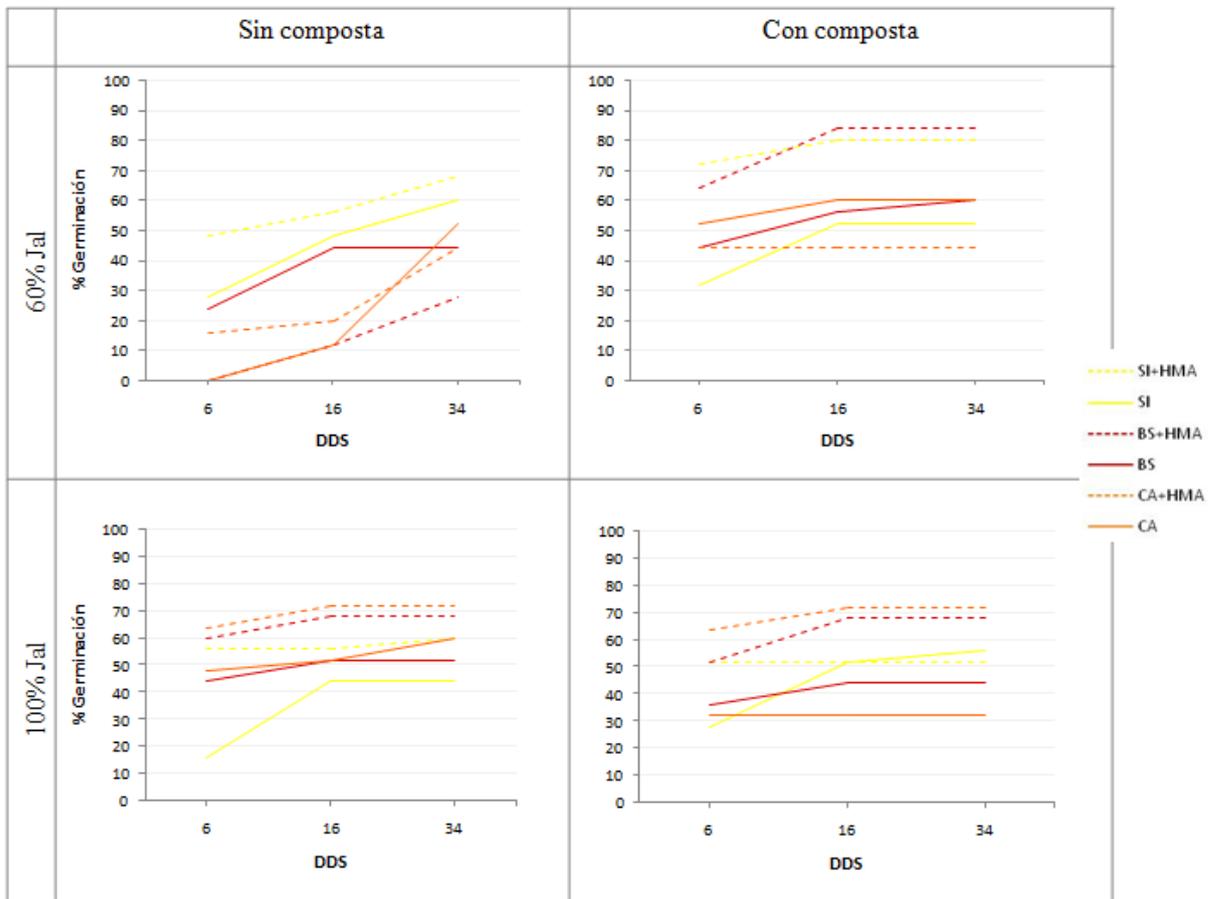


Figura 6.3a. **Comportamiento de la germinación de *Bouteloua curtipendula*.** Porcentaje de germinación contra días después de siembra (DDS). Tratamientos sin inóculo bacteriano de color amarillo, tratamiento con microcápsulas de color naranja e inóculo líquido de color rojo. Las líneas continuas corresponden a los tratamientos sin HMA, las líneas punteadas corresponden a los tratamientos con HMA.

El comportamiento descrito por los tratamientos con un 60% de jal, no se conservó para los tratamientos con 100% de jal como sustrato, al sexto día después de la siembra alcanzan valores mayores de germinación pero en la tendencia no se observa un incremento al último día de la evaluación. Con excepción de los tratamientos sin inóculo (sin inóculo de bacteria y sin inóculo de HMA), con composta y sin composta, que al día seis de la evaluación reportó valores de germinación de 28% y 16% %, respectivamente, alcanzando un porcentaje de germinación al último día de evaluación de 56% y 44%.

Los tratamientos con un sustrato de 100 % jal que no contaban con composta, presentaron valores de germinación al sexto día después de su siembra del 16% al 64%. El aumento observado para último día de la evaluación fue menor que el observado para los tratamientos en 60% de jal, los valores alcanzados fueron del 44% hasta el 68% de germinación. La mayoría de los tratamientos alcanzaron un porcentaje de germinación mayor al último día de la evaluación, que los tratamientos con composta, en la misma concentración de jal. Los tratamientos con un sustrato de 100 % jal, adicionados con composta, son los que presentan menor porcentaje de germinación de los cuatro sustratos empleados. Los porcentajes de germinación alcanzados al último día de la evaluación fueron de 32% a 68%.

Se observó un comportamiento muy interesante en tres tratamientos del ensayo, en el cual los valores del porcentaje de germinación de las semillas de *B. curtispindula* aumentó significativamente del sexto día al último día evaluado; comportamiento que no se observó en ningún otro tratamiento. Los tres tratamientos se encontraban en un sustrato con 60% de jal y sin composta. Los tres tratamientos antes referidos, son de los tratamientos que reportaron los porcentajes mayores en la colonización de raíces por HMA; lo que llevó a considerar que es un factor íntimamente relacionado con el porcentaje de germinación de las semillas de las plantas. Las posibles razones por las cuales un tratamiento sin inoculo de HMA presente colonización de raíz por HMA se abordan más adelante con los demás resultados de la colonización de las raíces de *B. curtispindula* por HMA.

Uno de estos tratamientos fue el co-inoculado con *B. subtilis* MZ y el consorcio Selva de HMA, el sexto día después de siembra reportó un valor de germinación de 0%, valor que aumentó significativamente al último día de la evaluación en 28%; la colonización de HMA en la raíces de las plantas correspondientes a este tratamiento fue de 44.69%. El segundo de estos tratamientos, fue el co-inoculado con microcápsulas de *B. subtilis* MZ y el consorcio Selva de HMA, reportó un valor de 16% de germinación al sexto día después de la siembra de *B. curtispindula*, valor que aumentó significativamente al día 34 después de siembra, alcanzando un valor de germinación de 44%, con una colonización por HMA del 36.44%. El tercero de estos tratamientos, es el que demuestra un incremento más drástico durante el tiempo evaluado, el tratamiento con un inóculo de microcápsulas de *B. subtilis* MZ reportó el sexto día después de siembra un valor de germinación de 0%, valor que aumentó hasta 52% al último día de la evaluación, con una colonización por HMA de 46.67%.

Se observó también al consorcio Selva íntimamente involucrado en los dos tratamientos que presentaron los valores mayores para el porcentaje de germinación de *B. curtispindula*, al día 34 después de siembra.

Lo anterior nos llevó a considerar que, el sinergismo que presentan la bacteria y el HMA favorece la germinación de las semillas de *B. curtispindula*.

Por otra parte, se observó que la sobrevivencia de las plántulas no se vio comprometida en la mayoría de los tratamientos; sin embargo, en tres tratamientos se observó un deceso de entre 5% y 12.5% de las plántulas germinadas.

Como se puede observar en la Figura 6.3b y Figura 6.3c, otra variable que se evaluó fue el peso fresco de la parte aérea y el peso fresco de la raíz de *B. curtispindula*, se observó un comportamiento similar al descrito por la germinación de las semillas, esto es, los tratamientos que incluyeron composta en el sustrato, fueron los que mostraron los valores mayores en ambas partes de la planta.

Estos resultados indican que, la adición de composta aumenta los nutrientes y su disponibilidad en el sustrato, lo que se refleja en un mayor crecimiento de la planta (peso fresco de la parte foliar, peso fresco de la raíz y altura de planta); a diferencia de los tratamientos sin composta, los cuales presentaron un crecimiento menor.

Por otro lado, se observó que el sinergismo entre las microcápsulas de *B. subtilis* MZ y los HMA, y su interacción con la composta, favorecen el crecimiento de la planta. Los tratamientos que presentaron mejores resultados en base a la variable de peso fresco de la parte foliar fueron el tratamiento co-inoculado con microcápsulas y HMA, y el tratamiento con inóculo líquido solamente; en un sustrato con composta y una concentración de jal de 60 %, con un peso de 5.81 gr y 5.66 gr respectivamente. Así mismo, en base a la variable de peso fresco de raíz el tratamiento que presentó los mejores resultados fue el tratamiento co-inoculado con microcápsulas y HMA en un sustrato con composta y una concentración de jal de 100%, alcanzando un peso de 9.69 gr. La colonización por HMA en estos tratamientos fue de 6.17%, 14.07% y 15.31% respectivamente, la colonización por micorrizas observada en los tratamientos sin inóculo de HMA se abordara más adelante.

El tratamiento de microcápsulas con HMA, el tratamiento con inóculo líquido y el tratamiento sin inóculo alguno, en un sustrato de 100 % jal y sin composta, fueron los tratamientos que presentaron los valores menores para las variables de peso fresco de ambas partes de la planta, con un peso fresco medio de la parte foliar de 0.28 gr. y 0.25 gr. respectivamente; y con un peso fresco medio de raíz de 0.65 gr. y 0.31 gr. respectivamente.

Así mismo, se puede observar en la Figura 6.3d la altura de *B. curtispindula* corresponde directamente con el peso fresco de la parte foliar de la planta. Es decir, los tratamientos con

mayor peso, fueron los que alcanzaron una altura mayor, los dos mejores tratamientos siendo estadísticamente iguales, fueron, el tratamiento con inóculo líquido sin micorrizas en un sustrato con composta y 60% de jal que alcanzó una altura media de la planta de 63.54 cm, y, el tratamiento de microcápsulas con micorrizas en el mismo sustrato que alcanzó una altura media de 62.42 centímetros. Continúa así la correspondencia tratamiento tras tratamiento; hasta el el tratamiento con inóculo líquido y sin micorrizas en un sustrato con 100% de jal y sin composta con una altura media de 25.85 cm., y el tratamiento de microcápsulas con micorrizas en un sustrato de 100 % jal y sin composta, con una altura media de planta de 25.45 cm, que son los tratamientos que representan los valores más bajos para esta variable.

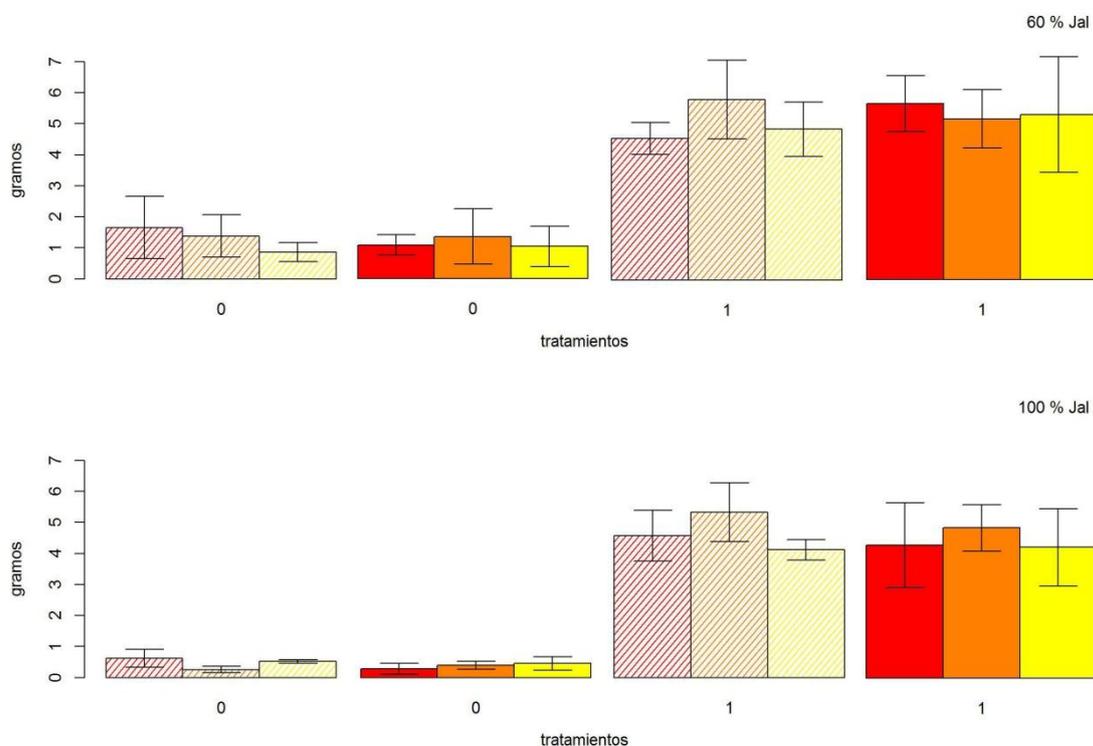


Figura 6.3b. **Peso fresco foliar de *B. curtipendula*.** Tratamientos con inóculo líquido de color rojo, tratamientos con microcápsulas de color naranja y tratamientos sin inóculo bacteriano de color amarillo. Las dos primeras columnas de cada gráfica son los tratamientos sin composta (0) las dos últimas columnas corresponden a los tratamientos con composta (1). Las barras sólidas corresponden a los tratamientos sin HMA, las barras achuradas corresponden a los tratamientos con HMA.

