

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

UNIDAD SALTILLO

**“Fitorremediación asistida con nanopartículas de
dióxido de titanio (TiO₂) para la remediación de un
suelo contaminado con residuos mineros”**

T E S I S

Que presenta

Ing. Ana Lucia Flores Hernández

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

EN

**SUSTENTABILIDAD DE LOS RECURSOS NATURALES Y
ENERGÍA**

**Director de la Tesis:
Dr. Fabián Fernández Luqueño**

Ramos Arizpe, Coahuila

MAYO, 2023

Agradecimientos

Agradezco al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV) por haberme permitido ser parte del programa de Maestría en Ciencias en Sustentabilidad de los Recursos Naturales y Energía.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) por la beca que me otorgaron para la realización de mis estudios de maestría.

Al FONCYT por el financiamiento del proyecto.

A mi director de tesis el Dr. Fabián Fernández Luqueño, por permitirme trabajar en su laboratorio y por los conocimientos brindados a lo largo de mis estudios.

Al Dr. César Roberto Sarabia Castillo por haberme guiado durante el proceso de mi experimentación y por ser un gran apoyo a nivel educativo y personal.

A mis compañeros de laboratorio por el apoyo brindado durante toda mi estancia en el CINVESTAV.

A mis padres, Alma y David por siempre apoyarme en cada una de las metas que me proponga.

A mis hermanos y sobrina (Emma, David e Isaura) por siempre estar conmigo y apoyarme a cumplir mis sueños.

A mi novio Diego, por ser mi mejor amigo y apoyarme en cada uno de los proyectos que me proponga.

Contenido

Acrónimos	v
Glosario de términos	vi
Resumen	vii
Abstract	viii
I-Introducción.....	1
II-Antecedentes	2
2.1-Residuos mineros	2
2.1.1-Residuos mineros en la región carbonífera de Coahuila	3
2.2-Remediación.....	4
2.2.1-Fitorremediación	6
2.2.2-Plantas utilizadas para los procesos de fitorremediación	8
2.2.3-El girasol (<i>Helianthus annuus</i> L.) como planta hiperacumuladora.....	9
2.3-Nanorremediación	9
2.4-Nanobiorremediación	10
III-Justificación	11
IV-Objetivos.....	11
4.1-Objetivo general	11
4.2-Objetivos particulares.....	11
V-Metodología científica	12
5.1- Semillas de girasol (<i>Helianthus annuus</i> L.)	12
5.2-Nanopartículas.....	12
5.3-Área de estudio.....	12
5.4-Estrategia de muestreo	13
5.5-Acondicionamiento y análisis fisicoquímico	14
5.5.1- Determinación del pH y conductividad eléctrica de suelo y jales.....	15
5.5.2- Contenido de materia orgánica.....	15
5.5.3- Determinación de la textura	16
5.5.4- Determinación de la densidad aparente.....	16
5.5.5- Determinación de carbono y nitrógeno	17

5.5.6- Determinación de nutrientes.....	17
5.6-Análisis de la viabilidad de las semillas.....	18
5.7- Aislamiento de cepas microbianas	20
5.8- Nanopartículas.....	21
5.9-Determinación de metales pesados en jales, suelo y plantas.....	22
5.10-Tratamientos preliminares.....	22
5.11-Montaje experimental en invernadero.....	24
5.11.1-Unidades experimentales.....	24
5.11.2-Manejo del cultivo.....	24
5.11.2.1-Solución nutritiva	24
5.11.3- Muestreo destructivo y caracterización del crecimiento de planta	26
5.11.4- Determinación del contenido de clorofila	26
5.11.5- Determinaciones con biomasa húmeda	26
5.11.6- Determinaciones con biomasa en seco.....	27
5.12- Caracterización fisicoquímica final.....	27
5.13- Índice de geoacumulación	28
5.14- Factor de bioconcentración (FBC) y traslocación (FT)	28
5.15-Análisis estadístico	29
VI- Resultados y discusiones	30
6.1- Análisis fisicoquímico inicial.....	30
6.1.1-pH y conductividad eléctrica.....	30
6.1.2-Contenido de materia orgánica.....	31
6.1.3- Textura del suelo y densidad aparente	31
6.1.4- Contenido de carbono, nitrógeno, calcio, potasio, magnesio y fósforo	33
6.2- Porcentaje de germinación de las semillas de girasol	33
6.3- Diseño preliminar de tratamientos	33
6.4- Concentración de metales pesados	34
6.5- Caracterización de nanopartículas.....	34
6.6-Cepas microbianas.....	35
6.7- Índice de geoacumulación inicial.....	37
6.8- Observaciones morfológicas del cultivo	38
6.9- Biomasa de las plantas	41

6.10- Acumulación de As y Pb en las plantas	44
6.11- Factor de Bioconcentración y Traslocación	45
6.12-Contenido de clorofila.....	48
6.13-Análisis de tejido por MEB.....	50
6.14- Análisis Físicoquímico final.....	54
6.14.1- pH y conductividad eléctrica.....	54
6.14.2- Índice de geo acumulación final.....	55
VII- Conclusiones	56
VIII- Recomendaciones.....	57
IX-Bibliografía	58

Acrónimos

BIO	Bioaumentación con cepas microbianas.
DDS	Días después de la siembra.
FBC	Factor de bioconcentración.
FT	Factor de traslocación.
LMP	Límites máximos permisibles.
NPs	Nanopartículas.
NR	No reportado.
SN	Sin nanopartículas.
TiO ₂	Dióxido de titanio.
UFC	Unidades Formadoras de colonias.

Glosario de términos

Clorofila: Pigmento verde presente en las hojas y tallos de las plantas, encargado del proceso fotosintético.

Drenaje ácido de minas: Sustancia ácida derivada de la lixiviación de sulfuros metálicos presentes en minerales.

Fitorremediación: Técnica de remediación biológica, la cual se basa en el uso de plantas para remover o inmovilizar contaminantes.

Jales: Residuos provenientes del procesamiento de minerales los cuales contienen sulfuros como la piritita, pirrotita y arsenopiritita.

Nanopartícula: Partícula con una dimensión de entre uno y 100 nm.

Planta Hiperacumuladora: Planta que puede sobrevivir en suelos contaminados con metales pesados y tiene la capacidad de acumular contaminantes en biomasa a concentraciones por encima de la media. Generalmente se consideran hiperacumuladoras cuando acumulan o inmovilizan de 100 a 1000 veces más que la media.

Xerosol cálcico: Tipo de suelo que se caracteriza por tener un bajo contenido de materia orgánica (menor al 3%) y se encuentra principalmente en climas áridos y semi áridos.

Resumen

La fitorremediación es una técnica que utiliza plantas para la degradación de contaminantes presentes en suelo y agua. En esta investigación, se evaluó la capacidad del girasol (*Helianthus annuus* L.) en combinación con diferentes dosis de nanopartículas de TiO₂ (50, 100 o 150 mg kg⁻¹) para la remediación de un suelo contaminado con residuos mineros de carbón. Las raíces de las plantas acumularon más As y Pb, en comparación con su parte aérea. La mayor capacidad de acumulación del As en las raíces fue de 24.16 µg g⁻¹ de suelo seco y 13.70 µg As g⁻¹ de la mezcla de suelo y jales. Por otra parte, la mayor acumulación de Pb en las raíces (37.93 µg g⁻¹ de peso seco) ocurrió en el tratamiento que contenía una dosis de 150 mg kg⁻¹ de NPs y la adición de inóculo de cepas autóctonas. El factor de bioconcentración de As fue superior a uno solo en los tratamientos que contenían suelo (T10, T14, T15 y T16). Por el contrario, el valor de bioconcentración del Pb se mantuvo por debajo de uno (1.0) en todos los tratamientos. En cuanto a las características morfológicas de las plantas, la longitud de las raíces aumentó con la presencia de microorganismos en combinación con una dosis de nanopartículas de 150 mg kg⁻¹. La investigación concluye que el tratamiento más adecuado para la remediación del As es el que contiene NPs y bioaumentación con microorganismos. No obstante, en la mezcla de suelo y jales el tratamiento control acumuló una mayor concentración de As en la planta, lo cual se puede atribuir al estrés que provocan las NPs en presencia de los jales.

Abstract

Phytoremediation is a technique that uses plants for the degradation of contaminants present in soil and water. In this research, the capacity of sunflower (*Helianthus annuus* L.) was evaluated in combination with different doses of TiO₂-nanoparticles (50, 100, or 150 mg kg⁻¹) for remediation of soil contaminated with coal mining waste. The roots of the plants accumulated more As and Pb, compared to their aerial part. The highest accumulation capacity of As in the roots was 24.16 µg g⁻¹ of dry soil and 13.70 µg g⁻¹ of the soil mixture and tailings. Moreover, the greatest accumulation of Pb in the roots (37.93 µg g⁻¹ dry weight) occurred in the treatment containing a dose of 150 mg kg⁻¹ of NPs and the addition of inoculum from native strains. The bioconcentration factor of As was higher than one in treatments containing soil (T10, T14, T15, and T16). Conversely, the bioconcentration value of Pb remained below one in all treatments. The morphological characteristics of the plants, the length of the roots increased with the presence of microorganisms in combination with a dose of nanoparticles of 150 mg kg⁻¹. The research concludes that the most suitable treatment for the remediation of As is that containing NPs and bioaugmentation with microorganisms. However, in the mixture of soil and tailings, the control treatment accumulated a higher concentration of As in the plant, which can be attributed to the stress caused by the NPs in the presence of the tailings.

I-Introducción

La contaminación del suelo por metales pesados está directamente relacionada con diversas actividades antropogénicas. En México, la minería es una de las principales causas de contaminación por metales pesados, derivado de la extracción y procesamiento de minerales. Reportes indican que a lo largo del país existen suelos afectados por el mal manejo de los residuos mineros (jales y material estéril). Sin embargo, aún no se conoce a fondo las condiciones en las que se encuentran ni los posibles impactos ambientales [1].

Una actividad prioritaria para la identificación de estos residuos es la caracterización de suelo de minas activas y abandonadas, con el objetivo de buscar una solución viable para el tratamiento de los residuos, los cuales generalmente incluyen metales pesados [2]. Los metales pesados no son biodegradables, por lo tanto, se pueden acumular y llegar a concentraciones que representen un riesgo para la salud humana y el medioambiente. Para tratar de lidiar con la contaminación se han desarrollado diversos métodos de remediación fisicoquímica y biológica. La fitorremediación representa una técnica biológica, eficiente y respetuosa con el medioambiente que emplea plantas para degradar o remover los contaminantes presentes en el suelo. Sin embargo, uno de los inconvenientes de esta técnica, es el uso de largos periodos de tiempo para obtener una remediación exitosa, por lo que, adicionar nanopartículas (NPs) podría ayudar a acortar los tiempos de remediación y proporcionará micronutrientes a las plantas para promover su crecimiento y tolerancia a condiciones de estrés [3, 4].

En el contexto anterior, la presente investigación considera como objeto de estudio un suelo contaminado con residuos mineros provenientes de una presa de jales de carbón fuera de operación en el municipio de San Juan de Sabinas, Coahuila de Zaragoza. Por tanto, en el trabajo experimental se realizó la caracterización de suelo y se desarrolló una estrategia de fitorremediación asistida con diversas dosis de NPs.

II-Antecedentes

La contaminación del suelo es la introducción de sustancias, elementos o energía a concentraciones que sobrepasan los límites máximos permisibles y ocasionan problemas ambientales y de salud pública [5]. Este tipo de contaminación normalmente ocurre de manera antropogénica, derivada de actividades como la minería, el consumo de combustibles fósiles, la agricultura, las industrias electrónicas, la industria textil, entre otras [6].

Se estima que a nivel mundial existen 5 millones de sitios contaminados con metales pesados [7], lo que provoca alteraciones en el suelo, en la salud humana y en el medioambiente [8]. El efecto de la contaminación con metales pesados suele ser persistente, debido a su alta movilidad y porque no se degradan de manera natural a formas no tóxicas [9, 10].

En México la minería representa una de las principales actividades económicas, la cual se desarrolla mayormente en los estados del centro y norte del país [11]. A nivel nacional, el estado de Coahuila de Zaragoza se caracteriza por tener uno de los principales yacimientos de carbón y se estima que el 90% de la producción en el país proviene de la cuenca carbonífera de Sabinas, la cual se caracteriza por dividirse en 8 subcuencas en los municipios de San Juan de Sabinas, Muzquiz, Sabinas, Monclova, Piedras Negras y Nava [12].

Se estima que las operaciones mineras (excavación, extracción y procesamiento) pueden generar volúmenes de residuos superiores al obtenido del mineral de interés (hasta 10 veces más), los cuales contienen elementos peligrosos para la salud humana [13]. Además, estos residuos afectan directamente el suelo provocando alteraciones y pérdida de la biodiversidad [14].

2.1-Residuos mineros

La industria minera genera diferentes tipos de residuos, sin embargo, existen algunos que se destacan por producirse en mayor volumen, entre ellos se encuentran el material estéril, los jales y el drenaje ácido de mina [14]. En el procesamiento minero se requiere que el mineral de interés se separe de la arena de grano fino; una vez que se logra, el residuo (jales) es contenido en presas.

La oxidación de los jales se desarrolla a lo largo del tiempo, principalmente cuando las presas cesan la operación y las condiciones climáticas (agua y aire) contribuyen a la oxidación de minerales sulfurosos presentes en los jales, como la pirita (FeS_2) y la pirrotita (Fe_7S_8), los cuales son la

principal fuente de elementos potencialmente tóxicos (EPT) como el As, Pb, Fe, Cd, entre otros [15].

El manejo inadecuado de los residuos provoca la movilidad de estos; principalmente la dispersión ocurre de manera eólica en climas áridos, lo que conlleva a un problema de contaminación de suelo y agua con los EPT, lo que provoca daños para la salud humana y el medioambiente [15].

En México se desconoce la cantidad de sitios contaminados con residuos mineros provenientes del procesamiento de minerales. Debido a lo anterior, Romero y Gutiérrez [16] realizaron un estudio geoquímico y mineralógico en jales de dos sitios mineros localizados en el sur y centro de México. En ambos sitios se encontraron diferentes metales pesados en altas concentraciones, As (3627 mg kg^{-1}), Cd (434 mg kg^{-1}) y Pb ($10\ 900 \text{ mg kg}^{-1}$), lo que podría representar un riesgo para el medioambiente.

2.1.1-Residuos mineros en la región carbonífera de Coahuila

En el municipio de San Juan de Sabinas las empresas dedicadas al procesamiento de carbón utilizan el método de flotación para separar el mineral valioso de los componentes no deseados (ganga). En el ejido de Santa María se encuentra una presa de jales fuera de operación en donde Ramos-Méndez [17], realizó un estudio fisicoquímico de los residuos. Los resultados de la investigación mostraron que, en algunas zonas de la presa, los jales contenían valores de pH ácido (entre 3 y 4), lo que era indicativo de la oxidación de sulfuros. Además, este autor logró identificar diversos metales en los residuos, como Cu, Fe, Zn y Pb.

Adicionalmente, Flores-Hernández [18] realizó un estudio para identificar elementos potencialmente tóxicos en los jales de carbón, en donde se encontraron elementos como As, Pb, Se y Cu en concentraciones que varían entre los 2 y los 95 mg kg^{-1} . Asimismo, se encontró la presencia de V ($1229.93 \text{ mg kg}^{-1}$).

2.2-Remediación

La remediación se refiere al conjunto de técnicas empleadas para lograr contener, limpiar o restaurar suelo, agua o aire contaminados. A través del tiempo se han desarrollado diversas técnicas de contención y remediación de suelo las cuales pueden ser de manera in situ o ex situ [7] (Figura 1).

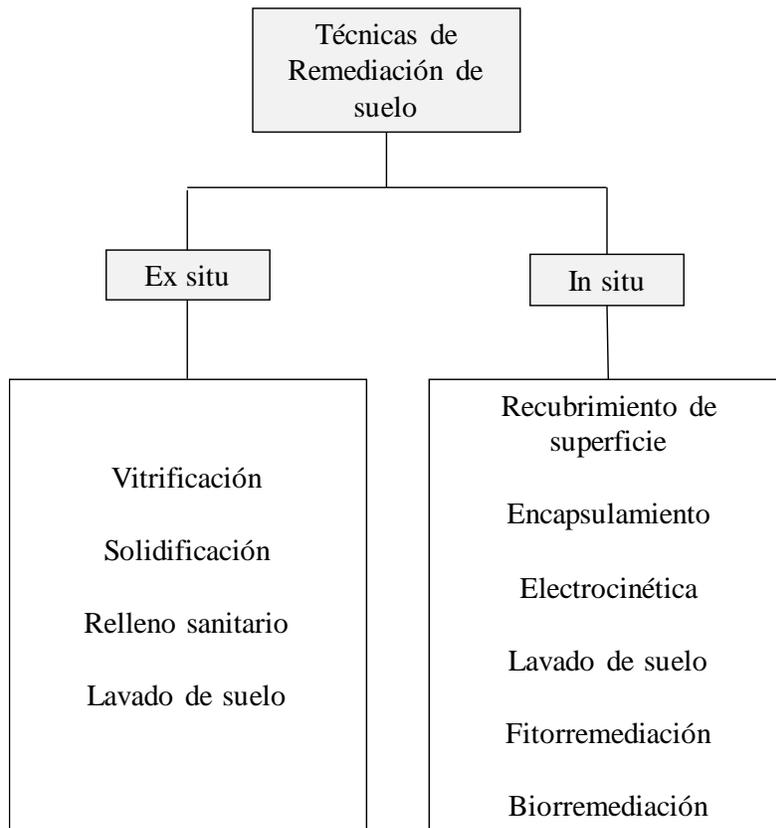


Figura 1. Técnicas comunes de contención y remediación para suelos contaminados con metales pesados.

Estas técnicas se pueden clasificar de acuerdo con el mecanismo de acción que emplea, entre los que se encuentran los métodos físicos, químicos, térmicos, eléctricos y biológicos [7]. Sin embargo, cada una de estas técnicas presenta ventajas y desventajas, las cuales están relacionadas con la complejidad, los costos y los riesgos medioambientales [6] (Tabla 1).

Tabla 1. Ventajas y desventajas de las técnicas de remediación de suelos.

Técnica de remediación	Ventajas	Desventajas
Térmica	Puede eliminar desechos radioactivos.	Técnica destructiva.
	Aplicable tanto in situ como ex situ.	Tecnología costosa (Entre \$330 y \$425 dólares m ³).
Química	Bajo costo para el lavado de suelo (Entre \$20 y \$104 dólares el m ³).	Aplicable solo a suelos permeables.
	Alta eficiencia (>75 % de remoción).	Alto costo para la inmovilización química (< \$1500 dólares m ³)
Física	Remediación de suelos altamente contaminados ($I_{geo} > 3$).	Corrige áreas pequeñas (< 2000 m ²).
	Económico (entre \$20 y \$90 dólares el m ²).	Perdida del suelo para cultivo.
Biológica	Mayor aceptación pública.	Largos períodos para remediar (> 10 años).
	Tecnología sencilla de emplear.	Su eficiencia estará en función de diferentes factores (pH del suelo, clima, nutrientes, etc.)
Eléctrica	Es aplicable tanto a suelos saturados como no saturados de agua.	Tecnología solo a escala piloto.
	Costo promedio de \$117 dólares el m ³).	Eficiencia condicionada al tipo de suelo, pH y contaminantes presentes.

