

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS, INGENIERÍA Y MEDICINA

PROGRAMAS MULTIDISCIPLINARIOS DE POSGRADO EN CIENCIAS
AMBIENTALES

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES

**EVALUACIÓN DE LA FITOTOXICIDAD EN SUELOS CONTAMINADOS POR
METALES PESADOS EN PASIVOS AMBIENTALES MINERO-METALÚRGICOS**

PRESENTA:

RICARDO ERNESTO SOMOHANO GAMBOA

CODIRECTORES DE TESIS:

DR. ISRAEL RAZO SOTO

DR. JOSÉ DE JESÚS MEJÍA SAAVEDRA

ASESOR:

DRA. LAURA YÁÑEZ ESPINOSA

SAN LUIS POTOSÍ, S. L. P.

AGOSTO DE 2013

CRÉDITOS INSTITUCIONALES

PROYECTO REALIZADO EN:

El municipio de Fresnillo, Zacatecas; en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Medicina de la UASLP, en el Área de Ciencias de la Tierra de la Facultad de Ingeniería de la UASLP; en el Instituto de Investigaciones de Zonas Desérticas; y en el Laboratorio de Mutagénesis del Centro de Estudios Académicos sobre Contaminación Ambiental, en la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro.

CON FINANCIAMIENTO DE:

Proyecto Fondo Mixto CONACyT-Gobierno del estado de Zacatecas
(ZAC-2007-CO1-81904)

A TRAVÉS DEL PROYECTO DENOMINADO:

“Caracterización Ambiental y Estimación del Riesgo para la Salud con Perspectivas a la Restauración Ambiental de Sitios Mineros Contaminados por Metales en el Estado de Zacatecas”

AGRADEZCO A CONACyT EL OTORGAMIENTO DE LA BECA-TESIS

Becario No. 369060

**LA MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES RECIBE APOYO ATRAVÉS
DEL PROGRAMA NACIONAL DE POSGRADOS DE CALIDAD (PNPC)**

AGRADECIMIENTOS

Expreso mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización del presente trabajo, en especial al Dr. Israel Razo, por la orientación, el seguimiento y la supervisión continúa de la misma, pero sobre todo por la motivación y el apoyo recibido a lo largo de estos años.

Especial reconocimiento merece el interés mostrado por mi trabajo y las sugerencias recibidas del Dr. Jesús Mejía, con el que me encuentro en deuda por el ánimo infundido y la confianza en mí depositada.

También me gustaría agradecer la ayuda recibida de la Dra. Laura Yáñez, por su apoyo, confianza, enseñanzas y amistad; durante las horas dedicadas a mí y a este proyecto. Al Dr. Guillermo Espinosa, por su valioso punto de vista y por ayudarme a mejorar.

Al Dr. Miguel Rico por su amabilidad, buena disposición, por el tiempo que me dedicó y por todas las facilidades que me otorgó para realizar este proyecto.

Quisiera hacer extensiva mi gratitud a mis compañeros de la Agenda Ambiental, especialmente al equipo investigador de las áreas de evaluación ambiental, salud ambiental integrada y recursos naturales, por su amistad y colaboración.

Un agradecimiento muy especial merece la comprensión, paciencia y el ánimo recibidos de mi familia y amigos.

A todos ellos, muchas gracias.

DEDICATORIA

A Dios, por permitirme llegar a este momento tan especial en mi vida. Por los triunfos y los momentos difíciles que me han enseñado a valorarlo cada día más. A mi madre que ha sabido formarme con buenos sentimientos, hábitos y valores, lo cual me ha ayudado a salir adelante en los momentos más difíciles. A mi padre por ayudarme en la construcción de mi proyecto de vida y hacer que verdaderamente crea en mí. A mis hermanos y sobrino por regalarme su amor y cariño de manera incondicional. A mi familia y amigos que me han brindado su apoyo y por compartir conmigo buenos y malos momentos.

CONTENIDO

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	5
2. MARCO TEÓRICO.....	9
2.1. Metales Pesados.....	9
2.1.1. Comportamiento de los Metales Pesados en el Suelo.....	12
2.1.2. Toxicidad de los Metales Pesados.....	13
2.2. Efectos por Genotoxicidad.....	16
2.3. Efectos en la Fisiología Vegetal.....	17
2.3.1. Pigmentos Fotosintéticos.....	17
2.3.2. Conductancia Estomática.....	18
2.4. Conceptos Ecotoxicológicos.....	19
2.4.1. Bioensayo.....	20
2.4.2. Bioindicador (<i>Tradescantia Clon 4430</i>).....	20
2.4.3. Biomarcadores (Micronúcleos).....	21
3. JUSTIFICACIÓN.....	23
4. OBJETIVOS.....	25
5. ÁREA DE ESTUDIO.....	27
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
6.1. Muestreo de Suelo.....	33
6.2. Preparación de Muestras.....	34
6.3. Determinación de las Concentraciones Totales de Metales Pesados.....	35
6.4. Determinación del pH de Suelos.....	36
6.5. Determinación de la Fracción Móvil (Soluble) de EPT en Suelo.....	36
6.6. Bioensayos.....	37

6.6.1. Propagación del Bioindicador <i>Tradescantia clon 4430</i>	37
6.6.2. Diseño Experimental del Bioensayo 1.....	38
6.6.3. Diseño Experimental del Bioensayo 2.....	39
6.6.4. Determinación de micronúcleos como biomarcadores de daño genotóxico.....	39
6.6.5. Determinación de Estrés Fisiológico.....	40
a) Medición de la Conductancia Estomática.....	40
b) Medición de la Concentración de Pigmentos Fotosintéticos.....	41
6.7. Análisis Estadístico.....	42
7. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	45
7.1. Concentración Total Recuperable de EPT en Suelo Superficial.....	45
7.2. Concentración Total Recuperable de EPT en Suelo a Diferentes Profundidades.....	48
7.3. Determinación de la Fracción Soluble (móvil) de EPT en Suelo.....	51
7.4. Bioensayos.....	53
7.4.1. Prueba de Micronúcleos (MCN) en <i>Tradescantia Clon 4430</i>	53
7.4.2. Determinación de la Concentración de Pigmentos Fotosintéticos.....	56
7.4.3. Evaluación de la Conductancia Estomática.....	60
7.4.4. Integración de Resultados de la Fracción Soluble de EPT y sus Efectos Fitotóxicos.....	64
8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	65
BIBLIOGRAFÍA.....	69
ANEXOS.....	75

Índice de Figuras

Figura 1. Esquema del Ciclo del Mercurio en la Ecósfera.....	11
Figura 2. Resumen Esquemático de los Factores que envuelven la no Tolerancia a Metales Pesados en Plantas.....	15
Figura 3. Ubicación Geográfica del Sitio de Estudio.....	27
Figura 4. Mapa de Localización de Las Cuatas.....	29
Figura 5. Aspecto del Depósito de Jales Abandonado en Las Cuatas.....	29
Figura 6. Aspecto del Área de Uso Forestal Aparentemente sin Disturbio Ubicada al SW del Depósito de Jales de Reprocesamiento en Las Cuatas.....	30
Figura 7. Aspecto del Área de Uso Forestal con un Alto Grado de Disturbio Ubicada al SW del Depósito de Jales de Reprocesamiento en Las Cuatas.....	30
Figura 8. Aspecto del Área de Uso Agrícola Localizada al SW del Depósito de Jales de Reprocesamiento en Las Cuatas.....	31
Figura 9. Mapa Descriptivo de Las Cuatas.....	31
Figura 10. Mapa de la Ubicación de los Puntos Seleccionados para el Muestreo de Suelo.....	33
Figura 11. Diagrama Esquemático del Diseño Experimental del Bioensayo 1.....	42
Figura 12. Diagrama Esquemático del Diseño Experimental del Bioensayo 2.....	43
Figura 13. Número de Células con MCN por cada 100 Células en Fase Tétrada.....	53
Figura 14. Número Total de MCN por Unidad Experimental.....	55
Figura 15. Concentración de Pigmentos Fotosintéticos del Bioensayo 1.....	57
Figura 16. Concentración de Pigmentos Fotosintéticos del Bioensayo 2.....	59
Figura 17. Variación de la Conductancia Estomática en el Bioensayo 1.....	61
Figura 18. Variación de la Conductancia Estomática en el Bioensayo 2.....	63

Índice de Tablas

Tabla 1. Efectos Tóxicos del Mercurio y Plomo.....	13
Tabla 2. Concentraciones de Referencia Totales.....	45
Tabla 3. Estadísticas Descriptivas de las Concentraciones Totales Recuperables de EPT (mg/kg) en las seis muestras de suelos superficial.....	46
Tabla 4. Distribución de los EPT en cinco distintos tipos de Perfiles.....	50
Tabla 5. Concentración en el Extracto y Movilidad de EPT.....	51
Tabla 6. Concentraciones y Relaciones entre las Clorofilas y Carotenoides en el Bioensayo 1.....	58
Tabla 7. Concentraciones y Relaciones entre las Clorofilas y Carotenoides en el Bioensayo 2.....	60

RESUMEN

El impacto ambiental de las actividades minero-metalúrgicas está relacionado con su naturaleza extractiva y los residuos que producen. Los estudios sobre los efectos negativos de estas actividades humanas son de mayor interés debido a las graves consecuencias ambientales y los riesgos que pueden representar para la salud humana. A lo largo de su historia, estas actividades han dejado una huella evidente, como es el abandono de residuos, cuyos vestigios son conocidos como pasivos ambientales, que en la mayoría de los casos representan un riesgo permanente y potencial para la salud humana, el ecosistema y recursos naturales circundantes y la propiedad.

Entre los pasivos ambientales de las actividades minero-metalúrgicas, resaltan los impactos por contaminación de suelos con Elementos Potencialmente Tóxicos (EPT) como son As, Pb, Cd, Hg, entre otros. Las posibles consecuencias de la presencia de EPT en suelo pueden ser variadas, pero sin duda los efectos adversos que pueden causar en especies vegetales es de especial relevancia por ser éstas la base de la productividad de los ecosistemas, por lo que cualquier posible efecto repercutiría en todos los niveles tróficos, además de que los EPT podrían transferirse a los consumidores. Los posibles efectos fitotóxicos por EPT pueden ser genotóxicos, fisiológicos y/o morfológicos los cuales pueden manifestarse mediante la disminución de la productividad, de la reproducción o mortalidad de las plantas. Para evaluar los posibles efectos fitotóxicos por exposición a suelos contaminados con EPT se han desarrollado diversas metodologías entre las que se encuentran los bioensayos, en los cuales se utilizan bioindicadores (especies vegetales sensibles) que presentan efectos causados por contaminantes presentes en suelo, agua o aire.

La normativa nacional que establece los criterios de remediación de suelos contaminados con EPT (NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004) señala que para aquellos sitios donde no exista población humana expuesta, se requerirá determinar la vulnerabilidad de especies vegetales o animales ante la exposición a suelos contaminados con EPT, no obstante, esta normativa carece de lineamientos específicos para evaluar la vulnerabilidad a esta exposición. Por ello, con el propósito de contribuir en la evaluación de los potenciales efectos en la vegetación expuesta a suelos contaminados en pasivos ambientales minero-metalúrgicos, en esta investigación se estableció como objetivo diseñar y aplicar un modelo de análisis ambiental para determinar los efectos fitotóxicos generados por la fracción soluble de EPT presentes en suelos

cercanos a un pasivo ambiental minero-metalúrgicos en el bioindicador *Tradescantia clon 4430* a través de la determinación de parámetros de genotoxicidad y de efectos fisiológicos.

La metodología desarrollada consistió primeramente en la obtención de muestras de suelo en el área circundante a un depósito de residuos metalúrgicos abandonados en la localidad Las Cuatas, en la región de Fresnillo, Zacatecas, en donde previamente se reportaron altas concentraciones de plomo, arsénico, cadmio y mercurio. El muestreo consistió en la selección de seis puntos de muestreo en áreas agrícolas y áreas sin aparente uso de suelo, para la obtención de suelo superficial (0-25 cm) que se consideró representativo de la capa donde ocurre la exposición de las raíces de especies herbáceas y arbustivas. Además, en cada punto de muestreo de suelo superficial, se obtuvo un núcleo de suelo hasta de un metro de profundidad, el cual se dividió en secciones de 25 cm para determinar la distribución de EPT con respecto a la profundidad. Los análisis químicos de las muestras de suelo consistieron en la determinación de la concentración total recuperable de 18 EPT por la técnica de Espectrometría de Masas con fuente de Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-MS), además se determinó la fracción soluble de los mismos EPT mediante extracciones con agua meteórica simulada, según establece la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004. Posteriormente, se evaluó la fitotoxicidad de la fracción soluble de EPT mediante la exposición del bioindicador *Tradescantia clon 4430* aplicando dos técnicas diferentes, la primera consistió en la que establece la metodología estandarizada para la determinación de efectos genotóxicos que consiste en la inmersión de cortes de tallos directamente en el extracto que contenía la fracción soluble de EPT (Bioensayo 1), mientras que la segunda consistió en la exposición de las plantas a través de la raíz mediante riegos periódicos con el mismo extracto (Bioensayo 2). Los biomarcadores de efecto evaluados para ambos bioensayos consistieron en la determinación de micronúcleos (MCN) en células reproductivas como biomarcador de daño genotóxico, y en la determinación de la concentración de pigmentos fotosintéticos y mediciones de la conductancia estomática, como biomarcadores de efectos fisiológicos.

Los resultados de la concentración total de EPT confirmaron que el suelo del sitio de estudio se encuentra contaminado por EPT, particularmente por As, Hg y Pb los cuales superaron los límites dictados por la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004, como consecuencia del inadecuado manejo y disposición de los residuos que ahí se localizan y que ha tenido como resultado su dispersión por transporte fluvial y eólico hacia los suelos circundantes, incluyendo suelos de uso agrícola y de uso forestal. No obstante que ninguno de los EPT superó su respectiva concentración de referencia soluble que establece la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004, en los

bioensayos realizados con el bioindicador *Tradescantia clon 4430*, fue posible observar respuestas genotóxicas y fisiológicas de acuerdo a los biomarcadores de efecto evaluados.

Los resultados de MCN, pigmentos fotosintéticos y conductancia estomática, como biomarcadores de estrés fitotóxico, mostraron significancia estadística con respecto a los controles negativos, cuando el bioindicador se expuso a la fracción soluble de EPT de los sitios de muestreo 2CF y 6CF, los cuales correspondieron a los suelos con las mayores concentraciones de EPT solubles. Por lo tanto, se demostró la capacidad de las fracciones solubles de EPT para causar efectos fitotóxicos, sugiriendo que aún cuando las concentraciones solubles de EPT no superan los criterios establecidos en la normativa nacional, pueden representar riesgos ecológicos por afectación a especies vegetales sensibles, por lo que en la caracterización de pasivos ambientales minero-metalúrgicos, sería recomendable incluir la evaluación de la fitotoxicidad de la fracción soluble de EPT mediante modelos similares al que aquí se propone.

Con respecto al modelo experimental que se utilizó para evaluar los efectos genotóxicos por MCN de las fracciones solubles de EPT, se puede considerar como una herramienta confiable y de fácil aplicación, ya que el bioindicador *Tradescantia clon 4430*, demostró ser suficientemente sensible para responder a las variaciones típicas de concentración y movilidad en suelos contaminados por fuentes minero-metalúrgicas. No obstante, en el caso de los otros biomarcadores propuestos, será necesario continuar con la estandarización de las técnicas para la determinación de pigmentos fotosintéticos y de la conductancia estomática.

1. INTRODUCCION

El planeta Tierra es un sistema cerrado, dinámico y estacionario. Se puede considerar cerrado porque el intercambio de materia con el espacio exterior es casi despreciable. Es dinámico debido a que la materia y energía dentro del globo terráqueo están en constante movimiento a través de los ciclos biogeoquímicos que siguen una circulación interna dentro de la ecósfera que comprende cuatro esferas: biosfera, atmósfera, hidrosfera y litosfera, que son las regiones de intercambio o de depósito en el continuo espacio y tiempo. Es estacionario por la mínima producción de entropía con la que ocurren todos los procesos involucrados en la transferencia de materia y energía. Así, la naturaleza de sus componentes y de los procesos involucrados en la transferencia de energía y materia, se combinan para crear un ambiente que es capaz de sustentar las diversas formas de vida, una situación única en el sistema solar (Siegel, 2002).

En las últimas décadas ha existido una creciente preocupación sobre el deterioro del planeta ocasionado por las actividades humanas, particularmente por la modificación de los ciclos biogeoquímicos naturales a través de la liberación al ambiente de sustancias consideradas contaminantes, y aunque el impacto por contaminación considerado de mayor relevancia es aquel ocasionado a nivel local, la cada vez mejor comprensión del transporte atmosférico, fluvial, terrestre y trófico de contaminantes a través de grandes distancias, ha modificado esta perspectiva, debido a los efectos observados en áreas lejanas de las fuentes que son directa o indirectamente contaminadas (Hespanhol & Helmer, 2000).

Entre los principales contaminantes de interés ambiental se encuentran los metales y metaloides, que además, son componentes naturales de nuestro planeta, donde se presentan principalmente como sólidos, y en algunos casos como líquidos o gases, tanto en sus formas elementales como en forma de compuestos orgánicos e inorgánicos (Siegel, 2002). La abundancia natural de estos elementos en los diferentes componentes del planeta, incluyendo la biosfera, depende de varios procesos estrechamente relacionados con la formación y transformación de la corteza terrestre, pero la actividad humana a través de su extracción, transformación, uso y disposición, ha modificado el intercambio natural de estos elementos al grado de incrementar sus concentraciones a niveles que causan efectos adversos en la salud humana y en la biota (Kabata-Pendias & Mukherjee, 2007). Algunos de los metales y metaloides que pueden considerarse nocivos para las plantas, animales y el hombre son As, Cd, Hg, Ni, Pb, Se, entre otros, los cuales son reconocidos como los de mayor preocupación por las pequeñas dosis a la que pueden causar efectos adversos (Badillo, 1998). Así, como

consecuencia de las diversas aplicaciones, que se han dado a los diferentes metales y metaloides, ha ocurrido la alteración de los ciclos biogeoquímicos de estos elementos, en donde la etapa extractiva a través de la minería y la metalurgia ha sobresalido como la principal fuente antropogénica de EPT (Nriagu & Pacyna, 1988).

Sin duda, la minería ha contribuido significativamente en el crecimiento o generación de riqueza de las naciones, especialmente mediante la explotación de metales preciosos como el oro y la plata, metales que han sido apreciados en todas las épocas y en todas las culturas humanas; y en el desarrollo tecnológico al proporcionar metales útiles para la sociedad, como son cobre, zinc, plomo, hierro, entre otros (Díaz *et al*, 2005). Sin embargo, esta actividad también es reconocida por los impactos ambientales negativos que puede generar cuando no se aplican medidas preventivas o de mitigación acordes a la características propias de su naturaleza extractiva (Sengupta, 1993).

Las operaciones minero-metalúrgicas pueden contribuir en la liberación de metales y metaloides al ambiente debido principalmente al inadecuado manejo de los residuos que generan, ya que por su volumen y por la diversidad de sus composiciones químicas, representan sin duda uno de los principales retos que esta industria debe enfrentar para lograr un desempeño ambiental apropiado (Hilson, 2003). En el pasado, las inadecuadas prácticas en el control y prevención de los impactos ambientales negativos de la minería, así como la inexistencia de una normativa precisa que regulara la operación y el cierre de minas, provocó la acumulación de **pasivos ambientales** en extensas áreas de países tradicionalmente mineros. La denominación de **pasivos ambientales**, en este caso de actividades minero-metalúrgicas, hace referencia a los impactos negativos generados por las operaciones mineras y/o metalúrgicas en donde no se realizó un cierre regulado (Yupari, 2003). Es decir, los pasivos ambientales son los daños no compensados producidos por una empresa al medio ambiente a lo largo de su historia, en su actividad normal o en caso de accidente (Russi & Martinez-Alier, 2002).

Por otra parte, aunque las actividades mineras y metalúrgicas como fuentes de metales y metaloides pueden impactar cualquiera de los medios ambientales circundantes, la contaminación del suelo tiene una especial importancia por ser el principal receptor de metales y metaloides, en donde éstos pueden permanecer por mucho tiempo, ya que este medio actúa como regulador natural del transporte de elementos y sustancias químicas hacia la atmósfera, hidrosfera y la biota (Kabata-Pendias, 2011). Por ello, es común encontrar altos contenidos de metales y metaloides en suelos de sitios con una larga trayectoria de producción minera y como

consecuencia, frecuentemente se identifican efectos negativos en los seres vivos (González-Chávez *et al*, 2000).

Una vez que los metales y metaloides se incorporan al suelo, se les consideran elementos potencialmente tóxicos (EPT), debido a su demostrada toxicidad, y pueden distribuirse en este medio o transferirse a otro, mediante cuatro diferentes mecanismos. Pueden quedar retenidos en el suelo, ya sea disueltos en la solución del suelo o bien, en fases sólidas formadas por procesos de adsorción o precipitación, el segundo mecanismo es el que sean absorbidos por los seres vivos y se incorporen a la cadena trófica, el tercer mecanismo es la transferencia a la atmósfera por volatilización y el último mecanismo es a través de su movilización a las aguas superficiales o subterráneas (Salas, 2006). Por lo tanto, el suelo además de actuar como receptor, una vez contaminado puede representar una fuente de EPT para otros componentes de la ecósfera, por lo que la prevención de su contaminación o la recuperación de suelos contaminados debe considerarse una prioridad para mantener la productividad de este medio, reducir potenciales efectos negativos para los seres vivos y conservar la calidad de otros medios ambientales (Kabata-Pendias, 2011).

Los criterios nacionales de remediación de suelos contaminados con EPT se establecen en la Norma Oficial Mexicana NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004, la cual incluye criterios de protección a la salud humana y a los recursos hídricos, pero además considera que para aquellos sitios donde no exista población humana expuesta, se requerirá determinar la vulnerabilidad de especies vegetales o animales ante la exposición a suelos contaminados con EPT. Para el caso de las especies vegetales, la exposición a relativamente bajos niveles de EPT puede causar efectos fitotóxicos que se manifestarían en una reducción de la producción de biomasa, en la inhibición de la reproducción e incluso causar efectos letales para estos organismos, los cuales podrían representar serias consecuencias ecológicas y económicas (Yarto, Gavilan, & Castro, 2004). Por ejemplo, se ha reportado que el exceso de zinc no inhibe la germinación, pero puede reducir el crecimiento de la raíz, provocar enanismo de las plantas, además de causar clorosis y una reducción en la producción de biomasa en leguminosas empleadas como forraje (Rout & Dan, 2003). Uno de los síntomas de la fitotoxicidad ocasionada por el plomo en bajas concentraciones puede ser la disminución del crecimiento de la raíz con concentraciones letales que exceden la concentración inhibitoria mínima (250 μM) en menos de 10 veces (Ivanov, Bystrova, & Seregin, 2003). Por otra parte, al representar la base de las cadenas tróficas, la bioacumulación de EPT en plantas representa un potencial riesgo para los consumidores, incluyendo a los humanos (Kabata-Pendias, 2011).

No obstante de los potenciales riesgos que representan los suelos contaminados con EPT para la vegetación, la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004 carece de lineamientos específicos para la protección de estos organismos. Por ello, con el propósito de contribuir en la evaluación de los potenciales riesgos ecológicos por exposición a suelos contaminados con EPT en pasivos ambientales minero-metalúrgicos, en esta investigación se estableció como objetivo diseñar y aplicar un modelo de análisis ambiental para determinar los efectos fitotóxicos en el bioindicador *Tradescantia clon 4430* a través de la determinación de parámetros de genotoxicidad y de efectos fisiológicos por la exposición a la fracción soluble de EPT presentes en suelos cercanos a un pasivo ambiental minero-metalúrgicos.

2. MARCO TEÓRICO

Los metales y metaloides forman parte de la materia que compone a nuestro planeta y se pueden presentar en el ambiente como sólidos, líquidos o gases, en sus formas elementales y como compuestos orgánicos e inorgánicos, y su abundancia y distribución en la corteza terrestre dependen de las condiciones geológicas locales y regionales y de los procesos que favorecen su dispersión. Bajo las mismas condiciones, se presentan otros elementos químicos que aunque son metales ligeros o no metales, se suelen englobar con los metales y metaloides por presentar orígenes y comportamientos asociados (Siegel, 2002).