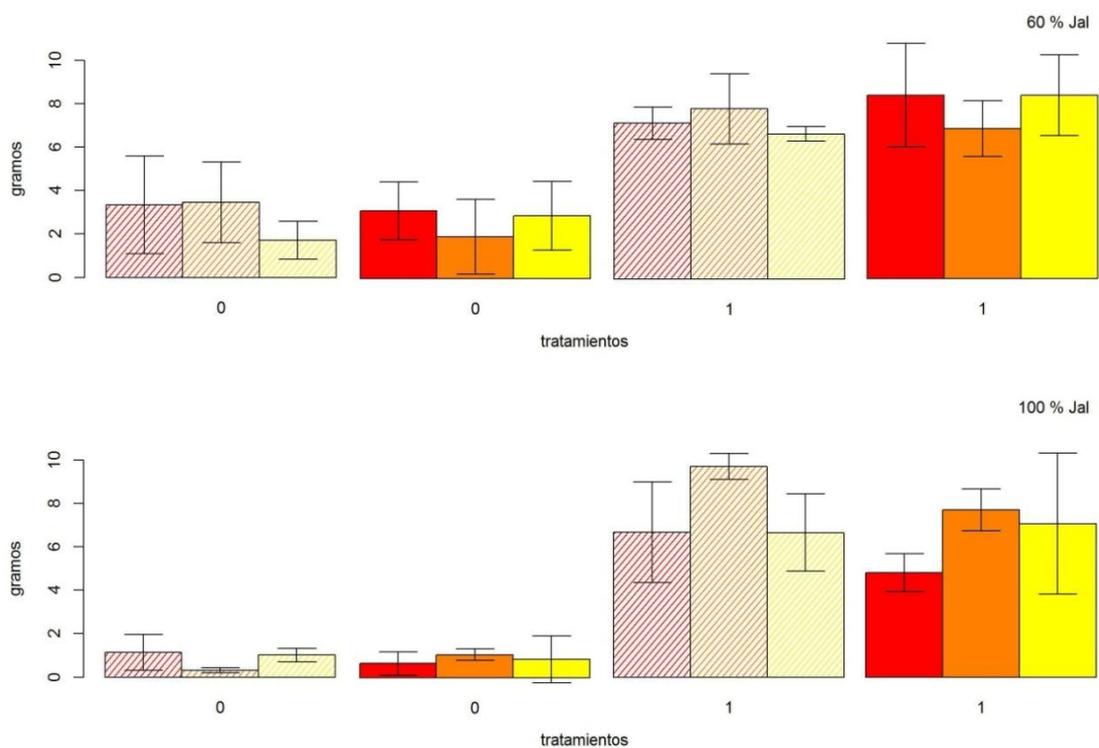


Figura 6.3c. **Peso fresco raíz de *B. curtispindula*.** Tratamientos con inóculo líquido de color rojo, tratamientos con microcápsulas de color naranja y tratamientos sin inóculo bacteriano de color amarillo. Las dos primeras columnas de cada gráfica son los tratamientos sin composta (0) las dos últimas columnas corresponden a los tratamientos con composta (1). Las barras sólidas corresponden a los tratamientos sin HMA, las barras achuradas corresponden a los tratamientos con HMA.

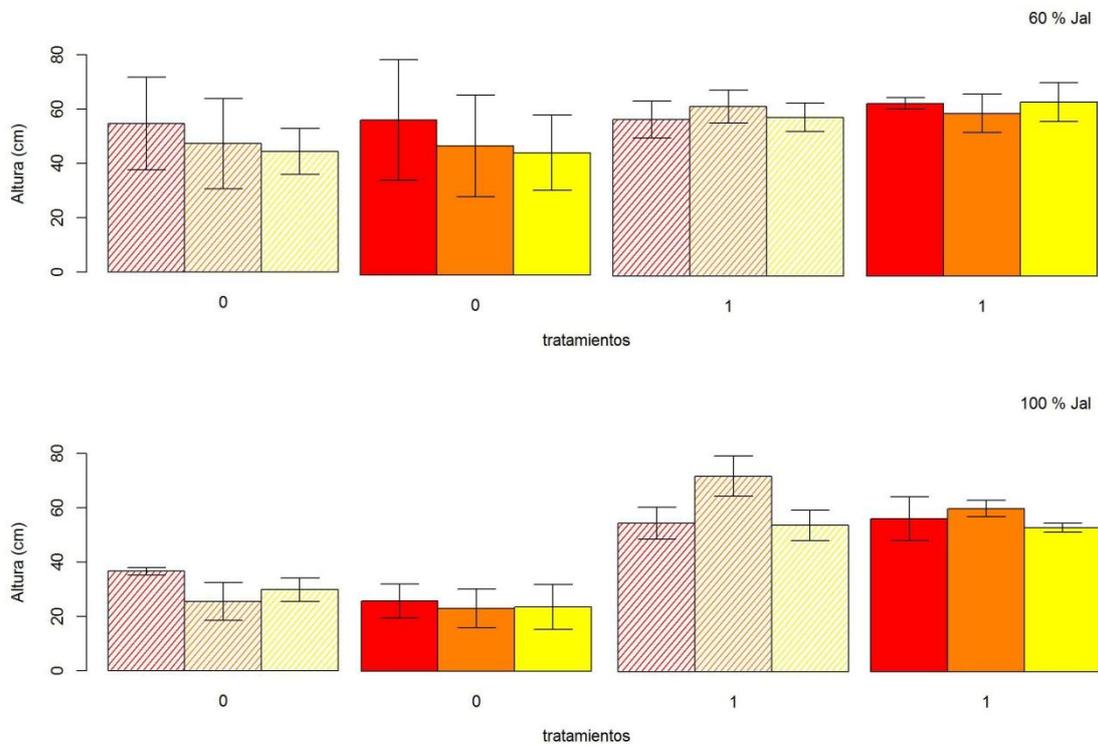


Figura 6.3d. **Altura de *B. curtispindula***. Tratamientos con inóculo líquido de color rojo, tratamientos con microcápsulas de color naranja y tratamientos sin inóculo bacteriano de color amarillo. Las dos primeras columnas de cada gráfica son los tratamientos sin composta (0) las dos últimas columnas corresponden a los tratamientos con composta (1). Las barras sólidas corresponden a los tratamientos sin HMA, las barras achuradas corresponden a los tratamientos con HMA.

6.3.1 Colonización de HMA

Se evaluó la colonización de la raíz por HMA como se describió en la sección de materiales y métodos. De los veinticuatro tratamientos que conformaban al bioensayo descrito en 5.3, únicamente la mitad incluía el inóculo de esporas del consorcio Selva de HMA, sin embargo, en todos los tratamientos se observó la presencia de arbuscúlos, hifas y vesículas. Los sustratos empleados se utilizaron en sus condiciones naturales, el único sustrato que se esterilizó fue la composta. Estos resultados son muy interesantes, pues al existir colonización por HMA en los tratamientos no inoculados y en los tratamientos con arena, así como también, en los tratamientos sin arena, nos indican la presencia de HMA en el jal.

Una de las desventajas del método empleado es que no se puede afirmar que todas las estructuras observadas corresponden solamente al hongo de nuestro interés. Considerando esto, se tomó como punto de comparación el porcentaje de arbuscúlos.

Como se puede observar en la Figura 6.3.1a y Figura 6.3.1b, la variable composta que se encontró íntimamente relacionada con la germinación y el crecimiento de *B. curtispindula*, en el caso de la colonización de HMA, invierte su papel, es decir, los tratamientos que presentaron los mayores valores de colonización fueron los tratamientos sin composta. Los dos tratamientos que presentaron el mayor valor en la colonización por HMA, fueron el tratamiento que contenía el inóculo de microcápsulas de *B. subtilis* MZ, con un porcentaje de arbuscúlos de 46.67 %, 52.10 % de vesículas y 79.51 % de hifas; y el tratamiento co-inoculado con *Bacillus subtilis* MZ líquido y el consorcio Selva de HMA con un porcentaje de arbuscúlos de 44.69 %, 49.38 % de vesículas y 79.75 % de hifas. Ambos tratamientos sin composta y en un sustrato con 60% de jal.

Sin embargo, el tratamiento que presentó el porcentaje de arbuscúlos menor, siendo estadísticamente diferente a los demás tratamientos, fue el tratamiento que no se inoculó con *Bacillus subtilis* y así tampoco con HMA, en un sustrato con un porcentaje de 100 % de jale y con composta. Este alcanzó un porcentaje de colonización de 4.69 % de arbuscúlos, 0.49% de vesículas y de 11.85 % de hifas. Los tratamientos con composta reportaron bajos valores en la colonización de HMA, de un 4.69% a un 15.31% solamente. Lo anterior puede ser debido a que, los HMA tienen una mejor respuesta cuando los nutrientes en el suelo son limitados, así también, a que con el alto contenido de nutrientes en la composta, la señalización entre la raíz y el hongo se ve afectada, y por lo tanto también el establecimiento de la simbiosis. Sin embargo, a pesar de alcanzar bajos valores de colonización de HMA, las estructuras que se desarrollan cuando se establece la simbiosis se encontraron en todas las plantas del ensayo, lo que llevó a considerar que el HMA puede fungir como un apoyo para mitigar los efectos causados en la planta por los metales pesados del sustrato.

Así también, se observó, como en las variables de germinación y crecimiento de la planta, que el sinergismo entre las microcápsulas de *B. subtilis* MZ y los HMA destacó presentando los mejores resultados.

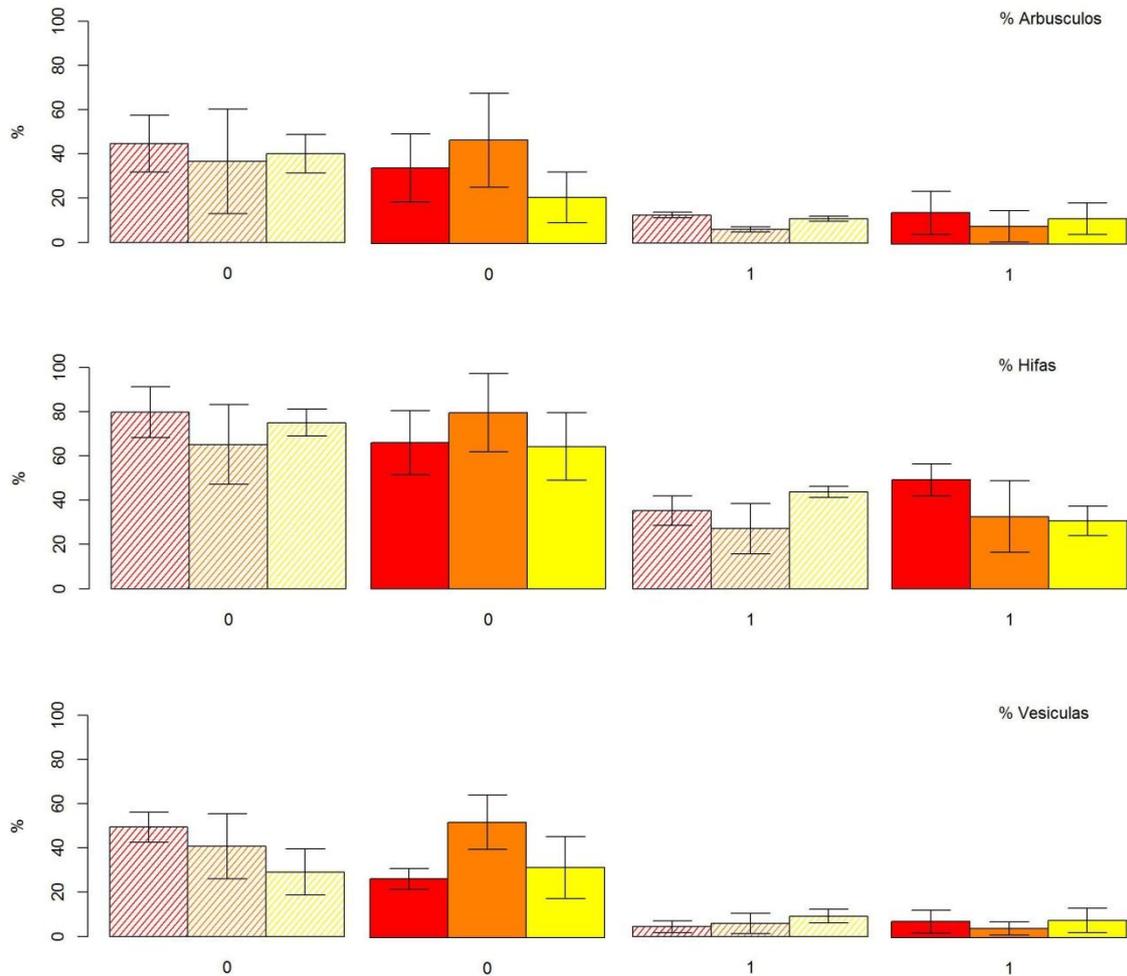


Figura 6.3.1a. **Colonización por HMA en raíces de *B. curtipendula*.** Porcentaje de arbusculos, porcentaje de hifas y porcentaje de vesículas de los tratamientos en un sustrato con una concentración de **60 % de jal**. Tratamientos con inóculo líquido de color rojo, tratamientos con microcápsulas de color naranja y tratamientos sin inóculo bacteriano de color amarillo. Las dos primeras columnas de cada gráfica son los tratamientos sin composta (0) las dos últimas columnas corresponden a los tratamientos con composta (1). Las barras sólidas corresponden a los tratamientos sin HMA, las barras achuradas corresponden a los tratamientos con HMA.