Tabla diseñada con base en información de [6,7,19]

El conjunto de técnicas descritas en la Tabla 1 indica las amplias posibilidades tecnológicas que existen para remover o degradar contaminantes en suelo. Por ejemplo, solo la remediación biológica incluye tecnologías como la bioaumentación (consiste en inocular cepas microbianas al medio contaminado –suelo o agua-), bioestimulación (implica adicionar sustratos o fertilizantes) y fitorremediación (consiste en el uso de plantas que remueven, degradan o acumulan contaminantes), entre otras.

2.2.1-Fitorremediación

La fitorremediación surge como una alternativa a los métodos convencionales de remediación y está basada en la utilización de plantas para la remediación de suelo o agua contaminados, logrando así que puedan reutilizarse nuevamente para cultivo u otros usos [9]. En general, la fitorremediación es adecuada para tratar grandes áreas contaminadas [7], debido a que las plantas acumuladoras de metales pesados pueden tolerar contaminantes, además de poder degradar e inmovilizar contaminantes.

La absorción de metales pesados en la fitorremediación implica diferentes procesos como (Figura 2): fitoextracción, fitoestabilización, fitovolatilización, fitodegradación y fitofiltración [20].

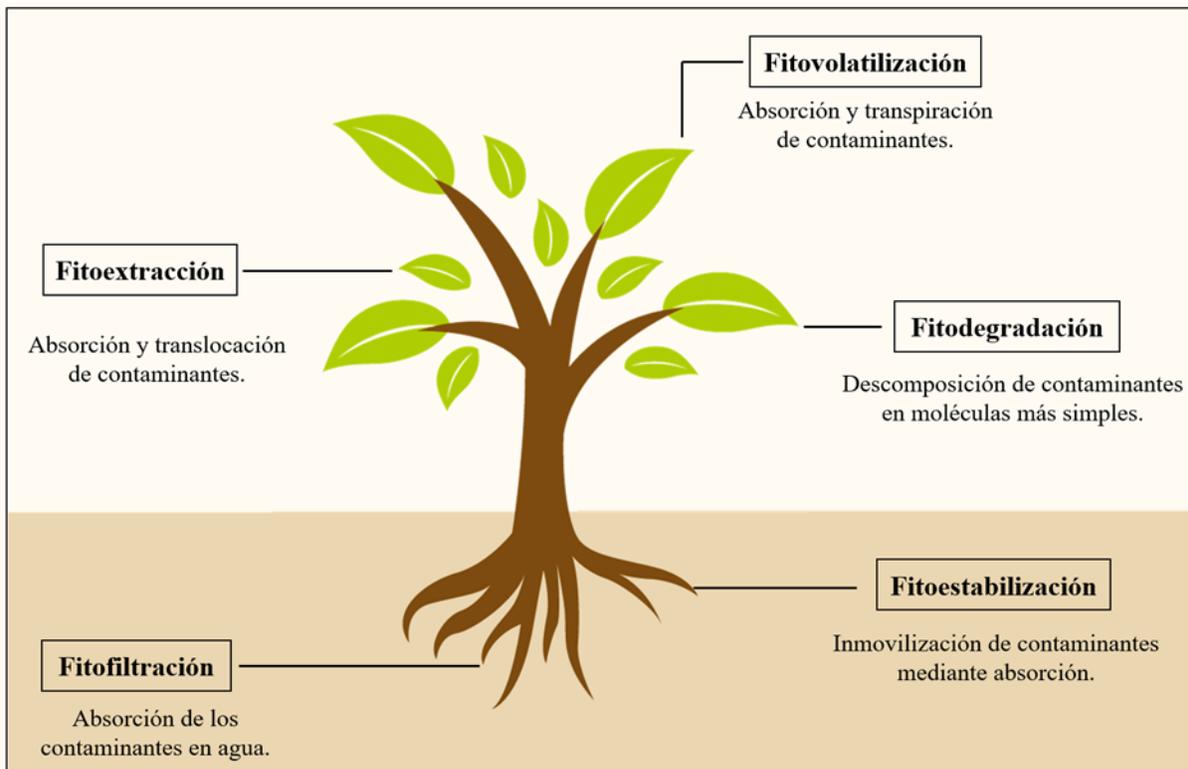


Figura 2. Procesos de fitorremediación para la contención o eliminación de contaminantes [21].

Procesos de fitorremediación:

Fitoextracción

La fitoextracción se basa en la absorción de contaminantes en la raíz para después translocarlos hacia la parte aérea de la planta, logrando así la descontaminación al realizar la cosecha. Para lograr que ocurra este proceso las plantas seleccionadas para la fitoextracción deben ser de rápido crecimiento y tolerantes a condiciones de estrés provocadas por los metales pesados; además, deben ser plantas hiperacumuladoras con el objetivo de poder acumular simultáneamente diversos contaminantes y en mayor cantidad [20].

Fitoestabilización

El proceso de fitoestabilización consiste en utilizar plantas que tengan la capacidad de inmovilizar metales pesados mediante la absorción de los contaminantes en la raíz. Una vez que los contaminantes son absorbidos se reduce la biodisponibilidad evitando que migren a suelos circundantes o aguas subterráneas [20].

Fitovolatilización

Este proceso sirve para eliminar contaminantes orgánicos y algunos metales pesados como el As y el Hg. El mecanismo que emplea es la transformación de los contaminantes en compuestos menos tóxicos y volátiles capaces de llegar a la atmósfera por el proceso de transpiración de la planta [21].

Fitodegradación

La fitodegradación es el mecanismo por el cual las plantas pueden metabolizar los contaminantes dentro de sus tejidos, convirtiéndolos en compuestos menos tóxicos y evitando que estos puedan moverse en el suelo [21].

Fitofiltración

Este método de degradación utiliza las raíces de las plantas (acuáticas y terrestres) como medio para absorber contaminantes presentes en aguas residuales o suelos saturados. Principalmente es utilizado para remover el exceso de nutrientes como el nitrógeno y fósforo [21].

2.2.2-Plantas utilizadas para los procesos de fitorremediación

Para que una planta sea considerada fitorremediadora debe presentar diversas características como la alta tolerancia y capacidad de absorción de metales pesados, ser de rápido crecimiento, presentar abundante biomasa aérea, etc. Existen más de 500 especies diferentes de plantas que tienen la capacidad de remediar, entre las cuales destacan las familias de plantas *Asteraceae*, *Brassicaceae* y *Phyllanthaceae*, debido a su capacidad de acumular metales pesados [22]. Cada planta presenta un proceso de remediación diferente dependiendo del tipo de contaminante que esté presente en el suelo (Tabla 2).

Se ha demostrado que utilizar plantas nativas para los procesos de fitorremediación resulta conveniente, debido a que las especies nativas están adaptadas a las condiciones climáticas del área a remediar, lo que contribuye al óptimo desarrollo de la planta para los procesos de remediación.

Tabla 2. Ejemplos de plantas utilizadas para remediar y los mecanismos que utilizan

Planta	Contaminante	Mecanismo de remediación	Referencia
<i>Lolium perenne</i> L.	Pb	Fitoextracción	[23]
<i>Zea mays</i> L.	Pb, Ti	Fitoextracción	[24]
<i>Helianthus annuus</i> L.	Cu, Zn, Pb, Hg.	Fitoestabilización	[25]
<i>Senna multijuga</i> (Rich.) H.S.Irwin & Barneby	Cu	Fitoestabilización	[26]
<i>Arundo donax</i> L.	As	Fitovolatilización	[27]
<i>Pteris vittata</i> L.	As	Fitovolatilización	[28]
<i>Brassica napus</i> L.	2,4-diclorofenol	Fitofiltración	[29]
<i>Callitriche lusitanica</i> Schotsman	As	Fitofiltración	[30]

2.2.3-El girasol (*Helianthus annuus* L.) como planta hiperacumuladora

El género *Helianthus* consta de 52 especies nativas de América del norte [31, 32]. El girasol (*Helianthus annuus* L.) es una planta que pertenece a la familia *Asteraceae* la cual se desarrolla en climas templados [33]. El cultivo del girasol se desarrolla principalmente durante la primavera y verano, debido a la tolerancia que presenta a la sequía y a las altas temperaturas. Además, esta planta tiene la capacidad de absorber y acumular diversos metales pesados como el As, Pb, Cd, etc., en concentraciones que pueden ser 1000 veces mayores a las plantas convencionales, sin presentar alteraciones en su crecimiento y desarrollo. Es por ello que, el girasol es conocido como una planta hiperacumuladora con el potencial para remediar sitios contaminados. Sin embargo, para que el cultivo del girasol sea óptimo debe contar con micro y macronutrientes esenciales (C, O, H, N, P, K, Ca, Mg, S, Fe, Mn, Zn, Cu, B, Mo y Cl) para su correcto desarrollo.

Se ha demostrado que el girasol presenta una alta capacidad de acumulación de As en los brotes (1550 mg kg^{-1}), además *H. annuus* acumula simultáneamente diversos metales pesados como el Cr y Ni [34, 35]. Un estudio realizado por Alaboudi et al., [36] en el cual utilizan girasol para remediar un suelo contaminado con Pb y Cd (solución madre con concentración de 200 mg kg^{-1}), se demostró que la planta presentó una concentración máxima en los brotes de 40.1 mg kg^{-1} de Pb y 65.7 mg kg^{-1} de Cd y en las raíces presentó una acumulación de 107.7 y 71.3 mg kg^{-1} , respectivamente. Se concluyó que la planta tiene la capacidad de remediar el suelo contaminado con ambos metales.

2.3-Nanorremediación

La nanorremediación es una técnica innovadora la cual se basa en las propiedades específicas que presentan los nanomateriales (tamaño nanométrico, reutilizables, alta reactividad, fácilmente dispersables, etc.) para eliminar contaminantes [37, 38]. La degradación de metales pesados varía dependiendo del tipo de nanomaterial que se utilice, debido a que la absorción de contaminantes se puede dar de diferentes formas (fisisorción y quimiosorción) [39].

Esta técnica, en comparación con los métodos convencionales de remediación tiene el potencial de reducir los costos de operación y el tiempo de limpieza [40], por lo tanto, esta tecnología representa una opción viable para remediar sitios contaminados.

2.4-Nanobiorremediación

Se ha demostrado que aplicar dos o más técnicas de remediación incrementa la efectividad de remoción de contaminantes [9]. El uso de las nanotecnologías reduce los tiempos de fitorremediación, debido a que los nanomateriales logran hacer biodisponibles a los metales pesados, mejorando el proceso de fitoextracción [41]. Además, los nanomateriales benefician a las plantas estimulando la germinación, promoviendo el crecimiento y ayudan a reducir la fitotoxicidad provocada por los contaminantes, lo que genera que las plantas sean más resistentes a condiciones de estrés [4, 42].

Las NPs de TiO_2 en pequeñas concentraciones ($\geq 300 \text{ mg kg}^{-1}$) pueden lograr que se reduzcan los efectos tóxicos de metales como el cadmio y el hierro. Además, se ha demostrado que las NPs de TiO_2 tienen la capacidad de influir positivamente en los procesos de fotosintéticos, aumentando la biomasa y el contenido de clorofila en las plantas [43].

Un estudio de fitorremediación de un suelo contaminado con cadmio (50, 100 y 150 mg kg^{-1}) [44], utilizando soya (*Glycine max* L.) y NPs de TiO_2 en diversas concentraciones (100, 200 y 300 mg kg^{-1}) demostró que las NPs en una concentración de 300 mg kg^{-1} lograron obtener la máxima acumulación del cadmio en las raíces ($1534.7 \mu\text{g g}^{-1}$), en comparación con el tratamiento que no contenía NPs ($131.9 \mu\text{g g}^{-1}$). Además, se obtuvieron los valores más altos de biomasa fresca y clorofila en el tratamiento de 300 mg kg^{-1} . Asimismo, un estudio realizado por Zhara (2019) [45], demostró que el utilizar una dosis de NPs de TiO_2 ($\geq 100 \text{ mg kg}^{-1}$) aumentó la longitud de las raíces y brotes en un 15.9% y 3.8%, respectivamente. Además, las NPs de TiO_2 contribuyeron al aumento de la actividad microbiana en la rizosfera mejorando así la absorción del fósforo en los brotes.

III-Justificación

La contaminación del suelo por metales pesados se ha incrementado a lo largo de los años y actualmente se estima que a nivel mundial existen más de 20 millones de hectáreas contaminadas. Específicamente en el municipio de San Juan de Sabinas, Coahuila de Zaragoza, se encuentran empresas dedicadas a la extracción y procesamiento de carbón mineral lo que representa un riesgo potencial para la salud humana y el medioambiente, debido a la toxicidad de los residuos generados. Las técnicas de remediación fisicoquímica del suelo suelen ser costosas, además de presentar un mayor impacto ambiental. Bajo el contexto anterior, la fitorremediación asistida con nanopartículas representa una alternativa viable a los métodos convencionales, logrando reducir los costos y el tiempo de remediación, en comparación con los métodos tradicionales.

IV-Objetivos

4.1-Objetivo general

Evaluar la capacidad del girasol (*Helianthus annuus* L.) en combinación con NPs de TiO₂ para la remediación de un suelo contaminado con desechos mineros ubicado en San Juan de Sabinas, Coahuila de Zaragoza, a nivel invernadero, para proponer estrategias de fitorremediación que permitan recuperar los sitios degradados.

4.2-Objetivos particulares

-Determinar la concentración de metales pesados en los jales mediante la caracterización fisicoquímica de los residuos de la región de San Juan de Sabinas, Coahuila de Zaragoza, con base en la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004 [46], para determinar estrategias de remediación.

-Evaluar la eficiencia de remoción de contaminantes por la planta de girasol al utilizar una combinación de nanopartículas y fitorremediación bajo condiciones de invernadero.

-Monitorear el efecto de las nanopartículas en las plantas y la remoción de contaminantes, con la finalidad de establecer una dosis óptima de nanopartículas, para remover contaminantes sin afectar las propiedades fisicoquímicas del suelo.

V-Metodología científica

En la siguiente investigación se realizaron muestreos en campo y análisis en laboratorio e invernadero. Las actividades de campo se llevaron a cabo en una presa de jales ubicada en el municipio de San Juan de Sabinas; Los análisis se desarrollaron en el laboratorio de Interacciones Ambiente Planta ubicado en las instalaciones del Cinvestav Unidad Saltillo.

5.1- Semillas de girasol (*Helianthus annuus* L.)

Las semillas de girasol (*H. annuus* L.) se obtuvieron en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, las cuales fueron almacenadas en bolsas de plástico y papel a 4 °C hasta su uso en invernadero.

5.2-Nanopartículas

Para esta investigación se utilizaron nanopartículas de dióxido de titanio (TiO₂), las cuales se adquirieron en “Investigación y Desarrollo de Nanomateriales SA de CV” (ID-nano), ubicado en San Luis Potosí, México.

5.3-Área de estudio

El presente estudio se llevó a cabo en la región norte del estado de Coahuila de Zaragoza, en un suelo tipo Xerosol cálcico [47] adyacente a una presa de jales fuera de operación (Figura 3). Esta se encuentra en un área de almacenamiento de residuos en una planta de beneficio de carbón; localizada en el ejido Santa María, San Juan de Sabinas. La zona se caracteriza por tener un clima semi desértico (temperatura máxima normal 28.5 °C), con lluvias escasas de 400 mm al año que predominan en los meses de mayo, agosto y septiembre [48].



Figura 3. Imagen satelital del área de estudio localizada en una planta de beneficio de carbón ubicada en el municipio de San Juan de Sabinas, Coahuila de Zaragoza.

5.4-Estrategia de muestreo

El muestreo se realizó el día 14 de octubre del 2021 de manera aleatoria y se registró la ubicación geográfica en el área de estudio, con base en un sistema de coordenadas utilizando los procedimientos propuestos por Petersen y Calvin [49]; además, se tomó en consideración la estabilidad y la accesibilidad del terreno para la toma de muestras. Se recolectaron 60 kg de jales a una profundidad de 15 a 20 cm en tres ubicaciones diferentes (Tabla 3). Las muestras se colocaron en bolsas de plástico, se trasladaron al Cinvestav Saltillo y se secaron dentro del invernadero. En la Figura 4 se muestra la localización geográfica de los puntos de muestreo.

Tabla 3. Localización geográfica de los puntos de muestreo.

Punto de muestreo	Coordenada	
P1	27°58'3.67"N	101°19'54.22"O
P2	27°58'3.35"N	101°19'55.35"O
P3	27°58'2.55"N	101°19'54.14"O



Figura 4. Distribución de los puntos de muestreo.

5.5-Acondicionamiento y análisis fisicoquímico

Para el cultivo de girasol se utilizó suelo agrícola colectado en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro para estudios previos, por colegas del grupo de trabajo [50]. Lo anterior debido a que los jales tienen concentraciones de nutrientes por debajo de las recomendadas para este cultivo [51].

Las muestras de jales para el análisis fisicoquímico fueron llevadas al invernadero, en donde se dejaron secar al aire por una semana. Posteriormente, las muestras de jale se homogenizaron y se tamizaron utilizando una malla de 2 mm para obtener un material homogéneo. Para el aislamiento

de los microorganismos se almacenaron 5 kg de muestra a 4 °C. Las determinaciones se realizaron por triplicado para el suelo agrícola y para los jales.

5.5.1- Determinación del pH y conductividad eléctrica de suelo y jales

Las determinaciones del pH de suelo y jales se realizaron por triplicado en una relación 1:2 (material-agua) empleando el método de potenciometría utilizando un electrodo de vidrio Thermo Fisher modelo Orion Star A211. Se pesaron 10 g de material el cual se encontraba seco y tamizado por una malla Tayler de 2 mm. Posteriormente se agregaron 20 mL de agua destilada y la mezcla se colocó en un agitador orbital durante 30 minutos. Finalmente se dejó reposar 15 minutos y se realizó la lectura con el potenciómetro previamente calibrado con soluciones estándar de pH (4.00, 7.00 y 10.00) [52].

La conductividad eléctrica se midió por triplicado siguiendo el procedimiento propuesto por Rhoades [53] utilizando el residuo de la medición del pH el cual se colocó sobre papel filtro dentro de un embudo Büchner previamente montado en un matraz kitazato de 500 mL conectado a una bomba de vacío. Una vez que se obtuvo el extracto, se colocó en un vaso de precipitado y posteriormente se procedió a tomar la lectura utilizando un conductímetro marca Thermo Fisher modelo Orion Star A222.