Así, la abundancia y distribución natural de estos elementos están estrechamente asociadas a los procesos de formación y transformación de las rocas, los cuales determinan la relación entre el magma, las rocas ígneas, sedimentarias, metamórficas, así como los suelos que se forman por la degradación física o química de estas rocas. No obstante, los metales pesados geogénicos son generalmente estables en el suelo y aunque suelen concentrarse durante el proceso de formación de suelos, generalmente no rebasan los umbrales de toxicidad para los seres vivos, pues se encuentran presentes en formas poco biodisponibles (Presser & Luoma, 2007).

De acuerdo a lo anterior, las concentraciones de los metales y metaloides en suelos, cuencas y hasta en la atmosfera como aerosoles o partículas suspendidas, se han modificado a través del tiempo debido a diferentes procesos naturales que ha sufrido nuestro planeta, y solo en algunos casos, como en la atmosfera, las concentraciones cambian constantemente. No obstante, cada vez es más reconocida la contribución de las actividades humanas que provocan mayores niveles de metales en nuestro entorno, siendo esta, la causa frecuente de que se presenten concentraciones tóxicas (INE, 2003).

2.1 Metales Pesados

El término 'metal pesado' suele referirse a metales cuyo peso específico es superior a 5 g/cm^3 y que tiene un número atómico superior de 20; no obstante, no todos los elementos que tienen estas características presentan otras propiedades análogas, por ejemplo, ser esenciales o no para funciones biológicas (Brady & Weil, 2002). Para aquellos metales que son esenciales para los seres vivos (Cu, Zn, Fe, entre otros), generalmente existe un equilibrio entre sus fracciones disponible y no disponible en el suelo, pero con frecuencia se producen alteraciones en los

aportes o pérdidas de dichos elementos que modifican su ciclo y dan lugar a que se encuentren en proporciones tóxicas o deficientes (Ferre-Huguet *et al*, 2007). Otro grupo de metales no tienen funciones biológicas identificadas (As, Cd, Hg, Pb, entre otros), por lo que éstos se consideran tóxicos por las pequeñas dosis que causan efectos (Badillo, 1998).

Las características del suelo juegan un papel importante en reducir o aumentar la concentración y toxicidad de los metales en el suelo. Así, la distribución de los metales pesados en los perfiles del suelo, así como su biodisponibilidad, está controlada por las propiedades intrínsecas del metal (López *et al*, 2006). A continuación se presentan ejemplos de las propiedades que determinan el comportamiento ambiental de algunos de los metales pesados de mayor relevancia.

En el caso del plomo (Pb), este metal cuenta con una alta resistencia a la corrosión atmosférica y a la acción de los ácidos, especialmente al ácido sulfúrico, propiedades por las que es un metal muy útil en la construcción e instalaciones eléctricas. Se encuentra en el grupo IV A de la tabla periódica, su peso molecular es de 207.2; sus estados de oxidación son 0, +2 y +4, su número de valencia generalmente es 2. En cuanto a sus propiedades físicas, su estado físico en la naturaleza es sólido, es insoluble en agua, presenta una viscosidad de 2.12 cP a 400°C, su punto de fusión es de 327°C y su punto de ebullición es 1770°C, su presión de vapor es de 0.9975mm Hg a 890°C, y tiene una densidad relativa de 11.35 g/cm³, esta última le da su característica de metal pesado, es blando, maleable, poco dúctil y mal conductor de electricidad. Para fines prácticos existen tres clases de compuestos de plomo, el elemental, los inorgánicos, que incluyen a las sales y a los óxidos, y los orgánicos, principalmente el tetra-etilo y tetra-metilo de plomo (Badillo, 1998). El plomo, puede emitirse al ambiente durante su extracción, fundición y refinación, pero también durante otros procesos como la combustión de hidrocarburos fósiles, y por su uso en la fabricación de diversos productos químicos. Por lo cual, la cantidad que se dispersa de plomo atmosférico es muy elevada, lo mas contrastante es el caso de que las emisiones antropogénicas de plomo en el aire son mucho más que las emisiones por fuentes naturales. (Badillo, 1998)

Otro ejemplo es el cadmio (Cd), el cual tiene una concentración promedio de 0.1 mg/kg en la corteza terrestre, y se distribuye de forma similar tanto en rocas ígneas como en las rocas sedimentarias, se encuentra en diversas formas minerales, generalmente asociado a zinc y plomo. Tanto el cadmio como el zinc comparten similar estructura iónica, electronegatividad, y propiedades químicas como son radio atómico, densidad y valencia. Sin embargo, el cadmio es más afín al azufre que el zinc, y su movilidad en medio ácido es más fuerte que la del zinc. A

pesar de que el Cd tiene la misma valencia y similar radio iónico que el calcio, no lo puede sustituir en redes cristalinas. El cadmio es considerado como uno de los metales más ecotóxico debido a que produce efectos adversos en la gran mayoría de los procesos biológicos de los humanos, animales y plantas (Kabata-Pendias, 2010).

En el caso del mercurio (Hg), las formas químicas más comunes son el mercurio divalente, mercurio metálico, fenil mercurio, alcoxialquilo de mercurio y metilmercurio. Debido a su toxicidad, el metilmercurio y fenilmercurio poseen mayor biodisponibilidad en la cadena alimenticia (Yarto, Gavilan, & Castro, 2004). El mineral de mercurio aprovechado a través de la minería es el sulfuro mercúrico o cinabrio (HgS), algunos científicos han determinado que la descarga de mercurio al ambiente proveniente del procesamiento de las menas de cinabrio es superior a las 2,000 ton/año. La descarga de los jales de las minas de cinabrio y otras menas metálicas sulfurosas puede contribuir con cantidades importantes aún no determinadas de mercurio a los cuerpos de agua (Yarto, Gavilan, & Castro, 2004). En el agua, suelo, sedimentos, plantas y animales se encuentra formando sales inorgánicas o como mercurio orgánico (metilmercurio). El mercurio atmosférico precipita por sedimentación o por la lluvia y puede volver a re-emitirse formando un ciclo aire-tierra-agua con una compleja serie de transformaciones fisicoquímicas (Figura 1).

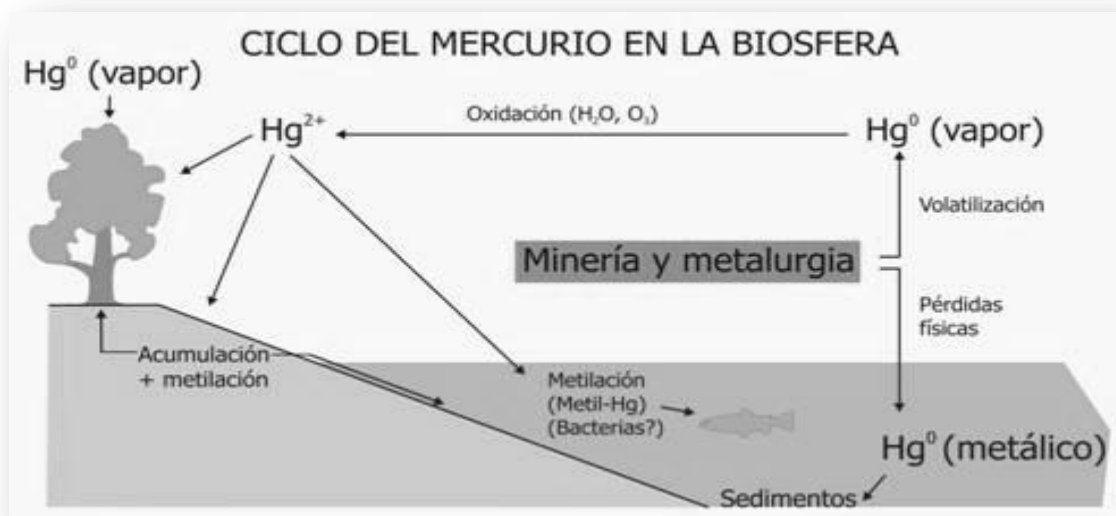


Figura 1. Esquema del ciclo del mercurio en la ecósfera (Modificado de Yarto, Gavilán & Castro, 2004)

2.1.1. Comportamiento de los Metales Pesados en el Suelo

Una vez que un metal o metaloide se incorpora al suelo, este puede sufrir diferentes procesos que promueven o limitan su difusión en este medio o hacia otros medios. La más preocupante descrita por Salas (2010), es el ingreso en cadenas tróficas que pueden ocurrir mediante procesos de absorción por las plantas o por el lavado hacia las aguas freáticas en las que tiene mucho que ver la solubilidad del metal. Otra forma de transferirse desde el suelo a las cadenas tróficas es por medio de volatilización, la cual se transferirá en primera instancia a la atmosfera donde podría ser inhalado y así ingresar en el metabolismo de los animales.

En áreas agrícolas, la mayoría de los metales pesados están incluidos en un ciclo biogeoquímico en el cual los dos componentes fundamentales son el suelo y la planta. Por una parte, dichos elementos llegan al suelo por vía aérea (aerosoles, partículas minerales, polvos suspendidos y transportados por el aire, etc.) y terrestre (fertilizantes, plaguicidas, residuos sólidos, etc.) y, por otra, se pierden por absorción por las plantas, o por lixiviación y erosión. La participación de las distintas vías de transferencia de estos elementos varía considerablemente; depende del tipo de elemento, especie vegetal, tipo de suelo, prácticas agrícolas, etc. (Ferre-Huguet *et al*, 2007).

En cuanto a su transferencia hacia los humanos, la vía primaria es la ingestión de alimentos (plantas y animales). La insolubilización de estos metales se atribuye a reacciones de oxidación (el compostaje es un proceso biooxidativo) que, juntamente con el pH del medio (más alcalino que el inicial) hace que se formen óxidos, hidróxidos y carbonatos poco solubles y a que, es posible, que una pequeña fracción forma complejos o quelatos con la fracción orgánica, más polimerizada al final del proceso (Ferre-Huguet *et al*, 2007).

Hay que resaltar que en todo lo expuesto influyen, en gran medida, las peculiaridades químicas de cada elemento. El tipo y composición del suelo, las características de las especies orgánicas e inorgánicas y su poder quelante, el valor y márgenes del pH, el estado redox y la especiación química, así como las interacciones suelo/planta de la rizósfera y la naturaleza, sensibilidad y edad del vegetal, ocupan también un lugar central en las relaciones de disponibilidad, toxicidad y respuesta de las plantas al estrés por metales (Nordberg, 2000).

Tomando como ejemplo el caso del mercurio, aparece de forma natural en el suelo como Hg^{2+} , por depositación atmosférica, meteorización y por la descomposición de la vegetación. La movilidad del mercurio en suelos queda determinada por la solubilidad de las especies químicas $Hg(OH)_2$, HgS , y Hg^0 . Por encima de pH 5 y en condiciones oxidantes, la especie de mercurio en solución que predomina es el Hg^0 . En condiciones reductoras, el Hg^0 precipita como sulfuro,

HgS. El mercurio alcanza sus mayores solubilidades en ambientes muy bien oxigenados. Una vez depositado en el suelo, el mercurio es retenido por la materia orgánica y por los óxidos de hierro y manganeso, principalmente, y por arcillas. Debido a su gran superficie específica y a su reactividad, los minerales de arcilla juegan un papel muy importante en la inmovilización del mercurio, especialmente en los suelos neutros y/o pobres en materia orgánica. El mercurio generalmente se encuentra fuertemente unido a los constituyentes del suelo como consecuencia de su afinidad por los grupos funcionales que contienen azufre y que se encuentran en las moléculas orgánicas de los horizontes superiores del suelo, ricos en materia orgánica. Los enlaces fuertes dan como resultado baja biodisponibilidad y movilidad del Hg en el suelo, de forma que normalmente sólo se encuentran en la solución del suelo concentraciones traza de mercurio en forma soluble, teniendo como especies dominantes Hg^{2+} y formas complejas sin carga. En suelos ácidos (pH 3 a 5), los complejos con materia orgánica soluble tienen también una contribución elevada a la solubilidad del mercurio, aunque en suelos neutros o con poca materia orgánica, la solubilidad estaría dominada por los óxidos de hierro y arcillas, y la movilidad de mercurio aumentará al disminuir el pH. Las plantas absorben únicamente la fracción de mercurio que se encuentra en disolución (fracción soluble), aunque ésta se encuentra en equilibrio con la fracción de mercurio retenida en los constituyentes del suelo con menor fuerza (Yarto, Gavilan, & Castro, 2004).

2.1.2 Toxicidad de los Metales Pesados

Los metales pesados pueden ocasionar diversos efectos tóxicos que dependen de: (1) la concentración biodisponible del metal; (2) forma química del metal; (3) de las condiciones fisicoquímicas del medio (pH, potencial redox, agentes complejantes disponibles, grado de saturación del medio, etc.); y (4) del tipo de organismo y su estado de desarrollo. En la Tabla 1 se presenta una comparación de los efectos tóxicos del mercurio y plomo para diferentes tipos de organismos.

Tabla 1. Efectos tóxicos del mercurio y plomo

Metal	Alteraciones al Ambiente	Efectos tóxicos en flora y/o fauna	Efectos tóxicos en humanos
Mercurio (Hg)	El metal es tóxico para microorganismos, en menor grado el inorgánico que el orgánico, de ahí las aplicaciones del mercurio como fungicida. (Español, 2001)	La vida acuática es afectada por el mercurio inorgánico a concentraciones de 1 mg/L y a más bajas por el orgánico, éste se suele encontrar en las branquias y aparatos digestivos aunque posteriormente se metaboliza y se acumula en el hígado y músculo. La toxicidad está en relación con la temperatura, salinidad, oxígeno disuelto y contenido de sales (Knights, 2006). El metilmercurio es la forma que predomina en los peces (Español, 2001)	Funciona como una neurotoxina. El metilmercurio es liposoluble, y puede atravesar las membranas biológicas, la intoxicación se produce por deterioro de las funciones biológicas de ciertas enzimas con grupos tioles que llegan a afectar a los riñones. (Knights, 2006; Español, 2001),
Plomo (Pb)	El plomo en el suelo es poco móvil, el suelo es su principal reservorio, se encuentran más altas concentraciones en sitios urbanos. Su principal efecto es su acumulación, provocando desequilibrios en el ambiente y su ciclo biogeoquímico (Badillo, 1998)	Este elemento retarda la ruptura heterolítica de la materia orgánica. Las plantas generalmente lo bioacumulan en su sistema radicular. Los animales lo biomagnifican. (Badillo, 1998).	La intoxicación crónica se presenta por la absorción de óxidos, carbonatos y otros compuestos solubles en el tracto digestivo. El plomo orgánico es altamente volátil y liposoluble (Badillo, 1998). Se presentan efectos en el sistema hematopoyético, en el sistema nervioso central, en el sistema nervioso periférico, endocrino, hepático, renal y reproductivo.

Cuando se evalúan efectos tóxicos en organismos vegetales, se debe tener en cuenta la tolerancia y adaptación que algunas plantas pueden desarrollar para resistir altas concentraciones de metales pesados y que son llamadas metalófitas (Bothe, 2011). Con excepción del Hierro (Fe), que puede estar presente en el suelo en concentraciones hasta de 10%, todos los metales pesados con una concentración de 0.1% o más en el suelo, pueden llegar a ser tóxicos para algunas especies y para otras no, y así generar un cambio en la estructura de la comunidad vegetal del sitio contaminado.

El caso del arsénico (As) es interesante, ya que existe una gran cantidad de estudios que relacionan la concentración de As en suelo con las que hay en plantas, sobre todo en raíz y hojas. Existe el problema de fitotoxicidad cuando el As se encuentra en concentraciones elevadas tanto en su forma arseniatos y arsenitos, ya que reaccionan con muchas enzimas y generan un desbalance del fósforo necesario para las plantas; estudios recientes describen al menos dos especies tolerantes a altas concentraciones de As, mezquites (*Prosopis laevigata*), y huizaches (*Acacia farnesiana*) (Armenia et al, 2008: En Kabata-Pendias, 2010).

Los metales pesados pueden sufrir múltiples mecanismos de tolerancia en el citoplasma de las células vegetales (Figura 2), pueden unirse a grupos funcionales esenciales, como el grupo SH presente en enzimas, provocando la inactivación de las mismas; sustituir elementos funcionales en grupos prostéticos de las enzimas, resultando una inactivación catalítica, por ejemplo el Cd sustituyendo al Zn en proteínas; o motivar la generación de ROS (en español, especies reactivas de oxígeno), a su vez, los ROS generan en la célula reacciones tipo Fenton, la cual genera la bivalencia en metales o que el catión del metal pesado cambie su estado de oxidación (Bothe, 2011).

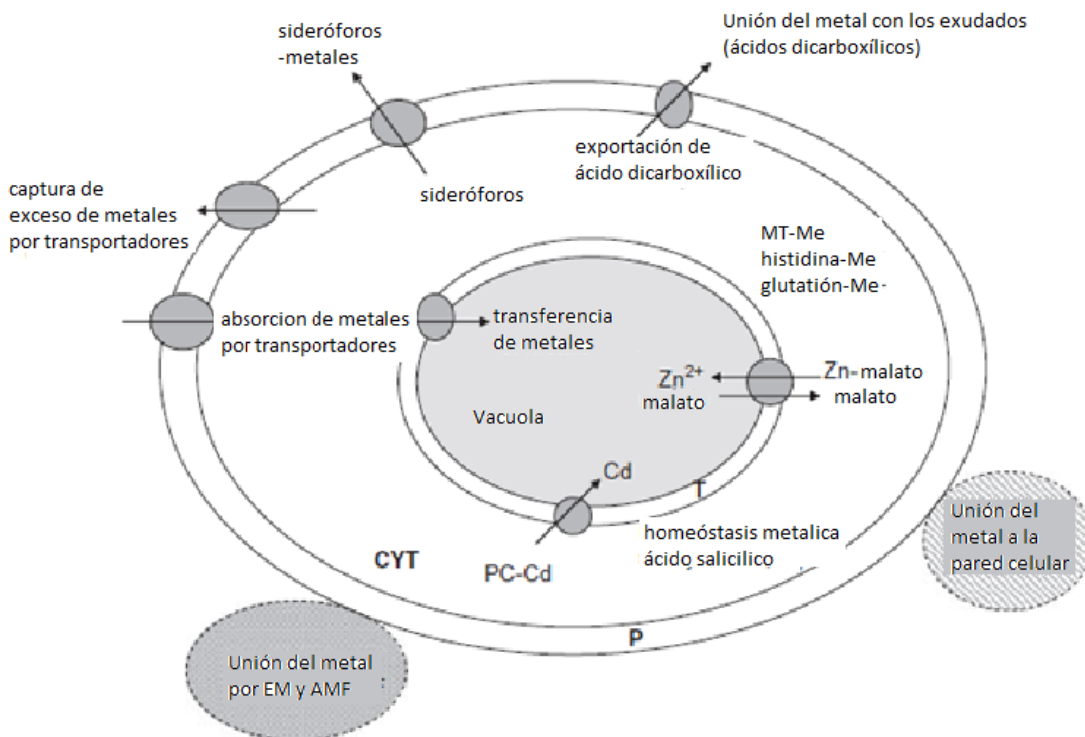


Figura 2. Resumen esquemático de los factores que envuelven la no tolerancia a metales pesados en plantas (Modificado de Bothe, 2011)

Los mecanismos anteriores pueden tener como resultado alguno de los siguientes cambios en la planta (Bothe, 2011):

- A. Formación de Sideróforos, que son moléculas complejas que excreta la planta al suelo.
- B. Síntesis de pequeñas moléculas tales como los ácidos carboxílicos.
- C. Unión de metales pesados a pequeñas moléculas, histidina o glutatión, misma que son usadas para mantener la homeostasis del citoplasma vegetal.
- D. Generación de metalotioneínas, cuyos grupo tiol (-SH) pueden unirse a los metales pesados en el citoplasma y con ello puede evitar que se ejerza efectos tóxicos.
- E. Generación de fitoquelatina, que son sintetizadas por la no traslación de la sintasa-quelatina, usando al glutatión como sustrato.
- F. Producción de transportadores de metales pesados. La membrana plasmática que rodea a las células del parénquima de raíz actúa como una barrera contra la absorción de metales pesados desde el citoplasma. Esta membrana y la tonoplasto que rodea la vacuola poseen varias clases de proteínas de transporte. Si existe una alta concentración de metales pesados, podrían ser tomados erróneamente, a menudo los transportadores no pueden discriminar estrictamente entre el elemento deseado y un metal pesado tóxico.
- G. Producción de enzimas desintoxicantes de ROS, que sucede tras el estrés causado por las altas cargas de metales pesados o sales, por la sequía o la acidez del suelo, las plantas expresan genes de respuesta de estrés.
- H. Alteraciones en la morfología, en el caso de la raíz, han demostrado que poseen una capa peri-endodérmico de las células con paredes celulares tangenciales irregularmente engrosadas impregnada por la lignina, dando lugar al aumento de biomasa de raíces, así como la producción de pelo de la raíz y longitud de raíces.

2.2. Efectos por Genotoxicidad.

La genotoxicidad se refiere a la capacidad relativa de un agente de ocasionar daño en el material genético, originando efectos biológicos adversos. Los daños genotóxicos no sólo ocurren al ADN, sino también a todos aquellos componentes celulares que se encuentran relacionados con la funcionalidad y comportamiento de los cromosomas dentro de la célula. Los agentes genotóxicos se clasifican en químicos, físicos y biológicos, de acuerdo a su origen, y de acuerdo a su modo de acción o efectos se clasifican en mutágenos, carcinógenos o teratógenos, dando lugar a tres tipos de procesos: mutagénesis, carcinogénesis y teratogénesis (Thomas, 1996).

Las alteraciones mutagénicas en plantas suceden inicialmente por una alteración bioquímica que no presenta manifestación morfológica reconocible; causadas por un grupo de EPT que incluye Ni, Cd, Co, Pb y Be, ya que tiene un efecto directo mediante uniones covalentes a los ácidos nucleicos. Por otro lado, los estudios carcinogénicos presentan a As, Be, Ni, Cd, Cr y Pb como metales con riesgo latente (Thomas, 1996).

2.3. Efectos en la Fisiología Vegetal

El estudio de la fisiología vegetal, busca analizar la respuesta de las plantas frente a factores ambientales; mediante la observación de los diferentes procesos, utilizando las metodologías de la bioquímica para la comprensión de la respuesta de las plantas al ambiente y bajo condiciones controladas (Solarte, Pérez, & Melgarejo, 2010).

La respuesta a estrés que puede ser ocasionado por salinidad, déficit hídrico, anegamiento, déficit o exceso de algún nutriente, toxicidad por metales, altas o bajas temperaturas, disturbios (contaminación, claros de bosque, fuego) e interacciones entre organismos; donde la planta debe responder a los cambios ambientales para poder mantener sus funciones metabólicas y fisiológicas (Solarte, Pérez, & Melgarejo, 2010).

2.3.1. Pigmentos Fotosintéticos

La fotosíntesis es la absorción de energía lumínica y su conversión en energía química (ATP) para la síntesis de compuestos orgánicos (fotosintatos). Puede considerarse como un proceso de tres fases: a) la absorción de luz y retención de energía lumínica, b) la conversión de energía lumínica en potencial químico, y c) la estabilización y almacenaje del potencial químico en carbohidratos (González, 2009).

La fotosíntesis tiene lugar dentro de los cloroplastos que contienen las clorofilas, proteínas tilacoidales y compuestos enzimáticos para realizar las distintas reacciones de este proceso. Cuando un fotón golpea y es absorbido por una molécula de clorofila, la molécula se excita y un electrón se eleva a un nivel de energía mayor que el original; toda la energía absorbida es transferida a un aceptor de electrones. El aceptor se reduce químicamente y la energía que entra a la molécula de clorofila queda "atrapada" y se convierte en potencial químico (Bidwell, 2002: En González, 2009).

Las reacciones bioquímicas se realizan en el estroma de los cloroplastos, la energía almacenada en forma de ATP y NADPH se usa para reducir el CO₂ a carbono orgánico. Esta función se lleva a cabo en el ciclo de Calvin. El ATP se sintetiza en los cloroplastos, solo en presencia de luz en un proceso conocido como fosforilación; debido a esta dependencia por la luz, en las hojas se sintetiza mucho más ATP con la luz de día. La energía del ATP y NADPH se utilizan en procesos de reducción de CO₂ para la síntesis de carbohidratos (Salisbury, 2004: En González, 2009)

Las clorofilas y otros pigmentos pueden permanecer en estado de excitación solo por periodos cortos. La energía de excitación se puede perder en su totalidad por la liberación de calor que se presenta cuando el electrón regresa a su estado basal. Todas las moléculas de pigmentos de un fotosistema pueden absorber fotones, pero solo unas pocas moléculas de clorofila asociadas al centro de reacción fotoquímica están especializadas en traducir la energía luminosa en energía química (González, 2009).

