



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE EDAFOLOGÍA

PLANTAS RIPARIAS Y SU POSIBLE USO EN FITORREMEDIACIÓN

ERÉNDIRA CARMONA CHIT

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2016

La presente tesis titulada: **PLANTAS RIPARIAS Y SU POSIBLE USO EN FITORREMEDIACIÓN**, realizada por la alumna **Eréndira Carmona Chit** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS

EDAFOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



Dr. Rogelio Carrillo González

ASESORA



Dra. Ma. del Carmen Ángeles González Chávez

ASESORA



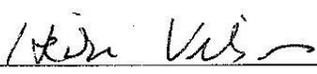
Dra. Adriana Delgado Alvarado

ASESORA



Dra. Laura Yañez Espinosa

ASESORA



Dra. Heike Vibrans Lindemann

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Diciembre de 2016.

PLANTAS RIPARIAS Y SU POSIBLE USO EN FITORREMEDIACIÓN

Eréndira Carmona Chit, Dra

Colegio de Postgraduados, 2016

RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivos identificar los factores edáficos que influyen en la biodiversidad de las comunidades vegetales y evaluar la tolerancia de una especie modelo (*Bacopa monnieri* (L.) Pennell) a los elementos potencialmente tóxicos (EPT) contenidos en residuos de mina. En la primera parte se hizo una exploración de las comunidades vegetales de ribera adyacentes a dos tipos de residuos de mina de Zimapán, Hidalgo. Se evaluaron los factores edáficos que intervienen en la biodiversidad de estas comunidades, particularmente los relacionados con los escurrimientos y lixiviados de residuos de mina. Se analizaron las estrategias de tolerancia de las especies a las altas concentraciones de EPT. En la segunda parte se plantó *B. monnieri* en residuos de mina ácidos y alcalinos; se determinó su capacidad de acumulación de EPT y respuesta antioxidante. También se exploró la neutralización de los residuos ácidos, como medida previa al establecimiento de la planta. Los resultados mostraron que la acidez es el principal factor que influye en la diversidad de especies. La concentración de EPT en las 34 especies analizadas fue mayor que los niveles fitotóxicos, en el siguiente orden: Zn > Pb > Cu > Ni > Cd. *B. monnieri* demostró ser una especie altamente tolerante a las altas concentraciones de EPT que puede ser útil en el tratamiento pasivo de residuos de minas por humedales, tanto ácidos como alcalinos.

Palabras clave: Bioacumulación de metales, tolerancia, residuos de mina, humedales.

RIPARIAN PLANTS FOR PHYTOREMEDIATION OF MINE WASTE

Eréndira Carmona Chit, Dra

Colegio de Postgraduados, 2016

ABSTRACT

The aims of this research were to identify soil factors affecting biodiversity of plant communities near to mine wastes and evaluate the ability of a native plant species (*Bacopa monnieri*) to potential toxic elements (PTE) toxicity from mine wastes. On one hand a survey was carried out on riverside vegetation communities adjacent to two types of mine tailings at Zimapán Hidalgo. We explored the edaphic factors affecting the biodiversity of these communities, particularly those related to runoff and leachate of mine waste. The tolerance strategies of these species to the high concentrations of PTE were addressed. On other hand, revegetation of alkaline and acid mining wastes with *B. monnieri* was analyzed: its accumulation capacity and antioxidant response were recorded. Finally, amendment of mine acid wastes was tested as a complementary measure for *B. monnieri* revegetation in a passive wetland treatment system. Soil acidity is closely related to the content of organic matter, and is the main factor influencing plant diversity. Accumulation of PTE was the most widespread strategy. Plant tissues from 34 plant species concentrate PTE in the following order: Zn> Pb> Cu> Ni> Cd at higher concentrations considered higher than the phytotoxic levels. *Bacopa monnieri* is a species highly tolerant to the high concentrations of PTE during a time of 12 weeks; and that it can be useful in the passive treatment of residues of both acidic and alkaline mines.

Key words: Metal-bioaccumulation, tolerant plants, mine tailings, wetlands.

DEDICATORIA

- A mi Dios Yahveh, Jehová, Elohim, Shalom, Raphá, Addoná, Shadaí. Gracias por permitirme este capricho. Sabes que mi vida es tuya. Vivo para Ti. A tí sea la Gloria, la Honra, el Honor y la Alabanza por siempre.

Cada vez que miro a través de un microscopio o veo las estrellas, cada vez que descubro con qué exactitud y precisión hiciste funcionar la naturaleza, compruebo la verdad de lo que está escrito: **“Y vio Dios todo lo que había hecho y he aquí que era bueno en gran manera”** Gracias por darme la oportunidad de apreciar tus maravillas y sorprenderme como ese niño cuando descubre las manos de su madre.

- A mi madre Alfonsina Sé que aunque no te vea disfrutas conmigo cada uno de mis logros. Gracias por enseñarme la constancia, la tenacidad, el carácter, la fidelidad. Te amo mamita.
- A mi padre Leopoldo Por tu gran corazón y amor incondicional para conmigo.
- A mi familia de origen: Irene, Silvia y Leopoldo Gracias por todo su apoyo y amor expresado en cada instante. Somos una gran familia.
- A mi esposo Humberto Gracias mi Piel Roja por soportar mis locuras y enseñarme la libertad. Por todo tu apoyo incondicional en los momentos de adversidad. Por las luchas compartidas. Este logro es nuestro.
- A mis hijas Mitzi, Paola y Laura Gracias por soportarme todo este tiempo. Las amo mis catarinas. Gracias por su apoyo en todos los proyectos que emprendemos juntos.
- A mis hermanos de “Shalom” Gracias por su paciencia apoyo y comprensión en mis ausencias. Gracias porque hemos aprendido a crecer juntos. Mis logros son los suyos también.

AGRADECIMIENTOS

- ♣ **Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** por la beca otorgada para mis estudios de Doctorado en el Colegio de Postgraduados.

- ♣ Al proyecto **Atlas de riesgo y vulnerabilidad por la dispersión de metales pesados por viento y lixiviados de residuos de mina, PDCPN1023-01-215241** por el financiamiento otorgado.

- ♣ **Al Colegio de Postgraduados** Institución que opera con fondos públicos, especialmente al **Programa de Edafología** por la oportunidad brindada para crecer en el ámbito profesional.

- ♣ **A los Doctores Rogelio Carrillo González, Ma. del Carmen Ángeles González Chávez, Heike Vibrans Lindemann, Adriana Delgado Alvarado y Laura Yañez Espinosa.** Por su confianza al aceptar ser parte de mi consejo particular. Por compartir conmigo sus conocimientos. Por cada reto planteado. Por intervenir de manera decisiva en mi formación profesional. Por su paciencia y calidad humana. Por guiar mis pasos al camino de la excelencia. Por su apoyo incondicional. Por alentarme a seguir adelante en los momentos difíciles y sacar lo mejor de mí.

- ♣ **A mis maestros del Área de Química M.C. Jaime Cruz Díaz y C. Bibiano Ramírez Vega.** Por facilitarme el uso de las instalaciones y equipo para el desarrollo de esta investigación. Porque en el trato cotidiano me enseñaron, paso a paso, cada uno de los secretos en la interesante tarea de la investigación. Gracias por su experiencia y paciencia para conmigo.

- ♣ A todos mis compañeros, colegas, amigos y a todos los que con tan sólo una mirada y una sonrisa me dieron aliento en los momentos de crisis.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
CAPÍTULO I. RIPARIAN PLANTS ON MINE RUNOFF IN ZIMAPAN, HIDALGO, MEXICO: USEFUL FOR PHYTOREMEDIATION.....	3
Resumen.....	3
Abstract.....	4
Introduction.....	5
Materials and Methods.....	6
Description of Area.....	6
Sampling.....	8
Analytical Procedures.....	8
Statistical Analysis.....	10
Results and Discussion.....	10
Water Quality.....	10
Plants Found in the Area of Influence of the Creek.....	10
Characteristics of Rhizosphere and Non- rhizosphere Soil.....	18
Total and Available PTE Concentrations in Soils.....	19
PTE Concentrations in Plants.....	23
Conclusions.....	31
Cited Literature.....	32
CAPÍTULO II. COMUNIDADES VEGETALES RIPARAS EN LA ZONA DE INFLUENCIA DE RESIDUOS DE MINA: FACTORES QUE DETERMINAN SU DIVERSIDAD.....	35
Resumen.....	35
Abstract.....	36
Introducción.....	37
Materiales y Métodos.....	39
Área de Estudio.....	39
Toma de Muestras.....	40
Análisis Estadístico.....	42

Análisis de Cobertura.....	42
Resultados.....	43
Suelo.....	46
Plantas.....	47
Discusión.....	53
Conclusiones.....	58
Literatura Citada.....	59
CAPÍTULO III. ANTECEDENTES SOBRE <i>Bacopa monnieri</i> (L.) Pennell Y LA	
ABSORCIÓN DE EPT.....	63
Resumen.....	63
Abstract.....	64
Descripción Morfológica.....	65
Capacidad de Acumulación de EPT en <i>B. monnieri</i>	66
Órganos de Bioacumulación en <i>B. monnieri</i>	72
Estudios de Bioacumulación con Mezcla de EPT.....	73
Cambios Estructurales por Efecto de la Bioacumulación de EPT en <i>B. monnieri</i>	75
Estudios de <i>B. monnieri</i> Asociada a Otras Especies Vegetales y su Importancia en la	
Fitorremediación.....	76
Interacción de los Factores del Medio con las Concentraciones Acumuladas.....	76
Clasificación de la Especie por sus Niveles de Bioacumulación.....	77
Conclusiones.....	80
Literatura Citada.....	82
CAPÍTULO IV. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y ANTIOXIDANTE DE <i>Bacopa</i>	
<i>monnieri</i> A LA EXPOSICIÓN A RESIDUOS DE MINA.....	84
Resumen.....	84
Abstract.....	85
Introducción.....	86
Materiales y Métodos.....	89
Obtención del Material Vegetal.....	89
Instalación del Experimento en Invernadero.....	90
Sustratos.....	90

Estabilización de Sustratos.....	90
Análisis de Sustratos.....	91
Características de los Sustratos.....	92
Estabilización de los Sustratos.....	93
Trasplante.....	93
Riego.....	94
Diseño Experimental.....	94
Monitoreo y Muestreo.....	95
Procesamiento de Muestras Vegetales.....	98
Análisis Estadístico.....	100
Resultados	100
Sobrevivencia.....	100
Concentración Extractable de EPT.....	101
Biomasa.....	103
EPT en Plantas.....	104
Enzimas Antioxidantes.....	106
Pigmentos Fotosintéticos.....	109
Discusión.....	112
Biomasa.....	112
Procesos Redox en los Sustratos.....	115
Concentración Extractable de EPT.....	116
EPT en Planta.....	117
Enzimas Antioxidantes.....	120
Conclusiones.....	125
Literatura Citada.....	125
DISCUSIÓN GENERAL.....	130
CONCLUSIONES GENERALES.....	133
RECOMENDACIONES	133
BIBLIOGRAFÍA GENERAL.....	134

ANEXO I. UTILIDAD DE <i>Bacopa monnieri</i> EN LA FITORREMEDIACIÓN DE RESIDUOS DE MINA.....	135
Resumen.....	135
Abstract.....	136
Introducción.....	137
Materiales y Métodos.....	142
Neutralización del Sustrato.....	142
EPT en Planta.....	143
Condiciones Finales del Experimento.....	144
Diseño Experimental y Análisis Estadístico.....	144
Resultados.....	144
Características del Sustrato.....	144
Discusión.....	147
Conclusiones.....	149
Literatura Citada.....	150
ANEXO II. PRODUCTOS DE LA TESIS.....	152

LISTA DE TABLAS

Table 1.1. Selected physico-chemical characteristics of the water from the Santiago River, Zimapán, Hidalgo.....	12
Table 1.2. Species of plants collected in Santiago River, Zimapán, Hidalgo.....	13
Table 1.3. Potentially toxic elements concentrations (mg kg ⁻¹) in rhizosphere and non-rhizosphere soil from terrestrial plants at the Santiago River, Zimapán, México.....	14
Table 1.4. Potentially toxic elements concentrations (mg kg ⁻¹) in rhizosphere and non-rhizosphere soil from wetland and aquatic plants from the Santiago River, Zimapán, México.....	15
Table 1.5. Selected physico-chemical characteristics of the water from the Santiago River, Zimapán, Hidalgo.....	20
Table 1.6. Bioconcentration factors (BCF) for plants collected at Zimapán, Hidalgo.....	27
Table 1.7. Translocation factors (TF) for plants collected from Zimapán, Hidalgo.....	28
Tabla 2.1. Características del suelo de rizósfera por estación. Riqueza y diversidad de especies.....	46
Tabla 2.2. Resultados del análisis de regresión múltiple.....	48
Tabla 2.3. Lista de especies encontradas en las estaciones I y V, y su correspondiente índice de cobertura-abundancia de Braun-Blanquet.....	52
Tabla 3.1 Concentraciones máximas de EPT bioacumulados por <i>Bacopa monnieri</i> en diversos estudios.....	69
Tabla 4.1 Características del suelo rizosférico de <i>Bacopa monnieri</i> en campo.....	89
Tabla 4.2 Características fisicoquímicas de los sustratos al inicio del experimento	92
Tabla 4.3 Concentración de EPT en los sustratos empleados (mg kg ⁻¹).....	93
Tabla 4.4 Arreglo factorial en diseño completamente al azar empleado en el experimento.....	95

Tabla 4.5 Resultado del ANDEVA y SNK.....	112
Tabla A.1 Proporción de Ca(OH)_2 requeridos para la neutralización del residuo Pal	143
Tabla A.2 Características fisicoquímicas del residuo minero al inicio del experimento.....	144
Tabla A.3 Concentración de EPT en los sustratos empleados (mg kg^{-1}).....	145
Tabla A.4 Concentración extractable de EPT en el sustrato al inicio y al final del experimento (mg kg^{-1}).....	145

LISTA DE FIGURAS

Figure 1.1	Mine tailings next to the Santiago River	7
Figure 1.2	Concentration of potentially toxic elements in plant tissues established along to the Santiago River, Zimapán, Hidalgo.....	24
Figura 2.1	Formas de vida de la vegetación herbácea y esquema de distribución en el sitio de estudio.	44
Figura 2.2	Porcentaje por estación de: A) formas de vida, B) familias de plantas y C) ciclo de vida.....	50
Figura 2.3	Índices de similitud (Sörensen y Jaccard) entre estaciones.....	51
Figura 3.1	Morfología de <i>Bacopa monnieri</i> y hábito de la planta.....	66
Figura 4.1	Sistema de riego por subirrigación durante el experimento.....	94
Figura 4.2	Efecto de la estabilización de los sustratos sobre la concentración extractable de EPT.....	96
Figura 4.3	Temperatura media y la humedad relativa durante el experimento.....	97
Figura 4.4	Muestreo de tejido vegetal y manejo de muestras.....	99
Figura 4.5	Aspecto de las plantas después de tres semanas del experimento.....	101
Figura 4.6	pH y CE durante el experimento	101
Figura 4.7	Concentración extractable (DTPA) de EPT con respecto al pH en los sustratos empleados	102
Figura 4.8	Biomasa de <i>Bacopa monnieri</i> durante el experimento.....	103
Figura 4.9	Concentración de EPT en <i>Bacopa monnieri</i> durante las semanas de exposición a los residuos de minas.....	105
Figura 4.10	Actividad de la glutatión reductasa en parte aérea (a) y la raíz (b) de <i>Bacopa monnieri</i> durante los tres tratamientos.....	107
Figura 4.11	Actividad de la catalasa en parte aérea (a) y la raíz (b) de <i>Bacopa monnieri</i> durante los tres tratamientos.	108
Figura 4.12	Concentración de clorofila a (a) y clorofila b (b) en las hojas de <i>Bacopa monnieri</i> durante el experimento.....	110

Figura 4.13	Concentración de clorofilas totales (a) y carotenoides (b) en las hojas de <i>Bacopa monnieri</i> durante el experimento.....	111
Figura A.1	pH a lo largo del tratamiento de neutralización.....	146
Figura A.2	CE a lo largo del tratamiento de neutralización.....	146
Figura A.3	Concentración total de EPT en <i>Bacopa monnieri</i> después del experimento....	147

INTRODUCCIÓN GENERAL

Las actividades mineras han afectado la calidad de los recursos como suelo y agua dentro de su área de influencia, por las altas concentraciones de contaminantes, como los elementos potencialmente tóxicos (EPT). Los EPT incluyen elementos esenciales que son requeridos en muy bajas concentraciones por los organismos, pero son tóxicos a altas concentraciones. También consideran elementos no esenciales y que son tóxicos aun a bajas concentraciones. (Carrillo-González, 2005). Sus efectos a corto y mediano plazo dependen en gran medida, de su concentración (Yarto, 2005), propiedades (Guillizoni, 1991), y procesos que sufren en el suelo.

Los EPT liberados en el suelo y expuestos a procesos de lixiviación constituyen un riesgo para los diferentes componentes bióticos de las cadenas tróficas (González-Chávez, 2005).

Una necesidad apremiante es encontrar alternativas que ayuden a disminuir los altos niveles de contaminación por EPT en los sitios contaminados. La fitorremediación consiste en un conjunto de procesos continuos, en los que las plantas pueden extraer, inmovilizar y transformar EPT, reduciendo su impacto sobre el ambiente. Estas tecnologías pueden ayudar a controlar la contaminación por EPT; son de bajo impacto ambiental y costo, pero es necesario diseñar los procedimientos de implementación.

En México el desarrollo de fitotecnologías es todavía incipiente, ya que depende del conocimiento de especies endémicas que estén adaptadas a ambientes con altas concentraciones de EPT. Las plantas que crecen en sitios contaminados con residuos de mina constituyen un banco importante de ecotipos genéticamente adaptados a las altas concentraciones de EPT, que podrían emplearse en la fitorremediación (Barrutia, 2011), sin necesidad de recurrir a especies exóticas. No obstante, muchos aspectos sobre este tipo de vegetación, incluyendo sus límites de tolerancia y bioacumulación aún son desconocidos.

Por otra parte, el diseño y propuesta de paquetes tecnológicos para el tratamiento de efluentes, que incluyan una variedad suficiente de plantas acuáticas cuyas características sean complementarias en el proceso de fitorremediación, representa un reto impostergable. En la presente investigación se hizo un estudio prospectivo de las macrofitas acuáticas en la zona de influencia de minas en Zimapán, Hidalgo, para conocer su posible uso en la fitorremediación.

Así mismo se evaluó la supervivencia de una planta modelo en suelos contaminados. El conocimiento generado en esta investigación, podría emplearse como criterio para la selección de esta especie dentro de paquetes de fitorremediación de aguas y suelos contaminados con EPT.

Esta tesis se presenta en dos partes: La primera es un estudio de las comunidades vegetales de ribera adyacentes a dos tipos de residuos de mina de Zimapán Hidalgo. El objetivo de esta parte fue identificar los factores edáficos que influyen en la biodiversidad de las comunidades vegetales, en particular los relacionados con los escurrimientos y lixiviados de residuos de mina. La segunda parte se probó el establecimiento de una especie en suelos contaminados. El objetivo de esta fase fue evaluar la capacidad de tolerancia de una especie modelo (*B. monnieri* (L.) Pennell) a los EPT contenidos en residuos de mina, considerando su posible uso en fitorremediación de suelos contaminados.

Como primer hipótesis se planteó que la concentración de EPT es el factor más limitativo de diversidad en las comunidades de ribera del río que crecen bajo la influencia de los contaminantes. Como segunda hipótesis se propuso que las plantas de *B. monnieri* pueden crecer en suelos con residuos de mina y por tanto puede ser empleada en la estabilización de EPT en sistemas de tratamiento pasivo de residuos de mina en humedales.

CAPÍTULO I. RIPARIAN PLANTS ON MINE RUNOFF IN ZIMAPAN, HIDALGO, MEXICO: USEFUL FOR PHYTOREMEDIATION?¹

Resumen

La dispersión y el escurrimiento de desechos mineros tienen graves consecuencias para la salud humana y en los ecosistemas de los alrededores. Se hizo un muestreo en agua, suelos y las plantas en transectos perpendiculares a la corriente de Santiago en Zimapán, Hidalgo, el cual recibe sedimentos de escorrentía de dos residuos ácidos de mina y uno alcalino. Se midieron las concentraciones de elementos potencialmente tóxicos (EPT) en agua, suelos (rizosférico y no rizosférico) y en plantas. Se determinaron las concentraciones extractables (DTPA) de Cu, Zn, Ni, Cd y Pb en el suelo de la rizósfera. Se calcularon los factores de bioconcentración y translocación para un ejemplar de cada especie por estación. Las especies ruderales anuales fueron el elemento principal de la vegetación herbácea. La acumulación fue la estrategia más frecuente para hacer frente a las altas concentraciones de Zn, Cu, Ni, Cd y Pb. El orden de la concentración en el tejido vegetal fue Zn > Pb > Cu > Ni > Cd. La mayoría de las plantas contenían concentraciones de PTE considerados fitotóxicas y se comportaron como especies tolerantes de metal. *Rorippa nasturtium-aquaticum* acumuló particularmente altas concentraciones de Cu. *Parietaria pensylvanica* y *Commelina diffusa*, las malas hierbas tropicales comunes, se comportaron como hiperacumuladoras Zn y deben ser estudiados más a fondo.

Palabras clave: bioacumulación de metales, plantas hipertolerantes, desechos mineros

¹ Este capítulo fue publicado con la siguiente referencia: Carmona-Chit E, Carrillo-González R, González-Chávez MCA, Vibrans H, Yáñez-Espinosa L, Delgado-Alvarado A. 2016. Riparian plants on mine runoff in Zimapan, Hidalgo, Mexico: Useful for phytoremediation? *International Journal of Phytoremediation* 18(9): 861-868. Accepted author version posted online: 03 Mar 2016, Published online: 03 Mar 2016. <http://dx.doi.org/10.1080/15226514.2016.1156639>.

Abstract

Dispersion and runoff of mine tailings have serious implications for human and ecosystem health in the surroundings of mines. Water, soils and plants were sampled in transects perpendicular to the stream Santiago in Zimapán, Hidalgo, which receives runoff sediments from two acidic and one alkaline mine tailing. Concentrations of potentially toxic elements (PTE) were measured in water, soils (rhizosphere and non-rhizosphere) and plants. Using DTPA extractable concentrations of Cu, Zn, Ni, Cd and Pb in rhizosphere soil, the bioconcentration and translocation factors were calculated. Ruderal annuals plants formed the principal element of the herbaceous vegetation. Accumulation was the most frequent strategy to deal with high concentrations of Zn, Cu, Ni, Cd and Pb. The order of concentration in plant tissue was Zn>Pb>Cu>Ni>Cd. Most plants contained concentrations of PTE considered phytotoxic and behaved as metal tolerant species. *Rorippa nasturtium-aquaticum* accumulated particularly high concentrations of Cu. *Parietaria pensylvanica* and *Commelina diffusa*, common tropical weeds, behaved as Zn hyperaccumulators and should be studied further.

Keywords: bioaccumulation of metals, hypertolerant plants, mine tailings.

Introduction

Industrial mining activities in America have increased very rapidly in the last 10 years. Numerous sites in Mexico are polluted by residues of abandoned as well as active mines. Potentially toxic elements (PTE) as Zn, Cd and Cu, along with sodium and extreme pH, have intense negative effects on ecosystems in mining areas (Hernández and Pastor, 2008). Zimapán, Hidalgo, is an old mining town with both active and historical mines for Au, Ag, Cu, Hg, Pb, Zn and other minerals. Residues contain varying amounts of sulfides (PbS, ZnS, CdS, FeCu₃), carbonates and other minerals, which are partly deposited in mine tailings, but also had been scattered into the surrounding areas by wind and water (Moreno-Tovar, Barbanson and Coreño-Alonso, 2009).

Oxidation of some of these minerals generates acid drainage and increases the available concentrations of As, Pb, Zn, Cu and Cd. Runoff and leachates of PTE form part of the main environmental problems that require immediate intervention (Sánchez-López *et al.*, 2015; González-Chávez, Sánchez-López and Carrillo-González, 2015). Phytoremediation can be used to diminish PTE pollution and is cheaper than other traditional remediation procedures (Ali, Khan and Sajad, 2013). Plant species adapted to PTE-contaminated soils can accumulate PTE in their tissues through compartmentalization mechanisms without poisoning (Baker and Brooks, 1989; Ali *et al.*, 2013).

Around 400 plant species belonging to 34 families have been documented as having developed strategies that confer the ability to tolerate high concentrations of PTE (Baker and Brooks, 1989). However, knowledge of PTE tolerant plants in Latin America is insufficient. In this region, studies relatives to native vegetation growing on PTE polluted areas are scarce compared with

other regions of the world (Ginocchio and Baker, 2004). PTE-tolerant species used in wetlands for mine waters treatment is restricted to a few species (Batty, 2005). Old polluted areas can be explored in order to identify adapted plants (González and González-Chávez, 2006) especially those useful to phytoremediation that naturally occurred in wetlands. This research aims to determine which species in the area of influence of runoff from the mines of the study area, if any, could be useful for stabilization or phytoextraction of PTE in mining waste and/or bodies of contaminated water. Identification of tolerant species for revegetation is a secondary goal.

Materials and Methods

Description of Area

The study area is located in the mining region of Zimapan, Hidalgo, Mexico, between 20° 44' 30" N 99° 22' 30" W, altitude 1780 m. Its climate is temperate and relatively dry, with an average annual temperature of 18.3 °C, and rainfall of 391 mm on average from May to July (INEGI, 2014). The mining waste has been left in open-air deposits (at least nine) in the lower part of the basin that flows into the Toliman River. Santiago is the side stream of the river that has been receiving runoff materials and leachates from the following deposits for the last 55 yr: Los Gomez, La Purisima, Preisser, Pal, and San Antonio.

The zone between the creek and the Preisser, Pal and San Antonio deposits constitutes the study area, a strip approximately 600 m long (Figure 1.1). The Preisser and Pal residues exhibit a reddish orange color due to advanced oxidation. The residues of the San Antonio deposit are less obvious as they have been covered intentionally with ground rock and soil as mitigation measure.

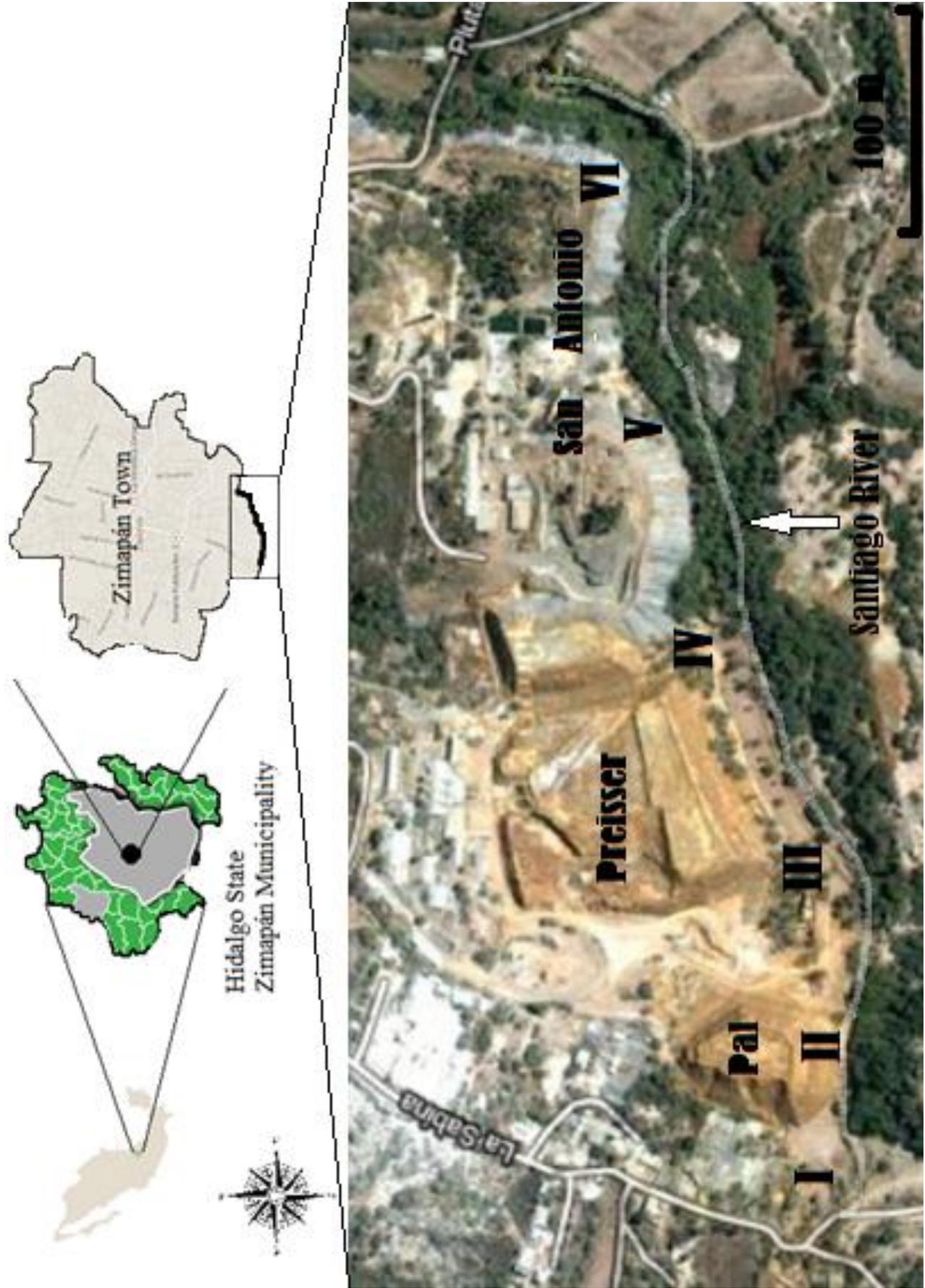


Figure 1.1. Mine tailings next to the Santiago River and sampling sites.

Sampling

Six sampling sites (I-VI) were chosen upstream for their abundance of plants and their location relative to the tailings (Figure 1.1). The approximate distance between sites was 100 m. They were located only on the northern side of the creek, which received mine tailing runoff and leachates. At each site, a 10 x 5 m transect perpendicular to the Santiago creek was established from its midpoint. Five composite samples of river water were collected in duplicate from each site (except site VI) and stored according to the procedures described by the USEPA (1996). The study sites were sampled in November 2012, May 2013, June 2014 and October 2014 to include both dry and rainy seasons.

Three individuals of each identifiable plant species found in the transect were sampled, both shoot and roots, and for both chemical analysis and taxonomic determination (plant without flowers or fruits were not collected). Composite soil samples were collected from the rhizosphere of plants naturally established and nearby non-rhizosphere soil. These samples were air dried and sieved with a 2 mm mesh sieve. The plants were identified with Rzedowski and Rzedowski (2001 and 2008) and Vibrans (2009), and voucher specimens deposited at the National Herbarium (MEXU).

Analytical Procedures

Water. The water samples were analyzed for pH, electrical conductivity (EC), redox potential (pE), and concentration of Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^+ , Na^+ , Cl^- , HCO_3^- and SO_4^{2-} ions following the procedures proposed by APHA-AWWA-WPCF (2000). Total concentrations of Cu, Zn, Ni, Cd and Pb were measured according to the USEPA (1996) method.

Soil. Soil pH and pE were determined in a suspension of 1:2.5 fresh soil: distilled water (w/v) as soon as the samples arrived at the laboratory. Particle size distribution was analyzed by standard procedure. Organic matter content (OM) was measured by the dichromate method (Rowell, 1994). Total concentration of Cu, Zn, Ni, Cd and Pb was determined by method 3050 (USEPA, 1992) and DTPA-extractable concentration according to Lindsay and Norvell method (1978). PTE were quantified by atomic absorption spectrometry using the flame technique (FAAS; Perkin Elmer 3100). Certified standards (1000 mg L⁻¹; Purity®) were used to prepare the appropriate calibration curves. All analyses were done in triplicate including a blank reagent as part of the QA/QC protocol. The bioavailability index (BI) (Chen, Shan and Qian, 1996) was calculated in soil for each PTE as the ratio of extractable and total PTE concentration and it was expressed as a percentage.

Plants. Presence or absence of herbaceous species was registered at each site on each of the fourth soil sampling dates (mentioned above). Vegetation was extremely variable because of frequent flooding and changes in the riverbed. The surface of the plant tissue was washed with tap water, phosphate-free detergent (2% Extran), distilled water, a solution of 10% HCl (10 min) and deionized water (Sánchez-López *et al.*, 2015) to remove soil particles. Leaves, stems, flowers, fruit and roots were separated and dried in a forced air oven at 65° C for 72 h. Each sample was ground to powder separately in a stainless steel mill.

Samples of 500 mg were digested in a mixture of HClO₄-H₂SO₄-H₂O₂ (4:1:1). Once cooled, samples were diluted to 25 mL with deionized water and filtered through fine porosity paper (Whatman 42). The concentration of Cu, Zn, Ni, Cd, Pb and As was determined by FAAS. The bioconcentration factor (BCF) was calculated according to Zhuang *et al.* (2007) for the root,

stem, leaf, flower and fruit, considering the concentration of extractable PTE in the rhizosphere soil. The translocation factor (TF; Stoltz and Greger, 2002) was also calculated as an indicator of the ability of the plant to move PTE from the root to the aerial part.

Statistical Analysis

A one way analysis of variance (ANOVA) test was used to determine significant differences among sample means of soil characteristics in each site ($\alpha = 0.05$). All results were analyzed with Pearson's correlation (r) ($p < 0.01$).

Results and Discussion

Water Quality

The physicochemical characteristics studied as well as concentration of PTE in the water were mostly within the quality parameters proposed by the Mexican Official Norm for water sources (Table 1.1). In general, the order of metal content concentration in the water was as follows: Zn>Pb>Cu>Ni>Cd, which correspond to the extractable concentrations found in sampled soils (Tables 3 and 4). The pH varied from neutral to slightly alkaline (7.1- 7.8); therefore, the acidic leaching and runoff from the oxidized mine tailing was neutralized in the water stream. The water was slightly oxidant, but the pE was within the limits of redox stability. CE indicated as scarce dissolved salts in water.

Plants Found in the Area of Influence of the Creek

During the rainy season sampling, observations showed that the sites were altered substantially by visible leachate and surface runoff from mining waste. In addition, the water level of the

creek fluctuated more than expected, due to higher-than-usual rainfall (over 700 mm/yr in the last two years; INEGI, 2014). People cut reeds and other plants, and constructed small dams for flood control, altering vegetation and water flow. Because of these modifications, new plant species were found on each sampling date and the shoreline varied considerably (Table 1.2). Forty-nine species of herbaceous plants belonging to 20 families were identified in the sampled transects from the aquatic environment within the creek, to its banks and further inland (Table 1.2).

Poaceae and Cactaceae families were not included in this study doubt to insufficient material to identification. The number of species per site varied from 16 to 25. It is noteworthy that there was more herbaceous vegetation on the northern bank (closest to the mining tails and runoff sediments) than southern bank (without herbs crowded out and shaded by trees). Among species of plant collected, 87% were native in wider sense (originating from and widespread in the Americas) (Vibrans, 2009). In transects sampled, species of ruderal annuals represent 53% and perennials 47% of the herbaceous plants.

Dominant presence of ruderals is a common phenomenon on mine tailings and PTE contaminated sites. Asteraceae family represents 25-50% of the total species. Hence, apparently occurrence of high concentrations of PTE was no problem to these species, in change it could be a factor associated with the presence of herbaceous vegetation as perturbation is. Ninety three percent of the plant species were found on the flood plain or in the plain next to mine tailings, that is under influence of runoff as main source of PTE in an intermittent flooding area. Since none of the species is exclusive of metalliferous soil, the populations found in the study area can be considered as metal tolerant to EPT (Ernst, *et al.*, 2008).

Table 1.1. Selected physico-chemical characteristics of the water from the Santiago River, Zimapan, Hidalgo.

Station	pH	CE (μScm^{-1})	pE (mV)	Soluble ions							Total concentration				
				Mg ²⁺	Ca ²⁺	K ⁺	Na ⁺	Cl ⁻	HCO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻	Cu	Zn	Ni	Cd	Pb
				a meq L ⁻¹							b mg L ⁻¹				
I	7.3	2.2	195.6	0.93	3.73	0.09	1.9	2.0	3.3	0.03	0.04±0.035	0.24±0.15	0.01±0.013	0.00±0.005	0.05±0.080
II	7.5	0.83	181.3	1.53	3.53	0.13	2.5	2.0	3.4	0.03	0.04±0.031	0.20±0.24	0.02±0.063	0.00±0.004	0.04±0.056
III	7.2	0.87	173.0	1.00	2.73	0.12	2.5	2.9	3.7	0.03	0.05±0.006	0.01±0.38	0.01±0.041	0.00±0.006	0.05±0.092
IV	7.1	0.87	178.4	0.40	2.93	0.12	2.8	3.7	3.3	0.03	0.04±0.009	0.03±0.07	0.01±0.045	0.01±0.069	0.07±0.020
V	7.8	0.76	-	1.75	7.00	0.27	3.7	2.2	3.1	0.005	0.03±0.001	0.24±0.0	0.22±0.004	0.04±0.002	0.26±0.014
VI	7.8	0.86	-	1.25	6.75	0.27	3.6	1.7	2.8	0.005	0.02±0.001	0.01±0.0	0.12±0.002	0.04±0.00	0.30±0.014
PL	5-9							7.0		500	4-6	10-20	2-4	0.1	0.4

All the values are the means of three replicates. (a = soluble ions, b = total concentration ± standard deviation). PL= Permissible limits according to NOM-001-SEMARNAT-1996 (SEMARNAT, 1997).

Table 1.2. Species of plants collected in Santiago River, Zimapan, Hidalgo.

Species	Family	Id	Life form	Life cycle	Habitat	Status	Presence by site					
							I	II	III	IV	V	VI
Analyzed												
<i>Acmella repens</i> (Walter) Rich.	Asteraceae	A r	2	P	B	N	X		X	X	X	X
<i>Apium graveolens</i> L.	Apiaceae	Ap g	2	P	A, B	I	X		X	X	X	X
<i>Argemone grandiflora</i> Sweet	Papaveraceae	Ar gr	1	AN	A, B, C	N	X	X	X			X
<i>Aster subulatus</i> Michx.	Asteraceae	Ass	2	AN	A	N		X				
<i>Bacopa monnieri</i> (L.) Pennell	Scrophulariaceae	B m	3	P	A	N	X	X			X	X
<i>Bidens pilosa</i> L.	Asteraceae	B p	1	AN/P	A, B, C	N	X	X	X			X
<i>Calyptocarpus vialis</i> Less.	Asteraceae	C v	2	P	A, B	N				X	X	X
<i>Chenopodium ambrosioides</i> L.	Chenopodiaceae	Cha	1	AN	A	N					X	X
<i>Commelina diffusa</i> Burm. f.	Commelinaceae	Cod	1	P	A, B	N					X	X
<i>Dalea bicolor</i> Humb. & Bonpl. ex Willd.	Fabaceae	Dab	5	P	B, C	N			X			
<i>Dalea foliolosa</i> var. <i>foliolosa</i> (Ait.) Barneby	Fabaceae	D f	1	AN	C	N			X			
<i>Dalea minutifolia</i> (Rydb.) Harms	Fabaceae	D m	5	P	C	N			X			X
<i>Flaveria trinervia</i> (Spreng.) C. Mohr	Asteraceae	F t	1	AN	B,C	N	X	X	X	X		
<i>Lepidium virginicum</i> L.	Brassicaceae	L v	1	AN	C,D	N			X	X	X	X
<i>Ludwigia peploides</i> (Kunth) P.H. Raven	Onagraceae	L p	3	P	A	N		X				
<i>Lycopersicon esculentum</i> P. Mill.	Solanaceae	L e	1	AN	A, B	N		X			X	
<i>Mentzelia hispida</i> Willd.	Loasaceae	M h	1	P	D	N					X	
<i>Mirabilis violacea</i> (L.) Hemerl	Nyctaginaceae	M v	1	P	C, D	N	X	X	X	X	X	X
<i>Oxalis corniculata</i> L.	Oxalidaceae	O c	1	AN/P	D	N					X	
<i>Parietaria pensylvanica</i> Muhl. ex Willd.	Urticaceae	P p	1	AN	C,D	N					X	X
<i>Petroselinum crispum</i> (Miller) A. W. Hill	Apiaceae	P c	2	AN	B	I						X
<i>Petunia parviflora</i> Juss.	Solanaceae	Pe p	2	AN	A	N	X					
<i>Phyla fruticosa</i> (Mill.) K. Kenn. ex Wunderlin & B.F. Hansen	Verbenaceae	P f	2	P	B	N	X		X	X	X	
<i>Piqueria pilosa</i> Kunth	Asteraceae	Pi p	1	P	C	N			X			
<i>Plantago major</i> L.	Plantaginaceae	P m	2	P	A, B, C	I	X	X	X	X	X	X
<i>Polygonum punctatum</i> Elliot var. <i>eciliatum</i> Small	Polygonaceae	Po p	3	P	A	N	X	X	X	X	X	X
<i>Rorippa nasturtium-aquaticum</i> (L.) Schinz & Thell.	Brassicaceae	Ron	3	P	A	I	X	X	X	X	X	X
<i>Sisymbrium irio</i> L.	Brassicaceae	Sis	1	AN	A, B	I			X			
<i>Solanum americanum</i> Mill.	Solanaceae	S a	1	AN/P	A, B, C	N	X				X	X
<i>Spirodela polyrrhiza</i> (L.) Schleid.	Lemnaceae	S po	4	AN	A	N		X				
<i>Verbena litoralis</i> Kunth	Verbenaceae	V l	2	P	A, B	N		X	X	X	X	X
<i>Verbesina encelioides</i> (Cav.) Benth. & Hook. ex A. Gray	Asteraceae	V e	1	AN	B	N	X		X			
<i>Viguiera dentata</i> (Cav.) Spreng.	Asteraceae	V d	1	P	C	N	X	X	X	X		
<i>Xanthium strumarium</i> L.	Asteraceae	X s	2	AN	B	N	X			X		
Not Analyzed												
<i>Berula erecta</i> (Huds.) Coville	Apiaceae	Ver	3	P	A	N		X			X	X
<i>Brickellia veronicifolia</i> (Kunth) A. Gray	Asteraceae	B v	1	AN	C,D	N				X		
<i>Cardiospermum halicacabum</i> L.	Sapindaceae	Ch h	1	P	B	N			X		X	
<i>Cirsium vulgare</i> (Savi) Tenore	Asteraceae	C v	1	AN	B	I			X	X	X	X
<i>Conyza canadensis</i> (L.) Cronquist	Asteraceae	C c	1	P	A, B,C,D	N	X	X	X	X	X	X
<i>Datura innoxia</i> P. Mill.	Solanaceae	Di i	1	P	C,D	N				X		
<i>Dyssodia papposa</i> (Vent.) A. S. Hitchc.	Asteraceae	D p	1	AN	C	N				X		
<i>Lantana camara</i> L.	Verbenaceae	L c	1	AN	B, C	N			X	X		
<i>Maurandya scandens</i> (Cav.) Pers.	Scrophulariaceae	M s	1	AN	B	N					X	
<i>Mirabilis jalapa</i> L.	Nyctaginaceae	M j	1	AN	C,D	N	X	X	X	X	X	X
<i>Nicotiana glauca</i> Graham	Solanaceae	N g	1	AN	C	N	X		X			
<i>Oenothera rosea</i> L'Her. ex Ait.	Onagraceae	O r	1	AN	C	N		X				
<i>Samvitalia procumbens</i> Lam.	Asteraceae	Sp	1	P	C,D	N	X			X		
<i>Vinca major</i> L.	Apocynaceae	V m	1	P	B	I					X	
<i>Zinnia peruviana</i> (L.) L.	Asteraceae	Z p	1	AN	C	N					X	
Total of species present by site							16	20	23	24	25	21

Life form: 1= Terrestrial Herb; 2 =Terrestrial herb of wet land; 3= Rooted emergent aquatic plant; 4= Free floating aquatic herb; 5= Terrestrial shrub. Habitat: A= Riverside; B= Floodplain; C= Plain next to mine tailings; D= On mine tailings; Life cycle: AN= Annual, P= Perennial; Status: N= Native; I= Introduced. Id: abbreviations used in the tables and figures.

