

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 genotoxicidad de suelos y residuos
mineros con células de raíz de haba (*Vicia faba*)”**

PRESENTA:

BQ. CAROL FABINA RÍOS MARTÍNEZ

Co-Directores de Tesis:

Dra. Donaji Josefina González Mille

Dr. César Arturo Ilizaliturri Hernández

Asesor:

Dra. Candy Carranza Álvarez

SAN LUIS POTOSÍ, S. L. P.

DICIEMBRE 2017

AGRADECIMIENTOS

A INSTITUCIONES

AL CENTRO DE INVESTIGACIÓN APLICADA EN AMBIENTE Y SALUD (CIAAS) DE LA FACULTAD DE MEDICINA – COORDINACIÓN PARA LA INNOVACIÓN Y APLICACIÓN DE LA CIENCIA Y LA TECNOLOGÍA (CIACYT) DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ.

AL CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN GENÉTICA Y AMBIENTE, DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA.

AL PROGRAMA MULTIDISCIPLINARIO DE POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES (PMPCA) DE LA UASLP.

AL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACYT) POR LA BECA OTORGADA (NO. BECARIO: 332529).

AL FINANCIAMIENTO OTORGADO POR:

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ A TRAVÉS DEL FONDO DE APOYO A LA INVESTIGACIÓN (C17-FAI-06-27-27).

SECRETARIA DE EDUCACIÓN PÚBLICA Y CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (SEP-CONACYT-CIENCIA BASICA-178778).

PROYECTO CATEDRAS CONACYT-UASLP (NO. 553).

A PERSONAS

En primera instancia agradezco a Dios por su gracia, por la vida, por la familia y por la formación profesional que el día de hoy tengo. “Mira que te mando que te esfuerces y seas valiente; no temas ni desmayes, porque Jehová tu Dios estará contigo en dondequiera que vayas” Josué 1:9

Agradezco grandemente a mi comité tutelar formado por la Dra. Donaji Josefina González Mille, la Dra. Candy Carranza Álvarez y al Dr. César Arturo Ilizaliturri Hernández, por la dirección de esta tesis y por todo su apoyo para que pudiera graduarme, gracias.

A la Dra. Edelmira García Nieto y a la Dra. Libertad Juárez Santacruz del Centro de Investigación en Genética y Ambiente, por su paciencia, por su ayuda en la obtención de semillas de haba y por transmitirme sus conocimientos, gracias.

Agradezco a mis padres, a Pedro Villasana, a Susana Tinajero y a Felipe Chamorro, que me ayudaron en mi estadía en San Luis, capital.

Agradezco a Luz María Tinajero Torres por cuidar de mi hijo para que pudiera culminar con éxito esta parte de mi vida.

Gracias a cada uno de ustedes.

DEDICATORIAS

*Mi esposo y mi hijo
Felipe Jaír Chamorro Tínejero y José Ángel Chamorro Ríos
Gracias por su amor, su fortaleza y su apoyo.
Los amo con todo mi corazón, proseguimos al blanco.*

*A mis padres
Ángel C. Ríos Almazán y M. Patricia Martínez Pérez
Gracias papá y mamá por las oportunidades que me han dado, por apoyarme y
motivarme para poder llegar hasta aquí. Los amo.*

*A mis hermanos.
Ángel de Jesús Ríos Martínez e Indira Regína Ríos Martínez
Gracias onii-chan por tu ayuda para “estudiar”.
Gracias hermana por el regalo de ser tía, Mateo es una bendición
Los amo.*

*Porque Jehová da la sabiduría,
Y de su boca viene el conocimiento y la inteligencia
Proverbios 2:6*

RESUMEN

El estado de San Luis Potosí cuenta con abundantes recursos minerales que han sido explotados desde hace más de 400 años, lo que ha ocasionado grandes cantidades de residuos mineros, causando graves efectos de contaminación y de salud en la población humana como en los componentes bióticos. El objetivo de este estudio fue evaluar el daño al ADN en células de raíz de haba (*Vicia faba*) expuestas a suelos y residuos mineros, a través del ensayo cometa. Semillas germinadas durante 3 días de *Vicia faba* fueron expuestas a elutriados de suelo impactado con metales pesados (n=10) y a elutriados de suelo de referencia (n=10), por 48 horas. Los sitios impactados y de referencia se ubicaron en Cerro de San Pedro, Charcas, Cedral y Villa de la Paz, en el estado de San Luis Potosí, México. Se analizaron parámetros fisicoquímicos (materia orgánica, pH, arcilla y conductividad eléctrica), concentraciones de metales (Cr, Mn, Ni, Cu, Zn, Cd, Hg, Pb, Fe, Co, Mo) y metaloides (B, As), índice de contaminación, índice de riesgo ecológico y ensayo cometa en células de raíz de haba (*Vicia faba*). Los resultados de los parámetros fisicoquímicos mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los suelos recolectados en los sitios de referencia y los sitios impactados con metales pesados y metaloides. Algunas concentraciones de metales (Ni, Zn, Pb, As, Cd, Hg, Cu) superan la Guía de Calidad Ambiental Canadiense y la regulación nacional, la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004 de uso residencial o agrícola. El índice de contaminación de metales indicó que el sitio minero Charcas se encuentra gravemente contaminado con metales pesados; por otro lado el índice de riesgo ecológico muestra que las altas cantidades de metales pesados en los sitios mineros pueden causar efectos adversos en las plantas, como es el daño al ADN. Los resultados del ensayo cometa mostraron que existen diferencias significativas ($p < 0.05$) en los valores de OTM y TL de las células de raíz de *Vicia faba* con respecto a los sitios impactados y el sitio de referencia, el sitio minero con mayor daño al ADN fue Cedral, seguido del Cerro de San Pedro, Villa de la Paz y por último Charcas.