Los metales pesados perjudican la absorción de elementos esenciales para la producción de clorofila tales como hierro y magnesio, por lo tanto inhiben la síntesis de clorofila; los daños a los aparatos fotosintéticos son debido a la afinidad de ciertos metales por ligandos de proteínas N- y S-. También se ha observado degradación de las clorofilas debido al incremento de la actividad de la clorofilasa. En el caso de exposición a plomo, se ha hallado que afecta más a la clorofila b que a la clorofila a en abetos de Noruega (Vodnik *et al*, 1999: En García-Vargas, 2006).

De acuerdo a González *et al* (2008) la presencia de metales pesados afecta la función del fotosistema II, de manera directa o indirecta, lo cual modifica la emisión de fluorescencia, por ello, estos cambios pueden utilizarse para revelar mecanismos de respuestas al estrés por los EPT.

2.3.2. Conductancia Estomática

Los estomas juegan un papel importante en el control del balance entre la asimilación del CO₂ y la transpiración. El grado de apertura de los estomas y la conductancia estomática regulan el flujo de CO₂ y de vapor de agua, siendo estos proporcionales a la conductancia, ya que el estoma responde directamente a un déficit hídrico mediante el cierre estomático, para evitar la pérdida excesiva de agua (Ortiz, 2006).

El déficit hídrico produce cierre de los estomas, provocando una disminución en la tasa de transpiración y una afectada disipación de calor, con el consiguiente incremento de la temperatura foliar. Una afectación según lo descrito por Ortiz (2006), si la pérdida de agua por transpiración no puede ser compensada por la absorción, las células oclusivas pierden la turgencia y el estoma se cierra.

Cuando existe exposición a plomo, las células de las hojas en plantas de *Ceratophyllum demersum*, según lo propuesto por García-Vargas (2006), exhibieron una reducción de apilamientos en la ultraestructura de los cloroplastos y así, en la relación de estomas al sistema lamelar, exhibiendo ausencia de granos de almidón. El tratamiento con plomo cambia la composición lipídica de las membranas tilacoidales en hojas de *Zea mays* L. (Stefanov *et al*, 1995: En García-Vargas, 2006).

2.4. Conceptos Ecotoxicológicos

La ecotoxicología estudia el impacto de las sustancias tóxicas en los procesos normales de los ecosistemas naturales, como son el intercambio de materia y energía, la estructura de las redes tróficas, la composición de las poblaciones y de las comunidades (Pérez, 2010).

Las investigaciones en el campo de la biología y toxicología, han tenido un importante número de desarrollos en la última década, como son los avances en la bioinformática, medidas tecnológicas como es la genómica y que fundamentalmente ayudan a entender toxicológicamente los niveles moleculares incrementando los tipos de información como medidas de riesgo. Sin embargo, muchos de los estándares de regulación ambiental no han sido modificados para adoptar estos grandes avances, por lo que las pruebas de toxicidad *in vivo* continúan generando la información básica para los procesos de toma de decisiones (Ankley *et al*, 2010).

En función de lo anterior, en cualquier estudio orientado a determinar los riesgos ecológicos asociados a la exposición de la biota a agentes tóxicos se debe procurar disminuir al máximo la incertidumbre que se genera en la mayor parte de trabajos de investigación ecotoxicológica, y por ello se considera prioritario la ejecución de estudios complementarios que generen información adecuada para la toma de decisiones en la intervención de las áreas afectadas (Salas, 2010).

2.4.1. Bioensayos

Los bioensayos son estudios que evalúan los procesos para determinar la capacidad de una sustancia o de un material para causar un efecto, a partir de las respuestas producidas en organismos biológicos, y se intenta establecer una relación funcional entre dosis y respuesta. Las dosis de sustancia administradas pueden venir dadas en diferentes unidades de medida. Las respuestas son una medida del resultado de la aplicación de la sustancia en determinadas dosis y pueden ser de varios tipos: ordinal (categoría de una infección), discreta cuantitativa (número de golpes de tos, número de mutaciones), dicotómica (muerte o no muerte, contracción muscular o no contracción muscular), o cuantitativa continua (tiempo de coagulación, peso) (Iannacone & Dale, 1999). En este sentido, tenemos un problema de regresión con una clara interpretación causa/efecto.

Las plantas, son materiales biológicos que nos traducen la asociación vital de los componentes xenobióticos, como los metales pesados, como un problema frecuente que puede llegar a ser o aumentar, que se traducen en procesos de bioacumulación o biomagnificación (Ankley *et al*, 2010). Existe diferentes maneras de realizar un estudio de monitoreo de la contaminación, de la cual existe una amplia gama de bioensayos en plantas y animales, tanto en ecosistemas terrestres como acuáticos.

Los bioensayos en plantas, son eficientes en cuanto a costo y tiempo, generalmente no requieren un equipo específico, se puede manipular de cualquier manera a la muestra, se puede aplicar procedimientos de concentración de los tóxicos y se han utilizado con éxito en estudios de exposición *in situ* (Meravi & Prajapati, 2013). De hecho, un bioensayo estandarizado es el Bioensayo *Tradescantia*: la inducción de Micronúcleos en tétradas (Cabrera & Rodriguez, 1998).

2.4.2. Bioindicador (*Tradescantia Clon 4430*)

Los bioindicadores son organismos o comunidades de organismos, de los cuales se observa reacciones representativas para evaluar una situación, dando idea de las condiciones en que se encuentra un ecosistema. Así, los bioindicadores son especies definidas que reaccionan ante un efecto antropogénico dentro del medio (Gerhardt, 2000).

Desde hace algunas décadas, diversas especies de plantas superiores, musgos y líquenes se emplean como bioindicadores de contaminación ambiental, dado que estos organismos brindan información acerca de la respuesta de un individuo no sólo frente a un contaminante en

particular durante un cierto periodo de tiempo, sino también frente a otras variables climáticas, meteorológicas y otros contaminantes que pueden presentar interacción entre sí (Seaward, 1995: En García & Carreras, 2008).

Uno de los bioindicadores ampliamente utilizados para determinar efectos genotóxicos es *Tradescantia clon 4430*, debido a que tiene un número cromosómico bajo ($2n=12$), es una planta sensible a los contaminantes ambientales, lo que permite someterla a diferentes maneras de tratamiento. Es una planta eficiente en la detención de mutágenos, teniendo validez en experimentos de laboratorio y para monitoreo *in situ* del ambiente (Cabrera & Rodríguez, 1999). Aunado a esto, evalúa el grado de estrés al que está sometida la planta, para demostrar de manera más detallada los efectos palpables de exposición. Mediante el uso de especies sensibles como bioindicadores, es razonable suponer entonces que, si un contaminante no causa daño detectable al bioindicador, no afectará significativamente a otras especies (Guimaraes *et al*, 2000: En García & Carreras, 2008).

2.4.3 Biomarcadores

Los biomarcadores son parámetros biológicos, que proporcionan un valor cualitativo o cuantitativo de la respuesta a la exposición a un agente tóxico. Depende de factores como la herencia genética del organismo, su tipo de alimentación, su comportamiento, las propiedades fisicoquímicas del compuesto, la dosis, duración y frecuencia de la exposición, así como la vía y ruta de exposición (EHC 155, 1993: En Pérez, 2010).

Los biomarcadores pueden clasificarse en (Pérez, 2010):

- ❖ Biomarcadores de exposición; permiten demostrar que un organismo o población se encuentra expuesto a un compuesto tóxico o a un agente estresante.
- ❖ Biomarcadores de efecto; se encuentran directamente relacionados con el mecanismo de acción del compuesto tóxico en un organismo.
- ❖ Biomarcadores de susceptibilidad; indican la capacidad innata o adquirida de un organismo, para responder adecuadamente cuando se encuentra expuesto a algún xenobiótico.

En este caso, el trabajo de investigación se basó en los biomarcadores de efecto, debido a que son la medida en la que los parámetros biológicos, se ven alterados como respuesta a la exposición a ciertos factores ambientales, así como agentes tóxicos. Los mejores biomarcadores de efecto tóxico son aquellos que demuestran que hay una alteración en las

funciones normales ya sea de una célula, un tejido u organismo, de forma específica y sensible a un agente tóxico o a un grupo de ellos (Handy *et al*, 2003: En Pérez, 2010).

Uno de los biomarcadores de mayor empleo para determinar efectos genotóxicos, es la detección de Micronúcleos (MCN), debido a que se ajusta a un gran número de bioensayos a corto plazo para la detección de toxicidad genética. Estos ensayos pueden utilizar una amplia gama de organismos y tipos de células, y miden una gran variedad de diferentes cambios genéticos. El daño genético detectado representa el daño que existe en el ADN, desde las mutaciones puntuales hacia las mutaciones cromosómicas (Cabrera & Rodriguez, 1999). En el ADN los sitios Locus posicionados más cerca de los centrómeros son más propensos a sufrir los efectos de división, fuera de la configuración tétrada. Estas observaciones conducen a la conclusión de que la exposición a EPT causa desprendimiento del material genético en los cromosomas después de la replicación, lo cual influye fuertemente en la susceptibilidad a eventos mutacionales (Rodrigues *et al*, 1997).

3. JUSTIFICACIÓN

La contaminación por metales pesados es considerada como una de las problemáticas ambientales más serias a nivel global; debido a la toxicidad, persistencia y continua demanda de estos elementos. La explotación de estos recursos ha generado crecimiento económico, pero las actividades minero-metalúrgicas tienen un ciclo de vida, al final del cual las instalaciones y los residuos generados son abandonados, representando pasivos ambientales. En México, la contaminación es evaluada a través de criterios basados en la concentración total de los metales pesados, que determina el potencial riesgo para la salud humana, y en el caso del impacto a los recursos hídricos, se evalúa la concentración móvil de los EPT; de acuerdo a las concentraciones de referencia predeterminadas por la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004, se comparan y se determina el nivel de riesgo, sin embargo esta apreciación generalmente está limitada.

Determinar el riesgo latente a la salud humana y al medio es una de las necesidades más relevantes en el manejo y la gestión ambiental, por lo cual es necesario el desarrollo de herramientas de monitoreo para la evaluación de los efectos tóxicos de EPT sobre los sistemas biológicos. Entre las metodologías bioanalíticas existentes, la aplicación de bioensayos de toxicidad con plantas vasculares es cada vez más frecuente en el diagnóstico ecotoxicológico. La presencia de los metales pesados, constituye un importante factor de riesgo para los sistemas naturales por lo que es necesario evaluar los efectos de los mismos en especies vegetales por representar la base de las cadenas tróficas. Por lo cual, en este proyecto de investigación, se propone diseñar y aplicar una técnica de bioensayo utilizando una especie vegetal para evaluar distintas respuestas fitotóxicas por exposición a la fracción soluble de EPT, con lo que se pretende contribuir en la evaluación de los potenciales riesgos ecológicos por exposición a suelos contaminados con EPT en pasivos ambientales minero-metalúrgicos.

4. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Diseñar un modelo de análisis ambiental en base a los efectos relevantes en la *Tradescantia clon 4430* (Bioindicador), generados por la fracción soluble de EPT presentes en suelos cercanos a pasivos ambientales minero-metalúrgicos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la concentración total y móvil de metales pesados en suelos con diferentes usos cercanos a un pasivo ambiental minero-metalúrgico,.
- Analizar través de la detección de micronúcleos, los efectos genotóxicos en el bioindicador de suelo impactado por pasivos ambientales minero-metalúrgicos.
- Evaluar parámetros fisiológicos vegetales en el bioindicador *Tradescantia clon 4430* expuesto a la fracción soluble de EPT como biomarcadores de estrés fitotóxico.

5. ÁREA DE ESTUDIO

En el estado de Zacatecas se pueden encontrar distintas condiciones de topografía, clima, geología y vegetación, por lo que estos cuatro factores al interactuar entre sí, dan como resultado suelos con diversas características. El estado de Zacatecas tiene un gradiente altitudinal que varía de 1400 msnm en la región oriente del estado a más de 2600 m en la zona occidente del mismo, particularmente en la parte que corresponde a la Sierra Madre Occidental; mientras que en la región central del estado se observan vastas áreas con planicies y lomeríos con pendientes suaves (Sánchez, 2005).

El distrito minero de Fresnillo se encuentra ubicado en la parte central del estado de Zacatecas (Figura 3), aproximadamente a 10 km al Noreste de la Sierra de Fresnillo con una altura de 2850 msnm y a varios kilómetros al Sur de la Sierra de Chapultepec con una altura de 2920 msnm, las cuales son las principales serranías de la región. En cuestión hidrográfica, se encuentra en el límite de dos regiones hidrológicas, una denominada “El Salado” localizada al Este del área urbana a la cual le pertenece la cuenca Fresnillo-Yesca. La segunda región hidrológica denominada “Nazas-Aguanaval”, localizada al oriente del área urbana. Los escurrimientos más próximos son los arroyos Chilitos, Rivera y Arroyo Prieto, los cuales tienen afluentes intermitentes hacia el distrito minero, sin embargo, la mayoría de ellos fuera de la mancha urbana, cuando hay recarga por escurrimientos fluviales el flujo corre en dirección E y NE. Los principales cuerpos de agua y bordos son: Laguna de Santa Ana y Laguna Seca al Noreste y Presa La Bomba también llamada Presa Rivera (INEGI, 2002).

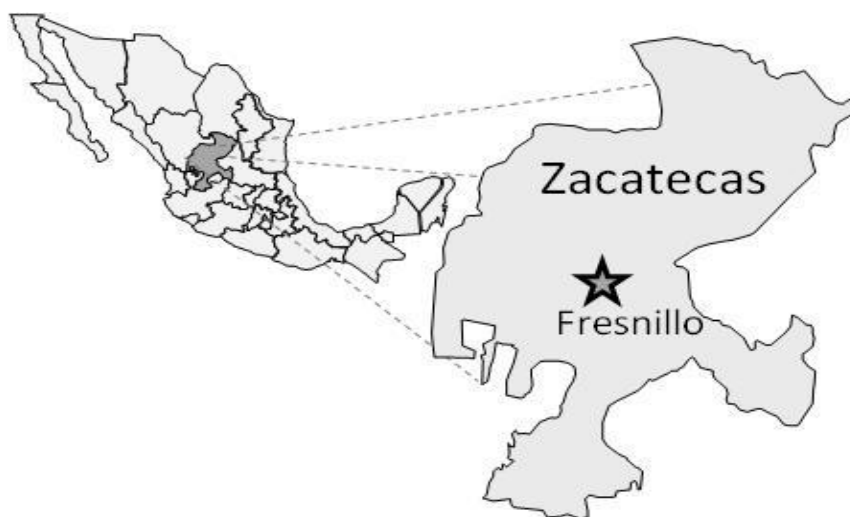


Figura 3. Ubicación geográfica del sitio de estudio

Los suelos del área Fresnillo se caracterizan por su moderada profundidad de 100 cm aproximadamente, con pendientes de terreno de 5 a 10%, con una pedregosidad superficial del 25% de menos de 5 cm de diámetro; tonalidades oscuras en la capa superficial, resultado de la adición de materiales orgánicos aportados por la vegetación del lugar, y colores pardo rojizos en el subsuelo por una acumulación de óxidos de hierro a medida en que se incrementa la profundidad (Sánchez, 2005). Continuando con la descripción de Sánchez (2005), la zona tiene una consistencia friable (suave) en la superficie del suelo se toma firme cuando se incrementa la cantidad de materiales arcillosos. El drenaje interno se considera moderado, ya que los materiales arcillosos dificultan la infiltración del agua en suelo.

El uso de suelo generalmente es agrícola de temporal y de riego, pecuario de pastizal natural y con asociaciones especiales de vegetación de nopaleras y matorrales, espinosos, como vegetación típica de la zona. Presenta áreas industriales de procesamiento de minerales al Sur de la mancha urbana de la ciudad de Fresnillo, en donde se encuentran las principales minas de mayor producción del distrito y una gran área de erosión debido a los residuos mineros hacia el Este (INEGI, 1975).

En el Distrito Minero Fresnillo se ha desarrollado la actividad minera desde hace más de 450 años, sobresaliendo como unos de los sitios productores de plata más importantes en el mundo. Como consecuencia de la histórica actividad minera, se han identificado extensas áreas de suelo contaminado con As, Pb, Hg y Cd, sobresaliendo la localidad Las Cuatas como el sitio que presentó las mayores concentraciones en suelo superficial de EPT (Mayorga, 2012). Las Cuatas se localiza aproximadamente a 10 km al Este de la ciudad de Fresnillo y en las cercanías de la comunidad Estación San José (Figura 4).

La contaminación del suelo que se registró en el área conurbada a los jales mineros de Fresnillo, implicaría en primer término una afectación directa a las funciones básicas de este medio que limitaría su utilidad y beneficios para los humanos y otros seres vivos, pero además implicaría otras consecuencias como la contaminación por metales pesados del aire y el agua, así como los riesgos para la salud de la población por los potenciales efectos tóxicos que representan y que son motivo suficiente para realizar estudios enfocados a determinar la exposición y efectos en la población (UNEP, 2000: En Manzanares-Acuña *et al*, 2006). Por otra parte, las áreas con los mayores niveles de EPT que se localizan al Este de Fresnillo tienen un uso preferentemente agrícola y forestal, por lo que en este caso, evaluar los potenciales riesgos ecológicos sería otra prioridad para el sitio.

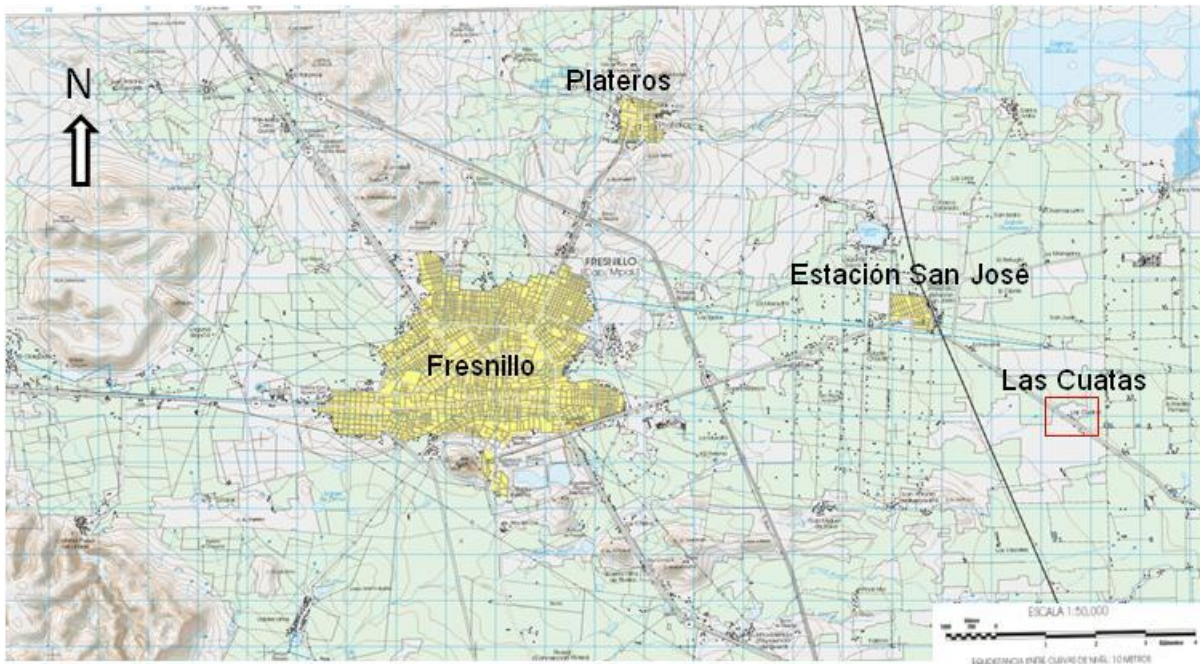


Figura 4. Mapa de localización de Las Cuatas

En Las Cuatas se encuentra abandonado un depósito de jales (Figura 5), presuntamente producidos por el reprocesamiento de residuos recuperados de terrenos donde se depositaron aquellos transportados desde el área de Fresnillo por las escorrentías que drenan hacia las áreas más bajas del valle (Vanegas, 1995).



Figura 5. Aspecto del depósito de jales abandonado en Las Cuatas.

Los suelos circundantes al depósito de residuos se encuentran impactados principalmente por la dispersión de los jales desde el depósito que ahí se localiza, pero también cabría considerar la existencia de suelos impactados por jales procedentes de Fresnillo y que fueron transportados por escorrentías hasta este sitio. Esto a su vez, explicaría la instalación de una

planta de procesamiento en una zona tan alejada de las minas. Al SW del depósito se puede observar áreas de uso forestal sin aparente disturbio, que representaría en tal caso, las condiciones del sitio previas a la recuperación de los jales que ahí se acumularon y que fueron posteriormente reprocesados (Figura 6). Colindando con el área aparentemente sin disturbio, es posible apreciar una zona con evidentes modificaciones en su topografía causadas posiblemente por la excavación realizada durante la recuperación de los jales acumulados (Figura 7).



Figura 6. Aspecto del área de uso forestal aparentemente sin disturbio localizada al SW del depósito de jales de procesamiento en Las Cuatas.



Figura 7. Aspecto del área de uso forestal con un alto grado de disturbio ubicada al SW del depósito de jales de procesamiento en Las Cuatas.

Finalmente, colindando con el margen E del depósito de jales se localiza un área de uso agrícola que por su ubicación con respecto a los residuos, representa el área de mayor susceptibilidad de recibir las partículas de jales de procesamiento que son dispersadas por arrastre hídrico (Figura 8). La Figura 9 muestra la distribución espacial de todas las áreas de interés para este estudio descritas anteriormente.



Figura 8. Aspecto del área de uso agrícola localizada al SW del depósito de jales de reprocesamiento en Las Cuatas.

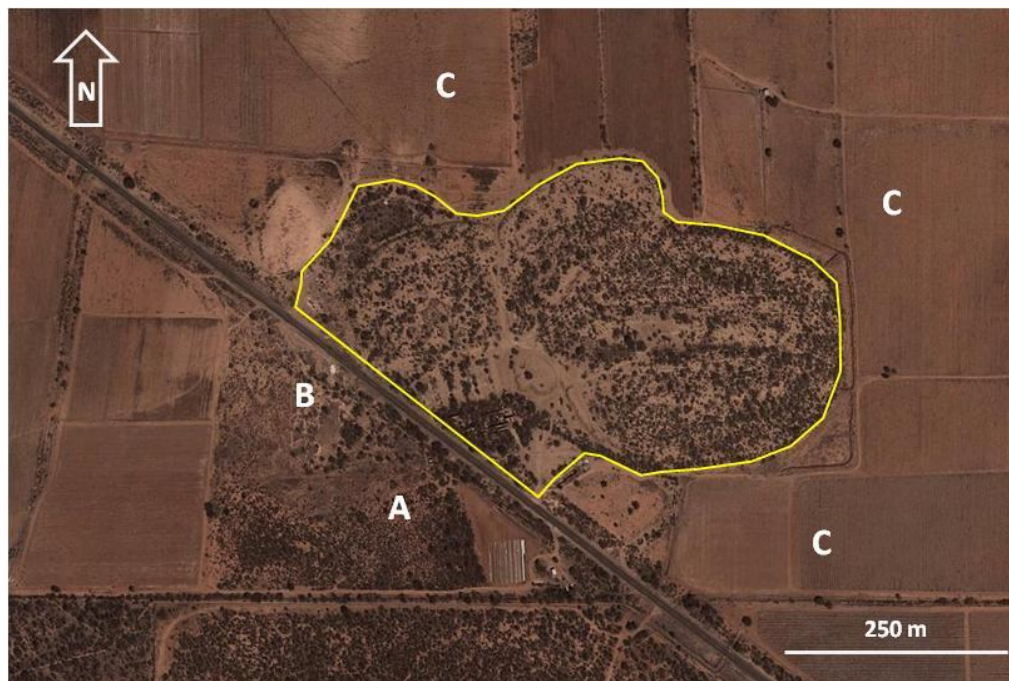


Figura 9. Mapa descriptivo de Las Cuatas. La línea amarilla indica los límites del depósito de residuos. A= Área de uso forestal aparentemente sin disturbio; B= Área con alto grado de disturbio aparentemente por excavación; C= Áreas agrícolas.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Muestreo de Suelo

Se realizó un muestreo dirigido o también conocido “a juicio de experto”, para lo cual se requirió realizar previamente un reconocimiento del sitio para identificar las condiciones que determinarían una variabilidad apropiada en las concentraciones de EPT que pudieran contrastarse contra los efectos esperados en los biomarcadores seleccionados para el bioensayo. Además, se consideró los diferentes usos de suelo presentes para los que la presencia de EPT en suelo representaría un potencial riesgo. De acuerdo a lo anterior, se seleccionaron seis puntos de muestreo cuya ubicación se muestra en la Figura 10.