Table 1.3. Potentially toxic elements concentrations (mg kg⁻¹) in rhizosphere and non-rhizosphere soil from terrestrial plants at the Santiago River, Zimapan, Mexico.

Station	Species ^a	Cu			Zn			Ni			Cd			Pb		
		TOT	DTPA	BI (%)	TOT	DTPA	BI (%)	TOT	DTPA	BI (%)	TOT	DTPA	BI (%)	TOT	DTPA	BI (%)
I	NR	372±22	26±1	7	2354±207	499±8	21	17±2	1±0	6	19±1	2±0	12	3183±148	10±0	0
	Sa	351±6	53±5	15	1446±34	191±14	13	41±0	4±1	9	16±2	4±0	26	625±59	70±7	11
	Vd	278±2	57±4	21	1192±41	270±62	23	42±3	5±1	11	17±2	5±1	29	381±4	101±7	27
	Ft	399±18	54±4	13	1852±510	469±102	25	40±4	12±0	30	20±1	5±1	28	1841±112	73±3	4
	Range ^b	278-399	53-57	13-21	1192-1852	191-469	13-25	40-42	4-12	9-30	16-20	4-5	26-29	381-1841	70-101	4-27
II	NR	381±4	119±6	31	2105±137	342±35	16	24±3	3±0	11	17±1	11±1	66	3473±479	92±6	3
	Ft	301±44	50±5	17	1637±237	441±24	27	42±3	9±0	22	18±0	6±0	32	1561±389	96±3	6
	Le	440±55	75±4	17	1750±215	372±51	21	38±1	8±1	20	22±2	8±0	37	2388±269	23±0	1
	Sa	210±16	11±1	5	4753±354	114±11	2	54±2	0±0	0	7±0	1±0	11	1772±4	119±3	7
	Range ^b	210-301	11-75	5-17	1637-4753	114-441	2-27	38-54	0-9	0-22	7-22	1-8	11-37	1561-2388	23-119	1-7
III	NR	197±9	21±3	10	2505±157	525±50	21	42±3	1±0	2	30±0	7±0	24	3159±58	24±0	1
	Df	295±48	51±6	17	3287±396	396±33	12	36±3	1±0	2	27±1	8±0	30	3884±752	19±1	0
	Dab	136±10	3±1	2	1061±208	160±8	15	40±4	6±0	15	10±1	3±0	26	433±24	76±0	18
	Pip	257±15	43±1	17	1059±108	328±33	31	31±3	14±1	44	9±0	3±0	32	2551±207	16±0	1
	Ft	124±25	28±4	22	1399±153	288±22	21	55±4	12±1	21	15±2	8±1	58	505±129	67±1	13
	Range ^b	124-295	3-51	2-22	1059-3287	160-525	12-31	31-55	1-12	2-44	9-30	3-8	26-58	433-3884	16-76	0-18

^a For explanation of plant species abbreviations, see Table 1.2. ^b Range for rhizosphere soil station. All the values are means of three replicates ± standard deviation; n=3. NR= Non-rhizosphere soil. TOT = Total PTE concentration. DTPA = Extractable PTE concentration. BI = Bioavailability Index (%). PL-AK: Permissible limits for total concentrations in agricultural soil (Kabata and Pendias, 2011). PLM-AR: Permissible limits in Mexico for total concentrations in agricultural or residential soil (Norma Oficial Mexicana NOM-147-SEMARNAT /SSA1-2004). EC = Maximum total contents in soils for agricultural soils with pH 6-7 (Council of the European Communities 1986).

Table 1.3 Cont. Potentially toxic elements concentrations (mg kg⁻¹) in rhizosphere and non-rhizosphere soil from terrestrial plants at the Santiago River, Zimapan, Mexico.

Station	Species ^a	Cu			Zn			Ni			Cd			Pb		
		TOT	DTPA	BI (%)	TOT	DTPA	BI (%)	TOT	DTPA	BI (%)	TOT	DTPA	BI (%)	TOT	DTPA	BI (%)
IV	NR	256±14	25±4	10	1382±275	291±3	21	15±2	1±0	10	8±1	2±0	27	3745±391	8±0	0
	Ft	184±29	42±6	23	2188±416	444±31	20	57±2	9±1	16	23±3	8±0	36	950±13	243±7	26
	Range ^b	184	42	23	2188	444	20	57	9	16	23	8	36	950	243	26
V	NR															
	Sis	135±43	38±2	28	4256±154	163±8	4	73±16	0±0	0	3±1	1±0	26	365±92	67±13	18
VI	NR															
	Dm	32±7	4±0	12	1766±129	46±3		51±0	0±0		7±1	0±0		495±67	51±5	
	Lv	199±11	65±5	33	15335±2667	2700±68	18	93±3	0±0	0	13±2	2±0	14	877±72	56±2	6
	Pp	84±9	10±1	12	5390±275	99±18	2	103±6	0±0	0	11±1	1±0	5	546±138	76±8	14
	Range ^b	32-199	4-65	12-33	1766-5390	99-2700	2-18	51-103	0	0	7-13	1-2	5-14	495-877	51-76	6-14
	PL-AK	60-150			100-300			20-60			1-5			20-300		
	PLM-AR							1600			37			400		
EC	140			300			75			3			300			

^a For explanation of plant species abbreviations, see Table 1.2. ^b Range for rhizosphere soil station. All the values are means of three replicates ± standard deviation; n=3. NR= Non-rhizosphere soil. TOT = Total PTE concentration. DTPA = Extractable PTE concentration. BI = Bioavailability Index (%). PL-AK: Permissible limits for total concentrations in agricultural soil (Kabata and Pendias, 2011). PLM-AR: Permissible limits in Mexico for total concentrations in agricultural or residential soil (Norma Oficial Mexicana NOM-147-SEMARNAT /SSA1-2004). EC = Maximum total contents in soils for agricultural soils with pH 6-7 (Council of the European Communities 1986).

Table 1.4. Potentially toxic elements concentrations (mg kg⁻¹) in rhizosphere and non-rhizosphere soil from wetland and aquatic plants from the Santiago River, Zimapán, Mexico.

Station	Species ^a	Cu			Zn			Ni			Cd			Pb		
		TOT	DTPA	BI (%)	TOT	DTPA	BI (%)	TOT	DTPA	BI (%)	TOT	DTPA	BI (%)	TOT	DTPA	BI (%)
I	NR	372±22	26±1	7	2354±207	499±8	21	17±2	1±0	6	19±1	2±0	12	3183±148	10±0	0
	Bm	495±68	59±5	12	2775±268	424±0	15	17±2	1±0	3	29±0	8±1	28	2085±99	9±1	0
	Bm	245±17	60±1	25	4502±220	2084±92	46	65±9	0±0	0	6±1	1±0	26	629±98	552±111	88
	Bm	245±17	38±1	16	12784±1184	1818±97	14	48±8	0±0	0	15±1	0±0	3	1755±76	112±7	6
	Pf	436±10	88±11	20	2543±465	390±6	15	37±4	7±0	20	26±2	5±0	18	2059±97	31±3	2
	Pep	681±3	64±4	9	2052±51	571±26	28	32±3	9±0	26	35±1	13±1	36	2055±87	15±2	1
	Pop	334±12	47±8	14	2175±153	412±18	19	21±2	1±0	4	21±0	6±1	30	2509±78	24±0	1
	Ron	353±107	10±0	3	3173±395	347±41	11	17±4	1±0	4	33±3	4±1	12	2609±0	143±21	5
	Xs	312±19	36±4	12	1697±123	342±35	20	35±2	4±1	11	14±1	4±1	31	1862±1036	63±7	3
	Range ^b	245-681	10-88	3-25	1697-12748	390-1818	11-46	17-65	0-9	0-11	6-35	0-13	3-36	629-2609	9-552	0-88
II	NR	381±4	119±6	31	2105±137	1094±75	52	24±3	3±0	11	17±1	11±1	66	3473±479	92±6	3
	Apg	210±16	11±1	5	4753±354	114±11	2	54±2	0±0	0	7±0	1±0	11	1772±4	119±3	7
	Ar	223±27	39±6	17	1726±288	322±95	19	37±4	6±0	17	14±1	5±0	33	1485±285	75±1	5
	Ar	521±19	5±3	1	2208±122	344±41	16	44±0	12±1	28	32±1	14±3	44	2633±84	23±3	1
	Ass	229±50	76±3	33	1291±194	449±28	35	32±1	12±1	38	16±0	14±2	90	782±84	19±0	2
	Bm	335±64	6±0	2	2187±65	373±26	17	22±4	1±0	4	24±0	3±0	11	3348±452	216±19	6
	Lp	189±2	39±9	21	1505±197	306±34	20	35±3	8±0	24	20±0	5±0	25	1819±846	73±5	4
	Pm	293±26	29±0	10	2122±237	423±23	20	21±1	1±0	4	18±0	7±0	36	3304±248	17±1	1
	Pop	594±52	2±0	0	2812±618	384±20	14	24±4	1±0	4	35±3	4±0	11	3532±226	14±0	0
	Ron	313±15	16±2	5	3036±186	1127±74	37	22±0	1±0	5	33±1	9±0	28	2964±14	6±1	0
Range ^b	189-594	2-76	0-33	1505-4753	114-1127	2-37	21-54	0-12	0-38	7-35	1-14	11-90	782-3532	6-216	0-7	
III	NR	197±9	21±3	10	2505±157	525±50	21	42±3	1±0	2	30±0	7±0	24	3159±58	24±0	1
	Pm	127±47	46±4	36	761±44	318±19	42	54±3	11±0	20	16±0	7±1	41	2046±385	16±1	1
	Ron	636±75	0±0	0	5110±44	488±33	10	25±5	2±0	8	71±2	2±0	3	3991±169	16±0	0
	Range ^b	127-636	0-46	0-36	761-5110	318-488	10-42	25-54	2-11	8-20	16-71	2-7	3-41	2046-3991	16-16	0-1

^a For explanation of plant species abbreviations, see Table 1.1. ^b Range for rhizosphere soil station. All the values are means of three replicates ± standard deviation; n=3. NR= Non-rhizosphere soil. TOT = Total PTE concentration. DTPA = Extractable PTE concentration. BI = Bioavailability Index (%). PL-AK: Permissible limits for total concentrations in agricultural soil (Kabata and Pendias, 2011). PLM-AR: Permissible limits in Mexico for total concentrations in agricultural or residential soil (Norma Oficial Mexicana NOM-147-SEMARNAT /SSA1-2004). EC = Maximum total contents in soils for agricultural soils with pH 6-7 (Council of the European Communities 1986).

Table 1.4 Cont. Potentially toxic elements concentrations (mg kg⁻¹) in rhizosphere and non-rhizosphere soil from wetland and aquatic plants from the Santiago River, Zimapán, Mexico.

		TOT	DTPA	BI (%)	TOT	DTPA	BI (%)	TOT	DTPA	BI (%)	TOT	DTPA	BI (%)	TOT	DTPA	BI (%)
IV	NR	256±14	25±4	10	1382±275	291±29	21	15±2	1±0	10	8±1	2±0	27	3745±391	8±0	0
	Ar	103±15	29±7	28	638±95	198±9	31	66±3	11±0	17	9±1	1±0	16	201±68	48±0	24
	Ar	406±61	74±3	18	1583±165	502±43	32	45±5	16±1	35	20±3	8±1	40	784±424	45±2	6
	Bm	256±51	44±3	17	2530±442	528±29	21	31±1	1±0	3	27±2	10±0	35	3505±315	14±0	0
	Pm	230±29	29±2	12	2407±16	544±88	23	29±0	1±0	3	25±5	6±0	23	2787±72	14±1	1
	Pop	99±12	13±1	13	911±46	299±1	33	42±1	1±0	2	9±0	3±0	38	2468±370	25±1	1
	Pop	166±12	26±2	15	2307±495	468±68	20	30±7	1±0	2	19±1	4±1	20	2856±696	33±2	1
	Vd															
	Range ^b	99-256	13-74	12-28	638-2530	198-544	21-33	29-66	1-16	2-35	9-27	1-10	16-40	201-3505	14-48	0-24
V	NR															
	Apg	128±49	18±2	14	4492±156	1896±113	42	64±5	0±0	0	7±2	1±0	13	442±21	63±0	14
	Pm	291±36	18±1	6	12655±1088	180±12	1	65±8	0±0	0	11±0	2±0	15	943±17	39±4	4
	Range ^b	128-291	18	6-14	4492-12655	180-1896	1-42	64-65	0-0	0	7-11	1-2	13-15	442-943	39-63	4-14
VI	NR															
	Ar	96±19	17±2	18	3253±197	136±14	4	91±6	0±0	0	10±2	1±0	7	784±177	83±2	11
	Cod	438±34	64±4	14	16200±577	2680±395	17	84±1	0±0	0	17±2	4±0	23	456±10	12±2	3
	Pc	242±37	79±4	33	14336±949	2075±22	14	106±2	0±0	0	18±1	4±0	20	554±28	13±0	2
	Pop	115±17	20±3	17	3395±302	163±19	5	79±2	0±0	0	4±1	1±0	29	483±56	64±4	13
	Ron	624±34	0±0	0	29190±339	297±3	1	104±4	3±1	3	49±1	1±0	1	717±189	1±0	0
	VI	298±159	19±2	6	11963±2125	108±14	1	85±15	0±0	0	3±1	1±0	27	933±1	96±15	10
	Range ^b	96-624	0-79	0-33	3253-29190	108-2680	1-17	79-106	0-3	0-3	3-49	1-4	1-29	456-933	1-96	0-13
	PL-AK	60-150			100-300			20-60			1-5			20-300		
	PLM-AR							1600			37			400		
EC	140			300			75			3			300			

^a For explanation of plant species abbreviations, see Table 1.2. ^bRange for rhizosphere soil station. All the values are means of three replicates ± standard deviation; n=3. NR= Non-rhizosphere soil. TOT = Total PTE concentration. DTPA = Extractable PTE concentration. BI = Bioavailability Index (%). PL-AK: Permissible limits for total concentrations in agricultural soil (Kabata and Pendias, 2011). PLM-AR: Permissible limits in Mexico for total concentrations in agricultural or residential soil (Norma Oficial Mexicana NOM-147-SEMARNAT /SSA1-2004). EC = Maximum total contents in soils for agricultural soils with pH 6-7 (Council of the European Communities 1986).

Most of the found species had not been reported by other authors in soils associated with mine waste runoff, except *Dalea bicolor*, *Flaveria trinervia*, *Viguiera dentata* (Sánchez-López *et al.*, 2015), *Acmella repens*, *Bidens pilosa*, *Commelina diffusa*, *Lepidium virginicum*, *Mirabilis jalapa*, *Polygonum punctatum*, *Solanum americanum* and *Verbena litoralis* (Sánchez-Pinzón, 2010). Several species were found in all sites, including *Mirabilis violacea*, *M. jalapa*, *Plantago major*, *P. punctatum* and *R. nasturtium-aquaticum*, so these species are highly tolerant to contamination by PTE.

Characteristics of Rhizosphere and Non- rhizosphere Soil

All sites had heavy silt clay soil (data not shown). Apparently, the particle distribution changed as minerals weathered. A negative correlation was observed between pH and pE values ($r = -0.67$); $p < 0.001$); this means that oxidation of tail minerals increased the oxidizing conditions (pE values ranged from 443 to 581 mV and 53 to 306 mV). Soils at sites I to III were strongly acidic (pH 2 to 3), neutral at site IV, and alkaline at sites V and VI (Table 1.5). The cause for these differences was the leachate and runoff from mine tailings affecting the soils. Preisser and Pal residues produced acid runoff (pH < 2.6) may be due to the oxidation of pyrite and arsenopyrite (González-Sandoval *et al.*, 2008).

In contrast, the leachates from sites V and VI originated from the San Antonio mine tailings were alkaline, due to their content of calcite and sphalerite (Moreno-Tovar *et al.*, 2009). Also, the soil of the region is alkaline to strongly alkaline (7.7 – 8.5). OM content in the non-rhizosphere soil ranged from 0.8% to 11.5%. Differences in pH were observed in rhizosphere soil as well. In sites I and II pH varied from 5.5 (*P. major*) to 5.7 (*P. punctatum*), while in site VI the pH was 8 (*Dalea minutifolia*), which shows the effect of the rhizosphere. In the rhizosphere soil, the

highest OM content was observed around *C. diffusa* (12.6%) and *R. nasturtium-aquaticum* (11.1%). OM and pH were positively correlated ($r= 0.99$; $p<0.001$). PCA results showed that no group of factors analyzed had sufficient variability to be considered as principal component of the system or either had a directional behavior in the system studied.

Total and Available PTE Concentrations in Soils

Total concentrations of PTE present in the soils were in the order Pb>Zn>Cu>Ni>Cd. All concentrations were higher than normal in agricultural soils (Kabata-Pendias, 2011) particularly total Pb (Tables 3 and 4). The highest concentrations of total PTE were found site II, directly exposed to the runoff from the Preisser and Pal mine tailings. The lowest total and extractable concentrations of PTE were detected at sites III and IV, located between the Preisser and San Antonio tailings (Figure 1.1; Table 1.3). Clearly, runoff from mining tailings have a direct influence on the soils adjacent to them.

Concentrations of extractable PTE for rhizosphere had the following order: Zn>Pb>Cu>Ni=Cd, the same trend as in water concentration of Santiago River. The bioavailability index (BI) (Tables 3 and 4) was very high, compared with the BI found by Manab and Maiti (2008), in Cu mine tailings in India. These authors suggest that the terms of toxicity to plants BI are considerable high compared with other sites. Extractable PTE, particularly Cu and Ni, in soils of wetlands and aquatic environments was higher than in soils of terrestrial plants (Tables 3 and 4).

Table 1.5. Selected physico-chemical characteristics of the water from the Santiago River, Zimapán, Hidalgo.

Station	pH	CE (μScm^{-1})	pE (mV)	Soluble ions								Total concentration				
				Mg ²⁺	Ca ²⁺	K ⁺	Na ⁺	Cl ⁻	HCO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻	Cu	Zn	Ni	Cd	Pb	
				a meq L ⁻¹								b mg L ⁻¹				
I	7.3	2.2	195.6	0.93	3.73	0.09	1.9	2.0	3.3	0.03	0.04±0.035	0.24±0.15	0.01±0.013	0.00±0.005	0.05±0.080	
II	7.5	0.83	181.3	1.53	3.53	0.13	2.5	2.0	3.4	0.03	0.04±0.031	0.20±0.24	0.02±0.063	0.00±0.004	0.04±0.056	
III	7.2	0.87	173.0	1.00	2.73	0.12	2.5	2.9	3.7	0.03	0.05±0.006	0.01±0.38	0.01±0.041	0.00±0.006	0.05±0.092	
IV	7.1	0.87	178.4	0.40	2.93	0.12	2.8	3.7	3.3	0.03	0.04±0.009	0.03±0.07	0.01±0.045	0.01±0.069	0.07±0.020	
V	7.8	0.76	-	1.75	7.00	0.27	3.7	2.2	3.1	0.005	0.03±0.001	0.24±0.0	0.22±0.004	0.04±0.002	0.26±0.014	
VI	7.8	0.86	-	1.25	6.75	0.27	3.6	1.7	2.8	0.005	0.02±0.001	0.01±0.0	0.12±0.002	0.04±0.00	0.30±0.014	
PL	5-9							7.0		500	4-6	10-20	2-4	0.1	0.4	

All the values are the means of three replicates. (a = soluble ions, b = total concentration ± standard deviation). PL= Permissible limits according to NOM-001-SEMARNAT-1996 (SEMARNAT, 1997)

Most rhizosphere soil samples had total Cu concentrations considered phytotoxic (32-681 mg kg⁻¹) by Kabata-Pendias (2011). These concentrations were slightly lower than those found by Bech *et al.* (1997) and Liu *et al.* (2008) on mine tailings in Peru and China (902, 5270 and 1020 mg kg⁻¹, respectively). The highest extractable Cu concentrations were found at sites I and II (near Pal and Preisser tailings) with acid pH values, which may be directly related with the continuous oxidation of pyrite (Manab and Maiti, 2008).

The total concentration of Zn in the rhizosphere varied from 638 to 29 190 mg kg⁻¹. The lowest total Zn concentration was found at sites II to IV (638-5 110 mg kg⁻¹) in contrast with highest concentrations of Pb in these stations. Total concentration of Zn increased in sites V and VI, where it reached the highest values (12 655 and 29 190 mg kg⁻¹, respectively), but where extractable PTE were the lowest. These results are easily explained, as Zn tends to be adsorbed by soil at an alkaline pH; in addition, Zn ions are precipitated or form complexes with OM (Liu *et al.*, 2008). Total concentrations of Zn, Ni and Pb showed significant differences in total concentration per site (Pr<0.0001; Pr=0.0001; Pr=0.0004 respectively).

The total concentration of Ni in rhizosphere soil was within normal values proposed for non-polluted soils (Kabata-Pendias, 2011). This element showed a gradient from I (17-65 mg kg⁻¹) to VI (79-106 mg kg⁻¹), closely related to soil pH ($r= 0.53$; $p<0.001$) and OM content ($r= 0.75$; $p<0.001$). Extractable Ni concentration was higher at sites I and II (4-12%) with low pH derived from the acidic Pal and Preisser residues) than sites V and VI due to the alkaline influence of San Antonio tailings. In these tailings alkalinity and high OM content diminished the availability of Ni, as concluded Chen, Huang and Liu (2009). These authors proposed that Ni is present as Ni(OH)₂ under alkaline conditions and forms stable complexes with the OM, whereas under

acidic conditions it takes the form of $\text{Ni}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ which is available to plants. This explanation agrees with the arguments of Kabata-Pendias (2011) and Van der Ent *et al.* (2013).

Total Cd concentrations exceeded normal values for agricultural soils (Kabata-Pendias, 2011). It was the least abundant element (3-49 mg kg^{-1}), but the most available (BI = 1-90; Tables 3 and 4). The concentration of Cd was slightly higher at site III (16-71 mg kg^{-1}). At sites V and VI, with higher OM content than other sites, extractable Cd concentration was from 1 to 4 mg kg^{-1} due to its high solubility and limited tendency to form complexes with the OM. These concentrations are lower than those reported in Cu mines from Peru (8.9-499 mg kg^{-1} ; Bech *et al.*, 1997). A negative correlation between available Cd and pH was found ($r = -0.63$; $p < 0.001$). As with the other PTE, Cd was more available under acid conditions than under alkaline conditions (Li *et al.*, 2012).

Sites I and II showed the highest total concentration of Pb (201-3991 mg kg^{-1}) as well as highest extractable concentration (6-552 mg kg^{-1}) compared with sites V and VI (1-96 mg kg^{-1}). Availability of Pb under acidic conditions is related to the oxidation of sulfide minerals present (Moreno-Tovar *et al.*, 2009), whereas in alkaline soils Pb is adsorbed onto the surfaces of clay particles, or precipitated (Chen *et al.*, 1996). Also, the higher content of OM in the soils of sites V and VI (Table 1.5) may stimulate the formation of stable organic complexes and reactions with clays, phosphates, sulfates, carbonates and hydroxides (McLean and Bledsoe, 1992) which makes the metal unavailable to plants (Tables 3 and 4). As suggested Liu *et al.* (2008), the results confirmed that pH, pE, OM and clay content are the most important soil factors that control availability of PTE in soils.

PTE Concentrations in Plants

Remarkably, all of the 34 plant species analyzed for this research accumulated PTE in higher concentrations than those considered normal by Kabata and Pendias (2011). Almost all plants sampled translocated PTE to aboveground tissues. The order of accumulation was $Zn > Pb$ or $Cu > Ni > Cd$. Thus, most of them were highly tolerant of Cd, Cu, Ni, Pb and Zn (Figure 1.2) and behaved as hypertolerant species (Ernst *et al.*, 2008).

According with results reported by Sánchez-Lopez *et al.* (2015) and González-Chávez *et al.* (2015), the concentration of PTE in the tissues varied among individuals of the same species and had different BCF and TF in different locations (Tables 6 and 7). We observed no relationship between the total concentration of PTE in rhizosphere soil and in the above ground plant tissues, although in most cases, accumulation in plants depended on the bioavailability of the PTE in the soil. Accumulation of PTE depends on the chemical form of the PTE in the soil, pH, age of the plants and, perhaps, their ecotypes (González and González-Chávez, 2006). Several species had a BCF >10 and a TF >1, which indicates considerable PTE accumulation (Tables 6 and 7).

Some of them may have potential as phytoextractors under the criteria of Van der Ent *et al.* (2013) and a few useful as stabilizers. They are discussed below, according the objectives of this study. Local plant populations studied here showed an important adaptation of tolerance and accumulation and translocation of Cu. Root Cu concentrations ranged from 7 to 1669 mg kg⁻¹

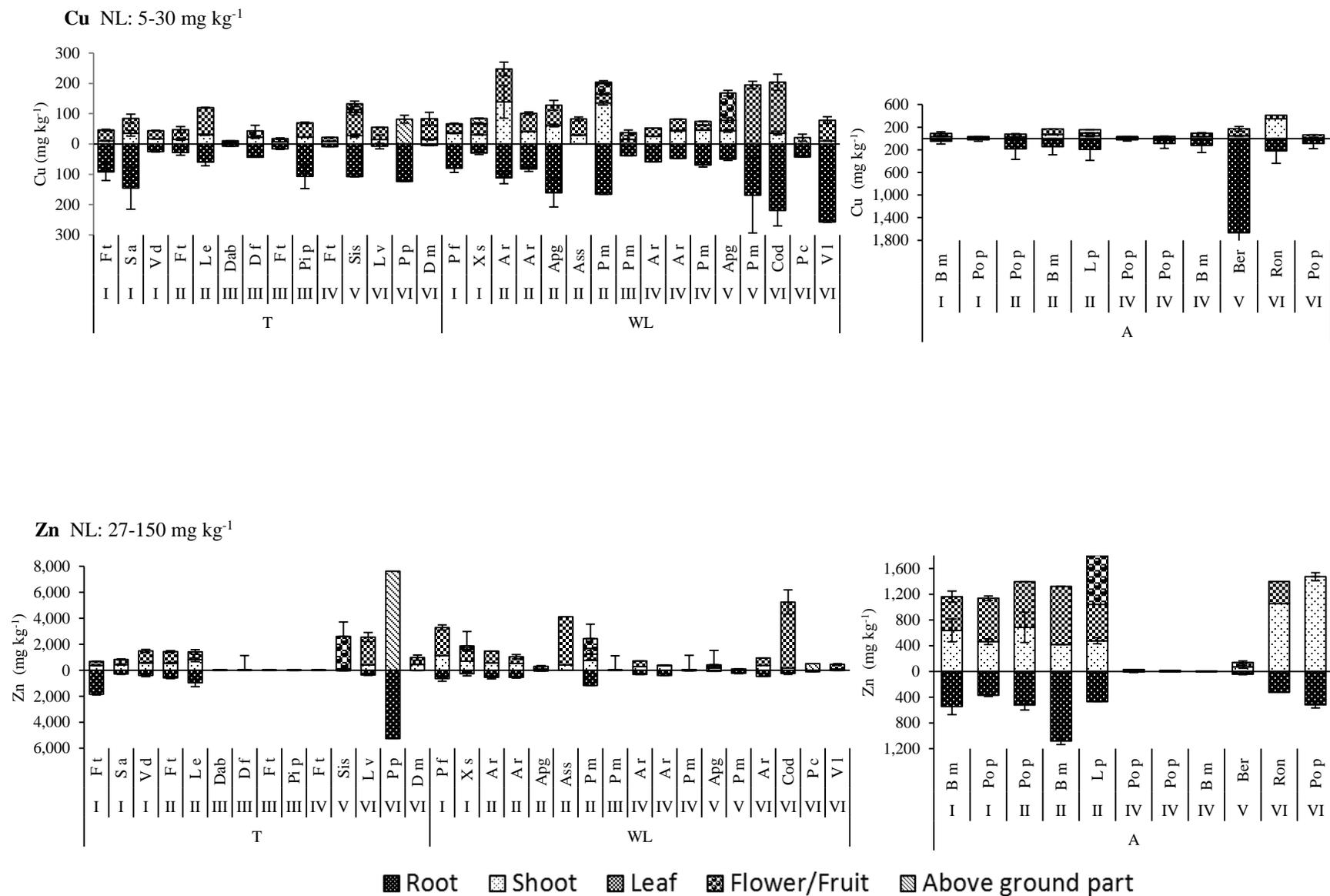


Figure 1.2. Concentration of potentially toxic elements in plant tissues established along to the Santiago River, Zimapan, Hidalgo. T = terrestrial species; WL= wet land species; A = aquatic species. NL= normal level (Kabata-Pendias, 2011).

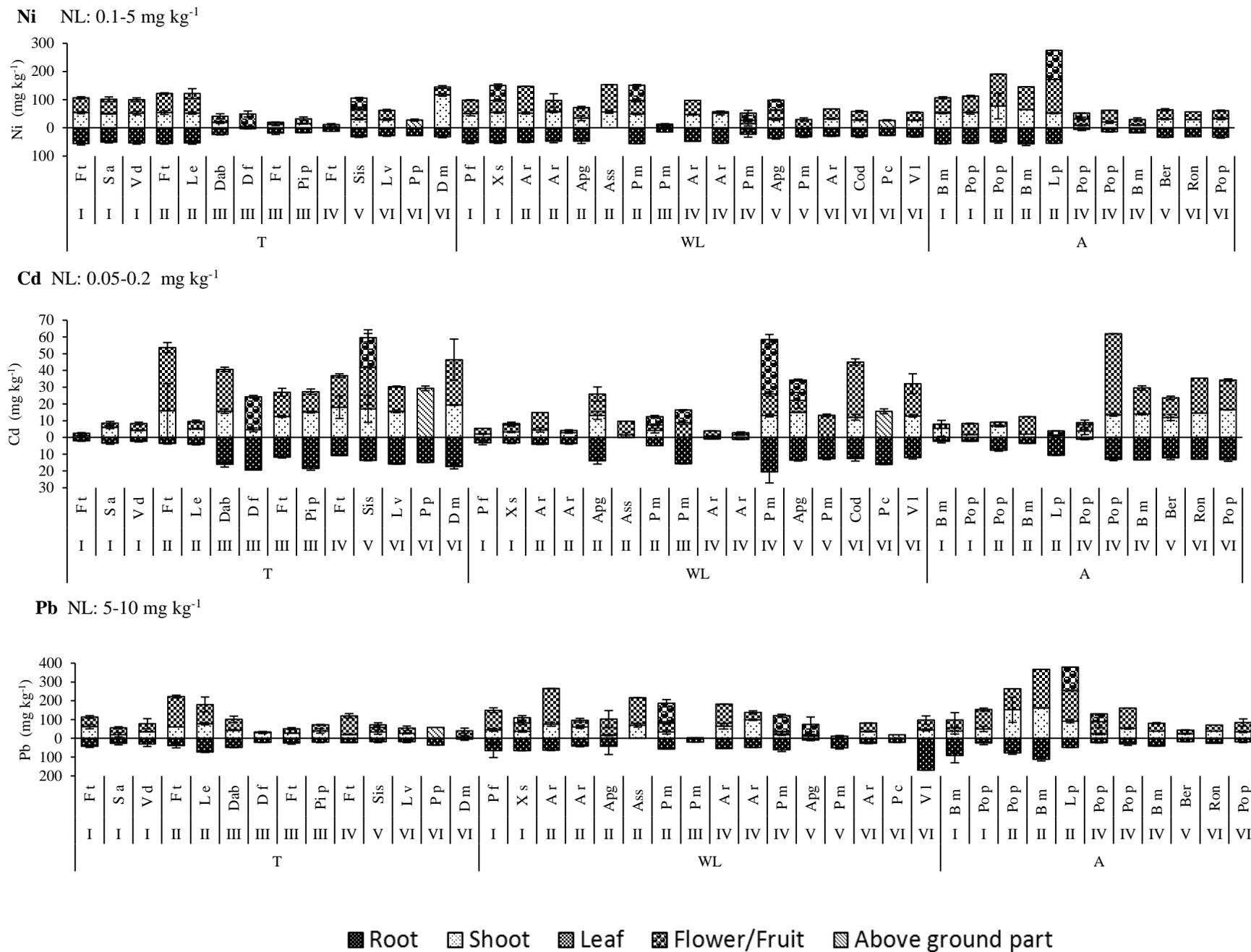


Figure 1.2 Cont. Concentration of potentially toxic elements in plant tissues established along to the Santiago River, Zimapan, Hidalgo. T = terrestrial species; WL= wet land species; A = aquatic species. NL= normal level (Kabata-Pendias, 2011).

and shoot concentrations ranged from 4 to 195 mg kg⁻¹ (Figure 1.2). These concentrations are higher than those reported by Liu *et al.* (2008) (36-1020 mg kg⁻¹). Also, Cu concentration in aquatic plants and those growing in wet places near the creek was higher than in more terrestrial plants. All individuals of *R. nasturtium-aquaticum* had high BCF values for Cu and concentrations of 350 mg kg⁻¹ in stem, so the species may have potential as a phytoextractor of Cu and would be considered a hyperaccumulator of Cu under the criteria of Van der Ent *et al.* (2013) (300 mg kg⁻¹). *A. repens* and *P. major* accumulated about 140 mg kg⁻¹ in both the roots and in the aerial parts. *C. diffusa* and *V. littoralis* accumulated more than 200 mg kg⁻¹ of Cu in roots. (Table 1.7; Figure 1.2). These species may serve as phytoextractors in wetlands.

The highest concentrations of Zn were found in *P. pensylvanica* (5 257 and 7 630 mg kg⁻¹ in the roots and stem respectively; Figure 1.2), *F. trinervia* (1 839 mg kg⁻¹ in the stem) and *C. diffusa* (5 086 mg kg⁻¹ in the leaves). These values were higher than those founded by Bech *et al.* (1997) (90-437 mg kg⁻¹) but lower than those registered by Barrutia *et al.* (2011; >4 000 mg kg⁻¹). According with results *P. pensylvanica* and *C. diffusa* can be considered hyperaccumulators of Zn according to the criteria of Van der Ent *et al.* (2013) (3 000 mg kg⁻¹) (Tables 6 and 7). Ni concentration was relatively similar between structures: 2.9-147 mg kg⁻¹ in roots, 2.8-117 mg kg⁻¹ in stems and 4.7-526 mg kg⁻¹ in leaves for all species (Figure 1.2), although none of the plants in this study may be considered hyperaccumulator plant of Ni.

The BCFs of Ni were between 20 to 100, particularly obvious in *Bacopa monnieri*, *Apium graveolens* and *C. diffusa* with a BCF> 300, *A. repens*, *L. virginicum* and *P. major* with a BCF>100, and *B. monnieri*, *D. minutifolia*, *P. major*, *P. pensylvanica*, *R. nasturtium-aquaticum* and *V. littoralis* with BCF between 20 and 100 (Tables 6 and 7).

Table 1.6. Bioconcentration factors (BCF) for plants collected at Zimapan, Hidalgo.

Station	Species Id	Cu			Zn			Ni			Cd			Pb		
		R	S	L	R	S	L	R	S	L	R	S	L	R	S	L
I	Bm	1		1	2	1	1	97	94	101				11	3	8
I	Pp	1		1	2		2	6	6		1	1		4	4	
I	Ron	10	10		6	6		77	77		1	1		1	1	
I	Xs	1	1	1	1	2	3	15	15	11	1	1	1	1	1	1
II	Ar					2	3		4	4					2	1
II	Ar	3	4	3	3	2	2	23	8	10	2	1	1	4	1	1
II	Ass			1		1	1		4	5					2	4
II	Bm	26	13	17	2			86	65	6.5	4	1	1	1		
II	Ft	1		1	1	1	1	8	6	6	1	1	3	1		1
II	Le	1		1	3	3	2	7	7	7	1		1	5	3	3
II	Lp	5	1	1	3	2	2	11	6	6	2	2		3	1	1
II	Pm	6	5	1	9	3	2	119	69	62	1	1	1	9	3	2
II	Pop	87	13	23	2	1	2	71	52	56	10	2	2	12	6	11
II	Sa	8	5	15	2	1	1				15	15	18	1		
III	Dab	2	1	2				3	4	3	6	6	6	1	1	1
III	Df	1						1			1	3			1	
III	Pm	1						45		16	3		2	3		1
III	Pp	2	1	1				2	1	1	9	6	5	4	1	3
III	Ron	303	303					9	9		8	8		2	2	
IV	Ar	2	1	1	4	2	1	10	4	4	1	1		2	1	1
IV	Ar	1	1	1	1	1	1	3	3	3				3	1	2
IV	Bm	3	1	1				51	15		5	1	2	8	3	3
IV	Ft							2	1			1	2			
IV	Pm	2	2	1				12	28	19	3	4	2	7	4	2
V	Apg	3	2	2				1507	1831	512	15	15	17			
V	Pm	9		11	2		1				10		8	1		1
V	Sis	3	1	2							14	16	20			
VI	Ar	6	10	8	4	3	3	158	162	114	41	27	26			
VI	Cod	3	1	3			2	1514	1515	1486	3	3	8	2	2	1
VI	Dm	1	4	18			10	97	59	60	76	69	75			
VI	Lv			1				224	229	250	8	9	8			
VI	Pp	12			6	77	77	196			36			1		
VI	Ron	686	29	193	26	1	4	8	9	3	45	20	23	70	31	46
VI	VI	13	1	4			1	69	80	69	20	14	15	1		

Id= For explanation of plant species abbreviations, see Table 1.2. This table only includes BCF ≥ 1 . R=root; S=shoot; L=leaf.

Table 1.7 Translocation factors (TF) for plants collected from Zimapan, Hidalgo.

Station	Species Id	Cu		Zn		Ni		Cd		Pb	
		S	L	S	L	S	L	S	L	S	L
I	Ft							4			
I	Pf		1							1	2
I	Pop	1	2								
I	Pp	1	1	1	1						
I	Sa			2	1	1	1	2			1
I	Vd	1	2	5		1	1				
I	Xs	1	1	3	3	1		1	2		
II	Ar		1	1	2	1		2	2	1	1
II	Ar						1				
II	Bm					1		2	2		1
II	Ft					1	1	1	1		
II	Le		1			1	1		1		
II	Lp					1	1	1	1		
II	Pop					1	2				
II	Sa		2					1	1		
III	Dab	1	2	6	4				1		1
III	Ft		4	1	2	2	1		1	1	1
III	Pip					1					
IV	Ar					1	1				
IV	Bm					1	1				
IV	Pm			3	1	2	2	1			
IV	Pop			4	6	1	1		3		
IV	Pop					1	1				
V	Apg				2	1	1	1	1		1
V	Ber									2	2
V	Cod					1	1		3		
V	Pm		1								2
V	Sis					1		1	1	1	2
VI	Ar	2	1			1	1				1
VI	Cod				21					1	
VI	Lv	2	5				1	1	1		1
VI	Pop										1
VI	VI					1	1				

Id = For explanation of plant species abbreviations, see Table 1.2. Only TF ≥ 1 are included. R = root; S = shoot; L = leaf.

The species with the highest BCF and TF corresponded to sites V and VI, where the available Ni concentration was very low and led to high quotients. BCFs of Ni were related negatively to soil Ni extractable concentration in soil rhizosphere. However, tolerance to Ni could not be confirmed for any of the species due to the relatively low concentrations of this metal in the study area. The TF was generally below 2 (Table 1.7).

The highest concentrations of Cd in plants were found at sites IV to VI, whereas the plants at I and II with acid soils had the lowest concentrations (Figure 1.2). This was unexpected, as there is normally an inverse linear relationship between the pH and the Cd concentration in plants (Kabata Pendias, 2011). However, Zn concentrations were high at these sites, and apparently, the plants preferably absorb and accumulate Zn at expense of Cd. Also a direct relation among OM and Zn accumulated in roots, and shoots of plants was found ($r=0.48$). The variability in the data can be explained by the degree of soil disturbance derived from the varying mechanisms of waste deposit, which are factors also reported in other mining areas (Barrutia *et al.*, 2011).

Concentration of Cd in above ground parts of plants was negatively related with total concentration of Zn in rhizosphere soil. Cd concentrations in roots, stems and leaves varied (1.17-20.7, 0.5-19.3 and 1.2-48.3 mg kg⁻¹ respectively). These values were two to four times higher than the level considered phytotoxic (0.05-0.2 mg kg⁻¹) (Figure 1.2). These concentrations were not enough to consider plants as hyperaccumulators (Van der Ent *et al.*, 2013). Nevertheless, several species show BCF>20 and TF>1 as *A. repens*, *A. graveolens*, *S. americanum* and *Sisymbrium irio*, so they may be promising as Cd phytoextractors.

The concentration of Pb, varied between 4-264, 2-162 and 1-204 mg kg⁻¹ for roots, stem and leaves, respectively. These fell within the concentrations of Pb registered on plants growing on

mine-contaminated sites in the UK (63 - 230 mg kg⁻¹; Kabata-Pendias, 2011). However, they were higher than the values reported by Bech *et al.* (1997; 1.41-2.13 mg kg⁻¹ in shoots). Roots had the highest Pb concentrations, with a BCF between 0 and 70 (Table 1.6). The plants at site II had the highest Pb concentrations in aboveground tissue overall, as well as the highest total and extractable concentrations of Pb in the rhizosphere soil. In the same way, plants of sites V and VI showed low Pb concentration in tissue, related with the lowest Pb extractable concentrations in soil.

R. nasturtium-aquaticum at VI had the highest BCF (70, 31 and 46 mg kg⁻¹ in roots, stem and leaves, respectively), and TF <1, and so the species can be considered as stabilizers of Pb. Other species with a high BCF for Pb were *P. punctatum*, *B. monnieri*, *Ludwigia peploides*, *A. repens* and *F. trinervia*. Concentration of PTE in roots had a positive relationship with soil OM ($r=0.81$; $p<0.001$). Also, concentrations of Cu, Zn and Pb in roots had a high correlation with total concentrations of Zn and Cu in soil ($r>0.94$). The results confirm that species such as *A. repens*, *P. major*, *B. monnieri* and *F. trinervia* are accumulators and can be useful in phytoremediation in wetlands, as reported by Kosobrukhov, Knyazeva and Mudrik (2004), Shukla, Dubey and Rai (2007) and Sánchez-López *et al.* (2015).

Conclusions

The leachate and runoff from mine tailings had a direct influence on pH and total concentration of PTE in soils next to mine tailings. The acidic leaching and runoff from the oxidized mine tailing was neutralized in the water stream. Plants had a direct effect on rhizosphere soil modifying pH and increasing OM content, which had a direct and strong correlation with each other. Factors that controlled availability of PTE in soils were pH, pE, OM and clay content.

Wetlands functioned as a sink of PTE where availability of PTE is higher than in terrestrial soils. Consequently, the absorption and accumulation of PTE by aquatic plant species and wetlands were higher than by terrestrial plants. The occurrence of high concentrations of PTE and perturbation in the flood plain next to mine tailings were the principal factors associated with the presence of ruderal herbaceous plant species. Riparian populations of ruderal plant species act as accumulators of PTE in soil with runoff from mines.

Accumulation was the most frequent plant strategy for dealing with high concentrations of Zn, Cu, Ni, Cd and Pb and depends mainly of bioavailability of PTE in soil and pH. None of the species found were exclusive of metalliferous soil, but the local populations of vegetal species can be considered metal tolerant particularly to Cu, Cd and Pb. Several species have potential as phytoextractors of Cu and Zn.

For species as *R. nasturtium-aquaticum* (a possible hyperaccumulator of Cu), *P. pennsylvanica* and *C. diffusa* (possible hyperaccumulators of Zn) is suitable to evaluate these species under controlled conditions to prove their tolerance strategy. Several species were promising for Cd extraction, among them *S. irio*, *P. major*, *P. punctatum*, *F. trinervia*, *D. minutifolia*, *R. nasturtium-aquaticum* and *C. diffusa*. Other species as *P. punctatum*, *B. monnieri*, *L. peploides*, *A. repens* and *F. trinervia*, most be probed as stabilizers of Pb. A relatively large number of tolerant species could be employed for revegetation. An exhaustive research is recommended to probe the usefulness for phytoremediation of other species presents in Santiago stream not analyzed in this study.