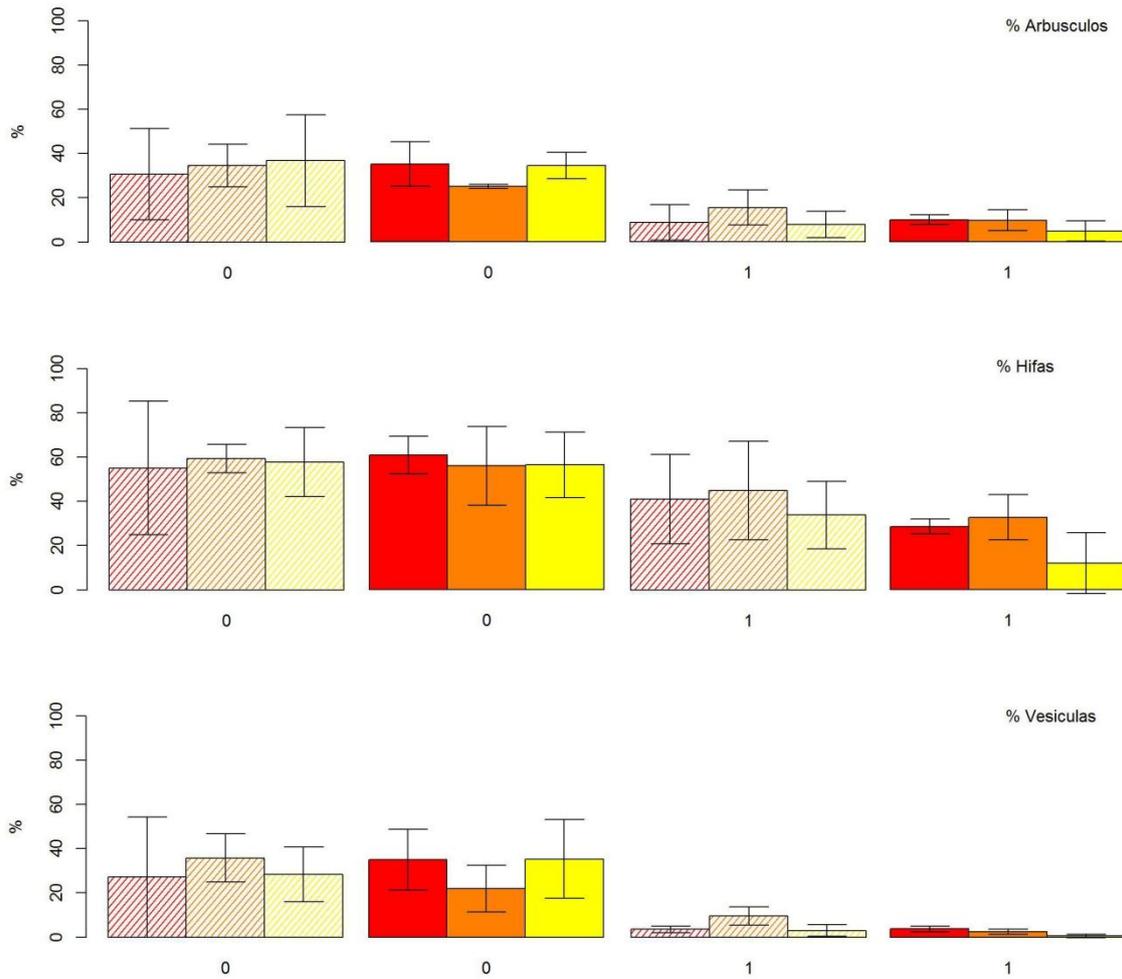


Figura 6.3.1b. **Colonización por HMA en raíces de *B. curtipendula*.** Porcentaje de arbusculos, porcentaje de hifas y porcentaje de vesículas de los tratamientos en un sustrato con una concentración de **100 % de jal**. Tratamientos con inóculo líquido de color rojo, tratamientos con microcápsulas de color naranja y tratamientos sin inóculo bacteriano de color amarillo. Las dos primeras columnas de cada gráfica son los tratamientos sin composta (0) las dos últimas columnas corresponden a los tratamientos con composta (1). Las barras sólidas corresponden a los tratamientos sin HMA, las barras achuradas corresponden a los tratamientos con HMA.

6.3.2 Análisis de metales en el tejido vegetal

Se calculó el factor de traslocación como la relación de la concentración en la parte foliar de la planta entre la concentración en la raíz. En la Tabla 6.3.2 se reportan los valores obtenidos para los metales cromo (Cr), cobre (Cu), y zinc (Zn). El factor de traslocación del plomo no se reporta, debido a que las concentraciones se encontraron fuera del rango detectable por el equipo para todas las muestras.

Debido a que las concentraciones en el jal para los metales cromo, cadmio y cobre se encontraron dentro de los límites máximos permisibles, el enfoque fue en el análisis del movimiento del zinc a través del tejido vegetal solamente, que es el metal que excede por más de 100% las concentraciones permitidas. Como se puede observar en el gráfico de la Figura 6.3.2, para el tratamiento con inóculo líquido de *B. subtilis* MZ sin inóculo del consorcio Selva, con un porcentaje de colonización por HMA de 14.97%, y en un sustrato con composta y 60% de jal, la concentración de zinc en la parte foliar de la planta se reportó como 0, fue el único tratamiento que presentó esta concentración, el valor de FT se tomó igual a 0, lo que indica que el zinc permaneció únicamente en la raíz de la planta.

Se observaron tres tratamientos con un factor de traslocación igual a 1, esto indica que la concentración foliar y la concentración de la raíz son iguales; estos fueron el tratamiento co-inoculado con microcápsulas y con el consorcio Selva en un sustrato con 60% de jal, el tratamiento con inóculo líquido de *B. subtilis* MZ en un sustrato con 100% de jal y el tratamiento co-inoculado con microcápsulas y el consorcio Selva en un sustrato con 100% de jal. Los tres tratamientos contaban con composta en su sustrato y una baja colonización de HMA, de 6.17% a 15.31%.

Por otro lado, entre los tratamientos en los cuales se observó que el zinc se movilizó en una tasa mayor hacia la parte foliar de *B. curtipendula*, se encontraron los tratamientos con un alto porcentaje de colonización por HMA. De los diez tratamientos que alcanzaron valores del factor de traslocación mayores a 1, seis de ellos son tratamientos inóculados con el consorcio Selva. Los altos porcentajes de colonización observados en este conjunto de datos, corresponden a estos seis tratamientos.

Así mismo, el tratamiento que presentó la mayor movilización de zinc a través de la planta, fue el tratamiento en 100% jal sin composta, con inóculo líquido de *B. subtilis* MZ; alcanzó un factor de traslocación promedio de 29.7, lo que indica una concentración sumamente mayor en la parte foliar de la planta a la concentración de zinc en la raíz de la planta. Los tratamientos siguientes fueron el tratamiento sin inóculo de *B. subtilis* MZ y con inóculo del consorcio Selva, y el tratamiento co-inoculado con microcápsulas y con el consorcio Selva, en el mismo sustrato, 100% jal sin composta, con valores del factor de traslocación de 9.65 y 7.01 respectivamente. Con fines ilustrativos, estos valores, se establecieron iguales a 2 en las gráficas que se observan en la Figura 6.3.2.

Por otro lado, en los tratamientos con un factor de traslocación menor a 1 se encontraron los tratamientos que no fueron inoculados con el consorcio Selva, pero a pesar de esto, presentaron altos valores de colonización por HMA. Lo anterior nos llevó a considerar que, cuando la raíz

de la planta presenta altos valores de colonización por las especies de HMA presentes en el consorcio Selva, se ve favorecida la traslocación del zinc hacia la parte aérea de la planta; sin embargo, cuando se presentan altos valores de colonización de la planta por especies de HMA presentes en el jal, se favorece la concentración del zinc en la raíz de la planta.

Los resultados obtenidos indican también que, la relación que establece *B. subtilis* MZ microencapsulado con el consorcio Selva favorece la movilización del zinc a través de la planta. Así mismo, *B. subtilis* MZ aumenta la movilidad del zinc hacia la parte foliar de *B. curtipendula*.

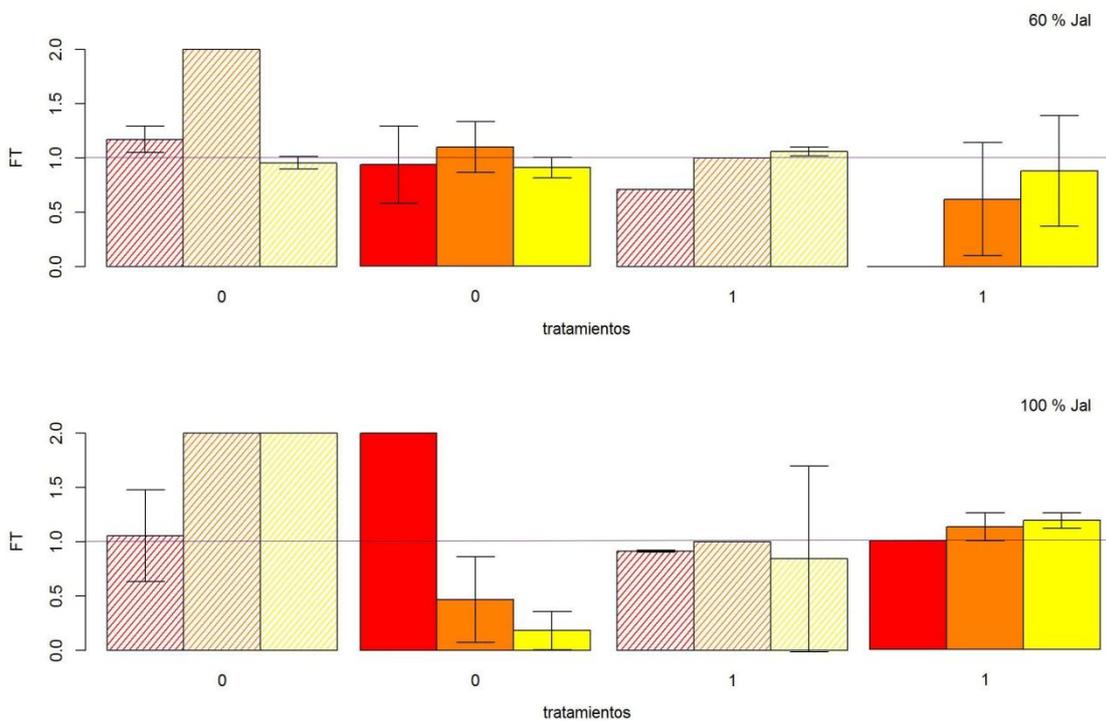


Figura 6.3.2. **Factor de traslocación de Zinc en *B. curtipendula*.** Tratamientos sin inóculo bacteriano de color amarillo, tratamiento con microcápsulas de color naranja e inóculo líquido de color rojo. Las dos primeras columnas de cada gráfica son los tratamientos sin composta (0) las dos últimas columnas corresponden a los tratamientos con composta (1). Las barras sólidas corresponden a los tratamientos sin HMA, las barras achuradas corresponden a los tratamientos con HMA.

Tabla 6.3.2. Factor de traslocación de metales en la planta. Medias±SD. **Micorriza:** (0) tratamientos sin micorrizas, (1) tratamientos con micorrizas. **Composta:** (0) tratamientos sin composta, (1) tratamientos con composta. **Inóculo:** (SI) tratamientos sin inóculo, (BS) tratamientos con inóculo líquido, (CA) tratamientos con microcápsulas.