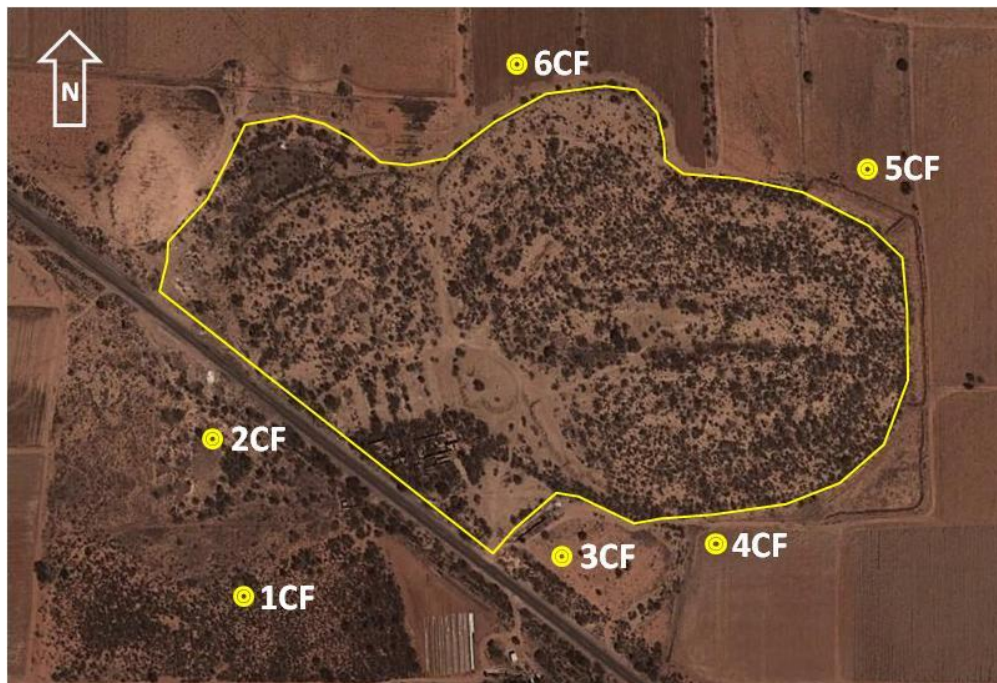


Figura 10. Mapa de la ubicación de los puntos seleccionados para el muestreo de suelo.

De esta manera, la muestra 1CF se obtuvo del área de uso forestal sin disturbio que representaría condiciones previas al reprocesamiento de jales; la muestra 2CF representaría al área de donde presuntamente se removieron los jales que fueron reprocesados; la muestra 3CF se obtuvo de un área de cultivo abandonada; mientras que las muestras 4CF, 5CF y 6CF representan a los suelos agrícolas que rodean al depósito de jales. En el Anexo A-1 se presentan fotografías de cada uno de los puntos de muestreo.

En cada uno de los puntos seleccionados se realizó un muestreo en suelo superficial mediante excavaciones de profundidad máxima de 25 cm, bajo la consideración que este espesor de suelo representa la región de exposición para la vegetación a través de sus raíces. Además, en cada uno de los puntos se obtuvieron muestras hasta una profundidad máxima de 100 cm utilizando un nucleador. Estas muestras se incluyeron para evaluar la distribución de los EPT con respecto a la profundidad.

El muestreo se llevó a cabo durante el mes de septiembre de 2011, y el plan de muestreo, las técnicas de recuperación, de manejo y control de las muestras cumplieron lo señalado por la Norma Mexicana NMX-AA-132-SCFI-2006, que establece los procedimientos de muestreo de suelo para la identificación y la cuantificación de metales y metaloides y manejo de la muestra. El procedimiento para la recolección de muestras superficiales se describe a continuación.

Para obtener la muestra superficial en cada punto determinado, se delimitó una superficie de un metro por un metro, y cuando fue necesario, se removieron restos de plantas y gravas. Posteriormente se excavó el suelo con ayuda de una pala procurando no exceder 25 cm de profundidad. Enseguida, se procedió a tamizar utilizando una criba de acero inoxidable 28 mallas de la serie Tyler, con lo que se recuperó la fracción menor a 2 mm. Aproximadamente 5 kilogramos del suelo tamizado se transfirieron a una bolsa de polietileno, sellándola inmediatamente para su transporte y almacenamiento. Cada bolsa fue etiquetada con una clave, lugar del muestreo, iniciales de quien realizó el muestreo, fecha y hora del muestreo. Se fotografió el punto de muestreo y se registraron las coordenadas geográficas utilizando un GPS marca Garmin modelo eTrex. Finalmente, en la bitácora de campo se registraron las observaciones de las características del suelo (color, textura, presencia de humedad, presencia de hojarascas y presencia de otros materiales eliminados durante el muestreo).

6.2 Preparación de Muestras

La preparación de las muestras es tan importante como el muestreo y análisis de las mismas. A continuación se describe la metodología seguida para la preparación de las muestras de suelo superficial.

Las muestras de suelo superficial que así lo requirieron, se secaron temperatura ambiente en la sombra y en un lugar libre de corrientes de aire, extendiendo las muestras en charolas hasta alcanzar una capa de no más de 2.5 cm.

Una vez secas, se procedió a homogeneizar cada muestra por manto y a reducir su volumen por cuarteo hasta obtener una cantidad que permitiera su fácil manejo en el laboratorio de análisis químico. Se almacenó una fracción de cada muestra como testigo.

Posteriormente se realizó una digestión en medio ácido, empleando un sistema de extracción con horno de microondas CEM MDS-2000. La técnica que se aplicó para la digestión es la mencionada en el método de digestión 3051 de la Agencia de protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA, por sus siglas en inglés), con el objetivo de extraer la fracción total recuperable de EPT (EPA , 2007). La cantidad de muestra de suelo utilizada en la digestión varió entre 0.2 y 0.3 g, los cuales fueron pesados en balanza analítica y colocados en un vaso de teflón. A estos vasos se les agregó 15 ml de una solución de HNO₃ al 25%, para posteriormente proceder con su digestión en el horno de microondas.

El proceso de digestión se llevó a cabo de acuerdo a las siguientes condiciones de trabajo: (1) potencia 100%, (2) presión 80 psías, (3) tiempo de rampa 50 minutos (4) tiempo de residencia 30 minutos y (5) ventilación 100%.

Concluido el tiempo de digestión, el extracto obtenido se filtró utilizando papel filtro Whatman No. 1 (apertura de poro de 11 µm) realizando tres lavados del residuo sólido para finalmente aforar a un volumen conocido.

Como control de calidad se realizó la digestión ácida del material estándar de referencia SRM 2710a Montana Soil certificado por el Instituto Nacional de Estándares y Tecnología de los Estados Unidos, (NIST por sus siglas en inglés) En todos los casos se incluyeron blancos de reactivos y las digestiones se realizaron por duplicado para todas las muestras.

6.3 Determinación de las Concentraciones Totales de Metales Pesados

Los análisis químicos se realizaron por Espectroscopía de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-MS) utilizando un equipo Thermo Electron Model X-Series II. Primero, se realizó un análisis de 50 elementos a cuatro soluciones para identificar cuales EPT se encontraban en mayor abundancia. A partir de este resultado, se decidió hacer el análisis químico en todas las muestras de suelo por As, Pb, Hg, Cd, Zn, Cu, Sb, Ni, V, Au, Ag, Cr, Mn, Fe, Co, Be, Sr y Ba.

6.4 Determinación del pH de Suelo

El pH de cada muestra se determinó empleando un medidor de pH portátil OAKTON RS232 equipado con referencia integrada y una sonda ATC para compensación de temperatura. Como control de calidad en la medición del pH por cada diez muestras se leerá una muestra por duplicado y una solución amortiguadora de pH para verificar la calibración del equipo, de ser necesario calibrar el equipo, esto de acuerdo a la NOM-147-SEMARNAT-SSA1-2004.

El procedimiento de medición de pH consistió primero en la calibración del equipo con un mínimo de dos puntos con soluciones de referencia, en el intervalo en el que se esperaba esté el pH de las muestras. Posteriormente, se colocaron 20 g de muestra en un vaso de precipitado al que se le agregaron 20 mL de agua desionizada. El contenido del vaso se agitó vigorosamente durante 15 minutos para después dejar reposar el tiempo suficiente para que sedimentaran las partículas y poder realizar la medición del pH de la solución en el sobrenadante. Cada medición se realizó por triplicado y el electrodo se enjuagó cuidadosamente entre cada medición.

6.5 Determinación de la Fracción Soluble de EPT en Suelo

Para determinar la movilidad de los EPT en muestras de suelo se aplicó el método establecido en la NOM-147-SEMARNAT-SSA1-2004, que a su vez se elaboró con base en la prueba ASTM 3987-85, que establece la extracción de EPT a partir de residuos sólidos minerales con una solución que simula la influencia del agua meteórica (pH 5.5 ajustado con CO₂) en la movilización de elementos desde una matriz sólida. El reactivo de extracción es agua desionizada, y en caso de que el pH del agua equivale a pH 5.5, se emplea directamente en la extracción, de lo contrario, el pH se ajusta a 5.5 adicionando agua carbonatada. El agua carbonatada se prepara burbujeando CO₂ en un volumen determinado de agua desionizada hasta que el pH sea el deseado.

La extracción consiste en colocar en una botella de plástico una cantidad determinada de muestra de suelo y solución de extracción con una relación sólido/líquido 1:20. La botella se coloca en un agitador rotatorio donde se mantiene en agitación constante a 30±2 r.p.m. durante 18±2 horas. Se prosigue después con la separación de la fase acuosa por filtración primero a través de un filtro de poro cerrado (11 µm) y después mediante una membrana de abertura de poro de 0.45 µm.

La solución final de cada extracción se acidificó a pH <2 con HNO₃ concentrado y se mantuvieron en refrigeración a 4° C hasta su análisis químico el cual se realizó por la técnica de ICP-MS.

Una parte de la solución final sin acidificar fue utilizada en las pruebas por bioensayo como medio de exposición del bioindicador a los EPT.

6.6 Bioensayos

6.6.1 Propagación del Bioindicador *Tradescantia clon 4430*

Las plantas de *Tradescantia clon 4430* se reprodujeron y mantuvieron en condiciones de invernadero durante las pruebas por bioensayos. Todas las pruebas de bioensayo se realizaron en el Laboratorio de Mutagénesis del Centro de Estudios Académicos sobre Contaminación Ambiental de la Universidad Autónoma de Querétaro en donde se obtuvo, además de las instalaciones adecuadas, todo el material biológico utilizado. Esta planta es un híbrido entre *T. hirsutiflora* y *T. subacaulis* que requiere condiciones óptimas para su crecimiento y mantenimiento, entre las que destacan:

- ✓ Intensidad de luz fluorescente de 1 800 pies-candela
- ✓ Intensidad de luz incandescente 180 pies-candela
- ✓ Temperatura 19-25 °C de día y 16 °C de noche
- ✓ Humedad relativa entre 60 y 80%
- ✓ Riego a Capacidad de Campo cada tercer día

El clon es estéril porque presenta autoincompatibilidad, por lo que la propagación en macetas se llevó a cabo mediante la separación de los tallos del macoyo de la planta madre, de tal forma que se permite que los retoños jóvenes crezcan. Como sustrato se utilizó una mezcla preparada con dos partes de tierra negra (con alto contenido de materias orgánicas carbonosas de origen vegetal, y nutrientes como nitrógeno, fósforo, potasio y calcio), una de hojarasca de encino y una de arena de río.

El bioensayo de micronúcleos en células meióticas de *Tradescantia* presenta las siguientes ventajas (Gonzalez & Mejorada, 1993):

- El bioensayo resulta ser eficiente y barato para probar la toxicidad relativa, clastogenicidad y mutagenicidad de agentes ambientales en un sistema vivo.

- Dada su versatilidad y eficiencia, existen estudios comparativos con aberraciones cromosómicas en linfocitos humanos, mostrando una correlación con los resultados en células humanas.
- Es altamente eficiente, por la sensibilidad de los cromosomas meióticos.
- La prueba se realiza en una de las etapas de la meiosis, sincronizada y con tiempos bien conocidos.
- La sencillez de un conteo de Micronúcleos (0.5-3 μm de diámetro) en las tétradas (18 a 20 μm de diámetro)
- Es un bioensayo a corto plazo, simple y eficiente.

6.6.2 Diseño Experimental del Bioensayo 1

El bioensayo 1 se basó en la metodología propuesta por Ma (1976: En Rico 2006), la cual se enfoca en la detención de efectos genotóxicos en las gemas reproductivas de la *Tradescantia clon 4430*, ya que al ser una planta sensible, se busca conocer el daño de un genotóxico de manera directa, pues el tallo absorbe el o los contaminantes en cortos periodos de tiempo (24 a 36 h). Así, esta técnica reduce los tiempos de exposición y recuperación, y es una técnica que ha sido usada con modificaciones para evaluar el efecto genotóxico de contaminantes presentes en agua, aire y suelo, en este último generalmente se hace por extractos y lixiviados (Misík *et al*, 2011).

Así, en el bioensayo 1 se seleccionaron 5 plantas con inflorescencias jóvenes en etapa de tétrada, a las cuales se les realizó un corte del tallo de 15 cm de largo, después se colocaron en un vaso de precipitado que contenía la solución acuosa que resultó de la extracción de EPT durante la determinación de la fracción soluble de la matriz de suelo superficial. Considerando que el volumen del extracto recuperado de la determinación de la fracción soluble fue cercano a 300 mL, los 5 cortes se colocaron en un recipiente con 100 mL de la solución. Esto se realizó por duplicado, por lo que cada prueba de bioensayo 1 empleó en total 10 cortes (todos ellos de plantas distintas) por cada uno de los extractos correspondiente a una muestra de suelo.

El tiempo de exposición de los cortes fue de 24 horas, seguido de un tiempo de recuperación de 6 horas, durante el cual los cortes fueron sumergidos en solución nutritiva de Hoagland (Anexo B-1). Este periodo de recuperación es importante para que las células dañadas en profase 1, continúen su división y alcancen su etapa de tétrada, fase en la cual se realiza la determinación del biomarcador de efecto genotóxico. Durante el bioensayo se utilizó un testigo negativo en donde los cortes del bioindicador se expusieron solo a la solución que simula agua meteórica y

que se utilizó para la extracción de la fracción soluble de EPT. También se utilizó un testigo positivo, el cual consistió en soluciones de glifosato, que es un herbicida organofosforado, con concentraciones 0.1 M y 0.05 M. Tanto en el testigo negativo, como en los positivos, se procedió de la misma manera que en los extractos de suelo.

6.6.3 Diseño Experimental del Bioensayo 2

En este bioensayo, la exposición del bioindicador al extracto de la fracción soluble de EPT se realizó directamente en las macetas utilizadas para la propagación. Este bioensayo se propuso, porque una interacción muy importante es la de suelo y raíz, ya que la raíz es la primera barrera con la que interaccionan los EPT, y ahí ocurre otra interacción posiblemente más importante aun con los microorganismos. Lo propuesto por Ma (1976: En Rico, 2006) y que se aplicó en el bioensayo 1, es una exposición más alejada de la realidad, además, al hacer el corte la planta sufre en sí misma una serie de mecanismos bioquímicos que de algún modo podrían influir en los biomarcadores de efecto analizados (Ankley *et al*, 2010).

Para el bioensayo 2, se seleccionaron 2 macetas con al menos 3 plantas del bioindicador que presentaran inflorescencias jóvenes en etapa de tétrada. La exposición se realizó mediante riegos cada tercer día con 200 mL de la solución final de la extracción de la fracción soluble de EPT. El periodo de exposición del bioindicador en el bioensayo tuvo una duración total de 6 días (2 riegos) y posteriormente se aplicó un periodo de recuperación de 2 días, durante el que las macetas se regaron con solución nutritiva de Hoagland. En el caso del bioensayo 2, el testigo negativo se regó con la solución que simula agua meteórica y el testigo positivo fue nuevamente soluciones de glifosato a una concentración de 0.1 M y 0.05 M, siguiendo el mismo procedimiento de exposición y recuperación descritos para los extractos de las muestras de suelo superficial.

6.6.4 Determinación de Micronúcleos como Biomarcadores de daño Genotóxico.

Primero se realizó la fijación, en la cual las inflorescencias y los pelos estaminales son cortadas de los tallos y de las flores respectivamente, y después se desarrollo el procedimiento establecido por Ma *et al* (1978: En Rico, 2006) y que se describe a continuación.

Las fijaciones son colocadas por un periodo de 24 horas en un vaso de precipitados con 50 mL de una solución de etanol-ácido acético (3:1). Posteriormente se procede con un análisis por

microscopía. En caso de no realizar el análisis a microscopio inmediatamente, las fijaciones se almacenaron en una solución de etanol al 70%. Las yemas que contienen a las células en etapa de tétrada, fueron disectadas bajo observación en un estereoscopio y una vez liberadas las células meióticas, la muestra se colocó en un portaobjeto y se añadieron 100 μ L del colorante acetocarmin al 0.5% para posteriormente colocar el cubre objetos y calentar en una lámpara de alcohol presionando suavemente para extender las tétradas y facilitar la observación. Las preparaciones de cada grupo experimental se observaron en un microscopio óptico utilizando una ampliación 40x para realizar el conteo de células en etapa tétrada registrando el número de células que presentaron 0, 1, 2, 3 o más micronúcleos hasta contabilizar un total de 1500. La cantidad total de micronúcleos se dividió entre el número total de tétradas observadas, y al multiplicar por cien se obtuvo el porcentaje, a partir de los cuales se calculó promedio y error estándar de cada grupo. En ambos bioensayos (1 y 2) se aplicó el mismo procedimiento.

Se aplicó un análisis estadístico para comparar las diferencias entre los porcentajes correspondientes a los grupos testigos y tratamientos, obteniendo así la mediana del número de micronúcleos observados; para ello se incluyó el análisis U-Mann Whitney, estableciendo un nivel de significancia de $p < 0.05$. Además, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para verificar las diferencias entre cada muestra y sitio de muestreo, así como identificar una posible correlación con la frecuencia de micronúcleos.

6.6.5 Determinación del Estrés Fisiológico

En la evaluación de los efectos fitotóxicos en el bioindicador, se incluyó esta etapa de trabajo experimental considerando aprovechar lo previsto en los bioensayos para los micronúcleos, para determinar la factibilidad de incluir otros biomarcadores de efectos fisiológicos mediante la aplicación de las técnicas de evaluación de estrés vegetal que a continuación se detallan.

a) Medición de la Conductancia Estomática

La conductancia estomática se midió directamente en las hojas del bioindicador con la ayuda de un porómetro marca SC-1, el cual aplica una técnica no destructiva que funciona bajo el principio del Estado Estacionario; midiendo la presión de vapor y el flujo de vapor sobre la superficie de la hoja en $m \cdot mol/m^2 \cdot s$. La pinza del porómetro, que incorpora una cámara con un recorrido de difusión conocido, se fija a la superficie de las hojas, y a continuación se comienza a medir la presión de vapor entre dos puntos de esta trayectoria, para calcular el flujo y el

gradiente con las medidas de presión de vapor y conductancia de difusión conocida (Cruz & Melgarejo, 2010). En el bioensayo 1, las mediciones se realizaron cada 6 horas obteniendo un total de 5 lecturas de conductancia estomática a lo largo de los periodos de exposición y de recuperación en cada uno de los cinco cortes de cada unidad experimental. En el bioensayo 2, las mediciones se realizaron cada 8 horas y se obtuvieron en total 13 lecturas, las mediciones se realizaron en 8 hojas seleccionadas aleatoriamente de cada maceta.

b) Medición de la Concentración de Pigmentos Fotosintéticos.

Para determinar el contenido de pigmentos fotosintéticos, en ambos bioensayos se utilizó una técnica destructiva, pero sin que interfiriera con la prueba de micronúcleos, pues al terminar los periodos de exposición, en ambos casos se recolectaron hojas para proceder con la cuantificación de clorofilas, la única diferencia que se presentó entre el bioensayo 1 y el bioensayo 2 fue el número de réplicas analizadas, que fueron 5 en el primer caso y 8 en el segundo, y esto se debió a que el bioensayo 2 presentaba una mayor área foliar. El procedimiento aplicado se describe a continuación.

Al finalizar el periodo de exposición, se procedió a cortar aleatoriamente de tres a cinco hojas por planta, las cuales se protegieron de la luz inmediatamente después de separarse del tallo para evitar la degradación de la clorofila. Posteriormente, cada muestra de hojas se pesó en una balanza analítica y después, en ausencia de luz, se procedió a triturarlas y molerlas en un mortero con acetona al 80%. A continuación, el extracto se colocó en un tubo para centrifuga y se aforó a 15 mL, para después centrifugar a 3000 rpm durante 15 min. Finalmente, se determinó la absorbancia del sobrenadante en un espectrofotómetro UV-Vis en las longitudes de onda de 470 nm, 646 nm y 663 nm (González, 2009).

Para calcular las concentraciones en $\mu\text{g/mL}$ de clorofila a (Cl a), clorofila b (Cl b), y xantofilas y carotinoides (x+c), se aplicaron las Ecuaciones 1 a 3, propuestas por Lichtenthaler y Wellburn (1987: En González, Perales, & Salcedo, 2008). Por último, se calculó la concentración de clorofilas en $\mu\text{g/g}$ de peso fresco.

$$\text{Cl a} = 12.21 \times (\text{absorbancia}_{663 \text{ nm}}) - 2.81 \times (\text{absorbancia}_{646 \text{ nm}}) \quad (\text{Ec. 1})$$

$$\text{Cl b} = 20.13 \times (\text{absorbancia}_{646 \text{ nm}}) - 5.03 \times (\text{absorbancia}_{663 \text{ nm}}) \quad (\text{Ec. 2})$$

$$x+c = [1000 \times (\text{absorbancia}_{470 \text{ nm}}) - 3.27 \times (\text{Cl a}) - 107 \times (\text{Cl b})] / 229 \quad (\text{Ec. 3})$$

6.7 Análisis estadístico.

Los valores de la media y su desviación estándar fueron calculados para cada grupo de tratamiento y los controles. Para la determinación de la significancia estadística entre las medias, se aplicó una prueba de ANOVA de un factor ($p < 0.05$), y paralelamente la prueba de Tukey.

En el caso de las pruebas de micronúcleos se realizó una prueba de comparación múltiple de Dunnett para establecer las medias altamente significativas. También se realizó la prueba de Correlaciones Múltiples. Para todos los cálculos estadísticos se utilizó el programa SAS© 2003.

En las Figuras 11 y 12, se presentan resúmenes esquemáticos de los procedimientos realizados para el bioensayo 1 y bioensayo 2, respectivamente.

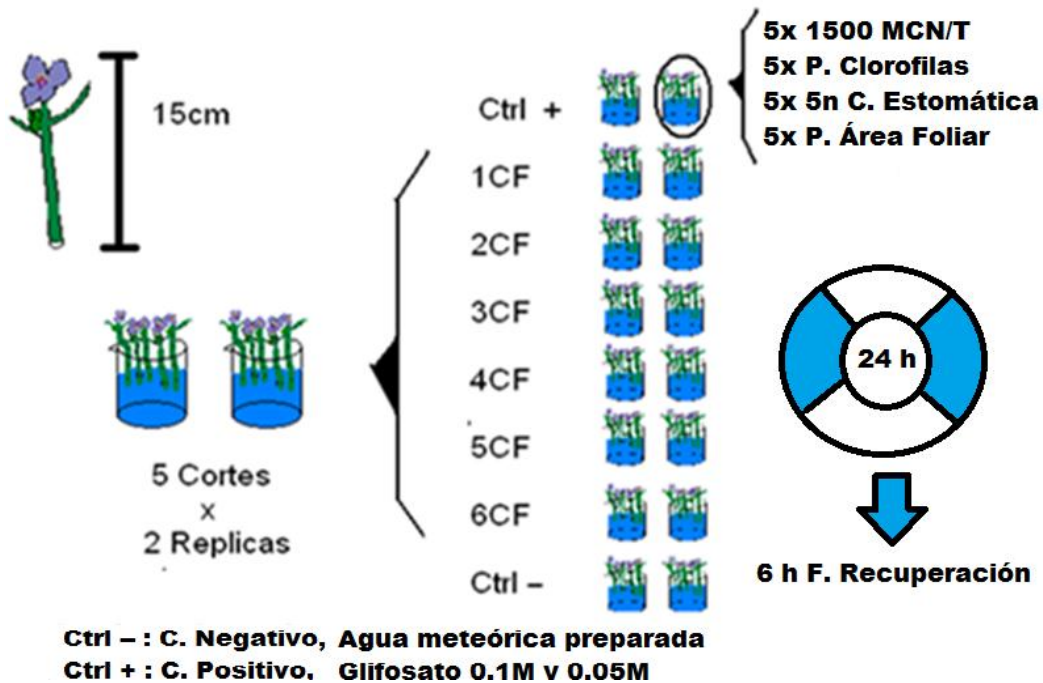


Figura 11. Diagrama esquemático del diseño experimental del bioensayo 1.