Cited Literature

- Ali H, Khan E, Sajad MA. 2013. Phytoremediation of heavy metals. Concepts and applications. *Chemosphere* 91: 869-881.
- APHA–AWWA–WPCF. 2000. Standard methods for the examination of water and wastewater. 20th ed. Washington, DC. APHA/AWWA/Water Environment Federation.
- Baker AJM, Brooks RR. 1989. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements. A review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery* 1: 81-126.
- Barrutia O, Artetxe U, Hernández A, Olano JM, García-Plazaola I, Garbisu C, Becerril JM. 2011. Native plant communities in an abandoned Pb-Zn mining area of Northern Spain: Implications for phytoremediation and germplasm preservation. *Int J Phytoremediation* 13(3): 256-270.
- Batty LC. 2005. The potential importance of mine sites for biodiversity. *Mine Water Environ* 24: 101-103.
- Bech J, Poschenrieder C, Llugany M, Barceló J, Tume P, Tobias FJ, Barrazuela JL, Vásquez GR. 1997. Arsenic and heavy metal contamination of soil and vegetation around a copper mine in North Peru. *Science Environ* 203: 83-91.
- Chen B, Shan XQ, Qian J. 1996. Bioavailability index for quantitative evaluation of plant availability of extractable soil trace elements. *Plant Soil* 186: 275-283.
- Chen C, Huang D, Liu J. 2009. Functions and toxicity of nickel in plants: Recent advances and future prospects. *Clean* 37(4-5): 304-313.
- Council of the European Communities. 1986. Council directive of 12 June 1986 on the protection of the environment, and in particular of the soil, when sewage sludge is used in agriculture. *Off J Eur Commun* L181. p 6-12.
- Ernst WHO, Krauss GJ, Verkleij JAC, Wesenberg D. 2008. Interaction of heavy metals with the sulphur metabolism in angiosperms from an ecological point of view. *Plant Cell Environ* 31: 123-143.
- Ginocchio R, Baker AJ. 2004. Metallophytes in Latin America: A remarkable biological and genetic resource scarcely known and studied in the region. *Rev Chilena Hist Nat* 77: 185-194.
- González R, González-Chávez MCA. 2006. Metal accumulation in wild plants surrounding mining wastes. *Environ Poll* 144: 84-92.

- González-Chávez MCA, Sánchez-López AS, Carrillo-González R. 2015. Arsenic concentration in wild plants growing on two mine tailings. *Phcog Commn* 5: 1-11.
- González-Sandoval MR, Sánchez-Tovar S, Márquez-Herrera C, Lizárraga-Mendiola L, Durán-Domínguez MC. 2008. Oxidación de jales ricos en pirita en un reactor a escala de banco. Special edition of *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales* 4: 130-138.
- Hernández AJ, Pastor J. 2008. Relationship between plant biodiversity and heavy metal bioavailability in grasslands overlying an abandoned mine. *Environ Geochem Health* 30: 127-133.
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática). 2014. Anuario Estadístico y Geográfico de Hidalgo 2013. July 30, 2014.
- Kabata-Pendias A. 2011. Trace elements in soils and plants. 4th ed. Boca Raton FL: CRC Press. 505 pp.
- Kosobrukhov A, Knyazeva I, Mudrik V. 2004. *Plantago major* plants responses to increase content of lead in soil: growth and photosynthesis. *J Plant Growth Regul* 42(2): 145-151.
- Li JT, Baker AJM, Ye ZH, Wang HB, Shu WS. 2012. Phytoextraction of Cd-contaminated soils: Current status and future challenges. *Crit Rev Environ Sci Tech.* 42(20): 2113-2152.
- Lindsay WL, Norvell WA. 1978. Development of a DTPA soil for zinc, iron, manganese and copper. *Soil Sci Soc Am J* 42: 421-428.
- Liu X, Gao Y, Sardar K, Duan G, Chen A, Ling L, Zhao L, Liu Z, Wu X. 2008. Accumulation of Pb, Cu, and Zn in native plants growing on contaminated sites and their potential accumulation capacity in Heqing, Yunnan. *J Environmental Sci* 20: 1469-1474.
- Manab D, Maiti SK. 2008. Comparison between availability of heavy metals in dry and wetland tailing of an abandoned copper tailing pond. *Environ Monit Assess* 137: 343-350.
- McLean JE, Bledsoe BE. 1992. Behavior of metals in soils. US Environmental Protection Agency EPA/540/S-92/018.
- Moreno-Tovar R, Barbanson L, Coreño-Alonso O. 2009. Neoformación mineralógica en residuos de mina(jales) del distrito minero Zimapán, Estado de Hidalgo, Mexico. *Minería y Geología* 25(2): 31.
- Norma Oficial Mexicana: NOM 001-SEMARNAT-1996. Diario Oficial de la Federación. January, 6, 1997. Mexico DF: Gobierno Federal.
- Norma Oficial Mexicana NOM 147-SEMARNAT/SSA1-2004. Diario Oficial de la Federación. March 2, 2007. 2nd Sect. Mexico DF: Gobierno Federal.

- Rowell DL. 1994. Soil Science: Methods and applications. New York USA: Routledge. 345 pp.
- Rzedowski GC, Rzedowski J. 2001. Flora fanerogámica del Valle de Mexico. Pátzcuaro, Michoacán, Mexico: Instituto de Ecología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.
- Rzedowski GC, Rzedowski J, eds. 2008. Flora del Bajío y de regiones adyacentes. Instituto de Ecología-Centro Regional del Bajío. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán, Mexico.
- Sánchez-López AS, González-Chávez MCA, Carrillo-González R, Vangronsveld J, Díaz-Garduño M. 2015. Wild flora of mine tailings: Perspectives for use in phytoremediation of potentially toxic elements in a semi-arid region in Mexico. *Int J Phytoremediation* 17(5): 476-484.
- Sánchez-Pinzón MS, Cogollo-Pacheco A, Arroyave-Quiceno C, Torrenegra-Guerrero RD, Giraldo-Mejía AM, Barahona-Rosales R. 2010. Botanical diversity and heavy metal content in the residue matrix and plants at the Moravia Dump in Medellín, Colombia. *Rev Fac Nal Agr Medellín* 63(1): 5209-5224.
- Shukla OP, Dubey S, Rai UN. 2007. Preferential accumulation of cadmium and chromium: toxicity in *Bacopa monnieri* L. under mixed metal treatments. *Bull Environ Contam Toxicol* 78(3-4): 252-257.
- Stoltz E, Greger M. 2002. Accumulation properties of As, Cd, Cu, Pb and Zn by four wetland plant species growing on submerged mine tailings. *Environ Exp Bot* 47: 271-280.
- US Environmental Protection Agency (USEPA). 1992. Method 3050A: Acid digestion of sediments, sludge and soils. Washington DC: US Gov Print Office.
- US Environmental Protection Agency (USEPA). 1996. Ecotox thresholds. ECO Update. Washington (DC): Office of Emergency and Remedial Response. US Gov Print Office. Intermittent Bulletin 3(2). EPA 540/F-96-038.
- Van der Ent A, Baker AJM, Reeves RD, Pollard AJ, Schat H. 2013. Hyperaccumulators of metal and metalloid trace elements: facts and fiction. *Plant Soil* 362: 319-334.
- Vibrans H, ed. 2009. Malezas de Mexico. <http://www.conabio.gob.mx/malezasdeMexico>. July 30, 2014.
- Zhuang P, Yang QW, Wang HB, Shu WS. 2007. Phytoextraction of heavy metals by eight plant species in the field. *Water Air Soil Pollut* 184: 235-242.

CAPÍTULO II. COMUNIDADES VEGETALES RIPARIAS EN LA ZONA DE INFLUENCIA DE RESIDUOS DE MINA: FACTORES QUE DETERMINAN SU DIVERSIDAD

Resumen

Los contaminantes del suelo pueden afectar negativamente la biodiversidad de los ecosistemas, especialmente las altas concentraciones de elementos potencialmente tóxicos (EPT) pesados. El conocimiento y la diferenciación del efecto de algunos factores como la acidez del suelo y la disponibilidad de EPT sobre la biodiversidad de las comunidades vegetales son elementales para implementar fitotecnologías en suelos contaminados, con el fin de mejorar las condiciones de crecimiento y promover la biodiversidad. El objetivo de la presente investigación fue conocer la relación que existe entre la diversidad de las comunidades vegetales ribereñas y algunos factores edáficos en un área afectada por los escurrimientos de dos residuos de mina. Se trabajó en seis sitios de muestreo a lo largo del cauce del arroyo Santiago, en Zimapán Hidalgo, México. En cada uno de ellos se estableció un transecto transversal en banda. Se hicieron cuatro muestreos en dos años: dos en la estación húmeda y dos en la seca. El suelo se caracterizó y se midió la concentración extractable (DTPA) de Cu, Zn, Ni, Cd y Pb en suelo. Se hizo un inventario de especies y se estimó su cobertura empleando la escala de Braun-Blanquet. Se representó la diversidad mediante los índices de Shannon y Simpson, así como la similitud entre las comunidades de cada estación mediante los índices de Jaccard y Sörensen. Se encontró que la variación en la diversidad de las comunidades riparias herbáceas se relaciona estrechamente con la acidez del suelo y consecuentemente con el contenido de materia orgánica. Las concentraciones de EPT específicos fue un factor de menor importancia. Además, se muestran y discuten los efectos de perturbaciones ocasionadas por las lluvias en las comunidades riparias.

Palabras Clave: lixiviados ácidos, bioacumulación

Abstract

Ecosystem biodiversity is negatively affected by soil contaminants, especially high concentrations of Potentially toxic elements (PTE). The knowledge and differentiation of the effect of factors such as soil acidity and heavy metal availability on the biodiversity of plant communities is basic for the application of phytotechnologies in contaminated soils, in order to improve plant growth and biodiversity. This study aimed to investigate the relationship between the diversity of riverside communities and some soil factors in the area of influence of mine tailing runoff. Six sampling sites were established along the Santiago creek streambed in Zimapán, Hidalgo, Mexico. At each site, a band transect was established perpendicular to the creek. The transects were sampled four times in two years: once in the rainy season and once in the dry season. Soil features and extractable concentrations (DTPA) of Cu, Zn, Ni, Cd and Pb were measured. In the transect, the presence-absence of species was registered and the species coverage was estimated using the-Braun-Blanquet scale. Diversity was estimated by Shannon and Simpson indices, and the similarity between the communities of each station was evaluated by Jaccard and Sørensen indices. Results showed that diversity of the riparian communities was closely related to soil acidity and consequently with the content of organic matter. Effects of disturbance caused by rain in the riparian communities are presented and discussed.

Key words: soil acidity, accumulation, annual plants

Introducción

El depósito de residuos de la minería a cielo abierto produce efectos negativos sobre el ambiente circundante. En general se acepta que las actividades de la minería cambian negativamente la estructura natural de las comunidades (Batty, 2005; Hernández y Pastor, 2008; Koptsik *et al.*, 2003; Vidic *et al.*, 2006). Algunos autores proponen a la acidez del suelo, las altas concentraciones de EPT (Dazy *et al.*, 2009) y su disponibilidad como los principales factores que reducen la biodiversidad (Liu *et al.*, 2003).

Ernst (1990) planteó que los mecanismos de tolerancia (acumulación, exclusión, translocación) de las especies vegetales a las altas concentraciones de EPT es la principal característica que determina la estructura de las comunidades vegetales en suelos ricos en EPT. Koptsik *et al.* (2003) comprobaron que en los lugares cercanos a los residuos de mina, el establecimiento, la composición y estructura de estas comunidades están condicionados por su tolerancia a una más amplia combinación de estrés.

La salinidad y la baja concentración de nutrientes son factores importantes en la estructura de las comunidades. Otros autores proponen como principales factores limitantes a la pobre estructura del suelo (Faucon, 2011; Parraga-Aguado *et al.*, 2013) o el grado de perturbación (Ward y Tockner, 2001) y la disponibilidad de nutrientes. Son aún más escasos, los trabajos relacionados con el estudio de comunidades vegetales asociadas a ambientes acuáticos con altas concentraciones de EPT. Su estudio es primordial dado que los ecosistemas acuáticos son los principales sumideros de los contaminantes químicos (Hernández y Pastor, 2008) y receptores de sus efectos. Se sabe que el efecto del drenaje ácido y escurrimiento de los residuos de mina sobre la parte superficial del suelo puede

hacerse evidente en corto tiempo. Pero puede tomar años o aún décadas para que se hagan visibles los efectos de contaminantes sobre la biota (Edwards, 2002). Los efectos pueden confundirse con los causados por otro tipo de perturbación, ya sea natural o inducida, lo que hace más complejos estos sistemas.

Sin embargo, los efectos pueden ser muy prolongados, tanto en el suelo como en la biota. En el concepto de Ward y Tockner (2001) la biodiversidad asociada a los ambientes riparios puede explicarse al integrar los procesos funcionales de las comunidades con la heterogeneidad espacio-temporal. La heterogeneidad que caracteriza a los procesos hidrológicos en la escala de paisaje en las planicies inundables, es de especial importancia.

La biodiversidad en las comunidades vegetales riparias la determinan diversos factores, entre ellos la disponibilidad de agua, el mantenimiento de los flujos de corriente, la velocidad de flujo (Bendix, 1997), el crecimiento del plano de inundación (Lite, Bagstad y Stromberg, 2005; Lamers *et al.* 2006), la frecuencia y duración de los períodos de inundación (Hupp y Bornette, 2003). A su vez, estos factores están estrechamente relacionados con la perturbación en el flujo del río, cuya frecuencia e intensidad puede provocar efectos tan severos como la fragmentación y destrucción de los ecosistemas naturales.

Por otra parte, Ernst (1990) planteó que los niveles de tolerancia de las especies a la presencia de EPT son factores clave que determinan la biodiversidad de las comunidades asociadas a los ambientes metalíferos. Otros autores como Kirmer *et al.* (2008) plantearon la necesidad de saber también el lugar que ocupan estas especies en los procesos de sucesión, como respuesta a las características ambientales particulares de cada lugar. Pero

no se ha analizado la continuidad de las especies en estos ambientes. Las plantas con mayor tolerancia al estrés abiótico pueden ser pioneras en la revegetación de sitios desnudos por el impacto de contaminantes.

Conocer las variables y factores de estrés que influyen en la biodiversidad de las comunidades facilita la comprensión de la capacidad de adaptación de las especies presentes en un lugar específico. Consecuentemente este conocimiento facilita la identificación de especies que puedan usarse en la fitorremediación o emplearse en procesos de restauración ecológica (Sánchez-Pinzón *et al.*, 2010). El objetivo de la presente investigación fue determinar la relación que existe entre la diversidad de las comunidades vegetales herbáceas riparias con algunos factores edáficos como la acidez, contenido de materia orgánica, disponibilidad de EPT en el suelo entre otros, en un área afectada por los escurrimientos de dos residuos de mina.

Materiales y Métodos

Área de Estudio

El área de estudio se ubica dentro de la zona minera de Zimapán Hidalgo. Los residuos se han depositado en más de nueve montículos en la parte baja de la cuenca cercanos al arroyo Santiago que desemboca en el río Tolimán. Los residuos de mina de esta zona contienen cantidades variables de sulfuros (PbS, ZnS, CdS, FeCuS₂) y carbonatos (Moreno-Tovar *et al.*, 2009) entre otros minerales. La oxidación de algunos de ellos genera drenaje ácido y aumenta la concentración disponible de As, Pb, Zn, Cu y Cd. La dispersión eólica de EPT y su lixiviación constituye el principal problema ambiental que requiere de intervención (Moreno-Tovar *et al.*, 2009).

El área de estudio se encuentra a los 20° 44'30" N 99°22'30" W y a 1780 msnm. Corresponde a un tramo de 600 m del arroyo Santiago, que desde hace más de 55 años recibe los escurrimientos y lixiviados de tres residuos de mina (Pal, Preisser y San Antonio). Los residuos Pal y Preisser tienen un color naranja rojizo; debido a su avanzado estado de oxidación. En contraste, en los escurrimientos de los residuos San Antonio, la oxidación es menos evidente; ya que se ha controlado por medio de la construcción de muros de contención y reforestación.

Además la oxidación de estos residuos no genera reacción ácida; pues el mineral predominante es esfalerita (Romero *et al.*, 2006). El sitio presenta clima templado, temperatura media anual de 18.3 °C y precipitación pluvial promedio de 391 mm por año con período lluvioso de mayo a junio. Después de un recorrido exploratorio, se establecieron seis sitios de muestreo a lo largo del cauce a una distancia aproximada de 100 m entre sí, considerando la abundancia de vegetación en las comunidades herbáceas riparias y su posición con respecto a los residuos de mina.

Cabe aclarar que durante la época de lluvias, la vegetación fue extremadamente variable debido a las inundaciones frecuentes y cambios en el lecho del río, así que los muestreos se hicieron al cesar las lluvias. Debido a la naturaleza transitoria de la vegetación en la ribera norte del río, los datos registrados solo representaron un estado puntual de las comunidades herbáceas en cuanto a su composición y abundancia.

Toma de Muestras

En cada sitio se estableció un transecto en banda de 10 x 5 m perpendicular al cauce del río, cubriendo una superficie de 50 m², del lado norte del río, es decir el lado que recibe los

escurrimientos de los residuos de mina. El estudio comprendió dos muestreos al final de las lluvias (noviembre de 2012 y octubre de 2013) y dos muestreos en temporada de lluvias (mayo de 2013 y julio de 2014). En todos los casos se muestrearon plantas y suelo rizosférico.

Se tomó una muestra de suelo rizosférico por especie y una muestra simple de suelo no rizosférico por estación, ambas a 10 cm de profundidad. Las muestras de suelo se secaron al aire y se cribaron por una malla de 2 mm. Se analizó la distribución del tamaño de partículas mediante el procedimiento de Bouyucos (Gee y Bauder, 1986). Tan pronto como las muestras llegaron al laboratorio se determinó el pH en una suspensión 1:2.5 suelo: agua destilada. También se estimó el contenido de materia orgánica por el método de Walkley and Black, descrito por Rowell (1994). Se estimó la concentración extractable con DTPA de Cu, Zn, Ni, Cd y Pb mediante el método de Lindsay y Norvell (1978).

Plantas

De cada especie vegetal se recolectaron dos ejemplares completos para su identificación taxonómica; la cual se hizo de acuerdo Rzedowski y Rzedowski (2001), Rzedowski y Rzedowski (2008) y Vibrans (2009). Se depositó un ejemplar de respaldo al Herbario Nacional (MEXU) y otro al Herbario-Hortorio del Colegio de Postgraduados (CHAPA). Se registró la presencia-ausencia de las especies vegetales en cada estación y muestreo y se estimó la cobertura-abundancia por relevés de Braun-Blanquet (Müeller-Dombois y Ellenberg, 1974). Con los datos obtenidos se estimó la diversidad vegetal en cada estación mediante los índices de Shannon (Spellerberg y Fedor, 2003) y Simpson (Simpson, 1949).

Se emplearon estos dos índices para conocer y confirmar la relación que tiene la biodiversidad con los factores abióticos. Así mismo, se comparó la similitud de las comunidades entre estaciones empleando los índices de Sørensen (Sørensen, 1948) y Jaccard (Real y Vargas, 1996). Para calcular los índices de diversidad y similitud, se consideraron los datos de cobertura de cada ejemplar por cuadrante por estación, en cada una de las cuatro fechas de muestreo.

Análisis Estadístico

Se hizo un análisis de variancia (ANDEVA) y una comparación de medias (prueba de Tukey) con el objetivo de conocer si hubo un efecto significativo de las estaciones de muestreo sobre las variables estudiadas. Además, se hizo un análisis de correlación de Pearson para conocer la existencia de algún vínculo entre las variables estudiadas. De manera complementaria se hizo un análisis de regresión múltiple por pasos para determinar cuáles son los principales factores que influyen en el comportamiento de la biodiversidad de plantas y en qué medida lo hacen. Los análisis estadísticos se hicieron mediante el programa estadístico SAS 9.0.

Análisis de Cobertura

En mayo de 2013 (al final de la época de secas) se hizo un análisis más detallado de la cobertura de la vegetación mediante mapeo fotográfico por cuadrantes. Este análisis se llevó a cabo en las estaciones I (afectada por los residuos Pal) y V (afectada por los residuos de San Antonio). La finalidad de esta comparación fue contrastar la diversidad puntual en dos zonas que, por su exposición a distintos residuos de mina, son

presumiblemente distintas por sus condiciones de acidez y contenido de materia orgánica (Carmona-Chit *et al.*, 2016).

El mapeo fotográfico abarcó un área de 40 m² en cada estación y se basó en la medición del área cubierta por cada especie a partir de la proyección vertical como un porcentaje del área del cuadrante.

Resultados

En el período que comprendió el estudio, especialmente en la temporada de lluvias de 2014, se encontró un importante grado de alteración e inestabilidad en el sistema ripario, debido a que se presentaron precipitaciones inusuales mayores a 700 mm)(INEGI, 2014). Estas condiciones aumentaron la escorrentía de lixiviados y arrastre superficial de residuos de minas durante la época de lluvias. También fue necesaria la intervención humana para controlar el cauce (tala de carrizo y colocación de diques) y evitar desbordes.

En los períodos de lluvias, estos factores marcaron cambios importantes en los niveles de inundación y dirección del cauce del río, los cuales se hicieron evidentes sobre todo en la estación I. En la Figura 2.1 se esquematizan los principales hábitats que se encontraron en la zona de estudio, los cuales son determinados principalmente por el efecto de inundación, crecimiento del río y la cercanía de los residuos de mina.

En dicha figura se muestran también las formas de vida de la vegetación riparia herbácea y su distribución en la zona de estudio. Se encontraron los siguientes habitats:

Lecho del arroyo. Aquí habitan todas las especies libres flotadoras y flotadoras enraizadas.

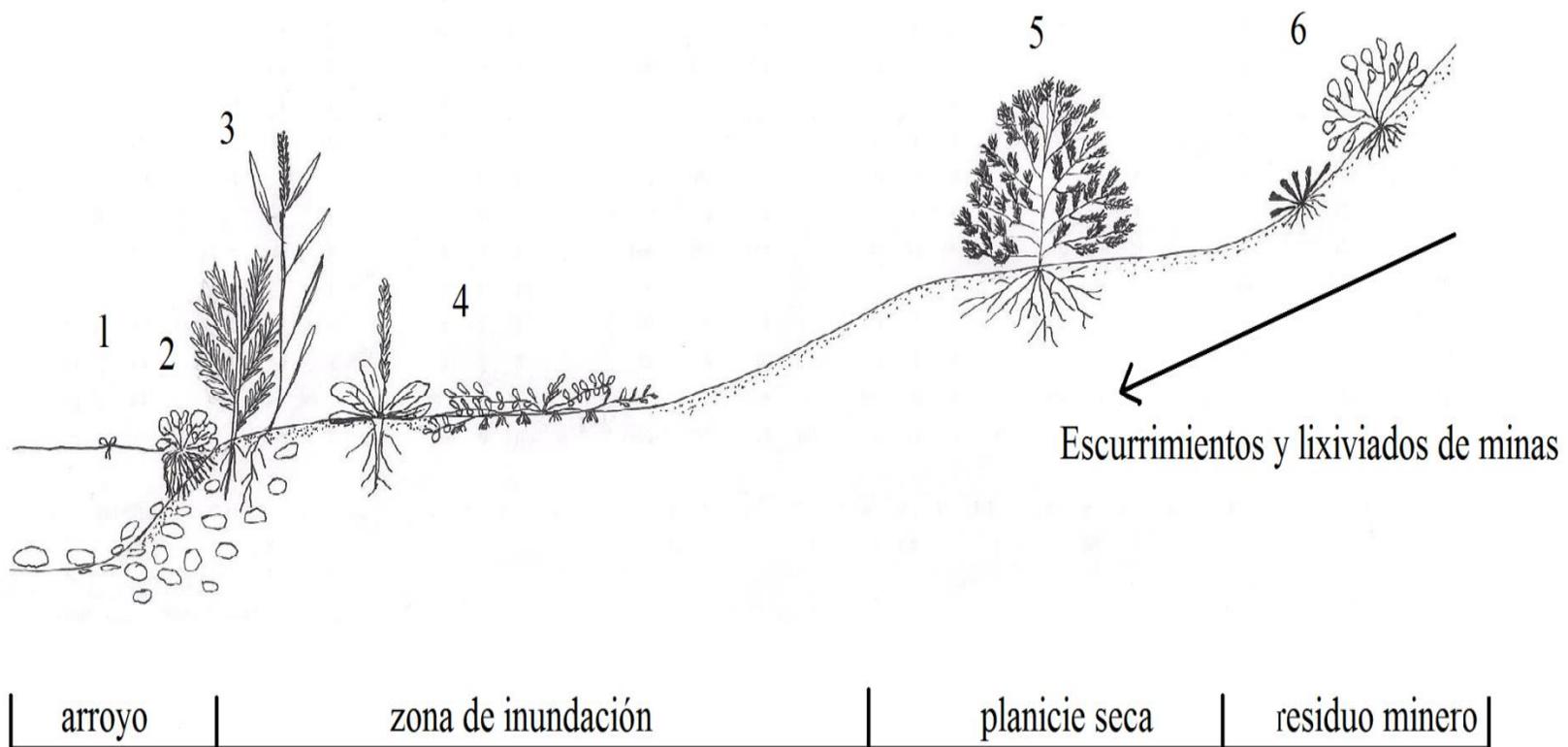


Figura 2.1 Formas de vida de la vegetación herbácea y esquema de distribución en el sitio de estudio. 1. Hierbas acuáticas libres flotadoras; 2. Hierba acuática enraizada emergente; 3. Hierba terrestre del humedal; 4. Hierba terrestre; 5. Arbusto terrestre; 6. Hierbas v arbustos en residuos de mina.

Zona de Inundación. Planicie que es cubierta por el agua durante la crecida arroyo. Abarca una distancia entre 5 y 10 m desde el límite del arroyo.

Planicie seca. Es una zona a la que normalmente no llega el lecho del arroyo durante la crecida. Se extiende cerca de 50 m desde la zona de inundación hasta la orilla de los residuos mineros.

Residuos de mina. Son los restos de las actividades mineras que fueron depositados al aire libre formado principalmente de roca molida y que ha sufrido procesos de intemperismo.

De los hábitats encontrados en el área de estudio, la planicie terrestre fue la menos perturbada por efecto de las inundaciones. La planicie de inundación tuvo cambios en cuanto a los niveles y extensión de la inundación, mismos que se observaron pero no pudieron medirse, pues el nivel del río incrementó varias veces el nivel habitual. El lecho del río experimentó cambios visibles, alterando drásticamente la cubierta vegetal de cada estación. Más del 50% de las plantas herbáceas fueron arrasadas por el agua o cubiertas con sedimentos; otras fueron cubiertas por los sedimentos provenientes de aguas arriba.

En general, se observó que la vegetación arbórea estuvo compuesta principalmente por *Salix bonplandiana* Kunth, *Schinus molle* L., *Prosopis laevigata* (Willd.) M.C.Johnst. y *Acacia farnesiana* L. Las últimas tres especies son comunes en la vegetación ruderal en ambientes áridos de la región. *Arundo donax* L. creció abundantemente en el lecho del arroyo, cubriendo más de 30 m a lo ancho del cauce, siendo particularmente invasiva a las orillas del arroyo. Visiblemente ocupó la mayor parte de la planicie de inundación,

desplazando a las demás especies. *Ricinus communis* L. también prosperó en la orilla del arroyo.

Suelo

Las estaciones I y II reciben los lixiviados y escurrimientos de los residuos de mina Pal y Preisser, mientras que las estaciones V y VI reciben los lixiviados del residuo San Antonio. Los efectos de ambos tipos de residuos fueron claros en las características del suelo (Tabla 2.1). El mayor contraste se encontró entre las estaciones I y V. La estación I presentó las más altas concentraciones extractables de Cu y Pb (48 y 107 mg kg⁻¹ respectivamente), pH=6 y bajo contenido de materia orgánica (2.8%).

Tabla 2.1. Características del suelo de rizósfera por estación. Riqueza y diversidad de especies.

Estación	I	II	III	IV	V	VI
	DTPA extraíble EPT (mgkg ⁻¹) ^a					
Ni	3±3	5±5	5±5	5±6	0	1±1
Cd	5±4	5±3	7±5	5±3	1	2±2
Cu	48±23	34±37	22±23	34±20	18	33±31
Pb	107±174	65±66	19±5	26±16	51±17	45±41
Zn	765±679	494±338	444±111	404±138	1038±1213	910±1155
pH	6.4	6	6.1	6.7	7.6	7.6
MO (%)	2.8	2.9	2.3	2.7	5.1	4
Riqueza ^b	16	20	23	24	25	21
Shannon ^b	2.1	2.2	1.8	1.7	0.4	1.6
Simpson ^b	0.15	0.14	0.09	0.23	0.33	0.23

^avalores promedio (n=7) ± desviación estándar. ^bConsiderando todas las especies en todos los muestreos. MO=materia orgánica

La estación V presentó las condiciones más altas de pH (7.6), MO (5.1%) y Zn extraíble (1038 mg kg⁻¹) y también la menor concentración extractable de Ni, Cd y Cu (trazas, 1 y 18 mg kg⁻¹, respectivamente). Aunque los lixiviados de los residuos I y II fueron ácidos ocurrió un proceso de neutralización. Se observó un aumento gradual, tanto en el pH como en la materia orgánica del suelo rizosférico, desde la estación I a la VI (Tabla 2.1), lo cual se correlacionó positivamente ($r= 0.99$; $p=0.001$). Igualmente, la disponibilidad de EPT en las estaciones se correlacionó estrechamente con la acidez del suelo y a su vez con la exposición del suelo a los escurrimientos y lixiviados de los residuos de mina.

Plantas

El listado de completo de las especies encontradas en este estudio puede consultarse en Carmona-Chit *et al.* (2016). La riqueza de especies (Tabla 2.1) estuvo relacionada negativamente con la distancia entre las comunidades y los residuos de mina. La estación I presentó los mayores índices de diversidad (Shannon=2.1; Simpson=0.15), mientras que la estación V mostró la menor diversidad de especies (Shannon =0.4; Simpson = 0.33). Por la riqueza de especies los sitios de muestreo guardaron el orden siguiente: I > VI > II > III > IV > V. El análisis de correlación entre estaciones indicó un gradiente de cambio en la composición específica de las comunidades y muy alta correlación entre el índice de diversidad de Simpson con el pH ($r=0.98$; $p=0.001$) y con la materia orgánica ($r=0.97$; $p=0.001$).

También se observó correlación negativa entre el índice de Shannon y el índice de Simpson, lo que confirma que, cuando existe mayor dominancia de especies en alguna comunidad, baja la diversidad (o equidad entre la proporción de cada especie). El análisis

de regresión múltiple (Tabla 2.2) mostró una relación estrecha entre ambos índices de diversidad y pH. Al introducir una segunda variable independiente en el análisis de regresión múltiple, el grado de correlación (R^2) disminuyó, lo que mostró que la variabilidad en la biodiversidad lo causa en su mayor parte un solo factor: la acidez del suelo.

Tabla 2.2. Resultados del Análisis de Regresión Múltiple

Y ₁	X ₁	R ² Ajustada	Ecuación	Cuadrado promedio	t	Prob (t)	F	Prob F
Índice Simpson	pH	0.73	$Y = -0.53 + 0.11x_1$	0.03	-2.807 ^a 3.87 ^b	0.048 0.018	14.95	0.02
Índice Shannon	pH	0.48	$Y = 6.32 - 0.69x_1$	1.24	3.22 ^a -2.40 ^b	0.032 0.074	5.76	0.07
Índice Shannon	MO	0.66	$Y = 3.38 - 0.53x_1$	1.54	6.20 ^a -3.33 ^b	0.003 0.029	11.12	0.03
Nº Especies perenes	pH	0.56	$Y = 24.85 + 5.42x_1$	74.94	1.85 ^a 2.72 ^b	0.138 0.052	7.42	0.05
Nº Especies anuales	pH	0.59	$Y = 77.26 - 5.76x_1$	84.63	5.71 ^a -2.88 ^b	0.005 0.045	8.28	0.04

^a=Intersección, ^b= X₁

Se observó que al emplear el índice de Shannon, la variabilidad de la biodiversidad se explica mejor en función de la materia orgánica y no del pH (Tabla 2.1). No obstante debe recordarse que estos dos factores mostraron correlación muy estrecha ($\alpha=0.98$). Sin embargo, se destaca que la variación en la biodiversidad de plantas no tuvo una relación significativa con la concentración de ninguno de los EPT evaluados. Por tanto, no es la concentración total de EPT en el suelo ni su disponibilidad, sino las condiciones de acidez del suelo (pH, íntimamente relacionada con la materia orgánica), la que determina la variabilidad en la biodiversidad.

Las especies perennes conformaron la mayor parte del estrato herbáceo (55-68%) mientras que las anuales contribuyeron entre 30% y 50%. Las especies anuales tuvieron su mayor proporción en la estación I, la más expuesta a la perturbación antropogénica (Figura 2.2A). Es importante destacar que el pH es un factor que determina la proporción de especies anuales y perennes en las comunidades bajo estudio (Tablas 2.1 y 2.3).

Las familias Asteraceae, Verbenaceae y Brassicaceae fueron las mejor representadas (25%-50%, 5%-15%, 5%-15%, respectivamente) y estuvieron presentes en todas las estaciones (Figura 2.2B). Predominaron las hierbas terrestres (45%-70%), las hierbas terrestres de zonas húmedas (30%) y las plantas acuáticas enraizadas emergentes (10%-25%; Figura 2.2C). Se observó un gradiente en la proporción de especies por sus formas de vida/hábitat: mayor número de especies de hierbas terrestres, seguida de las hierbas asociadas a la planicie de inundación y menor proporción de hierbas acuáticas (Figura 2.2C). Sin embargo, se encontró que las especies que mostraron mayor cobertura (*Acmella repens*, *Commelina diffusa*, *Phyla fruticosa*) se asocian a la planicie de inundación (Tabla 2.3).

El índice de cobertura-abundancia de Braun-Blanquet demuestra que la estación I tuvo mayor cobertura y abundancia de especies que la estación V (Tabla 2.3). La estación I mostró la mayor cobertura de plantas, con 16 especies, en comparación con la estación V con 21 especies. Las especies con mayor cobertura (entre el 25% y 50 %) fueron *Rorippa nasturtium-aquaticum* y *Phyla fruticosa* en la estación I y en la estación V *Acmella repens* y *Commelina diffusa* (Tabla 2.3).

Todas estas especies dominantes se consideran especies perennes. *R. nasturtium* se localizó dentro del lecho del arroyo, mientras que las demás especies colonizaron la zona de inundación (Figura 2.1).

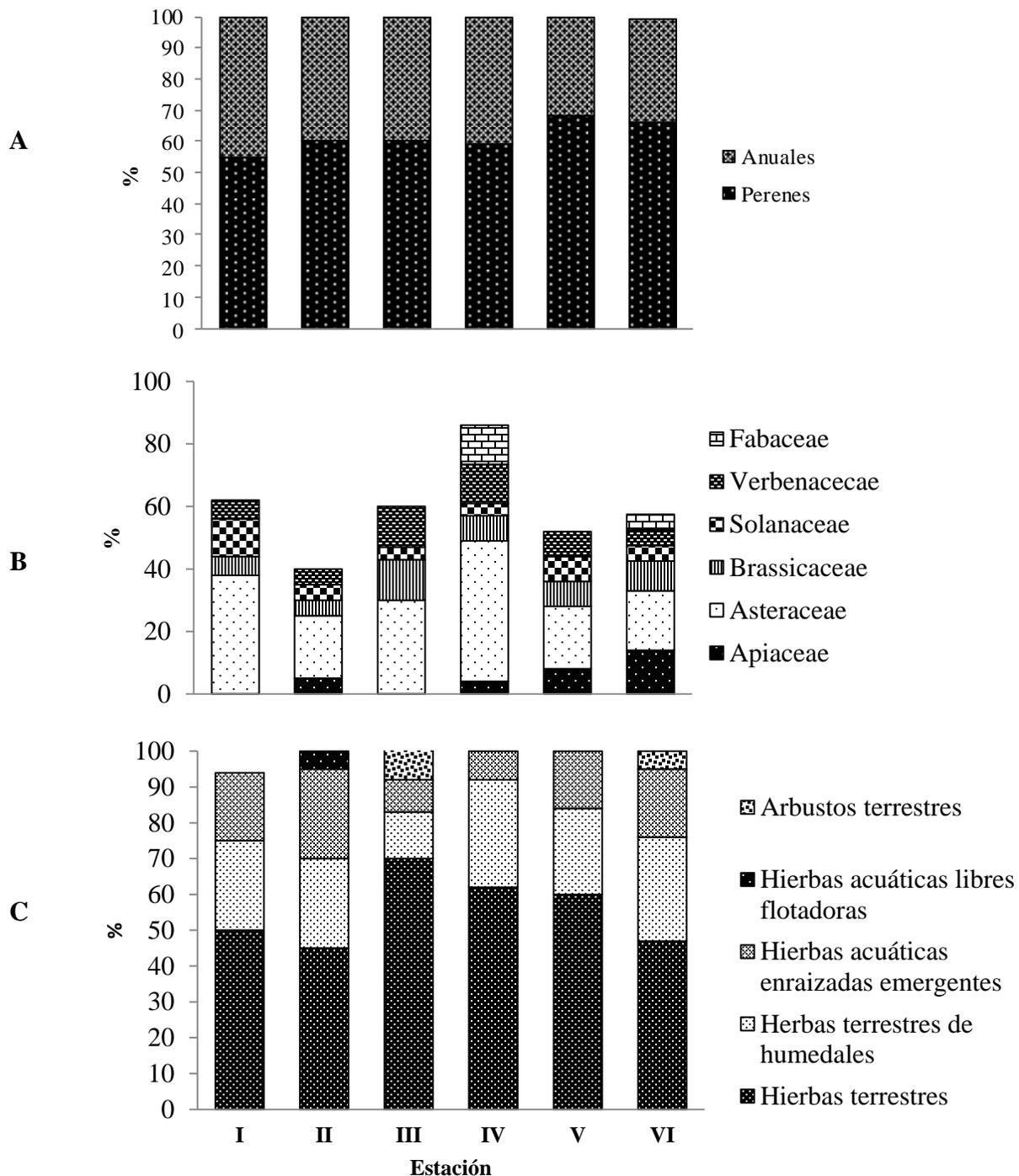


Figura 2.2. Porcentaje por estación de: A: formas de vida, B: familias de plantas y C: ciclo de vida

Otras especies que llegaron a cubrir hasta 25% de la superficie de la estación I fueron *Flaveria trinervia*, *Xanthium strumarium*, *Plantago major* y *Polygonum punctatum*. Algunas especies como *Bidens pilosa*, *Solanum americanum* y *Flaveria trinervia* se encontraron en ambas condiciones contrastantes de las estaciones I y V. Estas especies son ruderales, pioneras, anuales y colonizaron desde la zona de inundación hasta la planicie seca cercana a los residuos de minas.

El resto de las especies presentaron cobertura menor a 25%, presentándose sólo en alguna de las dos estaciones (Tabla 2.3). Fue generalizado encontrar especímenes solitarios. No se encontraron especies exclusivas de condiciones ácidas en la planicie de inundación adyacente a los residuos Pal y Preisser. La disimilitud más alta se encontró entre las estaciones I y VI como lo indican los índices de Sørensen y Jaccard (Figura 2.3). Las comunidades con la mayor similitud fueron la V y VI (Sørensen= 0.8), con la mayor proporción de especies presentes (58 %). Ambas se encontraban cercanas a los residuos de San Antonio.

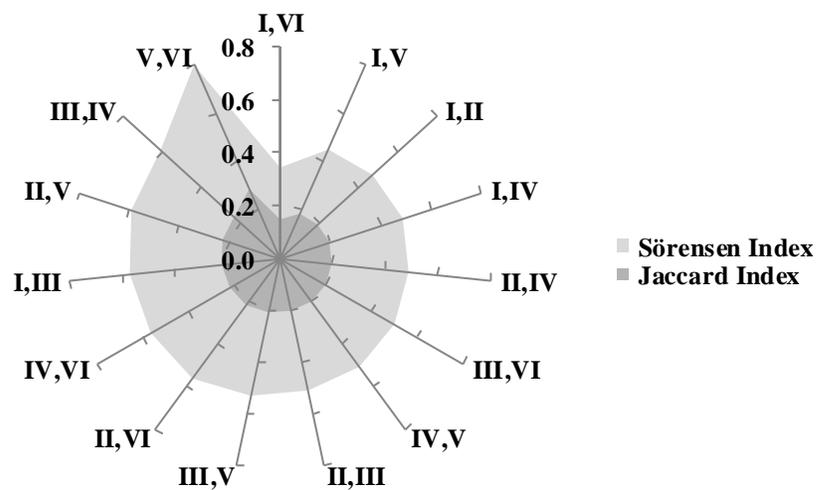


Figura 2.3. Índices de similitud (Sørensen y Jaccard) entre estaciones. Cada eje concéntrico corresponde a la similitud de dos estaciones, referida a la escala vertical. La similitud es proporcional a la superficie

Tabla 2.3. Lista de especies encontradas en las estaciones I y V y su correspondiente índice de cobertura-abundancia de Braun- Blanquet.

Estación		I	V
Especie	Familia	Índice de cobertura	
<i>Apium graveolens</i> L.	Apiaceae	-	dispersa <5%
<i>Berula erecta</i> (Huds.) Coville	Apiaceae	-	dispersa <5%
<i>Petunia parviflora</i> Juss.	Apiaceae	dispersa <5%	-
<i>Sanvitalia procumbens</i> Lam.	Asteraceae	solitaria con poca cobertura	
<i>Acmella repens</i> (Walter) Rich.	Asteraceae	5-25%	25-50%
<i>Bidens pilosa</i> L.	Asteraceae	solitaria con poca cobertura	-
<i>Flaveria trinervia</i> (Spreng.) C. Mohr	Asteraceae	5-25%	-
<i>Viguiera dentata</i> (Cav.) Spreng.	Asteraceae	común, cobertura media 5 %	-
<i>Verbesina encelioides</i> (Cav.) Benth. & Hook. ex A. Gray	Asteraceae	solitaria con poca cobertura	-
<i>Xanthium strumarium</i> L.	Asteraceae	5-25%	-
<i>Rorippa nasturtium-aquaticum</i> (L.) Schinz & Thell.	Brassicaceae	25-50%	-
<i>Sisymbrium irio</i> L.	Brassicaceae	-	dispersa, <5%
<i>Commelina diffusa</i> Burm. f.	Commelinaceae	-	25-50%
<i>Spirodela polyrrhiza</i> (L.) Schleid.	Lemnaceae	solitaria con poca cobertura	-
<i>Plantago major</i> L.	Plantaginaceae	5-25%	dispersa, <5%
<i>Polygonum punctatum</i> Elliot var. <i>eciliatum</i> Small	Polygonaceae	5-25%	-
<i>Solanum americanum</i> Mill.	Solanaceae	solitaria con poca cobertura	-
<i>Bacopa monnieri</i> (L.) Pennell	Scrophulariaceae	dispersa, <5%	-
<i>Parietaria pensylvanica</i> Muhl. ex Willd.	Urticaceae	dispersa, <5%	-
<i>Phyla fruticosa</i> (Mill.) K. Kenn. ex Wunderlin & B.F. Hansen	Verbenaceae	25-50%	-
<i>Verbena litoralis</i> Kunth	Verbenaceae	-	dispersa, <5%

Discusión

El efecto de los lixiviados de residuos de mina sobre la disponibilidad de EPT y por consecuencia, sobre la diversidad de especies, es claro. Este efecto se debe principalmente a los cambios en la acidez del suelo, lo que se corrobora por el gradiente en las características del suelo de rizósfera desde la estación I a la VI. Ambas estaciones presentaron la más alta disimilitud, es decir, la más alta heterogeneidad entre la composición de ambas.