ABSTRACT

The state of San Luis Potosi has abundant mineral resources that have been exploited for more than 400 years, which has caused large amounts of mining waste, causing serious pollution and health effects in the human population as in the biotic components. The objective of this study was to evaluate the damage to DNA in bean root cells (*Vicia Faba*) exposed to soils and mining waste, through the comet assay. Germinated seeds during 3 days of *Vicia Faba* were exposed to elutriados of ground impacted with heavy metals (n = 10) and elutriados of reference soil (n = 10), for 48 hours. The impacted and referenced sites were located in Cerro de San Pedro, Charcas, Cedral and Villa de la Paz, in the state of San Luis Potosi, Mexico. We analyzed physicochemical parameters (organic matter, pH, clay and electrical conductivity), concentrations of metals (Cr, Mn, Ni, Cu, Zn, Cd, Hg, Pb, Fe, Co, Mo) and metalloids (B, As), contamination index, ecological risk index and comet assay in bean root cells (*Vicia Faba*). The results of the physicochemical parameters showed significant differences ($p < 0.05$) between the soils collected at the reference sites and the sites impacted with heavy metals and metalloids. Some concentrations of metals (Ni, Zn, Pb, As, Cd, Hg, Cu) exceed the Canadian Environmental Quality Guide and national regulation, NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004 for residential or agricultural use. The metal pollution index indicated that the mining site Charcas is severely contaminated with heavy metals; on the other hand the ecological risk index shows that high amounts of heavy metals in mining sites can cause adverse effects on plants, such as DNA damage. The results of the comet assay showed that there are significant differences ($P < 0.05$) in the OTM and TL values of the *Vicia Faba* root cells with respect to the sites impacted and the reference site, the mining site with the greatest damage to DNA was Cedral, followed by the Cerro de San Pedro, Villa de la Paz and finally Charcas.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	iii
DEDICATORIAS	v
RESUMEN	vi
ABSTRACT	vii
LISTA DE CUADROS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
INTRODUCCIÓN	14
JUSTIFICACIÓN	16
OBJETIVO GENERAL	17
Objetivos específicos	17
ANTECEDENTES	18
La minería en México.....	18
La minería en el estado de San Luis Potosí	19
Sitios de estudio	20
Descripción de los sitios de estudio	23
Cerro de San Pedro	23
Charcas.....	24
Cedral	25
Villa de la Paz	27
MARCO TEÓRICO	29
El suelo.....	29
Metales pesados.....	30
Elementos potencialmente tóxicos.....	31
Plomo.....	31
Cadmio.....	32
Cobre	32
Mercurio	33
Arsénico	33
Metales pesados como nutrientes esenciales.....	34

Factores que influyen la biodisponibilidad de metales pesados en plantas	34
Materia orgánica (MO).....	34
pH.....	35
Textura del suelo	35
Conductividad eléctrica.....	36
Importancia ecológica de las plantas	37
Efectos de ETP sobre algunas funciones biológicas en plantas.....	38
Efecto de las plantas ante la presencia de arsénico	40
Efecto de las plantas ante la presencia de plomo	40
Efecto de las plantas ante la presencia de cobre.....	41
Efecto de las plantas ante la presencia de zinc	42
Bioensayos en plantas.....	43
<i>Vicia faba</i>	45
Biomarcadores de genotoxicidad	46
Ensayo cometa.....	48
Aplicaciones del ensayo cometa	50
MATERIALES Y MÉTODOS.....	52
Identificación de los sitios de muestreo.....	52
Recolección de muestras de suelo.	53
Cuantificación de metales y metaloides (As, B) en muestras de suelo.....	54
Análisis de parámetros fisicoquímicos en muestras de suelo.....	55
Estandarización del ensayo cometa en células de raíz de haba (<i>Vicia faba</i>)	55
Evaluación de genotoxicidad de suelos y residuos mineros en raíces de <i>Vicia faba</i>	56
Germinación de semillas de haba.....	56
Preparación de elutriados	57
Exposición de raíces de haba a elutriados.....	58
Ensayo cometa en raíces de <i>Vicia faba</i>	59
Análisis estadístico	62
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	64
Análisis de Propiedades fisicoquímicas de suelos y residuos mineros.....	64