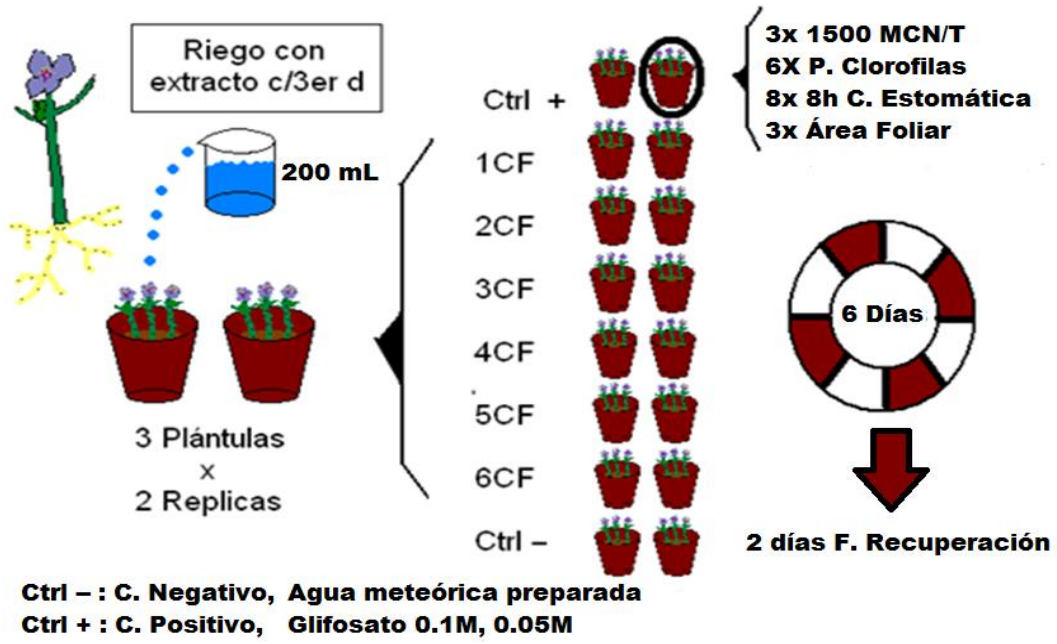


Figura 12. Diagrama esquemático del diseño experimental del bioensayo 2.

7. RESULTADOS Y DISCUSIONES

7.1. Concentración total recuperable de EPT en suelo superficial

Para implementar los bioensayos propuestos en este estudio, se seleccionó un pasivo ambiental minero-metalúrgico donde previamente se reportaron elevados niveles de Pb, As, Hg y Cd en suelo superficial y en donde los potenciales riesgos asociados a la contaminación no repercutieran principalmente en la población humana (Mayorga, 2012). No obstante, los resultados de la concentración total de los 18 EPT analizados en las muestras de suelo superficial fueron en primera instancia contrastados contra las concentraciones de referencia totales establecidos en la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004, los cuales están claramente referidos a niveles que procuran la protección de la salud humana. Para aquellos EPT que fueron analizados pero que no están incluidos en la normativa nacional, se emplearon concentraciones de referencia de Australia y que también están referidos a potenciales riesgos para la salud humana. Como concentraciones de referencia también se incluyeron aquellas reportadas como típicas de suelos no contaminados en varias partes del mundo (Tabla 2).

Tabla 2. Concentraciones de referencia totales por tipo de uso de suelo de la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004 y valores de referencia de otras fuentes. Todas las concentraciones están expresadas en mg/kg.

Elemento	Uso agrícola/residencial ¹	Uso industrial ¹	Uso residencial ²	Suelo no perturbado ³
Arsénico (As)	22	260	100	6.8
Bario (Ba)	5400	6700	-	460
Berilio (Be)	150	1900	20	1.3
Cadmio (Cd)	37	450	20	0.4
Cromo (Cr)	280	510	100	59.5
Mercurio (Hg)	23	310	15	0.07
Níquel (Ni)	1600	20000	600	29
Plata (Ag)	390	5100	-	0.13
Plomo (Pb)	400	800	300	27
Vanadio (V)	78	1000	-	129
Antimonio (Sb)	-	-	-	0.67
Cobalto (Co)	-	-	100	11.3
Cobre (Cu)	-	-	1000	38.9
Estroncio (Sr)	-	-	-	175
Hierro (Fe)	-	-	-	35000
Manganeso (Mn)	-	-	1500	488
Oro (Au)	-	-	-	0.003
Zinc (Zn)	-	-	7000	70

¹ Valores establecidos en la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004.

² Niveles de suelo residencial estándar para investigaciones basadas en salud en sitios contaminados, propuestos por el Departamento de Salud de Queensland, Australia (Imray & Langley, 2001).

³ Concentraciones promedio en suelos naturales de varias partes del mundo reportados por Kabata- Pendias (2010).

Las estadísticas que describen a las concentraciones totales de los EPT en las muestras de suelo superficial, se presentan en la Tabla 3. Al contrastar los resultados de la Tabla 3 contra los valores reportados en la Tabla 2, es posible observar que la mayoría de valores mínimos de EPT en las muestras de suelo son cercanos o menores a los reportados para suelos no impactados, y sólo unos pocos EPT superan su respectivo valor de referencia para suelos no contaminados. Sin embargo, cuando se comparan los valores máximos, claramente se distingue una diferencia, pero sólo las concentraciones de As, Hg y Pb superaron los criterios de la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004 para suelo de uso residencial o agrícola. Sin embargo, cuando se utilizan las concentraciones de suelo no contaminados como referencias, es posible notar que las concentraciones de algunos EPT registradas en las muestras de suelo de Las Cuatas, claramente las superan por varias órdenes de magnitud.

Tabla 3. Estadísticas descriptivas de las concentraciones totales recuperables de los EPT analizados en las seis muestras de suelo superficial (0-25 cm).

Elemento	Mínimo	Máximo	Media	Mediana	Desviación Estándar
As	24	549	138	62	205
Ba	74	290	126	91	82
Be	1	2	1.4	1.2	0.4
Cd	0.4	11	4	2.5	4.3
Cr	18	40	24	21	8
Hg	0.8	43	9.7	3.6	16
Ni	10	26	15	11	6.2
Ag	0.8	29	6.5	2.2	11
Pb	34	2046	439	141	790
V	16	68	30	22	19
Sb	0.1	2	0.8	0.4	0.9
Co	4	11	5.9	5.2	2.6
Cu	18	257	78	42	92
Sr	18	49	27	23	11
Fe	12430	39037	18666	14743	10166
Mn	268	751	383	314	184
Au	0.1	0.4	0.2	0.2	0.1
Zn	60	971	281	126	353

Así, los EPT que destacaron por su concentración elevada según los valores de referencia establecidos en la Tabla 2, fueron As, Ag, Cd, Cu, Hg, Ni, Pb, Sb, V y Zn. Pero los más sobresalientes, según la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004 son As, Hg y Pb. Aunque el Cd no superó el criterio de la Norma Oficial Mexicana, si presentó concentraciones mayores que el valor de referencia de Australia. El resto de los EPT presentaron diferencias en uno o más puntos en el valor de referencia de un suelo no perturbado.

Las concentraciones de EPT presentaron una alta variabilidad con respecto al punto de muestreo, tal como lo indica la desviación estándar, que resulta relativamente alta en comparación con el valor de la media correspondiente, además de que se puede observar en el rango que existe entre el valor mínimo y máximo. Así, a pesar de su cercanía, las muestras de suelo presentaron variables concentraciones de EPT. De esta manera, se confirmó que la selección de puntos de muestreo fue adecuada, pues se buscó obtener muestras que presentaran un claro gradiente de concentración en los EPT, que permitiera distinguir relaciones causa-efecto en los bioensayos. La muestra que presentó las menores concentraciones de EPT se obtuvo del sitio 4CF, que corresponde a un área actualmente utilizada para agricultura (Figura 8), mientras que las concentraciones más elevadas de EPT se presentaron en el sitio 2CF, el cual corresponde al área con alto grado de disturbio, lo cual parece confirmar que de este sitio se recuperaron los residuos que fueron reprocesados.

Cabe resaltar que los EPT que se identificaron con niveles en suelo superiores a los criterios de la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004, es decir, Pb, As y Hg, coincidieron con los reportados en la misma condición por Mayorga (2012), excepto el Cd, que en el caso de este estudio no superó ningún criterio de la normativa nacional. Al respecto cabe mencionar que existió una diferencia importante en las características del muestreo realizado por Mayorga (2012) pues al tratarse de una caracterización orientada a evaluar la calidad del suelo con respecto a la protección de la salud humana, el suelo muestreado correspondió a la capa superficial (0-5 cm) por lo que las concentraciones de EPT que se reporta en el estudio previo resultaron ligeramente mayores que las encontradas en las muestras de mayor profundidad (0-25 cm) utilizadas en este estudio.

En el caso de arsénico (As), su presencia en el suelo del sitio de estudio está claramente relacionada con el pasivo ambiental, pues el sitio 2CF superó el valor de referencia de la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004 para suelo de uso industrial, mientras que los sitios 3CF, 5CF y 6CF superaron el valor de referencia de la norma para uso agrícola.

El mercurio (Hg) es de especial interés para este sitio, pues existen antecedentes históricos de la aplicación del proceso de amalgación por el método de patio en las haciendas que operaron en lo que hoy es la ciudad de Fresnillo. Es común que en los sitios donde se aplicó históricamente la amalgación, se encuentren concentraciones anómalas de Hg en suelos o sedimentos (Ogura, *et al*, 2003). En Las Cuatas, el sitio 2CF presentó la mayor concentración de Hg, superando por dos veces el valor de referencia que establece la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004 para uso de suelo agrícola. De acuerdo a lo propuesto por Mayorga (2012), es poco probable que las elevadas concentraciones de Hg halladas en Las Cuatas, correspondan a la dispersión de los residuos actuales, sino a la depositación de residuos arrastrados desde Fresnillo que no fueron recuperados para su reprocesamiento.

Para el Plomo (Pb), debido a su baja solubilidad cuando se libera al ambiente tiende a acumularse en el suelo, donde puede permanecer accesible a los seres vivos (Kabata-Pendias, 2010), sin embargo la barrera suelo-planta limita la transmisión de Pb a la cadena alimenticia, generalmente por procesos de inmovilización química en el suelo (Laperche *et al*, 1997). En el caso del sitio de estudio, la mayor concentración nuevamente se presentó en el sitio 2CF, donde se superó por más del doble el valor de referencia que establece la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004 para uso de suelo industrial, mientras que los sitios 3CF, 5CF y 6CF superaron el valor de referencia de la norma para uso agrícola.

Por lo anterior, las elevadas concentraciones de As, Hg y Pb encontradas en el suelo del sitio de estudio, sugieren potenciales riesgos ecológicos y/o a los cultivos, por lo que queda plenamente justificado evaluar los potenciales efectos fitotóxicos de estos EPT conjuntamente con otros que aunque no superaron los criterios de la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004, también se han reconocido como potenciales fitotóxicos.

En el caso del pH, propiedad química del suelo que tiene un efecto importante en la movilidad de EPT y en el desarrollo de los seres vivos (incluidos microorganismos y plantas); los suelos superficiales de Las Cuatas presentaron un valor promedio de 6.5 sin variaciones significativas entre el mínimo (5.7) y el máximo (6.7) por lo que se pueden clasificar como suelos ligeramente ácidos.



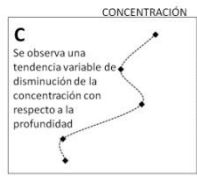
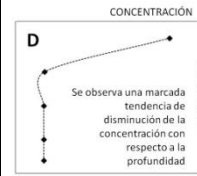
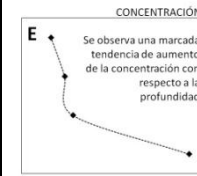
7.2. Concentración total recuperable de EPT en suelo a diferentes profundidades

El suelo actúa en general como una barrera de otros medios más sensibles (hidrológicos y biológicos). La variación en las propiedades del suelo, tales como pH, contenido de materia orgánica y de su calidad, la textura, la cantidad y calidad de los sitios de sorción, puede influir significativamente en su distribución así como en su disponibilidad para las plantas, pero cuando se supera su capacidad de retención para una o varias sustancias, el suelo actúa como fuente de contaminantes para otros medios (Galán & Romero, 2008).

Para determinar la distribución de los EPT con respecto a la profundidad del suelo, y así identificar procesos involucrados en su dinámica en este medio, se realizaron análisis de muestras de suelo a diferentes profundidades obtenidas en cada sitio de muestreo de suelo superficial. Los resultados de este análisis permitieron identificar que algunos EPT presentaban patrones de distribución con respecto similares, por lo que se procedió a clasificarlos de acuerdo a uno de los cinco perfiles característicos que describían las variaciones observadas en cada punto de muestreo. La Tabla 4 presenta los diferentes grupos obtenidos de la clasificación de EPT de acuerdo al perfil característico y por punto de muestreo. Con respecto a la profundidad, los sitios siguieron 5 tipos de patrones diferentes de concentración de cada EPT.

En el perfil A fue el característico de aquellos EPT que no presentaron variaciones significativas en sus concentraciones con respecto a la profundidad, sugiriendo la ausencia de un claro impacto en la superficie del suelo por depositación de residuos. Los EPT que frecuentemente presentaron este tipo de perfil fueron Mn, Au y Sb. El perfil B corresponde a aquellos EPT que presentaron una ligera tendencia a incrementar sus concentraciones en las profundidades intermedias, entre los que frecuentemente se presentaron Be, Fe, Co, V, Cr y Ni. El perfil C fue característico de aquellos elementos que mostraron una variable tendencia de su concentración a disminuir con respecto a la profundidad, y fue el perfil típicamente observado para el Zn, El perfil D describe a aquellos EPT que mostraron una clara tendencia de su concentración a disminuir después de los primeros 25 cm de profundidad y que correspondió comúnmente a Pb, Hg, As, Ag y Cu. El perfil E representa a los EPT cuya concentración se incrementó significativamente en las mayores profundidades, que fue lo más común para Ba y Sr. Cabe mencionar que el Cd fue el único EPT que mostró diferentes patrón de distribución por sitio de muestreo, por lo que no se pudo determinar su perfil característico.

Tabla 4. Distribución de los EPT en cinco distintos perfiles

Sitio	Clasificación de EPT según el tipo de perfil característico				
					
1CF	Mn	Be, Fe, Co, V, Cr, Ni, Cd	Zn, As, Cu	Pb, Hg, Ag, Sb, Au	Ba, Sr
2CF	Mn, Au	Fe, V, Cr, Ni, Cd, Pb, As, Zn, Cu, Ba, Hg, Sr, Ag, Sb	Co, Be	-	-
3CF	Mn, Au, Sb	Be, Fe, Co, V, Cr, Ni	Zn, Cd	Pb, Hg, Ag, As, Cu,	Ba, Sr
4CF	Au, Sb	Be, Fe, Co, V, Cr, Ni, Mn, Ba, Sr	Zn	Pb, Hg, Ag, As, Cu, Cd	-
5CF	Au, Sb, Cd	Be, Fe, V, Cr, Ni, Mn, Ba, Sr	Co	Pb, Hg, Ag, As, Cu, Zn	-
6CF	Au, Sb	Fe, V, Cr	-	Pb, Hg, Ag, As, Cu, Cd, Zn	Ba, Sr, Ni, Co, Be, Mn

El tipo de perfil y los EPT asociados a cada uno, sugiere diferentes orígenes de los EPT analizados, así, los perfiles A y E indican que posiblemente Mn, Au, Sb, Ba y Sr podrían estar más asociados a las condiciones naturales de los suelos que a una fuente antropogénica, mientras que por el contrario, los perfiles B, C y D sugieren que el resto de los EPT proceden de una fuente superficial y por ello se han acumulado en la superficie del suelo. Además, es interesante notar que en el caso del sitio 2CF, algunos EPT claramente asociados a fuentes minero-metalúrgicas (Pb, As, Zn, Cu, Hg, Cd, etc.) presentaron un patrón de distribución atípico con respecto a los otros sitios de muestreo, lo cual podría explicarse porque este sitio representa el área de acumulación de los residuos que se dispersaron desde Fresnillo y que fueron posteriormente recuperados para su reprocesamiento.

Estos resultados confirman que el suelo superficial, que representa la zona de exposición para la flora del sitio, presenta acumulación de los EPT procedentes de las fuentes minero-metalúrgicas.

7.3. Determinación de la fracción soluble (móvil) de EPT en suelo superficial

La movilidad de los EPT se refiere a la capacidad de éstos para transferirse a la fase acuosa y mantenerse ahí mientras ocurre su transporte y así, podrían ocasionar contaminación de los cuerpos de agua. Por ello, como medida de protección a los recursos hídricos, la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004 establece concentraciones de referencia solubles (CRs) como criterios de remediación de suelos contaminados. Los resultados de la prueba de movilidad para aquellos EPT que regula la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004 se presentan en la Tabla 5. En el Anexo C-3 se presentan las concentraciones totales del extracto y las concentraciones móviles del resto de EPT analizados.

Tabla 5. Concentración en el extracto y movilidad de EPT analizados en muestras de suelo superficial que incluye la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004

Sitio	Concentración en el extracto (µg/L)							Movilidad (mg/kg)						
	As	Ag	Cd	Hg	Ni	Pb	V	As	Ag	Cd	Hg	Ni	Pb	V
1CF	9.1	0.7	0.3	19.2	8.5	17.5	5.7	0.2	0.01	0.01	0.4	0.2	0.4	0.1
2CF	337.3	2.9	0.7	16.3	4.3	99.5	9.3	6.7	0.06	0.01	0.3	0.1	2.0	0.2
3CF	17.2	0.7	0.3	11.2	4.0	16.7	8.1	0.3	0.01	0.01	0.2	0.1	0.3	0.2
4CF	11.7	0.4	0.3	9.2	5.9	21.7	12.3	0.2	0.01	0.01	0.2	0.1	0.4	0.2
5CF	61.6	1.3	0.7	7.8	5.1	39.1	8.4	1.2	0.03	0.01	0.2	0.1	0.8	0.2
6CF	120.4	6.2	2.9	7.6	8.1	196.6	13.5	2.4	0.12	0.06	0.2	0.2	3.9	0.3
CRs	500	500	100	20	1100	500	160	-	-	-	-	-	-	-

Como puede observarse en la Tabla 5, las concentraciones solubles de EPT no superaron en ninguno de los casos a las CRs que establece la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004. Sin embargo, es importante resaltar que todos los EPT analizados presentaron concentraciones detectables en todos los extractos finales de la prueba de movilidad, siendo sobre todo destacables las concentraciones solubles de As, Hg y Pb, que si bien no superaron a su respectiva CRs, fueron cercanas en algunas de las muestras de suelo superficial. Cabe destacar el caso de la muestra 2CF y 6CF las cuales presentaron las mayores concentraciones

solubles de As y Pb, así como la muestra 1CF, que presentó la mayor concentración soluble de Hg. Es interesante notar que no se observó una relación directa entre la concentración total y la concentración móvil, es decir, las concentraciones móviles más altas de algunos EPT no se registraron en aquellas muestras que presentaron las mayores concentraciones totales de los mismos. Esto indicaría que la movilidad de los EPT está determinada por otros factores diferentes a la concentración total.

La transferencia de EPT a la fase acuosa del suelo depende principalmente de la solubilidad de los minerales portadores (Smith & Huyck, 1999), pero una vez que los EPT se disuelven, su movilidad estará controlada por la estabilidad de las especies en solución bajo las condiciones particulares del suelo como pH, conductividad, potencial redox, contenido de materia orgánica y la carga superficial de adsorbentes que depende a su vez del pH (Siegel, 2002). La influencia que tienen estos factores depende del EPT, así por ejemplo, en el caso del As, su movilidad se incrementa cuando el medio se vuelve más ácido y más reductor, y disminuye cuando ocurre el cambio contrario (Siegel, 2002). En el caso de otros EPT, como Pb y Cd, sus movilidades aumentan cuando el medio se vuelve más ácido y más oxidante y viceversa (Siegel, 2002). Por otra parte, la composición mineralógica de los suelos también tendría una importante influencia en el control de la movilidad de los EPT, por ejemplo, la presencia de óxidos de Fe representa un importante control de la movilidad de As por mecanismos de adsorción (Smedley & Kinniburgh, 2002). En el caso del Hg, se ha reconocido una importante influencia de su forma química, así el HgCl_2 tiene una muy alta solubilidad acuosa (69 g/L a 20 °C), seguida de sus compuestos orgánicos (0.1 a 1 g/L a 21 °C), mientras que las solubilidades del Hg^0 , Hg_2Cl_2 y el HgS , son muy bajas ($<2 \times 10^{-3}$ g/L a 25 °C) (ATSDR, 1999). No obstante, la movilidad del Hg no dependen exclusivamente de la especie química presente, sino además de las características fisicoquímicas del medio, de tal manera que la presencia de iones Cl^- , el pH, el potencial de óxido-reducción, el contenido de materia orgánica, entre otros, son factores que controlan la disolución y movilidad química de Hg en los medios naturales (Gabriel & Williamson, 2004). Sin contar con mayor información sobre la especiación de los EPT y las condiciones fisicoquímicas de los suelos del sitio de estudio, no es posible determinar cuáles son los factores involucrados en el control de la movilidad de los EPT analizados.

De acuerdo a los resultados de movilidad, el área de Las Cuatas no debería someterse a un proceso de remediación orientado a la protección de los recursos hídricos. Sin embargo, las concentraciones solubles que se obtuvieron en el extracto final podrían representar potenciales afectaciones en otros recursos, pues una vez liberados a la fase acuosa del suelo, los EPT también podrían quedar disponibles para ser absorbidos por las plantas y causar efectos

fitotóxicos (Kabata-Pendias, 2011). Por ello, en este trabajo se procedió a evaluar la fitotoxicidad de la fracción soluble de EPT mediante bioensayos.

7.4. Bioensayos

7.4.1. Prueba de Micronúcleos (MCN) en *Tradescantia Clon 4430*

Los micronúcleos se forman por la ruptura de cromosomas provocada por distintas sustancias mutagénicas durante la meiosis, por ello, la frecuencia de formación de micronúcleos representa una medida del potencial genotóxico del ambiente (Zeballos *et al*, 2006). En este estudio, se consideró evaluar el efecto genotóxico causado por la exposición del bioindicador *Tradescantia Clon 4430* a la fracción soluble (o móviles) de EPT de los suelos del sitio de estudio. En el Bioensayo 1, el cual representa al método estandarizado para evaluar efectos genotóxicos en el bioindicador, se registraron los resultados presentados en la Figura 13, en la cual se representa la frecuencia de MCN representada en el número de células que presentaron MCN por cada 100 células en fase tétrada observadas.

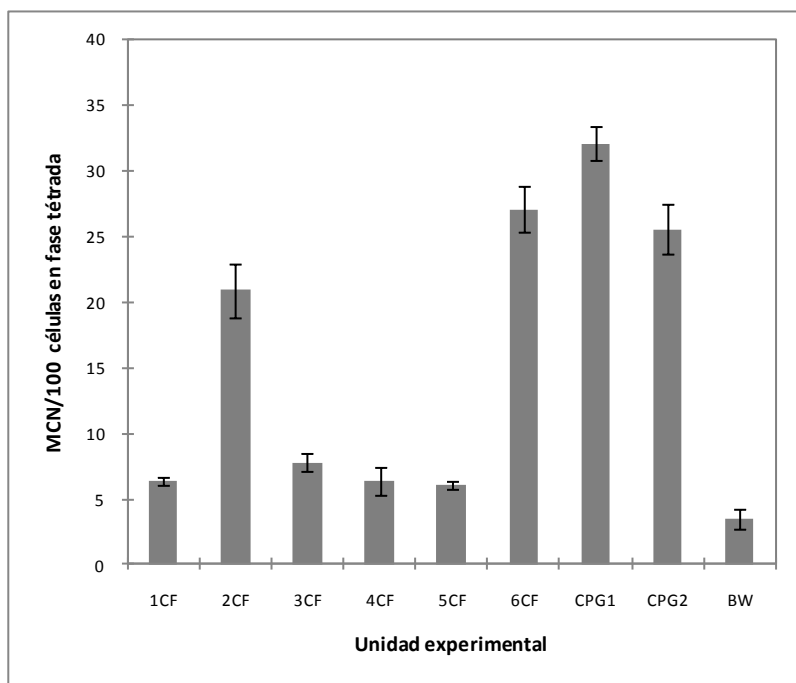


Figura 13. Número de células con MCN por cada 100 células en fase tétrada. Las barras representan la desviación estándar. CPG1= Control positivo con solución de glifosato 0.05 M; CPG2= Control positivo con solución de glifosato 0.1 M; BW= Control negativo.