Tratamientos				Factor de traslocación			
	Micorriza	Composta	Inoculo	Cr	Cd	Cu	Zn
100 % Jal	0	0	SI	1.12±0.17	0.69±0.43	0.84±0.45	0.18±0.17
	0	0	BS	1.0±0	0.77±0.15	1.92±2.34	29.71±39.56
	0	0	CA	1.08±0.58	1.0±0.46	1.32±0.83	0.46±0.55
	0	1	SI	2.91±2.94	4.5±5.64	1.09±0.13	1.18±0.09
	0	1	BS	0.96±0.75	1.11±1.07	0.66±0.47	1.0±0
	0	1	CA	1.02±0.24	4.07±3.66	0.95±0.10	1.12±0.18
	1	0	SI	0.77±0.66	1.78±1.78	0.92±0.27	9.65±11.99
	1	0	BS	1.80±1.13	2.47±0.73	0.90±0.42	1.05±0.59
	1	0	CA	1.40±0.56	1.14±0.62	1.33±0.44	7.01±7.0
	1	1	SI	1.0±1.41	2.66±3.77	0.79±1.12	2.75±0.64
	1	1	BS	1.62±1.94	1.02±0.64	3.61±3.69	0.90±0.01
	1	1	CA	0.88±0.63	2.73±2.45	6.72±8.2	1.0±0
60 % jal	0	0	SI	1.5±1.41	1.0±0.45	1.80±0.16	0.90±0.93
	0	0	BS	0.66±0.47	1.11±0.51	0.73±0.18	0.93±0.35
	0	0	CA	1.08±0.58	0.75±0.24	1.14±0.66	1.09±0.23
	0	1	SI	1.25±0.53	0.48±0.06	0.94±0.08	0.87±0.50
	0	1	BS	0±0 Concentración foliar ND			
	0	1	CA	1±0	2.09±1.93	0.94±9.6	0.61±0.52
	1	0	SI	0.83±0.23	0.55±0.16	1.51±1.18	0.95±0.05
	1	0	BS	0.70±0.42	1.40±0.78	0.69±0.56	1.16±0.12
	1	0	CA	1.75±0.35	1.04±0.98	0.65±0.02	2.11±1.75
	1	1	SI	1.0±0	0.6±0	2.76±3.15	1.05±0.04
	1	1	BS	1.33±0.94	2.3±0	1.0±0	0.71±0
	1	1	CA	1.0±0	1.0±0	1.0±0	1.0±0

6.3.3 Análisis multivariado de componentes

Se realizó un análisis multivariado de seis componentes principales para el bioensayo en jal de *Bouteloua curtipendula* y co-inoculado con microcápsulas de *B. subtilis* MZ y HMA; como se puede observar en la Figura 6.3.3a los dos primeros componentes describen cerca del 93.8 % de los datos analizados.

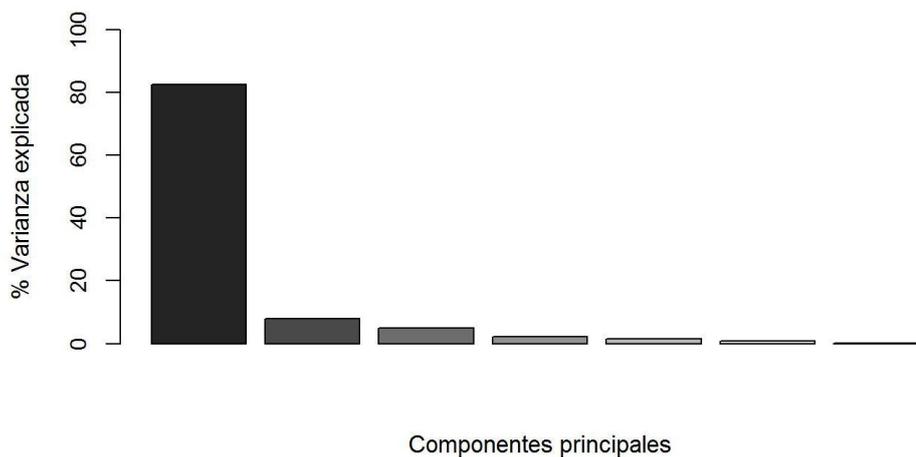


Figura 6.3.3a. Porcentaje de varianza explicada por cada uno de los componentes principales del análisis multivariado.

Las variables incluidas en el análisis fueron altura, peso fresco y peso seco de la parte aérea de la planta; peso fresco, peso seco y volumen de raíz, y colonización de la raíz por HMA. La correlación observada entre las variables de porcentaje de colonización (% de arbusculos, en gráfico X.A) es de 0.5 con el primer componente y 0.5 con el segundo componente. Las demás variables presentan una alta correlación negativa con el primer componente (Figura 6.3.3b.).

En la Figura 6.3.3c se representa gráficamente la agrupación de las muestras con respecto al puntaje obtenido de los dos primeros componentes, tomando como referencia el porcentaje de jal en el sustrato. Se observa que la agrupación de las muestras si distingue levemente entre las concentraciones de los tratamientos, esto es debido a que, la estructura del sustrato es un elemento involucrado en el desarrollo vegetal, no solamente lo son la disponibilidad de nutrientes o el contenido de metales pesados.

En la Figura 6.3.3d se observa el comportamiento de las muestras con respecto a los puntajes de cada uno de los dos primeros componentes principales, agrupados por el factor composta; permite separar dos grupos de variables, las muestras correspondientes a las variables con composta hacia los valores negativos del primer componente principal, las muestras sin composta hacia el lado positivo del primer componente principal.

De la Figura 6.3.3e, se puede observar que la relación que existe entre la colonización por HMA de los tratamientos inoculados con el consorcio Selva de HMA y de los tratamientos no inoculados, con los dos componentes principales, es muy similar, esto se debe a la presencia de colonización de los HMA en todos los tratamientos. En la Figura se observa la agrupación de las muestras con respecto al puntaje obtenido de los dos primeros componentes tomando como referencia el inóculo de HMA.

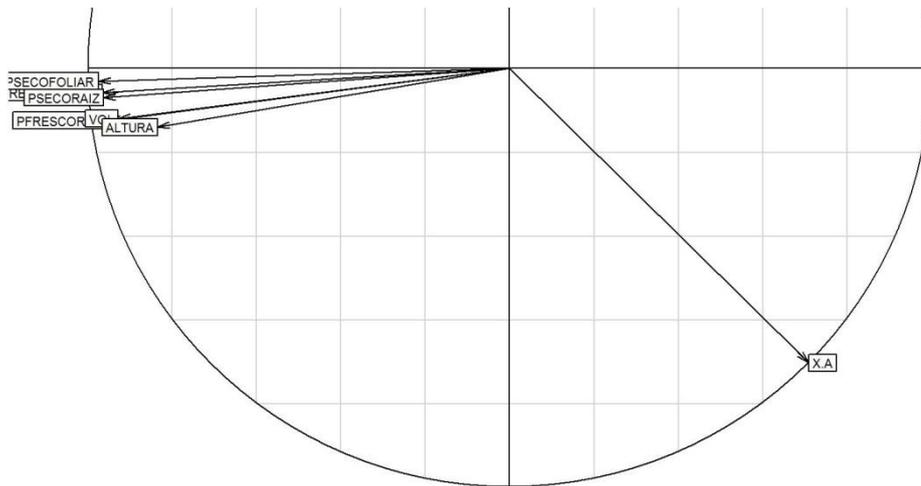


Figura 6.3.3b. Correlación entre las variables analizadas y los dos primeros componentes.

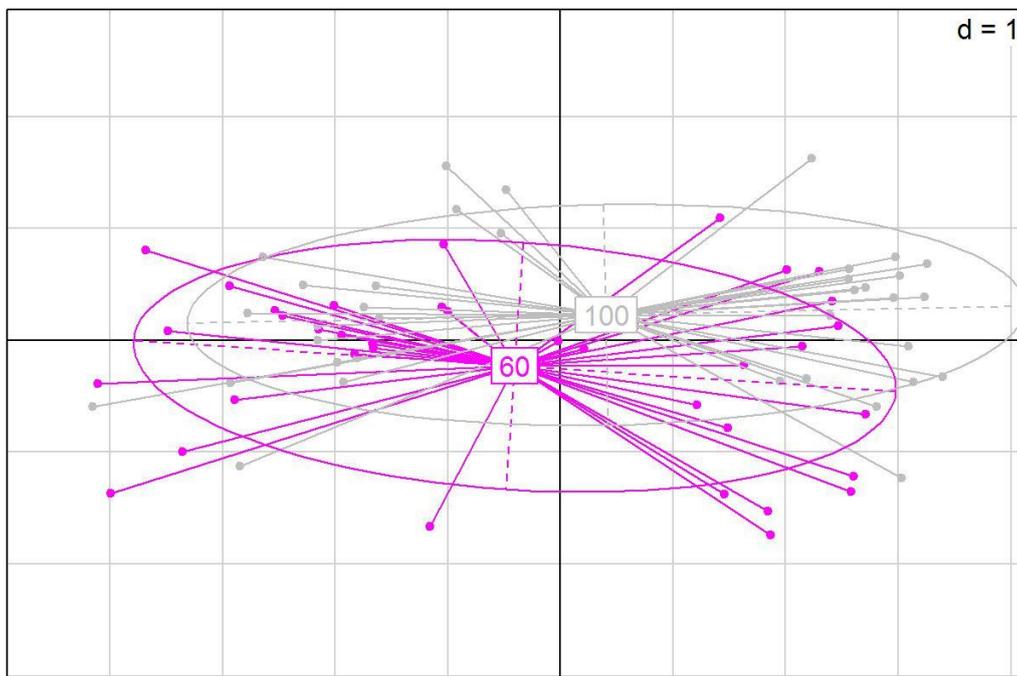


Figura 6.3.3c. Comportamiento de las muestras con respecto a los puntajes de cada uno de los componentes principales, agrupados por concentración de jal en el sustrato. Muestras con una concentración de 60 % jal de color magenta, muestras con una concentración de 100% jal de color gris.

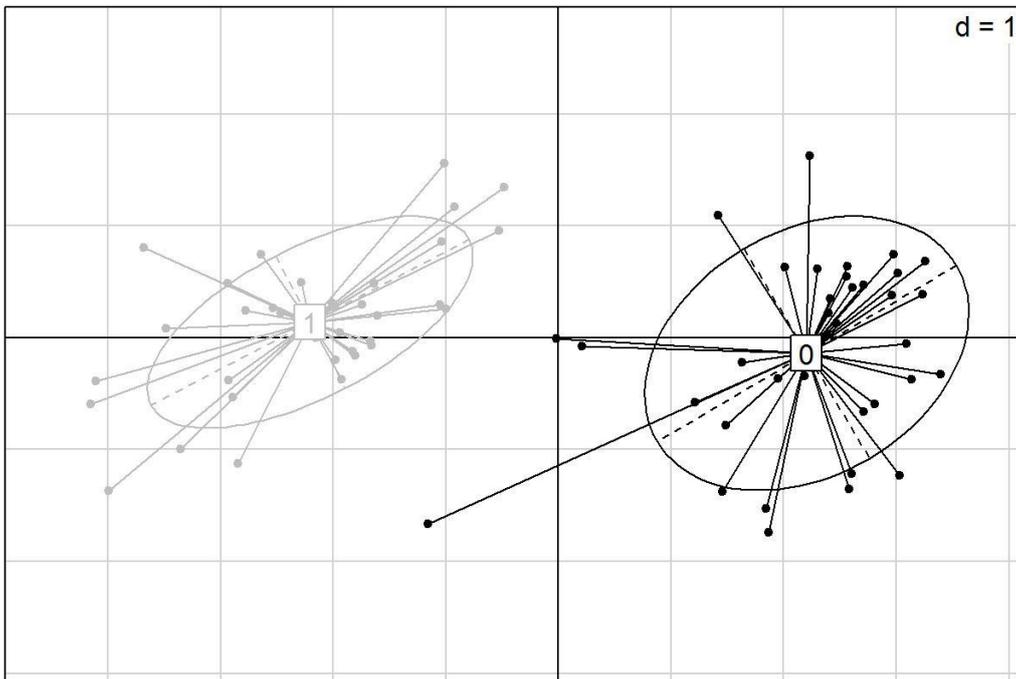


Figura 6.3.3c. Comportamiento de las muestras con respecto a los puntajes de cada uno de los componentes principales, agrupados por el factor composta. Muestras con composta de color gris (1, izquierda), muestras sin composta de color negro (0, derecha).