Análisis de metales, As y B en suelo y residuos mineros	69
Comparación de metales y metaloides en suelos y residuos por región minera .	69
Cerro de San Pedro	69
Charcas.....	71
Cedral	73
Villa de la Paz	75
Comparación de las concentraciones de metales en los sitios impactados	77
Concentraciones de cromo en residuos mineros	80
Concentraciones de níquel en residuos mineros	81
Concentraciones de cobre en residuos mineros	82
Concentraciones de zinc en residuos mineros	84
Concentraciones de cadmio en residuos mineros	86
Concentraciones de mercurio en residuos mineros	88
Concentraciones de plomo en residuos mineros	89
Concentraciones de arsénico en residuos mineros	90
Análisis del índice de contaminación	92
Índice de Riesgo ecológico.	94
Control de calidad del ensayo cometa en células de raíz de haba.	97
Análisis de daño al ADN en células de raíz de <i>Vicia faba</i>	100
Relaciones entre concentraciones de elementos, daño al ADN y cofactores.	106
CONCLUSIONES	115
RECOMENDACIONES	118
BIBLIOGRAFÍA	119
ANEXO 1	141

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Relación de la actividad minera y su impacto al ambiente.	19
Cuadro 2. Zonas de estudio en diferentes regiones mineras del estado de S.L.P.	22
Cuadro 3. Estudios realizados en <i>Vicia faba</i>	46
Cuadro 4. Parámetros fisicoquímicos de suelos y residuos mineros del estado de San Luis Potosí, México.	65
Cuadro 5. Concentraciones de metales y metaloides en Cerro de San Pedro.	70
Cuadro 6. Concentraciones de metales y metaloides en Charcas.	72
Cuadro 7. Concentraciones de metales y metaloides en Cedral.	74
Cuadro 8. Concentraciones de metales y metaloides en Villa de la Paz.	77
Cuadro 9. Concentraciones de metales y metaloides de residuos mineros del estado de San Luis Potosí.	78
Cuadro 10. Valores de OTM y TL en núcleos de raíz de <i>Vicia faba</i>	103
Cuadro 11. Estudios realizados en <i>Vicia faba</i> por medio del ensayo cometa.	105
Cuadro 12. Porcentaje de variación acumulada de cada componente principal	106
Cuadro 13. Cargas factoriales de cada componente principal con su respectiva variable.	107

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Actividad minera en el estado de San Luis Potosí.....	20
Figura 2. Localización del municipio Cerro de San Pedro, S.L.P.....	24
Figura 3. Localización del municipio de Charcas, S.L.P.....	25
Figura 4. Localización del municipio Cedral, S.L.P.....	26
Figura 5. Localización del municipio de Villa de la Paz, S.L.P.....	28
Figura 6. Componentes de las fases del suelo.....	29
Figura 7. Estresores que conducen a la muerte celular en plantas.	39
Figura 8. Semillas y plántula de haba (<i>Vicia faba</i>).....	45
Figura 9. Aplicación del ensayo cometa para la evaluación del daño en el ADN en distintos modelos de especies.	50
Figura 10. Localización de los sitios de muestreo.	53
Figura 11. Recolección de muestras de suelo.....	54
Figura 12. Estandarización de la técnica ensayo cometa para células de raíz de <i>Vicia faba</i>	56
Figura 13. Proceso de lavado y germinación de semillas de haba (<i>Vicia faba</i>).	57
Figura 14. Preparación de muestras de suelo para elutriados.....	58
Figura 15. Exposición de raíces de haba a Elutriados.....	59
Figura 16. Técnica ensayo cometa en células de raíz de haba.	61
Figura 17. Concentración de cromo en los sitios impactados.....	81
Figura 18. Concentración de níquel en los sitios impactados..	82
Figura 19. Concentración de cobre en los sitios impactados.	84
Figura 20. Concentración de zinc en los sitios impactados.	85
Figura 21. Concentración de cadmio en los sitios impactados.	87
Figura 22. Concentración de mercurio en los sitios impactados.....	89
Figura 23. Concentración de plomo en los sitios impactados..	90
Figura 24. Concentración de arsénico en los sitios impactados..	92
Figura 25. MPI en sitios mineros de San Luis Potosí.	93
Figura 26. MPI en sitios de referencia e impactado con metales y metaloides.....	94
Figura 27. SQGQI en sitios mineros de S.L.P.	95
Figura 28. SQGQI en sitios de referencia e impactado con metales y metaloides.....	97

Figura 29. Daño al ADN en células de raíz de haba inducido con AsNaO_2 bajo diferentes tratamientos.....	99
Figura 30. Daño al ADN a diferentes concentraciones de AsNaO_2	100
Figura 31. OTM y TL en núcleos de raíces de <i>Vicia faba</i> expuestas a suelos y residuos mineros de distintas zonas del estado de San Luis Potosí.....	102
Figura 32. Cometas observados de raíces de habas expuestas a muestras de residuos mineros.....	103
Figura 33. Daño al ADN en núcleos de raíces de <i>Vicia faba</i> expuesto a suelos de sitios de referencia y sitios impactados con metales pesados.....	104
Figura 34. Ordenación de componentes principales por sitios.	108
Figura 35. Relación entre el OTM en función del CP1.....	110
Figura 36. Relación entre el TL en función del CP1.	111
Figura 37. Rango de suficiencia de concentraciones de nutrientes.....	112
Figura 38. Relación del OTM en función del CP2.....	113
Figura 39. Relación de TL en función del CP2.	113