En la Figura 13 se debe resaltar en primer término que el control negativo (BW) resultó ser la unidad experimental que registró la menor proporción de células con MCN, aunque el valor obtenido fue relativamente alto con respecto a otros valores para controles negativos del bioindicador *Tradescantia Clon 4430* reportados (García & Carreras, 2008; Iannacone & Dale, 1999; Meravi & Prajapati, 2013). Cabe recordar que los controles negativos de los bioensayos consistieron en exponer al bioindicador a un blanco de la solución de extracción empleada para determinar la fracción soluble de EPT, la cual consistió en agua meteórica simulada, es decir, desionizada con pH 5.5, ajustado con CO₂, por lo que este bajo valor de pH pudo ser la causa de que el control negativo registrara proporciones relativamente altas de células con MCN, pues los métodos empleados en la mayoría de los trabajos reportados han realizado la exposición utilizando soluciones de pH neutro (Misík *et al*, 2011; Meravi & Prajapati, 2013). Con respecto a los controles positivos (CPG1 y CPG2), es posible observar que registraron los valores más altos del bioensayo, confirmando se esta manera la respuesta del bioindicador a un agente genotóxico reconocido, como lo es el herbicida glifosato (Alvarez-Moya C, 2011).

Con respecto al efecto de las fracciones solubles de EPT, es posible observar que todas las muestras presentaron efectos en la producción de MCN significativamente superiores al control negativo, y en particular resaltan las muestras 2CF y 6CF, cuyos resultados con incluso comparables con los controles positivos. Es importante resaltar que ambas muestras presentaron las concentraciones solubles más altas de EPT (Tabla 5) y así, que el bioindicador empleado en este bioensayo tuvo una respuesta proporcional a la exposición de EPT, particularmente a aquellos reconocidos como genotóxicos como son As, Pb, Be, Ni, Cr y Cd (Thomas, 1996).

El análisis estadístico ANOVA de la prueba demostró que existen diferencias significativas entre los diferentes tratamientos de exposición ($p < 0.0001$), además la prueba Dunnett, en donde se obtuvo $\alpha = 0.05$ y un valor crítico de 3.26, y la prueba Tukey reportó 5 grupos divididos de la siguiente forma: (CPG1) (6CF, CPG2) (2CF) (3CF, 4CF, 1CF, 5CF) y (BW); pudiéndose apreciar que el tratamiento con el extracto 6CF presentó un efecto estadísticamente similar a CPG2, y que todos los tratamientos con extractos de la fracción soluble de EPT fueron significativamente diferentes al tratamiento BW. También es importante señalar que a pesar de que CPG1 tuvo una concentración de glifosato de 0.05M, superó la genotoxicidad de CPG2 de una concentración de glifosato de 0.1M.

Durante el conteo de células con MCN, se determinó el número de MCN que había en cada célula en etapa tétrada, pues se observó que no solo hubo formación de 1 o 2 MCN en cada

célula observada, que era lo esperado, si no que se observaron casos de células con 3 o más MCN formados, por lo cual puede considerarse que el desprendimiento de material genético fue alto. En la Figura 14 se presenta el número total de MCN observados en cada unidad experimental, y como puede apreciarse, no hubieron variaciones en los patrones de efectos por la exposición a los EPT o controles, sin embargo si en el factor cuantitativo. El análisis estadístico de la prueba mostró que si existen diferencias significativas con una ANOVA de ($p < 0.0001$), mientras que en la prueba Dunett se obtuvo $\alpha = 0.05$ y un valor crítico de 3.26. Los resultados de la prueba Tukey indicó 7 grupos divididos de la siguiente forma: (1CPG) (6CF) (2CPG) (2CF) (3CF) (1CF, 4CF, 5CF) y (BW).

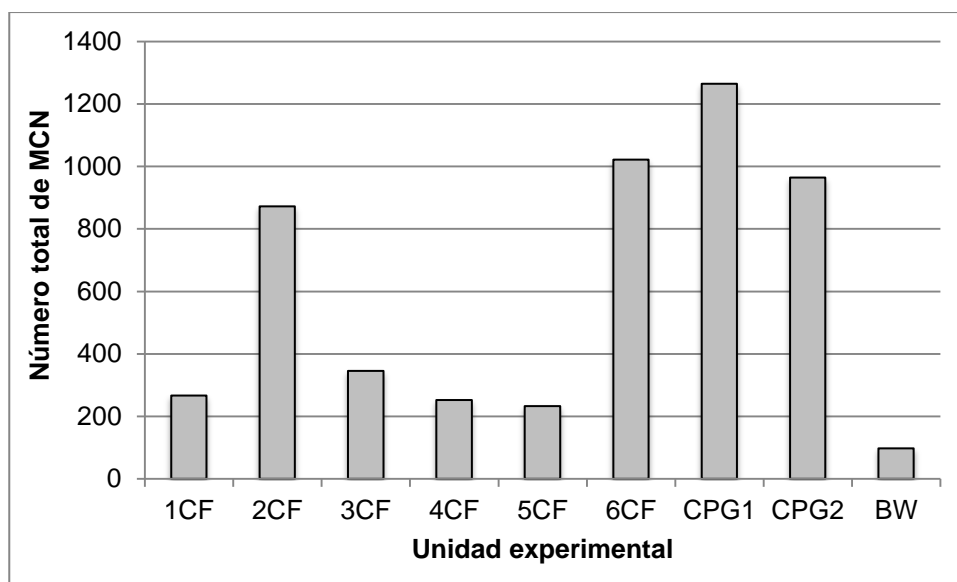


Figura 14. Número total de MCN por unidad experimental. CPG1= Control positivo con solución de glifosato 0.05 M; CPG2= Control positivo con solución de glifosato 0.1 M; BW= Control negativo.

Es importante resaltar que en el modelo experimental que se propone en este estudio para determinar el efecto fitotóxico de la fracción soluble de EPT, el bioindicador es expuesto a una mezcla compleja de potenciales agentes genotóxicos que incluye no sólo a los EPT que se analizaron, sino además a otros contaminantes probablemente presentes en los suelos y solubles bajo las condiciones de la extracción con agua meteórica simulada. Al respecto, en un estudio presentado por Čėsniėnė et al (2007), empleando un modelo similar al realizado en este estudio pero donde se obtuvieron concentraciones totales de EPT más bajas y donde los EPT más relevantes fueron Al, Fe y Co, se encontró la presencia de un compuesto orgánico activo, no identificado, al que se asoció los principales efectos genotóxicos. En el caso de las muestras de suelo que se evaluaron en este trabajo, es importante considerar que debido a su

procedencia, en algunas de ellas es probable la presencia de agentes fitotóxicos que por no haberse analizado no es posible aún confirmar su presencia o su ausencia, por ejemplo, las muestras obtenidas de áreas de cultivo podrían presentar concentraciones residuales de herbicidas, no obstante, aún bajo esta sospecha, la potencial contribución de otros agentes genotóxicos, aparentemente no tuvo efectos significativos en la diferenciación de los tratamientos. Por ello, se debe resaltar como una característica importante para este tipo de bioensayos, la sensibilidad del bioindicador seleccionado, aunque su especificidad sea baja.

En el caso del Bioensayo 2, no fue posible obtener resultados de la determinación de MCN debido a que al observar en el microscopio, las células ya no se encontraban en etapa tétrada, lo cual al parecer es algo común cuando no se coordinan adecuadamente los periodos de exposición con el ciclo reproductivo del bioindicador (García & Carreras, 2008). Cabe recordar que en el caso del bioensayo 2, la exposición se programó para un periodo de una semana, por lo que al concluir éste, las células ya habían concluido su fase reproductiva.

7.4.2. Determinación de la Concentración de Pigmentos Fotosintéticos.

El análisis de la emisión de fluorescencia de las clorofilas asociadas a los fotosistemas I y II del aparato fotosintético de plantas terrestres, hace posible caracterizar los efectos y modos de acción de diferentes tipos de estrés ambiental (González, Perales, & Salcedo, 2008). Esto es posible debido a las funciones específicas de la clorofila a y de la clorofila b, las cuales se relacionan con la productividad de las plantas, en aspectos fotoquímicos (Lichtenthaler & Burkart, 1999).

Los resultados de la determinación de pigmentos fotosintéticos en el bioensayo 1, mostraron un aumento en la concentración de todos los pigmentos fotosintéticos, con respecto al control negativo. Los tratamientos que presentaron los mayores incrementos fueron los controles positivos con glifosato (CPG1, CPG2), así como los extractos de EPT solubles correspondientes a las muestras 2CF y 6CF (Figura 15).

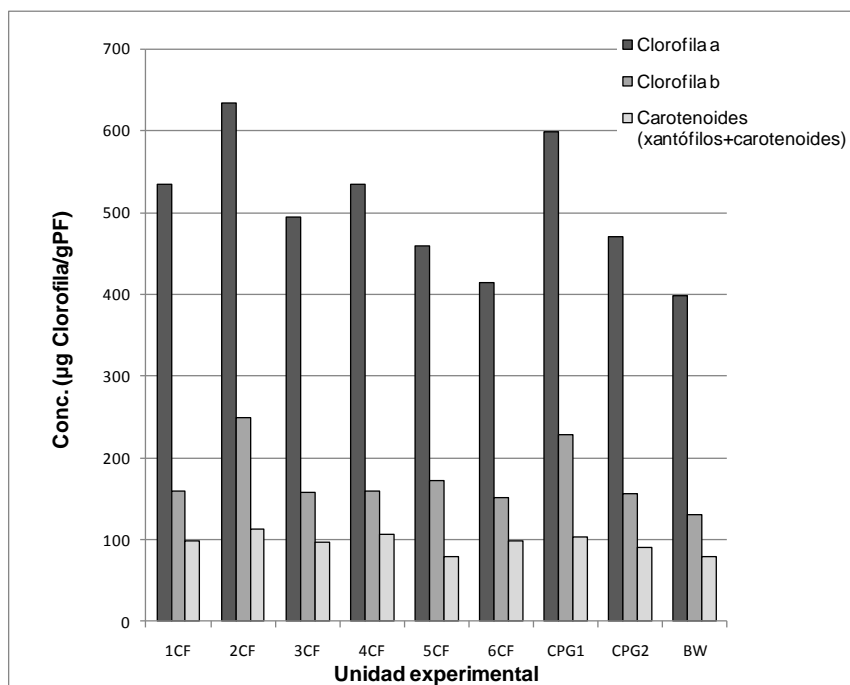


Figura 15. Concentración de pigmentos fotosintéticos del bioensayo 1. CPG1= Control positivo con solución de glifosato 0.05 M; CPG2= Control positivo con solución de glifosato 0.1 M; BW= Control negativo.

Sin embargo, para evaluar los posibles efectos fitotóxicos en el bioindicador, este estudio se basó en la relación de clorofila a y clorofila b (Cl_a/Cl_b), la cual debe variar entre 2.9-3.4, ya que si esta relación se cumple, es posible descartar efectos en la producción de ambas clorofilas (Lichtenthaler & Burkart, 1999). Los resultados de esta relación se presentan en la Tabla 6, en donde se puede apreciar que los tratamientos que no cumplieron este criterio fueron el control positivo 1 (CPG1) así como los extractos de los sitios 2CF, 5CF y 6CF.

Otra relación relacionada a la producción de pigmentos en las hojas, es aquella que se presenta entre las clorofilas y los carotinoides $[(Cl_a + Cl_b) / Cl(x+c)]$, la cual debe ser mayor de 4.9; de lo contrario la hoja llegaría a un proceso, natural o antropogénico, de senescencia (Lichtenthaler & Burkart, 1999). Para este criterio, es posible observar en la Tabla 6, que todos los tratamientos, incluyendo los controles positivos, cumplieron el criterio.

Tabla 6. Concentraciones y relaciones entre las Clorofilas y Carotenoides en el bioensayo 1

Unidad experimental	Clorofila a Cla	Clorofila b Clb	Carotenoides Cl(x+c)	Cla/Clb	Cla+Clb/ Cl(x+c)
	µg/g PF				
1CF	534,8	159,4	98,7	3,4	7,0
2CF	633,9	249,8	112,6	2,5	7,8
3CF	493,9	157,2	97,0	3,1	6,7
4CF	534,6	158,9	106,5	3,4	6,5
5CF	459,3	171,8	78,9	2,7	8,0
6CF	414,1	152,2	98,2	2,7	5,8
CPG1	598,7	229,1	104,1	2,6	8,0
CPG2	471,0	155,5	91,1	3,0	6,9
BW	399,0	131,1	79,2	3,0	6,7

El análisis estadístico de los resultados de concentraciones de los pigmentos fotosintéticos mostraron para el bioensayo 1, que no hubo diferencias significativas ($p > 0.05$) en la concentración de los tres pigmentos fotosintéticos para todos los tratamientos, mientras que en las relaciones Cla/Clb se presentaron diferencias significativas ($p = 0.0409$) entre dos grupos de los cuales uno está formado por CPG1 y 2CF, y el otro está integrado por el resto de los tratamientos, incluyendo BW. En cuanto a la relación entre las clorofilas y los carotenoides [(Cla+Clb)/ Cl(x+c)] no se presentaron diferencias significativas.

González (2009) reportó una disminución en la relación de clorofila a y clorofila b (Cla/Clb= 2.8) asociada a variación en la cantidad y calidad de la luz a la que es expuesta la planta, demostrando que existe reducción de la actividad del Fotosistema I y el Fotosistema II, cuando la cantidad de luz disminuye e incrementa el tamaño de la antena receptora, Durante el proceso de senescencia foliar la relación Cla/Clb disminuye, principalmente por la degradación de la Cla y por ende de la productividad de la planta, afectando la función del fotosistema II lo cual modifica la emisión de fluorescencia (González, Perales, & Salcedo, 2008).

En el caso del bioensayo 2, las concentraciones de clorofilas siguieron el mismo comportamiento que en el bioensayo 1, pues se observaron mayores concentraciones en todos los tratamientos con respecto al control negativo (Figura 16).

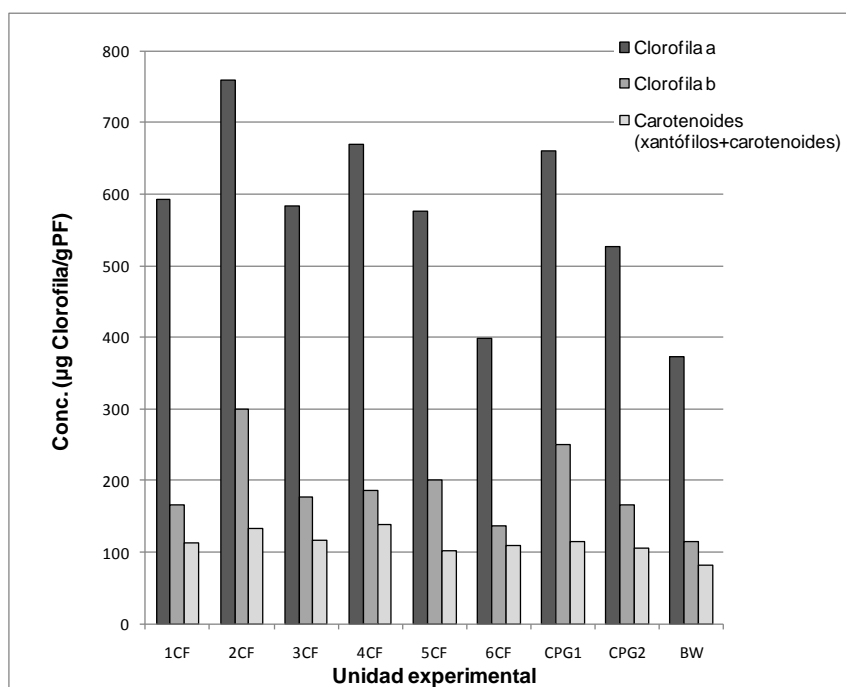


Figura 16. Concentración de pigmentos fotosintéticos del bioensayo 2. CPG1= Control positivo con solución de glifosato 0.05 M; CPG2= Control positivo con solución de glifosato 0.1 M; BW= Control negativo.

Con respecto a las relaciones entre clorofila a y clorofila b, los tratamientos que no cumplieron con el criterio establecido para la producción normal de clorofilas (2.9-3.4) fueron CPG1 y 2CF, sugiriendo un posible efecto por la exposición a la fracción soluble de EPT debido a que la muestra 2CF presentó las mayores concentraciones de la mayoría de los EPT analizados. En el caso de la relación entre las clorofilas y los carotenoides $[(Cl_a+Cl_b)/ Cl(x+c)]$ la cual debe ser mayor a 4.9, sólo el tratamiento con el extracto de la muestra 6CF fue cercano a este límite, indicando la etapa inicial a una senescencia inducida por la exposición a EPT.

De acuerdo al análisis estadístico de los resultados del bioensayo 2, las relaciones Cl_a/Cl_b no presentaron diferencias significativas, no obstante que los tratamientos CPG1 y 2CF presentaron valores bajos de esta relación. En cambio la relación $[(Cl_a+Cl_b)/ Cl(x+c)]$ mostraron diferencias significativas ($p=0.0485$), donde la prueba Tukey arrojó tres grupos: en el primero se incluyen CPG1 y los sitios 2CF y 5CF; en el segundo grupo estarían los demás tratamientos excepto 6CF, el cual integra al tercer grupo.

Tabla 7. Concentraciones y relaciones entre las Clorofilas y Carotenoides en el bioensayo 2

Unidad experimental	Clorofila a Cla	Clorofila b Clb	Carotenoides Cl(x+c)	Cla/Clb	Cla+Clb/ Cl(x+c)
	µg/g PF				
1CF	591,9	166,5	112,7	3,6	6,7
2CF	760,2	299,0	133,6	2,5	7,9
3CF	583,1	177,5	116,2	3,3	6,5
4CF	668,9	186,6	139,1	3,6	6,2
5CF	575,8	201,6	101,2	2,9	7,7
6CF	397,9	136,2	110,0	2,9	4,9
CPG1	661,2	250,9	115,0	2,6	7,9
CPG2	526,7	165,1	106,3	3,2	6,5
BW	372,1	115,5	81,7	3,2	6,0

En un estudio donde se evaluó el efecto en la producción de clorofilas en clones de Lemnáceas expuestos subcrónicamente a Cu, Cd y Cr, se reportaron efectos graves en las hojas debido a que el Cu afectó negativamente la producción de clorofila a, mientras que el Cr no presentó efectos tan graves, pero el Cd causó los mayores efectos en la relación Cla/Clb alcanzando valores tan bajos como 1.5. Por lo tanto, es posible que los efectos menores en la producción de pigmentos fotosintéticos que se hallaron en el bioindicador *Tradescantia clon 4430* puedan asociarse a la exposición de EPT, pues la muestra 6CF, a la cual se asoció el mayor efecto en este biomarcador, correspondió también al extracto con la mayor concentración de Cd soluble (Tabla 5). Es importante resaltar que los resultados de la relación $[(Cla+Clb)/Cl(x+c)]$, aun cuando estadísticamente no mostraron diferencias significativas, se consideran de alta relevancia para el bioindicador ya que indica el inicio de la senescencia foliar para una especie que es perennifolia (González, Perales, & Salcedo, 2008)

7.4.3. Evaluación de la Conductancia Estomática

Para el bioensayo 1, la prueba de conductancia estomática se realizó durante un ciclo respiratorio del bioindicador. Los resultados de esta prueba se muestran en la Figura 16. Es posible observar que cuando el bioindicador *Tradescantia clon 4430* se expuso a los diferentes tratamientos, su conductancia estomática disminuyó con respecto al control negativo (BW), mostrando este efecto inicial en todos los sitios, con excepción de 3CF. Se observa también

que después de 6 horas de exposición (14:00 h) la conductancia estomática es baja, aunque este efecto es el esperado bajo condiciones normales, debido a que de manera natural los estomas se cierran a esta hora del día, sin embargo las mediciones se realizaron en un invernadero con condiciones controladas de temperatura y humedad, por lo que las diferencias observadas entre los diferentes tratamientos con respecto al control negativo (BW) se pueden asociar a la exposición a los extractos de EPT o al glifosato, en el caso de los controles positivos CPG1 y CPG2.

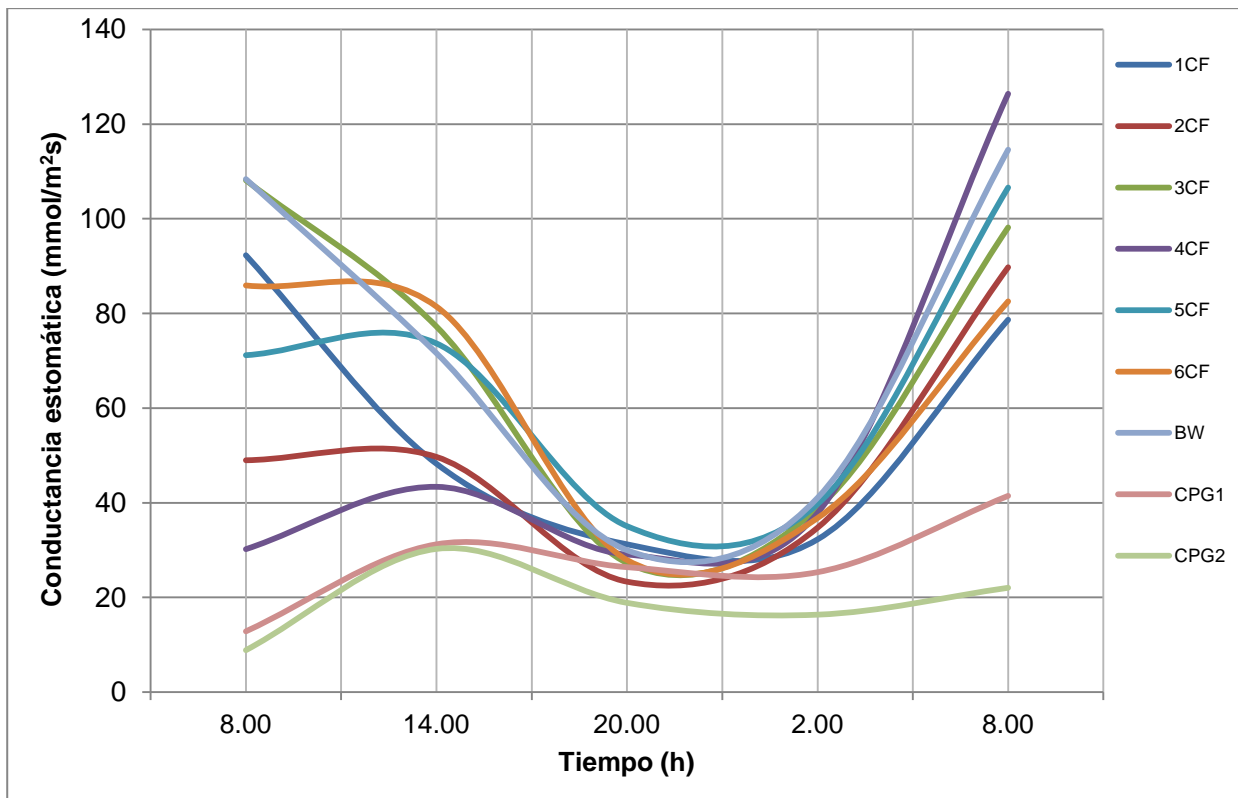


Figura 17. Variación de la conductancia estomática en el bioensayo 1. CPG1= Control positivo con solución de glifosato 0.05 M; CPG2= Control positivo con solución de glifosato 0.1 M; BW= Control negativo.