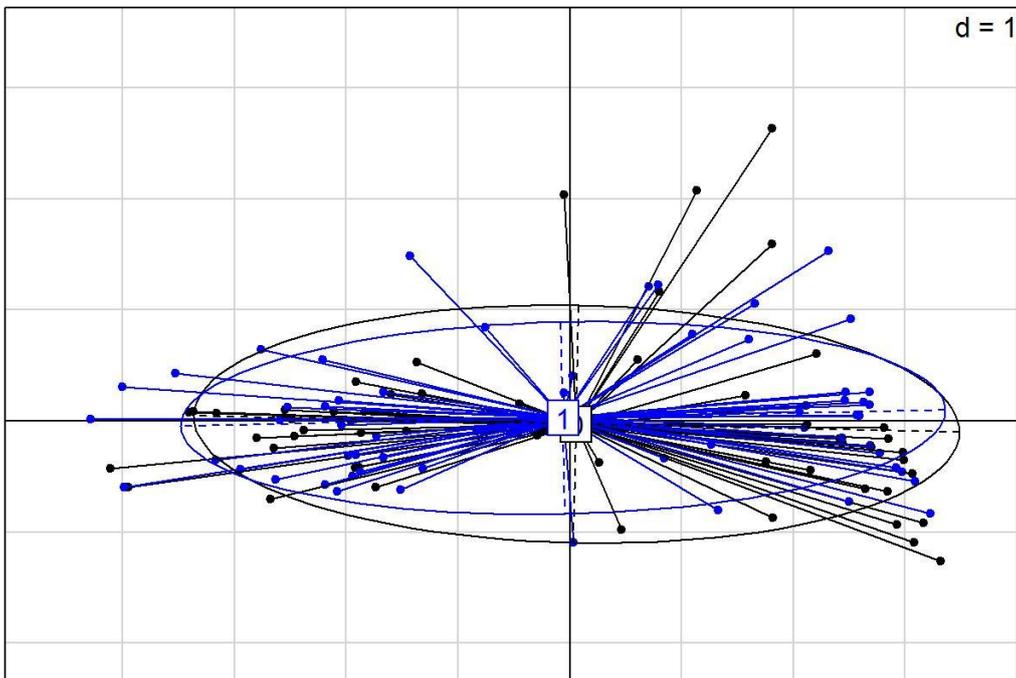


Figura 6.3.3e. Comportamiento de las muestras con respecto a los puntajes de cada uno de los componentes principales, agrupados por inóculo de HMA. Muestras con inóculo de HMA de color azul (1), muestras sin inóculo de HMA de color negro (0).

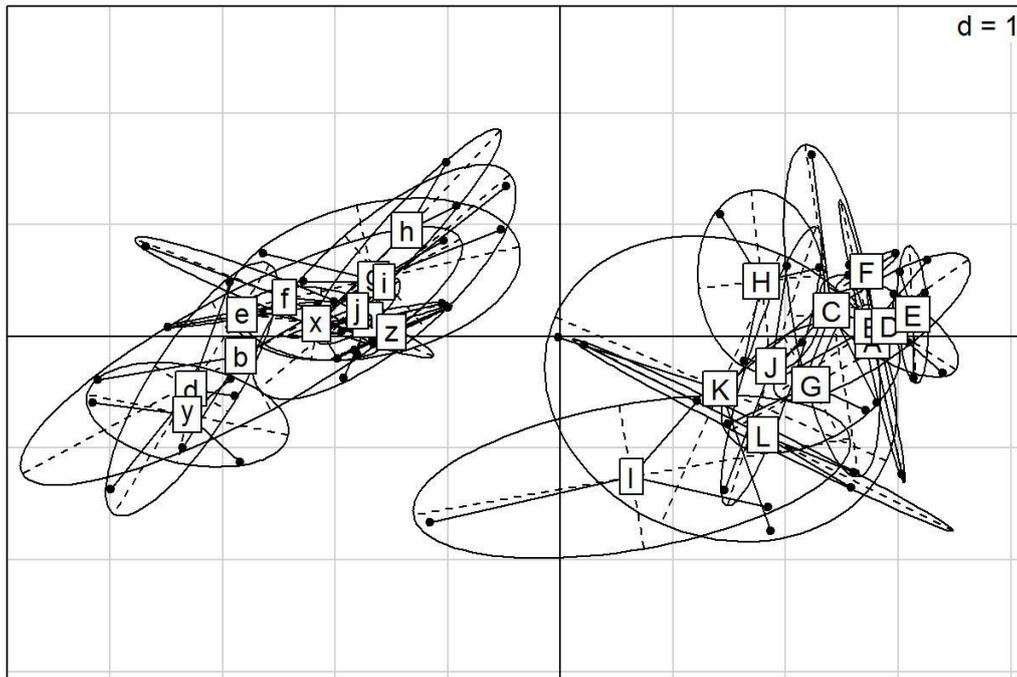


Figura 6.3.3f. Comportamiento de las muestras con respecto a los puntajes obtenidos de cada uno de los componentes principales agrupados por tratamiento.

La correlación entre las variables originales y los primeros dos componentes principales permitió diferenciar dos grupos de variables, las correspondientes a la presencia de composta en el sustrato y a su ausencia. En la Figura 6.3.3f se pueden observar como las muestras de las variables con composta se agrupan del lado positivo del primer componente principal, y las muestras de las variables sin composta del lado negativo del mismo.

Este análisis ayuda a reafirmar lo que se ha observado en esta sección de resultados, la disponibilidad de nutrientes que aporta la composta juega un papel importante en los factores de crecimiento vegetal de *B. curtipendula*; así mismo la estructura del sustrato que mejora con la adición de composta y arena, es también un factor altamente implicado en el desarrollo de la planta.

7. Discusión

A nivel mundial son empleados diferentes procesos para la producción de minerales con alto valor comercial, independientemente del proceso, el aprovechamiento de metales presenta un riesgo y una alteración al ecosistema, en menor o mayor grado. Los procesos tempranos para el aprovechamiento del mineral, son procesos altamente ineficientes, de los cuales, las colas y desechos son descargados directamente en el ecosistema o en presas de jales [Cobb *et al.*, 2000]. En las presas de jales y colas de minas, las concentraciones de metales pesados como lo son el plomo, el cadmio, el zinc y el arsénico sobrepasan los rangos establecidos por las agencias internacionales, en la mayoría de los casos [Puga *et al.*, 2006].

Las presas de jales de la industria minera San Francisco del Oro, en el sur del estado de Chihuahua, en México, cubren una superficie de aproximadamente 140 ha [Puga *et al.*, 2006]. En el estado de Guanajuato las presas de jales abarcan una superficie de 81.9 ha y contienen cerca de 40.3 millones de toneladas de jal [Ramos *et al.*, 2012].

Las concentraciones alcanzadas en el jal proveniente de la presa de jales de la mina “El cubo” localizada en el estado de Guanajuato, en México, fueron de 3.6 mg/kg para cadmio, 195.1 mg/kg cromo, 22.3 mg/kg cobre y 930 mg/kg de zinc (Tabla 6.2.2.).

Las concentraciones de los metales cadmio, cromo, cobre y plomo del jal proveniente de la presa de jales de la mina “El cubo”, se encuentran dentro de los niveles permisibles establecidos en la norma oficial NOM-147-SEMARNAT/SSA1-200. Sin embargo, la concentración de zinc presente en el jal de la zona de estudio, excedió en un 132.5 % los niveles recomendados por la norma.

Estas concentraciones son mayores a las reportadas por Ramos y colaboradores [2012], para muestras de jal procedentes del distrito minero de Guanajuato; las concentraciones reportadas en el citado estudio fueron de 71.3 mg/kg de cromo, 19.8 mg/kg de cobre, 53.3 mg/kg de Zn y 24.6 mg/kg de plomo.

En China, en la Provincia de Guangdong, Wu y colaboradores [2006] analizaron las colas del proceso de una mina de plomo-zinc en Fankou, donde la concentración de zinc, plomo, cobre y cadmio son mayores que las obtenidas para la presa de jales de la mina “El cubo”. Las concentraciones reportadas para ese sitio fueron las siguientes: zinc 9826.8 ppm, plomo 402.3ppm, cobre 89.9 ppm y cadmio 32.6 ppm. Otro estudio realizado en China por Ban y col. [2015], en la provincia Shaanxi, en una mina de plomo-zinc en Qiandongshan, en el cuál evaluaron la concentración del suelo rizosférico de seis especies de plantas que se encontraban creciendo en muestras de jal de la mina mencionada, reportó concentraciones del suelo

rizosférico para plomo de 221 hasta 1537 mg/kg y para zinc concentraciones de 290 a 4964 mg/kg. Uno de los valores mayores reportado en la bibliografía, para la concentración de zinc en las colas o jales mineros, se encontró en el sureste de España, en el distrito minero “La Unión”. El estudio fue realizado por Curaqueo y colaboradores [2014], quienes encontraron una concentración de zinc de 12000 µg/g, la concentración de otros metales en el jal fue de 91 µg/g para cromo y 163 µg/g de cobre.

Se han realizado diversos estudios para evaluar la movilización de los metales pesados a través de efluentes de agua superficiales. En Japón, en 1994, Hiraki analizó el área “El Tomayan”, localizada río abajo del río Lintu, río arriba se encuentra localizada la mina de zinc Kamioka. La concentración de zinc presente en este suelo fue de 2830 ppm, otros metales presentes fueron cadmio 20.3 ppm y cobre 92.5 ppm.

Se han desarrollado y adaptado diversos procesos físicos, químicos y biológicos, para tratar de resolver este problema ambiental, uno de estos es la fitoremediación. La fitoremediación es el proceso, en el cual se usan plantas para remover, destoxificar, o estabilizar contaminantes, es un proceso amigable con el medio ambiente y una excelente herramienta para descontaminar suelos y agua. El uso de plantas para disminuir la concentración de metales pesados en colas de minas y efluentes industriales ha presentado resultados interesantes [Cheng, 2003].

La capacidad de purificación de las plantas, de sitios contaminados por metales pesados, se ve afectado por diferentes factores, como lo son la concentración de los metales pesados, la especie de elementos, la especie de la planta, el tiempo de exposición, las condiciones nutricionales (agua, N, P, K, oxígeno, etc.), la temperatura y el pH del sitio [Cheng, 2003; Glick, 2003; Wu *et al.*, 2006]. Como se menciono anteriormente, el pH del sitio es uno de los factores que más afecta la biodisponibilidad de los nutrientes y metales, así mismo es considerado uno de los factores vitales para el establecimiento de microorganismos. El jal proveniente de la mina “El cubo” mostró un valor de pH de 8.5, valores muy similares han sido reportados para otros jales de otras minas en el estado de Guanajuato [Ramos *et al.*, 2012], los cuales oscilan entre pH de 8.5 a 8.7. El comportamiento alcalino de este sustrato se puede observar en jales mineros o colas de mina en otros países [Ban *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2006], quienes reportan valores que van de un pH de 7.23 hasta 8.10 unidades.

La recuperación de las propiedades del suelo es una de las mayores metas en los programas de fitoestabilización de presas de jales [Curaqueo *et al.*, 2014], esta recuperación puede verse favorecida mediante el establecimiento de la sucesión secundaria de especies vegetativas, la biopotencialización de la microbiota nativa, el apoyo de PGPR y HMA para la fitoremediación y la reforestación del sitio. La reforestación de presas de jales y otros depósitos de colas de

minas, es una forma de contener los metales para evitar el aumento de ecosistemas contaminados [Cobb *et al.*, 2000]. En este sentido, Price y Thirgood [1983] evaluaron la reforestación de una presa de jales en una mina de molibdeno localizada al norte de la Columbia Británica, en Canadá. La invasión natural presente en la presa de jales fracasa a los nueve años, mientras que la reforestación que ellos realizaron con gramíneas y leguminosas compatibles con el ecosistema, prevalecía fuerte a los doce años.

La reforestación de presas de jales en México, debe realizarse con especies vegetales nativas de la región, para garantizar la sucesión y permanencia con un mínimo de conservación [NOM-141-SEMARNAT-2003]. Banderita (*Bouteloua curtipendula*), es un pasto forrajero que crece en climas semiáridos, si se proyectara la reforestación de la presa de jales de la mina “El cubo”, utilizar esta especie cumpliría con la normatividad mexicana, además, es un pasto que presenta un rápido crecimiento. Por lo que, en el presente trabajo, se evaluó el pasto *Bouteloua curtipendula*, en un sustrato con diferentes concentraciones de mezcla general de invernadero y jal proveniente de la zona de estudio, en condiciones de esterilidad. El crecimiento de *B. curtipendula* se vio afectado por la concentración de jal en el sustrato, se observó que a mayor concentración de jal el crecimiento de la planta fue menor. Esta tendencia coincide con lo descrito por Wu y colaboradores [2006], quienes observaron que la biomasa de la planta decrece severamente a medida que incrementa la concentración del jal. Cob y col. [2000] observaron que a medida que incrementa la concentración de metales en el suelo, la salud de la planta decrece.

Desde el punto de vista del establecimiento de las plantas en procesos de bioremediación, la formación de la raíz es fundamental para este fin, en el presente trabajo se puede demostrar que los jales de mina tienen efectos marcados sobre esta estructura de las plantas, el peso seco de raíz decrece marcadamente en los tratamientos con una concentración de 50% de jal, y este efecto incrementa a medida que se incrementa la concentración del jal. Este comportamiento coincide con lo reportado por Cheng [2003], quien evaluó el crecimiento de *Stylosanthes guianensis* en colas de mina, en su análisis reportó que la viabilidad de la raíz se reduce bajo condiciones de estrés por metales pesados. Wang [1991], indicó que el crecimiento de raíz como punto final de lectura, es más sensible a la toxicidad que la germinación de semillas.