INTRODUCCIÓN

La minería es considerada una de las actividades más antiguas y fundamentales de la humanidad. México se ha caracterizado por ser una potencia minera. En la actualidad ocupa los primeros lugares en la producción de arsénico, cadmio, plomo, mercurio, fluorita, bario, etc. a nivel mundial. Esta gran producción se debe a que las zonas mineras mexicanas se localizan en extensas áreas del territorio nacional. Así, la minería ha llegado a convertirse en un sector económico de gran importancia para estados como Guanajuato, Sonora, Chihuahua, Durango, Zacatecas, San Luis Potosí e Hidalgo (Secretaría de Economía, 2016).

En el siglo XVI en el estado de San Luis Potosí se descubrieron ricas vetas de oro y plata, que posteriormente dieron lugar a nacimientos de distritos mineros como Charcas, Cerro de San Pedro, Real de Catorce, Guadalcazar, Santa María de la Paz y otros (Sánchez-Crispín *et al.*, 1994).

En un sitio minero, son dos las principales actividades contaminantes: i) el proceso primario de tratamiento de metales y ii) la generación de residuos mineros (ej. jales) (Mejía *et al.*, 1999). Estos últimos pueden dispersarse al ambiente, por lo que es común que en sitios cercanos a minas y fundiciones de metales se encuentren áreas extensas con presencia de cobre, cadmio, arsénico, plomo entre otros, los cuales en altas concentraciones tienen efectos tóxicos y son considerados contaminantes ambientales capaces de alterar a los ecosistemas (Nedelkoska y Doran 2000, Chehregani *et al.* 2005, Wei *et al.* 2007, Yadav *et al.* 2009); además, estos elementos, no son biodegradables y pueden bioacumularse (Boularbah *et al.* 2006). Las especies vegetales han desarrollado mecanismos muy específicos para absorber, translocar y acumular nutrientes (Lasat, 2000); sin embargo, algunos metales y metaloides aunque no son esenciales para los vegetales pueden ser absorbidos, translocados y acumulados debido a que presentan un comportamiento

electroquímico similar a los elementos nutritivos esenciales (Souza *et al.* 2005). Así, los metales pesados causan estrés oxidativo en las plantas (Fayiga *et al.* 2004) afectando a lípidos, proteínas y al ADN, por lo tanto se puede decir que los metales pesados son compuestos genotóxicos, debido a que pueden actuar directa o indirectamente sobre el ADN (Zuluaga *et al.*, 2009). Por ejemplo, los metales son conocidos por interferir en el funcionamiento fisiológico y bioquímico de la membrana celular de la planta, que resulta en alteraciones en su composición molecular, rigidez, fluidez, permeabilidad y nutrientes, una reducción en el crecimiento del tejido y la biomasa, la perturbación del ciclo celular y la división celular, así como una reducción en el contenido de clorofila y la perturbación del proceso de fotosíntesis incluyendo el estrés oxidativo (Geremias *et al.*, 2012).

Los bioensayos son pruebas en las que se usan organismos vivos para detectar o medir la presencia y efectos de una o más sustancias tóxicas, así como determinar el límite de tolerancia de dichas sustancias con respecto a los organismos (DGECyTM, 2009). Los bioensayos con plantas están siendo utilizados cada vez más para el diagnóstico ecotoxicológico (Pentreath *et al.*, 2015) debido a que las plantas son más sensibles en la detección de genotoxicidad de los agentes ambientales y pueden servir como la primera alerta de la presencia de peligros ambientales en agua, aire y suelo (Saghirzadeh *et al.*, 2008). Las plantas como bioindicadores tienen una larga historia; han demostrado ser buenos para la detección y vigilancia de los efectos genotóxicos de productos químicos (Yıldız *et al.*, 2009; Bandyopadhyay y Mukherjee, 2011). Durante décadas se han utilizado como parte de la evaluación del riesgo ecológico de productos agrícolas y productos químicos industriales, residuos sólidos, aditivos alimentarios, metales pesados, entre otros, en suelo y agua contaminados (Bandyopadhyay y Mukherjee, 2011; Morais y Marin-Morales, 2009).

Vicia faba es un bioindicador eficaz para la detección química y el monitoreo *in situ* e *in vitro* de genotoxicidad de contaminantes ambientales, es utilizado debido a

su sensibilidad, el tamaño uniforme de los cromosomas, de fácil cultivo en el laboratorio, reducción del tiempo de germinación, disponibilidad, requisitos mínimos de instalación (Zhong *et al.*, 2001; Song *et al.*, 2009; Dhyevre *et al.*, 2014).