5.5.2- Contenido de materia orgánica

El contenido de materia orgánica (MO) se determinó utilizando el método de pérdida por ignición, el cual consiste en la combustión de las muestras de suelo previamente tamizadas y secadas a 120 °C durante 24 horas [54]. Se colocaron las muestras de 5 g en crisoles de porcelana los cuales se pesaron previamente y fueron llevados a la mufla durante 4 horas a una temperatura de 400 °C. Posteriormente se colocaron las muestras en un desecador hasta dejar enfriar y se pesaron las muestras calcinadas. Para el cálculo del porcentaje de materia orgánica se utilizó la Ecuación 1.

$$\% \text{ MO} = \frac{P_1 - P_2}{P_1} \times 100 \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde:

% MO = porcentaje de materia orgánica

P1= peso inicial de la muestra

P2= peso final de la muestra

5.5.3- Determinación de la textura

La textura de la fracción fina del suelo se midió con el método de Bouyoucos, utilizando 50 g de suelo con 10 mL de hexametáfosfato de sodio [55], los cuales fueron agitados en el vaso del agitador mecánico durante 10 minutos y posteriormente se pasó la suspensión a una probeta de 1000 mL, la cual se aforó con agua destilada. La probeta se agitó durante 1 minuto y se dejó reposar 40 segundos para tomar la primera lectura con el hidrómetro y se midió la temperatura. Se dejó reposar por 2 horas y se tomó la segunda lectura y la temperatura. Una vez que se obtuvieron los valores se utilizaron las Ecuaciones 2, 3 y 4 para determinar la clase textural del suelo.

$$\% \text{ Limos} + \% \text{ Arcilla} = \frac{\text{Primera lectura}}{\text{g de suelo}} \times 100 \quad (\text{Ecuación 2})$$

$$\% \text{ Arenas} = 100 - (\% \text{ de limos} + \% \text{ de arcillas}) \quad (\text{Ecuación 3})$$

$$\% \text{ Arcilla} = \frac{\text{Segunda lectura}}{\text{g de suelo}} \times 100 \quad (\text{Ecuación 4})$$

5.5.4- Determinación de la densidad aparente

La determinación de la densidad aparente se realizó utilizando un matraz volumétrico de 50 mL el cual se pesó asegurándose de que estuviera limpio y seco. Una vez obtenida la medición, el matraz se llenó con suelo previamente secado y tamizado. El suelo se compactó dando ligeros golpes hasta llegar al ras; posteriormente se registró el peso del matraz con el suelo. A continuación, se retiró la

muestra del matraz y se limpió, para después llenarlo con agua y se registró nuevamente el peso, además se registró la temperatura del agua. La prueba se realizó por triplicado y se empleó la Ecuación 5 [56].

$$\rho_a = \frac{p_2 - p_1}{p_3 - p_1} \times \rho_{agua} \quad (\text{Ecuación 5})$$

Donde:

ρ_a = Densidad aparente

P_1 = Peso del matraz

P_2 = Peso del matraz con suelo

P_3 = Peso del matraz con agua

ρ_{agua} = Densidad del agua a la temperatura registrada en el procedimiento

5.5.5- Determinación de carbono y nitrógeno

El carbono y nitrógeno total se midieron en el laboratorio de análisis químico del Cinvestav Saltillo mediante el método de Dumas, el cual consiste en la quema de la muestra a alta temperatura en una atmósfera de oxígeno puro [57]. Se prepararon 8 muestras tamizando 6 g por muestra a 0.149 mm (malla #100) y se colocaron en bolsas etiquetadas. Para el análisis de las muestras se utilizó un analizador elemental marca Thermo Scientific modelo FlashSmart.

5.5.6- Determinación de nutrientes

Los nutrientes como el calcio, potasio, magnesio y fósforo se determinaron mediante Espectrometría de Absorción (AA) y /o Emisión Atómica por plasma (ICP) por lo cual, se prepararon 8 muestras de 5 g tamizadas a malla #100. El análisis se realizó en un equipo de absorción atómica marca Thermo Scientific modelo ICE 3300 y/o un espectrómetro de emisión por plasma marca PERKIN ELMER modelo OPTIMA 8300.

La cuantificación inicial de los metales pesados en jales y suelo se realizó con base en el procedimiento indicado en la sección “5.9 Determinación de metales pesados en jales, suelo y plantas”.

5.6-Análisis de la viabilidad de las semillas

Se evaluó el porcentaje de germinación siguiendo los protocolos de las Reglas Internacionales para el Análisis de las Semillas [58]. Se tomaron 30 semillas las cuales se sumergieron en etanol al 70% con agitación constante por tres minutos, una vez transcurrido el tiempo se enjuagaron con agua destilada estéril; después se colocaron en una solución de hipoclorito de sodio al 2.5 % durante tres minutos y se enjuagaron cinco veces con agua destilada estéril. Las semillas se colocaron sobre papel filtro humedecido en dos cajas Petri de cristal y se sellaron con papel parafilm, posteriormente las cajas Petri se colocaron en una incubadora marca VICHI modelo INO 650M la cual se programó a 28 °C durante 7 días. Una vez transcurrido el tiempo, se clasificaron las semillas (Tabla 4) y se utilizó la Ecuación 6 para obtener el porcentaje de germinación.

$$\% \text{ de Germinación} = \frac{\text{Número de semillas normales}}{\text{Número de semillas totales}} \times 100 \quad (\text{Ecuación 6})$$

Tabla 4. Clasificación de semillas

Tipo de plántulas	Características
Plántulas normales	<ul style="list-style-type: none"> • Intactas: plántulas con estructuras esenciales bien desarrolladas y sanas. • Con leves defectos: plántulas con ligeros defectos en sus estructuras esenciales, pero sanas. • Con infección secundaria: plántulas afectadas por hongos o bacterias que no proceden de las semillas de origen.
Plántulas anormales	<ul style="list-style-type: none"> • Dañadas: plántulas a las que falta cualquiera de las estructuras esenciales. • Deformadas o desequilibradas: plántulas con un desarrollo débil o con alteraciones fisiológicas. • Descompuestas: plántulas con estructuras esenciales deterioradas que el desarrollo normal no es posible.
Semillas sin germinar	<ul style="list-style-type: none"> • Duras: semillas que quedan duras al final del período de análisis, debido a que no absorbieron agua. • Frescas: semillas que no han podido germinar en las condiciones de la prueba de germinación, pero que permanecen limpias y firmes y se pueden convertir en una plántula normal. • Muertas: semillas que no han producido parte alguna de una plántula al final del período de prueba.

Información recolectada de los protocolos de las Reglas Internacionales para el Análisis de las Semillas [58].

5.7- Aislamiento de cepas microbianas

Se realizó un análisis de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) presentes en el suelo y en los jales. Para el aislamiento de los microorganismos se preparó un medio de cultivo, para ello, se agregaron 6.9 g de Agar nutritivo (contiene 1.5 g de peptona, 0.9 g de extracto de carne y 4.5 g de agar) en 300 mL de agua destilada. Posteriormente, el medio de cultivo se esterilizó en autoclave a 121 °C, durante 15 minutos. Después, se utilizó una campana de extracción para realizar las diluciones. Se pesó 1 g de muestra (suelo o jales) y se diluyó en nueve mililitros de agua destilada previamente estéril, se agitó durante 30 segundos y se dejó reposar durante un minuto para que los sólidos precipitaran. A partir de esa disolución inicial, se realizaron seis disoluciones más (1×10^{-1} , 1×10^{-2} , 1×10^{-3} , 1×10^{-4} , 1×10^{-5} y 1×10^{-6}) en agua destilada estéril [59, 60, 61].

De todas las diluciones anteriores solo se seleccionaron las disoluciones cuatro, cinco y seis (1×10^{-4} , 1×10^{-5} y 1×10^{-6}) para la siembra en las cajas Petri, en donde se vertió 30 mL de medio de cultivo estéril y 0.30 mL de la disolución, en seguida se agitaron y sellaron con papel parafilm. Se incubaron a 27 °C durante 7 días para evaluar su crecimiento utilizando la regla de “25 a 250” [62].

Una vez realizado el aislamiento se seleccionaron las cepas que presentaron características morfológicas diferentes entre sí (color, brillo, forma, borde y elevación) y posteriormente se realizó de nuevo el aislamiento de las cepas utilizando agar nutritivo adicionando sales de Pb y As para evaluar su crecimiento con concentración de 400 mg kg⁻¹ y 22 mg kg⁻¹, respectivamente. Lo anterior se realizó con el objetivo de seleccionar las cepas que pudieran sobrevivir a las condiciones de contaminación (Figura 5).

Después de realizar el aislamiento de las cepas se seleccionaron las que presentaron diferencias morfológicas y se enviaron al Instituto Tecnológico de Durango para la extracción del ADN e identificación a nivel de género y especie. Así mismo, se utilizó el método propuesto por Mc Farland [63] para la estimación cuantitativa del contenido de microorganismos en una solución madre utilizando el espectrofotómetro a una densidad óptica de 600 nm.

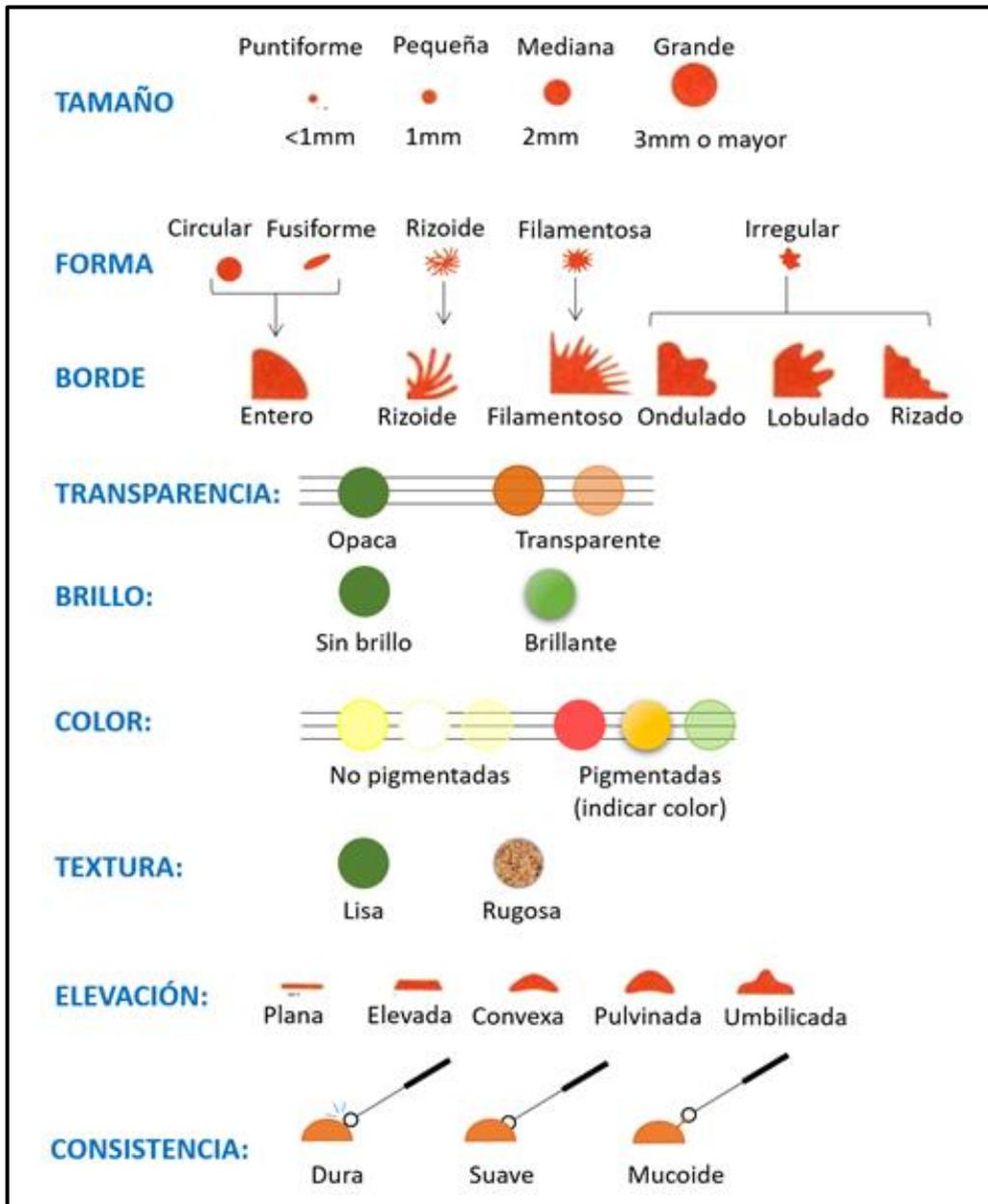


Figura 5. Características morfológicas de las colonias que se consideraron para realizar la caracterización correspondiente.

5.8- Nanopartículas

La composición de las nanopartículas se determinó con análisis de difracción de rayos X (DRX), mediante el método de polvos, con un barrido desde 10 a 80 grados con respecto a 2θ para identificar las fases cristalinas, utilizando un difractómetro Empyrean Panalytica. Para la medición

de la morfología se empleó microscopía electrónica de barrido (MEB) con un microscopio marca JEOL (modelo JSM-7800F PRIME).

5.9-Determinación de metales pesados en jales, suelo y plantas

Se determinó la concentración total de Pb, As, y V mediante espectrometría de absorción atómica utilizando el método 7000B establecido por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos [64], en donde se secaron las muestras a temperatura ambiente por cinco días y se tamizaron en malla #100 para obtener un tamaño de partícula homogéneo; posteriormente las muestras fueron etiquetadas en bolsas con 5 g para ser analizadas en el laboratorio de análisis químico.

5.10-Tratamientos preliminares

Con la finalidad de obtener un óptimo crecimiento en las plantas se realizó un ensayo preliminar utilizando mezclas de suelo agrícola y jales. Se montaron en el invernadero 4 tratamientos distintos por triplicado (Tabla 5) en macetas de cuatro pulgadas. Se homogenizó el suelo y los jales y se colocaron en las macetas, se agregaron 3 semillas de girasol en cada maceta a una profundidad de 1.5 cm y se regó cada tercer día durante 15 días.

Tabla 5. Tratamiento preliminar de mezclas de suelo y jales para el crecimiento de la planta.

Tratamiento	Descripción
M1	100% jales (300 g)
M2	75 % jales (225 g) + 25% (75 g) suelo agrícola
M3	50% jales (150 g) + 50% suelo agrícola (150 g)
M4	25% jales (75 g) + 75% (225 g) suelo agrícola

Una vez establecida la mezcla adecuada de suelo y jales se realizó la cuantificación de la remoción de metales pesado. Para el estudio completo se diseñaron 20 tratamientos diferentes (Tabla 6), los cuales se montaron por triplicado, teniendo un total de 60 unidades experimentales las cuales se evaluaron en un diseño completamente aleatorizado.

Tabla 6. Tratamientos para la remediación de suelos utilizando plantas de girasol, nanopartículas en diferentes dosis (NPs) y cepas microbianas (BIO).

Tratamiento	Descripción
T1	Jales (25% jales + 75% suelo) + Planta + NPs (50 mg kg ⁻¹) + BIO.
T2	Jales (25% jales + 75% suelo) + Planta + NPs (100 mg kg ⁻¹) + BIO.
T3	Jales (25% jales + 75% suelo) + Planta + NPs (150 mg kg ⁻¹) + BIO.
T4	Jales (25% jales + 75% suelo) + Planta + NPs (50 mg kg ⁻¹).
T5	Jales (25% jales + 75% suelo) + Planta + NPs (100 mg kg ⁻¹).
T6	Jales (25% jales + 75% suelo) + Planta + NPs (150 mg kg ⁻¹).
T7	Jales (25% jales + 75% suelo) + Planta + BIO.
T8	Jales (25% jales + 75% suelo) + BIO.
T9	Jales (25% jales + 75% suelo) + NPs (100 mg kg ⁻¹)
T10	Suelo (100%) + Planta + NPs (50 mg kg ⁻¹) + BIO.
T11	Suelo (100%) + Planta + NPs (100 mg kg ⁻¹) + BIO.
T12	Suelo (100%) + Planta + NPs (150 mg kg ⁻¹) + BIO.
T13	Suelo (100%) + Planta + NPs (50 mg kg ⁻¹).
T14	Suelo (100%) + Planta + NPs (100 mg kg ⁻¹).
T15	Suelo (100%) + Planta + NPs (150 mg kg ⁻¹).
T16	Suelo (100%) + Planta + BIO.
T17	Control Jales (25% jales + 75% suelo + Planta).
T18	Control Suelo (Suelo 100% + Planta).
T19	Suelo (100%) + BIO.
T20	Suelo (100%) + NPs (100 mg kg ⁻¹).

5.11-Montaje experimental en invernadero

El experimento se realizó en el invernadero del Cinvestav Saltillo, con base en lo que se indica en las subsecciones siguientes.

5.11.1-Unidades experimentales

Se utilizaron macetas de 5 pulgadas de diámetro con 3 kg de suelo, jales o sus mezclas de suelo y jales, con base en lo que se indica en la Tabla 6. A cada maceta se le adicionaron concentraciones de los contaminantes (22 mg kg^{-1} de As y 400 mg kg^{-1} de Pb) y se dejó reposar por 3 días con el suelo saturado con agua. Una vez que transcurrieron los tres días, se agregaron los estímulos (tratamientos) con base en lo indicado en la Tabla 6. En aquellos tratamientos en los que se consideró la adición de NPs, estas se mezclaron cuidadosamente con el suelo para favorecer que se distribuyan uniformemente. Posteriormente, se colocaron tres semillas de girasol previamente desinfectadas en cada unidad experimental, a una profundidad de 1.5 a 2 cm. Donde se requirió (con base en lo indicado en la Tabla 6), las cepas microbianas se adicionaron en una suspensión de 5 mL con al menos 1×10^6 unidades formadoras de colonias.

5.11.2-Manejo del cultivo

Las macetas se mantuvieron en el invernadero bajo la luz solar natural (10-12 horas). El riego se realizó una vez al día y se aplicaron 150 mL de solución nutritiva semanalmente, a partir del día 26 después de la siembra, para reducir los efectos de deficiencia nutricional. A los 60 días se suspendió el manejo del cultivo y se procedió al muestreo de suelo, jales y plantas.

5.11.2.1-Solución nutritiva

Cincuenta litros de solución nutritiva se prepararon utilizando los reactivos descritos en la Tabla 7. A esta se le agregaron 10 mL de solución stock (Tabla 8). La solución nutritiva se empleó para evitar la deficiencia nutricional del cultivo. Para preparar la solución nutritiva se emplearon reactivos grado analítico.

Tabla 7. Reactivos utilizados para la preparación de la solución nutritiva

Reactivo	Cantidad
Ca (NO ₃) • 4H ₂ O	2.30 g
MgSO ₄ • 7H ₂ O	16.36 g
CaSO ₄ • 2H ₂ O	14.25 g
K ₂ SO ₄	18.00 g
NaFeEDTA	0.65 g
Ca(H ₂ PO ₄) ₂ • 2H ₂ O	3.18 g
Solución stock [€]	10 mL
Agua destilada	50 L

[€] Los reactivos necesarios para la preparación se indican en la Tabla 8.

La solución stock se preparó de acuerdo con lo indicado en la Tabla 8. Todos los reactivos fueron grado analítico.