Un ejemplo del efecto de las condiciones de acidez y el contenido de materia orgánica en el suelo es la presencia de *Commelina diffusa*, la cual creció sólo en condiciones de pH neutro o alcalino con mayor contenido de materia orgánica en la planicie de inundación cercana a los residuos de San Antonio. Dada la estrecha relación entre estos dos factores del suelo, puede considerarse a la materia orgánica como un segundo factor determinante de la biodiversidad (Correlación Simpson-pH; Simpson-MO; Tabla 2.2).

De la misma manera, la exposición a los escurrimientos de diferentes residuos de mina afectó la riqueza de especies en las estaciones I y V, acentuando su disimilitud. Esta disimilitud es cercana al máximo posible, debido a la diferente composición en las especies con mayor cobertura (Figura 2.3). Las características particulares de acidez en ambos ambientes conllevan a la presencia de variaciones estructurales y funcionales en las comunidades vegetales que, según Sculthorpe (1985), se expresan en diferente composición de especies y formas de vida en las comunidades vegetales.

Los resultados del presente trabajo coinciden con los reportados por Koptsik *et al.* (2003) y Liu, Coveney y Chen (2003) quienes, en condiciones similares, encontraron que la acidez de los

residuos de mina, estrechamente relacionada con la disponibilidad de EPT, es determinante en la diversidad de las comunidades herbáceas acuáticas y de riberas adyacentes a residuos de mina.

Aunque en la diversidad de especies vegetales pueden influir otras variables, tales como la concentración total de EPT y el pobre contenido de materia orgánica en el suelo, éstos no fueron los mejores predictores de la diversidad de especies en áreas contaminadas por EPT, al menos en este caso. Las altas concentraciones de EPT disponibles son factores que obligan a que las plantas adopten alguna estrategia de sobrevivencia, ya sea que impidan su entrada a los tejidos de la planta o bien los acumulen en algunos de sus tejidos.

Se observó que todas las especies encontradas en el lugar acumularon EPT como estrategia de sobrevivencia (Carmona-Chit *et al.*, 2016). Si la acumulación es una estrategia de tolerancia generalizada ante las altas concentraciones de EPT en esta comunidad de plantas, entonces es cierto lo que plantea Ernst (1990) que la diversidad de estas comunidades está en función de los mecanismos de tolerancia de las especies encontradas. En este caso la diversidad de estas comunidades podría restringirse a ecotipos con capacidad de acumular EPT como estrategia de tolerancia.

Por otra parte, los bajos índices de similitud entre las comunidades de otras estaciones (Figura 2.3) sugieren la presencia de cambios o perturbaciones adicionales, relacionados muy probablemente con los niveles de inundación, el cauce del arroyo y la intensidad de los eventos e, incluso por periodos prolongados de sequía. Al respecto, Zepeda-Gómez *et al.* (2012) explicaron que las planicies de inundación funcionan como reguladores de flujo de nutrimentos y sedimentos entre los ambientes terrestre y acuático, y por tanto favorecen condiciones para el establecimiento de comunidades vegetales variables. Las estaciones III y IV corresponden a una

zona de transición ubicada entre los residuos de mina oxidados (ácidos) y los no oxidados. Además, se ubican en una zona donde la planicie de inundación se extiende hasta más de 50 m desde el margen del río hasta los residuos de mina.

Se observó que en esta zona hay una fluctuación menor en los niveles de inundación y por tanto las condiciones son más estables en comparación a las otras estaciones. Los índices de diversidad indican que en estas estaciones hay una mayor proporción de especies terrestres, pero con una diversidad menor. La baja proporción de especies acuáticas estrictas puede asociarse con los períodos cortos de estabilidad en la velocidad de flujo en el cauce, y con la magnitud y la localización de la sedimentación (Lamers *et al.*, 2006). La mayor población de *Rorippa nasturtium-aquaticum* se encontró en un momento de estabilidad del río, cuyas condiciones permitieron la acumulación de sedimentos con un alto contenido de materia orgánica, en los que esta especie puede enraizar.

Las características de las comunidades vegetales bajo estudio coinciden con las consideraciones de Kirmer *et al.* (2008) para las comunidades vegetales en zonas de minas. Generalmente, éstas tienen una estructura de vegetación abierta causada por condiciones deficientes de nutrientes en el suelo. Los suelos rizosféricos se caracterizaron por un bajo contenido de materia orgánica (Carmona-Chit *et al.*, 2016) lo que favoreció el establecimiento de especies pioneras (Kirmer *et al.*, 2008).

Dos elementos secundarios que influyen también la diversidad de las comunidades asociadas a los ambientes húmedos son la frecuencia e intensidad de la fluctuación en los niveles de inundación (Cronk y Fennessy, 2001; Lite, Bagstad y Stromberg, 2005). Ambos factores contribuyen a la alteración del paisaje con la consecuente aparición de numerosos sitios para el

establecimiento de especies perennes, pero también para la colonización de especies anuales (Kirmer *et al.*, 2008). Bornette y Amoros (1996) demostraron que los niveles de diversidad en las comunidades riparias se relacionan también con alta heterogeneidad espacial en el sustrato.

Los grupos coexistentes en estos ambientes pueden variar sus habilidades de dispersión y competencia en su fenología (Baker y Walter, 1990). Esto explica la presencia de especies anfibias en la planicie de inundación (tolerantes a períodos cortos de inundación) y la alta proporción de especies anuales, en su mayoría ruderales y pioneras (propia de lugares perturbados). Lite, Bagstad y Stromberg (2005) y Ward y Tockner (2001) consideraron que los patrones de riqueza de las comunidades herbáceas de ribera responden a la variación en el tiempo de características como el ancho de la llanura de inundación, la intensidad de flujo, la diversidad topográfica y la cubierta vegetal. Se considera importante evaluar con más detalle estas características en subsecuentes investigaciones.

Por otra parte, la presencia de especies anuales sugiere también un estado primario de sucesión; cuya función es iniciar la formación del suelo, proteger el suelo de la erosión física, incrementar el contenido de nutrientes y facilitar así el establecimiento progresivo de especies bianuales y perennes a largo plazo (Dazy *et al.*, 2008; Ottenhof *et al.*, 2007). Wei *et al.* (2003) mencionó que las especies anuales que se encuentran en suelos contaminados con EPT tienen ciertas características como bajos requerimientos nutrimentales, fuerte comportamiento competitivo, flexibilidad en los ciclos de vida.

Otras características presentes son la capacidad de acumular EPT (Carmona-Chit *et al.*, 2016) y su capacidad reproductiva (dispersión de semillas por viento; Cooke y Johnson, 2002). Su corto ciclo de vida, pequeña talla y sistema radical superficial, hacen que estas especies respondan

rápidamente a los cambios ambientales a lo largo de gradientes ambientales cortos y tengan una mayor riqueza en comparación con las poblaciones perennes (Lite, Bagstad y Stromberg, 2005).

Entonces, la biodiversidad del lugar puede explicarse: 1) Por el grado de acidez en el suelo debido al efecto de escurrimiento de residuos de mina y 2) por el comportamiento en los regímenes de inundación y cambios en el cauce del río, lo que favorece la heterogeneidad del hábitat y puede influir en la diversificación de la vegetación. Algunas especies se consideraron notables porque estuvieron presentes en todas las estaciones, independientemente de las perturbaciones por inundación y mostraron amplia tolerancia a la alta disponibilidad de EPT.

Por ejemplo, en la planicie terrestre destacaron: *Bidens pilosa*, *Flaveria trinervia* y *Plantago major*; *Xanthium strumarium* estuvo estrechamente asociada a la planicie de inundación y *Polygonum punctatum* se considera como una especie acuática ubicada sobre la margen del río. *Rorippa nasturtium-aquaticum* tuvo mayor cobertura en la estación I. Sin embargo estuvo presente en forma de manchones en todo el transecto.

Estos factores y sus combinaciones particulares son limitantes de los patrones espaciales de la riqueza de las especies herbáceas en una estación en particular (Lite, Bagstad y Stromberg, 2005) y pueden ayudar a determinar el grado de influencia de estos factores de disturbio en la diversidad de plantas. Finalmente, es importante considerar que las especies pioneras que se identificaron en esta investigación pueden tener función primordial en la fitorremediación. Para que los resultados de los trabajos de fitorremediación sean exitosos, es necesario tomar en cuenta las interacciones ecológicas entre las especies que se emplean (Martínez-Ruiz y Fernández-Santos 2005; Rufo y De la Fuente, 2010).

Faucon (2011) sugirió que los ambientes asociados a los residuos de minas son microambientes que influyen en la conservación de especies adaptadas a un nivel importante de estrés multifactorial, tanto por su tolerancia a múltiples condiciones desfavorables del suelo (Freitas *et al.*, 2004), como por su aporte en la materia orgánica por su biomasa en los procesos biogeoquímicos del suelo (Ottenhof *et al.*, 2007). Esto explica la presencia de numerosas especies ruderales de amplia distribución, preadaptadas a estos múltiples estresores.

Conclusiones

1. El pH fue el factor más determinante de la diversidad y composición de las comunidades herbáceas de ribera y se relacionó estrechamente con el contenido de materia orgánica en el suelo.
2. Las escorrentías y lixiviados de los residuos de mina son el principal factor que determinan la acidez del suelo. Afectan la composición y abundancia de las comunidades riparias, la dominancia de las especies y finalmente su diversidad. La estructura de estas comunidades no depende sólo de los mecanismos de tolerancia a EPT de las especies vegetales.
3. El grado de alteración del área de estudio se debe principalmente a la interacción de tres factores: a) la escorrentía y arrastre superficial de residuos de mina, b) la frecuencia e intensidad de los períodos de inundación y c) la intensidad y cambios en el cauce del río. Estos factores influyeron en la proporción de especies por cada hábitat de la zona riparia. Es deseable un estudio más detallado sobre estos aspectos con respecto a tiempo y períodos de lluvia.

4. Las comunidades vegetales bajo estudio presentan diversos niveles de sucesión; en los que las especies pioneras tienen función primordial, por su alto nivel de tolerancia a las condiciones de estrés multifactorial.

Literatura Citada

- Baker AJM, Walter PL. 1990. Ecophysiology of metal uptake by tolerant plants. In: Shaw AJ. (Ed.). Heavy metal tolerance in plants: Evolutionary aspects. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida.
- Batty LC. 2005. The potential importance of mine sites for biodiversity. *Mine Water and the Environment* 24: 101-103.
- Bendix J. 1997. Flood disturbance and the distribution of riparian species diversity. *Geographical Review* 87(4): 468-483.
- Bornette G, Amoros C. 1996. Disturbance regimes and vegetation dynamics: role of floods in riverine wetlands. *Journal of Vegetation Science* 7(5): 615-622.
- Carmona-Chit E, Carrillo-González R, González-Chávez MCA, Vibrans H, Yañez-Espinosa L, Delgado-Alvarado A. 2016. Riparian plants on mine runoff in Zimapán, Hidalgo, México: Useful for phytoremediation? *International Journal of Phytoremediation* 18(9): 861-868.
- Cooke JA, Johnson MS. 2002. Ecological restoration of land with particular reference to the mining of metals and industrial minerals: A review of theory and practice. *Environmental Review* 10(1): 41-71.
- Cronk JK, Fennessy MS. 2001. *Wetland plants: Biology and ecology*. CRC Press. Boca Raton Florida.
- Dazy M, Jung V, Férard JF, Masfaraud, JF. 2008. Ecological recovery of vegetation on a coke-factory soil: role of plant antioxidant enzymes and possible implications in site restoration. *Chemosphere* 74(1): 57-63.
- Dazy M, Béraud E, Cotelle S, Grévilliot F, Férard JF, Masfaraud JF. 2009. Changes in plant communities along soil pollution gradients: Responses of leaf antioxidant enzyme activities and phytochelatin contents. *Chemosphere* 77(3): 376-383.
- Edwards CA. 2002. Assessing the effects of environmental pollutants on soil organisms, communities, processes and ecosystems. *European Journal of Soil Biology* 38(3): 225-231.

- Ernst WHO. 1990. Mine vegetation in Europe. In: Shaw AJ (Eds). Heavy metals tolerance in plants: Evolutionary Aspects. CRC Press. Boca Raton Florida. pp. 22-32
- Faucon MP, Parmentier I, Colinet G, Mahy G, Ngongo-Luhembwe PM, Meerts P. 2011. May rare metallophytes benefit from disturbed soils following mining activity? The case of the *Crepidiorhopalon tenuis* in Katanga (DR Congo). *Restoration Ecology* 19(3): 333-343.
- Freitas H, Prasad MNV, Pratas J. 2004. Plant community tolerant to trace elements growing on the degraded soils of São Domingos mine in the south east of Portugal: environmental implications. *Environment International* 30(1): 65-72.
- Gee GW, Bauder JW. 1986. Particle-size analysis. In: Klute A (Ed.) *Methods of Soil Analysis. Part 1: Physical and Mineralogical Methods*. 2nd ed. American Society of Agronomy and Soil Science Society of America. Madison. WI. pp. 383-410.
- Hernández AJ, Pastor J. 2008. Relationship between plant biodiversity and heavy metal bioavailability in grasslands overlying an abandoned mine. *Environmental Geochemistry and Health* 30(2): 127-133.
- Hupp CR, Bornette G. 2003. Vegetation as a tool in the interpretation of fluvial geomorphic processes and landforms in humid temperate areas. In: Kondolf GM, Piégay H. (Eds.). *Tools in Fluvial Geomorphology*. John Wiley and Sons. Chichester. p. 269-288.
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática). 2014. Anuario Estadístico y Geográfico de Hidalgo 2013. Julio 30, 2014.
http://internet.contenidos.inegi.org.mx/contenidos/productos/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/anuario_14/702825066192.pdf
- Kirmer A, Tischew S, Ozinga WA, Von-Lampe M, Baasch A, Van-Groenendael JM. 2008. Importance of regional species pools and functional traits in colonization processes: predicting re-colonization after large-scale destruction of ecosystems. *Journal of Applied Ecology* 45(5): 1523-1530.
- Koptsik S, Koptsik G, Livantsova S, Eruslankina L, Zhmelkova T, Vologdina Z. 2003. Heavy metals in soils near the nickel smelter: chemistry, spatial variation, and impacts on plant diversity. *Journal of Environmental Monitoring* 5(3): 441-450.
- Lamers LPM, Loeb R, Antheunisse AM, Miletto M, Lucassen E, Boxman AW, Smolders AJP, Roelofs JGM. 2006. Biogeochemical constraints on the ecological rehabilitation of wetland vegetation in river floodplains. *Hydrobiologia* 565: 165-186.
- Lindsay WL, Norvell WA. 1978. Development of a DTPA soil test for zinc, iron, manganese and copper. *Soil Sciences Society of America Journal* 42: 421-428.
- Lite SJ, Bagstad KJ, Stromberg JC. 2005. Riparian plant species richness along lateral and longitudinal gradients of water stress and flood disturbance, San Pedro River, Arizona, USA. *Journal of Arid Environments* 63(4): 785-813.

- Liu WX, Coveney RM, Chen JL. 2003. Environmental quality assessment on a river system polluted by mining activities. *Applied Geochemistry* 18(5): 749-764.
- Martínez-Ruiz C, Fernández-Santos, B. 2005. Natural revegetation on topsoiled mining-spoils according to the exposure. *Acta Oecologica* 28(3): 231-238
- Moreno-Tovar RL, Barbanson L, Coreño-Alonso O. 2009. Neoformación mineralógica en residuos de mina (jales) del distrito minero Zimapán, estado de Hidalgo, México. *Minería y Geología* 25(2): 31.
- Müeller-Dombois D, Ellenberg H. 1974. *Aims and methods of vegetation ecology*. John Wiley and Sons. New York, NY. 547 p.
- Ottenhof CJM, Cano AF, Arocena JM, Nierop KGJ, Verstraten JM, Van Mourik JM. 2007. Soil organic matter from pioneer species and its implications to phytostabilization of mined sites in the Sierra de Cartagena (Spain). *Chemosphere* 69(9): 1341-1350.
- Parraga-Aguado I, González-Alcaraz MN, Álvarez-Rogel J, Jiménez-Cárceles FJ, Conesa HM. 2013. The importance of edaphic niches and pioneer plant species succession for the phytomanagement of mine tailings. *Environmental Pollution* 176: 134-143.
- Real R, Vargas JM. 1996. The probabilistic basis of Jaccard's index of similarity. *Systematic Biology* 45(3): 380-385.
- Romero FM, Armienta MA, Villaseñor G, González JL. 2006. Mineralogical constraints on the mobility of arsenic in tailings from Zimapán, Hidalgo, Mexico. *International Journal of Environment and Pollution* 26(1-3): 23-40.
- Rowell DL. 1994. *Soil Science: Methods and applications*. Routledge. New York, NY. 345 pp.
- Rufo L, De la Fuente V. 2010. Successional dynamics of the climatophile vegetation of the mining territory of the Río Tinto Basin (Huelva, Spain): soil characteristics and implications for phytoremediation. *Arid Land Research and Management* 24(4): 301-327.
- Rzedowski GC, Rzedowski J. 2001. *Flora fanerogámica del Valle de México*. Instituto de Ecología A.C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro Michoacán, México. 678 p.
- Rzedowski GC, Rzedowski J. (Eds.) 2008. *Flora del bajío y de regiones adyacentes*. Instituto de Ecología-Centro Regional del Bajío. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán, México. Vol 38.
- Sánchez-Pinzón MS, Cogollo-Pacheco A, Arroyave-Quiceno C, Torrenegra-Guerrero RD, Giraldo Mejía AM, Barahona-Rosales R. 2010. Botanical diversity and heavy metal content in the residue matrix and plants at the Moravia Dump in Medellín, Colombia. *Revista de la Facultad Nacional de Agronomía, Medellín* 63(1): 5209-5224.

- Sculthorpe CD. 1985. The biology of aquatic vascular plants. Cambridge, UK: CUP.
- Simpson EH. 1949. Measurement of diversity. *Nature* 163: 688.
- Sörensen T. 1948. A method of establishing groups of equal amplitude in plant sociology based on similarity of species content. *Kongelige Danske videnskabernes selskab.; Biologiske skrifter. Biologiske. Skrifter* 5: 1-34.
- Spellerberg IF, Fedor PJ. 2003. A tribute to Claude Shannon (1916–2001) and a plea for more rigorous use of species richness, species diversity and the ‘Shannon–Wiener’ Index. *Global Ecology and Biogeography* 12(3): 177-179.
- Vibrans H. (Ed.) 2009. *Malezas de México*. <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico>. Consultado el 30 julio de 2014.
- Vidic T, Jogan N, Drobne D, Vilhar B. 2006. Natural revegetation in the vicinity of the former lead smelter in Zerjav, Slovenia *Environmental Science and Technology* 40(13): 4119-4125.
- Ward JV, Tockner K. 2001. Biodiversity: towards a unifying theme for river ecology. *Freshwater Biology* 46(6): 807-819.
- Wei SH, Zhou QX, Wang X, Cao W, Ren LP, Song YF. 2003. Potential of weed species applied to remediation of soils contaminated with heavy metals. *Journal of Environmental Sciences (China)* 16(5): 868-873.
- Zepeda-Gómez C, Lot-Helgueras A, Nemiga XA, Madrigal-Uribe D. 2012. Florística y diversidad de las ciénegas del río Lerma Estado de México, México. *Acta Botánica Mexicana* 98: 23-43.

CAPÍTULO III. ANTECEDENTES SOBRE *Bacopa monnieri* Y LA ABSORCIÓN DE EPT

Resumen

Bacopa monnieri (L.) Pennell es una macrofita emergente de la familia Scrophulariaceae originaria de América. Se distribuye en el norte y sur del continente y en la zona tropical del Viejo Mundo. En México se encuentra en casi todo el país. Esta especie ha sido estudiada por varios autores por su capacidad de bioacumulación de elementos potencialmente tóxicos (EPT) como Cd, Hg, Cr, Cu, Mn, Mg, Pb y Zn. Por esta razón es considerada por la Agencia de Protección Ambiental (EPA) como una de las macrofitas acuáticas con alto potencial en la fitorremediación de aguas y lodos residuales. No sólo es tolerante a altas concentraciones de varios EPT en los medios acuáticos, sino que también muestra una alta capacidad de bioacumulación simultánea de varios de ellos. Su tasa de absorción depende del metal, su concentración y de las interacciones entre contaminantes en el medio. Esta especie puede emplearse para la remediación de suelos con mezcla de varios EPT en muy altas concentraciones, por períodos cortos (16 semanas), ya que al término de este período las plantas presentan síntomas de toxicidad. La acumulación de EPT es considerablemente mayor en las raíces más finas en comparación a los tallos, ya que las raíces funcionan como una barrera para la translocación del EPT a tallos y hojas. Por ello, se ha sugerido su uso en la rizofiltración; para la estabilización de contaminantes. Uno de sus usos posibles es como mejoradoras de humedales contaminados con desechos industriales, que experimentan descargas regulares de aguas residuales.

Palabras clave: Macrofitas, rizofiltración, fitoestabilización, EPT.

Abstract

Bacopa monnieri is an emergent macrophyte of the Scrophulariaceae family, a native of America. It is distributed in the north and south of the continent and in Old World tropical regions. In Mexico it is distributed almost throughout the country. This species has been studied by several authors for its ability to bioaccumulate potential toxic elements (PTE) such as Cd, Hg, Cr, Cu, Mn, Mg, Pb and Zn. It is considered to be one of the aquatic macrophytes with a high potential in the phytoremediation of waste water and sludge by the Environmental Protection Agency (EPA). *B. monnieri* is not only tolerant to high concentrations of several PTEs in aquatic environments, but also shows a high capacity for simultaneous bioaccumulation of several elements. Its rate of absorption depends of PTE, its concentration and the interactions among the contaminants in its medium. This species can be used for the remediation of soils with a mixture of a very high concentration of several PTEs, for short periods (16 weeks), as the plants show symptoms of toxicity at the end of this period. PTE accumulation is considerably higher in the finer roots compared to the stems, as the roots act as a barrier to EPT translocation to stems and leaves. Therefore, it is recommended its use in phytoremediation is for rhizofiltration that is phytostabilization rather than phytoextraction. A possible use is for remediation of wetland polluted with industrial wastes receiving regular discharges of wastewater.

Key words: Macrophytes, rhizofiltration, phytostabilization, heavy metals.

Descripción Morfológica

Bacopa monnieri (L.) Pennell es una especie acuática anfibia enraizada emergente de la familia Scrophulariaceae originaria de América. Se distribuye en Norte y Sudamérica; desde el sureste de los Estados Unidos a América del Sur y en las Antillas (Mathur *et al.*, 2002). También se le encuentra en la zona tropical del Viejo Mundo (Australia, India, Nepal, Sri Lanka, China, Taiwán y Vietnam). En México se le ha registrado prácticamente en todo el país, desde Baja California Norte hasta Yucatán (Villaseñor y Espinosa, 1998); se le considera como especie nativa (Vibrans, 2009). En la cuenca de México se considera como escasa (Rzedowski y Rzedowski, 2001).

B. monnieri es una planta enraizada emergente, anfibia, de hábito rastrero o postrado, de 5 a 50 cm de largo, con hojas oblanceoladas, succulentas y opuestas. Las flores son pequeñas y blancas con 4-5 pétalos. Por su hábito, es una planta común en los acuarios. Se caracteriza por su alta resistencia a períodos de inundación y sequía, y de rápido crecimiento. Bajo las condiciones climáticas de la India, *B. monnieri* florece en febrero (Baruah y Saha, 1999). En México, la floración ocurre desde marzo hasta septiembre-octubre. Su propagación es muy fácil a través de esquejes (Mathur y Kumar, 2001). Es una especie de rápida proliferación en humedales, se caracteriza por formar grupos de finas raíces que surgen en cada nodo del tallo postrado; se adapta a vivir en la columna de agua y en cuerpos de agua someros. Su carácter anfibio, no obstante, le permite sobrevivir en suelos con períodos intermitentes de inundación o con niveles medios de humedad (Figura 3.1). Considerando este comportamiento anfibio, se eligió a esta planta como modelo para analizar la respuesta de un espécimen semi-acuático al estrés abiótico derivado de la contaminación por EPT.

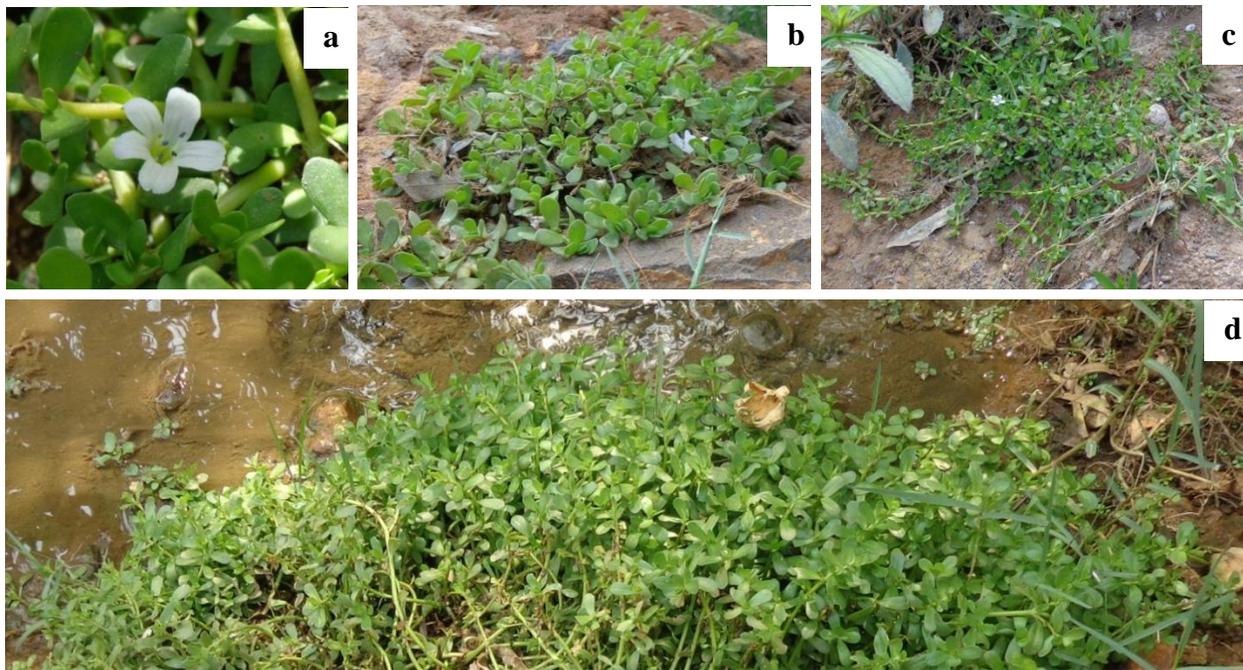


Figura 3.1. **a:** Morfología de *Bacopa monnieri*. **b, c y d:** Hábito de la planta.

Capacidad de Acumulación de EPT en *Bacopa monnieri*

B. monnieri ha sido estudiada por su capacidad de bioacumulación de EPT como Cd, Hg, Cr, Cu, Mn, Mg, Pb, Zn (Rai *et al.*, 1995; Vajpayee *et al.*, 1995; Sinha *et al.*, 1996; Chandra *et al.*, 1997; Sinha, 1999; Ali *et al.*, 1998; Ali *et al.*, 1999a y 1999b; Mishra *et al.*, 2006; Pande *et al.*, 2007; Hussain *et al.*, 2010). *B. monnieri* ha sido expuesta a una amplia variedad de condiciones de contaminación por EPT, la mayor parte de las veces en condiciones de laboratorio y en pocos casos *in situ*.

B. monnieri forma parte de la llamada Ayurveda o medicina tradicional India, dadas sus propiedades medicinales en el mejoramiento de la memoria por su alto contenido de antioxidantes, con la consecuente importancia económica (Singh y Dhawan, 1997). Por ello, la literatura disponible hasta el momento está enfocada principalmente a prevenir el riesgo que implica el aprovechamiento de la especie; ya sea a partir de plantaciones o bien por la

recolección de poblaciones en la India en lugares contaminados con EPT. No hay referencias sobre esto en otras regiones del mundo. En *B. monnieri* se han encontrado altas concentraciones de EPT (Cu, Cd, Cr, Mn, Hg, Pb y Zn) en experimentos de hasta 16 semanas de duración (Tabla 3.1). Sin embargo, no hay uniformidad en las condiciones a las que se ha sometido esta especie, por lo que los resultados no son comparables, tampoco se ha experimentado exponiéndola a suelos con contaminación real.

Los tratamientos probados incluyen variación en las concentraciones de un elemento (sales solubles) o mezcla de varios elementos en el medio de cultivo (Sinha y Chandra, 1990; Sinha *et al.*, 1990; Gupta *et al.*, 1994; Rai *et al.*, 1995., Vajpajee *et al.*, 1995; Sinha *et al.*, 1996; Sinha, 1999). Rai *et al.* (1995) en un estudio comparativo con otras especies, encontraron que *B. monnieri* acumuló alta concentración de Cd (29,000 mg kg⁻¹) después de 15 días de exposición, en comparación con otras macrófitas acuáticas.

Sinha y Chandra (1990) demostraron la capacidad de *B. monnieri* para acumular tanto Cd como Cu, en tratamientos simples (unielemento) o combinados. Los resultados mostraron que la acumulación de Cu fue estimulada por la presencia de Cd, mientras que la absorción de Cd fue inhibida por la absorción de Cu; es decir, al encontrarse estos dos elementos en el medio, *B. monnieri* mostró preferencia de bioacumulación de Cu, sobre Cd. También se ha estudiado la absorción y la toxicidad de Cu y Cr en la raíz y tallo de *B. monnieri*, tanto en tratamientos aislados como combinados. En ambos casos la bioacumulación es mayor en la raíz que en el tallo (de 3 a 4 veces mayor; Tabla 3.1). Aunque (Gupta *et al.*, 1994) observaron un efecto antagónico entre Cu y Cr: la bioacumulación de Cu se inhibe, pero aumenta la de Cr

Sinha (1999) demostró que *B. monnieri* acumula Cd tras exposiciones de 8, 12 y 16 semanas. Rai *et al.* (1995) reportaron acumulación de 0.25 mmol g⁻¹ de Cd después de 15 días de exposición a

una concentración de 0.150 mM. Mishra *et al.* (2006) reportaron acumulación máxima de 9,240 mg g⁻¹, referido a peso seco, ante una exposición de 100 mM de Cd en el medio durante siete días. Respecto a la respuesta a la exposición a Cr, se han reportado que *B. monnieri* acumula hasta 1600 mg g⁻¹ peso seco al ser expuesta a concentraciones de 96.1 mM de Cr con un período de 168 h en solución de Hoagland a 10% (Chandra y Kulshreshtha, 2004).

La Agencia de Protección Ambiental (EPA) considera a *B. monnieri* como una de las macrofitas acuáticas con alto potencial en la fitorremediación de aguas y lodos residuales, (especialmente de Cr) por los niveles de bioacumulación (340 mg kg⁻¹ de peso seco) después de ser expuesta a concentraciones de 214 mg kg⁻¹ de lodo residual durante dos semanas (Pivetz, 2001). Las plantas de *B. monnieri* expuestas a estas condiciones mostraron incremento en la biomasa (433%), sin que se detectarán síntomas visibles de toxicidad, excepto un ligero decremento en la cantidad de clorofila.

Este hecho la sitúa como una especie altamente tolerante a las concentraciones de Cr en el ambiente (Chandra *et al.*, 1997). Pande *et al.* (2007) estudiaron los efectos de altas concentraciones de Cr y vermicompost sobre el crecimiento y la bioacumulación en *B. monnieri*. Después de 118 días encontraron el mayor rendimiento en la producción de *B. monnieri* a concentraciones de 192 mM de Cr y 5 mg de vermicompost por kg de suelo. Este tratamiento representó la mayor cantidad de N disponible para la planta. No obstante al incrementar la concentración de Cr de 192 μM a 768 μM la concentración de N disminuyó notablemente. La aplicación de 768 μM de Cr redujo el rendimiento en campo en cerca de 12% de la biomasa en comparación a la concentración de 384 μM de Cr.

Tabla 3.1. Concentraciones máximas de EPT bioacumulados por *Bacopa monnieri* en diversos estudios.

	Concentración en el EPT medio(mgkg ⁻¹)	Tipo de exposición	Total bioacumulado (mg kg ⁻¹)	Bioacumulado (%)			Proporción de bioacumulación raiz:tallo	Período (semanas)
				Raiz	Tallo	Hoja		
Cd	0.001 ^a	Simple	11 456	81	12	7	7	7
Cd	3.372 ^b	Simple	450 000	57	40	3	1	7
Cd	21.581 ^h	Mezcla	17	71	29	-	2	16
Cd	53.952 ^h	Mezcla	17	73	27	-	3	12
Cr	11.127 ^e	<i>In situ</i>	405	77	23	-	3	12
Cr	36.657 ^f	<i>In situ</i>	241	-	-	-	-	2
Cr	0.250 ^g	<i>In situ</i>	13	-	-	-	-	2
Cr	9.983 ^h	Mezcla	19	82	17	-	5	16
Cr	24.958 ^h	Mezcla	25	80	20	-	4	12
Hg	2.006 ^c	Simple	157	32	44	24	1	7
Hg	0.005 ^d	Simple	322	85	15	-	6	2
Cu	12.200 ^h	Mezcla	17	81	19	-	4	16
Cu	30.499 ^h	Mezcla	17	75	25	-	3	12
Mn	10.548 ^h	Mezcla	44	78	22	-	3	16
Mn	26.370 ^h	Mezcla	56	80	20	-	4	12
Zn	58.833 ^c	Simple	26		Brotos	Brotos	-	4
Pb	39.780 ^h	Mezcla	7	81	19	-	4	16
Pb	99.451 ^h	Mezcla	8	79	21	-	4	12

Concentraciones expresadas en mg kg⁻¹ a partir de: ^aMishra *et al.*(2006); ^bHussain *et al.*(2011b); ^cSinha.(1999); ^dSinha *et al.* (1996); ^eChandra *et al.*(1997); ^fVajpayee (1995); ^gRai *et al.*(1995).
^hCultivo en mezcla. - = no determinado.

Por otra parte, en este mismo experimento, el comportamiento del P fue contrario al de N: Se incrementó significativamente el contenido de P con el incremento del Cr de 192 μM a 768 μM , lo que sugiere un efecto sinérgico de la vermicompost sobre la concentración de Cr en el medio y su bioacumulación por las plantas. Sin embargo, el trabajo no describe el mecanismo de respuesta. La acumulación de Cr en *B. monnieri* fue máxima a concentraciones de 768 μM de Cr y 5 mg de vermicompost por kg de suelo, en cuyas condiciones las plantas fueron capaces de extraer la mayor cantidad de Cr del medio y translocarlo a la parte de los tallos. Este efecto fue similar al de la absorción de nutrimentos.

Se ha observado que el Mn se disuelve más rápido que otros EPT como Cd, Pb, Zn, Cr y Hg, a partir del sedimento y migra en el agua adsorbida en los poros. Al someter a *B. monnieri* a concentraciones crecientes de Mn (6, 16, 32, 64 y 160 μM) en una solución mixta con Cu, Cd, Cr y Pb, se observó que la acumulación de Mn en raíz y tallo fue significativa (34.55 y 9.61 μM o $\mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco respectivamente) cuando se expuso a 64 μM . La adición de 160 μM de Mn en el medio indujo la acumulación de 44.80 y 11.14 $\mu\text{M g}^{-1}$ de peso seco en raíz y tallo, respectivamente, a las 12 semanas de exposición. Pero la acumulación fue letal para la planta a las 16 semanas (Sinha, 1999).

Al someter a *B. monnieri* a concentraciones de 0.49 a 24.92 μM de Hg se encontró que la acumulación de Hg en las raíces (273 $\mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco) fue cinco veces mayor que en el tallo (48.7 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de peso seco; Sinha *et al.*, 1996). En otro estudio (Hussain *et al.*, 2011b) investigaron la bioacumulación de Hg y Cd en *B. monnieri*, contaminando artificialmente la solución nutritiva Hoagland con HgCl_2 (2,5 y 10 μM) y cloruro de CdCl_2 (10, 20 y 30 μM) por períodos de 20, 30, 40 y 50 días. Se encontró mayor acumulación de Cd que de Hg. Los autores

observaron que la translocación de Hg y Cd fue proporcional a la disponibilidad del EPT en los medios de cultivo y al período de crecimiento. La bioacumulación fue mayor en medios ácidos que en medios alcalinos.

Al parecer las macrofitas acuáticas acumulan Pb después de que éste es liberado de los sedimentos al agua, ya que este elemento es insoluble en condiciones naturales y la concentración de las formas fijadas a los sedimentos es generalmente alta. Por tanto, las raíces no absorben Pb directamente del sedimento (Knowlton *et al.*, 1983). La capacidad de bioacumulación de Pb en *B. monnieri* es menor con respecto a la que presenta para acumular otros EPT (Cuadro 3.1). Al respecto, Sinha (1999) encontró acumulación significativa de Pb en los mechones de las raíces durante la exposición inicial de ocho semanas.

La cantidad absorbida de Pb fue directamente proporcional a la concentración en el medio, pero disminuyó para períodos prolongados de exposición (12 y 16 semanas), llegando a ser letal para la planta (Sinha, 1999). Esto sugiere que, si bien no es recomendable el uso de esta especie para la fitoextracción de Pb en suelos específicamente contaminados con este elemento (Sinha, 1999), es necesario confirmar si es útil para la remediación de suelos con mezcla de varios EPT, por períodos cortos.

B. monnieri es capaz de soportar altas concentraciones de Zn en el sustrato, aunque en cierto intervalo se inhibe el crecimiento de brotes regenerativos. La incorporación de ZnSO₂ en concentraciones de 100-600 µM en un medio de mantenimiento de sacarosa a 2%, suplementado con ácido naftalenacético (0.2 mg L⁻¹) y benzilaminopurina (0.5 mg L⁻¹) promovió el crecimiento de brotes regenerativos en *B. monnieri*. Pero, altas concentraciones (800-1000 µM) inhibieron el

crecimiento de tallos y raíz por 16 semanas. Después de este tiempo, la regeneración fue normal aun a altas concentraciones.

La prolina y las proteínas acumuladas mostraron ser una secuela del estrés por Zn. La cantidad de ZnSO₄ acumulado en la pared celular fue considerablemente mayor que en el citoplasma, lo que sugiere una estrategia de sobrevivencia de la planta.

Los cultivos en un medio suplementado con ZnSO₄ por más de tres años no sobrevivieron cuando se transfirieron en un medio libre de Zn₂SO₄, lo que indica su adaptación a las condiciones de estrés por Zn (Ali *et al.*, 1999a). Al someter a *B. monnieri* a una combinación de Cr y Zn, uno de los efectos colaterales fue un decremento significativo en la concentración de Zn en el tejido, conforme aumentó la concentración de Cr en el medio de enraizamiento. El incremento de Cr en el tejido fue proporcional a la concentración del medio (Gupta *et al.*, 1994).

Órganos de Bioacumulación en *Bacopa monnieri*

La mayoría de las plantas acuáticas que presentan bioacumulación de EPT tienen un sistema vascular bien desarrollado. Se han descrito dos tipos de transporte de iones en este sistema: el acropétalo, que facilita el transporte hacia la parte aérea de la planta y el basipétalo, el transporte hacia la raíz. Probablemente, el transporte basipétalo es el más frecuente (Guillizoni, 1991). *Eloдея*, por ejemplo, una macrofita flotadora, absorbe Hg del agua y lo retiene en la raíz, mientras que *Vallisneria spirallis* transloca Fe en ambas direcciones.

También existen diferencias claras en cuanto a la acumulación de EPT entre varios órganos de las plantas. Esto depende de la demanda que la planta tenga de EPT esenciales para el crecimiento de la planta, dependiendo de su edad y estado de desarrollo (generalmente hay

acumulación mayor en la zona apical si se trata de una planta joven, o en el rizoma o tubérculo si se trata de una planta senescente). Las inflorescencias acumulan más Cu, mientras que el Pb se acumula en los espacios libres de las paredes celulares. Con frecuencia los tallos no almacenan EPT (Guillizoni, 1991).

En *B. monnieri* la absorción de EPT ocurre por la raíz y su acumulación es considerablemente mayor en las raíces más finas en comparación a los tallos (Sinha, 1999). Este autor observó que la concentración de EPT en el tallo representa alrededor de la cuarta parte con respecto a la que presenta la raíz dependiendo del elemento y la concentración de que se trate (Cuadro 1). Esta puede ser una estrategia de la planta para inactivar el exceso de EPT en las paredes celulares del sistema radical (Sinicrope *et al.*, 1992; Sinha, 1999). Mishra *et al.* (2006) encontraron que al someter a *B. monnieri* a concentraciones de 50 y 100 μM de Cd durante 7 días, 81% del Cd se acumuló en raíces y 12% se acumuló en el tallo y sólo 7% fue translocado a las hojas.

El Cr se acumula en mayor cantidad en la raíz (Gupta *et al.*, 1994; Zurayk *et al.*, 2001; Sinha *et al.*, 2002). No obstante, la información acerca de las concentraciones acumuladas de EPT en esta especie es escasa. Esto impide correlacionar el tipo de EPT, el mecanismo de translocación y órgano de acumulación y factores biológicos como edad de la planta, etapa de desarrollo, estacionalidad, entre otros factores.

Estudios de bioacumulación con mezcla de EPT

Se ha estudiado también el potencial de acumulación de EPT en *B. monnieri* bajo condiciones de laboratorio empleando una mezcla de EPT: Cu, Cd, Pb, Cr y Mn en exposiciones repetidas en suelo artificialmente contaminado (Sinha, 1999; Cuadro 3.1). Después de 8 semanas, las plantas

fueron expuestas a las concentraciones de cada EPT tres veces mayor que la exposición inicial (Cuadro 3.1), con el objetivo de determinar el máximo potencial de acumulación de cada EPT.

La acumulación de los EPT en las raíces y en los tallos dependió, tanto de la concentración como del tiempo de exposición y mostró el siguiente orden: Mn>Cr>Cu>Cd>Pb. Las plantas de *B. monnieri* no mostraron ningún síntoma de toxicidad visible después de las ocho semanas. No obstante, como resultado de la toxicidad de EPT combinados, el contenido de clorofila se redujo 62% después de 12 semanas. La concentración más alta de EPT fue letal para la planta a las 16 semanas (Sinha, 1999).

Por los hallazgos en diversos estudios, *B. monnieri* se puede considerar como una especie no específica en la acumulación de EPT (Rai *et. al.*, 1995). No obstante, los resultados obtenidos bajo condiciones de laboratorio o con medios artificialmente contaminados no pueden extrapolarse a las condiciones existentes en campo. La acumulación y efecto de contaminantes en los ecosistemas naturales permanecen a través de largo tiempo, y dependen a la interacción de múltiples factores siendo de mayor importancia la especiación de los elementos, el contenido de materia orgánica y el pH.

En condiciones naturales las plantas están expuestas al efecto combinado de varios EPT, causando condiciones de estrés por contaminación en el ecosistema, en el cual pueden ocurrir interacciones sinérgicas o antagónicas entre EPT (Sinha, 1999). Por otra parte se ha encontrado que la existencia de niveles óptimos de nutrientes en el medio de crecimiento, incrementa la eficiencia en la absorción y acumulación de EPT (Zurayk *et al.*, 2001), por lo que la disponibilidad de nutrientes debe tomarse en cuenta al efectuar un tratamiento de fitorremediación.

Cambios Estructurales por Efecto de la Bioacumulación de EPT en *B. monnieri*

Al parecer, en *B. monnieri* las raíces funcionan como una barrera para la translocación del EPT a la parte emergente de la planta (tallos y hojas). Esto puede deberse a la cantidad de sustancias como el glutatión y el ascorbato, los cuales se encuentran más en las raíces que en los tallos de la planta (Sinha *et al.*, 1996). Se ha sugerido que el glutatión y ascorbato parecen enlazar a los EPT y reducen su toxicidad en alguna medida, ya que los EPT son tóxicos para la planta si las concentraciones acumuladas exceden su capacidad de desintoxicación (Sinha, 1999).