Una forma de cuantificar el daño al ADN en raíz de *Vicia faba*, es por medio de la técnica de ensayo cometa o electroforesis alcalina de células individuales, que es un método que se basa en la observación de células individuales (células meristemáticas) con la finalidad de evaluar la fragmentación y migración del ADN, ocasionado por el rompimiento del material genético debido a la exposición a contaminantes genotóxicos (Tice *et al.*, 2000). Es una prueba técnicamente simple, altamente sensible, rápida y económica (Liman *et al.*, 2011; Setha *et al.*, 2008; Kumaravel *et al.*, 2007). El ensayo cometa en núcleos de diversas plantas se ha utilizado antes, en especies tales como *Vicia faba*, *Allium cepa*, *Nicotiana tabacum*, *Calamagrostis epigejos*, *Impatiens balsamina*, *Arabidopsis thaliana* y *Hordeum vulgare* (Saghirzadeh *et al.*, 2008; Morais y Marin-Morales, 2009).

JUSTIFICACIÓN

La minería es considerada una actividad productiva de alto impacto ambiental, debido a que en todas sus etapas (exploración, extracción y procesamiento) se generan una gran cantidad de residuos. En el estado de San Luis Potosí, se ha llevado a cabo la minería desde hace más de 400 años, lo cual produce contaminación en agua, suelo, aire y sedimento, causando efectos en animales, plantas y el humano. El uso de plantas como organismos de prueba se ha indicado y validado por varias agencias ambientales, como el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA), la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Agencia de Protección Ambiental (EPA). Debido a que algunas plantas son sensibles a la exposición de contaminantes, y pueden servir como primera alerta de la presencia de contaminantes ambientales en agua, suelo y aire, en el presente estudio se utilizó como organismo de prueba *Vicia faba*, la cual ha demostrado ser

Ríos Martínez

una especie eficiente que presenta mejor respuesta ante un estresor (como los metales pesados). Se ha utilizado en ensayos como la prueba de ensayo cometa, que es una prueba ampliamente utilizada para cuantificar el daño al ADN causado por agentes genotóxicos como los metales pesados presentes en residuos mineros. Esta técnica cuenta con ventajas como tiempo de respuesta corto, sensibilidad para detección de daños al ADN, bajo costo, requisito de número de células relativamente corto, etc.

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el daño al ADN en células de raíz de haba (*Vicia faba*) expuestas a suelos y residuos mineros, a través del ensayo cometa para determinar la toxicidad y el potencial de riesgo en cuatro sitios de San Luis Potosí.

Objetivos específicos

- Estandarizar la técnica ensayo cometa como biomarcador de daño en el ADN en células vegetales de raíz de haba (*Vicia faba*)
- Evaluar la genotoxicidad en células de raíz de haba de diferentes sitios mineros (Cedral, Charcas, Cerro de San Pedro y Villa de la Paz) en San Luis Potosí.
- Establecer la relación existente entre la concentración de metales de cada sitio minero y el daño genotóxico en el organismo de prueba (*Vicia faba*).

ANTECEDENTES

La minería en México

México es uno de los países de Latinoamérica que se encuentra localizado en una región volcánica rica en minerales. La tradición minera en el país se remonta a la época prehispánica, con la explotación de yacimientos ubicados principalmente en zonas de Taxco (Guerrero), Pachuca (Hidalgo), Guanajuato y Querétaro. Dicha actividad adquirió una gran relevancia económica y social hasta el periodo de la colonia, convirtiéndose entonces en el motor del crecimiento económico y modernización de la corona española (Garfias y Barojas, 1997).

Debido al desarrollo y modernización en los procesos de extracción y procesamiento de los recursos minerales, así como a la generación de grandes cantidades de residuos provenientes de sus procesos, la industria minera en México ha generado por décadas una gran cantidad de desechos y sitios contaminados a lo largo de todo el país. La producción minera en México, se concentra en doce entidades: Chihuahua, Michoacán, Zacatecas, Durango, Sonora, Coahuila, Guanajuato, San Luis Potosí, Hidalgo, Sinaloa, Colima y Jalisco. La excavación de minas, la remoción de minerales y el procesamiento y extracción de metales pueden causar daños ambientales y en casos extremos destruir el ecosistema; por ejemplo, se pueden dañar tierras de cultivo, favorecer la erosión y contaminar cuerpos de agua con sales solubles de elementos potencialmente tóxicos como arsénico, selenio, plomo, cadmio y óxidos de azufre, entre otros. El grado de impacto sobre el ambiente y la salud se relacionará con la composición del mineral, el tipo de explotación, el proceso de beneficio, la escala de las operaciones y las características del entorno. En el cuadro 1, se resumen las etapas de los procesos mineros y su relación con el impacto ambiental que generan (INECC, 1994).

El ejemplo más común de la contaminación de suelos por actividades mineras en México es la generada durante el beneficio del oro y plata, realizado comúnmente por amalgamación con mercurio y por cianuración. En ninguno de los dos casos, es posible la recuperación total de los compuestos y/o elementos adicionados, por lo que es común encontrarlos en los residuos del proceso (jales) en forma soluble. Los elementos potencialmente tóxicos más comunes derivados de estos procesos, en el caso de México son: Pb, Cd, Zn, As, Se y Hg (Volke *et al.*, 2005).