Tabla 8. Reactivos necesarios para la preparación de la solución stock

Reactivo	Cantidad
KCl	27.9 g
H ₃ BO ₃	25.0 g
MnSO ₄ • H ₂ O	12.5 g
ZnSO ₄ • 7H ₂ O	2.7 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ • 4H ₂ O	5.5 g
CuSO ₄ • 5H ₂ O	2.5 g
H ₂ SO ₄	10.8 mL
Agua destilada	2 L

5.11.3- Muestreo destructivo y caracterización del crecimiento de planta

Después de un periodo de 60 días las plantas se cosecharon para separar los brotes y raíces, posteriormente estos se lavaron con agua desionizada para eliminar las partículas de suelo restantes y se tomaron medidas de la longitud de la raíz y del tallo. La biomasa húmeda se midió con una balanza analítica, separando las raíces de tallo y hojas.

5.11.4- Determinación del contenido de clorofila

Para la determinación del contenido de clorofila se molieron 0.5 g de tejido de hojas en un mortero de ágata y se agregaron 5 mL de acetona al 80%. Una vez que se obtuvo el extracto se colocaron las muestras en tubos los cuales fueron llevados a centrifugar a 2000 rpm durante 10 minutos, con el objetivo de separar el sobrenadante que contienen los pigmentos. Después se tomaron 0.5 mL de sobrenadante y se aforó con 5 mL de acetona. Una vez que se obtuvo el extracto se realizó un análisis con espectrofotometría UV a 645 nm y 663 nm [65] y se calculó el contenido de clorofila con las ecuaciones propuestas por Arnon [66] (Ecuaciones 7, 8 y 9).

$$\text{Clorofila A} = (12.7 \times \text{Abs } 663) - (2.69 \times \text{Abs } 645) \quad (\text{Ecuación } 7)$$

$$\text{Clorofila B} = (22.9 \times \text{Abs } 645) - (4.68 \times \text{Abs } 663) \quad (\text{Ecuación } 8)$$

$$\text{Clorofila Total} = (20.2 \times \text{Abs } 645) + (8.02 \times \text{Abs } 663) \quad (\text{Ecuación } 9)$$

5.11.5- Determinaciones con biomasa húmeda

Para el análisis de Microscopia Electrónica de Barrido se tomaron muestras de raíz y tallo las cuales se obtuvieron realizando cortes con bisturí. Una vez que se obtuvieron los cortes se colocaron en tubos Eppendorf con solución Trump's para conservar las muestras. La solución Trump's se realizó añadiendo 4 mL de glutaraldehído al 25%, 10 mL de formaldehído al 37%, 1 g de fosfato de sodio monobásico anhidro y 0.27 g de hidróxido de sodio, aforándolo a 100 mL con agua destilada.

Transcurrido 24 horas después de añadir la solución Trump's a las muestras, se llevó a cabo la deshidratación mediante una serie graduada de etanol a diferentes concentraciones durante 30 minutos cada una (0 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90% y dos veces en 100 % v/v). Una vez deshidratada la muestra se utilizaron porta muestras de acero en donde los tejidos se fijaron con cinta de carbón.

5.11.6- Determinaciones con biomasa en seco

Para la obtención de la biomasa seca, las plantas se secaron en un horno de aire forzado Thermo Scientific a 70 °C durante 48 horas y posteriormente se pesaron. Para la determinación del contenido elemental, se tomaron las muestras secas y se separó la parte aérea de la raíz. Las muestras se molieron utilizando un mortero de porcelana y posteriormente se sometieron a un proceso de digestión ácida por vía húmeda utilizando H₂SO₄, HCl y H₂O₂ [67]. La determinación de los metales pesados (As y Pb) y titanio se realizó mediante espectrometría de emisión de plasma de acoplamiento inductivo, utilizando un espectrómetro ICP-OES, Perkin Elmer modelo Optima 8300.

5.12- Caracterización fisicoquímica final

Las muestras de suelo se dejaron secar a temperatura ambiente y se tamizaron con una malla de 2 mm. Se determinó el contenido de materia orgánica, la conductividad eléctrica y el pH, utilizando la metodología descrita anteriormente. Además, se determinó el contenido de nutrientes mediante ICP-OES.

Con base en las concentraciones de metales pesados, se determinó el índice de geoacumulación y los factores de bioconcentración (FBC) y traslocación (FT).

5.13- Índice de geoacumulación

Para la estimación del grado de contaminación en el suelo se utilizó el método propuesto por Müller (Tabla 9) [68], el cual se calculó con la Ecuación 10.

$$I_{geo} = \log_2 \left(\frac{C_n}{1.5B_n} \right) \quad (\text{Ecuación 10})$$

Donde C_n es la concentración del metal en el material analizado; B_n es el valor de fondo geoquímico del metal estimado por Taylor y McLennan [69]. El factor de 1.5 es una constante que sirve para compensar las fluctuaciones de origen antropogénico.

Tabla 9. Índice de geoacumulación de Müller [68].

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

5.14- Factor de bioconcentración (FBC) y traslocación (FT)

Para determinar la eficiencia de la fitoextracción se utilizó el factor de bioconcentración el cual indica la capacidad de una especie vegetal para acumular un metal en sus tejidos. El FBC se calculó de acuerdo con la Ecuación 11 [3].

$$FBC = \frac{\text{Concentración de metal en el tejido}}{\text{Concentración de metal en el suelo}} \quad (\text{Ecuación 11})$$

El factor de traslocación indica la capacidad de trasladar los metales desde la raíz hasta los brotes y se calculó con base en la Ecuación 12 [3].

$$TF = \frac{\text{Concentración del metal en la parte área de la planta}}{\text{Concentración del metal en la raíz}} \quad (\text{Ecuación 12})$$

Los valores superiores a uno en ambos factores indica la capacidad de la planta para ser acumuladora, sin embargo, si los valores son superiores a cinco la planta se considera como una hiperacumuladora de metales [3].

5.15-Análisis estadístico

Los datos de las variables de interés se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba post hoc con un nivel de significancia $p \leq 0.05$, utilizando el software STATISTICA para Windows, versión 13.0.

VI- Resultados y discusiones

6.1- Análisis fisicoquímico inicial

Los resultados de la caracterización fisicoquímica del suelo y los jales se muestran a continuación, en la subsección que corresponde.

6.1.1-pH y conductividad eléctrica

El pH en las muestras de los jales se mantuvo ligeramente básico (7.6), por otra parte, las muestras de suelo obtuvieron valores medianamente básicos (7.7). Es decir, el pH del jale y suelo está muy cerca del óptimo (7.0) requerido para los procesos de fitorremediación. Además, estos valores de pH reducen la lixiviación y disminuyen la precipitación en forma de fosfatos o carbonatos.

La conductividad eléctrica para las muestras de jales se mantiene por encima de los 4.0 dS m^{-1} , lo que indica la presencia de sales y se clasificaría como salino. En lo que respecta a las muestras de suelo agrícola, los valores se mantienen en 2.4 dS m^{-1} , lo que es indicativo de que el suelo se encuentra ligeramente salino [70]. La salinidad del suelo se clasifica en función de sus valores de conductividad eléctrica. Suelos con conductividad eléctrica de $<2 \text{ dS m}^{-1}$ se consideran no salinos, de 2 a 4 dS m^{-1} se consideran ligeramente salinos, de >4 a 8 dS m^{-1} se consideran salinos, de >8 a 16 dS m^{-1} se consideran fuertemente salinos y aquellos suelos con conductividad eléctrica de $>16 \text{ dS m}^{-1}$ se consideran extremadamente salinos.

Tabla 10. Valores promedio de la caracterización química de las muestras de jales y suelo (n=3).

Muestra	pH	Conductividad eléctrica (dS m^{-1})
Jales	7.606 ± 0.13	4.558 ± 0.22
Suelo	7.723 ± 0.02	2.244 ± 0.14

\pm = Error estándar.

6.1.2-Contenido de materia orgánica

Los resultados obtenidos del porcentaje de materia orgánica del suelo (Tabla 11) se mantuvieron por debajo del 3%, lo que indica que el contenido de materia orgánica se encuentra en un rango medio (1.6-3.5). Sin embargo, los valores de MO para los jales se encontraron en un rango bajo para cultivo. Es necesario considerar que los tratamientos con jales fueron diseñados únicamente con el 25% de jales, mientras que el restante 75% correspondió a suelo. Por lo anterior, a pesar de que los jales solo contenían el 1.3% de materia orgánica, estos se compensaron con la materia orgánica que contenía el suelo agrícola.

Tabla 11- Resultado promedio del contenido de materia orgánica en el suelo (n=3).

Muestra	Materia orgánica (%)
Jales	1.39 ± 0.42
Suelo	2.85 ± 0.03

± = Error estándar.

6.1.3- Textura del suelo y densidad aparente

La textura del suelo presentó un alto contenido de arena (72.8%) y un bajo contenido de limo y arcilla (12.8 y 14.4%, respectivamente), lo que resultó en una textura franco-arenosa, con base en la clasificación textural del suelo del USDA (Figura 6) [71].

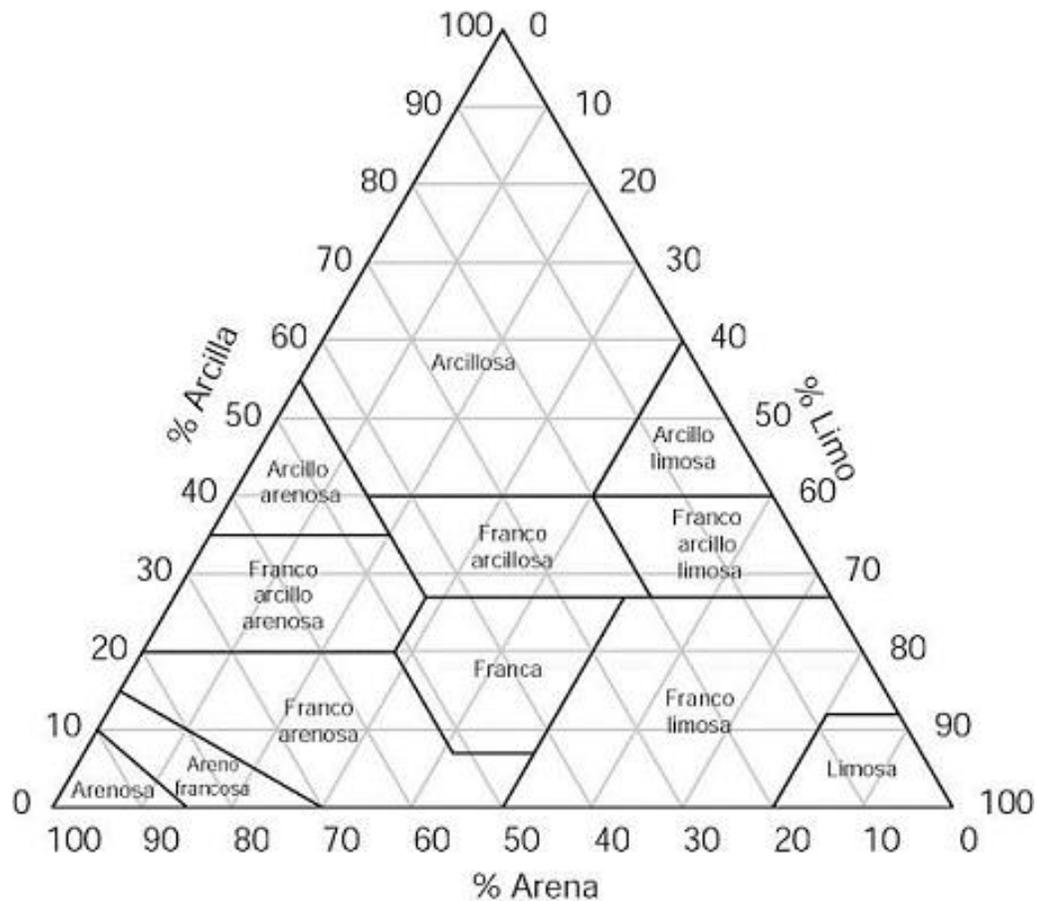


Figura 6. Triángulo de texturas de suelo.

Los resultados obtenidos para la densidad aparente del suelo y jales se muestran en la Tabla 12. La densidad aparente y la textura son consistentes con la literatura citada, debido a que un suelo franco tiene una densidad aparente de aproximadamente 1.2 o 1.3 g cm^{-3} [72].

Tabla 12- Densidad aparente promedio de los jales y suelo.

Muestra	Densidad aparente (g cm^{-3})
Jales	1.037 ± 0.01
Suelo	1.157 ± 0.01

\pm = Error estándar promedio (n=3).

6.1.4- Contenido de carbono, nitrógeno, calcio, potasio, magnesio y fósforo

Los macronutrientes como el nitrógeno, fósforo y potasio son necesarios en mayor proporción para que el desarrollo de la planta se lleve de manera correcta. Los valores obtenidos (Tabla 13) muestran que la principal composición de las muestras de los jales es carbono. Los niveles de nitrógeno en los jales y el suelo son muy altos (>0.25). Las muestras de jales muestran una menor cantidad de nutrientes en comparación con el suelo agrícola.

Tabla 13- Contenido promedio de nutrientes en las muestras de jales y suelo.

Sustrato	C	N	Ca	K	Mg	P
	%					
Suelo	7.617 ±	0.259 ±	24.015 ±	0.181 ±	0.463 ±	0.082 ±
	0.02	7.5×10^{-4}	0.21	0.01	0.01	0.01
Jales	33.795 ±	0.648 ± 0.01	2.366 ± 0.04	0.067 ±	0.080 ±	0.025 ±
	0.29			0.01	1.8×10^{-3}	0.01

± = Error estándar promedio (n=3).

6.2- Porcentaje de germinación de las semillas de girasol

Los ensayos del porcentaje de germinación indicaron que las semillas no se encontraban dañadas ya que no se identificaron semillas duras o muertas. Esto se corroboró al obtener el 100% de germinación. Lo anterior indica que previo a las pruebas, las semillas estaban sanas y se almacenaron adecuadamente, por consiguiente, se descarta un posible efecto atribuible a la calidad de la semilla.

6.3- Diseño preliminar de tratamientos

El diseño preliminar de siembra en la mezcla de suelo agrícola y jales demostró que 12 días después, las semillas emergieron en un 100% en el tratamiento M4 (25% jales (75 g) + 75% (225 g) suelo agrícola); de acuerdo con lo indicado en la Tabla 5. En contraste, las muestras M1, M2 o M3 las semillas no emergieron. Esto sugiere que emplear la relación 25% jales/75% suelo favorece la emergencia de las plántulas.

Se ha reportado que los jales podrían contener diversas concentraciones de metales pesados, poros muy pequeños similares a aquellos de los suelos arcillosos y alta capacidad de retención de humedad, lo cual podría retener agua por periodos largos y llevar al mínimo el número de poros con aire, lo que mataría la semilla por falta de aire. Lo anterior se corrobora al considerar que la densidad aparente de los jales es 1.0, correspondiente a agregados arcillosos, con dimensiones menores a 0.002 mm [73].

6.4- Concentración de metales pesados

Las concentraciones de los metales pesados para las muestras de jales (Tabla 14) obtuvieron valores por debajo de los límites máximos permisibles establecido en las normas internacionales y mexicanas [5, 46]. Por lo tanto, se va a contaminar artificialmente el suelo, con el objetivo de evaluar la capacidad de remediación utilizando las técnicas propuestas con anterioridad.

Tabla 14. Concentración promedio de metales pesados (mg kg^{-1}).

Muestra	As	V	Pb
Jales	5.13 ± 1.27	15.0 ± 0.58	20.67 ± 0.33
LMP-FAO [‡]	20	NR	400
LMP-México [‡]	22	78	400

[±] Error estándar del promedio(n=3); [‡] Límites máximos permisibles de la Organización Mundial para la Alimentación y la Agricultura; [‡] Límites máximos permisibles en México (NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004); NR- valor no reportado.

6.5- Caracterización de nanopartículas

La figura 7 corresponde a la caracterización de las NPs de TiO_2 , mediante DRX y MEB. Este difractograma (Figura 7a), indica que los valores de 2θ se encuentran entre el rango de 20° a 80° al utilizar una radiación $\text{Cu-K}\alpha$ a una longitud de onda de 1.58 \AA . En el difractograma se pueden observar diversos picos ubicados en los planos (100), (004), (200), (211), (204) y (215), los cuales

confirman la fase anatasa de acuerdo con la carta 96-900-9087. Por otra parte, en la micrografía (Figura 7b) se observa que el material se encuentra aglomerado y la morfología corresponde a formas irregulares.

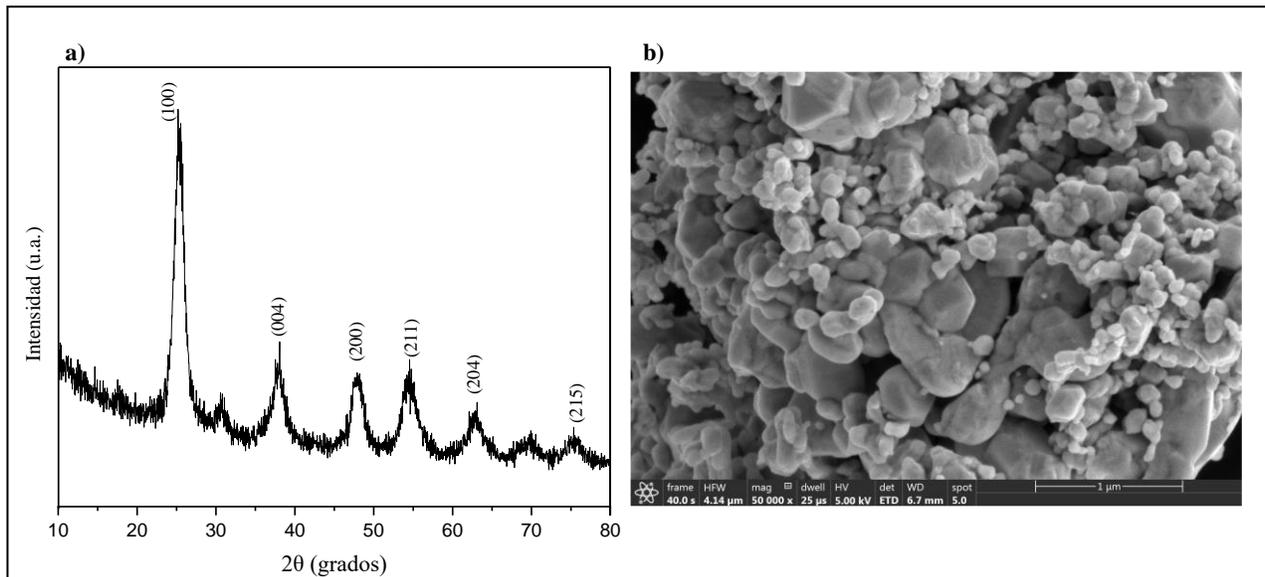


Figura 7. Caracterización de nanopartículas por DRX y MEB.

6.6-Cepas microbianas

En la Figura 8, se muestran diversas cepas las cuales fueron aisladas del suelo y jales. Cada colonia presentó características diferentes entre sí. Las variaciones que se pudieron observar entre cepas fue el color (el cual oscilaba entre el blanco y amarillo), la forma (la cual variaba entre circular, filamentosa, rizoide y puntiforme), el borde (se encontraron bordes redondeados, ondulados, rizados y lobulado) y la elevación (se observaron elevada, plana y convexa).