En un estudio *in vitro* se probó que el Cd, en concentraciones de 25 y 50 μM como CdCl_2 , inhibió el crecimiento de *B. monnieri* y la adición de 50 a 100 μM de CuSO_4 mitigó parcialmente este efecto negativo (Ali *et al.*, 1998). Estos resultados coinciden con los encontrados por Ali *et al.* (2000), quienes expusieron esquejes de *B. monnieri* a Cd y Zn (25 + 25; 25 + 50; 50 + 25 y 50 + 50 μM , respectivamente), bajo cultivo *in vitro*. Los autores encontraron que la producción de raíz cesó por completo en los tratamientos con 50 μM de Cd expuestos por más de 16 semanas, este período de exposición es reportado como letal a altas concentraciones de Cd por Sinha (1999). Se observó que conforme incrementa la concentración de Cd, se inhibe el desarrollo y crecimiento de raíces y tallos. Adicionalmente, se observó que con concentraciones de Cd de 50 μM , los tallos se necrosan y se reduce la longitud de los entrenudos.

También se han evaluado los efectos genotóxicos del Cd sobre *B. monnieri* (Vajpayee *et al.*, 2006). Estos autores evaluaron el daño al ADN de *B. monnieri* expuesta a dos mutágenos modelo: etil-metanosulfonato y metil-metanosulfonato. Después de someter tanto a plantas completas como a núcleos extracelulares de esta especie, a concentraciones de 0.01-5 μM de etil-metasulfonato y de 0.05 a 100 μM de metil-metasulfonato por dos horas, se evaluó el valor

genotóxico del Cd en una concentración de 0.001 a 200 μM . En estas concentraciones el Cd provocó daños al ADN, siendo mayor en las raíces que en las hojas. Este daño dependió de la dosis y el tiempo de exposición (Vajpayee *et al.*, 2006).

Puede deducirse que la respuesta de esta especie ante altas concentraciones de diferentes EPT depende del elemento específico, su concentración en suelo, la combinación con otros EPT y el tiempo de exposición. Dependiendo de estos y otros factores, *B. monnieri* adopta diferentes estrategias de sobrevivencia.

Estudios de *B. monnieri* Asociada a Otras Especies Vegetales y su Importancia en la Fitorremediación

Los pocos estudios que comprueban la capacidad de bioacumulación de EPT de *B. monnieri in situ* en poblaciones naturales incluyen los de Hussain *et al.* (2010); Sinha y Chandra (1990) y Sinha *et al.* (2002). También se han llevado a cabo estudios controlados *in situ* en combinación con otras especies vegetales acuáticas (Vajpayee *et al.* 1995), como *Spirodela polyrhiza*, *Hydrilla verticillata* y *Nymphaea alba*. Estas especies se emplearon para reducir la contaminación por Cr en efluentes provenientes de la industria de curtido.

El monocultivo de las plantas redujo la concentración de Cr hasta 50% excepto en el caso de *S. polyrhiza*. Se obtuvieron resultados óptimos al emplear estas especies en un tratamiento secuenciado: *N. alba*, *B. monnieri*, *H. verticillata* y *S. polyrhiza*. Se obtuvo el máximo grado de remoción de Cr al diluir el efluente en 25%. En los cultivos mezclados la remoción óptima de Cr (36%) se obtuvo empleando tanto especies flotadoras como sumergidas. Se observó que la remoción de EPT tuvo una relación estrecha con la densidad de las raíces finas y que, a pH de 8 en el efluente, se redujeron las cantidades absorbidas de Cr por *S. polyrhiza*.

Interacción de los Factores del Medio con las Concentraciones Acumuladas

Varios autores coinciden en que la acumulación de EPT en las plantas depende de su concentración en el suelo y la duración del período de exposición (Mishra *et al.* 2006; Singh *et al.* 2006; Sinha, 1999), pero no se han incluido en la discusión los factores que controlan la biodisponibilidad. Hussain *et al.* (2011b) observaron fuerte correlación entre el pH y la acumulación de Cd y Hg. En medios ácidos se incrementa la acumulación; mientras que en los medios básicos la acumulación de estos EPT se reduce significativamente (Crowder, 1991), sobre todo de Hg. Como resultado de un tratamiento combinado de HgCl₂ y CdCl₂, la acumulación fue muy baja tanto en medios ácidos como en medios básicos. Adicionalmente al pH, el efecto antagónico del Ca presente en el agua de cal (adicionada para alcanzar el pH del medio de crecimiento), también controla la acumulación y absorción de iones de Hg y Cd.

Clasificación de la Especie por sus Niveles de Bioacumulación

B. monnieri también ha demostrado su capacidad de bioacumulación de EPT aún en cantidades traza, al someterla a diferentes concentraciones de agua mineral comercial, esta es la razón por lo que Hussain *et al.* (2011a) le han propuesto como bioindicador en el monitoreo de la presencia de EPT en bebidas suaves y agua mineral. Por otra parte, los resultados de los estudios sobre la capacidad de bioacumulación de *B. monnieri* demuestran que esta especie es no sólo tolerante a altas concentraciones de varios EPT en los medios acuáticos. Su calificación como hiperacumuladora es restringida a que, a muy altas concentraciones de EPT (Sinha, 1999), la planta presenta síntomas de toxicidad e incluso son letales, en un período corto de exposición (16 semanas máximo). Tiene una capacidad limitada para translocar los EPT a la parte aérea de la planta, condición indispensable para clasificarla dentro de esta categoría.

Para poder ubicarla dentro de una u otra categoría, habría que hacer estudios comparativos de la producción de peso seco en ambas partes de la planta en varias condiciones de campo, ya que el crecimiento de las raíces es considerable. En general se sabe que la concentración de EPT en las plantas sufre de cambios sustantivos de acuerdo a la estación: como regla general la concentración de EPT en las poblaciones naturales de plantas es mayor durante la estación fría y decrece rápidamente durante el período de máximo crecimiento de las plantas (Gommes y Muntau, 1981 en Guillizoni, 1991), y varía con el período de muestreo, el estado fisiológico de la planta y la edad del tejido. Tampoco se ha investigado cuáles son los niveles de acumulación en órganos en particular, por ejemplo, en las flores, ápices de tallos, que en otras especies muestran tener concentraciones altas de EPT.

Con base en la revisión bibliográfica, puede concluirse que muchas de las observaciones realizadas por Guillizoni (1991) son vigentes para el caso del conocimiento generado hasta ahora para *B. monnieri*. Entre ellas se mencionan los siguientes:

- La información disponible hasta el momento en su mayoría es descriptiva. Los datos sobre la acumulación de elementos no siempre es comparable dado que se trata de situaciones distintas.
- Muchas de las investigaciones toman como base la concentración total presente en el medio, sin considerar las especies químicas de EPT y su disponibilidad en particular.
- Debido a la complejidad que representa el estudio de todos los factores ambientales que afectan la disponibilidad de los EPT, se carece de información sobre las formas de obtención y acumulación por la planta y finalmente sobre su actividad metabólica.

Por otra parte, sólo hay un estudio que considera la competencia entre los EPT para observar los efectos sinérgicos o antagónicos en el proceso de absorción, cuando están presentes en una mezcla. Se requieren estudios ecotoxicológicos y de campo que consideren estos aspectos en condiciones reales que permitan evaluar los efectos de la calidad del agua y comparar datos de diferentes ambientes, correlacionando estos resultados con la respuesta fotosintética y la respiración. También se requiere definir la función de los agentes que facilitan la rápida obtención de elementos traza (Guillizoni, 1991).

Se desconocen las formas químicas de la mayoría de los EPT presentes en el medio, dado que la mayor parte de los estudios se han hecho bajo condiciones de laboratorio y son escasos los estudios de especiación. Por otra parte, los mecanismos de absorción de los EPT a través de la raíz no son completamente conocidos y están planteadas sólo a nivel de hipótesis.

No se ha documentado si la abundancia de las poblaciones de *B. monnieri* es favorecida por las altas concentraciones de EPT en el medio, tampoco si la especie es capaz de concentrar grandes cantidades de EPT en sus tejidos, a partir de las bajas concentraciones que existen en los ambientes naturales. Hasta ahora no existen estudios de campo que correlacionen las variaciones en las comunidades o poblaciones de plantas como resultado de la presencia y concentración de contaminantes.

Conclusiones

Los experimentos de laboratorio son de gran utilidad práctica en el entendimiento de las respuestas de *B. monnieri* a los EPT presentes en el sustrato. Sin embargo, el efecto de un solo contaminante en particular es de relevancia limitada para la estimación de su función en el ecosistema. Los antecedentes indican que *B. monnieri* es una planta útil en la fitoestabilización y

rizofiltración de EPT, dado que acumula mayor proporción de EPT en la raíz que en la parte aérea. El conocimiento de la tolerancia y capacidad de concentración de EPT de esta especie en condiciones de campo es indispensable para confirmar su posible uso en fitorremediación.

Definir la eficiencia de esta especie, tanto en la acumulación como la estabilización de varios EPT con respecto al tiempo de exposición, es un factor que debe definirse en condiciones de campo. Debe confirmarse la hipótesis de Sinha (1999) de que, en vista de su alta tolerancia, las plantas de *B. monnieri* pueden considerarse como mejoradoras de humedales contaminados con desechos industriales que experimentan descargas regulares de aguas residuales. Atendiendo esta necesidad, en el siguiente capítulo se plantea una investigación en condiciones reales de contaminación con residuos de mina para evaluar la factibilidad que tiene *B. monnieri* de ser empleada en el tratamiento pasivo de residuos de mina a través de humedales.

Literatura citada

- Ali G, Shrivastava PS, Iqbal M. 1998. Effect of cadmium and copper on growth of *Bacopa monniera* regenerants. *Biologia Plantarum* 41(4): 635-639.
- Ali G, Shrivastava, PS, Iqbal M. 1999a. Morphogenic and biochemical responses of *Bacopa monniera* cultures to Zinc toxicity. *Plant Science (Limerick)* 143(2): 187-193.
- Ali G, Shrivstava PS, Iqbal M. 1999b. Proline accumulation, protein pattern and photosynthesis in *Bacopa monniera* regenerants grown under NaCl stress. *Biologia Plantarum* 42(1): 89-95.
- Ali G, Shrivastava, PS, Iqbal M. 2000. Influence of Cadmium and Zinc on growth and photosynthesis of *Bacopa monniera* cultivated in vitro. *Biologia Plantarum* 43(4): 599-601.
- Baruah BC, Saha BN. 1999. Study of floral biology of *Bacopa monnieri* (L.) Pennell. *Journal of Economic and Taxonomic Botany* 23(3): 705-708.
- Chandra P, Kulshreshtha K. 2004. Chromium accumulation and toxicity in aquatic vascular plants. *Botanical Review* 70(3): 313-327.

- Chandra P, Sinha S, Rai UN, Kruger EL, Anderson TA, Coats, JR. 1997. Bioremediation of chromium from water and soil by vascular aquatic plants. En: Phytoremediation of Soil and Water Contaminants. American Chemical Society. Washington USA pp. 274-282.
- Crowder A. 1991. Acidification, metals and macrophytes. *Environmental Pollution* 71: 171-203.
- González-Chávez MC, Pérez-Moreno J, Carrillo-González R. 2005. Introducción y aspectos generales de los suelos contaminados con residuos de minas y su recuperación. En: González-Chávez MC, Pérez-Moreno J, Carrillo-González R. (eds.). 2005. El sistema planta microorganismo-suelo en áreas contaminadas con residuos de minas. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México pp. 1-8.
- Guillizoni P. 1991. The role of heavy metals and toxic materials in the physiological ecology of submersed macrophytes. *Aquatic Botany* 41: 87-109.
- Gupta M, Sinha S, Chandra P. 1994. Uptake and toxicity of metals in *Scirpus lacustris* L. and *Bacopa monnieri* L. *Journal of Environmental Science and Health. Part A. Environmental Science and Engineering* 29(10): 2185-2202.
- Hussain K, Abdussalam AK, Ratheesh-Chandra P. Nabeesa, S. 2010. Bio-accumulation of heavy metals in *Bacopa monnieri* (L.) Pennell growing under different habitat. *International Journal of Ecology and Development* 15(W10): 66-73.
- Hussain K, Abdussalam AK, Szalim N. 2011a. *Bacopa monnieri*. A pollutant detector of mineral water and soft drinks. *International Journal of Ecology and Development* 19(11): 86-94.
- Hussain K, Abdussalam AK, Ratheesh-Chandra P y Nabeesa S. 2011b. Heavy metal accumulation potential and medicinal property of *Bacopa monnieri* – a paradox. *Journal of Stress Physiology and Biochemistry* 7(4): 39-50.
- Knowlton MF, Boyle TP, Jones JR. 1983. Uptake of lead from aquatic sediments by submerged macrophytes and crayfish. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 12: 195-202.
- Larcher F, Vigetti A, Merlo F, Ajmone-Marsan F, Devecchi M. 2010. New methods for the recovery of postindustrial areas: choosing plants for phytoremediation. *Acta Horticulturae* 881: 339-342.
- Mathur S. Kumar S. 2001. Reproductive biology of *Bacopa monnieri*. *Journal of Genetics and Breeding* 55(2): 101-109.
- Mathur S, Gupta MM, Ram M, Sharma S, Kumar S. 2002. Herb yield and Bacoside-A content of field grown *Bacopa monnieri* accessions. *Journal of Herbs, Species and Medicinal Plants* 9(1): 11-18.
- Mishra S, Srivastava S, Tripathi RD, Govindarajan R, Kuriakose SV, Prasad MNV. 2006. Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri*. *Plant Physiology and Biochemistry* 44(1): 25-37.

- Pande P, Chand S, Yadav VK, Anwar M, Patra DD. 2007. Influence of chromium with vermicompost on growth and accumulation by Brahmi. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 38(19-20): 2815-2829.
- Pivetz EB. 2001. Phytoremediation of Contaminated Soil and Ground Water of Hazardous Wastes Sites. EPA. Ground Water Issue. Office of Research and Development. Office of Solid Waste and Emergency Response. EPA/540/S-01/500. Washington D. C. February 2001. 36 p.
- Rai UN, Sinha S, Tripathi RD, Chandra P. 1995. Wastewater treatability potential of some aquatic macrophytes. Removal of heavy metals. *Ecological Engineering* 5(1): 5-12.
- Rzedowski GC, Rzedowski J. 2001. Flora fanerogámica del Valle de México. Instituto de Ecología A.C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro Michoacán, México. p. 678.
- Sinha S. 1999. Accumulation of Cu, Cd, Cr, Mn and Pb from artificially contaminated soil by *Bacopa monnieri*. *Environmental Monitoring and Assessment* 57: 253-264.
- Sinha S, Gupta M, Chandra P. 1996. Bioaccumulation and biochemical effect of mercury in the plant *Bacopa monnieri* (L). *Environmental Toxicology and Water Quality* 11(2): 105-112.
- Sinha S, Chandra P. 1990. Removal of Cu and Cd from water by *Bacopa monnieri* L. *Water, Air and Soil Pollution* 51(3-4): 271-276.
- Sinha S, Saxena R, Singh S. 2002. Comparative studies on accumulation of Cr from metal solution and tannery effluent under repeated metal exposure by aquatic plants: Its toxic effects. *Environmental Monitoring and Assessment* 80(1): 17-31.
- Singh HK, Dhawan, BN. 1997. Neuropsychopharmacological effects of the Ayurvedic nootropic *Bacopa monniera* Linn.(Brahmi). *Indian Journal of Pharmacology* 29(5), 359.
- Singh S, Eapen S, D'Souza SF. 2006. Cadmium accumulation and its influence on lipid peroxidation and antioxidative system in an aquatic plant, *Bacopa monnieri* L. *Chemosphere* 62(2): 233-246.
- Sinicrope T, Langis R, Gergberg RM, Busnardo MJ, Zedler JB. 1992. Removal of metals by wetlands mesocosms subjected to different hydroperiods. *Ecological Engineering* 1: 309-322.
- Vajpayee P, Dhawan A, Shanker R. 2006. Evaluation of the alkaline Comet assay conducted with the wetlands plant *Bacopa monnieri* L. as a model for ecogenotoxicity assessment. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 47(7): 483-489.
- Vajpayee P, [Sinha S](#), [Chandra P](#). 1995. [Bioremediation of tannery effluent by aquatic macrophytes. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology](#) 55(4): 546-553.

- Vibrans H. 2009. En: Heike Vibrans (ed.), Malezas de México. Fecha de acceso: 16 de Julio de 2010. <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/scrophulariaceae/bacopa-monnierifichas/ficha.htm>.
- Villaseñor-Ríos JL, Espinosa-García FJ. 1998. Catálogo de malezas de México. Universidad Nacional Autónoma de México, Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario y Fondo de Cultura Económica. México, D.F.
- Zurayk R, Sukkariyahh B, Baalbaki R, Ghanem DA. 2001. Chromium phytoaccumulation from solution by selected hydrophytes. *International Journal of Phytoremediation* 3(3): 335-350.

CAPÍTULO IV. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y ANTIOXIDANTE DE *Bacopa monnieri* A LA EXPOSICIÓN A RESIDUOS DE MINA

Resumen

Las plantas que crecen en lugares contaminados con residuos de mina están expuestas a los efectos tóxicos combinados de varios elementos potencialmente tóxicos (EPT), lo cual se traduce en condiciones de estrés. Existen evidencias de que *Bacopa monnieri* (L.) Pennell podría ser empleada en los trabajos de fitorremediación de sitios contaminados por EPT. Sin embargo, no se tiene la certeza de que esta especie se establezca directamente en los residuos. En un experimento en invernadero se simuló el establecimiento de *B. monnieri* en dos residuos de mina (Pal y Santa María) (oxidado y no oxidado respectivamente) con altas concentraciones de EPT. Las plantas de *B. monnieri* crecieron en suelos con residuos de mina no oxidados por un período de nueve semanas. En los residuos oxidados, el alto grado de acidez ($\text{pH} < 2$) y la concentración de EPT destruyeron el sistema radical a las tres semanas. Aunque la planta no sobrevivió más allá de ese período, acumuló Pb en la raíz dentro de los límites fitotóxicos desde el primer día de exposición. Se relacionó la absorción de Mn, Cu, Cd y Pb con la actividad enzimática de la catalasa (CAT) y glutatión reductasa (GR). Esta especie es acumuladora de varios EPT; por sus niveles de tolerancia puede ser empleada en la estabilización o revegetación en humedales. Además *B. monnieri* tiene la capacidad de desintoxicación de Pb de la raíz y translocarlo y acumularlo en el follaje sin presentar síntomas de toxicidad.

Palabras clave: Fitorremediación, humedales, CAT, GR, actividad enzimática.

Abstract

Plants growing on sites contaminated with mine tailings are exposed to the combined toxic effects of several potentially toxic elements (PTE), which contributes to the appearance of stress conditions. Several authors agree that *Bacopa monnieri* (L.) Pennell could be used in phytoremediation of PTE polluted sites. However, until now there is no information about the development of *B. monnieri* directly on tailing heaps. The establishment of *B. monnieri* on tailings (oxidized and non-oxidized) with high PTE concentrations was simulated in a greenhouse experiment. *B. monnieri* plants grew on non-oxidized mining residues for the whole nine weeks period. Soil acidity (pH <2) and the concentration of EPT in the oxidized residues destroyed the root system within three weeks. However, the plant accumulated Pb at the root within the phytotoxic limits. Mn, Cu, Cd and Pb concentrations were correlated with the catalase (CAT) and glutathione reductase (GR) activity. This species accumulated several PTEs, so it can be used for stabilization or revegetation of contaminated wetlands. In addition, *B. monnieri* has the ability to detoxify Pb from the root and is able to translocate it to the foliage within phytotoxic levels without presenting symptoms of toxicity.

Key words: Phytoremediation, wetlands, CAT, GR, enzyme activity.

Introducción

Las plantas que crecen en lugares contaminados con residuos de mina están expuestas a los efectos tóxicos combinados de varios elementos potencialmente tóxicos (EPT), y a baja disponibilidad de nutrimentos, lo que contribuye a la aparición de estrés para las plantas (Yadav, 2010; Manara, 2012). Dependiendo de su concentración en el suelo, los EPT pueden tener efectos aditivos, sinérgicos o antagónicos entre sí. Estos efectos pueden influir en la disponibilidad de EPT para las plantas (Sinha, 1999; Kabata-Pendias 2011) y en las estrategias de tolerancia de las mismas.

A diferencia del suelo donde generalmente predomina un ambiente oxidante, en los ecosistemas acuáticos, los cambios en las condiciones de óxido-reducción (Feng *et al.*, 2007) determinan de manera importante la disponibilidad de EPT en función de esas variaciones. Hasta el momento son pocos los estudios de las poblaciones vegetales naturales acuáticas que crecen en lugares contaminados con EPT (Fellet *et al.*, 2007, Farrag *et al.*, 2012). La mayoría de ellos se enfocan al registro de especies y sus estrategias de tolerancia ante altas concentraciones de EPT.

Varios autores han sugerido que las especies que han mostrado tales adaptaciones pueden ser empleadas en la fitorremediación (Conesa *et al.*, 2006; Franco-Hernández *et al.*, 2010; Barbaferi *et al.*, 2011) de suelos contaminados con EPT. Por otra parte, muchos estudios han tratado de determinar las concentraciones tóxicas, de acumulación y de tolerancia para cada especie y elemento en particular; sin embargo, los estudios aún son insuficientes y la información para una especie no es extrapolable a otras. No obstante, estos estudios se han hecho en laboratorio, con corta duración (horas o días), en condiciones no reales o lejanas a lo que realmente ocurre en el ambiente (Guala *et al.*, 2010).

En los ecosistemas naturales, la acumulación y efecto de contaminantes permanecen a través de largo tiempo, y dependen a la interacción de múltiples factores, que pueden incrementar o mitigar los efectos tóxicos. Es deseable que una planta considerada como útil en la fitorremediación pueda sobrevivir en esas condiciones por períodos de meses o aún años. Ernst *et al.* (2008) consideraron que para elucidar de manera más certera la tolerancia a los diversos EPT y el uso de estas plantas en la fitorremediación, los estudios de laboratorio deben comparar ecotipos o genotipos de una misma especie en condiciones reales de crecimiento, complementado con un perfil metabólico enzimático (Yadav, 2010).

Varios autores (Sinha y Chandra, 1990; Sinha *et al.*, 1993; Gupta *et al.*, 1994; Rai *et al.*, 1995, Vajpayee *et al.*, 1995; Sinha, *et al.*, 1996; Sinha, 1999) coinciden en que *Bacopa monnieri* podría ser empleada en los trabajos de fitorremediación de sitios contaminados por EPT. No obstante, los estudios en los cuales sustentan sus conclusiones, no son comparables entre sí, y hasta ahora es probable que la respuesta de la planta no sea extrapolable a EPT distintos a los estudiados. Entre los pocos trabajos llevados a cabo *in situ* con esta especie están los de Sinha y Chandra (1990), Vajpayee *et al.* (1995), Chandra *et al.* (1997), Rai *et al.* (1995) y Sinha *et al.* (2002).

Éstos últimos, están enfocados en la bioacumulación de Cr, es decir no se ha explorado la respuesta a otros elementos. En el estudio realizado por Carmona-Chit *et al.* (2016) en una zona de ribera contaminada con residuos mineros, *B. monnieri* presentó factores de translocación Ni, Cd y Pb mayores a 1 y se encontró que es capaz de acumular en el follaje entre 2 y 50 veces más de Ni, Cd y Pb que la concentración extractable de estos EPT en suelo. Estos valores son sobresalientes y confirman que esta especie puede ser considerada como útil en la fitorremediación por acumular varios EPT a la vez.

No obstante, es necesario hacer un seguimiento del comportamiento de esta especie ante los EPT desde su establecimiento, con el fin de identificar indicadores del estrés abiótico altamente sensibles (como estrés oxidativo) vinculado con el efecto tóxico de los elementos. Por los resultados mostrados en diversos estudios hasta el momento, se ha sugerido a *B. monnieri* como una especie que acumula no únicamente un EPT en particular (Rai *et. al.*, 1995) sino que podría servir para la remediación de suelos o efluentes con altas concentraciones de varios EPT. Puede deducirse que la respuesta de esta especie depende del elemento específico, su concentración en el suelo, la combinación con otros EPT y el tiempo de exposición. El tiempo máximo de exposición que se ha logrado en mezcla de EPT en altas concentraciones es de 16 semanas, antes de los efectos letales (Sinha, 1999).

Sólo se tienen dos referencias respecto de la actividad enzimática en *B. monnieri* y su relación con la acumulación de EPT: Sinha *et al.*, (2002) estudiaron la reacción con relación a la oxidación por Fe y otra el estrés por Cd (Mishra *et al*, 2006). El presente trabajo se llevó a cabo con la finalidad de a) evaluar la respuesta de la planta a la exposición de EPT en conjunto, b) evaluar algunas variables indicativas de estrés oxidativo, c) seguir los cambios en forma controlada reduciendo la variabilidad experimental.

A diferencia de las pruebas reportadas en la literatura, en las que las concentraciones de EPT son inducidas con sales solubles, en este trabajo se simuló el establecimiento de *B. monnieri* en condiciones reales de dos residuos de mina (oxidados y no oxidados) con altas concentraciones de EPT. En este estudio se comparó la capacidad de absorción de Cu, Mn, Cd y Pb en un período de 12 semanas, en función de la concentración extractable y la proporción de estos EPT en dos residuos de mina. También se determinó la relación entre las concentraciones acumuladas y la actividad de las enzimas antioxidantes catalasa (CAT) y glutatión reductasa (GR).

Materiales y Métodos

Obtención del Material Vegetal

En julio de 2013, se recolectó material vegetal (1 kg peso fresco) de una población de *Bacopa monnieri* ubicada en la carretera Ixmiquilpan-Zimapán en el km 90, que crecía en suelo no contaminado (Tabla 4.1). Estas plantas sirvieron como planta madre para su propagación y establecimiento del experimento. La planta se adaptó durante un período de dos años en invernadero, en un sistema experimental (cerrado) en el que las plantas se propagaron vegetativamente seis meses antes de establecer el experimento. La planta se propagó a una temperatura entre 20 y 32°C, en macetas de 4” de diámetro con un sustrato de crecimiento preparado con turba y tierra de hoja en proporción 3:2 como lo recomiendan Cervantes-Adame *et al.* (2011). A esta mezcla se agregó arena de tezontle (una parte por cada dos de tierra de hoja) para mejorar la aireación.

Tabla 4.1 Características del suelo de rizósfera de *Bacopa monnieri* en campo

Arena ^a	Limo ^a	Arcilla ^a	Textura			pH	MO ^a	CE (dSm ⁻¹)
64.50	30.4	5.1	franco arenoso			8.09	3.63	0.85
N ^b	P ^b	Ca ^c	Mg ^c	Na ^c	K ^c	CO ₃ ^{=c}	HCO ₃ ^{=c}	Cl ^b
14.8	20.54	4.25	2.78	0.84	0.18	1.85	3.56	1.47
Pb ^b	Cr ^b	Cd ^b	Ni ^b	Co ^b	Mo ^b	B ^b	SO ₄ ^{2-b}	
ND	ND	0.014	0.006	0.12	0.33	2.71	1.56	

^aCantidades en porciento; ^b(mg kg⁻¹); ^cmeq L⁻¹ ND=No determinado; MO=materia orgánica; CE=Conductividad eléctrica

El sustrato se colocó en macetas de 4” de diámetro en las cuales se plantaron esquejes de 4 cm de largo a partir de brotes apicales (uno por maceta). Las plantas se mantuvieron con riegos continuos, hasta que se alcanzaron una biomasa mínima de 28 g (peso fresco), este tamaño se consideró apropiado para su trasplante al experimento.

Instalación del Experimento en Invernadero

Sustratos

Como sustrato se emplearon los residuos de mina denominados Pal y Santa María (de Zimapán, Hidalgo) mezclados con 10% p/p de materia orgánica (3% en forma de tierra de hoja y 7% en forma de vermicompost) con dos tratamientos previos de estabilización de EPT, mismos que se explican más adelante. Las fuentes y proporciones de materia orgánica se eligieron con el fin de: a) asegurar suficientes ligantes orgánicos reactivos y afines a los elementos a inmovilizar, b) asegurar suficiente materia orgánica para estabilizar la disponibilidad de los EPT c) probar fuentes económicas de materia orgánica y de fácil obtención y d) en proporciones mayores a las encontradas en campo (Tabla 4.1).

También se empleó un tratamiento testigo con el mismo sustrato utilizado en la propagación, como referencia de la absorción de EPT por *B. monnieri*. En la preparación de los sustratos se cribaron por una malla de 5 mm de apertura para tener un tamaño de partícula uniforme.

Estabilización de Sustratos

Se estimó la curva de retención de humedad de ambos sustratos, para lo cual se determinó la humedad retenida a diferentes presiones usando la olla de presión (Klute, 1986). En el invernadero se estabilizó la disponibilidad de EPT mediante el siguiente tratamiento: adición de 3% de materia orgánica en forma de tierra de hoja y la aplicación de cuatro ciclos de humedad-sequedad consecutivos. En cada ciclo se adicionó 80% de humedad respecto de la capacidad de campo, se homogeneizó y se dejó secar completamente. Al término del primer tratamiento, se midió la concentración de Cu, Pb y Cd extractables como indicadores de su estabilización. La

disponibilidad de Pb y Cd no disminuyó significativamente por lo que se procedió a establecer un segundo tratamiento de estabilización y se adicionó 7% de vermicompost. Se aplicaron otros cuatro ciclos de humedad-sequedad. Después de ambos tratamientos de estabilización se analizó la concentración total y extractable de EPT en los sustratos y sus características físico-químicas.

Análisis de Sustratos

En los sustratos se determinó pH (Rowell, 1994) y conductividad eléctrica (CE; Richards, 1954) en una suspensión suelo: agua 1:2.5 (p/v). Se analizó la textura y densidad aparente. Se cuantificó la concentración de sulfatos en extracto acuoso (por turbidimetría) y la concentración total de azufre después de digestión húmeda (Bailey, 1986). El contenido de materia orgánica y carbono se hizo por digestión húmeda (Walkley and Black). El nitrógeno total se determinó por Micro-Kjeldahl (Bremner, 1965). La concentración de Na⁺ y K⁺ se hizo con los procedimientos de APHA (2000).

Las concentraciones totales de Zn, Cu, Mn, Cd y Pb se determinaron por el Método EPA 3050 (USEPA, 1992) y la concentración extractable de acuerdo a Lindsay y Norvell (1978). El Ca⁺² y Mg⁺² se cuantificaron por espectrometría de absorción atómica por la técnica de flama (FASS) (Perkin Elmer 3100). Para el control de la calidad de los análisis el material se remojó en HCl diluido 10% y se enjuagó varias veces con agua desionizada. Se emplearon estándares certificados (Purity) para preparar las curvas de calibración. Todos los análisis se hicieron por triplicado incluyendo un blanco de reactivos como control por cada grupo de muestras. Adicionalmente, los equipos se calibraron para obtener tres lecturas por cada muestra.

Características de los Sustratos

El sustrato Santa María fue más arenoso y pesado en comparación al sustrato Pal (Tabla 4.2). Debido a ello retuvo menos humedad y por tanto fue más estable en las condiciones de acidez y óxido-reducción. Es decir, fue un sistema oxidante, aunque en menor grado que el sustrato Pal. El pH del sustrato Santa María era ligeramente alcalino por lo que la disponibilidad de EPT fue menor que en el sustrato Pal (excepto de Pb, cuya disponibilidad fue mayor a pH cercano a 7).

Tabla 4.2 Características fisicoquímicas de los sustratos al inicio del experimento

Sustrato	pH	CE (μScm^{-1})	Retención de humedad (%)		M O (%)	C (%)	Textura	DA (gcm^{-3})	$\text{SO}_4^{=}$	S total	Na^+		K^+	Ca^{++}		Mg^{++}	N total (%)
			CC	PMP							(mg kg^{-1})			cmol kg^{-1}			
Pal	2.4	56.4	18.3	10.4	1.78	1.03	Franco arcilloso arenoso	1.43	3187.2	3628.8	0.014 ± 0.0		0.004 ± 0.0	1245.8 ± 1.4		560.8 ± 8.6	0.03
Santa María	6.9	34.3	4.5	2.9	1.03	0.6	Franco arenoso	1.55	1972.8	3589.92	0.01 ± 0.0		0.041 ± 0.0	321.7 ± 1.5		160.6 ± 16	0.03

CE= Conductividad eléctrica. MO=Materia orgánica. DA=Densidad aparente.

La CE del sustrato Pal fue el doble de la CE del sustrato Santa María, debido a la presencia de iones Ca^{+2} y Mg^{+2} , resultado de la solubilización de carbonatos y formación de sulfatos (CaSO_4 y MgSO_4) a partir de los sulfuros presentes. La acidez y la oxidación de sulfuros permiten el incremento de iones libres de EPT (como Cd^{+2} y Mn^{+2}) y significan un estrés abiótico fuerte para plantas. La mayor concentración de Fe en el sustrato Pal (datos no mostrados), determinó una condición muy oxidante en el sustrato en la cual predominaron el Fe y Zn (Tabla 4.3) en forma de óxidos como consecuencia del pH (Mc Bride, 1994).

Tabla 4.3 Concentración de EPT en los sustratos empleados (mg kg^{-1}).

Sustrato	Zn		Cu		Mn		Cd		Pb	
	Total	DTPA	Total	DTPA	Total	DTPA	Total	DTPA	Total	DTPA
Pal	895 ± 316	282.1 ± 16.9	525 ± 14	27.1 ± 2.9	1193 ± 142	33.5 ± 2.1	24 ± 1	2.4 ± 0.2	6533 ± 1007	1.9 ± 0.56
Sta. Ma.	6945 ± 1513	236.9 ± 39.4	2033 ± 108	9.8 ± 3.8	3619 ± 449	8.0 ± 0.0	61 ± 7	2.4 ± 2.4	1996 ± 610	57.2 ± 10
LP*	ND		ND		ND			37	400	

* LP: Límite permisibles en México para la concentración total en suelos agrícolas o residenciales (NOM-147-SEMARNAT/SSA1, 2004). ND= No determinado

Estabilización de los sustratos

Se pudo observar claramente el efecto de los procesos de estabilización sobre la concentración extractable de Cu, Cd y Pb (Figura 4.2). Como resultado del segundo tratamiento de estabilización, la concentración de Cu extractable en el sustrato Pal aumentó 35%, mientras que la disponibilidad de Pb y Cd se redujeron hasta 70% y 25% respectivamente. En el sustrato Santa María la disponibilidad de Cu aumentó en 80%, la disponibilidad de Pb y Cd se redujeron en 50% y 30% respectivamente. Por tanto en el sustrato Santa María la disponibilidad de EPT bajó considerablemente incluso por debajo de los límites establecidos el Norma NOM-147 (Tabla 4.3). La concentración de Cd y Zn extractable fue similar en ambos sustratos.

Trasplante

Para mantener la uniformidad de la biomasa en las plantas antes de la fase experimental, se eliminó el tejido excedente del follaje, sobre todo en las ramas maduras, de manera que cada ejemplar tuvo 28 g (peso fresco). Posteriormente, todo el sustrato de la raíz se separó en agua para evitar la pérdida de raíces secundarias. Cada uno de los ejemplares se trasplantó a charolas más amplias (6") de poliestireno expandido, con 250 g de sustrato estabilizado. Esto fue con la

finalidad de evitar el estrés causado por falta de espacio para el desarrollo de la raíz y permitir mayor superficie de contacto con el sustrato. Una vez hecho el trasplante se empleó un sistema superficial donde la profundidad del sustrato en cada charola fue de 2 cm (Figura 4.1).

Riego

Después del trasplante y durante todo el experimento, se empleó un sistema de riego cerrado por subirrigación para mantener la humedad de los sustratos a capacidad de campo. Con esta técnica se evitaron cambios tanto en el potencial eléctrico como en los estados de oxidación de los EPT (Figura 4.1).

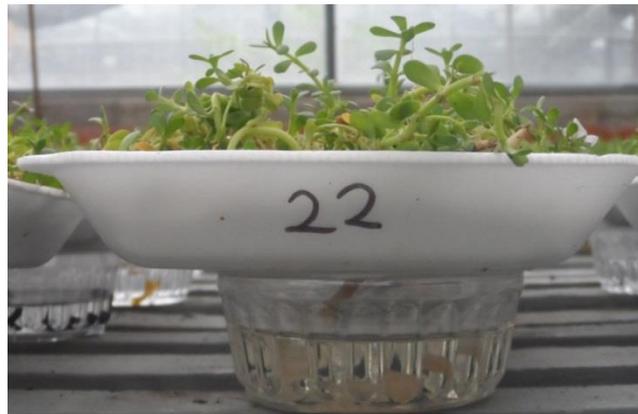


Figura 4.1. Sistema de riego por subirrigación durante el experimento.

Diseño experimental

El experimento duró 12 semanas, con base en la expectativa de vida de *B. monnieri* ante concentraciones elevadas de EPT en condiciones de invernadero; lo cual se reportó en la literatura (Sinha, 1999). Se estableció un experimento factorial de tres tratamientos con 15 repeticiones por tratamiento en un diseño completamente al azar (Tabla 4.4). Cada tres semana se muestrearon tres unidades experimentales de cada tratamiento.

Tabla 4.4 Arreglo factorial en diseño completamente al azar empleado en el experimento.

Factores		Variables Respuesta	
Tipo de sustrato	Tiempo de exposición	Concentración de EPT	
		Raíz	Follaje
Santa María (alcalino) Pal (ácido) Testigo	0 semanas	Cu	Cu
	3 semanas	Mn	Mn
	6 semanas	Cd	Cd
	9 semanas	Pb	Pb
	12 semanas		

Monitoreo y Muestreo

Diariamente, se registró la temperatura ambiente promedio del invernadero, máxima intensidad luminosa y humedad relativa promedio mediante un sensor múltiple HOBO H8. Se hicieron cinco muestreos (uno cada tres semanas) de plantas elegidas al azar. Cada muestreo se hizo por triplicado para cada tratamiento. Durante el experimento la temperatura promedio varió entre 13-34 °C. La temperatura mínima al amanecer osciló entre 11.7 y 17.5°C mientras que la máxima al atardecer se registró entre los 24.12 y 40.6°C.

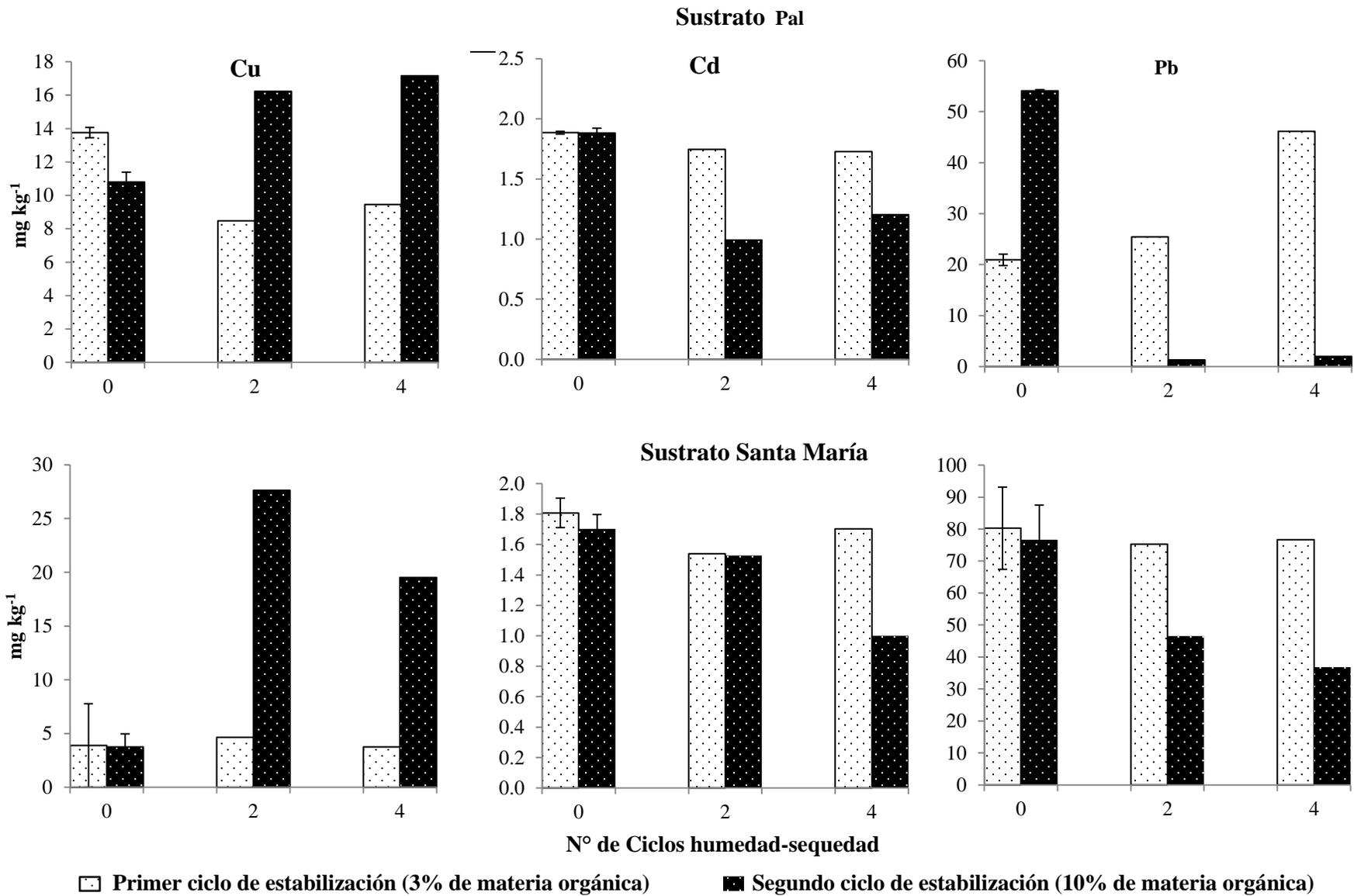


Figura 4.2 Efecto de la estabilización de los sustratos sobre la concentración extractable de EPT.

La humedad relativa varió entre 55% y 61%. En la semana nueve se registraron las temperaturas más bajas y la humedad relativa más alta (Figura 4.3). Las condiciones de humedad y temperatura durante todo el experimento en intervalos fisiológicamente adecuados para el desarrollo de *Bacopa monnieri* (Cervantes-Adame, 2011).

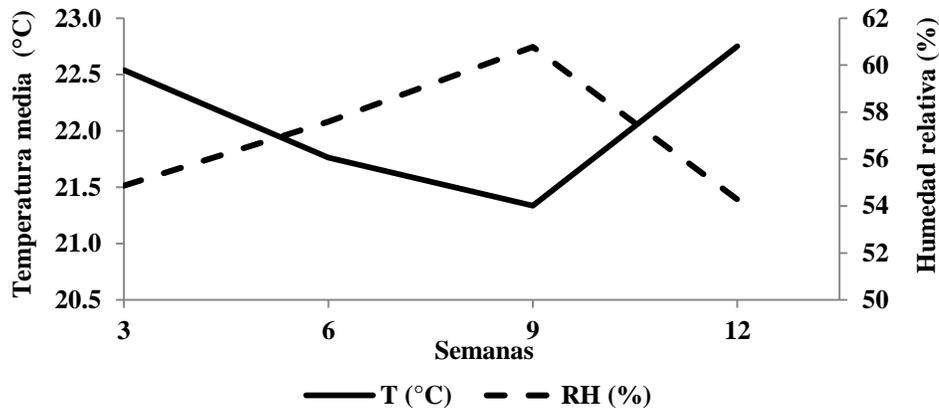


Figura 4.3 Temperatura media v humedad relativa durante el experimento.