Las altas concentraciones de metales pesados presentes en los jales de mina, inhiben el crecimiento de las plantas [Glick, 2003]. Esto puede ser debido a que las plantas tienen mecanismos de tolerancia, sin embargo, no todas las plantas desarrollan estos mecanismos de tolerancia a metales pesados, además, el bajo contenido de nutrientes en los residuos de minas, contribuye a la mortalidad de las plantas. Cobb y col. [2000] evaluaron el crecimiento de cuatro diferentes vegetales en un sustrato proveniente de una presa de jales del Reino Unido;

observaron que las plantas de lechuga y rábano en 100% de jal de mina, presentaron una sobrevivencia del 100%, mientras que el porcentaje de sobrevivencia del frijol fue del 25% y el de las plantas de jitomate del 0%, bajo la misma concentración de jal. Además de la sobrevivencia de las plantas en estos sitios, otro factor que se ve alterado es el ciclo de vida de la planta [Glick, 2003]. En este sentido, *B. curtispindula* en 100% de jal, no alcanzó la etapa de floración, sin embargo, los demás tratamientos evaluados en una concentración de jal de 20%, 40%, 50%, 60% e incluso en 80% de jal de mina, si alcanzaron la etapa de floración.

Para llevar a cabo una eficiente fitoremediación de suelos contaminados por metales pesados, la biodisponibilidad del metal para las raíces de las plantas es considerada un requerimiento crítico para que la bioconcentración del metal o inmovilización en la planta ocurra. Debido a que solo una fracción de los metales pesados presentes en el suelo se encuentran disponibles para las plantas [Khan *et al.*, 2000], el rol de la microbiota, específicamente de los microorganismos rizosféricos y endófitos, que tienen la capacidad de incrementar la biodisponibilidad de los metales mediante diferentes mecanismos, puede ser usado como alternativa para optimizar la tasa de movilización, absorción, acumulación de contaminantes, entre otros [Ma *et al.*, 2012].

Los procesos y tecnologías físico-químicas usadas para la remediación de sitios contaminados, presentan una gran desventaja, eliminan las actividades biológicas, incluyendo microorganismos benéficos, como las bacterias fijadoras de nitrógeno y los hongos micorrízicos [Khan *et al.*, 2000]. Por otra parte, la eficiencia de la fitoremediación puede ser menor que la de las tecnologías físico-químicas, pero es ambientalmente más amigable, y debido a que se realiza en el sitio contaminado es también una alternativa más económica [Wu *et al.*, 2006]; sin embargo, esta eficiencia puede incrementarse considerablemente con el apoyo de microorganismos nativos o microorganismos de colección que han sido probados bajo circunstancias similares. Una alternativa para incrementar la eficiencia de la fitoremediación con el apoyo de microorganismos, es la inoculación con bacterias de vida libre promotoras de crecimiento (PGPR), pues se ha demostrado que facilitan el crecimiento de la planta, incrementan la biomasa, aumenta la acumulación del metal, además de que mejoran la nutrición y la salud de la planta [Lucy *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2006].

Por otra parte, se ha demostrado que los hongos micorrízicos arbusculares (HMA), simbioses mutualistas de las plantas, mitigan el estrés causado por metales pesados en las plantas. La tolerancia que aporta la colonización por HMA a la planta en suelos contaminados con metales pesados, la deposición de metales pesados en los órganos de las plantas y las estructuras de los hongos, la producción de compuestos estimulantes del crecimiento vegetal de los HMA que aumentan la nutrición e incrementan la biomasa de la planta; son características que llevan a considerar el uso de plantas-HMA como otra alternativa con alto potencial en el proceso de

fitoremediación [Hildebrandt *et al.*, 2007; Khan *et al.*, 2000]. Se ha demostrado que los metales pesados se unen a la pared celular de ectomicorrizas y endomicorrizas, mediante compuestos como quitina, derivados de celulosa y melanina [Khan *et al.*, 2000].

Una pequeña alteración en las propiedades físico, químicas y/o biológicas en la rizósfera causada por estreses abióticos o bióticos, pueden afectar severamente la interacción planta-microorganismo. Así también, el crecimiento y sobrevivencia de los microorganismos en la rizósfera se ve considerablemente afectado por el potencial tóxico de los metales pesados [Chaudhary *et al.*, 2004]. La colonización y sobrevivencia de los microorganismos bajo condiciones de estrés, ocasionado por los metales pesados presentes en el ecosistema, es un factor indispensable para aumentar el crecimiento vegetal y lograr que el proceso de fitoremediación se lleve a cabo con éxito [Rajkumar *et al.*, 2012].

Chaudhary y col. [2004] realizaron estudios de fijación de nitrógeno en *R. leguminosarum* bvs vicae y trifolli, con sus hospederos chícharo y trébol Egipcio, respectivamente; realizados en un suelo colectado de una granja donde el riego se realiza con agua contaminada con metales pesados, mostraron la inhibición de distintos parámetros en la fijación de nitrógeno, como lo son el número de nódulos, el peso fresco y peso seco de los nódulos, el peso fresco y seco de la raíz, y el contenido de nitrógeno y fósforo en las plantas.

Otros aspectos que intervienen en la remediación de suelos son su heterogeneidad a pequeña escala, particularmente en los factores como el contenido de materia orgánica, pH, la fracción de limo, así como, la variación en la temperatura, el contenido de agua y de oxígeno, el suministro de nutrientes, provocan fluctuaciones naturales en el número y la actividad de los microorganismos [Doelman *et al.*, 1994]. La contaminación del suelo por metales pesados, no solo afecta el comportamiento vegetal y su interacción con los microorganismos, si no que repercute en su comportamiento, sus funciones y su sobrevivencia.

Una alternativa para aumentar la supervivencia de las bacterias es su inmovilización dentro de acarreadores biodegradables, con la encapsulación se proporciona protección al microorganismo [Schoebitz *et al.*, 2013]. Para el encapsulamiento de microorganismos se emplean diferentes procesos físicos y químicos. En el presente estudio se encapsuló a *Bacillus subtilis* MZ en almidones modificados mediante secado por aspersión. El secado por aspersión es un proceso que funciona de forma continua, con bajos costos de operación, buenos rendimientos y se obtiene un producto de alta calidad [Boza *et al.*, 2004; Schoebitz *et al.*, 2013].

Los rendimientos obtenidos en este estudio por el proceso de secado por aspersión fueron menores a 50%; sin embargo, no se considero que los bajos rendimientos obtenidos sean debido al proceso. Esto puede ser debido a que se procesaron volúmenes pequeños y el equipo está

diseñado para procesar volúmenes mayores, en los cuales las pérdidas a través del proceso son menores. Es necesario considerar los volúmenes óptimos del proceso para obtener un mayor rendimiento y presentar una alternativa competitiva con otros procesos de encapsulación. Entre los factores que influyen en el rendimiento del proceso de secado por aspersión son las condiciones de operación. Cai y Corke [2000], evaluaron las condiciones de alimentación de la solución y la temperatura del aire de entrada, los mejores resultados fueron los obtenidos con una temperatura de entrada del aire de 180°C. Boza y col. [2004] observaron que cuando la temperatura de entrada del aire fue menor, y la suspensión sometida al secado contenía baja concentración de sólidos, se presentó un decremento gradual en la viabilidad de las bacterias microcapsuladas durante su almacenamiento. Por otra parte, el material usado para encapsular es una variable que también influye en la eficiencia del proceso de secado por aspersión, así como, en la calidad de las microcápsulas. Para encapsular microorganismos se emplean un sin número de materiales de pared [Cai *et al.*, 2000; García *et al.*, 2014; Schoebitz *et al.*, 2013], los almidones modificados ofrecen una excelente alternativa para microencapsular microorganismos debido a sus características físicas, sus propiedades emulsificantes y buenas propiedades de secado [Cai *et al.*, 2000; Murúa *et al.*, 2009; Falfán *et al.*, 2014]. Otra variable que ha sido reportada como clave en el resultado del producto obtenido mediante secado por aspersión, es el porcentaje de sólidos en la solución que se someterá al proceso [Boza *et al.*, 2004; Cai *et al.*, 2000].

En el presente estudio se empleó como material de pared a dos diferentes almidones modificados. El primero un almidón de arroz fosfatado, las microcápsulas realizadas con este almidón se obtuvieron a partir del secado de una emulsión con un total de sólidos suspendidos del 10%. El segundo material de pared empleado fue un almidón succinatado comercial, las microcápsulas de este material de pared se obtuvieron a partir del secado de una emulsión con un 30% de sólidos suspendidos totales. García y col. [2014], microencapsularon esporas de *B. thuringiensis* empleando como material de pared dos almidones de amaranto modificados, almidón fosfatado y almidón succinatado, las emulsiones sometidas a secado se realizaron con un 30% de sólidos suspendidos totales. Los rendimientos obtenidos en el estudio mencionado, fueron de 32.62% para el almidón fosfatado y del 25.98% para el almidón succinatado. El rendimiento que se obtuvo en el presente estudio para ambos materiales de pared fue mayor, el rendimiento de las microcápsulas de almidón fosfatado fue de 36.5% y de las microcápsulas de almidón succinatado de 41.38%.

Una de las desventajas que presentan los procesos para la producción de microcápsulas, es que durante el proceso mueren un gran número de bacterias [Bashan *et al.*, 2012]. El secado por aspersión alcanza altas temperaturas durante el proceso, por lo cual para aumentar la

sobrevivencia de los microorganismos se recomienda usar para bacterias capaces de formar esporas [Shoebitz *et al.*, 2013]. La sobrevivencia de la bacteria al final del proceso, se definió con el análisis del cambio en las células viables antes y después del secado por aspersión, como lo reportan Boza y colaboradores [2004].

En el presente estudio también se probaron dos cantidades de inoculo bacteriano en las emulsiones que se someterían a secado, para la producción de las microcápsulas, uno del 6% y el otro del 12% del volumen de la emulsión. Se observó que la sobrevivencia de las bacterias en las microcápsulas de almidón fosfatado con un 6% de inóculo fue menor que la sobrevivencia de las bacterias en las microcápsulas realizadas con un 12% de inoculo; sin embargo, la sobrevivencia de las bacterias presentes en las microcápsulas de almidón succinatado con un inóculo del 12% fue menor que la sobrevivencia de las bacterias en las microcápsulas de almidón succinatado con un inóculo del 6%. En este sentido, los resultados coinciden con los de García y colaboradores [2014], quienes utilizaron un inóculo de la bacteria del 6% del volumen. A diferencia de Boza [2004], quien reportó que altas concentraciones de la bacteria en las emulsiones generalmente logran una alta tasa de sobrevivencia.

El material de pared que presentó mayor protección para *Bacillus subtilis* MZ, fue el almidón succinatado. Las microcápsulas de almidón succinatado con un inoculo de 6% corresponden a el tratamiento que alcanzó el mayor porcentaje de sobrevivencia de *B. subtilis* MZ, con un valor de 21.9 %. Lo anterior puede deberse a que las microcápsulas de almidón succinatado, provienen de una solución con 30% de sólidos suspendidos, Boza y col. [2004] reportan que la resistencia del microorganismo incrementó con el contenido de sólidos totales.

Se han reportado diferentes variables que se ven involucradas en la sobrevivencia del microorganismo durante el proceso de secado por aspersión, como lo son la temperatura de alimentación del aire, el tipo de almidón, el porcentaje de sólidos y la concentración de la bacteria en la emulsión. Además de estas variables, nuestros resultados muestran claramente que la relación entre el inóculo y la concentración de sólidos de la emulsión, o incluso la relación entre el inóculo y el tipo de almidón empleado son determinantes también en la sobrevivencia de la bacteria.

Esta capacidad de sobrevivir de la bacteria se confirmó a través de un análisis al microscopio, para discernir las células vivas de las células muertas y a su vez, de las esporas en los microencapsulados, se realizaron tinciones de las microcápsulas de almidón fosfatado con una combinación de yoduro de propidio y naranja de acridina. Boulos y su equipo de trabajo [1999], reportaron que los valores obtenidos para el conteo de células teñidas con naranja de acridina compiten con los obtenidos por kits comerciales (como LIVE/DEAD® *BacLight*™), y

requieren de una inversión menor. Además, se cumplió con lo recomendado por Hobbie y col. [1977], quienes remarcan la necesidad de contar con un buen contraste para la observación de células viables. Nuestro método permitió diferenciar a las células vivas (verde fluorescente) de las muertas (rojas) exitosamente. Lo anterior permitió observar, la presencia de células vivas de *Bacillus subtilis* MZ. Bashan [1986] reportó el recubrimiento de células de *Azospirillum brasilense* en el interior y exterior de las cápsulas de alginato, observadas con microscopía electrónica. Nuestros resultados indican que las microcápsulas contienen una mezcla de células vegetativas y esporas, como se observó en la Figura 6.1.5a.

La fitoremediación asistida con microorganismos es un proceso confiable y seguro, con mayores rendimientos [Glick, 2003; Lucy *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2012; Zhuang *et al.*, 2007]. Los mejores resultados obtenidos en la eficiencia de la fitoremediación no se basa estrictamente en la concentración de metal en los diferentes tejidos de la planta, sino, en que un incremento en la biomasa de la planta resulta en el incremento de la tasa de remoción de los metales [Wu *et al.*, 2006].