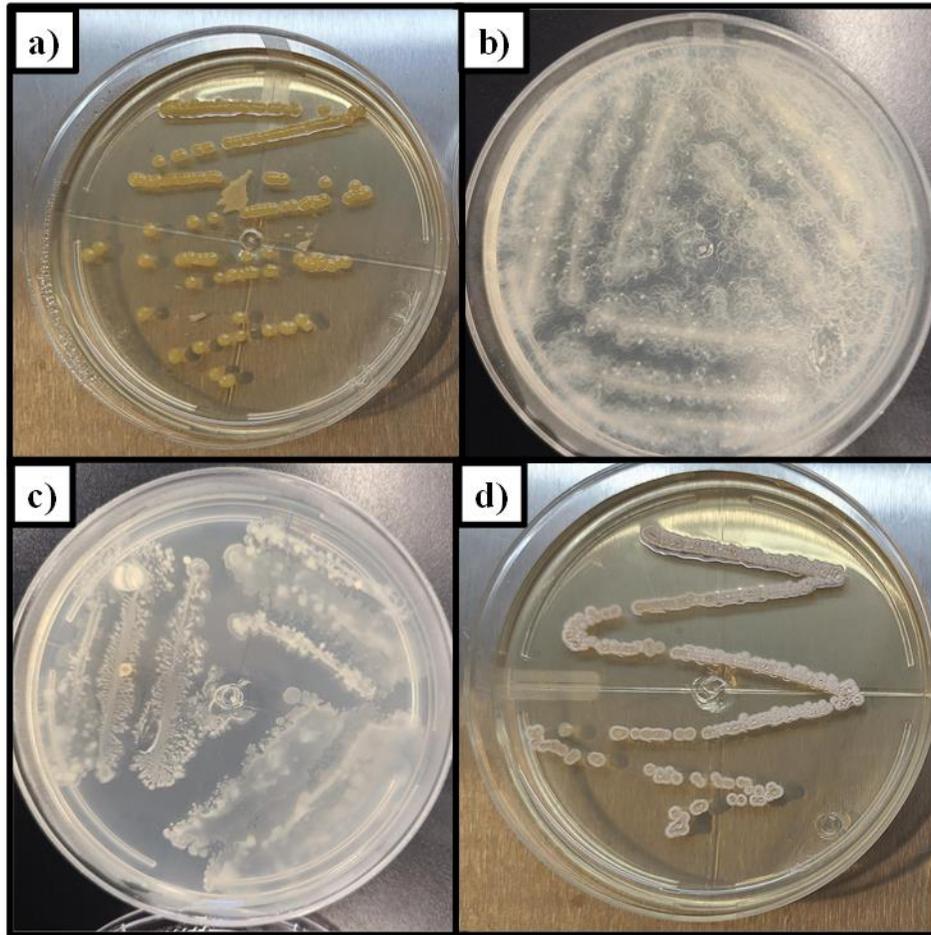


Figura 8. Aislamiento de microorganismos en cajas Petri; a) Cepa aislada de los jales; b) Cepa aislada del suelo; c) Cepa aislada del suelo; d) Cepa aislada de jales.

Para determinar las UFC mL^{-1} se utilizó una curva de calibración y se adaptó a los resultados obtenidos de absorbancia. En la Figura 9 se puede observar la relación que existe entre la absorbancia y las UFC; además, se obtuvo el coeficiente de regresión y la ecuación lineal que mejor se ajusta.

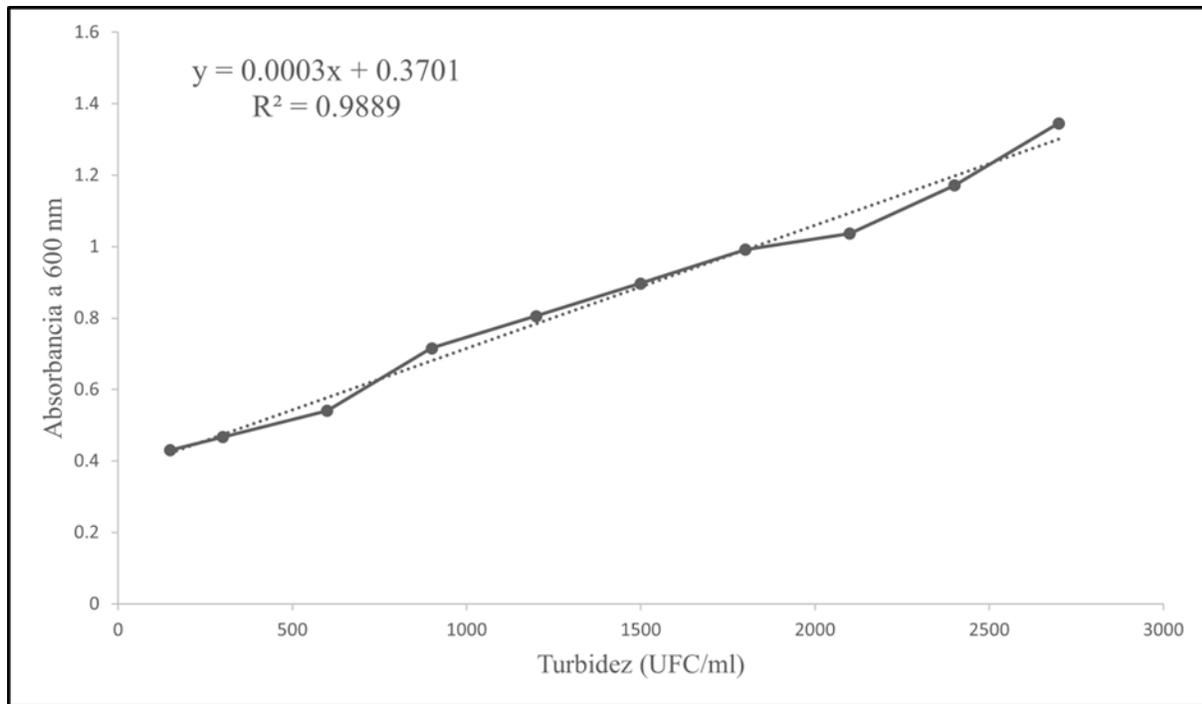


Figura 9. Curva de calibración de McFarland para la determinación de microorganismos totales.

Al sustituir los valores obtenidos de la densidad óptica promedio del consorcio (0.50 a 600 nm) en la ecuación, se obtiene un valor de 4.3×10^6 UFC mL⁻¹. En general, los inóculos de microorganismos deben contener al menos una densidad de UFC de 1×10^6 UFC mL⁻¹, por lo que, con base en este criterio, se destaca que el inóculo se aplicó con la densidad suficiente de células.

6.7- Índice de geoacumulación inicial

Una vez realizada la caracterización inicial de la mezcla de suelo y jales se obtuvieron concentraciones por debajo de los límites máximos permisibles (4 mg kg^{-1} As y 22 mg kg^{-1} Pb). Posteriormente se realizó el cálculo del índice de geoacumulación utilizando la Ecuación 10. Se utilizaron los valores de fondo propuestos por Taylor y McLennan (2001) [69], Pb (20 ppm) y As (1.5 ppm).

Los valores obtenidos fueron de 0.83 para el arsénico y 0.44 para el plomo, posteriormente, se clasificó según lo estipulado por Müller [67] como un suelo no contaminado a moderadamente contaminado (valores entre 0 y 1).

Una vez obtenidos los valores del índice de geo acumulación se realizó la contaminación del suelo añadiendo sales de Pb y As (400 ppm y 22 ppm respectivamente). Con las nuevas concentraciones de contaminantes presentes en el suelo y la mezcla (suelo y jales) se estimó nuevamente el índice de geoacumulación utilizando la Ecuación 10 con los valores de fondo descritos anteriormente. Los resultados obtenidos indicaron que el suelo se encontraba fuertemente contaminado debido a que se obtuvieron valores por encima de 3 (3.15 As y 3.73 Pb).

6.8- Observaciones morfológicas del cultivo

Todas las semillas de girasol germinaron en los tratamientos establecidos en diseño de experimentos; Sin embargo, se pudo observar que la emergencia de las plántulas ocurrió primero para los tratamientos 14 (Planta + 100 mg kg⁻¹ de NPs) y 18 (Control suelo), 12 días después de la siembra (DDS).

La emergencia total en los tratamientos se obtuvo a los 20 DDS y no se encontraron síntomas visibles de toxicidad provocada por los metales pesados. A partir del día 40 DDS se observaron cambios en las características morfológicas de las plantas. En los tratamientos T1 y T2 se observaron hojas de color amarillo y la longitud de la planta fue menor en comparación de los demás tratamientos.

En la Tabla 15 se puede observar la altura de planta para cada uno de los tratamientos evaluados, en donde el tratamiento T2 (mezcla de jales inoculada + 100 mg kg⁻¹ de NPs) es el que presenta menor altura (27.97 cm) y el tratamiento T4 (mezcla de jales no inoculado + 50 mg kg⁻¹ de NPs) presenta la mayor altura (48.07 cm). Con respecto a la longitud de las raíces, se puede observar que el tratamiento T3 (mezcla de jales inoculada + 150 mg kg⁻¹ de NPs) tuvo una mayor longitud de raíz (17.73 cm) y la menor longitud registrada de las raíces fueron las del tratamiento T14 el cual contiene suelo no inoculado con 100 mg kg⁻¹ de NPs (11.90 cm).

Lo anterior sugiere que la presencia de microorganismos en combinación con una dosis de nanopartículas de 150 mg kg⁻¹ ayudará a que las raíces tengan un mayor crecimiento. Por el contrario, el tratamiento T7 el cual contiene solo inóculo desarrolló una menor longitud de raíz.

De esta manera se puede encontrar una relación positiva con la adición de microorganismos y NPs a los tratamientos, debido a que estos pueden actuar como bioestimulantes para el crecimiento y desarrollo de la planta.

Tabla 15- Altura del tallo y longitud de raíz en cada uno de los tratamientos de remediación.

Clave de Tratamiento ^ε	Tratamientos			Altura de tallo (cm)	Longitud de raíz (cm)	
	Suelo o Jales	Inoculado	NPs (mg kg ⁻¹)			
T7	Mezcla de suelo y jales	Sí	SN	36.00±4.58 ^{BCD}	13.39±2.52 ^{AB}	
T1			50	28.47±5.31 ^{CD}	16.00±1.00 ^{AB}	
T2			100	27.97±1.37 ^D	17.10±1.01 ^A	
T3			150	40.97±2.05 ^{AB}	17.77±1.08 ^A	
T4		No	No	50	48.07±6.87 ^A	16.70±2.89 ^A
T5				100	33.57±8.62 ^{BCD}	14.50±5.47 ^{AB}
T6				150	43.90±4.03 ^{AB}	14.23±3.27 ^{AB}
T17				Control	43.87±2.97 ^{AB}	16.40±2.34 ^{AB}
T16	Suelo	Sí	SN	36.50±6.50 ^{BCD}	17.33±2.48 ^A	
T10			50	37.70±9.20 ^{ABCD}	16.00±2.65 ^{AB}	
T11			100	41.80±5.89 ^{AB}	16.33±2.31 ^{AB}	
T12			150	39.00±4.50 ^{ABCD}	13.90±1.70 ^{AB}	
T13		No	No	50	40.17±7.42 ^{AB}	13.83±2.36 ^{AB}
T14				100	39.00±8.89 ^{ABCD}	11.90±2.33 ^B
T15				150	39.70±8.52 ^{ABC}	17.33±1.53 ^A
T18				Control	41.80±2.97 ^{AB}	17.30±2.34 ^A

^ε Clave de Tratamientos con base en lo indicado en la Tabla 6. ± = Desviación estándar de n=3. Valores medios con diferente letra mayúscula en cada columna, indican diferencia significativa entre tratamientos ($\alpha=0.05$). No se incluyen los tratamientos T8, T9, T19 y T20 porque las unidades experimentales no contienen plantas.

Con respecto al desarrollo de la planta, los tratamientos, T11, T17 y T18 presentaron un mayor desarrollo y llegaron al proceso de floración (Figura 10). En las macetas que contenían la mezcla de suelo y jales se observaron hojas de color amarillo. Por el contrario, en los tratamientos donde solo se utilizó suelo no se observaron hojas dañadas ni con falta de pigmentación verde.



Figura 10. Crecimiento de las plantas de girasol en diversos tratamientos; a) Tratamiento T18 a los 60 DDS; b) Tratamientos de suelo con diversas dosis de nanopartículas; c) Tratamiento T17 60 DDS.

6.9- Biomasa de las plantas

La biomasa de la planta se utilizó para evaluar los efectos de cada uno de los tratamientos de remediación. Se contempló la biomasa húmeda total (suma de raíces y brotes) y la biomasa seca total. La figura 11 (a), indica que la adición de diversas dosis de NPs en los tratamientos con la mezcla de suelo y jales contribuyó a la reducción de la biomasa húmeda tanto de las raíces, como

de la parte aérea de la planta, en comparación al tratamiento control (T17). Lo anterior es consistente con lo expuesto por Alaboudi et al., (2018) [36], quienes mencionan que la biomasa de la planta se redujo en los tratamientos contaminados en comparación con el tratamiento control.

Entre los tratamientos se puede observar que la adición de cepas microbianas contribuyó a la disminución de biomasa húmeda en las raíces de las plantas, mientras que con la adición de 50 mg kg⁻¹ de nanopartículas (Tratamiento 4) sin inóculo se obtuvo una biomasa mayor en comparación al tratamiento que contenía cepas y la misma cantidad de nanopartículas (T1). De igual manera, el tratamiento 4 promovió una mayor biomasa húmeda en la parte aérea en comparación a los tratamientos que contenían inóculo. El análisis de varianza y una prueba Post-hoc ($\alpha= 0.05$) demostraron que los tratamientos T4 y T13 son estadísticamente iguales, mientras que los tratamientos que presentaron diferencias significativas son los que contenían el inóculo.

Los tratamientos que solo contenían suelo tuvieron un comportamiento diferente en comparación de la mezcla de suelo y jales. Como se puede observar en la figura 11 (a), la biomasa húmeda tanto para la parte aérea, como para la raíz aumentó con respecto al control. El mayor aumento en la parte aérea (53%) fue en el tratamiento T14, el cual contenía una dosis de NPs de 100 mg kg⁻¹. En la parte de la raíz, el tratamiento que presentó un mayor aumento de biomasa fue el T15, el cual contenía 150 mg kg⁻¹ de nanopartículas. De igual manera a la mezcla de suelo y jales, los tratamientos que contenían inóculo y una dosis de NPs más elevada (> 50 mg kg⁻¹) tuvieron valores menores de biomasa, en comparación con los que no los tenían.

Respecto a la biomasa seca, los análisis revelaron un comportamiento similar a lo observado en la biomasa húmeda, en donde el tratamiento control de la mezcla de suelo y jales provocó una mayor biomasa respecto a los demás tratamientos (Figura 11b). En los tratamientos que contenían solo suelo, el aumento de la biomasa total se vio favorecido con la aplicación de NPs.

Los resultados anteriores coinciden con la investigación de Zand et al., (2020) [43] en donde al aplicar nanopartículas de TiO₂ (entre 100 y 300 mg kg⁻¹) a un suelo contaminado con cesio, la biomasa disminuyó un 45% a los 60 DDS en comparación al control. De igual manera, el estudio realizado por Singh y Lee (2018) [44], mostró una reducción en la biomasa de la planta *Brassica juncea* L, a causa de la contaminación del suelo con metales pesados.

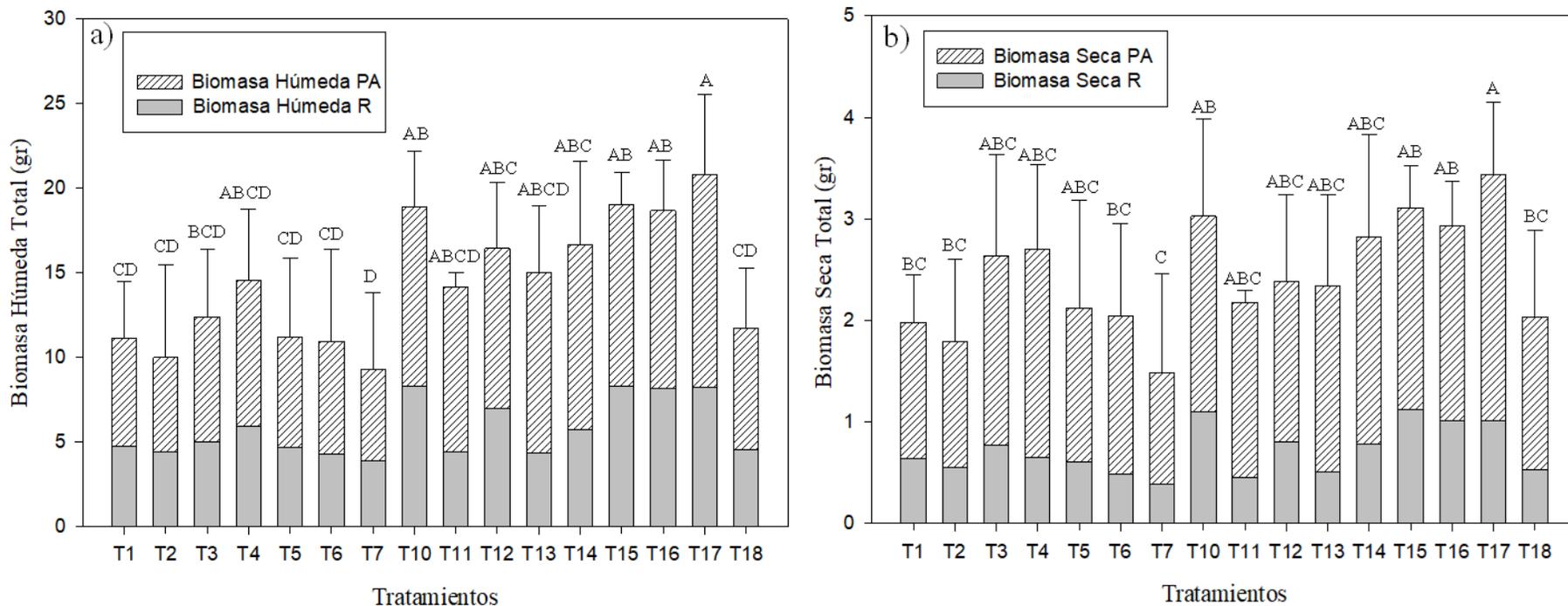


Figura 11. Valores totales de biomasa húmeda y biomasa seca para los diversos tratamientos 60 DDS. PA=Parte aérea, R=raíz. Las barras de error representan la desviación estándar de n=3. Las medias con letras iguales son estadísticamente iguales considerando la biomasa total en $\alpha=0.05$. La descripción de los tratamientos se indica en la Tabla 6. No se incluyen los tratamientos T8, T9, T19 y T20 porque las unidades experimentales no contienen plantas.