Cuadro 1. Relación de la actividad minera y su impacto al ambiente.

Fase	Descripción	Impacto ambiental
Exploración	Barrenación, obras y perforaciones.	Dstrucción de cobertura vegetal
Explotación	Obras diversas: tiros, socavones, patios para depósito de minerales, zonas para descarga de materiales	Operación de presas de jales: arrastre de residuos peligrosos. Descarga de aguas residuales
Beneficio	Concentración Trituración y molienda Tratamientos previos	Generación de ruido Vibración y emisión de polvo
Fundición y refinación	Obtención de metales y sus aleaciones (uso de hornos industriales) Eliminación de impurezas en los metales para aumentar la ley de contenido	Emisiones a la atmósfera, residuos peligrosos y aguas residuales

Fuente: INECC, 1994.

La minería en el estado de San Luis Potosí

El estado de San Luis Potosí se encuentra ubicado en la parte central de México y se divide, desde el punto de vista fisiográfico, en tres grandes regiones: 1) la Llanura Costera del Golfo; 2) la Sierra Madre Oriental y, 3) la Altiplanicie Mexicana, que regionalmente recibe el nombre de Altiplano Potosino, aquí se concentran ocho de las 14 regiones mineras del estado (Figura 1) (Sánchez-Crispín *et al.* 1994). El

Ríos Martínez

altiplano se conforma de regiones planas con alternancias de sierras locales, donde se extraen minerales metálicos como Au, Ag, Cu, Pb, Zn, Mn, Sn, Fe, Hg y Sb y minerales no metálicos como fluorita, fosforita, yeso, azufre, arcillas aluminicas, ónix, mármol, boratos, barita, travertino, dolomita, sal, calizas, canteras y materiales pétreos (SGM, 2011).



Figura 1. Actividad minera en el estado de San Luis Potosí. Figura tomada de: SGM, 2011.

Sitios de estudio

Los distritos estudiados en el presente trabajo se encuentran dentro de tres regiones mineras, las cuales se presentan en el Cuadro 2, a excepción del municipio de Cedral, el cual se encuentra ubicado en la zona del altiplano del estado de San Luis Potosí y el cual forma parte de un sistema industrial minero-metalúrgico que ha funcionado desde 1615 hasta la actualidad en un área denominada “región minera de la Sierra de Catorce” que corresponde a los municipios de Vanegas, Cedral, Catorce, Villa de La Paz y Matehuala. En la comunidad se ubicaron haciendas de beneficio

que procesaban el mineral que procedía de las minas de Real de Catorce, utilizando el método de patio (amalgamación con mercurio). Como desechos de este método, se generaron los jales de Jesús María y el Caballo, localizados dentro de la zona urbana de Cedral (Flores-Ramírez *et al.*, 2012).

El distrito minero Santa María de la Paz ha estado funcionando por más de 200 años (Fernández *et al.*, 1986), teniendo actualmente actividad de extracción y beneficio de minerales a partir de los yacimientos localizados en la llamada Sierra del Fraile, siendo uno de los principales distritos mineros activos del estado de San Luis Potosí. Los yacimientos que se han explotado son polimetálicos del tipo sistema skarn de Pb, Zn, Ag, Cu y Au (Razo *et al.*, 2004).

Los trabajos históricos actuales sobre el municipio Cerro de San Pedro han concentrado su atención en torno a la minería desde el momento mismo del hallazgo del "Cerro del Potosí", lugar de fundación del real de minas de Cerro de San Pedro a finales del siglo XVI. Una vez oficializado el descubrimiento minero e iniciado el asentamiento de población desde 1592, el lugar se convirtió en un centro de confluencia de personas interesadas en la explotación de oro y plata. Las tareas de exploración, extracción y beneficio impulsaron el surgimiento de asentamientos y haciendas como Real del Monte (Caldera), Portezuelo, San Francisco de los Pozos y Armadillo, por mencionar algunas (Martínez *et al.*, 2010).

En el Distrito Minero de Charcas los cuerpos mineralizados consisten de vetas y zonas de reemplazamiento (tipo skarn), siendo estos últimos los de mayor interés por su volumen (SGM, 2007). En este distrito se explotan minerales como Au, Ag, Zn y Cu. El descubrimiento del mineral de Charcas fue hecho en 1563 y a la mina principal se le impuso el nombre de San Cristóbal (INAFED, 2010).

Cuadro 2. Zonas de estudio en diferentes regiones mineras del estado de S.L.P.