La exposición del bioindicador se concluyó a las 2:00 h e inmediatamente después inició la etapa de recuperación con la solución de Hogland por un periodo de 6 h. En este tiempo, se observa la recuperación de la conductancia estomática, cuando los estomas tienen una mayor eficiencia en el intercambio gaseoso, observando que la mayoría de los tratamientos, con excepción de los dos controles positivos, hubo una clara recuperación hasta aproximarse al

control negativo (BW). Como pruebas estadísticas se realizaron análisis factoriales con medidas repetidas mostrando diferencia significativas ($p < 0.05$); que en este caso estadísticamente se dividió en tres grupos, el primero con los controles positivos, en otro los sitios 2CF y 4CF, y en el último el resto de los tratamientos junto con el control negativo.

En el bioensayo 2, la conductancia estomática tuvo 5 ciclos, iniciando en una etapa de baja conductancia estomática del bioindicador (21:00 h) por lo que no fue posible apreciar el efecto inicial observado en el bioensayo 1. Además, debido a que la exposición a los EPT solubles no es directa, es posible observar un efecto retardado, incluso para los controles positivos, que podría deberse al tiempo necesario que tomó la absorción de los EPT, así, es posible observar efectos en la disminución de la conductancia estomática a partir del segundo ciclo en el caso de los controles positivos, y a partir del tercer o cuarto ciclo en el caso de algunos tratamientos con extractos de EPT solubles.

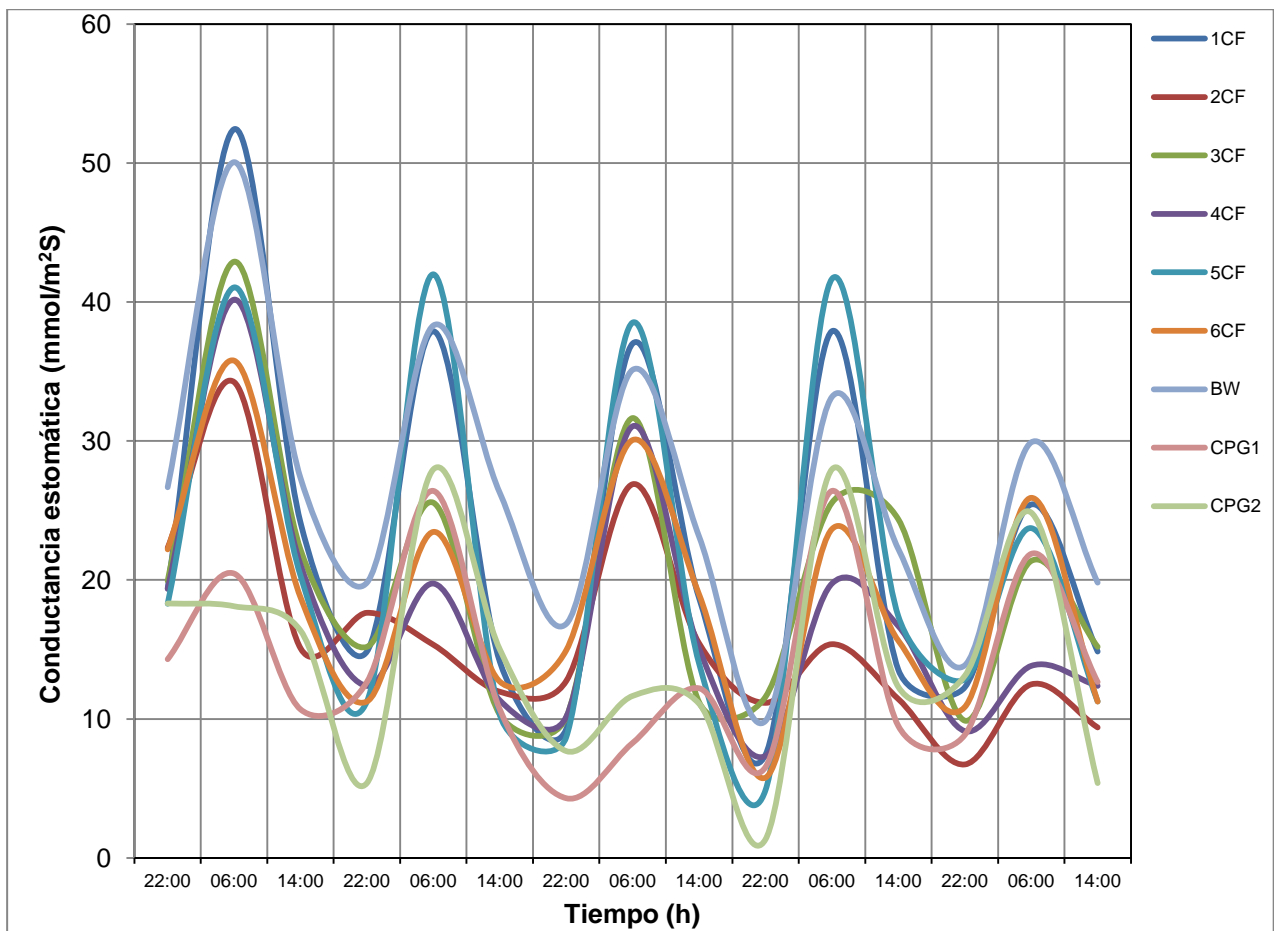


Figura 17. Variación de la conductancia estomática en el bioensayo 2. CPG1= Control positivo con solución de glifosato 0.05 M; CPG2= Control positivo con solución de glifosato 0.1 M; BW= Control negativo.

Las pruebas estadísticas de los resultados del bioensayo 2 se realizaron por análisis factorial con medidas repetidas, el cual reportó diferencias significativas ($p < 0.05$) para tres grupos, el primero integrado por ambos controles positivos, el segundo por el tratamiento 2CF y en el tercer grupo los demás sitios y el control negativo.

En ambos bioensayos se logró apreciar un efecto significativo en la conductancia estomática cuando el bioindicador se expuso, además de los controles positivos, al extracto del sitio 2CF, este efecto no solo se repite entre los bioensayos, sino entre la relación de pigmentos fotosintéticos y la prueba de genotoxicidad; de hecho Casson & Gray (2008) afirman que la conductancia estomática está relacionada a la formación de nuevos órganos de la planta, y un cambio ambiental que la afecte, también podría tener repercusiones mutagénicas, aunque faltaría evaluar si las diferentes condiciones ambientales evaluadas modifican la expresión de

moléculas que participan en otros procesos vitales, como por ejemplo los procesos reproductivos.

7.4.4. Integración de Resultados de la Fracción Soluble de EPT y sus Efectos Fitotóxicos

Establecer la relación causa-efecto cuando se evalúan biomarcadores de efecto no específicos ante la exposición a una mezcla de contaminantes, es complejo. Sobre todo si se considera los diferentes comportamientos que se pueden presentar entre los contaminantes, por ejemplo, algunos EPT pueden presentar antagonismo con respecto a unos y/o sinergismo con respecto a otros (Rodrigues et al,1997).

Aunque el objetivo principal de este estudio fue diseñar un modelo experimental para determinar la fitotoxicidad de la fracción soluble de EPT en suelos contaminados, se consideró relevante identificar las asociaciones estadísticamente significativas entre los biomarcadores de efecto evaluados en el bioindicador y los EPT analizados. Para ello se realizó un análisis de correlaciones múltiples con el que se logró identificar algunas asociaciones interesantes. En el Anexo C4 se presentan los resultados de dichas correlaciones.

En el caso de MCN, los EPT que mostraron mejores correlaciones con el biomarcador fueron Cr, Cu, Zn, As, Ag, Cd, Sb, Au y Pb, la mayoría de los cuales se han reportado como potenciales genotóxicos (Thomas, 1996).

Mientras las correlaciones de las clorofilas, los EPT tuvieron correlaciones inversamente proporcional con el biomarcador, debido a que el valor de las relaciones entre la Cla/Clb en ambos bioensayos, tuvieron un efecto decreciente en función al aumento de la concentración de EPT y mostraron, Cu, As, Ag, Au, Sb y Pb, la mayoría de los cuales tienen efectos negativos en la relación de productividad de los pigmentos fotosintéticos (González, Perales, & Salcedo, 2008); de igual manera los EPT presentaron correlaciones inversamente proporcional con respecto a la relación de $\frac{Cla+Clb}{Cl(x+c)}$, que denota un efecto de senescencia foliar inducida por el aumento de las concentraciones de la mayoría de los siguientes EPT, como son Be, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Zn y Cd (González, Perales, & Salcedo, 2008).

La conductancia estomática, las concentraciones de EPT presentaron también correlaciones inversamente proporcional con este biomarcador fisiológico, en donde la presencia de Cr en el bioensayo 1 y Hg en el bioensayo 2 afectaron la tasa de intercambio gaseoso en los estomas.

8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El pasivo ambiental minero-metalúrgico que se seleccionó para el desarrollo de este trabajo, correspondió a un sitio impactado por residuos minero-metalúrgicos históricos que se han dispersado a las áreas circundantes ocasionando la contaminación de suelos de usos forestal y agrícola. Esto se comprobó con el resultado del análisis de 18 EPT en muestras superficiales representativas de los usos de suelo. De acuerdo a las concentraciones totales de referencia que establece la normativa aplicable, As, Pb y Hg resultaron ser los EPT de mayor relevancia para el sitio, sin embargo, otros EPT como Ag, Cd, Cu, Sb y Zn, presentaron concentraciones superiores a las reportadas como normales para suelos no contaminados, por lo que es posible asociar su presencia en relativamente altas concentraciones con la dispersión y depositación de residuos, lo cual fue respaldado por sus distribuciones con respecto a la profundidad del suelo, pues sus mayores concentraciones se presentaron típicamente en la sección más superficial de los diferentes puntos de muestreo, observándose una significativa disminución de éstas conforme se incrementó la profundidad del muestreo.

En ausencia de población humana, que es el caso del sitio de estudio, la normativa ambiental establece la evaluación de la movilidad de EPT como medida de protección de los recursos hídricos. Los resultados de movilidad indicaron que ninguno de los EPT regulados superó su respectiva concentración de referencia soluble, sin embargo, las concentraciones móviles de algunos EPT, entre ellos As, Pb, Hg y Cd, no deberían considerarse despreciables, pues sus potenciales afectaciones también podrían incluir efectos fitotóxicos en especies sensibles.

La capacidad de los EPT solubles en agua meteórica simulada para ejercer efectos fitotóxicos, fue valorada mediante un modelo experimental basado en dos diferentes bioensayos, uno por exposición directa a través de tallo (bioensayo 1) y otro por exposición a través de raíz (bioensayo 2), de la especie bioindicadora *Tradescantia clon 4430* y mediante la evaluación de tres diferentes biomarcadores de efecto.

Las pruebas de determinación de genotoxicidad por micronúcleos, la cual está estandarizada para el bioindicador utilizado y fue la base experimental para el resto de los biomarcadores de efecto determinados, reportó diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de tratamientos con los extractos de EPT solubles y el control negativo en el bioensayo 1, resaltando los extractos de las muestras 6CF y 2CF, los cuales presentaron las mayores concentraciones de la fracción soluble de EPT como As, Ag, Cd, Ni, Hg, V y Pb, y mostraron efectos similares a los controles positivos, confirmando el potencial genotóxico de la fracción

soluble de EPT en los suelos del sitio de estudio. Este efecto no pudo confirmarse mediante el bioensayo 2, debido a que el periodo de exposición del bioindicador y su etapa reproductiva no se sincronizaron adecuadamente. Para estudios futuros que consideren las condiciones de exposición del bioensayo 2 con la especie *Tradescantia clon 4430* se recomienda previamente estandarizar el periodo de exposición al tiempo reproductivo la planta.

Con respecto a los pigmentos fotosintéticos que se evaluaron como biomarcadores de efecto, en general se encontró un incremento de la producción de clorofila a, clorofila b y carotenoides con respecto al control negativo, como efectos de todos los tratamientos con extractos de EPT solubles y controles positivos, lo cual puede deberse a la interacción de algunos EPT con las proteínas que participan en el Fotosistema II, aumentando la producción de clorofilas a partir de plástidos de los cloroplastos. Sin embargo, el principal efecto de la exposición a la fracción soluble de EPT se observó en la disminución de las relaciones entre clorofila a y clorofila b (Cl_a/Cl_b) y entre las clorofilas y los carotenoides $[(Cl_a+Cl_b)/Cl(x+c)]$, las cuales podrían asociarse a una baja productividad de biomasa y a una senescencia foliar inducida, respectivamente. Estos efectos fueron observados en ambos bioensayos.

La conductancia estomática fue otro biomarcador de efecto que se incluyó en ambos bioensayos. En el bioensayo 1, el cual coincidió con un ciclo respiratorio, se logró relacionar la exposición a la fracción soluble de EPT de los sitios 2CF y 4CF con una disminución de la tasa respiratoria del bioindicador, mientras que en el bioensayo 2, que tuvo una duración de 5 ciclos respiratorios, sólo se observó el mismo efecto en la exposición a la fracción soluble de EPT del sitio 2CF.

De acuerdo a los resultados de los biomarcadores de efecto evaluados en el bioindicador *Tradescantia clon 4430* bajo los diferentes bioensayos, se demostró la capacidad de las fracciones solubles de EPT para causar efectos fitotóxicos con respecto al gradiente de concentraciones solubles que presentaron los suelos del sitio de estudio. Por tanto, se puede concluir que las concentraciones solubles de EPT que no superan los criterios establecidos en la normativa nacional, pueden representar riesgos ecológicos para especies sensibles, por lo que en la caracterización de pasivos ambientales minero-metalúrgicos, se recomienda incluir la evaluación de la fitotoxicidad de la fracción soluble de EPT mediante modelos similares al que aquí se propone.

En general, el modelo experimental que se utilizó para evaluar los efectos genotóxicos por MCN de las fracciones solubles de EPT, se puede considerar como una herramienta confiable y de fácil aplicación, ya que el bioindicador *Tradescantia clon 4430*, demostró ser suficientemente

sensible para responder a las variaciones típicas de concentración y movilidad en suelos contaminados por fuentes minero-metalúrgicas. No obstante, en el caso de los otros biomarcadores propuestos, es necesario continuar con la estandarización de esta metodología para la determinación de pigmentos fotosintéticos y de la conductancia estomática.

BIBLIOGRAFÍA

- Alvarez-Moya C, S. M. (2011). Evaluation of genetic damage induced by glyphosate isopropylamine salt using *Tradescantia* bioassays. *Genet Mol Biol* , 127-130.
- Ankley, Gerald, T.; Bennett, Richard, S.; Erikson, Russell, J.; Hoff, Dale, J.; Hornung, Michael, W.; Johnson, Rodney, D.; Mount, David, R.; Nichols, John, W.; Russom, Cristine, L.; Schmieder, Patrice, K.; Serrano, Jose; Tietge, Joseph; Villeneuve, Daniel. (2010). Adverse Outcome Pathways: A Conceptual Framework to Support Ecotoxicology Research and Risk Assessment. (S. o. Chemistry, Ed.) *Environmental Toxicology and Chemistry* , 29 (3), 730-741.
- ATSDR, A. f. (1999). *Toxicological Profile for Mercury*. Atlanta, USA: Agency for Toxic Substance and Disease Registry. U.S. Department of health and human services.
- Badillo, G. J. (1998). Plomo. Capitulo 10. In *Metales Pesados* (pp. 165-181).
- Balderas-Plata, M. Á., Cajuste, L. J., Lugo-de la Fuente, J. A., & Vázquez-Alarcón, A. (2003). Suelos Agrícolas Contaminados por Metales Pesados Provenientes de Depósitos de Vehículos de Desecho. (U. d. Chapingo, Ed.) *TERRA Latinoamericana* , 21 (4), 449-459.
- Bothe, H. (2011). Plants in Heavy Metal Soils. In I. Sherameti, & A. Varma, *Detoxification of Heavy Metals. Soil of Biology* (Vol. 30, pp. 35-57). Cologne, Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Brady, N., & Weil, R. (2002). *The Nature and Properties of Soils*. USA: Prentice-Hall.
- Burlo, F., Guijarro, I., Barrachino, A. A., & Valero, D. (1999). Arsenic Species: Effects on and Accumulation by Tomato Plants. *J. Agric. Food Chem.* , 1247-1253.
- Cabezas, J., Alonso, J., Pastor, J., Sastre-Conde, I., & Lobo, M. (2004). Absorción y Acumulación . *Environmental Biotechnology and Engineering* , 1-11.
- Cabrera, G. L., & Rodriguez, D. M. (1998). Genotoxicity of Leachates from Landfill using three Bioassays. *Mutation Research* , 207-210.
- Cabrera, G. L., & Rodriguez, D. M. (1999). Genotoxicity of Solil from Farmland Irrigated with Wastewater using three Plant Bioassays. *Mutation Research* (426), 211-214.
- Casson, S., & Gray, J. E. (2008). Influence of Environmental Factors on Stomatal Development. *New Phytologist. Tansley review* , 9-23.
- Chen, M., Ma, L., Singh, P., Cao, R., & Melamed, R. (2003). Phosphate-Induced Metal Immobilization in a Contaminated Site. *Enviromental pollution* , 23-38.
- Cruz, A. M., & Melgarejo, L. M. (2010). Respiración Vegetal. In L. M. Melgarejo, *Experimentos en Fisiología Vegetal* (pp. 124-136). Colombia: Laboratorio de fisiología y bioquímica vegetal. Departamento de biología. Universidad Nacional de Colombia.

Díaz, G. L., Díaz, O. A., Carrillo-González, R., & González-Chavez, M. d. (2005). Plantas que se Desarrollan en Áreas Contaminadas con Residuos Mineros. In M. González-Chavez, J. Pérez-Moreno, & R. Carrillo-González, *El Sistema Planta-Microorganismo-Suelo en Áreas Contaminadas con Residuos de Minas* (pp. 9-33). Montecillo, Estado de México, México: Colegio de Posgraduados.

EPA, (Environmental Protection Agency). (1993). *R. E. D. Facts Glyphosate*. Prevention, Pesticides, and Toxics Substances (7508), United States Environmental Protection Agency. USA: EPA-738-F-93-011.

EPA, (Environmental Protection Agency). (2007). *Method 3051, Microwave Assisted Acid Digestion of Sediments, Sludges, Soils and Oils*. USA.

Español, C. S. (2001). *Toxicología del Mercurio. Actuaciones Preventivas en Sanidad Laboral y Ambiental*. Gama.

Ferre-Huguet, N., Schuhmacher, M., Llobet, J. M., & Domingo, J. L. (2007). Metales Pesados. Riesgos de Exposición. *MAPFRESEGURIDAD* , 50-58.

Gabriel, M., & Williamson, D. (2004). Principal Biogeochemical Factors Affecting the Speciation and Transport of Mercury Through the Terrestrial Environment. *Environmental Geochemistry and Health* , 421-434.

Galán, H. E., & Romero, B. A. (2008). Contaminación de Suelos por Metales Pesados. *Revista de la Sociedad Española de Mineralogía* , 48-60.

García, F. M., & Carreras, A. H. (2008). Análisis de la Genotoxicidad de Material Particulado Recolectado en dos Ciudades de la Provincia de Córdoba, Argentina, mediante el Ensayo de Micronúcleos. *Theoria* , 17 (1), 33-40.

Gerhardt, A. (2000). Bioindicator Species and their Use in Biomonitoring. In L. International, *Environmental Monitoring* (pp. 1-10). Lund, Sweden: Encyclopedia of Life Support Systems.

González, A. S. (2009). *Tesis. Enverdecimiento de la Espata de Spathiphyllum wallisii Regel*. Montecillo, Texcoco, Estado de México, México: Colegio de Postgraduados. Campus Montecillo. Posgrado de Botánica.

Gonzalez, M. A., & Mejorada G., M. (1993). *Tesis. Posible Efecto Genotóxico del Agua Potable del Municipio de Mexquitic, S. L. P.* (F. d. Universidad Autónoma de Querétaro, Ed.) Querétaro, Querétaro, México: UAQ.

González, M. S., Perales, V. H., & Salcedo, A. M. (2008). La Fluorescencia de la Clorofila a como Herramienta en la Investigación de Efectos Tóxicos en el Aparato Fotosintético de Plantas y Algas. *REB* , 27 (4) 119-129.

González-Chavez, M., Pérez-Moreno, J., & Carrillo-González, R. (2000). *El Sistema Planta-Microorganismo-Suelo en Áreas Contaminadas con Residuos de Minas*. Montecillo, Estado de México, México: Colegio de Postgraduados.

- Hespanhol, I., & Helmer, R. (2000). La Contaminación del Agua. Capítulo 4. In A. Yassi, & T. Kiehlström, *Enciclopedia de Salud y Seguridad en el Trabajo* (pp. 4.18-4.22). USA: Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- Hilson, G. (2003). Defining "Cleaner Production" and "Pollution Prevention" in the Mining Context. *Minerals Engineering*, 305-321.
- Iannacone, J. A., & Dale, W. E. (1999). Protocolo del Bioensayo Ecotoxicológico para Evaluar Metales Pesados Contaminantes de Agua Dulce con *Chironomus calligraphus* (Diptera: Chironomidae) y *Moina macrocopa* (Crustacea: Cladocera), en el Río Rímac, Lima, Perú. *Revista Peruana de Entomología*, 111-120.
- Imray, P., & Langley, A. (2001). *Health-Based Soil Investigation Levels*. Queensland, Australia: Queensland Department of Health, In Health Council, Commonwealth of Australia.
- INE. (2003). *Introducción al Análisis de Riesgos Ambientales*. (I. N. INE, & S. d. SEMARNAT, Eds.) D. F., México: www.ine.gob.mx.
- INEGI, (Instituto Nacional de Estadística y Geografía e Informática). (1975). *Carta Uso de Suelo Fresnillo F-13-B-47. Escala 1:50 000*. México.
- INEGI, (Instituto Nacional de Estadística y Geografía e Informática). (2002). *Carta Hidrológica Aguas Superficiales Fresnillo F-13-B-47, Escala 1:250 000*. México.
- IUSS/IIED. (2007). *Base Referencial Mundial del Recurso Suelo*. WRB. Roma: FAO.
- Ivanov, V., Bystrova, E. I., & Seregin, I. V. (2003). Comparative Impacts of Heavy Metals on Root. *Russian J Plant Physiol* 50, 398-406.
- Kabata-Pendias. (2010). *Trace Elements in Soils and Plants* (Cuarta edición ed.). (A. Kabata-Pendias, Ed.) USA: CRC Press Taylor & Francis Group.
- Kabata-Pendias, A. (2011). *Trace Elements in Soils and Plants* (Cuarta Edición ed.). Boca Raton, Florida, USA: CRC Press.
- Kabata-Pendias, A., & Mukherjee, A. B. (2007). *Trace Elements from Soil to Human*. Springer Berlin Heidelberg.
- Knights, C. A. (2006). *Development of an Ecological Risk Assessment Methodology for Assessing Wildlife Exposure Risk Associated with Mercury-Contaminated Sediments in Lake and River Systems*. Office of Research and Development, Unit States Environmental Protection Agency. Washington D. C.: EPA.
- Landner, L., & Reuther, R. (2005). Metals in Society and in the Environment. In B. J. Allow, & J. T. Trevors, *Environmental Pollution Vol. 8* (pp. 321-344). USA: Kluwer Academic Publishers.
- Laperche, V., Logan, T., Gaddam, P., & Traina, S. (1997). Effect of Apatite Amendment on Plant uptake of Pb from Contaminated Soil. *Environmental Science Technology*, 2745-2753.