La iluminancia se mantuvo entre los 2762 y 5530 lux (Lm m^{-2}) en el horario de mayor incidencia (entre las 9 y 17 h) durante el experimento, lo cual es adecuado para plantas de sombra con medianos requerimientos de luz.

En cada muestreo se analizaron en el sustrato: pH, CE y la concentración extractable (DTPA-TEA- CaCl_2) de Cu, Mn, Cd y Pb de acuerdo a Lindsay y Norvell (1978). Se eligieron estos elementos con base en los antecedentes de acumulación en *B. monnieri* (Sinha, 1999). El primer muestreo (semana cero) se hizo 24 horas después de instalado el experimento. Se cuantificó la biomasa fresca de las plantas. Cada ejemplar se lavó con abundante agua potable, detergente libre de fosfatos (Extrán 2%), agua destilada, HCl 10% (10 min), agua destilada y agua desionizada. Todo ello para remover partículas adheridas a los tejidos.

Después el material vegetal se mantuvo a 0 °C con hielo durante el proceso de separación para los diferentes análisis (Figura 4.4).

Procesamiento de Muestras Vegetales

EPT en plantas. Las plantas se secaron a 60°C en una estufa de aire forzado por 48 h y se molieron en un molino de acero inoxidable. Se analizó la concentración total de Cu, Mn, Cd y Pb después de la mineralización de las muestras por digestión ácida en una mezcla de HClO₄-H₂SO₄-H₂O₂ (4:1:1 v/v). Las muestras se dejaron en pre digestión por 24 h y después se calentaron a 120 °C hasta que la solución mostró una apariencia clara. Cada muestra se diluyó con agua desionizada, se aforó a 25 mL y se filtró con papel Whatman 42. Se determinó la concentración de EPT por espectrometría de absorción atómica (Perkin Elmer 3110[®]), se trabajó en el intervalo lineal de concentración de EPT que especifica el manual del equipo.

Clorofila y pigmentos fotosintéticos. Se tomó una muestra compuesta de hojas maduras de la parte media de las ramas, elegidas al azar hasta completar 100 mg de peso fresco. La muestra se conservó en acetona a 80% en frascos ámbar de vidrio. Se determinó la concentración de pigmentos fotosintéticos (Lichtenthaler, 1987) en un espectro de luz UV-Vis Scan Pro[®]

Actividad enzimática. Se tomó una muestra compuesta de hojas maduras por ejemplar (0.25 – 0.5g) para el análisis de la actividad de las enzimas (Figura 4.4). Estas muestras se conservaron a -34°C y después en ultracongelador a -70°C hasta su procesamiento. Se analizó la actividad enzimática de la catalasa (CAT; Aebi, 1984) y glutatión reductasa (GR) (Yannarelli, 2007) en relación al contenido de proteínas (Bradford, 1976), para después correlacionar estas actividades con la acumulación de EPT en *B. monnieri*.

PROCEDIMIENTO PARA LA TOMA DE MUESTRAS DE TEJIDO VEGETAL

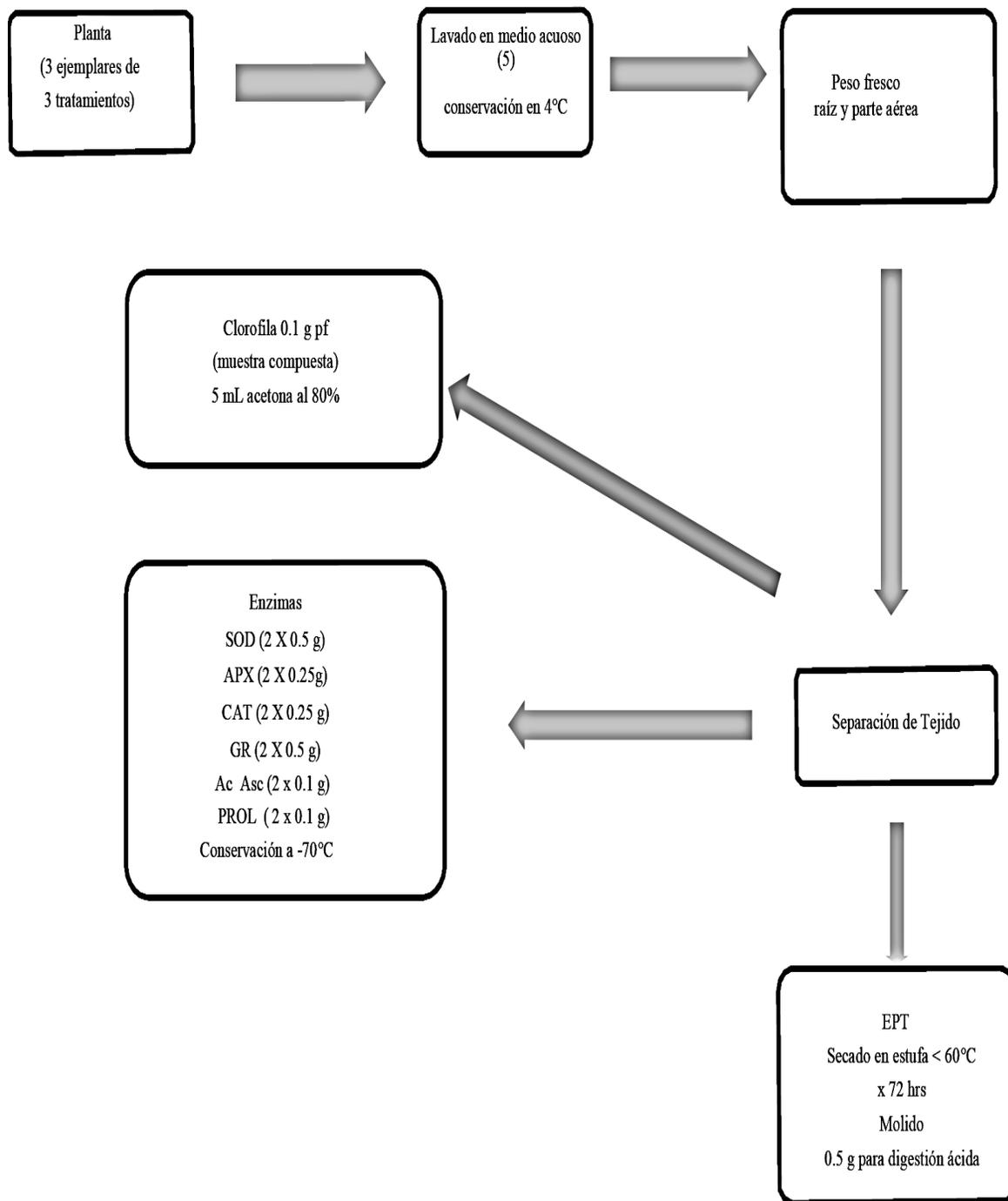


Figura 4.4. Muestreo de tejido vegetal y manejo de muestras.

Análisis Estadístico

Los resultados se analizaron mediante un ANDEVA para cada una de las variables respuesta, complementado con una prueba de comparación de medias SNK e índice de propensión (PS). Se hizo también un análisis de correlación de Pearson entre las variables respuesta para cada muestreo empleando el paquete estadístico SAS 9.0 ($\alpha=0.05$).

Resultados

Sobrevivencia

Las plantas en el sustrato Pal sobrevivieron sólo hasta la semana tres en la que se hizo el primer muestreo. Las plantas del sustrato Santa María se mantuvieron vivas durante todo el experimento aunque a partir de la semana 10 fue imposible recolectar tejido de la raíz debido a que ya estaba completamente desintegrado. En el sustrato Pal la quemadura de tejido en las plantas fue el efecto más evidentemente observado desde el primer muestreo. El daño causado por la acentuada acidez del sustrato se manifestó como la corrosión del tejido (oscurecimiento y muerte del tejido) (Figura 4.5a).

Este efecto fue más dañino que la toxicidad por EPT, la cual se manifiesta como amarillamiento. En los sustratos Santa María y Testigo, se observó una tendencia ligera y gradual hacia la alcalinidad, más acentuada y uniforme en el sustrato Santa María (de 6.3 a 7.6) que en el tratamiento testigo (7.7 a 8.0; Figura 4.6). También al aumentar el tiempo de incubación se incrementó la CE de los sustratos. En el sustrato Santa María se elevó de 0.27 a 2.32 mS cm⁻¹ mientras que en el testigo se incrementó de 0.27 a 1.5 mS cm⁻¹.



a **b** **c**

Figura 4.5 Aspecto de las plantas después de tres semanas del experimento. a) Tratamiento Pal; b) Tratamiento Santa María; c) Tratamiento Testigo. Nótese el efecto corrosivo en las plantas por efecto de la acidez en el Tratamiento Pal.

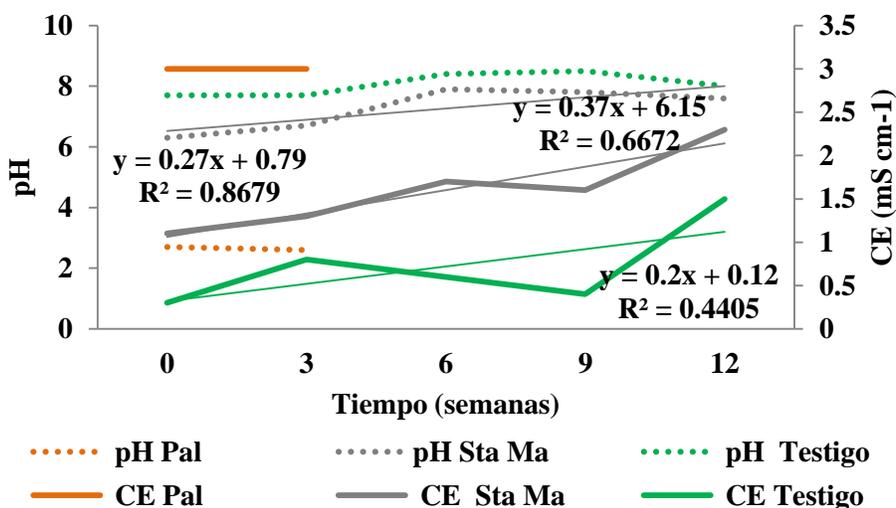


Figura 4.6 pH y CE durante el experimento. Sta Ma= Santa María

Concentración Extractable de EPT (DTPA-TEA)

En los sustratos Santa María y Pal la disponibilidad de Mn se mantuvo en niveles similares (alrededor de 5 mg kg^{-1}) (Figura 4.7). El Cu y Mn se presentaron en concentraciones extractables similares entre sí. La disponibilidad de ambos elementos fue mayor en el sustrato Pal en

comparación al sustrato Santa María, por las condiciones reductoras y la marcada acidez del sustrato. En el sustrato Santa María la disponibilidad y movilidad de Cu fue casi nula. El Cd también se mantuvo poco disponible en el sustrato Pal (Figura 4.7). La disponibilidad de Pb aumentó en el sustrato Santa María.

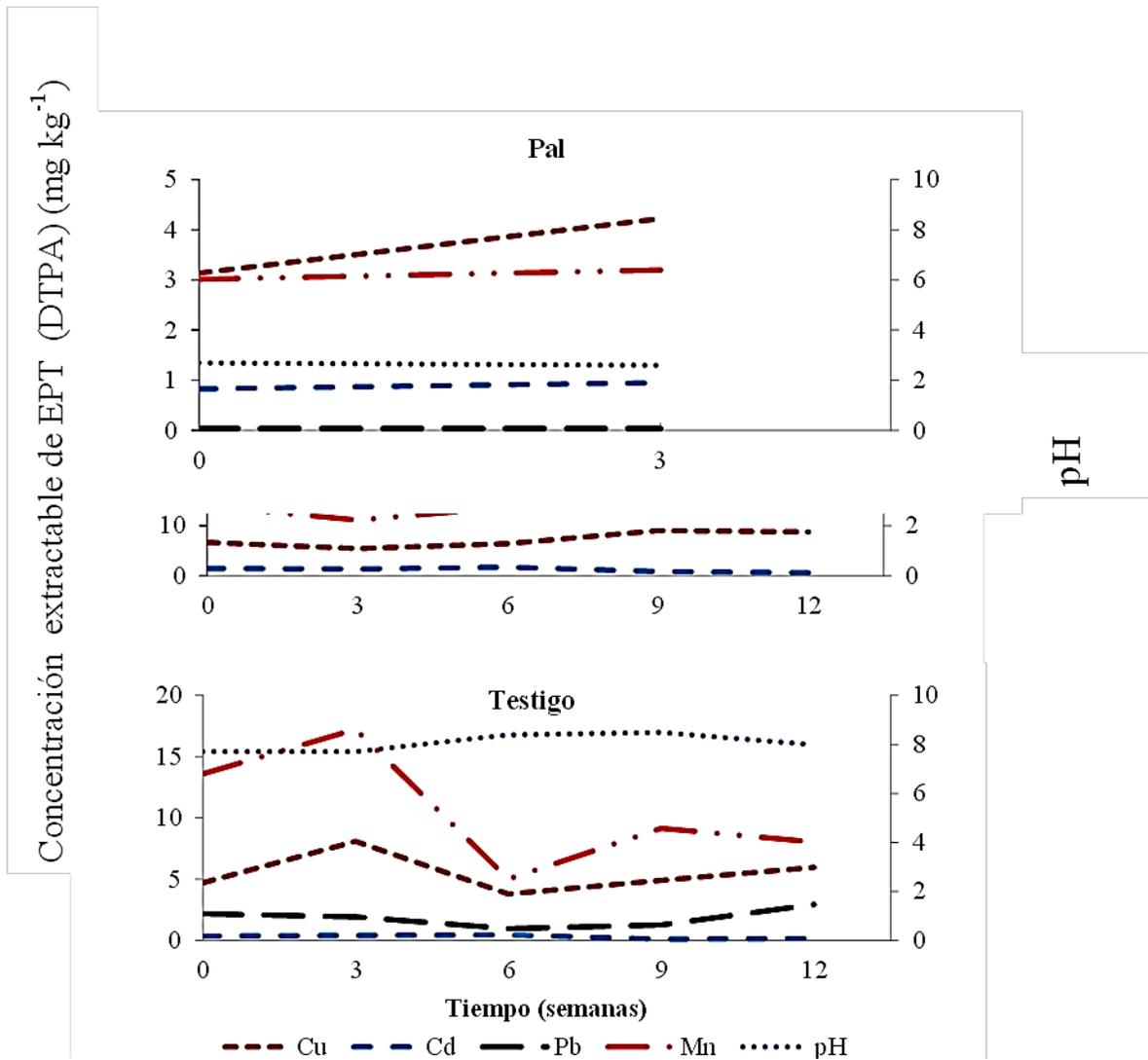


Figura 4.7 Concentración extractable (DTPA-TEA) de EPT con respecto al pH en los sustratos empleados.

Biomasa

La biomasa fue similar en los tres tratamientos, con efectos cíclicos de incremento-disminución de la biomasa en cada muestreo (Figura 4.8). En el tratamiento testigo se observó incremento constante en la biomasa. En la semana tres disminuyó el crecimiento y posteriormente las plantas siguieron creciendo hasta el final del experimento. En el tratamiento Santa María la mayor disminución en la biomasa ocurrió en la semana nueve en comparación con el testigo. No obstante hubo recuperación en la biomasa del follaje en la semana 12 (Figura 4.8).

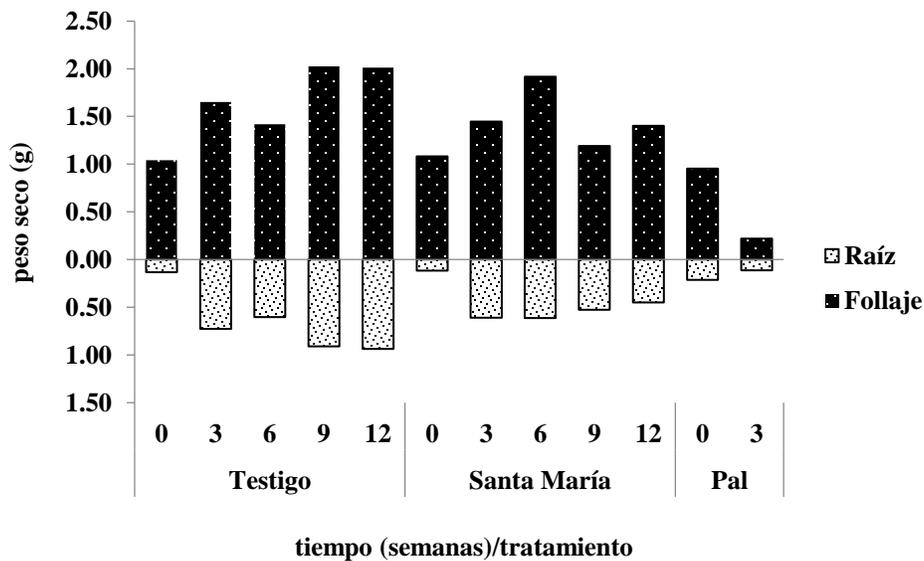


Figura 4.8 Biomasa de *Bacopa monnieri* durante el experimento.

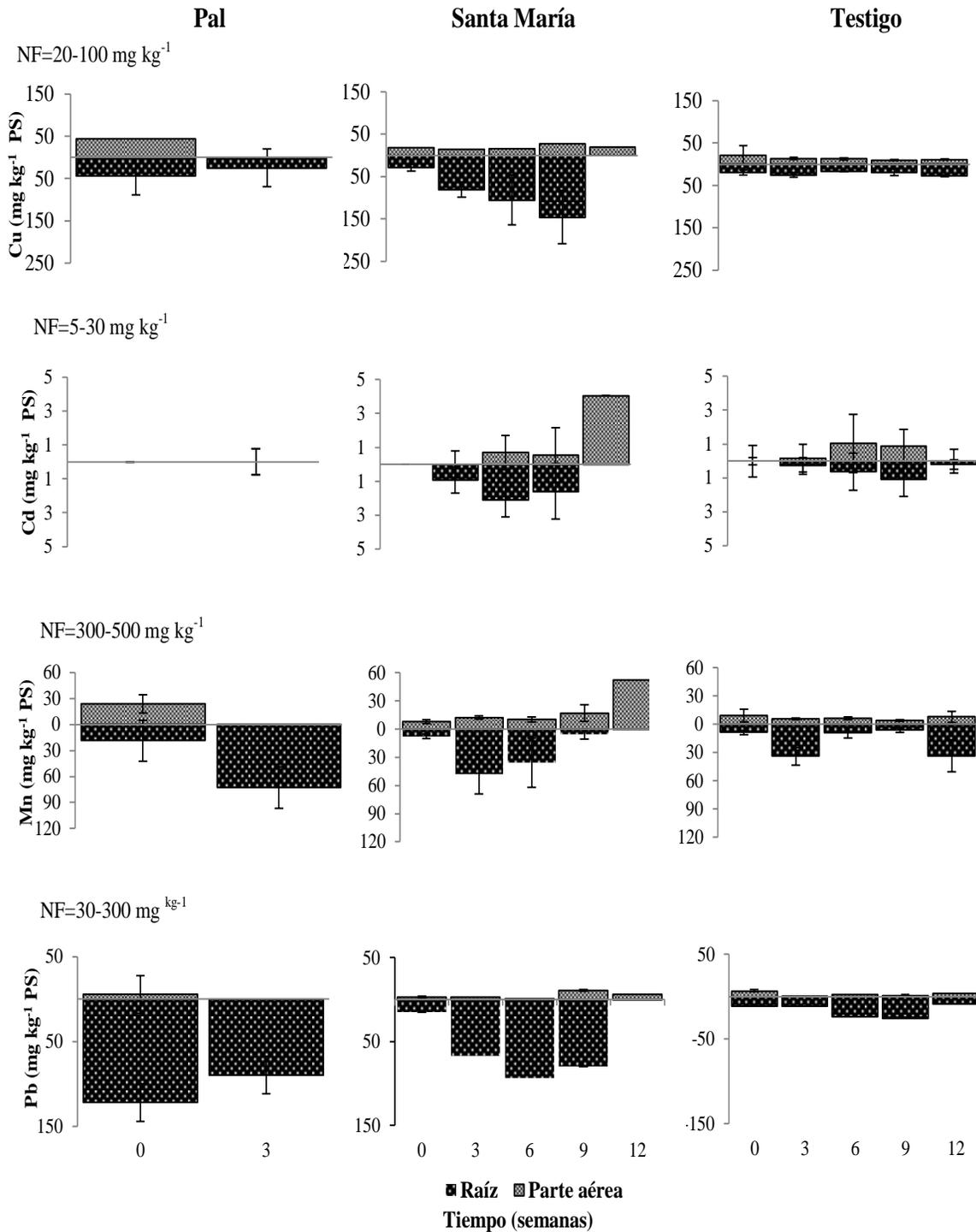
En el sustrato Pal la biomasa decreció hasta 46% de las plantas. Sin embargo, algunas plantas generaron brotes nuevos. El peso de la raíz se incrementó considerablemente durante las tres primeras semanas por efecto de la humedad a capacidad de campo la cual estimuló el crecimiento y disminuyó gradualmente desde la semana 9 hasta la 12. En general se observó que el tiempo de exposición tuvo efecto significativo sobre el peso seco de raíz ($r=0.78$) y del follaje ($r=0.62$).

EPT en Plantas

Los sustratos Santa María y Pal tuvieron un efecto similar en la concentración de EPT en el tejido aéreo, a diferencia del tratamiento testigo. La mayor diferencia fue observada en la semana 12, pues se expresaron síntomas tóxicos visibles en las plantas como la desintegración de la raíz (Figura 4.9). Por ello, en la semana 12 no fue posible medir las concentraciones de EPT en raíz en el tratamiento Santa María, ni las concentraciones en la parte aérea para el tratamiento Pal (Figura 4.8).

Se observó que *B. monnieri* acumuló rápidamente EPT desde el momento del trasplante (Figura 4.8), ya que el primer muestreo se tomó 24 h después del mismo. En el sustrato Pal, la planta también acumuló rápidamente los EPT, pero posteriormente colapsó por el efecto tóxico y corrosivo de la acidez. Durante el último muestreo las plantas testigo tuvieron una concentración de Zn por encima de los 200 mg kg⁻¹ en la parte aérea (datos no mostrados), el Mn por encima de los 50 mg kg⁻¹ y el Pb cerca de 121 kg⁻¹ (ésta última en la raíz).

En los sustratos Pal y Santa María *B. monnieri* acumuló Zn en la raíz por encima de los niveles fitotóxicos (100-400 mg kg⁻¹). En ambos tratamientos la concentración de Zn absorbida fue entre 215 y 408 mg kg⁻¹ en el follaje y entre 420 y 459 mg kg⁻¹ en la raíz para ambos sustratos (datos no mostrados).



Semanas de Tratamiento

Figura 4.9 Concentración de EPT en *Bacopa monnieri* durante las semanas de exposición a residuos de minas. NF=Concentración fitotóxica (Kabata-Pendias, 2011).

La absorción de Cu en la raíz se presentó en función de la disponibilidad de este elemento y fue similar en los tres sustratos (entre 21 y 44 mg kg⁻¹) en el follaje. En el sustrato Santa María la acumulación en raíz fue gradual y directamente proporcional al tiempo de exposición. Alcanzó los 146 mg kg⁻¹ en raíz en la semana 12, ligeramente por encima de la concentraciones fitotóxicas (100 mg kg⁻¹; Figura 4.9).

En el sustrato Santa María la máxima acumulación de Mn en tejido se presentó en la semana tres después de la cual la concentración de Mn en la raíz disminuyó y hubo aumento en concentraciones de 52 mg kg⁻¹ en el follaje. La máxima acumulación de Cu en el follaje se encontró en el sustrato Pal (44 mg kg⁻¹; Figura 4.9). En el tratamiento Pal no se detectó la presencia de Cd en el tejido en la planta durante las tres primeras semanas (Figura 4.9). La concentración de Pb en *B. monnieri* fue similar en los tres tratamientos: Los valores máximos fueron entre 5.6 y 10 mg kg⁻¹ en follaje y entre 93 y 121 mg kg⁻¹ en la raíz, en los sustratos Pal y Santa María, respectivamente (Figura 4.9). La concentración de Pb en la raíz en el sustrato Santa María tuvo un comportamiento inverso al tiempo de exposición: Al principio del experimento acumuló concentraciones menores a los niveles fitotóxicos en el follaje y la concentración en raíz disminuyó gradualmente.

Enzimas Antioxidantes

La respuesta de la actividad de las enzimas al estrés por saturación hídrica se observó en la glutatión reductasa (GR), cuya actividad fue similar en el follaje de las plantas para los tres sustratos (Figura 4.10a). Desde el inicio del experimento hasta la semana tres bajó la actividad enzimática de GR decreció en los tres sustratos. En contraste, la actividad en el tratamiento testigo se incrementó en la semana tres, mientras que en el tratamiento Santa María la actividad

aumentó en la semana nueve e inclusive fue superior a la del tratamiento testigo. Si bien en el inicio del experimento la actividad de la GR fue ligeramente mayor en la raíz que en el follaje, se mantuvo sin cambio a partir de la semana seis. Probablemente esto sea debido a que la glutatión reductasa es una enzima localizada en el cloroplasto, aunque también puede estar presente en mitocondria, citosol o peroxisomas (Jiménez *et al.*, 1997) (Figura 4.10).

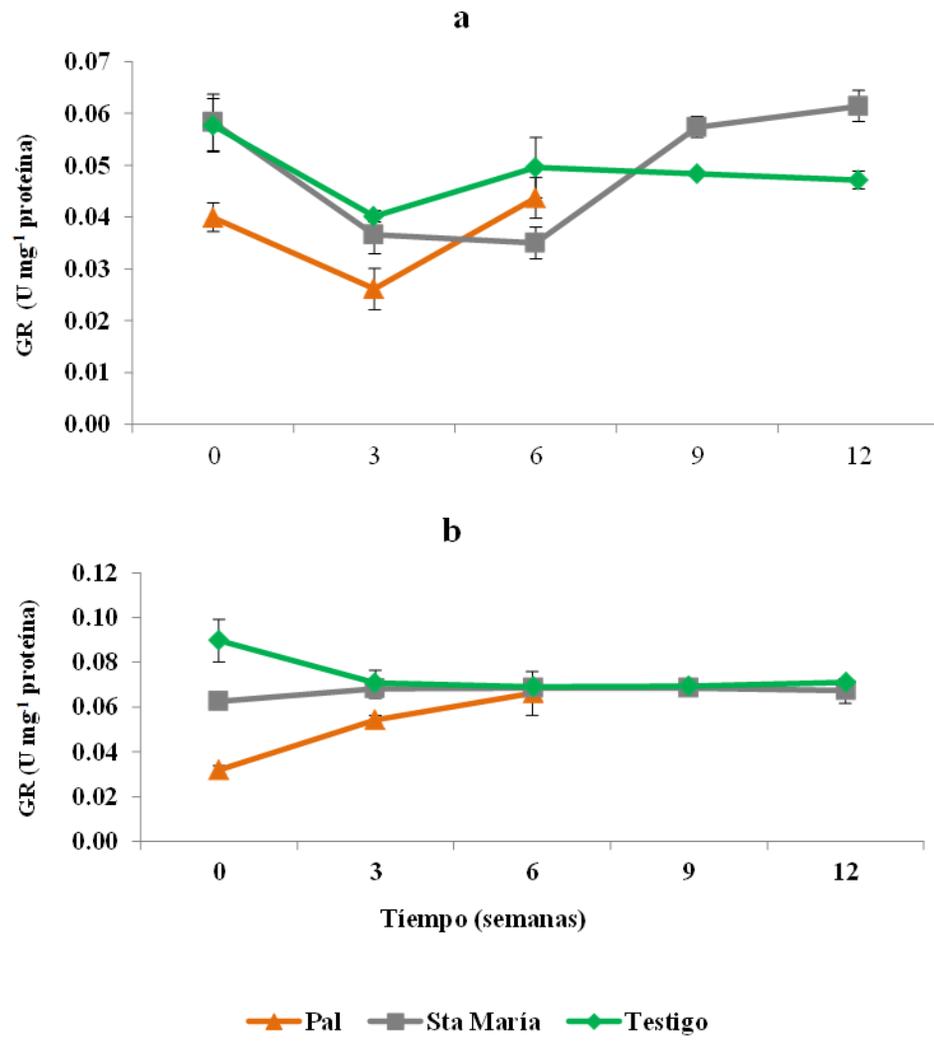


Figura 4.10 Actividad de la glutatión reductasa en el follaje (a) y la raíz (b) de *Bacopa monnieri* durante los tres tratamientos. Una unidad de GR es definida como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 μ mol de NADH por minuto bajo condiciones estándar. Los valores son promedios de nueve repeticiones. Sta. María=Santa María. Coeficiente de extinción molar del NADH: $\epsilon=6.22 \text{ mM cm}^{-1}$.

La actividad de GR se observó más notablemente en la raíz que en el follaje. En las plantas del sustrato Santa María la actividad máxima de esta enzima se observó en la raíz, donde se mantuvo en los mismos niveles durante todo el experimento (Figura 4.10). La actividad de CAT se mantuvo estable en el tejido de la parte aérea del tratamiento testigo. Por efecto de los EPT bajó su actividad en los sustratos con residuos de mina, pero el estrés por EPT estimuló su actividad en la parte aérea hasta la semana nueve. En la semana doce bajó la actividad de CAT lo que coincide con la destrucción de la raíz. La CAT disminuyó su actividad drásticamente hasta su punto mínimo en la semana tres (sustrato testigo) y en la semana seis (sustrato Santa María) (Figura 4.11).

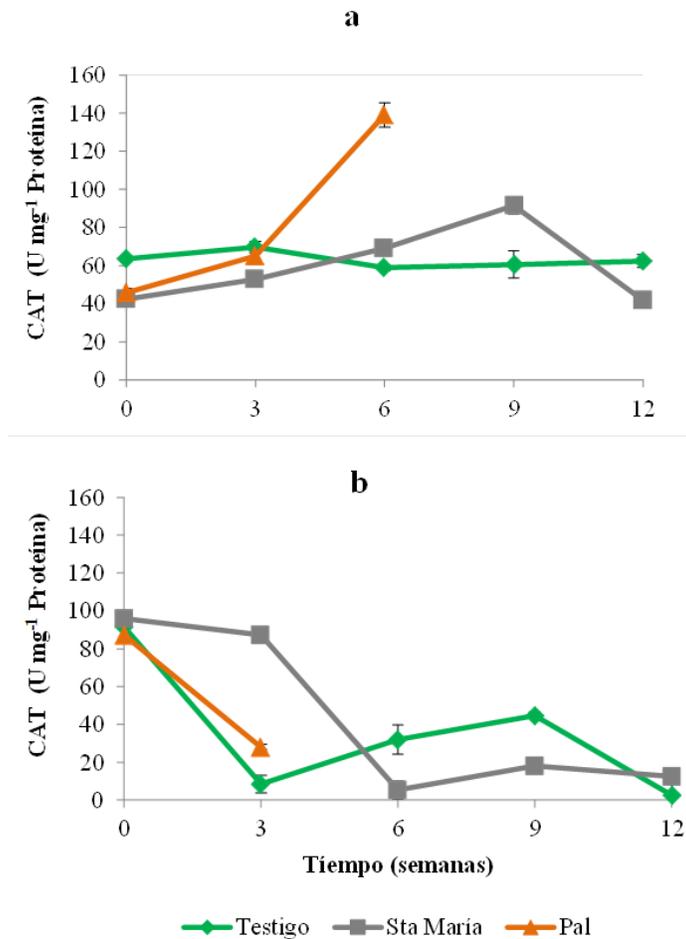


Figura 4.11 Actividad de la catalasa en follaje (a) y la raíz (b) de *Bacopa monnieri* durante los tres tratamientos. Una unidad de CAT es definida como la cantidad de enzima necesaria para oxidar $1\mu\text{mol}$ de H_2O_2 por minuto bajo condiciones estándar. Los valores son medias de nueve repeticiones. Sta María=Santa María. Coeficiente de extinción molar $\text{H}_2\text{O}_2=\epsilon=28\text{ mM cm}^{-1}$.

En la raíz al inicio del experimento la actividad de CAT fue similar para los tres tratamientos. La actividad de CAT se incrementó por efecto del estrés por EPT (en el sustrato Santa María) en la semana tres, lo cual está relacionado con la concentración de Pb en la raíz ($r=0.54$). En la parte aérea no hubo variación significativa ($\alpha=0.001$) en la actividad de la CAT entre los tratamientos, en contraste con lo observado en la raíz, en respuesta aparente al estrés por EPT. Lo mismo sucedió para la CAT en raíz en las semanas seis y doce para el sustrato Santa María.

Pigmentos Fotosintéticos

En ambos tratamientos la clorofila mostró un comportamiento similar a través del período del experimento, aunque la concentración en las plantas del sustrato Santa María fue menor (Figura 4.12). Los resultados muestran que las plantas mantuvieron su actividad fotosintética, y en la semana doce hubo una recuperación importante de clorofila a (Figura 4.12a). La clorofila b no mostró tendencia clara, pero también tuvo un incremento en la concentración en la semana doce. (Figura 4.12b).

La concentración de clorofila total y de carotenoides + xantofilas tuvieron una acumulación similar en ambos tratamientos a través de las 12 semanas del experimento. Las plantas en el sustrato Santa María tuvieron la mayor concentración en la semana tres (Figura 4.13).

En el sustrato testigo la clorofila total mostró correlación negativa con la clorofila a, la cual se recuperó después de la semana doce. La disminución de la actividad fotosintética debida a la clorofila a fue compensada por los carotenoides+xantofilas, los cuales mantuvieron la captación

de energía solar. La concentración de pigmentos fotosintéticos en las plantas se mantuvo con pocos cambios a partir de la semana seis. (Figura 4.13).

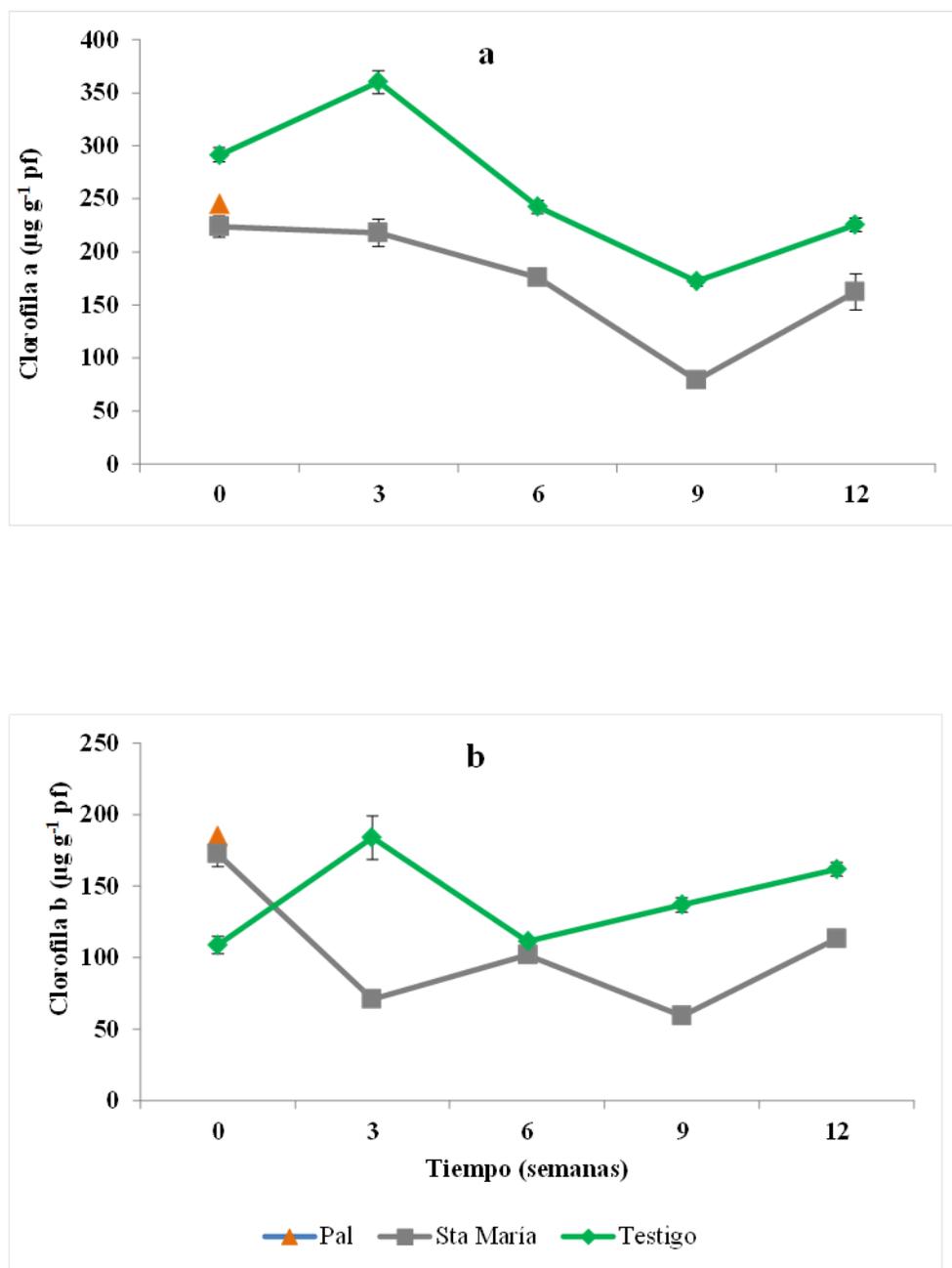


Figura 4.12. Concentración de clorofila a (a) y clorofila (b) en las hojas de *Bacopa monnieri* durante el experimento.

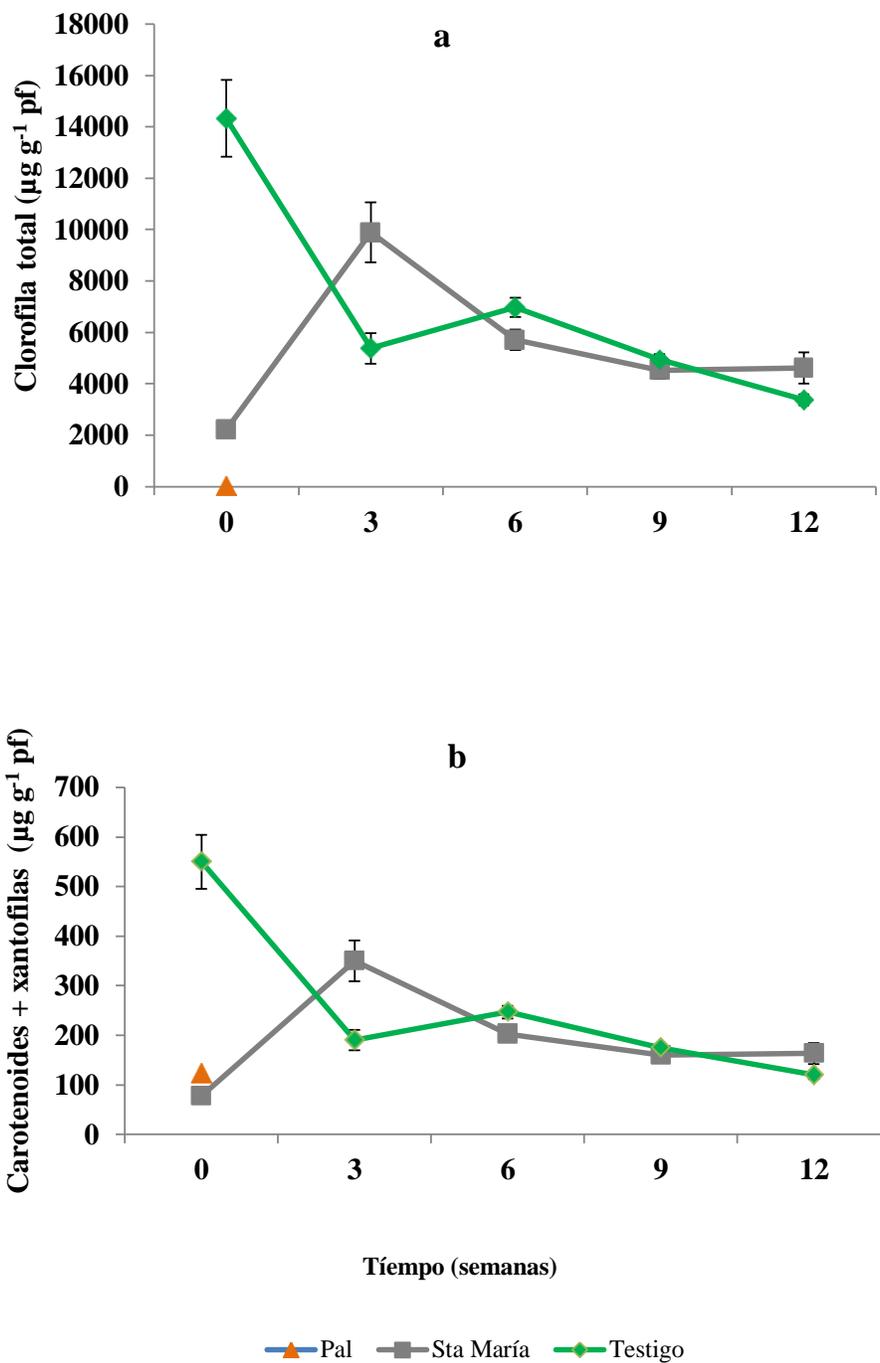


Figura 4.13. Concentración de clorofila total (clorofila a + b) (a) y carotenoides + xantofilas (b) en las hojas de *Bacopa monnieri* durante el experimento.

El análisis estadístico indica, con un alto grado de correlación ($R^2=0.84$), que en el experimento hubo un efecto claro y significativo de los factores de variación: el tipo de sustrato empleado, el tiempo de exposición y de la interacción entre ambos factores (Tabla 4.5).

Tabla 4.5 Resultado del ANDEVA y SNK

FV	R^2	GL	SC	CM	Pr>F	α
S	0.848	2	621	310	0.0001	0.05
T		4	574	143	0.0011	0.05
S*T		4	1102	275	<0.0001	0.05

FV=Fuentes de variación; S=sustrato; T=Tiempo de exposición; GL=Grados de libertad; SC=suma de cuadrados; CM=Cuadrados medios.

Discusión

Biomasa

En general, el peso de la raíz mostró una relación directa con el tiempo de exposición ($r=0.78$) y el tipo de sustrato ($r=0.56$) y con la actividad de CAT en raíz, así como una correlación negativa con la actividad de CAT en raíz ($r=-0.59$). Esto significa que la acumulación de la biomasa puede emplearse como un indicador de las condiciones de estrés (Pierce *et al.*, 2009). En el sistema empleado, el estrés es causado por: 1) la saturación de humedad, 2) el potencial redox y 3) la disponibilidad de EPT en el sustrato. Los dos primeros factores están estrechamente relacionados.

Es muy probable que el estrés hídrico, causado por la saturación de humedad continua (Pierce *et al.*, 2009) y el estrés causado por las altas concentraciones de EPT tuviesen un efecto sinérgico sobre la planta. Ambos factores dependen de las condiciones redox. Este efecto se observó más

claramente en el tratamiento Santa María, el cual tuvo mayor disminución de la biomasa presumiblemente por el efecto sumado de ambos tipos de estrés.

Pierce *et al.* (2009) encontraron que el grado de saturación de humedad en el sustrato afecta directamente la producción de biomasa (Pierce *et al.*, 2009). No obstante, se deduce que las condiciones de saturación de humedad no fueron las mismas en todos los sustratos. Aunque la saturación de humedad no se midió en el sustrato, es probable que las plantas del sustrato Santa María hayan estado más expuestas a las variaciones de humedad por efecto de la evapotranspiración. Debido a su textura más arenosa, retiene menos humedad que los otros sustratos, que aumenta la variación en la tasa de evaporación y causando estrés hídrico. Esto explica los cambios cíclicos en el incremento y disminución de biomasa a lo largo del experimento (Figura 4.8).