Región minera	Mineralización	Forma de yacimiento	Distrito minero	Municipio	Tiempo de explotación	Referencia
San Luis Potosí	Au, Ag, Cu, Zn, Pb y Sn.	Vetas, chimeneas, mantos, diseminados	<u>Distrito Minero Cerro de San Pedro.</u> Zona Mineralizada Villa de Reyes. Zona Mineralizada Villa de Arriaga.	Cerro de San Pedro.	400 años	(Velázquez, 1946)
Sierra de Catorce	Au, Ag, Cu, Pb, Zn, Fe, Sb y Hg	Vetas, chimeneas y mantos.	Distrito Minero Real de Catorce <u>Distrito Minero Santa María de la Paz</u> Distrito Minero La Maroma Distrito Minero San José Tierras Negras (Wadley)	Villa de la Paz	300 años	(Flores-Ramírez, 2012)
Charcas	Au, Ag, Cu y Zn.	Vetas, chimeneas.	<u>Distrito Minero Charcas</u> Zona Mineralizada San Rafael Zona Mineralizada Santa Gertrudis	Charcas	400 años	(INAFED, 2010)
Cedral	Au, Ag, Cu, Pb, Zn, Fe, Sb y Hg	Desechos mineros	Haciendas de beneficio de Jesús María y el Caballo	Cedral	300 años	(Flores-Ramírez, 2012)

Fuente: SGM, 2011.

Descripción de los sitios de estudio

Cerro de San Pedro

El municipio se encuentra localizado en la zona centro del estado de San Luis Potosí (Figura 2). La cabecera municipal tiene las siguientes coordenadas 100°47'59" de longitud oeste y 22°12'58" de latitud norte con una altura de 2,047 metros sobre el nivel del mar, con una extensión de 127.48 Km² y cuenta con 4,021 habitantes (SNIM, 2010). El clima predominante en esta zona es seco templado, con una temperatura media anual de 16.8°C y una precipitación pluvial anual de 304.5 mm, el municipio cuenta con diversos arroyos intermitentes. Los tipos de vegetación predominantes en la zona son: matorral micrófilo, matorral espinoso y nopaleras. La fauna dominante se caracteriza por especies de mamíferos pequeños como: coyote, gato montés, liebre, conejo y algunas variedades de aves y reptiles. La mayor parte del municipio está asentado en suelo de tipo litosol eútrico con pendientes que van del 8% a mayores de 20%. Al oeste y al sur se detecta una zona constituida por xerosol calcárico donde se localiza una porción de suelo medianamente salino. El uso del suelo es para pastoreo extensivo (INAFED, 2010). Las principales actividades productivas en la zona son: agricultura de autoconsumo de maíz y frijol; la producción pecuaria, principalmente de ganado bovino, caprino y lanar; y la actividad minera (Rojas-Rodríguez, 2011).



Figura 2. Localización del municipio Cerro de San Pedro, S.L.P. Figura propia.

Charcas

El municipio se encuentra localizado en la parte norte del estado, en la zona altiplano (Figura 3), las coordenadas de la cabecera municipal son 101°06'48" de longitud oeste y 23°07'47" de latitud norte, con una altura de 2,017 metros sobre el nivel del mar, con una extensión de 2,164.66 Km², con 21,138 habitantes (SNIM, 2010). En la mayor parte del municipio predomina el clima seco templado, en la zona existen arroyos intermitentes. Las especies vegetales dominantes en el área del municipio son: gobernadora, mezquite, huizache, hojasén, granjeno y nopaleras. La fauna se caracteriza por especies de mamíferos pequeños como: liebre, aves silvestres, víboras, venados, gato montés, tigrillo y arácnidos. El tipo de suelo que se encuentra en este municipio se clasifica como litosol eútrico calcárico con textura media, es de topografía plana con pendientes menores del 8%. El uso del suelo es pecuario. En la parte central del municipio se localiza la principal zona minera con yacimientos de mercurio y antimonio. El territorio destaca por que en él se encuentran productos minerales como oro, plata, zinc, cobre, plomo, ónix y mármol (INAFED, 2010). Las

Ríos Martínez

principales actividades productivas en la zona son la agricultura, ganadería, la minería, industria manufacturera (Arnecom), industria de la construcción y la industria energética (C.F.E., Organismo Operador de Agua Potable, gaseras y gasolineras); teniendo a la industria minera como el desarrollo económico del municipio.



Figura 3. Localización del municipio de Charcas, S.L.P. Figura propia

Cedral

El municipio se encuentra localizado en la parte norte del estado (Figura 4), con coordenadas $100^{\circ}43'35''$ de longitud oeste y $23^{\circ}49'10''$ de latitud norte, con una altura de 1,701 metros sobre el nivel del mar, una extensión de 1,185.06 Km² y cuenta con 18,485 habitantes (SNIM, 2010). El clima predominante en la zona es el seco templado, con una temperatura anual de 16.8 °C, y una precipitación anual de 420 mm, no existen corrientes superficiales de importancia. Los suelos son de origen sedimentario, el material predominante está constituido por detritos de roca caliza, calcilutitas y areniscas; son moderadamente profundos a poco profundos, presentándose una superposición de estratos calichosos endurecidos, variando la profundidad, son de color café amarillento claro a café grisáceo. Se explota en ellos

Ríos Martínez

la actividad pecuaria. La topografía de este municipio varía del 1.5% al 5%. El relieve es ondulado en toda la superficie. El uso del suelo es principalmente de ganado caprino; su uso actual agrícola y ganadero con bajo rendimiento. El municipio se encuentra cubierto por la vegetación típica de la zona desértica; como el matorral desértico micrófilo, espinoso, nopalera, izotal, cardonal y pastizal. La fauna se caracteriza por especies como: el venado casi en extinción, liebres y víboras de cascabel (INAFED, 2010). Las actividades productivas de la zona son la agricultura, de maíz, frijol, cebolla y alfalfa; ganadería (bovino, ovino, porcino, equino, aves de corral con producción de leche, huevos, miel y carne); e industrias manufactureras, de la construcción, eléctricas, minería y petróleo.