- Leura, V. A. (2009). *Fitoextracción de una Mezcla de Cd, Cr y As en Solución por Plantas de Typha latifolia (Espadaña). Toxicidad y Tolerancia*. San Luis Potosí: UASLP. Facultad de Ciencias Químicas.
- Lichtenthaler, H. K., & Burkart, S. (1999). Photosynthesis and High Light Stress. *BULG. J. PLANT PHYSIOL* , 3-16.
- López, S., Perelman, P., Rivara, M., Castro, M., & Faggi, A. (2006). *Características del Suelo y Concentración de Metales a lo largo de un Gradiente de Urbanización*. Buenos Aires, Argentina: Multequina.
- Manzanares-Acuña, E., Vega-Carrillo, H., Salas-Luévano, M., Hernández-Dávila, V., Letechipía-de León, C., & Bañuelos-Valenzuela, R. (2006). Lead Levels in High-Risk Populations on the Surrounding Environment in San Ignacio, Fresnillo, Zacatecas, Mexico. *Salud Publica Mex* 48 , 212-219.
- Mayorga, Á. R. (2012). *Tesis. Evaluación de la Contaminación por Arsénico y Metales Pesados en el Distrito Minero Fresnillo (Zacatecas, México)*. Zacatecas: PMPCA. Programa Multidisciplinario de Posgrado en Ciencias Ambientales.
- Meravi, N., & Prajapati, S. K. (2013). Effects of Heavy Metals/metalloids Contamination of Soils on Micronucleus Induction in Tradescantia pallida. *Environmental Skeptics and Critics* , 58-62.
- Meza, N., & Bautista, D. (1999). Estimación del Área Foliar en Plantas Jóvenes de Níspero (Manilkara achras Miller Fosberg) Sometidas a dos Ambientes de Luz. *Bioagro* , 11 (1), 24-28.
- Misík, M., Ma, T. H., Nersesyan, A., Monarca, S., Kim, J. K., & Knasmueller, S. (2011). Micronucleus Assays with Tradescantia pollen tetrads: an update. *Mutagenesis* , 26 (1), 216-221.
- Nordberg, G. (2000). METALES: Propiedades Químicas y Toxicidad Capítulo 63. In C. Elinder, L. Friberg, B.-K. Lee, N. K. Mottet, K. Nogawa, T. Norseth, et al., *Enciclopedia de Salud y Seguridad en el Trabajo* (pp. 63.1-63.75). Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- Nriagu, J. O., & Pacyna, J. M. (1988). Quantitative Assessment of Worldwide Contamination of Air, Water and Soil by Trace Metals. *Nature* (333), 134-139.
- O'Neill, P. (1995). Arsenic. In B. J. Alloway, *Heavy Metals in Soils* (pp. 105-121). London, U.K.: Blackie Academic & Professional.
- Odjegba, A. J., & Fasidi, I. O. (2006). Effects of Heavy Metals of some proximate composition of Eichhornia crassipes. *Science Environmental Mgt.* , 10 (1), 83-87.
- Ogura, T., Ramírez-Ortiz, J., Arroyo-Villaseñor, M., Hernández, M., Palafox-Hernández, P., García de Alba, H., et al. (2003). Zacatecas (México) Companies Extract Hg from Surface Soil Contaminated by Ancient Mining Industries. *Water, Air and Soil Pollution* , 167-177.

OMS/EPA. (2000). *Identificación del Herbicida Glifosato Propiedades y Toxicidad*. Environmental Protection Agency.

Ortiz, O. M. (2006). *Tesis. Respuestas Fisiológicas y Bioquímicas de dos Especies de Pino en Condiciones Limitantes de Humedad*. Tulancingo, Hidalgo: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Instituto de Ciencias Agropecuarias.

Ortiz-Cano, H., Trejo-Calzada, R., Valdez-Cepeda, R., & Arreola-Avila, J. (2003). Fitoextracción de Plomo y Cadmio en Suelos Contaminados Usando Quelite (*Amaranthus hybridus* L.) y Micorrizas. *Chapingo. Serie Horticultura*, 161-168.

Pérez, F. M. (2010). *Tesis. Evaluación Morfológica del Bazo de Sapo Gigante (Rhinella marina), Expuesto a una Mezcla de Contaminantes en la Zona de Coatzacoalcos, Veracruz*. (P. M. Ambientales, Ed.) Coatzacoalcos, Veracruz, México: Universidad Autónoma de San Luis Potosí. PMPCA.

Presser, T., & Luoma, S. (2007). *Forecasting Selenium Discharges to the San Francisco Bay-Delta Estuary: Ecological Effects of a Proposed San Luis Drain Station*. Interagency Funding Agreement, Environmental Protection Agency. San Francisco: EPA/IAG.

Ramírez, H. V. (2010). *Caracterización Ambiental y Análisis de Riesgos para la Salud en un Sitio Minero-Metalúrgico. Caso de Estudio: Concepción del Oro, Zacatecas, México*. San Luis Potosí: Universidad Autónoma de San Luis Potosí. PMPCA.

Rico, R. M. (2006). *Tesis. Evaluación de las Posibles Alteraciones Genéticas en Tradescantia Producidas por Insecticidas Piretroides Liberados por Vaporizadores Eléctricos*. Ciudad de México: Universidad Autónoma de México, Facultad de Ciencias, Posgrado en Ciencias Biológicas.

Rodrigues, G. S., Ma, T. H., Pimentel, D., & Weinstein, L. H. (1997). Tradescantia Bioassays as Monitoring Systems for Environmental Mutagenesis: A Review. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 325-359.

Rout, G. R., & Dan, P. (2003). Effect of metal toxicity on plant growth and metabolism: I. Zinc. *Agronomie* 23, 3-11.

Russi, D., & Martínez-Alier, J. (2002). Los Pasivos Ambientales. (S. A. Facultad de Ciencias Sociales, Ed.) *ICONOS, Revista de Ciencias Sociales* (015), 123-131.

Salas, M. E. (2006). *Tesis. Niveles de Metales en Suelos Asociados a Diferentes Usos Históricos en San Luis Potosí*. (F. d. Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Ed.) San Luis Potosí, S. L. P., México: UASLP.

Sánchez, G. P. (2005). Características de los Suelos Aledaños a los Depósitos de Residuos de Minas. In M. González-Chávez, J. Pérez-Moreno, & R. Carrillo-González, *El Sistema Planta-Microorganismo-Suelo de Áreas Contaminadas con Residuos de Minas* (pp. 126-136). Montecillo, Estado de México, México: Colegio de Postgraduados.

Sengupta, M. (1993). *Environmental Impacts of Mining: Monitoring, Restoration and Control*. London: Lewis Publishers.

Siegel, F. R. (2002). *Environmental Geochemistry of Potentially Toxic Metals*. USA.

Smedley, P., & Kinniburgh, D. (2002). A Review of the Source, Behavior and Distribution of Arsenic in Natural Waters. *Applied Geochemistry*, 517-568.

Smith, K., & Huyck, H. (1999). An Overview of the Abundance, Relative, Mobility, Bioavailability, and Human Toxicity of Metals. *Rev. Econo. Geol.*, 29-70.

Sobrero, M. C. (2010). *Tesis. Estudio de la Fitotoxicidad de Metales Pesados y del Herbicida Glifosato en Ambientes Acuáticos. Bioensayos con Plantas Vasculares como Organismos Diagnósticos*. Buenos Aires: Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Naturales y Museo.

Solarte, M. E., Pérez, L. V., & Melgarejo, L. M. (2010). VIII. Ecofisiología Vegetal. In L. M. Melgarejo, *Experimentos en Fisiología Vegetal* (pp. 137-166). Colombia, Colombia: Universidad Nacional de Colombia.

Thomas, J. A. (1996). Toxic Responses of Reproductive System. In C. D. Klaassen, M. O. Ambur, & D. J., *Casarett and Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons* (pp. 547-581). New York: McGraw-Hill.

UNEP. (2000). *Minning and Sustainable Development II. Challenges and Prespectives* (Vol. Industry and Environment). UNEP, United Nations Environment Programme.

Vanegas, R. L. (1995). *La Compañía Minera de San José S. A. 1930-1936*. Zacatecas: Gobierno del Estado de Zacatecas. Edición Conmemorativa del 1er. Centenario 1895-1995.

Vidal, D. J., Marrugo, N. J., Jaramillo, C. B., & Perez, C. L. (2010). Remediación de Suelos Contaminados con Mercurio Utilizando Guarumo (*Cecropia peltata*). *Ingeniería y Desarrollo*, 113-129.

WHO/IPCS. (1994). *Environmental Health*. World Health Organization / International Programme on Chemical Safety. IPCS.

Yarto, R. M., Gavilan, G. A., & Castro, D. J. (2004). La Contaminacion de Mercurio en Mexico. *Gaceta Ecológica*, 21-34.

Yupari, A. (2003). *Pasivos Ambientales Mineros en Sudamérica*. Informe elaborado para la para CEPAL, el Servicio Nacional de Geología y Minería, SERNAGEOMIN y el Instituto Federal de Geociencias y Recursos Naturales, BGR.

Zeballos, G., Zaballa, R. M., De la Rocha, A., Cuadros, M., Del Granado, S., Anze, R., et al. (2006). Estandarización de Métodos de Cultivo y Exposición para Estudios de Biomonitorio. *ACTA NOVA*, 412-421.

ANEXOS

ANEXO A1- Fotografías de los sitios de muestreo

Fotografías del sitio 1CF. Zona aparentemente menos perturbada, con presencia de vegetación típica de la zona.



Fotografías del sitio 2CF. Zona perturbada, posible presencia de jales, vegetación arbustiva.



Fotografías del sitio 3CF. Zona entre los campos de cultivo y los pasivos ambientales.



Fotografías del sitio 4CF. Zona de uso agrícola activa, con plantaciones de jitomate.



Fotografías del sitio 5CF. Zona agrícola inactiva, posiblemente abandonada.



Fotografías del sitio 6CF. Posible drene de agua superficial, proveniente del pasivo ambiental, en temporada de lluvias, zona agrícola abandonada e inactiva.



ANEXO B1- Solución Nutritiva de Cultivo de Hoagland (Rico, 2006)

Sustancia	Solución Madre (g/L)	Volumen de Solución madre (mL/L) en Agua
NH ₄ H ₂ PO ₄	115.1	1
KNO ₃	101.1	6
Ca (NO ₃) ₂	164.1	4
MgSO ₄	120.4	2

*Se deben agregar en el orden mencionado, para posteriormente agregar la solución de elementos menores que se añaden a 1 mL/L de la solución nutritiva final.

Sustancia	Gramos/L
H ₃ BO ₃	2.86
MnCl ₂ :4H ₂ O	1.81
ZnSO ₄ :7H ₂ O	0.22
CuSO ₄ :5H ₂ O	0.08
H ₂ MoO ₄ : H ₂ O	0.02

Se agregan sales de Hierro 0.05%, y se ajusta la solución nutritiva a un pH de 6.

ANEXO C1- Tabla de la distribución Total de los Metales pesados en Suelo.

La Tabla, detalla el promedio de los valores obtenidos, de la concentración total en suelo de cada uno de los sitios, denotando los valores más altos en un tono rojizo y en verde los valores más bajos.

Sitios	Metales Pesados en mg/kg de Suelo																	
	Be	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	As	Sr	Ag	Cd	Sb	Ba	Au	Hg	Pb
1CF	1.5	31.4	24.3	362.7	17720	5.9	18.6	17.8	83.5	24.4	23.6	1.3	0.7	0.2	122.0	0.2	5.1	51.4
2CF	2.1	67.5	39.5	751.2	39037	11	25.5	257.3	971	549.5	49.2	28.8	11	2.3	289.9	0.4	43.2	2046.4
3CF	1.2	22.7	21.2	268.3	15915	4.5	11.2	23.5	72.5	26.2	21.7	1.7	0.7	0.1	93.3	0.2	2.5	114.3
4CF	1.2	20.5	19.8	287.9	12430	4.5	10.6	18.5	60.3	19	22.6	0.8	0.4	0.2	88.3	0.1	0.8	34.1
5CF	1.2	22.0	20.8	333.4	13570	5.8	11.7	61.1	168.7	97.4	23.4	2.7	4.4	0.6	88.7	0.1	2.2	167.8
6CF	1.0	15.7	17.7	294.9	13325	4.0	10.3	87.4	330.5	113.4	18.5	3.7	6.6	1.4	74.1	0.1	4.7	221.9

ANEXO C2- Concentraciones (mg/kg) de EPT en suelo a diferentes profundidades.

Profundidad	Be	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	As	Sr	Ag	Cd	Sb	Ba	Au	Hg	Pb
1CF (0-20 cm)	1.4	29.8	23.9	328.2	17180	5.4	14.4	15.6	78.1	23.7	23.4	20.0	0.5	5.9	109.3	0.7	2.9	982.2
1CF (20-40 cm)	2.0	38.3	29.2	306.9	23730	6.3	20.3	13.5	59.6	10.7	31.5	0.6	0.2	0.1	159.8	0.2	0.9	21.6
1CF (40-60 cm)	2.6	38.7	33.7	270.2	27547	6.1	27.0	12.6	70.8	9.1	39.2	0.4	0.2	0.1	189.9	0.1	0.4	16.1
1CF (60-80 cm)	0.9	27.5	23.7	261.9	11637	5.2	17.6	7.2	28.9	6.6	80.7	0.2	0.4	0.0	621.5	0.0	0.2	16.2
1CF (80-85 cm)	0.9	30.0	22.3	288.6	11917	5.8	16.6	7.8	30.3	7.0	76.9	0.2	0.2	0.1	421.4	0.0	0.2	15.9

Profundidad	Be	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	As	Sr	Ag	Cd	Sb	Ba	Au	Hg	Pb
2CF (0-20 cm)	1.7	50.8	31.9	600	30202	8.9	20.2	176	592	395	36.3	19.4	7.7	2.1	208	0.3	41.1	1508
2CF (20-40 cm)	1.9	57.7	37.4	700	40945	9.9	23.6	319	950	866	48.3	34.3	11.5	3.3	289	0.5	66.8	2132
2CF (40-60 cm)	1.4	55.9	36.7	540	41812	7.0	23.8	462	664	1406	44.0	42.6	10.5	4.3	288	0.3	160.9	2283
2CF (60-80 cm)	1.6	32.2	24.9	641	24137	7.7	17.0	96.3	286	607	31.1	9.1	4.7	1.3	170	0.3	32.3	478

Profundidad	Be	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	As	Sr	Ag	Cd	Sb	Ba	Au	Hg	Pb
3CF (0-20 cm)	1.1	19.9	18.2	273.2	11785	4.3	13.5	21.9	69.5	30.5	18.8	1.4	0.6	0.2	87.7	0.1	2.3	72.3
3CF (20-40 cm)	1.6	25.1	22.9	276.8	16160	5.8	13.6	13.3	60.9	10.8	26.4	0.5	0.2	0.1	89.0	0.1	0.7	27.1
3CF (40-60 cm)	2.4	35.4	29.7	251.5	23262	9.4	20.1	12.6	74.9	10.1	37.4	0.5	0.4	0.0	129.7	0.1	0.5	18.2
3CF (60-80 cm)	1.5	24.9	25.6	229.4	12120	5.6	16.4	9.5	42.3	6.1	41.6	0.3	0.1	0.0	137.4	0.0	0.2	15.8

Profundidad	Be	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	As	Sr	Ag	Cd	Sb	Ba	Au	Hg	Pb
4CF (0-20 cm)	1.2	19.8	17.5	275.2	11772	4.3	9.9	16.5	58.7	19.9	22.0	0.8	0.4	0.2	87.8	0.1	0.7	61.7
4CF (20-40 cm)	1.3	21.4	19.1	292.4	13120	4.8	11.2	14.1	50.3	19.1	24.4	0.6	0.4	0.0	93.0	0.1	0.5	39.8
4CF (40-60 cm)	1.6	25.3	21.2	352.2	16785	6.9	13.2	12.3	51.0	8.9	29.2	0.4	0.3	0.1	116.7	0.1	0.2	25.7
4CF (60-78 cm)	0.9	16.6	14.5	207.8	10857	5.3	8.0	6.6	29.7	5.7	18.1	0.2	0.1	0.0	73.8	0.0	0.1	13.5

Profundidad	Be	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	As	Sr	Ag	Cd	Sb	Ba	Au	Hg	Pb
5CF (0-20 cm)	1.3	20.5	18.3	282.5	13955	5.9	11.2	56.1	153.6	82.6	22.1	2.4	4.1	0.7	83.2	0.1	1.8	164.0
5CF (20-40 cm)	1.8	26.1	25.4	209.9	20315	4.8	14.5	10.5	59.4	8.6	34.6	0.5	3.1	0.1	68.1	0.1	0.2	7.9
5CF (40-54 cm)	2.9	30.3	28.4	333.0	24560	8.7	23.2	12.4	71.0	12.1	53.5	0.5	3.9	0.0	115.3	0.1	0.2	11.7

Profundidad	Be	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	As	Sr	Ag	Cd	Sb	Ba	Au	Hg	Pb
6CF (0-20 cm)	1.0	16.1	16.4	276.8	13047	4.0	10.3	81.8	331.5	111.2	18.0	3.5	7.1	1.1	72.8	0.2	5.0	211.9
6CF (20-40 cm)	1.3	18.5	19.6	222.8	15202	4.4	12.5	21.6	224.6	23.5	23.9	0.9	4.6	0.2	79.4	0.1	1.2	63.7
6CF (40-60 cm)	2.2	24.3	26.0	158.0	23952	4.5	16.8	11.8	61.0	8.7	40.5	0.4	3.9	0.1	99.8	0.1	0.2	12.7
6CF (60-81 cm)	2.9	21.7	20.8	530.8	19512	6.2	21.8	11.0	53.4	7.2	62.0	0.4	4.2	0.0	553.5	0.1	0.1	15.0

ANEXO C3- Concentración solubles de EPT en los extractos con agua meteórica simulada y movilidad de EPT en suelo.

Concentraciones solubles en los extractos empelados en los bioensayos por cada tratamiento o sitio.

Sitios	Metales Pesados en µg/L de Extracto																	
	Be	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	As	Sr	Ag	Cd	Sb	Ba	Au	Hg	Pb
1CF	0,3	5,7	2,3	156,7	524,5	1,3	8,5	16,4	64,3	9,1	55,2	0,7	0,3	1,0	51,8	0,1	19,2	17,5
2CF	0,1	9,3	1,8	23,2	412,0	0,4	4,3	64,0	153,4	337,3	71,3	2,9	0,7	8,4	67,9	0,4	16,3	99,5
3CF	0,3	8,1	2,6	66,4	678,7	0,9	4,0	12,8	65,2	17,2	28,6	0,7	0,3	0,7	31,2	0,1	11,2	16,7
4CF	0,8	12,3	3,5	200,8	1826,0	2,2	5,9	15,4	71,6	11,7	47,4	0,4	0,3	0,5	57,2	0,1	9,2	21,7
5CF	0,5	8,4	2,8	129,3	992,3	1,3	5,1	37,9	95,6	61,6	17,7	1,3	0,7	1,8	28,0	0,1	7,8	39,1
6CF	1,2	13,5	4,3	290,3	2783,0	2,9	8,1	101,1	549,7	120,4	29,4	6,2	2,9	2,3	55,7	0,1	7,6	196,6

Movilidad de EPT expresada en mg/kg, para cada sitio de muestreo

Sitios	Metales Pesados en mg/kg de Suelo																	
	Be	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	As	Sr	Ag	Cd	Sb	Ba	Au	Hg	Pb
1CF	0,01	0,11	0,05	3,13	10,49	0,03	0,17	0,33	1,29	0,18	1,10	0,01	0,01	0,02	1,04	0,00	0,38	0,35
2CF	0,00	0,19	0,04	0,46	8,24	0,01	0,09	1,28	3,07	6,75	1,43	0,06	0,01	0,17	1,36	0,01	0,33	1,99
3CF	0,01	0,16	0,05	1,33	13,57	0,02	0,08	0,26	1,30	0,34	0,57	0,01	0,01	0,01	0,62	0,00	0,22	0,33
4CF	0,02	0,25	0,07	4,02	36,52	0,04	0,12	0,31	1,43	0,23	0,95	0,01	0,01	0,01	1,14	0,00	0,18	0,43
5CF	0,01	0,17	0,06	2,59	19,85	0,03	0,10	0,76	1,91	1,23	0,35	0,03	0,01	0,04	0,56	0,00	0,16	0,78
6CF	0,02	0,27	0,09	5,81	55,66	0,06	0,16	2,02	10,99	2,41	0,59	0,12	0,06	0,05	1,11	0,00	0,15	3,93

ANEXO C4- Relaciones entre la concentración móvil EPT y los efectos en *Tradescantia clon 4430*

Bioensayo 1. Prueba de Genotoxicidad.

EPT	Coeficiente de correlación de Pearson		Residuos generados	
	MCN/100t	#MCN	MCN/100t	#MCN
Be	-0,007	-0,032	-0,009	-0,010
V	-0,071	-0,071	-0,003	-0,002
Cr	0,448	0,413	-0,011	-0,017
Mn	-0,111	-0,134	0,000	-0,003
Fe	0,032	0,008	-0,007	-0,007
Co	-0,116	-0,137	0,001	-0,001
Ni	-0,162	-0,170	0,008	0,005
Cu	0,316	0,315	-0,005	-0,006
Zn	0,381	0,357	0,003	0,006
As	0,281	0,318	-0,018	-0,021
Sr	-0,194	-0,159	0,007	0,008
Ag	0,502	0,485	-0,002	0,000
Cd	0,381	0,356	0,004	0,005
Sb	0,217	0,259	-0,019	-0,022
Ba	-0,138	-0,116	0,004	0,004
Au	0,207	0,251	-0,024	-0,025
Hg	-0,264	-0,229	0,042	0,047
Pb	0,375	0,367	-0,001	0,000

MCN/100t= Número de células con MCN por cada 100 células en etapa tétrada

#MCN= Número total de MCN

Bioensayo 1. Pruebas de pigmentos fotosintéticos y conductancia estomática

EPT	Coeficiente de correlación de Pearson			Residuos generados		
	Cla/Clb	Cla+Clb/Cl(x+c)	CE(14h)	Cla/Clb	Cla+Clb/Cl(x+c)	CE(14h)
Be	0,111	-0,591	0,465	0,001	-0,014	-0,011
V	-0,020	-0,373	0,452	0,013	-0,036	-0,002
Cr	0,063	-0,197	-0,325	0,012	-0,041	-0,086
Mn	0,276	-0,619	0,417	-0,023	0,046	-0,003
Fe	0,054	-0,581	0,479	0,007	-0,031	-0,009
Co	0,246	-0,601	0,436	-0,014	0,021	-0,002
Ni	0,368	-0,528	0,274	-0,038	0,101	0,006
Cu	-0,467	-0,297	0,482	-0,018	0,035	-0,003
Zn	-0,323	-0,509	0,474	-0,004	-0,026	0,008
As	-0,615	0,247	0,132	0,014	-0,018	-0,020
Sr	0,144	0,008	0,005	0,012	-0,030	0,004
Ag	-0,526	-0,357	0,424	0,004	-0,040	0,000
Cd	-0,356	-0,496	0,501	-0,015	0,005	0,006
Sb	-0,551	0,294	0,078	0,008	0,002	-0,019
Ba	0,090	-0,194	0,211	0,009	-0,026	-0,001
Au	-0,544	0,383	-0,007	0,028	-0,054	-0,025
Hg	0,248	0,081	-0,102	-0,010	0,061	0,023
Pb	-0,454	-0,356	0,469	0,003	-0,028	-0,002

Cla/Clb= Relación de la concentración de la clorofila a entre la concentración de la clorofila b

Cla+Clb/Cl(x+c)= Relación entre la sumatoria de las concentraciones de clorofila a y b entre las concentraciones de carotenoides.

CE(14h)=Conductancia estomática determinada a las 14:00 del último ciclo del bioensayo.

Bioensayo 2. Pruebas de Fisiología vegetal correlacionados a los EPT expuestos

EPT	Coeficiente de correlación de Pearson			Residuos generados		
	Cla/Clb	Cla+Clb/Cl(x+c)	CE(14h)	Cla/Clb	Cla+Clb/Cl(x+c)	CE(14h)
Be	0,063	-0,087	0,235	0,015	-0,039	-0,025
V	0,020	-0,294	0,363	0,014	-0,046	-0,014
Cr	0,031	-0,105	-0,055	0,023	-0,015	-0,038
Mn	0,157	-0,429	0,216	-0,034	0,019	-0,008
Fe	0,041	-0,509	0,267	0,008	-0,009	-0,038
Co	0,146	-0,014	0,310	-0,054	0,006	-0,043
Ni	0,169	-0,275	0,351	-0,044	0,117	0,034
Cu	-0,267	-0,651	0,213	-0,013	0,049	-0,004
Zn	-0,227	-0,087	0,474	0,003	-0,030	0,032
As	-0,151	0,467	0,132	-0,040	-0,012	-0,038
Sr	0,114	0,056	0,005	0,014	-0,046	0,004
Ag	-0,091	-0,669	0,424	0,063	-0,212	0,002
Cd	-0,450	-0,650	0,041	-0,018	0,011	0,018
Sb	-0,105	0,194	0,047	0,008	0,004	-0,019
Ba	0,045	-0,045	0,343	0,082	-0,058	-0,010
Au	-0,439	0,248	-0,011	0,020	-0,040	-0,014
Hg	0,148	0,012	-0,242	-0,007	0,068	0,060
Pb	-0,539	-0,152	0,047	0,045	-0,084	-0,021

Cla/Clb= Relación de la concentración de la clorofila a entre la concentración de la clorofila b

Cla+Clb/Cl(x+c)= Relación entre la sumatoria de las concentraciones de clorofila a y b entre las concentraciones de carotenoides.

CE(14h)=Conductancia estomática determinada a las 14:00 del último ciclo del bioensayo.