6.10- Acumulación de As y Pb en las plantas

En la tabla 16 se observan los valores de acumulación de As y Pb promedio en cada uno de los tratamientos. La mayor acumulación de As total en la planta para los tratamientos en donde se usó la mezcla de suelo y jales fue en el tratamiento control (T17), logrando acumular $30.61 \mu\text{g g}^{-1}$ (con respecto a peso seco en toda la planta). Sin embargo, la mayor acumulación de As en las raíces se encontró en el tratamiento el cual contenía 100 mg kg^{-1} de NPs sin aplicar inóculo. En contraste, la mayor acumulación de As en la parte aérea de la planta se obtuvo en el tratamiento control logrando acumular $16.91 \mu\text{g g}^{-1}$ (con respecto a peso seco).

Para los tratamientos en donde se utilizó solo suelo, la mayor acumulación de As total se obtuvo en el tratamiento el cual contenía 150 mg kg^{-1} de NPs y no se encontraba inoculado ($30.62 \mu\text{g g}^{-1}$ con respecto a peso seco). La distribución del contaminante en la parte aérea y en la raíz nos indica que el tratamiento el cual absorbió mayor cantidad de As en la raíz fue el que contenía 150 mg kg^{-1} de NPs sin inóculo. Por el contrario el tratamiento con mayor acumulación de As en la parte aérea fue el tratamiento inoculado al cual se le agregaron 50 mg kg^{-1} de NPs y se encontraba inoculado. Lo anterior coincide con lo expuesto por Zhara et al., (2019) [45] en donde menciona que utilizar NPs de TiO_2 favorecerá la absorción de contaminantes las raíces de las plantas. En la acumulación en la parte aérea se encontraron diferencias significativas dependiendo del tipo de suelo utilizado. En las raíces se encontraron valores significativamente mayores con respecto al control en la mezcla de suelo y jales.

Con respecto al Pb en la mezcla de suelo y jales se puede observar que la mayor acumulación total se presentó en el tratamiento el cual no se inóculo y contenía 50 mg kg^{-1} de NPs ($30.01 \mu\text{g g}^{-1}$ con respecto a peso seco).

Para los tratamientos en los cuales solo se utilizó suelo la mayor acumulación total de Pb en las raíces se encontró en el tratamiento inoculado y con NPs en una concentración de 150 mg kg^{-1} ($37.96 \mu\text{g g}^{-1}$ con respecto a peso seco). El aumento con respecto al control fue de 26.36 veces.

Por otra parte, la acumulación de Pb en la parte aérea de la planta obtuvo una mayor concentración de acumulación en el tratamiento el cual contenía suelo inoculado con una concentración de NPs de 100 mg kg^{-1} siendo este 4.45 veces mayor que el tratamiento control.

Como se puede observar, la acumulación del As fue mayor en comparación a la del Pb. Lo anterior se puede atribuir a que el girasol no es una opción viable para la acumulación de Pb tal como lo exponen Alaboudi et al., (2018) [36].

6.11- Factor de Bioconcentración y Traslocación

El uso del factor de bioconcentración brinda información acerca de la capacidad que tiene una planta para acumular diversos metales pesados, como se muestra en la figura 12 a) para la acumulación de As, los tratamientos que tienen el potencial de remediar de manera más eficiente son el T10, T14, T15 y T16. En estos casos el girasol puede ser utilizado como una planta fitorremediadora (valores ≥ 1). El factor más alto obtenido en la acumulación de As es el tratamiento T10 seguido del tratamiento T15. El factor más bajo se obtuvo en el tratamiento T7. Se pudo observar que el FBC aumentó en el suelo al añadir NPs con respecto al tratamiento control. Lo anterior indica que el girasol tiene una mayor capacidad para absorber el As del suelo en presencia de NPs. Sin embargo, para la mezcla de suelo y jales la adición de NPs disminuyó el factor de bioconcentración con respecto al control. Sin embargo, los valores se mantuvieron por encima al tratamiento en el que solo se le aplicó bioestimulación.

El factor de bioconcentración del Pb indica que todos los tratamientos se encuentran por debajo de 1, por lo cual, ningún tratamiento adicionado con nanopartículas y cepas microbianas favorece la absorción del Pb para remediar el suelo. Lo anterior es consistente con respecto a la investigación de Alaboudi et al., (2018) [36], en donde el uso del girasol no es favorable para acumular plomo en sus tejidos.

Tabla 16- Concentración de As y Pb acumulado en la parte aérea y la raíz de la planta.

Clave de Tratamiento ^ε	Tratamientos			As ($\mu\text{g g}^{-1}$ dw)		Pb ($\mu\text{g g}^{-1}$ dw)	
	Suelo o Jales	Inoculado	NPs (mg kg^{-1})	As Tallo	As raíz	Pb tallo	Pb raíz
T7			SN	1.64±1.87 ^B	3.77±2.44 ^{CD}	3.29±1.15 ^{CD}	7.32±6.42 ^{BC}
T1		Sí	50	2.52±2.16 ^B	3.83±1.26 ^{CD}	2.10±1.34 ^D	11.54±0.47 ^{ABC}
T2			100	2.15±1.12 ^B	6.15±5.98 ^{BCD}	2.76±0.46 ^{CD}	12.95±6.20 ^{ABC}
T3	Mezcla de suelo y jales		150	5.05±3.89 ^{AB}	4.25±1.56 ^{CD}	2.28±2.69 ^{CD}	15.17±2.65 ^{ABC}
T4			50	3.73±4.43 ^B	9.54±3.28 ^{ABCD}	7.38±6.12 ^{ABCD}	22.63±8.52 ^{ABC}
T5		No	100	3.61±3.04 ^B	6.78±4.38 ^{BCD}	1.96±1.08 ^D	13.77±9.98 ^{ABC}
T6			150	5.56±1.87 ^{AB}	3.02±2.29 ^{CD}	3.05±1.76 ^{CD}	13.42±10.12 ^{ABC}
T17			Control	16.91±3.90 ^A	13.70±3.21 ^{ABCD}	4.05±2.53 ^{CD}	3.24±1.63 ^C
T16			SN	3.67±1.96 ^B	9.91±5.88 ^{ABCD}	6.49±1.36 ^{ABCD}	26.26±3.47 ^{ABC}
T10		Sí	50	8.21±9.48 ^{AB}	16.39±8.05 ^{ABCD}	8.32±3.81 ^{ABC}	27.76±17.25 ^{ABC}
T11			100	5.65±4.27 ^{AB}	18.55±2.21 ^{ABC}	12.06±5.18 ^A	9.73±2.37 ^{ABC}
T12	Suelo		150	1.45±1.43 ^B	2.89±0.81 ^{CD}	7.52±3.43 ^{ABCD}	37.96±24.46 ^A
T13			50	3.29±1.59 ^B	14.71±3.62 ^{ABCD}	5.78±3.37 ^{BCD}	15.37±6.84 ^{ABC}
T14		No	100	2.23±1.21 ^B	21.99±7.38 ^{AB}	10.99±8.86 ^{AB}	27.14±14.11 ^{ABC}
T15			150	6.46±2.21 ^{AB}	24.16±4.55 ^A	5.49±2.38 ^{BCD}	34.51±2.70 ^{AB}
T18			Control	6.06±5.65 ^{AB}	0.48±0.02 ^D	2.71±3.16 ^{CD}	1.44±0.92 ^C

^ε Clave de Tratamientos con base en lo indicado en la Tabla 6. ± = Desviación estándar de n=3. Valores medios con diferente letra mayúscula en cada columna, indican diferencia significativa entre tratamientos ($\alpha=0.05$). No se incluyen los tratamientos T8, T9, T19 y T20 porque las unidades experimentales no contienen plantas.

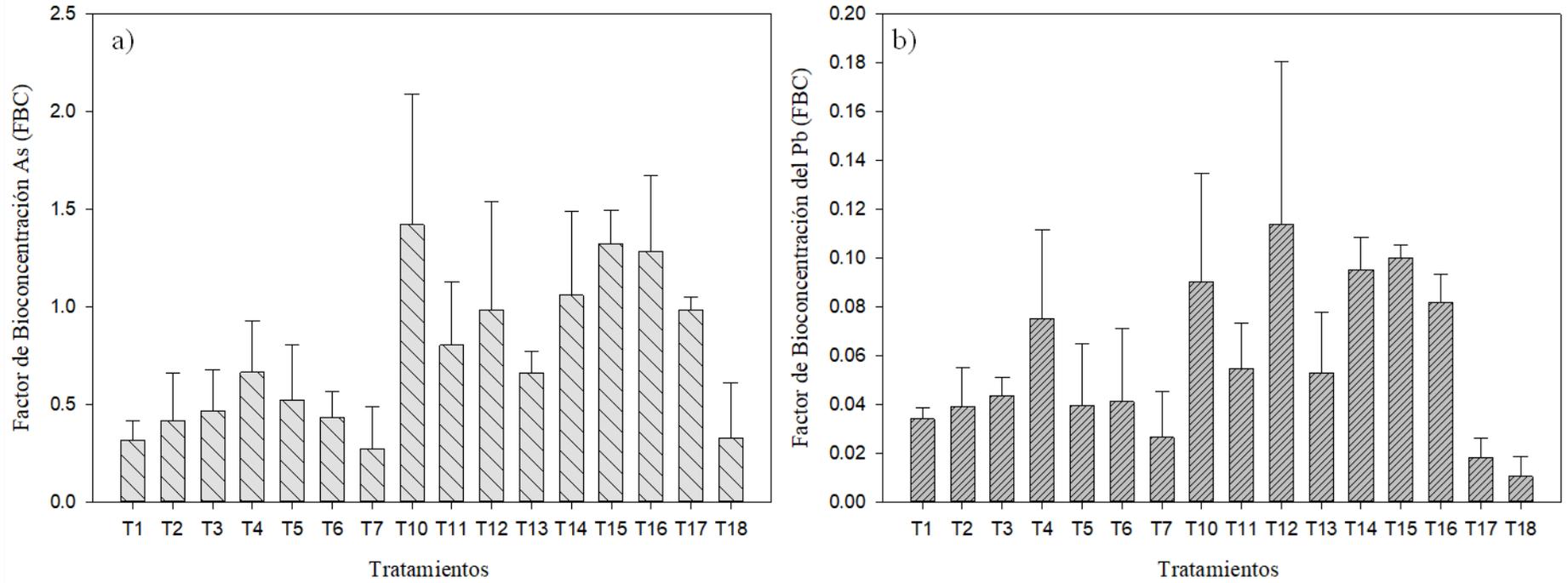


Figura 12. Factor de bioconcentración para el As y el Pb medido a los 60 DDS. Las barras de error representan la desviación estándar de n=3. La descripción de los tratamientos se encuentra en la tabla 6. No se incluyen los tratamientos T8, T9, T19 y T20 porque las unidades experimentales no contienen plantas.

El factor de traslocación nos indica la capacidad de una planta para transferir los contaminantes desde la raíz hasta la parte aérea. Valores superiores a 1 indican la capacidad de movimiento de los contaminantes en la planta. En la figura 13, se muestran los factores obtenidos para el As y Pb. El factor de traslocación del As fue mayor a 1 en los tratamientos T3, T6, T17 y T18. Lo anterior sugiere que en presencia de NPs la traslocación se logra con una concentración de 150 mg kg^{-1} ya que en los tratamientos en donde se añade una menor concentración se tiene un factor menor a 1.

En cuanto a la traslocación del plomo, los tratamientos T11, T17 y T18 provocaron un valor por encima de 1, mientras que los tratamientos que presentaron el factor más bajo fueron a los que se le añadieron nanopartículas y bioaugmentación en la mezcla de suelo y jales. Lo anterior concuerda con la investigación de Forte y Mutiti (2017) [74], en donde se indica que el girasol no tiene la capacidad de translocar el plomo desde la raíz hasta las partes aérea.

6.12-Contenido de clorofila

En la figura 14 se observa que el mayor contenido de clorofila total se encuentra en el tratamiento T11 (suelo) en el cual se añadieron 100 mg kg^{-1} de nanopartículas de TiO_2 y se realizó bioestimulación. Por el contrario, el tratamiento con el menor contenido de clorofila fue el tratamiento T4 (mezcla de suelo y jales) en el cual se adicionaron 50 mg kg^{-1} sin bioestimulación. Lo anterior coincide con lo expuesto por Zand et al., (2020) [43], en donde demuestra que una adición baja de nanopartículas de TiO_2 (entre 100 y 200 mg kg^{-1}) altera ligeramente el contenido de clorofila, además, mejora la tasa del contenido fotosintético.

En la mezcla de suelo y jales no se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el tratamiento control de jales (T17) con respecto a los tratamientos T3 y T5. Sin embargo, estadísticamente el tratamiento T4 es diferente a todos los demás.

El mayor contenido de clorofila total para la mezcla se encuentra en el tratamiento T3, lo cual comprueba que la combinación de nanopartículas con la bioestimulación favoreció los valores de clorofila total.

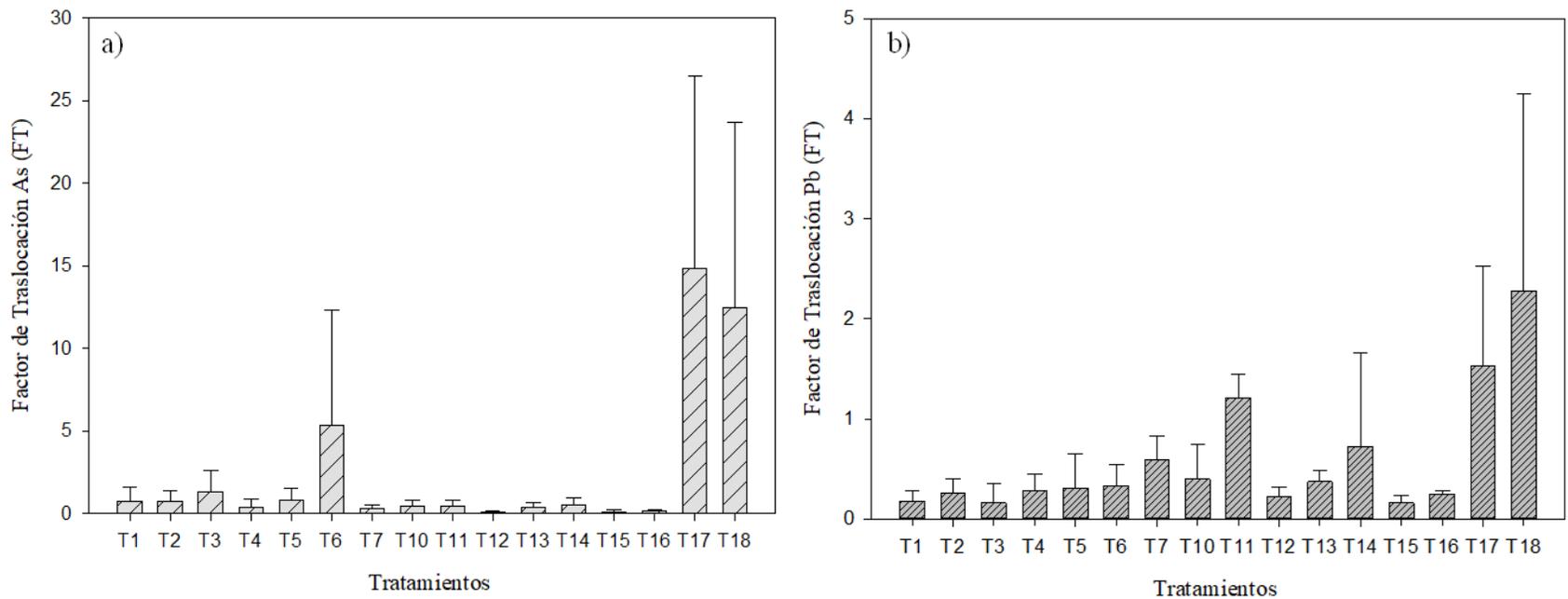


Figura 13. Factor de traslocación para el As y el Pb medido a los 60 DDS. Las barras de error representan la desviación estándar de $n=3$. La descripción de los tratamientos se encuentra en la tabla 6. No se incluyen los tratamientos T8, T9, T19 y T20 porque las unidades experimentales no contienen plantas.

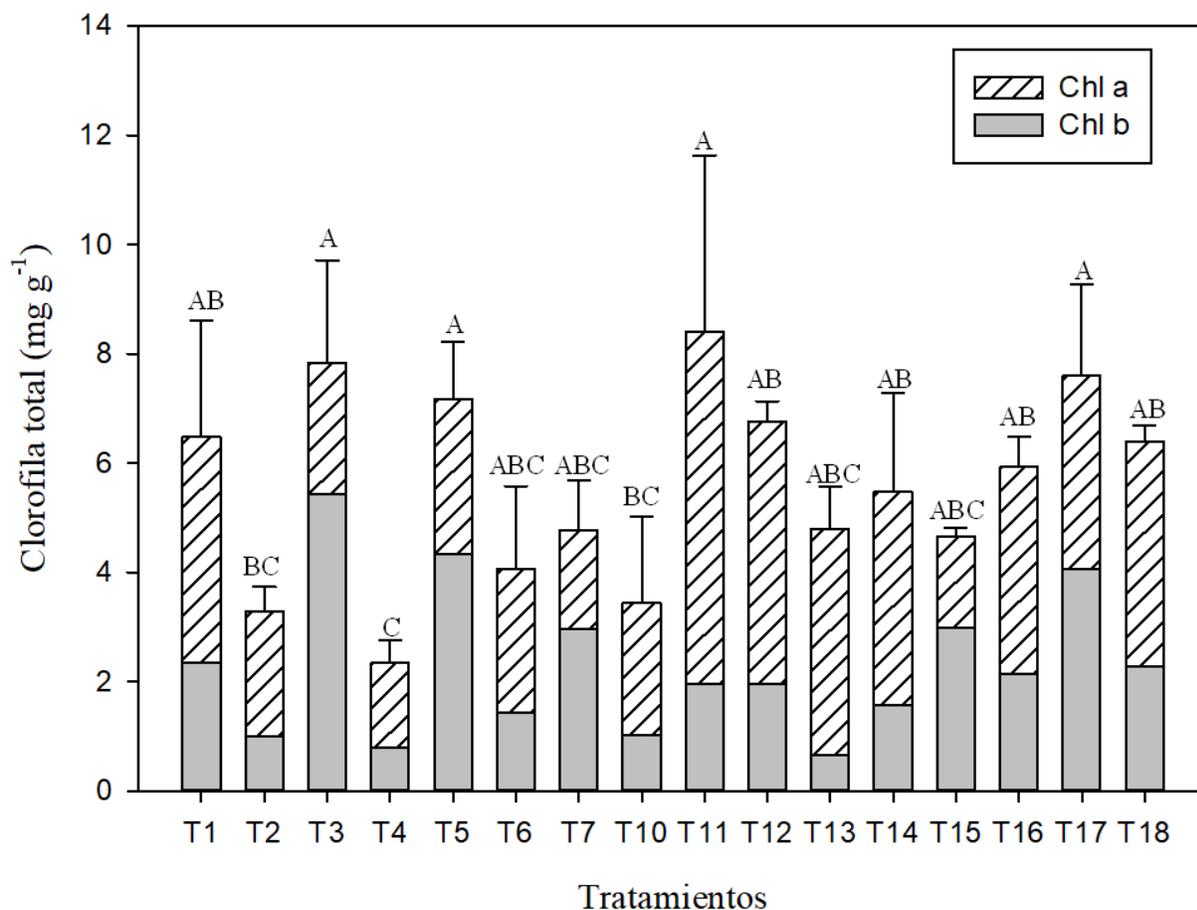


Figura 14. Contenido de Clorofila Total promedio 60 DDS. Las barras de error representan la desviación estándar en n=3. Valores medios con diferente letra indican diferencias estadísticas entre tratamientos considerando la clorofila total ($\alpha=0.05$). La descripción de los tratamientos se encuentra en la tabla 6. No se incluyen los tratamientos T8, T9, T19 y T20 porque las unidades experimentales no contienen plantas.