El uso de microorganismos encapsulados en los procesos de fitoremediación *in situ* se presenta como una alternativa con alto potencial, debido a que los microorganismos encapsulados pueden liberarse gradualmente dependiendo de los factores externos, como el contenido de materia orgánica, pH, la fracción de limo, así como, la variación en la temperatura, el contenido de agua y de oxígeno, el suministro de nutrientes, que provocan fluctuaciones en el número y la actividad de los microorganismos [Doelman *et al.*, 1994]; además de, amortiguar las condiciones complejas que se presentan en los sitios contaminados, como lo sugiere Zhuang y col. [2007] quienes señalan que algunas PGPR podrían no sobrevivir bajo las condiciones de estos ecosistemas.

En el presente estudio, se evaluó el comportamiento en suelo (*in vitro*) de *B. subtilis* MZ microencapsulado y sin encapsular, cuando la bacteria se encontraba microencapsulada alcanzó una concentración final de organismos mayor y una mayor sobrevivencia, comparada con la bacteria sin encapsular. Debido a que la capacidad de colonizar las raíces es fundamental para el éxito del uso de microorganismos en el proceso de fitoremediación, nuestros resultados nos conducen a considerar que, el uso de la bacteria microencapsulada en suelos contaminados presenta un mayor potencial para colonizar a la raíz de las plantas que se utilizaran para la fitoremediación del sitio. En los procesos de fitoremediación apoyados con el uso de microorganismos, no se debe de ignorar la existencia de microorganismos benéficos en el sitio, que pueden presentar ventajas de adaptación ante los microorganismo inóculados, es importante prestar atención y buscar conservar la biota endémica del sitio [Khan *et al.*, 2000]. La presencia de bacterias benéficas estimulan el crecimiento de la planta y la protegen de la toxicidad de los

metales pesados [Wu *et al.*, 2006]. Una exitosa colonización y la sobrevivencia de los inóculos son variables vitales en el proceso de fitoremediación [Lucy *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2012].

El primer indicio de la respuesta de la planta-microorganismo ante las condiciones adversas del sustrato o del sitio a remediar, es la germinación de la semilla. Cheng [2003] reportó porcentajes menores al 45% de germinación para diferentes especies, cuando se encuentran en un sustrato con alto contenido de Cd, observó también, que existe mayor susceptibilidad al daño durante la etapa de plántula de la planta. La germinación de *B. curtispindula* en un sustrato contaminado con metales pesados, inoculada con microcápsulas *B. subtilis* MZ microencapsulada y un consorcio de HMA, alcanzó un porcentaje promedio de germinación de 72%, siendo mayor a los reportados en la bibliografía.

Existen diversos factores que influyen en el establecimiento de la simbiosis entre los microorganismos y la planta, además de los involucrados por la presencia de los metales pesados, como lo son los nutrientes presentes en el suelo, la disponibilidad de agua, el pH y la porosidad del suelo [Khan *et al.*, 2000]. Se han realizado diferentes estudios incrementando las condiciones nutricionales de los sitios contaminados con metales pesados. Curaqueo y Col. [2014], Price y Thirgood [1983] y Wu y col. [2006] observaron que el uso de composta en la fitoremediación ofrece una excelente estrategia para aumentar su rendimiento.

La combinación de HMA con composta podría ser una estrategia factible, al incorporarlos en los programas de fitoremediación, debido a que estos mejoran las propiedades del suelo, permiten un mejor desarrollo de las plantas mitigando los efectos de estrés por metales pesados, contaminantes en el suelo presentes debido a procesos mineros; además la inoculación con HMA resulta en la reducción de mortalidad y en el incremento del crecimiento de plantas [Curaqueo *et al.*, 2014]. La intensidad y tipo de respuesta de plantas micorrizadas depende de la planta hospedera, la especie del hongo y las condiciones del ecosistema [Allen, 1989]. Curaqueo y Col. [2014] realizaron un estudio en el cual inocularon con hongos micorrízicos arbusculares a *T. articulata* apoyada con el uso de 3% de composta, en un suelo contaminado con metales pesados, reportaron que la producción de biomasa foliar y de la raíz de la planta incrementó en un 96% y 60%, respectivamente.

En el presente estudio se observó que al mejorar la estructura del suelo, con la adición de composta y disminuir la concentración del jal con un 40% de arena, con el apoyo de *Bacillus subtilis* MZ y el consorcio Selva de HMA, las semillas de *B. curtispindula* alcanzaron valores de germinación promedio del 84%; así también, se vio favorecido el crecimiento de la planta. Los resultados obtenidos indican que la composta es un factor de gran importancia, esto puede ser debido a que aumenta los nutrientes disponibles en el sustrato y mejora la estructura del suelo.

A continuación, se analizó a los tratamientos que no incluían composta en su sustrato, y se observó que los mejores tratamientos para la variable de peso fresco foliar y altura de la planta fueron el tratamiento con inóculo líquido y con el consorcio SELVA, con una colonización del 44.69%; y, el tratamiento con inóculo de microcápsulas y el consorcio SELVA, con una colonización de 36.54%; ambos tratamientos en un sustrato con una concentración de 60% de jal. Ambos corresponden a tratamientos que presentaron altos valores de colonización por HMA, lo anterior llevó a considerar que existe un sinergismo entre el hongo, la bacteria y la planta, en el cual los tres elementos se ven favorecidos.

Bashan y colaboradores [2012] en un estudio realizado para la restauración de un sitio en el desierto de Sonora, apoyado con *Azospirillum brasilense* CD y *Bacillus pumilus* microencapsulados en una matriz de alginato, HMA y composta (en una proporción 1:8) evaluaron la sobrevivencia de tres tipos de árboles: mezquite, palo verde amarillo y palo verde azul. En alta densidad de plantas el tratamiento combinado (composta, bacterias encapsuladas y HMA) fue el que presentó mayor porcentaje de sobrevivencia para los tres tipos de árboles analizados. Lo anterior coincide con el comportamiento observado en el presente estudio para la variable de peso fresco foliar y altura de la planta, el tratamiento que presentó mejores resultados fue el tratamiento inoculado con microcápsulas de *B. subtilis* MZ y el consorcio Selva de HMA en un sustrato con composta y 60 % de jal.

Por otra parte, la colonización de la raíz de *B. curtispindula* por micorrizas, al contrario que lo descrito por los parámetros de altura de la planta y biomasa producida, se vio favorecida en los tratamientos que no contaban con composta en el sustrato. Esto puede deberse a que, el alto contenido de fósforo reduce la producción de exudados de la raíz, que estimulan el establecimiento de la comunicación para HMA [Smith *et al.*, 2008]. Los efectos benéficos de HMA son mayores cuando se encuentra en condiciones donde los nutrientes disponibles son limitados [Parniske, 2008]. Se observó que el tratamiento que alcanzó el mayor porcentaje de colonización por HMA del 46.67%, fue el que contenía el inóculo de microcápsulas de *B. subtilis* MZ en un sustrato con 60% de jal; sin embargo, cabe puntualizar que el tratamiento no se inoculó con el consorcio Selva de HMA.

Los resultados indican la presencia de HMA en el jal de la presa de jales de la mina “El cubo”. Efectivamente, los HMA pueden estar presentes en los jales, como lo mostró Ban y col. [2015], quienes identificaron 4 especies diferentes de HMA en jales de una mina donde se extraen principalmente plomo y zinc, se identificó a *Glomus constrictum*, *G. intraradices*, *G. aurantium* y *G. mosseae*. La colonización de HMA alcanzó valores desde 35% hasta 70%.

Las plantas son capaces de almacenar metales pesados en sus órganos, la acumulación depende de muchos factores, entre ellos del tipo de metal y la especie de planta, así como de las condiciones ambientales [Cheng, 2003; Cobb *et al.*, 2000]. Dentro de las condiciones ambientales se puede encontrar la presencia de microorganismos benéficos que modifican la capacidad de absorber y movilizar/inmovilizar los metales pesados por la raíz de la planta, mediante diferentes mecanismos, uno de ellos es aumentando la disponibilidad del metal hacia la planta. En un estudio realizado por Wu y col. [2006], observaron que al inocular con *Azotobacter chroococcum* HKN-5 (fijadora de nitrógeno), *Bacillus megaterium* HKP-1 (bacteria solubilizadora de fósforo) y *Bacillus mucilaginosus* HKK-1 8 (solubilizadora de potasio), se incrementó la concentración de plomo y zinc en los tejidos de *Brassica juncea*, en un sustrato con 25% de jal o menos, sin embargo, la concentración disminuyó a medida que aumentó la concentración de jal. No observaron el mismo comportamiento para cadmio y cobre, los cuales a diferencia del plomo y del zinc, incrementaron su concentración en el tejido de la planta a medida que incrementó la concentración del jal. En el presente estudio se observó que *B. subtilis* MZ aumenta la movilidad del zinc hacia la parte foliar de *B. curtipendula*, en un sustrato con 100% de jal.

Entre estos microorganismos también es posible encontrar a los HMA; se ha observado que los HMA presentan una fuerte capacidad de absorber metales pesados y pueden afectar la traslocación de los metales pesados en la planta [Ban *et al.*, 2015; Rajkumar *et al.*, 2012]. Se han descrito dos comportamientos contrapuestos acerca de la traslocación del metal a través de la planta, la primer corriente describe que los HMA pueden actuar como una barrera contra la traslocación de metales pesados de la raíz de la planta hacia la parte aérea [Rajkumar *et al.*, 2012]; la segunda corriente, es que los HMA ayudan a la traslocación del metal de la raíz hacia el resto de la planta. En este sentido, Ban y col. [2015] observaron que la colonización de HMA presenta una correlación negativa con el factor de traslocación de zinc, lo que indica que la colonización de HMA en la planta ocasiona una mayor acumulación de zinc y plomo en la raíz. Así mismo, Rajkumar y col. [2012], inocularon con *Sclerotium citrinum*, *Amanita muscaria* y *Lactarius rufus* plantulas de pino, observaron que se redujo la traslocación de cadmio, plomo y zinc, de las raíces de la planta hacia la parte foliar.

En el presente estudio se observó que en las plantas colonizadas por las especies de HMA presentes en el consorcio Selva, se vio favorecida la traslocación del zinc hacia la parte aérea de la planta; a diferencia de las plantas colonizadas por especies endófitas del jal, donde se favoreció la inmovilización del zinc en la raíz de la planta. Así también, se observó que el factor de traslocación del cadmio para los diferentes tratamientos aumentó en los tratamientos inoculados con el consorcio Selva de HMA en 100% jal, comparados con los tratamientos en un

sustrato con 60% de jal. El factor de traslocación del cadmio y del cobre, de los tratamientos inoculados con microcápsulas de *B. subtilis* MZ y el consorcio Selva de HMA, fueron mayores en un sustrato con 100% de jal, comparados con los mismos tratamientos en un sustrato con un 60% de jal.

Curaqueo y colaboradores [2014], señalan que el factor de traslocación en *T. articulata* en un sustrato con metales pesados se ve alterado con la adición de composta, la concentración de cromo, níquel y plomo en la parte foliar de la planta disminuye, mientras que la concentración de cromo y arsénico disminuye en la raíz. En el presente estudio, se observó que los tratamientos con una baja colonización de HMA, de 6.17% a 15.31%, y con la adición de composta en el sustrato, reportaron valores del factor de traslocación de 1, lo que indica que la concentración en ambas partes de la planta son iguales.

Ciertamente, la fitoremediación de suelos contaminados con metales pesados asistida con microcápsulas de *B. subtilis* MZ, presenta una alternativa con gran potencial. Por consiguiente, es necesaria la optimización de proceso del secado por aspersion, considerando que el inóculo del 6% de la bacteria es el más viable. Además, cuando esta alternativa se apoyó con la co-inoculación de HMA, el sinergismo entre la bacteria y el hongo, se incrementó la tasa de germinación, la altura y biomasa de la planta; en consecuencia, se observó el mismo comportamiento con el rendimiento del proceso. La mejor alternativa observada, fue la co-inoculación de la microcápsulas con el HMA junto con la adición de composta, pues además del sinergismo entre los microorganismos, con la adición de composta se incrementan los nutrientes en el suelo, más aun, se mejora la estructura del mismo, mejorando las condiciones a las que se enfrentan los organismos del sistema, HMA, bacterias y planta.

En lo que respecta a la traslocación del metal a través de la planta, el uso de composta debe estar condicionado al objetivo planteado para el proceso, es decir, evaluar la cantidad de composta que permita a los HMA colonizar la raíz, para obtener mejores resultados. Por otra parte, la concentración de zinc en el jal de mina del sitio de estudio excedió a los niveles máximos permisibles normados en el país, se observó que, la movilización del zinc hacia la parte foliar de la planta se vio favorecida en presencia de las microcápsulas de *B. subtilis* MZ en conjunto con el consorcio Selva, por lo cual, esta estrategia se presenta como una excelente alternativa para la remediación del sitio de estudio.

8. Conclusiones

El material de pared es importante en el proceso de encapsulamiento.

El tipo de almidón, el porcentaje de sólidos suspendidos y el porcentaje del inóculo bacteriano repercuten en la sobrevivencia de la bacteria microencapsulada, siendo el almidón succinatado el que aporta una mayor protección al microorganismo.

El producto del secado por aspersión, es de gran calidad y puede contener una alta presencia de microorganismos.

B. subtilis MZ es capaz de sobrevivir al proceso de secado por aspersión; además, las microcápsulas se constituyen de células vivas y esporas de la bacteria.