Se observó un factor adicional de estrés causado por el endurecimiento paulatino de la superficie de los sustratos. Este proceso, fue más evidente en el sustrato Pal que en el sustrato Santa María, se explica porque los procesos de óxido-reducción en la superficie de los sustratos dan lugar a la formación de CaSO_4 y MgSO_4 , además de otros minerales (Mc Bride, 1994) que se acumularon en la parte superficial de ambos sustratos. Este proceso es importante, dado que se manejó un sistema de humedal superficial (2 cm de profundidad), lo que afectó la zona de rizósfera. El efecto se explica por el sistema cerrado de subirrigación empleado (Montesano *et al.*, 2010), el cual pudo haber causado estrés osmótico para la plantas (Montesano *et al.*, 2010).

Montesano *et al.* (2010) encontraron que este tipo de estrés está relacionado con la disminución del crecimiento. En el experimento realizado se observó que la disminución de la biomasa se

presentó en los tratamientos con residuos de mina (Figura 4.8), lo cual se atribuye en parte, al estrés osmótico.

Se ha probado que en sistemas de tratamiento de residuos de mina en humedales, algunas plantas tienen la capacidad de cambiar las características químicas de los sustratos, lo cual ocurre en la capa de 1 cm de grosor subyacente a la superficie de la raíz (Wright y Otte, 1999). Lo que sugiere en este estudio que la influencia de la raíz alcanzó la mayor parte del sustrato, dado que se empleó un sistema superficial, con 2 cm de profundidad, con menor limitación para el crecimiento radical. Los momentos de compensación en la biomasa pueden explicarse debido al carácter anfíbio de *B. monnieri* que le permite modificar las condiciones redox del sustrato a nivel de rizósfera. En condiciones de bajas concentraciones de oxígeno y saturación de humedad la planta puede aportar oxígeno al sustrato y por tanto aminorar las condiciones de estrés (Pierce *et al.*, 2009).

La alta concentración de EPT en los sustratos con residuos de mina (particularmente en el sustrato Santa María) también tuvo un efecto significativo sobre el crecimiento de las plantas ($r=0.56$ para la raíz y $r=0.62$ para el follaje). De forma notable, en el sustrato Pal es posible que el efecto tóxico de los EPT haya reducido poco a poco la vitalidad de la planta y por tanto su capacidad de tolerancia debido a los daños causados en el sistema radical (Nagjaiyoti *et al.*, 2010).

Se ha reportado que el efecto tóxico de los EPT acumulados en las membranas y paredes celulares de la raíz dañan estos tejidos (Cheng, 2003, Siedlecka, 2014) en otras especies. Sin embargo, la aparición de brotes nuevos en el tratamiento Pal indica que esta especie podría superar condiciones severas de acidez en el medio, si se emplean enmiendas para aminorar la

acidez. En el tratamiento Pal no se pudo obtener material suficiente para la determinación de bioacumulación de EPT en el follaje después de las tres semanas iniciales, debido a la acidez. Se ha demostrado que en condiciones de alta acidez se destruyen las membranas celulares y se inhibe el crecimiento (Manara, 2012). Aun así, las concentraciones de EPT en la raíz estuvieron por encima de los niveles fitotóxicos, ya que la planta comenzó a acumular EPT en los tejidos de la raíz desde el primer día.

Procesos Redox en los Sustratos

La alcalinización paulatina que se presentó en todos los tratamientos (Figura 4.6) puede explicarse por la constante saturación de humedad de los sustratos a capacidad de campo, lo cual favorece (hasta cierto punto) la carencia de O₂ y el desencadenamiento de una secuencia de reacciones de óxido-reducción que desencadenaron una tendencia a la alcalinidad (Figura 4.6). (Mc Bride, 1994; O'Sullivan *et al.*, 1999; Pierce *et al.*, 2009). También puede explicarse dado que tanto el sustrato testigo como el sustrato Santa María tenían concentraciones de sulfatos más bajas que el sustrato Pal, como fuente de acidez.

Se observó que el sustrato Santa María tiene mayor capacidad de amortiguamiento que el Pal, debida al contenido de CaCO₃ formada por efecto de la alcalinización. Al cambiar las condiciones de acidez se modificó también la solubilidad de los iones metálicos y consecuentemente su disponibilidad en la solución del suelo. O'Sullivan *et al.* (1999) encontraron que en humedales en condiciones de inundación hay una estrecha relación entre la CE y la concentración de sulfatos. En el sistema probado, el aumento en la conductividad eléctrica pudo deberse en parte al incremento en la concentración de sulfatos en el sustrato; lo que explica la formación de sales en la superficie.

El ligero estado de anaerobiosis pudo haber favorecido la actividad microbiana acentuando las condiciones reductoras del suelo, y la consecuente disminución del potencial redox (E_h), la cual puede observarse en períodos de solo 24 h (Pierce *et al.*, 2009).

En este experimento no fue posible medir el potencial redox. Sin embargo, se ha documentado que los valores de E_h en condiciones de oxidación pueden llegar a -250 mV, valores en los cuales la mayoría de las reacciones consumen H^+ contribuyendo a la alcalinización progresiva del medio (Mc Bride, 1994). Una consideración importante es que generalmente en los suelos con humedad a capacidad de campo, el agua es retenida con una energía que es fácilmente superada por la de succión de las raíces al mismo tiempo que hay suficientemente aireación para que la respiración radicular sea posible. No obstante, en este sistema, puede darse el proceso de alcalinización debido al consumo de oxígeno por la formación de sulfatos y de sales, provocando cierta condición de anaerobiosis.

También es importante considerar que a pH ligeramente alcalinos (entre 7 y 7.7) como los que prevalecieron en el tratamiento Santa María y el testigo, cambian las formas de algunos elementos importantes, por ejemplo el Mn^{2+} y el Fe^{2+} en solución acuosa se presentan en formas de $MnCO_3$ y $FeCO_3$ (Stumm y Morgan, 1981), que son de baja solubilidad. Los sulfuros se oxidan a sulfatos y se forman oxihidróxidos (Murshed *et al.*, 2003), lo cual también explica el incremento en la conductividad eléctrica de la solución del suelo (Figura 4.6).

Concentración Extractable de EPT

En general, las concentraciones de EPT observadas en el tratamiento Santa María están muy por debajo de las reportadas por otros autores (Sinha, 1999; Mishra *et al.*, 2006), muy posiblemente debido a las condiciones de alcalinidad de este sustrato (Hussain *et al.*, 2011), ya que el pH tiene

una relación estrecha con la biodisponibilidad de EPT en el suelo. Otro factor que influyó fue la humedad, ya que las condiciones de saturación continua desencadenan reacciones de óxido-reducción en los sustratos y la consecuente alcalinización del medio.

La disponibilidad de Cu y Mn (Figura 4.7) se rigió por el potencial redox, debido a las condiciones reductoras del sustrato y la saturación de humedad. En estas condiciones las formas iónicas de EPT no están disponibles. A pH >6, como en el sustrato Santa María, el Cu se precipita, la mayoría del Cu^{+2} es adsorbido por los óxidos de Fe y Mn, además de la materia orgánica con la cual se acompleja (Brennan *et al.*, 1983). La adsorción se incrementa en forma directamente proporcional al pH.

La baja disponibilidad de Cd en el sustrato Pal se puede deber también a las condiciones reductoras. En estas condiciones no aparece como Cd^{+2} sino Cd_s y se encuentra unido a sulfuro y asociado al Zn. En el sustrato Santa María estuvo disponible como Cd^{+2} en concentraciones semejantes, muy posiblemente por la formación de complejos iónicos solubles.

En la disponibilidad de los elementos también intervino la composición de los sustratos. La tierra de hoja actuó como biosorbente de Cu y Cd en los tratamientos Pal y Santa María, sin embargo, este comportamiento no fue generalizado para los EPT analizados. La adición de vermicompost modificó la disponibilidad de los éstos (Figura 4.2), lo que sugiere que la calidad y el grado de transformación de la enmienda orgánica es determinante para su reacción con los EPT y la solubilidad de los complejos orgánicos formados.

EPT en Planta

Es importante resaltar que las concentraciones de Zn, Mn y Pb encontradas en el tratamiento testigo son altas en comparación con las reportadas por Hussain-Koorimannil *et al.* (2010) para

Bacopa monnieri en suelos no contaminados. Podría indicar cierto grado de contaminación del suelo del testigo. Por otra parte, las concentraciones de Zn encontradas en planta en los sustratos Pal y Santa María confirman la preferencia que tienen las plantas en la absorción de este elemento en relación a otros (Kabata-Pendias, 2011) Debido a las importantes funciones que tiene este elemento en el funcionamiento enzimático de las plantas. Esto se explica porque el Zn fue el elemento con mayor biodisponibilidad en ambos residuos de mina (en el sustrato Pal es el segundo después del Fe) y es al que las plantas dan la preferencia en la absorción (Kabata-Pendias 2011).

La concentración de Mn en tejido tuvo fue proporcional a su disponibilidad en los tres sustratos: En el sustrato Santa María fue mayor en el tejido de la raíz. Por otra parte se observó un comportamiento sinérgico en la acumulación de Cu y Mn en la raíz ($r=0.67$), mientras que en el follaje este comportamiento fue opuesto ($r=-0.72$). Sunda y Huntsman (1983) reportaron un efecto competitivo entre estos iones en una planta acuática y lo explican por competencia por los sitios de enlace dentro de la célula. Tanto el Cu como el Mn son elementos esenciales para la planta, sin embargo, en altas concentraciones el Cu es más tóxico que el Mn (Mc Bride, 1994).

Por tanto, *B. monnieri* mostró una preferencia por la absorción de Mn comparado con Cu. La concentración de Cu en el follaje fue un factor importante en la disminución de la biomasa tanto en el tejido aéreo ($r=-0.55$) como en la raíz ($r=-0.48$). Se encontró una relación inversa entre la concentración de Mn y Cu en el follaje ($r=0.49$) y en raíz ($r=-0.68$). Este comportamiento fue muy similar en el sustrato Pal y el testigo. Como resultado de la exclusión de Mn, la absorción de Cu en la raíz aumentó.

La ausencia de Cd en el tejido de la planta en el tratamiento Pal puede explicarse por las condiciones reductoras del sustrato (Wahid *et al.*, 2009) en las que el Cd⁺² está poco disponible, lo cual se debe demostrar haciendo estudios de especiación en estas condiciones. En el sustrato Santa María, la mayor concentración de Cd en el follaje fue notable en la semana 12 (5 mg kg⁻¹), por debajo de los niveles considerados como fitotóxicos (30 mg kg⁻¹; Kabata-Pendias, 2011). Este comportamiento fue diferente al encontrado en otros estudios (Stroinski *et al.*, 1999; Mishra *et al.*, 2006; Shukla *et al.*, 2007; Stroinski *et al.* 1999). La acumulación de Cd en la raíz tuvo una relación directa con la acumulación de Cu (r=0.56). Fue notable la secuencia en la que se presentó la acumulación de EPT: Mn>Cu>Cd en la raíz (Figura 4.8), lo que corresponde a un comportamiento inverso a su toxicidad (McBride, 1994) y coincide con los resultados de Sinha (1999).

Además, conforme la concentración de estos elementos aumentó en la raíz, se translocó al follaje. Este comportamiento es una estrategia de tolerancia ante las condiciones de estrés causado por las altas concentraciones de EPT en el sustrato. Normalmente los iones de Cd son retenidos en las paredes celulares y las vacuolas de la exodermis en la raíz (Wahid *et al.*, 2009) aunque puede ser translocado al follaje en pequeñas concentraciones (Cataldo, 1981).

El Pb normalmente no es translocado al follaje, dada su alta toxicidad. La concentración de Pb en la raíz y el tiempo de exposición tuvieron una relación inversa (r=-0.52). No se encontró una relación directa entre la concentración de Pb en tejido de la raíz y las enzimas CAT y GR. Sin embargo la respuesta antioxidante causada por la condición de estrés para controlar el nivel y los efectos del daño celular mediante la limitación de las especies reactivas de oxígeno (ROS) se relacionan también con otras enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD) y la peroxidasa (POD) (Hall, 2002; Caregnato *et al.* (2008); o bien con la formación de una barrera

de protección por la misma planta en las paredes celulares de la raíz. Hay evidencias de que el Pb es retenido en el apoplasto de la raíz y es transportado en vesículas hasta el simplasto, en donde es introducida al plasmalema en vesículas dictiosómicas por un proceso de endocitosis y almacenado finalmente en las vacuolas de la raíz (Wierzbicka, 1995).

La acumulación de Pb en raíz mostró un comportamiento inverso o antagónico con el Cu. Durante el transcurso del experimento esta especie acumuló cantidades crecientes de Cu en la raíz, al mismo tiempo que disminuyó la concentración de Pb de manera gradual (Figura 4.8), este comportamiento coincide con lo descrito para otras especies (Kabata-Pendias, 2011). La concentración de Pb en el follaje mostró una relación directa con la concentración de Cu en la raíz ($r=0.63$).

La concentración de Pb en la raíz fue uno de los principales factores que afectó negativamente la producción de biomasa, particularmente de la raíz ($r=-0.67$). La disminución en la concentración de Pb en la raíz se vio reflejada en un mayor crecimiento de la planta, especialmente en el follaje (Figuras 4.8 y 4.9). En este caso, el Pb no tuvo un efecto sinérgico con la acumulación de Cd como lo mencionan Kabata y Pendias (2011); muy posiblemente por el estado reductor de los sustratos en condiciones de inundación, ya que en condiciones reductoras y alcalinas, tanto Cd como Pb se precipitan en formas no disponibles para las plantas (O'Sullivan, 1999).

Enzimas Antioxidantes

La respuesta enzimática de CAT y GR en *B. monnieri* en este experimento, se observa que esta respuesta tiene relación con dos factores de estrés principales: la concentración de oxígeno disuelto en el sustrato y las concentraciones de EPT. Los efectos de estos dos factores fueron más evidentes en la raíz. La respuesta enzimática a las condiciones de estrés por humedad fue

notable dado que fueron sometidos a las mismas condiciones de humedad. Dado que el comportamiento de la actividad de GR fue muy similar en los tres tratamientos, sugiere que la respuesta de la enzima al estrés fue causada por las condiciones de saturación de humedad en el sustrato, similar en todos los tratamientos. Este comportamiento es semejante al encontrado en *Oryza sativa* donde se documenta que el estrés causado por las condiciones de inundación y anoxia tiene una correlación importante con el comportamiento enzimático de GR y CAT (Ushimaru *et al.*, 1992). Se observó también que en la parte aérea, la actividad de la GR disminuyó durante las condiciones de estrés más intensas (semanas uno a la tres) (Figuras 4.9 y 4.10), que se sabe está relacionado con la reducción de glutatión y la producción de fitoquelatinas (Stroinski *et al.*, 1999 y Mishra *et al.*, 2006).

Después, la condición de estrés causado por la saturación de humedad se estabilizó (al menos el estrés que activa a la GR), lo que sugiere una capacidad importante de recuperación en la actividad enzimática de la GR en la parte aérea (Figura 4.10a). Es sabido que la actividad de GR se ve estimulada por la absorción de Pb dado que GR es un factor importante en la capacidad de desintoxicación de Pb en la raíz (Verma y Duby, 2003). Tanto la actividad de la GR como la acumulación de Pb llegan a la estabilidad (92-121 mg kg⁻¹) a partir de la semana tres (Figuras 4.9 y 4.10).

El Pb se translocó al follaje desde el inicio del experimento aunque en muy baja concentración (Figura 4.9). La acumulación de Pb en la parte aérea está relacionada con el incremento en la actividad de GR en esta parte de la planta. Una vez controlada la absorción y acumulación de Pb, tanto en la raíz como en el follaje, la entrada de Cd aumentó (Figura 4.9).

Esta capacidad de desintoxicación de *B. monnieri* es debida a que la GR ayuda a la conversión de Glutación oxidado (GSSG) a Glutación reducido (GSH) para el funcionamiento del ciclo ascorbato-glutación y la consecuente síntesis de fitoquelatinas, importantes en la inmovilización del Pb fuera de la raíz (Mishra *et al.*, 2006). El comportamiento de la GR en la raíz está relacionado negativamente con el comportamiento de la acumulación de Pb y Mn en el follaje ($r=-0.51$) (Figuras 4.9 y 4.10b). En resumen, la GR constituye un sistema importante de defensa en contra del efecto de oxidación y de intoxicación de la planta. La GR es una enzima antioxidante importante que existe en varias isoformas y que previene el daño oxidativo en las plantas ocasionado por varios tipos de estrés entre los cuales se encuentra también la toxicidad por Cd (Yanarelli *et al.*, 2007).

Se encontró una correlación negativa importante entre el comportamiento de la actividad de CAT del follaje y de la biomasa de la raíz ($r=-0.54$) y viceversa ($r=-0.59$), también entre la actividad de CAT con respecto al tiempo de exposición ($r=0.70$). Esto sugiere que la actividad de CAT en el follaje tuvo una participación para contrarrestar el efecto de oxidación producido por los EPT, especialmente Cd en la raíz ($r=0.46$), lo que permitió mantener de la producción de biomasa. También se observó que la actividad de la CAT en el follaje está relacionada con la acumulación de Mn en la raíz ($r=0.46$).

Es importante considerar que la CAT es una enzima ecoprotectora. Bajo la acción del factor de estrés, en este caso el Mn, se incrementó la actividad de esta enzima en el follaje, en el tratamiento Santa María. Este incremento, a través del mecanismo propio de la enzima, puede hacer que la planta produzca una reacción protectora al EPT que podría causarle toxicidad (Lin *et al.*, 2015). Con respecto al Pb, la CAT tuvo una relación directa, tanto en la raíz como en el follaje ($r=0.45$) (Figuras 4.9 y 4.11). Conforme disminuyó la concentración de Pb a lo largo del

tiempo la producción de CAT también se redujo (Figuras 4.9 y 4.11). No obstante el comportamiento encontrado en la CAT con respecto al Pb en la raíz concuerda con el reportado por Verma y Duby (2003).

Una prueba del estrés en *B. monnieri* por la acumulación de EPT es el comportamiento de los pigmentos fotosintéticos. La concentración de clorofila tuvo una respuesta al estrés por EPT que se evidenció por tener valores menores en el tratamiento Santa María que en el testigo. De la misma manera, la presencia de la clorofila b fue mayor en el testigo que en el tratamiento Santa María (Figura 4.11). La actividad fotosintética se afectó de manera significativa por la concentración de Cd en raíz ($r=-0.58$), por acumulación de Pb en raíz ($r=-0.55$) y en el follaje ($r=-0.53$), también por la acumulación de Cu en la raíz ($r=-0.53$). Por tanto estos son los tres elementos más tóxicos para *B. monnieri*. Sin embargo, esta especie no mostró un declive total en la actividad fotosintética, la cual aún se mantuvo en la semana 12.

Lo anterior apoya el hecho de que la actividad de la GR tiene una función importante en la producción de precursores de fitoquelatinas por la relación directa que tiene con la producción de clorofila total ($r=0.79$) y otros pigmentos ($r=0.62$). La sobrevivencia de las plantas en este experimento tuvo que ver más con las condiciones de pH y alcalinización de los sustratos. Las condiciones permanentes de saturación hídrica de los sustratos favorecieron un efecto corrosivo constante en la raíz y baja disponibilidad de oxígeno. Si estos sustratos se mantuviesen con niveles de humedad suficientes, pero no a saturación (en condiciones aerobias), sería posible mantener la vida de las plantas por más tiempo.

Posiblemente el uso de *Bacopa monnieri* sea más eficiente en el tratamiento de residuos de mina con una acidez moderada y niveles de humedad por debajo de la saturación, que permitan

condiciones aerobias permanentes. Es necesario y muy recomendable hacer un perfil completo del comportamiento de todas las enzimas antioxidantes que participan en los mecanismos de desintoxicación de *B. monnieri*. Entre las enzimas sugeridas están la superóxido dismutasa (SOD) y ascorbato peroxidasa (APX) además de los bacósidos como medio de soporte de la actividad antioxidante de esta especie ante el estrés por altas concentraciones de EPT (Mohan *et al.*, 2011).

Este perfil permitirá entender los mecanismos de adaptación y respuesta al estrés, para poder sustentar la potencialidad que tiene esta especie de emplearse en la fitorremediación. Con base en los estudios sobre la capacidad de acumulación de EPT de *B. monnieri* se puede confirmar que es posible usarla en la estabilización de EPT en suelos contaminados. También sería útil en humedales de flujo sub superficial para tratar efluentes a bajo costo. Estos resultados confirman la tolerancia que tiene *B. monnieri* a las altas concentraciones de EPT en los sustratos no oxidados y a su capacidad de sobrevivencia en los mismos en un corto plazo.

Esta especie puede ser útil en la estabilización de residuos de mina por períodos cortos (2 meses), si se somete a las plantas a condiciones de inundación intermitentes. Es posible que esta especie sobreviva más tiempo si se procuran las condiciones aerobias adecuadas en el sustrato. *B. monnieri* cuenta con mecanismos antioxidantes que le permiten retener Pb en la raíz y translocar Cu al follaje en concentraciones dentro de los límites fitotóxicos sin que se presenten síntomas de toxicidad en un tiempo de 9 semanas.

Conclusiones

Las plantas de *B. monnieri* pueden crecer en suelos con residuos de mina no oxidados, con altas concentraciones de Cu, Mn, Cd y Pb, al menos en un período de nueve semanas. El alto grado de acidez ($\text{pH} < 2$) y la concentración de EPT en el sustrato Pal destruyeron el sistema de raíces de la planta, después de la tercera semana, aunque este período fue suficiente para que la planta acumulara Pb en la raíz dentro de los límites fitotóxicos. Se confirma que *B. monnieri* es una planta acumuladora de varios EPT, que por sus niveles de tolerancia puede ser empleada en la estabilización o revegetación de sistemas de humedales en condiciones de saturación de humedad intermitentes. Además *B. monnieri* demostró su capacidad de desintoxicación de Pb en la raíz a lo largo de nueve semanas y la capacidad de translocarlo al follaje dentro de niveles fitotóxicos, sin presentar síntomas de toxicidad.

Literatura citada

- Aebi H. 1984. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* 105: 121-126.
- APHA–AWWA–WPCF. 2000. Standard methods for the examination of water and wastewater. 20th ed. APHA/AWWA/Water Environment Federation. Washington, DC.
- Bailey S. 1986. The analysis of agricultural materials. 3rd ed. Reference book 427. Her Majesty's Stationery Office. London. p. 210-212.
- Barbafieri M, Dadea C, Tassi E, Bretzel F, Fanfani L. 2011. Uptake of heavy metals by native species growing in a mining area in Sardinia, Italy: discovering native flora for phytoremediation. *International journal of Phytoremediation* 13(10): 985-997.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annals of Biochemistry* 72: 248-254.
- Bremner JM 1965. Total nitrogen. En: Black CA (Ed). *Methods of Soil Analysis. Part 2.* American Society of Agronomy Madison, WI. pp 1149–1178.

- Brennan RF, Robson AD, Gartrell JW. 1983. Reactions of copper with soil affecting its availability to plants. II. Effect of soil pH, soil sterilization and organic matter on the availability of applied copper. *Australian Journal of Soil Research* 21(2): 155–163.
- Caregnato FF, Koller CE, Macfarlane GR, Moreira JCF 2008. The glutathione antioxidant system as a biomarker suite for the assessment of heavy metal exposure and effect in the grey mangrove, (Forsk.) *Vierh. Mar Pollut Bulletin*
- Carmona-Chit E, Carrillo-González R, González-Chávez MCA, Vibrans H, Yañez-Espinosa L, Delgado-Alvarado A. 2016. Riparian plants on mine runoff in Zimapán, Hidalgo, Mexico: Useful for phytoremediation? *International Journal of Phytoremediation* 18(9): 861–868.
- Cataldo DA. 1981. Cadmium uptake kinetics in intact soybean plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 73: 844–848.
- Cervantes-Adame YF, Acosta-Durán CM, Villegas-Torres OG. 2011. Sustratos para la propagación por esqueje de *Bacopa monnieri*. *Investigación Agropecuaria* 8(1): 51–61.
- Chandra P, Sinha S, Rai UN, Kruger EL, Anderson TA, Coats JR. 1997. Bioremediation of chromium from water and soil by vascular aquatic plants. En: *Phytoremediation of Soil and Water Contaminants*. American Chemical Society. Washington USA. pp. 274–282.
- Cheng S. 2003. Effects of heavy metals on plants and resistance mechanisms. *Environmental Science and Pollution Research* 10(4): 256–264.
- Conesa HM, Faz Á, Arnaldos, R. 2006. Heavy metal accumulation and tolerance in plants from mine tailings of the semiarid Cartagena–La Unión mining district (SE Spain). *Science of the Total Environment* 366(1): 1–11.
- Ernst WHO, Krauss GJ, Verkleij JAC, Wesenberg D. 2008. Interaction of heavy metals with the sulphur metabolism in angiosperms from an ecological point of view. *Plant Cell and Environment* 31: 123–143.
- Farrag K, Senesi N, Nigro F, Petrozza A, Parma A, Shaarawi S, Brunetti G. 2012. Growth responses of crop and weed species to heavy metals in pot and field experiments. *Environmental Science and Pollution Research* 19(8): 3636–3644.
- Fellet G, Marchiol L, Perosa D, Zerbi G. 2007. The application of phytoremediation technology in a soil contaminated by pyrite cinders. *Ecological Engineering* 31(3): 207–214.
- Feng XH, Zhai LM, Tan WF, Liu F, He JZ. 2007. Adsorption and redox reactions of heavy metals on synthesized Mn oxide minerals. *Environmental Pollution* 147(2): 366–373.
- Franco-Hernandez MO, Vásquez-Murrieta MS, Patiño-Siciliano A, Dendooven L. 2010. Heavy metals concentration in plants growing on mine tailings in Central Mexico. *Bioresource technology* 101(11): 3864–3869.

- Guala SD, Vega FA, Covelo EF. 2010. The dynamics of heavy metals in plant–soil interactions. *Ecological Modelling* 221(8): 1148-1152.
- Gupta M, Sinha S, Chandra P. 1994. Uptake and toxicity of metals in *Scirpus lacustris* L. and *Bacopa monnieri* L. *Journal of Environmental Science and Health. Part A. Environmental Science and Engineering* 29 (10): 2185-2202.
- Hall JL. 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany* 53: 1-12.
- Hussain K, Abdussalam AK, Ratheesh CP, Salim N. 2011. Heavy metal accumulation potential and medicinal property of *Bacopa monnieri* a paradox. *Journal of Stress Physiology and Biochemistry* 7(4): 39-50.
- Hussain-Koorimannil A, Abdussalam AK, Rateesh-Chandra P, Nabeesa-Salim. 2010. Bioaccumulation of heavy metals in *Bacopa monnieri* (L.) Pennell growing under different habitat. *International Journal of Ecology and Development* 15: 67-73.
- Jiménez A, Hernández JA, Sevilla F. 1997. Evidence of the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea (*Pisum sativum* L.) leaves. *Plant Physiology* 114: 275-284.
- Kabata-Pendias A. 2011. Trace elements in soils and plants. 4th ed.: CRC Press. Boca Raton FL. 505 pp.
- Klute A. 1986. Water retention: Laboratory methods. En: *Methods of Soil Analysis. Series Agronomy N° 9 Part I: Physical and Mineralogical Methods*. American Society of Agronomy. 2nd Ed. Madison, WI pp. 635-662.
- Lichtenthaler, HK. 1987. Chlorophyll and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* 148: 350-382.
- Lindsay WL, Norvell WA. 1978. Development of a DTPA soil for zinc, iron, manganese and copper. *Soil Science Society American Journal* 42: 421-428.
- Manara A. 2012. Plant responses to heavy metal toxicity. En: Manara A. (Ed.) *Plants and Heavy Metals*. Springer. Ciudad? pp 23-57.
- McBride MB. 1994. *Environmental Chemistry of Soils*. Oxford University Press. New York, NY. 406 p.
- Mishra S, Srivastava S, Tripathi RD, Govindrajan R, Kuriakose SV, Prasad MNV. 2006. Phytochelatin synthesis and response to antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri* L. *Plant Physiology and Biochemistry* 44: 25–37.
- Mohan N, Jassal PS, Kumar V, Singh RP. 2011. Comparative In vitro and In vivo study of antioxidants and phytochemical content in *Bacopa monnieri*. *Recent Research in Science and Technology* 3(9): 78-83.

- Montesano F, Parente A, Santamaria P. 2010. Closed cycle subirrigation with low concentration nutrient solution can be used for soilless tomato production in saline conditions. *Scientia Horticulturae* 124(3): 338-344.
- Murshed M, Rockstraw DA, Hanson AT, Johnson M. 2003. Rapid oxidation of sulfide mine tailings by reaction with potassium ferrate. *Environmental Pollution* 125(2): 245–253.
- Nagjaiyoti PC, Lee KD, Sreekanth TVM. 2010. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: A review. *Environmental Chemistry Letters* 8(3): 199-216.
- Norma Oficial Mexicana NOM 147-SEMARNAT/SSA1-2004. Diario Oficial de la Federación. March 2, 2007. 2nd Sect.: Gobierno Federal. Mexico DF.
- O'Sullivan AD, McCabe OM, Murray DA, Otte ML. 1999. Wetlands for rehabilitation of metal mine wastes. *Biology and Environment: Proceedings of the Royal Irish Academy* 1: 11-17.
- Pierce SC, Pezeshki SR, Larsen D, Moore MT. 2009. Hydrology and species-specific effects of *Bacopa monnieri* and *Leersia oryzoides* on soil and water chemistry. *Ecohydrology* 2(3): 279-286.
- Rai UN, Sinha S, Tripathi RD, Chandra P. 1995. Wastewater treatability potential of some aquatic macrophytes. Removal of heavy metals. *Ecological Engineering* 5(1): 5-12.
- Richards LA. (Ed.) 1954. Diagnosis and improvement of saline and alkali soils. U.S. Dep. Agric. Handb. No. 60.
- Rowell DL. 1994. Soil Science: Methods and applications. New York USA: Routledge. 345 pp.
- Romero-Puertas MC, Corpas FJ, Rodríguez-Serrano M, Gómez M, Luis A, Sandalio LM. 2007. Differential expression and regulation of antioxidative enzymes by cadmium in pea plants. *Journal of Plant Physiology* 164(10): 1346-1357.
- Shukla OP, Dubey S, Rai UN. 2007. Preferential accumulation of cadmium and chromium: toxicity in *Bacopa monnieri* L. under mixed metal treatments. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 78(3-4): 252-257.
- Siedlecka A. 2014. Some aspects of interactions between heavy metals and plant mineral nutrients. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 64(3): 265-272.
- Sinha S. 1999. Accumulation of Cu, Cd, Cr, Mn and Pb from artificially contaminated soil by *Bacopa monnieri*. *Environmental Monitoring and Assessment* 57: 253-264.
- Sinha S, Gupta M, Chandra P. 1996. Bioaccumulation and biochemical effect of mercury in the plant *Bacopa monnieri* (L). *Environmental Toxicology and Water Quality* 11(2): 105-112.
- Sinha, S, Chandra, P. 1990. Removal of Cu and Cd from water by *Bacopa monnieri* L. *Water, Air and Soil Pollution* 51(3-4): 271-276.

- Sinha S, Saxena R, Singh S. 2002. Comparative studies on accumulation of Cr from metal solution and tannery effluent under repeated metal exposure by aquatic plants: Its toxic effects. *Environmental Monitoring and Assessment* 80(1): 17-31.
- Sinha S, Rai UN, Tripathi RD, Chandra P. 1993. Chromium and manganese uptake by *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle: Amelioration of chromium toxicity by manganese. *Journal of Environmental Science and Health. Part A.* 28(7): 1545-1552.
- Stroinski A. 1999. Some physiological and biochemical aspects of plant resistance to cadmium effect. I. Antioxidative system. *Acta Physiologiae Plantarum* 21: 175–188.
- Stumm W, Morgan JJ. 1981. *Aquatic Chemistry*. Wiley 2nd ed. New York, NY.
- Sunda WG, Huntsman, SA. 1983. Effect of competitive interactions between manganese and copper on cellular manganese and growth in estuarine and oceanic species of the diatom *Thalassiosira*. *Limnology and Oceanography* 28(5): 924–934.
- US Environmental Protection Agency (USEPA). 1992. Method 3050A: Acid digestion of sediments, sludge and soils.: US Government Printing Office. Washington, DC.
- Ushimaru T, Shibasaka M, Tsuji H. 1992. Development of the-detoxification system during adaptation to air of submerged rice seedlings. *Plant and Cell Physiology* 33(8): 1065-1071.
- [Vajpayee P.](#) [Rai UN,](#) [Sinha S,](#) [Chandra P.](#) 1995. Bioremediation of tannery effluent by aquatic macrophytes. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 55(4): 546-553.
- Verma S, Dubey RS. 2003. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Science* 164: 645-655.
- Wierzbicka, M. 1995. How lead loses its toxicity to plants. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 64(1): 81-90.
- Wright DJ, Otte ML. 1999. Wetland plant effects on the biogeochemistry of metals beyond the rhizosphere. En: *Biology and Environment: Proceedings of the Royal Irish Academy* 1: 3-10.
- Yadav SK. 2010. Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *South African Journal of Botany* 76(2): 167-179.
- Yannarelli GG, Fernández-Álvarez AJ, Santa-Cruz DM, Tomaro ML. 2007. Glutathione reductase activity and isoforms in leaves and roots of wheat plants subjected to cadmium stress. *Phytochemistry* 68: 505-512.

DISCUSIÓN GENERAL

La contaminación del suelo producto de las actividades mineras en Zimapán, Hidalgo, como en otras regiones mineras de México, es motivo de preocupación. Es evidente que en la actualidad el manejo de desechos mineros es inadecuado y constituye un riesgo de exposición. Las medidas tomadas hasta el momento son insuficientes, como lo demuestran las altas concentraciones de EPT en los suelos circundantes a los depósitos de residuos. Es necesario tomar acciones para mitigar sus efectos sobre los componentes de los sistemas como el suelo y agua superficial y las cadenas tróficas.

Las plantas que crecen alrededor de los residuos de minas, pueden ser una vía de entrada a la cadena trófica (González y González-Chávez, 2006) o bien un medio para inmovilizar los contaminantes, por ello es importante entender sus funciones en las comunidades. Las plantas de ribera en especial son muy importantes, por encontrarse en una zona de confinamiento de contaminantes. El desarrollo de tecnologías limpias (como la fitorremediación) en México, implica como primer paso, contar con información sobre una amplia gama de especies que puedan adaptarse a diferentes condiciones de humedad; concentración de elementos potencialmente tóxicos, varios hábitats; requerimientos de nutrimentos; condiciones diversas de acidez o alcalinidad y de oxidación, entre otras.

La manera más sencilla y económica de encontrar especies adaptadas a estos sitios contaminados es la exploración, prospección y conocimiento de las comunidades vegetales asociadas a los residuos de mina, de modo que se aproveche la selección que el medio ha ejercido sobre las plantas colonizadoras de estos sitios contaminados y se ahorre tiempo y dinero. En el caso estudiado, se encontró que las comunidades ribereñas asociadas al río Santiago no son poco diversas como los confirman los índices de Shannon y Simpson. Dentro de los factores

edáficos, el pH y el contenido de materia orgánica son los factores que mayor influencia tienen sobre la disponibilidad de EPT.

Esta afirmación se basa en las correlaciones observadas entre ellos. La acidez y el contenido de materia orgánica del suelo afectan la composición y abundancia de las comunidades riparias, la dominancia de las especies y su diversidad. La acidez puede reducirse exitosamente con fuentes de alcalinidad y las enmiendas pueden abatir la actividad de los iones de algunos elementos. Aunque, se debe considerar la acidez potencial para programar la incorporación de las enmiendas. Se encontró que las comunidades están formadas por ecotipos de especies frecuentes en sitios perturbados, algunos de ellos con alta capacidad de tolerancia a los tóxicos.

Esto significa que muchas de las especies de las comunidades locales están adaptadas a las altas concentraciones de EPT y desarrollaron la capacidad de absorber estos elementos: Algunas podrían ser consideradas como hiperacumuladoras de Zn o Cu, lo cual debe confirmarse con estudios posteriores. Se identificaron 47 especies vegetales de las cuales *S. irio*, *P. major*, *P. punctatum*, *F. trinervia*, *D. minutifolia*, *R. nasturtium-aquaticum* y *C. diffusa* pueden absorber concentraciones anormales de Cd. Otras como *P. punctatum*, *B. monnieri*, *L. peploides*, *A. repens* y *F. trinervia*, estabilizaron Pb.

Las comunidades muestreadas también son afectadas por otro tipo de estrés, causado por la fluctuación en los niveles de inundación del río y arrastre de sedimentos. Estos procesos provocan cambios constantes en las condiciones de óxido-reducción del suelo y como consecuencia, en las formas en las que se encuentran estos EPT y su disponibilidad para las plantas. También influyen en el ambiente, en la riqueza y el valor que tienen los ecotipos locales, respecto a su plasticidad adaptativa.

El uso potencial de las especies vegetales de estas comunidades radica en que algunas de ellos se pueden usar para desarrollar tecnologías diversas como la construcción de humedales y otros tratamientos pasivos de residuos de mina y sus lixiviados.

El establecimiento de sistemas de fitorremediación es un campo interdisciplinario que exige el dominio de muy diversos campos de conocimiento. En especial es necesario conocer los mecanismos fisiológicos a través de los cuales una especie puede adaptarse a altas concentraciones de EPT en el suelo. *Bacopa monnieri*, puede emplearse como modelo para evaluar la respuesta de las plantas anfibias a la perturbación causada por los contaminantes derivados de la minería. Esta especie se estableció en sustratos contaminados por varios EPT, lo que demuestra que se puede usar en la fitorremediación.

Algunas de las variables bioquímicas de las plantas (actividad de ciertas enzimas como la catalasa y glutatión reductasa o de pigmentos fotosintéticos) pueden usarse para detectar cambios fisiológicos en la planta, aun cuando no se observen otras alteraciones visuales. Sin embargo, otros factores ambientales (como sequia o temperatura) tienen fuerte efecto en las variables bioquímicas. Esto reduce su confiabilidad como variables indicadoras de los efectos tóxicos de los contaminantes, por lo que su interpretación debe estar asociada a otras variables.

CONCLUSIONES GENERALES

1. Los factores edáficos que más influyen en diversidad de las comunidades vegetales son pH y el contenido de materia orgánica. Ambos afectan la composición y abundancia de las comunidades riparias, la dominancia de las especies y su diversidad. A la vez, las plantas modifican su rizósfera para mejorar las condiciones de crecimiento. Por tanto, se rechaza la hipótesis de que la concentración de EPT es el factor más limitante la diversidad de las comunidades vegetales riparias.

2. *Bacopa monnieri* es una especie tolerante a altas concentraciones de varios EPT; los niveles de tolerancia varían de un elemento a otro. Por tanto se acepta la hipótesis de que las plantas de *B. monnieri* pueden crecer en suelos con residuos mineros. Por sus niveles de tolerancia puede ser empleada en la estabilización de EPT en sistemas de tratamiento pasivo de residuos de mina en humedales.

RECOMENDACIONES

1. Se recomienda continuar con la prospección de otras especies presentes en la corriente del Río Santiago no analizadas en este estudio, para su uso en fitorremediación.

2. Se requiere un estudio más detallado de la variación de las comunidades vegetales en función de la frecuencia e intensidad de los períodos de inundación y cambios en el cauce del río, para conocer cómo influyen en la proporción de especies por cada hábitat de la zona riparia.

3. Se recomienda hacer un estudio más detallado de las condiciones de humedad, pH y Eh, óptimas para la mayor eficiencia de plantas anfíbias en el tratamiento pasivo de residuos de mina.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Carrillo-González R. 2005. Niveles de contaminación de los suelos y las plantas. En: González-Chávez MC, Pérez Moreno J, Carrillo-González R. (eds.) 2005. El Sistema Planta-Microrganismo-Suelo en Áreas Contaminadas con Residuos de Minas. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México. pp. 34-60.
- Guillizoni P. 1991. The role of heavy metals and toxic materials in the physiological ecology of submerged macrophytes. *Aquatic Botany* 4: 87–109.
- González-Chávez, MCA. Recuperación de suelos contaminados con metales pesados utilizando plantas y microorganismos rizosféricos. *Terra Latinoamericana*. 23:29-37.
- Barrutia O, Artetxe U, Hernández A, Olano JM, García-Plazaola I, Garbisu C, Becerril JM. 2011. Native plant communities in an abandoned Pb-Zn mining area of Northern Spain: Implications for phytoremediation and germplasm preservation. *International Journal of Phytoremediation* 13(3): 256-270.
- González R, González-Chávez MCA. 2006. Metal accumulation in wild plants surrounding mining wastes. *Environmental Pollution* 144: 84-92.
- Yarto M. 2005. Los efectos de la contaminación: el caso de las sustancias tóxicas persistentes. En: Sánchez O, Peters E, Márquez Huitzil R, Vega E, Azuara D. (Eds). *Temas sobre Restauración Ecológica*. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología. U.S. Fish and Wildlife Service y Unidos para la Conservación A.C. México D.F. pp. 231-244.
- Whitehead, P. G., Cosby, B. J., Prior, H. 2005. The Wheal Jane wetlands model for bioremediation of acid mine drainage. *Science of the Total Environment* 338: 125–135.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.09.012>

ANEXO I. UTILIDAD DE *Bacopa monnieri* EN LA FITORREMEDIACIÓN DE RESIDUOS DE MINA

Resumen

Los residuos de mina están formados por minerales molidos mucho de los cuales son reactivos, como los sulfuros. Los sulfuros expuestos a la intemperie pueden formar compuestos con reacción ácida, los cuales causan los drenajes ácidos de minas (DAM). Las técnicas más efectivas para mitigar el efecto corrosivo de los DAM son los métodos de neutralización internos, las cubiertas de agua y la construcción de sistemas de transformación biológica natural entre los que se encuentran los humedales. Es necesario desarrollar investigaciones enfocadas en la optimización de estos sistemas ya que las experiencias en México son muy escasas. En este estudio se evaluó la adición de Ca(OH)_2 para la neutralización de residuos de mina ácidos, y de vermicompost como enmienda para controlar la acidez y estabilizar los EPT extractables. El establecimiento de *B. monnieri* en condiciones aerobias se usó como medida indicadora de mejoría en las condiciones del sustrato. La adición de Ca(OH)_2 y vermicompost es un medio efectivo de neutralización para evitar la formación de DAM. *Bacopa monnieri* es una planta útil en la fitorremediación de residuos ácidos mineros en tratamientos pasivos que han pasado por un proceso de neutralización.

Palabras clave: enmiendas, metales pesados, fitorremediación, lixiviados ácidos

Abstract

Mine tailings are grinded rocks. Reactive minerals could form new minerals by weathering process. Sulfides are the most commonly exposed minerals generating so-called acid mine drains (AMD). The most effective techniques to mitigate the contaminating effect caused by AMD are the internal neutralization methods, water decks and built systems for natural biological transformation such as wetlands. Wetlands are passive systems which provide ecosystem services and can be built as clean technologies. It is necessary to develop research focused on the optimization of these systems since the experiences in Mexico are very scarce. In this study, different concentrations of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ were tested as liming treatment to acidic mineral residues, and vermicompost was used for stabilize extractable PTE. The establishment of *Bacopa monnieri* was also tested in aerobic wetland conditions as a measure of phytoremediation. It was confirmed that the addition of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ and vermicompost is an effective means of neutralization to avoid the formation of AMD. *Bacopa monnieri* is a useful plant in the phytoremediation of mineral acid residues in passive treatments that have gone through a process of neutralization.

Key words: amendments, heavy metals, phytoremediation, acid leaching

Introducción

Las actividades mineras en México han tenido una importancia económica histórica desde tiempos de la colonia (Bakewell, 1984). Los beneficios económicos de la productividad de EPT del país se reflejan en un grupo reducido de la población. No obstante estas actividades causan impactos cuya magnitud y permanencia en el ambiente son considerables ya que, cuando las minas son abandonadas, los problemas de contaminación quedan como un legado de miseria por generaciones.