6.13-Análisis de tejido por MEB

La morfología de las raíces y el tallo de la planta se determinó mediante un análisis de microscopía electrónica de barrido. En la figura 15 se encuentran las imágenes obtenidas de los diferentes tratamientos utilizando NPs. En los cortes longitudinales de los tallos no se observaron daños en la estructura, además, no se observó la presencia de NPs como resultado de la traslocación.

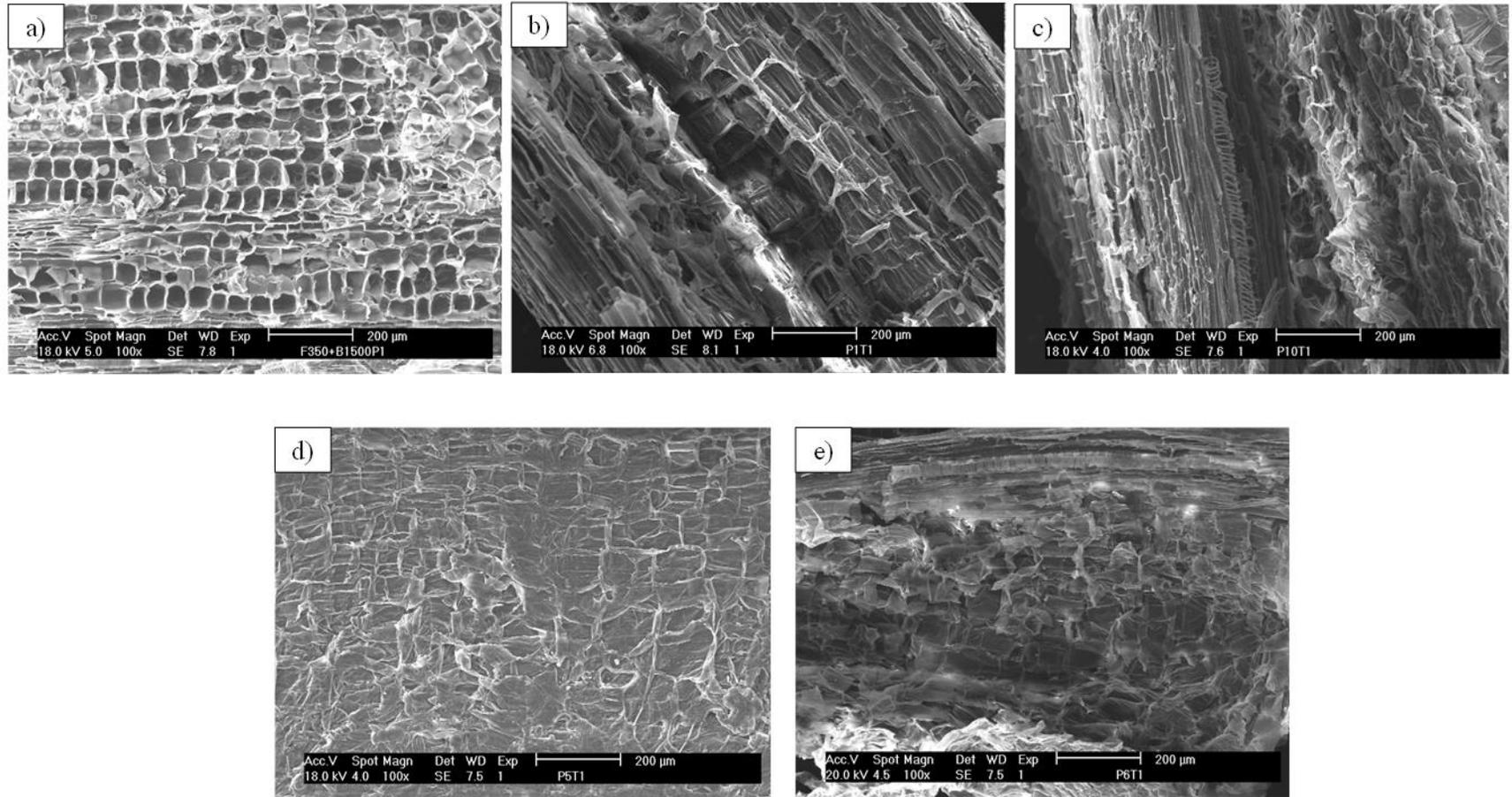


Figura 15. Micrografías de la estructura interna de los tallos del girasol bajo diferentes tratamientos de nanopartículas en la mezcla de suelo y jales; a) Control, b) Sin NPs, c) 50 mg kg⁻¹, d) 100 mg kg⁻¹, y e) 150 mg kg⁻¹.

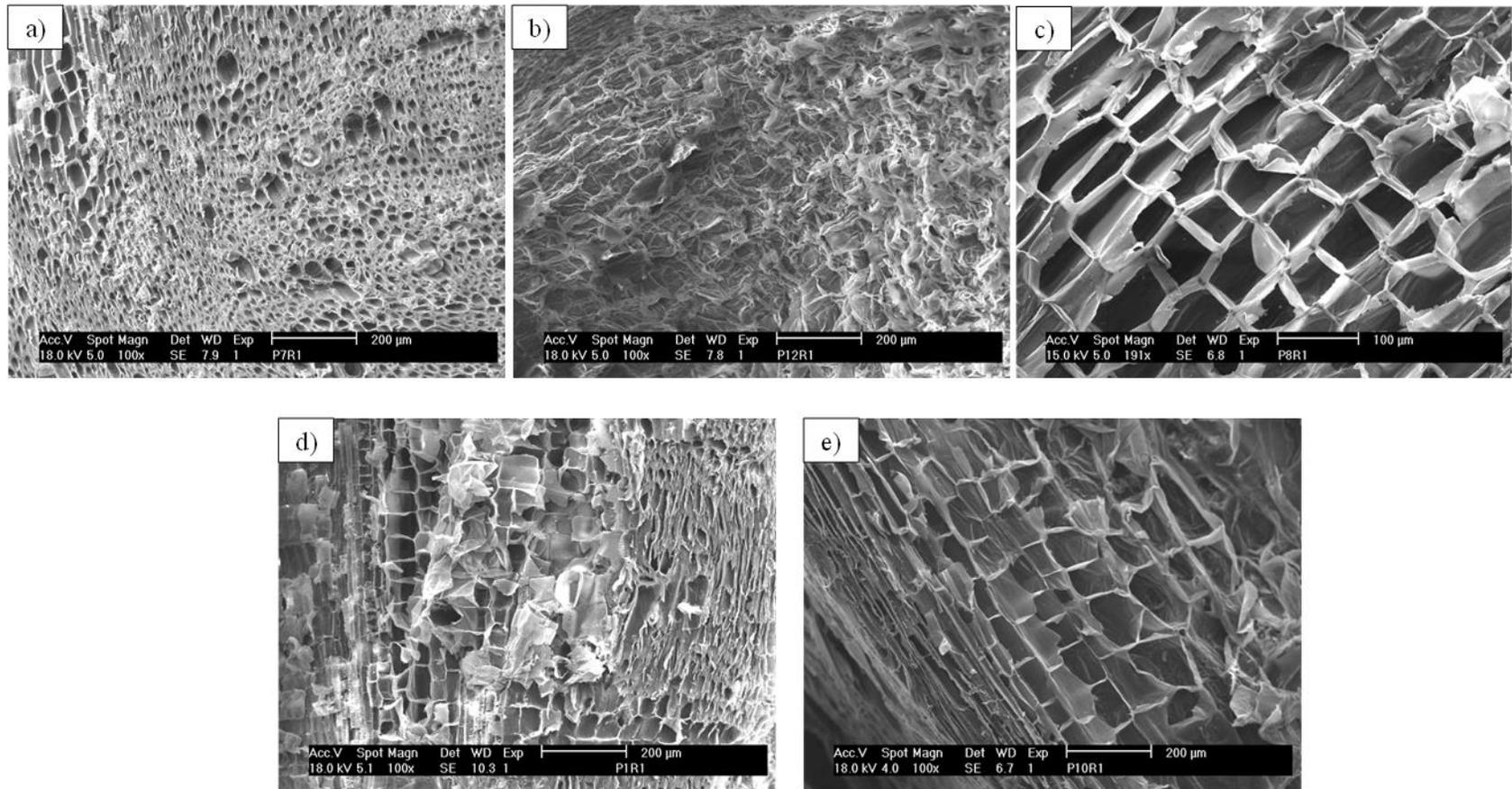


Figura 16. Micrografías de la estructura interna de las raíces del girasol bajo diferentes tratamientos de nanopartículas en la mezcla de suelo y jales; a) Control, b) Sin NPs, c) 50 mg kg⁻¹, d) 100 mg kg⁻¹, y e) 150 mg kg⁻¹

En la figura 16 se muestran las imágenes correspondientes a los cortes realizados en las raíces. De igual manera que en las imágenes de los tallos, no se puede observar daños en la morfología, sin embargo, en algunos tratamientos como el T4 a un mayor acercamiento, se pueden observar partículas semiesféricas lo cual pudiera sugerir la presencia de NPs en las raíces (figura 17). Para comprobar lo anterior, se realizó un análisis de EDS de las partículas presentes en las muestras. Una vez obtenidos los resultados se comprobó la nula presencia de TiO_2 y se demostró que los principales componentes de las partículas era carbono y oxígeno, lo cual indica que existe la presencia de gránulos de almidón.

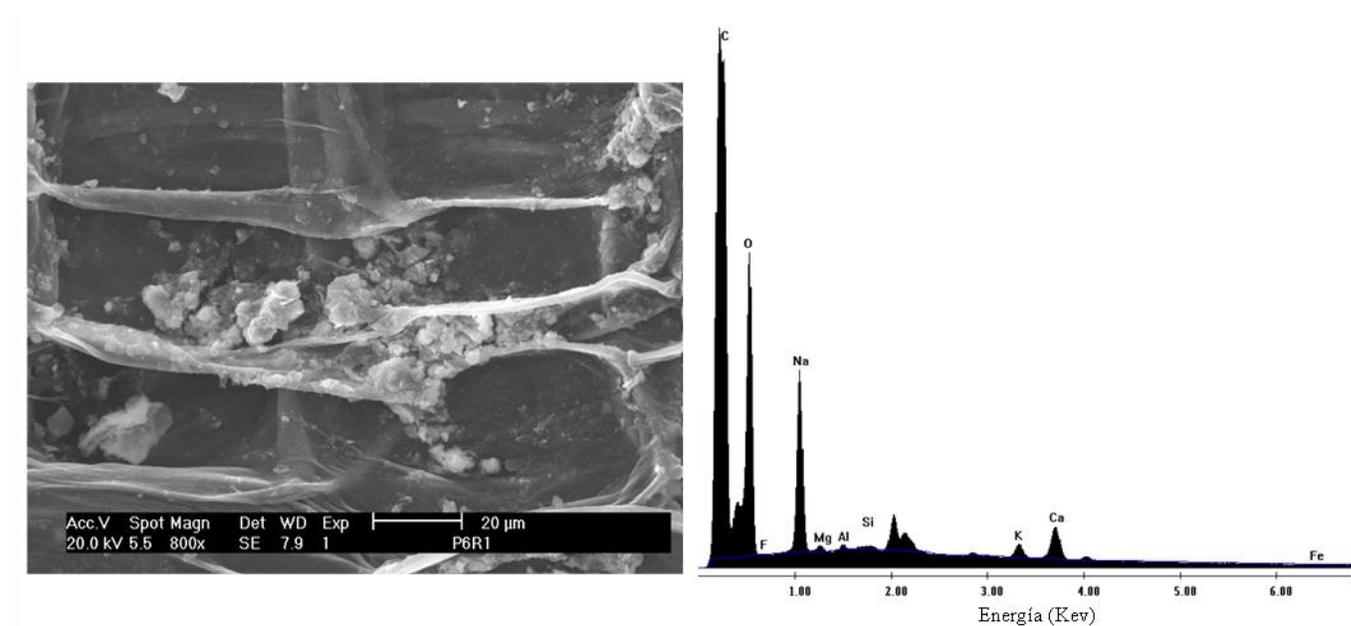


Figura 17. Micrografía de la estructura interna de la raíz del girasol a una concentración de 50 mg kg⁻¹ de NPs y EDS de los gránulos presentes en la raíz. La muestra corresponde a plantas del Tratamiento T4.

6.14- Análisis Físicoquímico final

Una vez que transcurrieron los 60 días de experimento se llevó a cabo un análisis del suelo de cada uno de los tratamientos.

6.14.1- pH y conductividad eléctrica

En la tabla 17 se observa que el pH aumentó a valores cercanos o mayores a 8, lo cual indica que durante el tiempo del experimento el suelo se volvió ligeramente alcalino, lo cual puede ser principalmente por la adición de solución nutritiva al suelo. El pH del suelo se encuentra relacionado con la biodisponibilidad de los metales. Para el caso del plomo a un pH más alto (> 6.5) disminuye la movilidad y biodisponibilidad, por lo tanto, las plantas no lo pueden acumularlo de manera eficiente [75]. La conductividad eléctrica presentó valores cercanos o mayores a 4 dS m⁻¹, lo cual es indicativo de presencia de sales y se considera un suelo salino. Esto se debe principalmente a la adición de la solución nutritiva.

Tabla 17. Valores promedio de pH y conductividad eléctrica después de la cosecha.

Tratamiento	pH	C.E. (dS m ⁻¹)
T1	8.16 ±0.02	4.29 ±0.43
T2	8.14 ±0.04	3.98 ±0.11
T3	8.14 ±0.03	4.22 ±0.17
T4	8.05 ±0.05	4.24 ±0.06
T5	8.04 ±0.13	4.17 ±0.04
T6	8.13 ±0.02	4.83 ±0.22
T7	8.23 ±0.05	4.89 ±0.11
T8	8.27 ±0.05	4.40 ±0.06
T9	7.98 ±0.02	4.01 ±0.32
T10	8.19 ±0.03	3.99 ±0.09
T11	7.92 ±0.15	4.55 ±0.36
T12	8.09 ±0.16	4.95 ±0.20
T13	8.09 ±0.16	4.69 ±0.27
T14	8.26 ±0.01	4.81 ±0.16
T15	8.19 ±0.02	3.74 ±0.04
T16	8.13 ±0.05	4.01 ±0.38
T17	8.14 ±0.15	4.36 ±0.06
T18	8.14 ±0.14	4.63 ±0.23
T19	8.24 ±0.06	3.86 ±0.25
T20	8.30 ±0.03	4.10 ±0.39

± = Error estándar promedio (n=3).

6.14.2- Índice de geo acumulación final

Una vez transcurridos los 60 días del experimento se estimó el índice de geo acumulación del As y Pb. Los valores obtenidos se muestran a continuación en la tabla 18.

Tabla18. Valores de los índices de geo acumulación de cada tratamiento.

Tratamiento	As	Pb
T1	2.44±0.099	2.07±0.586
T2	2.12±0.009	2.30±0.184
T3	2.11±0.246	2.36±1.573
T4	2.55±0.338	2.66±0.413
T5	2.13±0.050	2.06±0.684
T6	2.76±0.108	2.17±0.332
T7	2.45±0.324	2.16±0.618
T8	0.86±0.081	1.71±0.877
T9	2.23±0.208	2.38±1.877
T10	2.17±0.125	1.92±1.680
T11	2.47±0.170	2.14±0.478
T12	2.69±0.153	2.45±0.446
T13	2.65±0.187	2.26±0.360
T14	2.33±0.132	2.21±0.495
T15	1.46±0.015	1.00±0.301
T16	0.37±0.073	2.11±0.232
T17	-2.05±0.003	-1.55±0.131
T18	-2.24±0.002	-1.56±0.025
T19	2.58±0.119	2.36±0.953
T20	1.73±0.074	2.02±1.124

Igeo<0 No contaminado, (n=3).

El valor más alto obtenido para el arsénico se encontró en la muestra 6 (2.76) y para el plomo en la muestra 4 (2.66), lo cuales se encuentran dentro del rango de un suelo moderadamente contaminado. Los valores negativos indican que el suelo no se encuentra contaminado. Las muestras 17 y 18 obtuvieron los valores más bajos de As y Pb. Los valores indican que la mezcla de suelo y jales después de la fitorremediación presenta una disminución del índice de geoacumulación calculado al principio del experimento.

VII- Conclusiones

La evaluación de la capacidad del girasol (*Helianthus annuus* L.) para el tratamiento de suelos contaminados con residuos mineros los cuales contenían metales pesados demostró que la planta es capaz de resistir a las condiciones de estrés provocada por los residuos. La presencia de NPs de TiO₂ en una concentración de 150 mg kg⁻¹ favoreció el crecimiento de las raíces, además, se demostró que la presencia de microorganismos contribuyó positivamente al aumento de estas.

La acumulación del Pb no fue favorable en comparación a la acumulación del As, por lo cual, no se recomienda esta técnica para la remediación de un suelo contaminado con Pb. Sin embargo, los valores de acumulación de As en las raíces y parte aérea de la planta indican la eficiencia de la técnica para la remediación de suelos. El tratamiento el cual contiene 50 mg kg⁻¹ de NPs y bioaumentación con microorganismos resultó el más adecuado para la remediación de suelo en estas condiciones. Por otra parte, en la mezcla de suelo y jales el tratamiento control acumuló una mayor concentración de As en la planta, lo cual se puede atribuir al estrés que provocan las NPs en presencia de los jales.

El factor de bioconcentración en la mezcla de suelo y jales se mantuvo por debajo de 1, lo cual se puede atribuir al tiempo del experimento, debido a que la mayor acumulación del girasol se presenta a los 90 DDS. A pesar de lo anterior, el factor de traslocación se vio favorecido en los tratamientos de suelo y jales, lo que podría ser indicativo de la eficiencia de la remediación. El índice de geoacumulación disminuyó en todos los tratamientos con respecto al calculado al inicio del experimento lo cual indica que la fitorremediación en combinación de NPs y microorganismos ayuda al proceso de eliminación de contaminantes.

VIII- Recomendaciones

- Como parte de la investigación se recomienda que los residuos de carbón a analizar sean residuos los cuales se encuentren depositados en las presas de jales por un largo tiempo (>5 años), sin haberse tratado y estar expuestos a las condiciones climáticas.
- Se recomienda utilizar concentraciones más bajas (<50 mg kg⁻¹) de NPs con el objetivo de evaluar si se ven afectadas las características morfológicas de las plantas y evaluar si presenta algún beneficio.
- Se sugiere que se realice el experimento por al menos 90 días y que se lleven a cabo muestreos destructivos a los 30 y 60 días con el objetivo de evaluar la capacidad de remediación en cada uno de los tiempos establecidos.