B. subtilis MZ microencapsulada se libera gradualmente al medio, y alcanza una sobrevivencia mayor que la de la bacteria sin encapsular.

La concentración de jal en el sustrato, afecta el crecimiento de *Bouteloua curtipendula*; así mismo, el crecimiento vegetal se favorece al incrementar los nutrientes disponibles y mejorar la estructura del suelo.

La co-inoculación con microcápsulas de *B. subtilis* MZ y HMA en el jal de mina, incrementa la tasa de germinación de *Bouteloua curtipendula*.

La biomasa de *B. curtipendula* se incrementó con la co-inoculación de las microcápsulas de *B. subtilis* MZ y con el consorcio Selva de HMA; así como, por el sinergismo entre estos microorganismos y los HMA presentes en el jal

Es posible encontrar HMA en el jal de la presa de jales de la mina “El cubo”. Además, su colonización en la raíz se ve favorecida con la inoculación de *B. subtilis* MZ microencapsulada.

La disponibilidad de nutrientes en el sustrato repercute en el establecimiento de la simbiosis entre la planta y el HMA.

El establecimiento de la simbiosis entre la planta, *B. subtilis* MZ y los HMA; afecta la movilidad del zinc a través de la planta.

Los jales o colas de mina, presentan altas concentraciones de metales pesados.

9. Perspectivas

Evaluar otros almidones modificados.

Producir microcápsulas solamente con esporas de *B. subtilis* MZ.

Analizar las microcápsulas con otro colorante o con otro tipo de microscopia para observar a las células en las cápsulas de almidón succinatado.

Evaluar el tiempo de degradación de las cápsulas en sustrato.

Monitorear las microcápsulas a determinados tiempos para conocer el comportamiento que presentan cuando son almacenadas durante periodos largos. Bashan en 1986, observó mediante microscopia electrónica a diferentes tiempos, la formación de protuberancias resultantes de la multiplicación de *Azospirillum brasilense* en cápsulas de alginato inoculadas con esta bacteria [Bashan, 1986].

Definir las condiciones óptimas para la producción de microcápsulas a gran escala, para producir la cantidad necesaria de inóculo y realizar experimentos *in situ*. Shoebitz indicó que es necesario la innovación de los procesos de bioncapsulación buscando incrementar sus rendimientos [Shoebitz *et al.*, 2013].

Aislar microorganismos provenientes del jal, evaluar su posible participación en la colonización de la raíz. Así como también, aislar esporas del jal e identificar los hongos micorrízicos arbusculares. Con la finalidad de conocer como conviven todos ellos en el ecosistema y poder elucidar su relación con el crecimiento de la vegetación en el sitio afectado.

Realizar experimentos *in situ* para evaluar otras variables dependientes del lugar que presenta el problema; como lo son condiciones climáticas, competencia o sinergismo natural, presencia de microorganismos edáficos, entre otros.

10. Referencias bibliográficas

- Abollino, O., Aceto, M., Malandrino, M., Mentaste, E., Sarzanini, C. & Barberis, R. 2002. Distribution and Mobility of Metals in Contaminated Sites. Chemometric Investigation of Pollutant Profiles. *Environmental Pollution*, 119:177.
- Allen, M., 1989. Mycorrhizae and rehabilitation of disturbed arid soils: process and practices. *Arid Soil Research* 3:229-241.
- Ban, Y., Xu, Z., Zhang, H., Chen, H. & Tang, M., 2015. Soil chemistry properties, translocation of heavy metals, and mycorrhizal fungi associated with six plant species growing on lead-zinc mine tailings. *Ann Microbiol.* 65:503-515.
- Bashan, Y., 1986. Alginate beads as synthetic inoculant carriers for slow release of bacteria that affect plant growth. *Applied and environmental microbiology* 51(5):1089-1098.
- Bashan, Y., Hernandez, P., Leyva, L. & Bacilio, M., 2002. Alginate microbeads as inoculant carriers for plant growth-promoting bacteria. *Biol Fertil soils* 35:359-368.
- Bashan, Y., Salazar B., Moreno, M., Lopez, B. & Linderman, R., 2012. Restoration of eroded soil in the Sonora Desert with native leguminous trees using plant growth-promoting microorganisms and limited amounts of compost and water. *Journal of environmental Management* 102:26-36.
- Bertolini, A., Siani, A. & Frosso, C., 2001. Stability of monoterpenes encapsulated in gum arabic by Spray-Drying. *J. Agric. Food Chem* 49:780-785.
- Boulos, L., Prévost, M., Barbeau, B., Coallier, J. & Desjardins, R., 1999. LIVE/DEAD® *BacLight*™: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *Journal of Microbiological Methods*, 37:77-86.
- Boza, Y., Barbin, D. & Scamparini A., 2004. Effect of spray-drying on the quality of encapsulated cells of *Beijerinckia* sp. *Process Biochemistry*, 39:1274-1284.
- Cai, Y. & Corke, H. 2000. Production and properties of spray-dried *Amaranthus* betacyanin pigments. *Journal of Food Science*, 65(6):1248-1252.
- Chaudhary, P., Dudeja, S. & Kapoor, K., 2004. Effectivity of host-*Rhizobium leguminosarum* symbiosis in soils receiving sewage water containing heavy metals. *Microbiological Research*. 159:121-127.

- Cheng, S., 2003. Effects of heavy metal on plants and resistance mechanisms. *Environ Sci & Pollut Res* 10(4):256-264.
- Cobb, G., Sands, K., Waters, M., Wixson, B. & Dorward-King, E., 2000. Accumulation of heavy metals by vegetables grown in mine wastes. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19(3):600-607.
- Curaqueo, G., Schoebitz, M., Borie F., Caravaca F. & Roldán A., 2014. Inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and addition of composted olive mill waste enhance plant establishment and soil properties in the regeneration of a heavy metal-polluted environment. *Environ Sci Pollut Res* 21:7403-7412.
- Doelman, P., Jansen, E, Michels, M. & Van Til, M., 1994. Effects of heavy metals in soil on microbial diversity and activity as shown by the sensitivity-resistance index, an ecologically relevant parameter. *Biol Fertil Soils*. 17:177–184.
- Falfán, R., Gaytán, M., Verdalet, I., Amaya, S., Ferreira, C. & Martínez, F., 2014. Evaluation of modified amaranth starch as Shell material for encapsulation of probiotics. *Cereal Chem*. 91(3):300-308.
- García, A., Gaytán M., Barrera, J., Ibarra J. & Martínez, F., 2014. Bio-insecticide *Bacillus thuringiensis* spores encapsulated with amaranth derivatized starches: studies on the propagation “in vitro”. *Bioprocess Biosyst Eng* 38(2):329-339.
- Glick, B., 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol*, 41:109-117.
- Glick B., Bashan Y.; 1997; Genetic manipulation of plant growth-promoting bacteria to enhance biocontrol of phytopathogens; *Biotechnology Advances*; Vol. 15; pp. 353-378.
- Glick, B., 2003. Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. *Biotechnology Advances*. 21:383-393.
- Hassen A., Saidi N., Cherif M. & Boudabous A., 1998. Resistance of environmental bacteria to heavy metals. *Bioresource Technology* 64:7-15.
- Hildebrandt, U., Regvar, M. & Bothe, G., 2007. Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance. *Phytochemistry*. 68:139-146.

- Hiraki, M., 1994. Populations of Cd-tolerant microorganisms in soils polluted with heavy metals. *Soil Science and Plant Nutrition*. 40(3):515-524.
- Hobbie, J., Daley, R. & Jasper, S., 1977. Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*, 33(5):1225-1228.
- Instituto Nacional de Ecología (INE). 2007. "Industria minera". INE. 02 de mayo de 2014. URL: http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/16/parte3_12.html.
- Khan, A., Kuek, C., Chaudhry, T., Khoo, C. & Hayes, W., 2000. Role of plants, Mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation. *Chemosphere*. 41:197-207.
- Kenneth, J. & James, S., 1985. An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-Propidium iodide. *The Journal of histochemistry and Cytochemistry* 33(1):77-79.
- Kumar, A., Prakash A. & Johri B. N., 2011. Bacillus as PGPR in crop ecosystem. Ed. Maheshwari D. K. , en *Bacteria in agrobiolgy: Crop Ecosystems* (pp 37-57). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Lucy, M., Reed, E. & Glick B., 2004. Applications of free living growth-promoting rhizobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 86:1-25.
- Ma, Y., Prasad, M., Rajkumar, M. & Freitas, H., 2012. Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils. *Biotechnology Advances*. 29:248-258.
- McGonigle, T., Miller, M., Evans, D., Fairchild, G. & Swan, J., 1990. A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol* 115:495-501.
- Mohamad, M. & Sijam K., 2012. Arbuscular mycorrhizal fungi and plant root exudates bio-communications in the rhizosphere. *African Journal of Microbiology Research*, 6(46):7295-7301.
- Murúa, B., Beristain, C. & Martínez, F., 2009. Preparation of starch derivatives using reactive extrusion an evaluation of modified starches as shell materials for encapsulation of flavoring agents by spray drying. *Journal of Food engineering* 91:380-386.

- Parniske, M., 2008. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nat Rev Microbiol*, 6(10):763-775.
- Phillips, A., 2014. (Top 10) World Silver Survey Reveals the Top Producing Nations 2013. *Mining global*. 12 de enero de 2015. URL: <http://www.miningglobal.com/top10/771/Top-10-World-Silver-Survey-Reveals-the-Top-Producing-Nations-2013>.
- Phillips, J. & Hayman D., 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transaction of the British Mycological Society* 55:158-161.
- Price, W. & Thirgood J., 1983. Reforestation research at Amax's Kitsault mine. En *Proceedings of the 7th Annual British Columbia Mine Reclamation Symposium*, 206-229. Victoria, BC.
- Puga S., Sosa M., Lebgue T., Quintana C. & Campos A., 2006. Contaminación por metales pesados en suelo provocada por la industria minera. *Ecología aplicada* 5(1):149-155.
- Rajkumar, M., Sandhya, S., Prasad, M. & Freitas, H., 2012. Perspectives of plant-associated microbes in heavy metal phytoremediation. *Biotechnology Advances*. 30:1562-1574.
- Ramos, M., Avelar, J., Medel, A., Yamamoto, L., Godinez, L., ramirez, M., Guerra, R. & Rodríguez, F., 2012. Movilidad de metales en jales procedentes del Distrito Minero de Guanajuato, México. 28:49.59.
- Salomon, W. 1995. Environmental impact of metals derived from mining activities: processes, predictions, prevention. *J. Geochim. Exploration*, 52:5-23.
- Schoebitz, M., López, M. & Roldán A., 2013. Bioencapsulation of microbial inoculants for better soil-plant fertilization. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 33:751-765.
- Secretaría de Economía (SE). 2015. SE. 13 de septiembre de 2015. URL: <http://www.economia.gob.mx/comunidad-negocios/mineria>.
- Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. Que establece el procedimiento para caracterizar los jales, especificaciones y criterios para la caracterización y preparación del sitio, proyecto, construcción operación y postoperación de presas de jales. NOM-141-SEMARNAT-2003. *Diario Oficial de la Federación Mexicana*, 17 de septiembre de 2003. 55p.

- Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales – Secretaría de Salubridad y Asistencia. Que establece los Criterios para determinar las concentraciones de remediación de suelos contaminados por arsénico, bario, berilio, cadmio, cromo hexavalente, mercurio, níquel, plata, plomo, selenio, talio y/o vanadio. Norma Oficial Mexicana NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004. Diario Oficial de la Federación Mexicana 02 de marzo de 2007. 62p.
- Servicio Geológico Mexicano (SGM) Coordinación General de Minería, 2014. Anuario estadístico de la minería Mexicana ampliada 2013. SGM. 12 enero 2015. URL: http://www.sgm.gob.mx/index.php?option=com_content&task=view&id=59&Itemid=67.
- Smith, S. & Read D., 2008. *Mycorrhizal symbiosis*. 3th edition. London. Academic Press. 800 p.
- Steel, R. & Torrie J., 1996. *Bioestadística: Principios y Procedimientos*. 2^a edición. México. McGraw-Hill. 622 p.
- Vacheron, J., Desbrosses, G., Bouffaud, M., Touraine, B., Moëgne-Loccoz, Y., Muller, D., Legendre, L., Wisniewski-Dye, F. & Prigent-Combaret, C., 2013. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Frontiers in Plant science* (4):356.
- Wang, W. 1991. Literature review on higher plants for toxicity testing. *Water Air Soil Pollution*, 59:381-400.
- Wu, S., Cheung, K., Luo, Y. & Wong m., 2006. Effects of inoculation of plant growth-promoting rhizobacteria on metal uptake by *Brassica juncea*. 140:124-135.
- Zambrano, F. & Camargo, C., 2001. Optimization of the conditions for the acid hydrolysis of cassava starch to obtain a fat replacer. *Brazilian Journal of Food Technology*. 71(4):147–154.
- Zhuang, X., Chen, J., Shim, H. & Bai, Z., 2007. New advances in plant growth-promoting rhizobacteria for bioremediation. *Environment International*. 33:406-413.