En México se encuentran muchas de minas tanto activas como inactivas, cuyos residuos están expuestos al aire libre sin tratamiento alguno (SEMARNAT, 2012), a expensas de la acción del viento y el agua, lo que aumenta su peligrosidad (Candeias *et al.*, 2014). Los procesos mineros alteran las condiciones geológicas estables de un lugar y propician la oxidación de minerales que estaban en estado reducido en el subsuelo (Mascaro *et al.*, 2002). Los subproductos o residuos generados durante el tratamiento generan un problema, tanto por su volumen como por su naturaleza química más reactiva (Castillo, 2013).

Los sulfuros son los minerales que más comúnmente quedan expuestos a la acción del oxígeno atmosférico y el agua (Mascaro *et al.*, 2002). Al oxidarse estos minerales generan sulfatos que pueden tener reacción ácida, generando los llamados drenajes ácidos de minas (DAM; Gray 1998). Los DAM son una de las fuentes principales de contaminación de las aguas superficiales y subterráneas (Filipek *et al.* 1987; Gray 1998; Gutiérrez-Ruiz, 2007; Corrales-Pérez 2013). Sus efectos pueden persistir por décadas y aún cientos de años. Dado que es un problema de carácter mundial, es necesario prevenir su formación y aplicar el tratamiento más adecuado una vez formados (Aduvire, 2006).

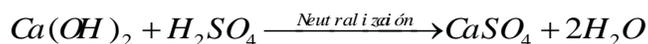
Los residuos cuyo componente principal es la pirita (FeS; 1%) o arsenopirita (Morales, 2003) tienen reacción ácida si reaccionan con el oxígeno atmosférico y el agua, los cuales pueden promover la liberación de EPT (Candeias *et al.*, 2014) y As. La oxidación de una tonelada de pirita produce casi una tonelada de hidróxido férrico y cerca de una tonelada y media de ácido sulfúrico (Aduvire, 2006). Los DAM se caracterizan por bajo pH y altas concentraciones de EPT. Son el producto de la exposición de los residuos de minas que contienen sulfuros al oxígeno y al agua (Candeias *et al.*, 2014).

Se ha descubierto que la eliminación de alguno de estos dos elementos reduce el proceso de formación de aguas ácidas, criterio que se emplea para tratar los DAM. La filosofía general de los tratamientos pasivos se basa en procesos físicos, químicos y biológicos que ayudan a cambiar las condiciones de Eh y pH de las aguas ácidas de mina, de forma que favorezcan las especies insolubles que precipitan como oxihidróxidos metálicos. El manejo adecuado de los DAM puede reducir el impacto sobre el ambiente a niveles que puedan ser tolerados por éste sin causarle un daño significativo (Whitehead *et al.*, 2005).

Las técnicas más efectivas para mitigar los DAM son los métodos de neutralización internos, las cubiertas de agua y los procesos de biodegradación biológica natural (Akcil y Koldas, 2006), todos ellos métodos de tratamiento pasivo. Estos métodos van desde los humedales construidos (aerobios y anaerobios), los drenajes anóxicos, las balsas orgánicas y los sistemas de producción alcalina, hasta las barreras reactivas permeables. Estos sistemas operan solos o combinados según las características del DAM y de los requerimientos del tratamiento (Whitehead *et al.*, 2005).

En todos ellos los beneficios son: la neutralización de la acidez, la precipitación de los EPT y la eliminación de sólidos en suspensión. Los tratamientos inicialmente empleados para la neutralización de los DAM incluyen la adición de materiales alcalinos para alcanzar un pH por encima de los requerimientos de las bacterias oxidantes de hierro (neutralización). Se emplean como fuentes de alcalinidad las calizas, la cal hidratada, la ceniza, la sosa cáustica, el amonio, el peróxido de calcio, y las cenizas volcánicas. Antes de la neutralización es necesario estimar la capacidad máxima de generación ácida, la cual comienza con el análisis del contenido total de sulfuros, sulfatos y azufre orgánico (azufre total).

González (2008) encontró que la concentración de sulfatos en DAM en diversos residuos ácidos de mina osciló entre los 2100 a 4200 mg kg⁻¹ de sulfatos. Para neutralizar estas concentraciones de azufre se requiere aplicar 62.5 kg de cal viva por tonelada de roca ácida. En el proceso de neutralización a partir de Ca(OH)₂ o cal apagada sucede la siguiente reacción:



Si el pH se incrementa por arriba de la neutralidad decrece la solubilidad de los EPT y éstos se precipitarán en forma de hidróxidos, pero la disponibilidad de nutrientes para las plantas puede decaer mucho. Durante la neutralización, la efectividad de la mezcla depende de la minuciosidad del mezclado, el movimiento del agua a través del sistema, la naturaleza de contacto de la roca o agua ácida con los aditivos neutralizantes o agua, la proporción de material neutro en exceso y finalmente el tipo y pureza del aditivo neutralizante. Para demostrar la efectividad de la mezcla se requieren de exhaustivas pruebas de laboratorio (Aduvire, 2006).

En los humedales aerobios artificiales se pretende reproducir los procesos de los humedales naturales (pantanos, marismas, turberas etc.) creando un ambiente propicio para el desarrollo de ciertas plantas que, junto con microorganismos, participan en la depuración del agua. Los humedales aerobios ocupan grandes superficies y tienen una somera lámina de agua (menos de 30 cm) que inunda el sustrato donde se desarrolla la vegetación (Johnson y Hallberg, 2005). El principio de funcionamiento es prevenir la formación de DAM mediante la saturación de agua para reducir la penetración de oxígeno atmosférico, creando un ambiente anóxico.

No obstante estos sistemas favorecen el contacto entre el agua contaminada y el aire atmosférico mediante el empleo de plantas acuáticas que liberan oxígeno por sus raíces y rizomas (Johnson y Hallberg, 2005). Estas plantas emergentes pueden transferir hasta 45 g O₂ /día a través de sus raíces y crear una zona aerobia en el sustrato del humedal en donde se produce la oxidación y precipitación de EPT. A su vez, la capa orgánica con plantas sobre los residuos de mina consume oxígeno a través de las raíces de las plantas por los procesos de respiración (Prasad, 2007). El tiempo de retención debe ser el suficiente para completar los lentos procesos de depuración del agua.

En estos sistemas se emplean especies de macrofitas con habilidad para sobrevivir en condiciones adversas con altas tasas de colonización (Brix, 1994). Las macrofitas enraizadas tienen una función importante en los procesos de intercambio. Estas plantas toman rápidamente los EPT en su forma reducida a partir de los sedimentos, en situaciones anaeróbicas. Luego los oxidan en los tejidos de las plantas haciéndolos inmóviles y concentrándolos en gran medida.

De esta forma reducen la movilidad de los EPT, estabilizándolos en sus raíces. La fitoestabilización sobre los residuos de mina cubiertos con agua puede reducir la penetración de

oxígeno en los residuos de minas y prevenir la liberación de elevados niveles de EPT en los alrededores (Prasad, 2007). Sin embargo, para favorecer el establecimiento de plantas fitorremediadoras en este tipo de residuos es necesario mantener el pH dentro de un intervalo ligeramente ácido (debajo de la neutralidad) para asegurar la sobrevivencia de las plantas y la disponibilidad tanto de nutrimentos como de cationes divalentes para las plantas.

Los sistemas pasivos son tecnologías limpias y eficaces en el control de la contaminación de efluentes provenientes de residuos de minas. Por su gran aplicabilidad, es necesario desarrollar investigaciones enfocadas en la optimización del funcionamiento de estos sistemas (López-Pamo *et al.*, 2002), ya que las experiencias en México son muy escasas. En especial, es necesaria la realización de experiencias piloto que puedan dar lugar a tecnologías emergentes. El desarrollo de los sistemas pasivos de aguas ácidas es apremiante en México si se consideran las grandes extensiones, y el número de residuos de mina abandonados donde se desarrollaron actividades extractivas.

En el caso de los sistemas pasivos de tratamiento, especialmente el uso de humedales, son muy pocos los trabajos de investigación realizados. Especialmente los relativos al establecimiento de especies vegetales que han sido probadas en el tratamiento o prevención de los DAM, ya que la mayor actividad biológica en la reducción de EPT proviene de la comunidad bacteriana. En este estudio se plantea una nueva modalidad de tratamiento pasivo de residuos ácidos de mina. Se probaron diferentes concentraciones de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ para la neutralización de residuos de minas ácidos, la adición de vermicompost como enmienda para la estabilización de EPT extractables y el control de la acidez. Así mismo se probó el establecimiento de *B. monnieri* en condiciones anaerobias de humedal como medida de fitorremediación.

Materiales y Métodos

El experimento que aquí se plantea, es complemento del experimento realizado en el capítulo 4. El objetivo fue evaluar el establecimiento de *B. monnieri* en los residuos de minas, así que se siguieron los mismos procedimientos en la preparación de sustratos. Previo al establecimiento de la planta, se probó una técnica para neutralizar la acidez de los residuos Pal que facilitara el establecimiento de las plantas.

Neutralización del Sustrato

Dado el grado de acidez de los residuos de mina (pH =2.4) se probó la neutralización de la acidez con Ca(OH)₂. Considerando que la acidez es derivada de la oxidación de los sulfuros se acepta que la actividad de los iones hidronio depende de la cantidad de sulfuros de acuerdo a la siguiente reacción:



Tomando como base la presencia de FeS en 1% en los residuos ácidos de mina con alto grado de oxidación (Morales, 2003) se calculó la concentración esperada de S en 100 g de residuos de mina como sigue:

$$\begin{aligned} 1 \text{ mol FeS} &= 87.847 \text{ g} && \text{de los cuales: } && 55.847\text{g Fe} \\ &&& && 32 \text{ g S} \\ \text{Si los DAM contienen 1 \% pirita entonces } &1 \text{ g FeS} &= &0.011 \text{ mol FeS} \\ &&& &= &0.011 \text{ mol S} \\ &&& &= &0.352 \text{ g S en 100 g de residuos mineros} \\ &&& &= &35200 \text{ mg S/kg suelo} \end{aligned}$$

A partir de estos resultados se probaron cinco tratamientos para comprobar el efecto de neutralización de diferentes concentraciones de Ca(OH)₂ sobre el sustrato Pal (Tabla A.1).

Tabla A.1. Proporción de Ca(OH)_2 requeridos para la neutralización del residuo Pal

Tratamiento	Moles Ca(OH)_2	mg Ca(OH)_2 / kg jal	Moles de S a neutralizar	S neutralizado (mg kg^{-1})
Testigo	0	0	0	0
1	0.00625	4620	0.00625	2000
2	0.0075	5550	0.0075	2400
3	0.00875	6475	0.00875	2800
4	0.010	7400	0.010	3200
5	0.01125	8300	0.01125	3600

Se pesaron 6 kg del residuo de mina, los cuales se cribaron por un tamiz de 2 mm para uniformar el tamaño de partícula. Se agregó vermicompost como enmienda en proporción 1:0.2. El vermicompost se cribó previamente con tamiz de 0.38 mm. De esta mezcla se pesaron porciones de 1 kg a los cuales se agregó Ca(OH)_2 como se indica en la Tabla A.1. Nuevamente se homogeneizó cada una de las mezclas. Se vació cada sustrato en recipientes extendidos y se agregó agua potable en equivalente a 20% de la capacidad de campo alternando cuatro ciclos de humedad-sequedad. Se midió el pH y CE a los 1, 2, 6 y 20 días de tratamiento. Se empleó un tratamiento testigo (ver Capítulo IV).

Se graficó la variación del pH con respecto al tiempo y con respecto a la concentración de Ca(OH)_2 en cada tratamiento. Una vez evaluada la estabilización de los sustratos se eligió el tratamiento que mostró la neutralización más efectiva para la instalación de las plantas.

EPT en Planta

Pasadas ocho semanas se cuantificó la concentración de EPT (Cu, Mn, Cd Pb, Ni y Zn) en la raíz y parte aérea de la planta. Las muestras de tejido vegetal se secaron a 60°C en una estufa de aire forzado por 48 h y se molieron en un molino de acero inoxidable. Se analizó la concentración total de Cu, Mn, Cd y Pb después de su mineralización por digestión ácida en una mezcla de $\text{HClO}_4\text{-H}_2\text{SO}_4\text{-H}_2\text{O}_2$ (4:1:1 v/v). Para lo cual se pesaron 500 mg de muestra seca, se

dejaron en pre digestión por 24 h con la mezcla ácida y después se calentaron a 120 °C hasta que la solución mostró una apariencia clara. Cada muestra se diluyó con agua desionizada, se aforó a 25 mL y se filtró con papel Whatman 42. Cada muestra se hizo por triplicado incluyendo un blanco como control. Se determinó la concentración de EPT por espectrometría de absorción atómica (Perkin Elmer 3110®). Después de las ocho semanas del experimento se estimó nuevamente la concentración extractable (DTPA-TEA-CaCl₂; Lindsay, 1978) de EPT en los residuos de mina.

Diseño Experimental y Análisis Estadístico

Se estableció un experimento en un diseño completamente al azar. Al final del experimento se hizo un análisis de varianza (ANDEVA) mediante el programa estadístico SAS 9.0.

Resultados

Características del Sustrato

Inicialmente el sustrato Pal presentaba una elevada acidez, alto contenido de arcillas, pobre contenido de materia orgánica, la mayor proporción de S en forma de SO₄²⁻ (87%) (Tabla A.2). Los EPT por su concentración total guardaron el siguiente orden: Pb>Fe>Mn>Zn>Cu>Cd. Por su concentración extractable: Fe>Zn>Mn>Cu>Cd>Pb (Tabla A.3).

Tabla A.2. Características fisicoquímicas del residuo minero al inicio del experimento

Sustrato	pH	CE (μScm^{-1})	RETENCIÓN DE HUMEDAD (%)		M O (%)	C (%)	Textura	DA (gcm^{-3})	SO ₄ ⁻	S total	Na ⁺	K ⁺	Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺	N total (%)
			CC	PMP											
Pal	2.4	56.4	18.3	10.4	1.78	1.03	Franco arcilloso arenoso	1.43	3187.2	3628.8	0.014 ± 0.0	0.004 ± 0.0	1245.8 ± 1.4	560.8 ± 8.6	0.03

Tabla A.3. Concentración inicial de EPT en el sustrato empleado (mg kg^{-1}).

Fe	Zn		Cu		Mn		Cd		Pb	
	Total	DTPA	Total	DTPA	Total	DTPA	Total	DTPA	Total	DTPA
4356.9±108	895 ± 316	282.1 ± 16.9	525 ± 14	27.1 ± 2.9	1193 ± 142	33.5 ± 2.1	24 ± 1	2.4 ± 0.2	6533 ± 1007	1.9 ± 0.56

Se puede observar que la concentración extractable fue mucho menor a la concentración total al inicio del experimento. Esta concentración extractable se redujo aún más en el caso de Cu, Mn y Cd. No así en el caso del Zn y Pb, cuya disponibilidad se mantuvo en concentraciones semejantes al inicio de la neutralización (Tabla A.4)

Tabla A.4 Concentración extractable de los EPT estudiados (DTPA_TEA) al inicio y final de

(mg kg^{-1})	Zn	Cu	Mn	Cd	Pb
Inicial	282.1±16.9	27.1±2.9	33.5±2.1	2.4±0.2	1.9±0.6
Final	248.3±15.2	6.7±1.1	12.5±2.5	0.3±0.5	1.4±0.7

La variación en la acidez y CE durante el proceso de neutralización mostró un comportamiento muy similar al adicionar cualquiera de las dosis de Ca(OH)_2 ($\alpha=0.05$). Sin embargo en la semana veinte hubo diferencia de hasta de una unidad en el pH entre tratamientos (Figura A.1). El tratamiento cinco mostró las condiciones de menos acidez ($\text{pH}=5.35$) y CE de 2.8 mScm^{-1} en el día veinte (Figura A.2). Como resultado de esta fase de estabilización se eligió el tratamiento 5 para probar la capacidad de establecimiento de *Bacopa monnieri* en este residuo minero, una vez que fue neutralizado.

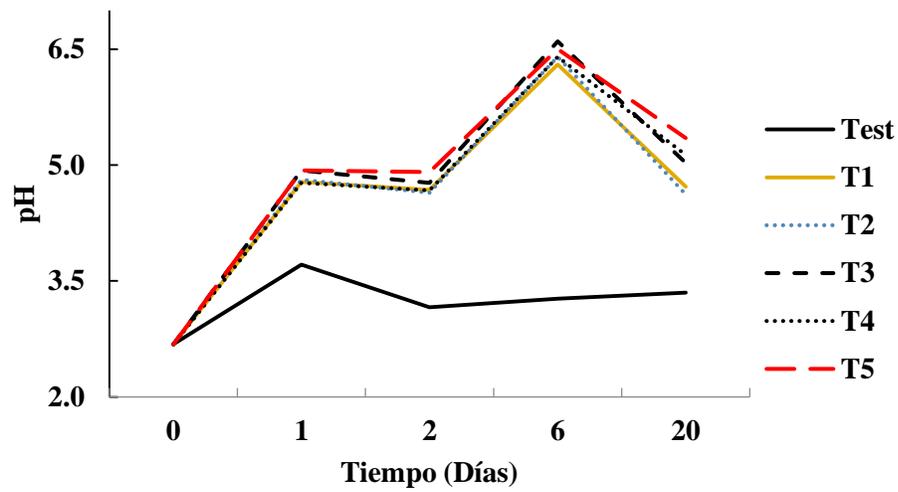


Figura A.1 Comportamiento del pH a lo largo del tratamiento de neutralización

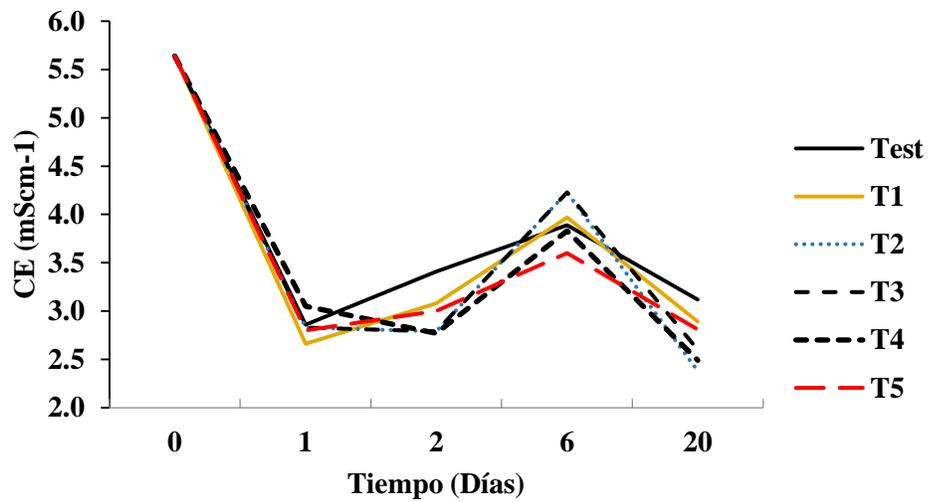


Figura A.2. CE a lo largo del tratamiento de neutralización

Después de ocho semanas de exposición, se encontró una concentración mayor de Zn, Mn y Pb en raíz (Figura A.3) dentro de los niveles considerados como fitotóxicos. La planta acumuló 105 mgkg⁻¹ de Mn y 138 mg kg⁻¹ de Zn en la parte aérea (por debajo de los niveles fitotóxicos).

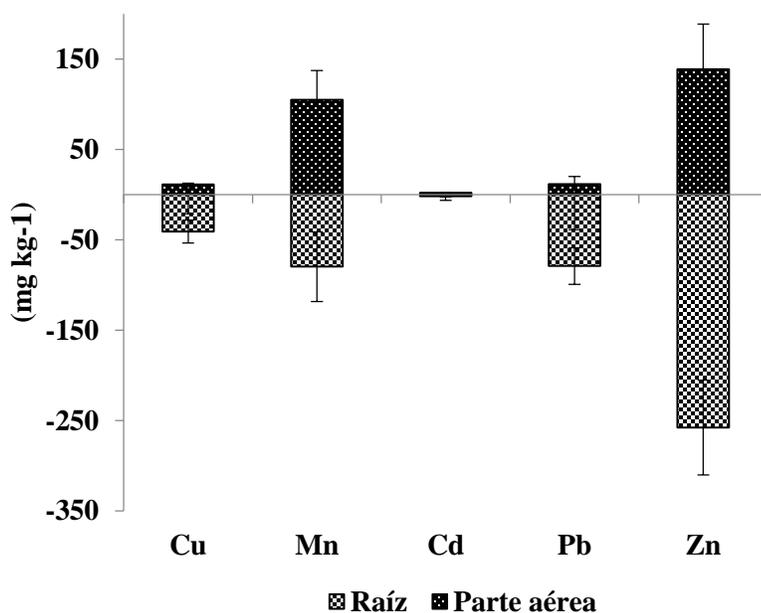


Figura A.3 Concentración de EPT en tejido de *B. monnieri* después de 8 semanas de exposición.

Discusión

La concentración total de Fe, Zn, Mn y Pb al inicio del experimento (Tabla A.3) confirman la peligrosidad de la dispersión de estos residuos en el ambiente y la necesidad de que sean tratados. Las características iniciales del sustrato indican que se trata de un residuo en condiciones oxidantes y ácidas (pH=2.4), con acidez potencial alta, debido a la presencia de azufre. La formación de sales solubles durante la neutralización se reflejó en la CE, pero sin

llegar a ser un problema para el crecimiento de las plantas. El tamaño de partícula, predominantemente pequeño, favoreció la retención de humedad y los procesos de oxidación. El pH se incrementó por efecto de la neutralización de los hidronios activos (de 6.3 a 6.6) llegando a su máximo valor en el día seis (Figuras A.2 y A.3). Ya que a partir de este día hubo un descenso, se restringió la adición de agua para evitar lavar las sales alcalinizantes.

Los efectos de neutralización fueron similares empleando diferentes concentraciones de Ca(OH)_2 , lo que indica cierta capacidad de amortiguamiento en el sustrato. Esta capacidad de amortiguamiento se presentó aún después de la neutralización del sustrato y la aplicación de vermicompost y fue generalizada para todos los tratamientos. Durante el experimento, el sustrato no volvió a las mismas condiciones de acidez, sino que se fue haciendo más alcalino paulatinamente a través del tiempo.

Los sustratos ácidos presentan diferentes tipos de acidez (Morales, 2003). Considerando esto, se puede decir que la acidez residual redujo paulatinamente el efecto neutralizante de la enmienda. Se observó que el sistema de subirrigación favoreció las condiciones anaerobias en el sustrato, al menos debajo de la superficie, debido a que el sustrato se mantuvo con 100% de humedad. Estas condiciones de saturación de humedad coadyuvieron también para que disminuyese la acidez y la concentración de sulfatos, en un proceso paulatino de alcalinización (Gray, 1998) (ver Capítulo IV).

Las concentraciones EPT en la parte aérea de *B. monnieri* después de 8 semanas de tratamiento están por debajo o dentro de las concentraciones fitotóxicas, Se encontró que estas concentraciones semejantes en raíz a las que mostró *Bacopa monnieri* en el sustrato Pal, pero sin

neutralización (Capítulo IV). Es decir, lo que indica que esta especie tiene una estrategia de acumulación intrínseca como un mecanismo fisiológico de defensa antioxidante la cual no depende de las concentraciones totales o disponibles que se encuentren en los sustratos ni tampoco de las proporciones en las que se encuentren los EPT en los sustratos.

Durante el experimento se observó un desarrollo importante de la masa de raíces sanas, sin necrosis, lo que favoreció la acumulación de EPT. Se observó que las plantas de *Bacopa monnieri* tuvieron un desarrollo óptimo, ya que durante el tratamiento se completó la etapa de floración. Las plantas no presentaron clorosis foliar u otro síntoma de daño por los residuos, tampoco hubo daño en la raíz, lo que indica que esta especie toleró sin problemas su establecimiento y pudo vivir en los residuos de minas neutralizados. Estos resultados confirman que esta especie tiene potencial para la fitorremediación de residuos ácidos de mina y DMA previamente neutralizados en sistemas de humedales anaerobios. En casos de tratamiento pasivo de humedales, es importante considerar un plan de aplicación de encalado en función de los procesos de amortiguamiento de la acidez a mediano plazo.

Conclusiones

1. La adición de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ es un medio efectivo de neutralización en los residuos Pal para evitar la formación de DAM, pero se debe considerar la acidez residual o potencial de los sustratos para establecer un plan de manejo ya que los cambios en pH no son permanentes.
2. Por su carácter alcalino, la adición de vermicompost es un medio efectivo de enmienda para la estabilización de las formas biodisponibles de EPT en los residuos ácidos de mina

(con alto grado de oxidación). Sin embargo los mecanismos de acción y alcance del tratamiento deben estudiarse a detalle.

3. *B. monnieri* es una planta útil en la fitorremediación de residuos de mina ligeramente ácidos que han pasado por un proceso de neutralización. Su carácter de acumulación de varios EPT la hace útil en los tratamientos pasivos como los humedales anaeróbicos.

Literatura Citada

- Aduvire O. 2006. Drenaje ácido de mina, generación y tratamiento. España: Instituto Geológico y Minero de España. Dirección de Recursos Generales y Geoambiente. Madrid. 136 p.
- Bakewell P. 1984. Mining in Colonial Spanish America. In: The Cambridge History of Latin America. Vol 2. Colonial Latin America. Leslie Bethell Ed. Cambridge University Press pp. 105-152.
- Bremner JM. 1965. Total nitrogen. En: Methods of Soil Analysis, Part 2. Black CA (Ed). American Society of Agronomy. Madison WI. pp 1149–1178.
- Brix H. 1994. Functions of macrophytes in constructed wetlands. En: Water Science and Technology. Vol. 29. pp. 71–78.
- Candeias C, Ávila PF, Silva-Da EF, Ferreira A, Salgueiro AR, Teixeira, JP. 2014. Acid mine drainage from the Panasqueira mine and its influence on Zêzere river (Central Portugal). Journal of African Earth Sciences, 99: 705–712.
<https://doi.org/10.1016/j.jafrearsci.2013.10.006>
- Castillo-Hernández JC. 2013. Procesos biogeoquímicos de sulfato-reducción involucrados en la remediación de los drenajes ácidos de mina y las balsas de fosfoyeso. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Experimentales. Departamento de Geología. Universidad Internacional de Andalucía y Universidad de Huelva España. 143 p.
- Cervantes-Adame, YF, Acosta-Durán, CM, Villegas-Torres, OG. 2011. Sustratos para la propagación por esqueje de *Bacopa monnieri*. Investigación Agropecuaria 8(1):51-61.
- Corrales-Pérez D. Romero FM. 2013. Evaluación de la peligrosidad de jales de zonas mineras de Nicaragua y México y alternativas de solución. Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana 65(3): 427-446.
- Filipek LH, Nordstrom DK, Ficklin WH. 1987. Interaction of acid mine drainage with waters and sediments of West Squaw Creek in the West Shasta Mining District, California. Environmental Science and Technology 21(4): 388-396.

- González LG. 2011. Modelización hidrológica del río Odiel: aplicación al estudio de la contaminación por drenaje ácido de minas. Doctoral dissertation, Universidad de Huelva.
- Gray NF. 1998. Acid mine drainage composition and the implications for its impact on lotic systems. *Water Research* 32(7): 2122-2134.
- Gutiérrez-Ruiz M, Romero FM, González-Hernández G. 2007. Suelos y sedimentos afectados por la dispersión de jales inactivos de sulfuros metálicos en la zona minera de Santa Bárbara, Chihuahua, México. *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas*, 24(2): 170-184.
- Johnson, D. B., Hallberg, K. B. 2005. Acid mine drainage remediation options: A review. *Science of the Total Environment*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.09.002>
- Lindsay WL, Norvell WA. 1978. Development of a DTPA soil for zinc, iron, manganese and copper. *Soil Science Society American Journal* 42: 421-428.
- López-Pamo E, Aduvire O, Baretino D. 2002. Tratamientos pasivos de drenajes ácidos de mina: estado actual y perspectivas de futuro. *Boletín Geológico y Minero* 113: 3-21.
- Mascaro I, Benvenuti B, Corsini F, Costagliola P, Lattanzi P, Parrini P, Tanelli G. 2002. Mine wastes at the polymetallic deposit of Fenice Capanne (southern Tuscany, Italy). *Mineralogy, geochemistry, and environmental impact*. *Environmental Geology* 41: 417-429. <https://doi.org/10.1007/s002540100408>
- Morales A. 2003. Determinación y mitigación del potencial de generación ácido en botaderos de estériles mina del proyecto Desarrollo Teniente División El Teniente, CODELCO-Chile. En: Congreso Geológico Chileno, Concepción, Chile.
- Prasad MNV. 2007. Emerging phytotechnologies for remediation of heavy metal contaminated/polluted soil and water. *Environmental Bioremediation Technology* 54(1): 39-43.
- SEMARNAT, 2012. Indicadores básicos del desempeño ambiental de México. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales, SEMARNAT. México.
- Sinha S, Saxena R. 2006. Effect of iron on lipid peroxidation, and enzymatic and non-enzymatic antioxidants and bacoside-A content in medicinal plant *Bacopa monnieri* L. *Chemosphere* 62(8): 1340-1350.
- US Environmental Protection Agency (USEPA). 1992. Method 3050A: Acid digestion of sediments, sludge and soils. Washington DC: US Government Print Office.
- Whitehead, P. G., Cosby, B. J., Prior, H. 2005. The Wheal Jane wetlands model for bioremediation of acid mine drainage. *Science of the Total Environment* 338: 125-135. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.09.012>

ANEXO II. PRODUCTOS DE LA TESIS

AII-1. Publicación del Artículo:



International Journal of Phytoremediation



ISSN: 1522-6514 (Print) 1549-7879 (Online) Journal homepage: <http://www.tandfonline.com/loi/bijp20>

Riparian plants on mine runoff in Zimapan, Hidalgo, Mexico: Useful for phytoremediation?

Eréndira Carmona-Chit, Rogelio Carrillo-González, Ma.del Carmen A. González-Chávez, Heike Vibrans, Laura Yáñez-Espinosa & Adriana Delgado-Alvarado

To cite this article: Eréndira Carmona-Chit, Rogelio Carrillo-González, Ma.del Carmen A. González-Chávez, Heike Vibrans, Laura Yáñez-Espinosa & Adriana Delgado-Alvarado (2016) Riparian plants on mine runoff in Zimapan, Hidalgo, Mexico: Useful for phytoremediation?, *International Journal of Phytoremediation*, 18:9, 861-868, DOI: [10.1080/15226514.2016.1156639](https://doi.org/10.1080/15226514.2016.1156639)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/15226514.2016.1156639>

 [View supplementary material](#) 

 Accepted author version posted online: 03 Mar 2016.
Published online: 03 Mar 2016.

 [Submit your article to this journal](#) 

 Article views: 70

 [View related articles](#) 

 [View Crossmark data](#) 

Full Terms & Conditions of access and use can be found at
<http://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=bijp20>

AII-2 Participación en el V Congreso de Ciencia y Arte del Paisaje “Paisajizando el Ambiente” Del 22 al 24 de septiembre de 2016 con la ponencia PLANTAS RIPARIAS DE LA ZONA DE ESCURRIMIENTOS MINEROS EN ZIMAPÁN, HIDALGO, MÉXICO; PROSPECTIVAS PARA LA FITORREMEDIACIÓN



PLANTAS RIPARIAS DE LA ZONA DE ESCURRIMIENTOS MINEROS EN ZIMAPÁN, HIDALGO, MÉXICO; PROSPECTIVAS PARA LA FITORREMEDIACIÓN

Carmona-Chit E. ¹, Carrillo-González R.^{2*}, González-Chávez M.C.^{3*}, Vibrans H.^{4*},
Yáñez-Espinosa L.⁵, Delgado-Alvarado A.⁶

¹Área de Biología, Departamento de Preparatoria Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo. km. 36.5 Carretera México-Texcoco. C.P. 56230. ²Laboratorio de Química de suelos. ³Laboratorio de Microbiología Ambiental. ⁴Especialidad de Botánica. *Colegio de Postgraduados Campus Montecillo. ⁵Instituto de Investigación en Zonas Desérticas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí. ⁶ Programa de Estrategias para el Desarrollo Agrícola Regional, Colegio de Postgraduados Campus Puebla

correo-e: erendiracarmona@colpos.mx

Introducción

Zimapán Hidalgo es una zona con tradición minera en la extracción de Au, Ag, Cu, Hg, Pb, Zn y otros minerales. Los residuos de minado esta área contienen altas concentraciones de elementos potencialmente tóxicos (EPT) cuyos efectos llegan a las áreas circundantes por efecto del agua y el viento. La dispersión y escurrimientos de los residuos de mina tienen serias implicaciones para la salud humana y de los ecosistemas circundantes. Se han registrado varias especies de plantas tolerantes a los EPT; adaptadas a vivir en suelos con altas concentraciones de los mismos. En Latinoamérica, el conocimiento de especies tolerantes útiles en la fitorremediación de humedales es muy restringido y por tanto insuficiente. El objetivo de esta investigación fue identificar especies de plantas herbáceas del área influenciada por los escurrimientos de residuos de mina que podrían emplearse para la estabilización o la fitoextracción de los EPT.

Materiales y Métodos

El área de estudio se ubica en la región minera de Zimapán, Hidalgo, México y corresponde a la franja de 600 m sobre la ribera del arroyo Santiago que ha recibido los escurrimientos y lixiviados de los depósitos mineros durante los últimos 55 años. Se seleccionaron seis estaciones que fueron muestreadas durante las épocas de secas y lluvias desde 2012 a 2014. Se muestreó

cada especie vegetal herbácea por estación, para su identificación taxonómica y análisis de EPT. También se obtuvo una muestra de suelo rizosférico por cada ejemplar vegetal recolectado y una muestra de suelo no rizosférico por estación. En el suelo se analizaron: pH y pE, distribución del tamaño de partículas (método estándar), materia orgánica (Rowell, 1994), concentración total de Cu, Zn, Ni, Cd, Pb (USEPA, 1992) y concentración extractable de estos mismos elementos (Lindsay y Norwell, 1978). Se registró la presencia-ausencia de especies en cada una de las fechas y estaciones de muestreo. Se analizó el contenido total de Cu, Zn, Ni, Cd, Pb en la raíz, tallo y hojas de cada ejemplar, y en el suelo mediante la digestión ácida ($\text{HClO}_4\text{-H}_2\text{SO}_4\text{-H}_2\text{O}_2$ (4:1:1)). Los EPT se cuantificaron por espectrometría de absorción atómica. Se calcularon los factores de bioconcentración (Zhuang, 2007) y translocación (Stoltz y Greger, 2002) para la raíz, tallo y hojas, considerando la concentración extractable del suelo. Los datos fueron probados estadísticamente mediante la realización de un análisis de varianza (ANOVA) ($\alpha = 0.05$) y mediante el análisis de correlación de Pearson (r) ($p < 0.001$).

Resultados y Discusión

Los lixiviados y escurrimientos de los residuos de mina tuvieron una influencia directa sobre el pH y la concentración de los EPT en los suelos cercanos. Los factores que controlan la disponibilidad de EPT en los suelos fueron el pH, pE, materia orgánica y contenido de arcillas. La composición de la vegetación fue extremadamente variable en cada muestreo debido a la alteración de los volúmenes de flujo del río y de la morfología del margen. Se encontraron 49 especies pertenecientes a 20 familias de plantas asociadas a los ambientes de ribera. De las especies recolectadas 87%, son nativas en el sentido amplio. Las especies ruderales anuales representan 53% y las perennes 47% del estrato herbáceo. La mayor parte de la vegetación (93%) estuvo asociada a la zona de inundación o en la planicie cercana a los residuos de mina (bajo la influencia de sus escurrimientos). El orden de concentración en el tejido de las plantas fue $\text{Zn} > \text{Pb} > \text{Cu} > \text{Ni} > \text{Cd}$, siempre por encima de los niveles fitotóxicos.

Conclusiones

Ninguna de las especies encontradas es exclusiva de suelos metalíferos por tanto las poblaciones encontradas pueden considerarse como tolerantes a los EPT (Ernst *et al.*, 2008). Todas las especies se comportaron como acumuladoras. *Rorippa nasturtium-aquaticum* acumuló

concentraciones particularmente altas de Cu. *Parietaria pensylvanica* y *Commelina diffusa*, se comportaron como hiperacumuladoras de Zn. Los humedales funcionaron como sumideros de EPT donde la disponibilidad de EPT es más alta que en los suelos de otros sistemas, lo que influye de manera directa en los niveles de acumulación de las plantas. Las poblaciones riparias actuaron como acumuladoras de EPT en los suelos con escurrimientos y lixiviados de residuos de minas.

Bibliografía Relevante

- Ali H, Khan E, Sajad MA. 2013. Phytoremediation of heavy metals. Concepts and applications. *Chemosphere* 91: 869-881.
- Baker AJM, Brooks RR. 1989. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements. A review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery* 1: 81-126.
- Barbafieri M, Dadea C, Tassi E, Bretzel T, Fanfani L. 2011. Uptake of heavy metals by native species growing in a mining area in Sardinia, Italy: discovering native flora for phytoremediation. *International Journal of Phytoremediation* 13(10): 985-997.
- Barrutia O, Artetxe U, Hernández A, Olano JM, García-Plazaola I, Garbisu C, Becerril JM. 2011. Native plant communities in an abandoned Pb-Zn mining area of Northern Spain: Implications for phytoremediation and germplasm preservation. *Int J Phytoremediation* 13(3): 256-270.

A II-3 Participación en el IV Congreso Internacional y XVIII Congreso Nacional de Ciencias Agronómicas Del 20 al 22 de abril de 2016 con la ponencia: PLANTAS RIPARIAS EN LA ZONA DE ESCURRIMIENTOS MINEROS EN ZIMAPÁN HIDALGO, MÉXICO: ¿ÚTILES PARA LA FITORREMEDIACIÓN?



IV Congreso Internacional y XVIII Congreso Nacional
de Ciencias Agronómicas
20 al 22 de abril de 2016



PLANTAS RIPARIAS EN LA ZONA DE ESCURRIMIENTOS MINEROS EN ZIMAPÁN, HIDALGO, MÉXICO: ¿ÚTILES PARA LA FITORREMEDIACIÓN?

Carmona-Chit E.¹, Carrillo-González R.², González-Chávez M.C.³, Vibrans H.⁴,
Yáñez-Espinosa L.⁵, Delgado-Alvarado A.⁶

¹Área de Biología, Departamento de Preparatoria Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo. Km. 36.5 Carretera México-Texcoco. C.P. 56230. ²Laboratorio de Química de suelos, ³Laboratorio de Microbiología Ambiental y ⁴Especialidad de Botánica del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, ⁵Instituto de Investigación en Zonas Desérticas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí. ⁶Programa de Estrategias para el Desarrollo Agrícola Regional del Colegio de Postgraduados Campus Puebla
correo-e: erendira.carmona@colpos.mx

Introducción

La dispersión y escurrimiento de los residuos mineros tienen serias implicaciones para la salud humana y de los ecosistemas circundantes a las zonas mineras. Zimapán, Hidalgo es una zona con tradición minera en la extracción de Au, Ag, Cu, Hg, Pb, Zn y otros minerales. Los residuos mineros de esta área contienen altas concentraciones de elementos potencialmente tóxicos (EPT) cuyos efectos llegan a las áreas circundantes por efecto del agua y el viento. Se han registrado varias especies de plantas tolerantes a los EPT; es decir, están adaptadas a vivir en suelos con altas concentraciones de los mismos. El conocimiento de especies tolerantes útiles en la fitorremediación de humedales es muy restringido y por tanto insuficiente en Latinoamérica. El objetivo de esta investigación fue determinar cuáles especies de plantas herbáceas del área influenciada por los escurrimientos de residuos mineros podrían emplearse para la estabilización o la fitoextracción de los EPT. Un segundo objetivo fue identificar si eran útiles para la revegetación.

Materiales y Métodos

El área de estudio se ubica en la región minera de Zimapán, Hidalgo, México y corresponde a la franja de 600 m sobre la ribera del arroyo Santiago, que ha recibido los escurrimientos y lixiviados de los depósitos mineros Preisser, Pal y San Antonio, durante los últimos 55 años. Se seleccionaron seis estaciones que fueron muestreadas durante las épocas de secas y lluvias desde 2012 a 2014. Se tomó un ejemplar de cada especie vegetal herbácea por estación, para el análisis de EPT, una muestra de suelo rizosférico por cada ejemplar vegetal recolectado y una muestra de suelo no rizosférico por estación. En el suelo se analizaron: pH y pE, distribución del tamaño de partículas (método estándar), materia orgánica (Rowell, 1994), concentración total de Cu, Zn, Ni, Cd, Pb (USEPA, 1992) y concentración extractable de estos mismos elementos (Lindsay y Norwell, 1978). Se registró la presencia-ausencia de especies en cada una de las fechas y estaciones de muestreo. Se analizó el contenido total de Cu, Zn, Ni, Cd, Pb en la raíz, tallo y hojas de cada ejemplar mediante digestión ácida (HClO₄-H₂SO₄-H₂O₂ (4:1:1) y cuantificación por Espectrometría de Absorción Atómica. Se calcularon el factor de bioconcentración (Zhuang, 2007) y translocación (Stoltz y Greger, 2002) para la raíz, tallo y hojas, considerando la concentración extractable del suelo. Los datos fueron probados estadísticamente mediante la realización de un análisis de varianza (ANOVA) ($\alpha = 0.05$) y mediante el análisis de correlación de Pearson (r) ($p < 0.001$).



Resultados y Discusión

Los lixiviados y escurrimientos de los residuos mineros tuvieron una influencia directa sobre el pH y la concentración de los EPT en los suelos cercanos a los residuos mineros. Los factores que controlan la disponibilidad de EPT en los suelos fueron el pH, pE, materia orgánica y contenido de arcillas. La composición de la vegetación fue extremadamente variable en cada evento de muestreo debido a la alteración de los volúmenes de flujo del río y de la morfología del margen del río. Se encontraron 49 especies pertenecientes a 20 familias de plantas asociadas a los ambientes de ribera. El 87%, especies nativas en el sentido amplio. Las especies ruderales anuales representan el 53% y las perennes el 47% del estrato herbáceo. La mayor parte de la vegetación (93% estuvo asociada a la zona de inundación o en la planicie cercana a los residuos mineros (bajo la influencia de sus escurrimientos). El orden de concentración en el tejido de las plantas fue Zn>Pb>Cu>Ni>Cd, siempre por encima de los niveles fitotóxicos.

Conclusiones

Ninguna de las especies encontradas es exclusiva de suelos metalíferos por tanto las poblaciones encontradas pueden considerarse como tolerantes a los EPT (Ernst et al., 2008). Todas las especies se comportaron como acumuladoras. *Rorippa nasturtium-aquaticum* acumuló concentraciones particularmente altas de Cu. *Parietaria pensylvanica* y *Commelina diffusa*, se comportaron como hiperacumuladoras de Zn. Los humedales funcionaron como sumideros de EPT donde la disponibilidad de EPT es más alta que en los suelos terrestres, lo que influye de manera directa en los niveles de acumulación de las plantas. Las poblaciones riparias actuaron como acumuladoras de EPT en los suelos con escurrimientos y lixiviados de residuos de minas.

Literatura Citada

- Ernst WHO, Krauss GJ, Verkleij JAC, Wesenberg D. 2008. Interaction of heavy metals with the sulphur metabolism in angiosperms from an ecological point of view. *Plant Cell Environ* 31: 123-143.
- Lindsay WL, Norvell WA. 1978. Development of a DTPA soil for zinc, iron, manganese and copper. *Soil Sci Soc Am J* 42: 421-428.
- Rowell DL. 1994. *Soil Science: Methods and applications*. New York USA: Routledge. 345 pp.
- Stoltz E, Greger M. 2002. Accumulation properties of As, Cd, Cu, Pb and Zn by four wetland plant species growing on submerged mine tailings. *Environ Exp Bot* 47: 271-280.
- US Environmental Protection Agency (USEPA). 1992. Method 3050A: Acid digestion of sediments, sludge and soils. Washington DC: US Gov Print Office.
- Zhuang P, Yang QW, Wang HB, Shu WS. 2007. Phytoextraction of heavy metals by eight plant species in the field. *Water Air Soil Pollut* 184: 235-242.