IX-Bibliografía

- [1] S. A. Covarrubias, J. J. Peña Cabriales. Contaminación ambiental por metales pesados en México: problemática y estrategias de fitorremediación. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 33 (2017) 7-21.
- [2] Y. R. Ramos-Arroyo, C. D. Siebe-Grabach. Estrategia para identificar jales con potencial de riesgo ambiental en un distrito minero: estudio de caso en el Distrito de Guanajuato, México. *Rev. Mex. Cienc. Geol.* 23 (2006) 54-74.
- [3] H. Ali, E. Khan, M. A. Sajad. Phytoremediation of heavy metals-Concepts and applications. *Chemosphere.* 91 (2013) 869-881.
- [4] B. Song, P. Xu, M. Chen, W. Tang, G. Zeng, J. L. Gong, P. Zhang, S. J. Ye. Using nanomaterials to facilitate the phytoremediation of contaminated soil. *Crit. Rev. Env. Sci. Tec.* 49 (2019) 791-824.
- [5] N. Rodríguez-Eugenio, M. McLaughlin, D. Pennock, *Soil Pollution: A Hidden Reality*, Food and Agriculture Organization, Rome, 2018.
- [6] E. Morillo, F. Madrid, A. Lara-Moreno, J. Villaverde. Soil bioremediation by cyclodextrins. A review. *Int. J. Pharm.* 591 (2020) Número de artículo: 119943.
- [7] L. Liu, W. Li, W. Song, M. Guo. Remediation techniques for heavy metal-contaminated soils: Principles and applicability. *Sci. Total Environ.*, 633 (2018) 206-219.
- [8] W. Ahmad, U. Najeeb, M. H. Zia, in: K. R. Hakeem, M. Sabir, M. Öztürk, A. R. Mermut (Eds.), *Soil Remediation and Plants*, Academic Press, London. 2015, pp. 37-61.
- [9] H. Y. Zhang, X. Z. Yuan, T. Xiong, H. Wang, L. B. Jiang. Bioremediation of co-contaminated soil with heavy metals and pesticides: Influence factors, mechanisms and evaluation methods. *Chem. Eng. J.* 398 (2020) Número de artículo: 125657.
- [10] A. Kicinska, J. Wikar. Ecological risk associated with agricultural production in soils contaminated by the activities of the metal ore mining and processing industry - example from southern Poland. *Soil. Till. Res.* 205 (2015) Número de artículo: 104817.

- [11] M. A. Salas-Luevano, R. Puente-Cuevas, H. R. Vega-Carrillo. Concentrations of heavy metals and measurement of ^{40}K in mine tailings in Zacatecas, Mexico. *Environ. Earth. Sci.* 80 (2021) Número de artículo: 186.
- [12] R. Corona-Esquivel, J. Tritilla, M. E. Benavides-Muñoz, N. piedad-Sánchez, I. Ferrusquía-Villafranca. Geología, estructura y composición de los principales yacimientos de carbón mineral en México. *Bol. Soc. Geol. Mex.* 58 (2006) 141-160
- [13] NOM-157-SEMARNAT-2009, Norma Oficial Mexicana número 157 de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. <https://www.gob.mx/profepa/documentos/norma-oficial-mexicana-nom-157-semarnat-2009>, descargada el 08 de agosto de 2021.
- [14] M. Gabarrón, R. Zornoza, J. A. Acosta, A. Faz, S. Martínez-Martínez, in: P. Pereira (Eds.), *Advances in Chemical Pollution, Environmental Management and Protection*, Elsevier Science Publishing Co Inc. United States, 2019, pp. 157-205.
- [15] F.M. Romero, M. A. Armienta, G. González- Hernández. Solid-phase control on the mobility of potentially toxic elements in an abandoned lead/zinc mine tailings impoundment, Taxco, Mexico. *Appl. Geochem.* 22 (2007) 109-27.
- [16] F. Martín-Romero, M. Gutiérrez-Ruiz. Estudio comparativo de la peligrosidad de jales en dos zonas mineras localizadas en el sur y centro de México. *Bol. Soc. Geol. Mex.* 62 (2010) 43-53.
- [17] K. L. Ramos-Méndez. Caracterización fisicoquímica de los jales de carbón del ejido santa maría, San Juan de Sabinas-Coahuila. Tesis de Licenciatura en Ingeniería en Recursos Minerales y Energéticos de la Universidad Autónoma de Coahuila (2015).
- [18] A. L. Flores-Hernández. Reconocimiento de elementos potencialmente tóxicos en jales de carbón. Tesina de Licenciatura en Ingeniería en Recursos Minerales y Energéticos de la Universidad Autónoma de Coahuila (2019).
- [19] S. Khalid, M. Shahid, N.K. Niazi, B. Murtaza, I. Bibi, C. Dumat. A comparison of technologies for remediation of heavy metal contaminated soils. *J. Geochem. Explor.* 182 (2017) 247-268.

- [20] L. W. Wang, D. Y. Hou, Z. T. Shen, J. Zhu, X. Y. Jia, Y. S. Ok, F. M. G. Tack, J. Rinklebe. Field trials of phytomining and phytoremediation: A critical review of influencing factors and effects of additives. *Crit. Rev. Env. Sci. Tec.* 50 (2019) 2724-2774.
- [21] H. Timalina, T. Gyawali, S. Ghimire, S.R. Paudel. Potential application of enhanced phytoremediation for heavy metals treatment in Nepal. *Chemosphere.* 306 (2022) Número de artículo: 135581.
- [22] W. M. Xu, P. Xiang, X. Liu, L. N. Q. Ma. Closely related species of hyperaccumulating plants and their ability in accumulation of As, Cd, Cu, Mn, Ni, Pb and Zn. *Chemosphere.* 251 (2020) Número de artículo: 126334.
- [23] S. X. Liang, Y. Jin, W. Liu, X. Li, S.G. Shen y L. Ding. Feasibility of Pb phytoextraction using nano-materials assisted ryegrass: Results of a one-year field-scale experiment. *J Environ Manage.* 190 (2017) 170-175.
- [24] X. Huang, D. Luo, X. Chen, L. Wei, Y. Liu, Q. Wu, T. Xiao, X. Mai, G. Liu y L. Liu. Insights into heavy metals leakage in chelator-induced phytoextraction of Pb-and Tl-contaminated soil. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 16 (2019) Número de artículo: 1328.
- [25] C.D. Jadia, M.H. Fulekar. Phytoremediation: The application of vermicompost to remove zinc, cadmium, copper, nickel and lead by sunflower plant. *Environ. Eng. Manag. J.* 7 (2008) 547-558.
- [26] R. De Marco, R.F. da Silva, C.O. Da Ros, M. Vanzam, D. Boeno. Senna multijuga and peat in phytostabilization of copper in contaminated soil. *Rev. Bras. de Eng. Agrícola e Ambient.* 21 (2017) 421-426.
- [27] F. Guarino, A. Miranda, S. Castiglione, A. Ciatelli. Arsenic phytovolatilization and epigenetic modifications in *Arundo donax* L. assisted by a PGPR consortium. *Chemosphere.* 251 (2020) Número de artículo: 126310.
- [28] M. Sakakibara, A. Watanabe, M. Inoue, S. Sano, T. Kaise. Phytoextraction and phytovolatilization of arsenic from As-contaminated soils by *Pteris vittata*. *ANN APICS* 12 (2010) 267-272.

- [29] E. Agostini, M.S. Coniglio, S.R. Milrad, H.A. Tigier, A.M. Giulietti. Phytoremediation of 2, 4-dichlorophenol by *Brassica napus* hairy root cultures. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 37 (2003) 139-144.
- [30] J. Favas, J. Pratas, M. Prasad. Accumulation of arsenic by aquatic plants in large-scale field conditions: opportunities for phytoremediation and bioindication. *Sci. Total Environ.* 433 (2012) 390-397.
- [31] G. Seiler, L.F. Marek. Germplasm resources for increasing the genetic diversity of global cultivated sunflower. *Helia.* 34 (2011) 1-20.
- [32] N.C. Kane, J.M. Burke, L. Marek, G. Seiler, F. Vear, G. Baute, S. T. Knapp, P. Vincourt, L. H. Rieseberg. Sunflower genetic, genomic and ecological resources. *Mol Ecol Resour.* 13 (2013) 10-20.
- [33] P. Rajiv, P. Vanathi, A. Thangamani. An investigation of phytotoxicity using *Eichhornia* mediated zinc oxide nanoparticles on *Helianthus annuus*. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 16 (2018) 419-424.
- [34] M. C. January, T. J. Cutright, H. van Keulen, R. Wei. Hydroponic phytoremediation of Cd, Cr, Ni, As, and Fe: Can *Helianthus annuus* hyperaccumulate multiple heavy metals. *Chemosphere.* 70 (2008) 531-537.
- [35] Z. A. Sahito, A. Zehra, L. Tang, Z. Ali, M. L. U. R. Hashmi, N. Bano, M. A. Ullah, Z. L. He, X. E. Yang. Arsenic and mercury uptake and accumulation in oilseed sunflower accessions selected to mitigate co-contaminated soil coupled with oil and bioenergy production. *J. Clean. Prod.* 291 (2021) Número de artículo: 125226.
- [36] K. A. Alaboudi, B. Ahmed, y G. Brodie. Phytoremediation of Pb and Cd contaminated soils by using sunflower (*Helianthus annuus*) plant. *Ann. Agric. Sci.* 63 (2018) 123-127.
- [37] I. Corsi, M. Winther-Nielsen, R. Sethi, C. Punta, C. Della Torre, G. Libralato, G. Lofrano, L. Sabatini, M. Aiello, L. Fiordi, F. Cinuzzi, A. Caneschi, D. Pellegrini, I. Buttino. Ecofriendly nanotechnologies and nanomaterials for environmental applications: Key issue and consensus recommendations for sustainable and ecosafe nanoremediation. *Ecotox. Environ. Safe.* 154 (2018) 237-244.

- [38] A. Kumar, G. Subrahmanyam, R. Mondal, M. M. S. Cabral-Pinto, A. A. Shabnam, D. K. Jigyasu, S. K. Malyan, R. K. Fagodiya, S. A. Khan, A. Kumar, Z. G. Yu. Bio-remediation approaches for alleviation of cadmium contamination in natural resources. *Chemosphere*. 268 (2021) Número de artículo: 128855.
- [39] J. Liu, W. Q. Guo, D. C. Shi. Seed germination, seedling survival, and physiological response of sunflowers under saline and alkaline conditions. *Photosynthetica*. 48 (2010) 278-286.
- [40] A. S. Ganie, S. Bano, N. Khan, S. Sultana, Z. Rehman, M. M. Rahman, S. Sabir, F. Coulon, M. Z. Khan. Nanoremediation technologies for sustainable remediation of contaminated environments: Recent advances and challenges. *Chemosphere*. 275 (2021) Número de artículo: 130065.
- [41] A. G. Khan. Promises and potential of in situ nano-phytoremediation strategy to mycorrhizoremediate heavy metal contaminated soils using non-food bioenergy crops (*Vetiver zizinoides* & *Cannabis sativa*). *Int. J. Phytoremediat.* 22 (2020) 900-915.
- [42] P. Landa. Positive effects of metallic nanoparticles on plants: Overview of involved mechanisms. *Plant Physiol. Bioch.* 161 (2021) 12-24.
- [43] A. D. Zand, A. M. Tabrizi, A. V. Heir. Co-application of biochar and titanium dioxide nanoparticles to promote remediation of antimony from soil by *Sorghum bicolor*: metal uptake and plant response. *Heliyon*. 6 (2020) Número de artículo: e04669.
- [44] J. Singh, y B. K. Lee. Effects of Nano-TiO₂ particles on bioaccumulation of Cs-133 from the contaminated soil by Soybean (*Glycine max*). *Process Saf. Environ. Prot.* 116 (2018) 301-311.
- [45] Z. Zahra, T. Maqbool, M. Arshad, M. A. Badshah, H. K. Choi y J. Hur. Changes in fluorescent dissolved organic matter and their association with phytoavailable phosphorus in soil amended with TiO₂ nanoparticles. *Chemosphere*. 227 (2019) 17-25.
- [46] NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004, Norma Oficial Mexicana número 147 de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. <https://www.gob.mx/profepa/documentos/norma-oficial-mexicana-nom-147-semarnat-ssa1-2004>, Fecha de consulta: 17 de agosto del 2021.

- [47] SEMA, Clasificación de suelos de la Secretaría de Medio Ambiente. (2011). <https://www.sema.gob.mx/SRN-SIIAECC-DG-MF-SUELOS.php>, Fecha de consulta: 27 de agosto del 2021.
- [48] SMN, Normales climatológicas del estado de Coahuila de Zaragoza. (2010). <https://smn.conagua.gob.mx/es/informacion-climatologica-por-estado?estado=coah>, Fecha de consulta: el 23 de agosto del 2021.
- [49] R. G. Petersen, L. D. Calvin, in: C. A. Black, D. D. Evans, L. E. Ensminger, J. L. White, F. E. Clark (Eds.), *Methods of Soil Analysis: Part 1 Physical and Mineralogical Properties, Including Statistics of Measurement and Sampling*, The American Society of Agronomy, Inc. Wisconsin, 1965, pp. 57-72.
- [50] A. Pérez-Moreno, C. R. Sarabia-Castillo, G. Medina Pérez, H. Pérez-Hernández, J. Roque De La Puente, S. González-Pozos, L. Corlay-Chee, A. Chamizo-Checa, R. G. Campos-Montiel, F. Fernández-Luqueño. Nanomaterials modify the growth of crops and some characteristics of organisms from agricultural or forest soils: An experimental study at laboratory, greenhouse and land level. *Mex. J. Biotechnol.* 4 (2019) 29-49.
- [51] Y. Kaya, R. Vasilevska-Ivanova, in: M. Tehseen Azhar, S. Hussain Wani (Eds.), *Wild Sunflowers: The Primary Genetic Resource for Sunflower Breeding*, Academic Press, Pakistan, 2021, pp. 153-185.
- [52] G. W. Thomas, in: D. L. Sparks, A. L. Page, P. A. Helmke, R. H. Loeppert, P. N. Soltanpour, M. A. Tabatabai, C. T. Johnston, M. E. Sumner (Eds.), *Methods of soil analysis part 3 chemical methods*, Soil Science Society of America, Inc. Wisconsin, 1996, pp. 475-490.
- [53] J. D. Rhoades, in: A. L. Page (Eds.), *Methods of soil analysis part 2 chemical and microbiological properties second edition*, Soil Science Society of America, Inc. Wisconsin, 1982, pp. 167-179.
- [54] M. H. Salehi, O. H. Beni, H. B. Harchegani, I. E. Borujeni, H. R. Motaghian.: Refining Soil Organic Matter Determination by Loss-on-Ignition. *Pedosphere.* 21 (2011) 473-482.
- [55] G. L. Bouyocos. Hydrometer method improved for making particle size analyses of soils. *Agron. J.* 54 (1962) 464.

- [56] D. J. Muñoz-Iniestra, A. Mendoza-Cantu, F. López-Galindo, A. Soler-Aburto y M. M. Hernández -Moreno, Edafología: Manual de métodos de análisis de suelo, Estado de México: UNAM, FES Iztacala, 2000.
- [57] FAO, GLOSOLAN (Global Soil Laboratory Network): Standard operation procedure for total carbon. Dumas Dry combustion method, 2^a. ed., FAO., Italy, 2019.
- [58] ISTA, International Rules for Seed Testing, 1^a. ed., International Seed Testing Association, Suiza, 2016.
- [59] L. W. Marzan, M. Hossain, S. A. Mina, Y. Akter, A. M. M. A. Chowdhury. Isolation and biochemical characterization of heavy-metal resistant bacteria from tannery effluent in Chittagong city, Bangladesh: Bioremediation viewpoint. Egypt. J. Aquat. Res. 43 (2017) 65-74.
- [60] N. Jayan, M. L. D. Bhatlu. Isolation and studies on zinc removal using microorganism from contaminated soil. Mater Today-Proc. 44 (2021) 1892-1897.
- [61] D. Kalaimurugan, B. Balamuralikrishnan, K. Durairaj, P. Vasudhevan, M. S. Shivakumar, T. Kaul, S. W. Chang, B. Ravindran, S. Venkatesan. Isolation and characterization of heavy-metal-resistant bacteria and their applications in environmental bioremediation. Int. J. Environ. Sci. Technol. 17 (2020) 1455-1462.
- [62] **NOM-092-SSA1-1994**, Norma Oficial Mexicana número 092 de la Secretaría de Salud. https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4886029&fecha=12/12/1995#gsc.tab=0, Fecha de consulta: 17 de agosto del 2021.
- [63] J. L. Donay, P. Fernandes, P. H. Lagrange, J. L. Herrmann. Evaluation of the inoculation procedure using a 0.25 McFarland standard for the BD Phoenix automated microbiology system. J. Clin. Microbiol.,45 (2007) Número de artículo: 4088.
- [64] US-EPA, SW-846 Test Method 7000B: Flame Atomic Absorption Spectrophotometry. (2007). <https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-12/documents/7000b.pdf>, Fecha de consulta: 20 de agosto del 2021
- [65] A. R. Wellburn. The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. J. Plant. Physiol. 144 (1994) 307-313.

- [66] D. I. Arnon. Copper enzymes in isolated chloroplasts - polyphenoloxidase in beta-vulgaris. *Plant. Physiol.* 24 (1949) 1-15.
- [67] A. Pequerul, C. Pérez, P. Madero, J. Val, E. Monge, en: M. A. C. Fragoso, M. L. Van Beusichem y A. Houwers (Eds.), *Developments in plant and soil sciences* vol. 53, Springer, Dordrecht, 1993 3-6.
- [68] G. Müller. Schwermetalle in den Sedimenten des Rheins-Veränderungen seit 1971. *Umsch. Wissensch. Techn.* 79 (1979) 778-783.
- [69] S. R. Taylor, S. M. McLennan. in: R. A. Meyers (Eds.), *Encyclopedia of Physical Science and Technology* (Third Edition), Academic Press, New York, 2001, pp. 697-719.
- [70] R. López-Aguilar, B. Murillo-Amador, M. Benson-Rosas, E. López-Arce, G. Valle-Meza. *Análisis Químicos de Suelos*. 1ª. ed., Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. La Paz, B.C.S, México.
- [71] USDA (United States Department of Agriculture). *Soil survey laboratory methods manual*. Soil survey investigations Report N°42, 4ª. ed., U.S. Department of Agriculture, Washington DC, 2004.
- [72] R.R. Weil, N.C. Brady, *The nature and properties of soils*, 15ª. ed., Pearson Education Limited, England, 2017.
- [73] K. Baudhdh, R.P. Singh. Growth: tolerance efficiency and phytoremediation potential of *Ricinus communis* (L.) in salinity and drought affected cadmium contaminated soil. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 85 (2012) 13-22.
- [74] J. Forte, S. Mutiti. Phytoremediation potential of *Helianthus annuus* and *Hydrangea paniculata* in copper and lead-contaminated soil. *Water Air Soil Pollut.* 228 (2017) 1-11.
- [75] A. Kushwaha, N. Hans, S. Kumar, R. Rani. A critical review on speciation, mobilization and toxicity of lead in soil-microbe-plant system and bioremediation strategies. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 147 (2018) 1035-1045.