Figura 4. Localización del municipio Cedral, S.L.P. Figura propia

Villa de la Paz

Se encuentra ubicado al norte del estado de San Luis Potosí (Figura 5). La cabecera municipal tiene las siguientes coordenadas: 100°42'47" de longitud Oeste y 23°40'31" de latitud Norte, con una altitud de 1,837 metros sobre el nivel de mar, con una extensión de 131.33 km² y cuenta con 5,350 habitantes (SNIM, 2010). El municipio cuenta con un clima seco templado. La temperatura media anual oscila entre los 18°C; el mes más caliente es junio con 28°C y el mes más frío enero con 3°C. La precipitación pluvial es de 486 milímetros anuales (INAFED, 2010). En la región no existen corrientes fluviales de importancia, sólo se localizan arroyos intermitentes, los cuales se forman en las sierras y transportan agua sólo durante eventos de lluvias torrenciales, sin ninguna utilización económica o social, pero el agua que llevan se capta en diferentes bordos que dan servicio de abrevadero para ganado y en menor medida para riego de algunas tierras (Razo, 2004). Predomina de manera notable el suelo de tipo litosol, el cual encontramos en la parte central norte y oeste. Alrededor de la cabecera municipal y hacia el norte se detecta una asociación del litosol con rendzina. En la porción central y norte se denota una fase petrocálcica. Hacia el norte y sureste, encontramos áreas consideradas dexerosol calcárico (CEFIM, 2012). Los tipos de vegetación se han definido por su fisonomía, derivada a su vez de la forma de vida en sus especies dominantes, de esta manera encontramos matorral desértico espinoso, micrófilo, nopaleras, izotal, cardonal y pastizal. De estas combinaciones se presentan especies como: gobernadora, mezquite, huizache, hojasén, corolaria, maguey, lechuguilla, guapilla, sotol, nopalera, palma china, palma loca y variedad de zacate como el salado y navajita. La fauna se caracteriza por especies dominantes como: liebre, víbora de cascabel y aves silvestres, gato montés, ardilla y ratón de campo. Las actividades productivas de la zona son: agrícola de tuna, pastos y praderas acicalado, maíz grano y frijol; ganadera, el municipio cuenta con actividades como la producción de carne de bovinos (8 toneladas/año), porcinos (9 toneladas/año), ovinos (1 tonelada/año), caprinos (19 toneladas/año) y producción de leche de bovino (18 mil L/año) y caprino (23 mil L/año) (INEGI, 2011); e industrial, en donde operan dos empresas pequeñas que fabrican veladoras y aromatizantes.

Ríos Martínez

Anteriormente funcionaba también una maquiladora de tamaño mediano, pero cerró en el año 2003. La economía de la cabecera municipal gira en torno de la empresa minera Santa María de la Paz y Anexas SA de CV, única empresa de este giro que está activa en la región. La empresa minera ocupa el 38.66% del área total de la cabecera municipal, por lo tanto el sitio es una típica área minera (INAFED, 2010).

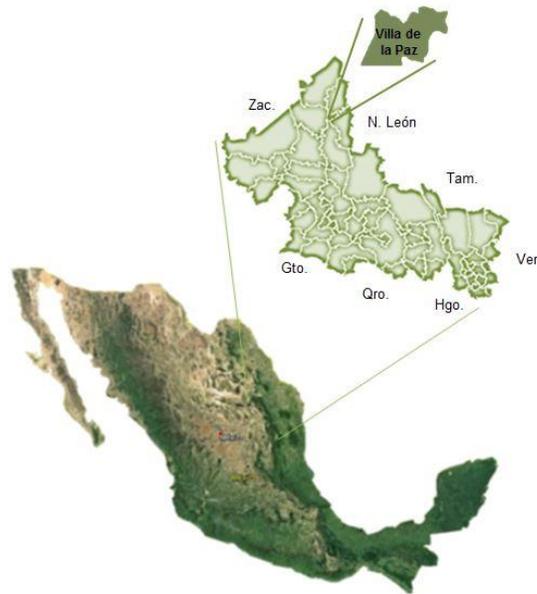


Figura 5. Localización del municipio de Villa de la Paz, S.L.P. Figura propia

MARCO TEÓRICO

El suelo

Se puede definir el suelo como el soporte de una gran variedad de organismos, entre ellos la vegetación. El suelo se puede considerar como un sistema abierto que presenta intercambios de materia y energía con el medio, en donde se desarrollan diversos procesos físicos, químicos y biológicos, responsables de su morfología y propiedades. Este está compuesto por tres fases: 1) sólida, 2) líquida y 3) gaseosa, los cuales se presentan en la Figura 6 (Bautista, 1999).

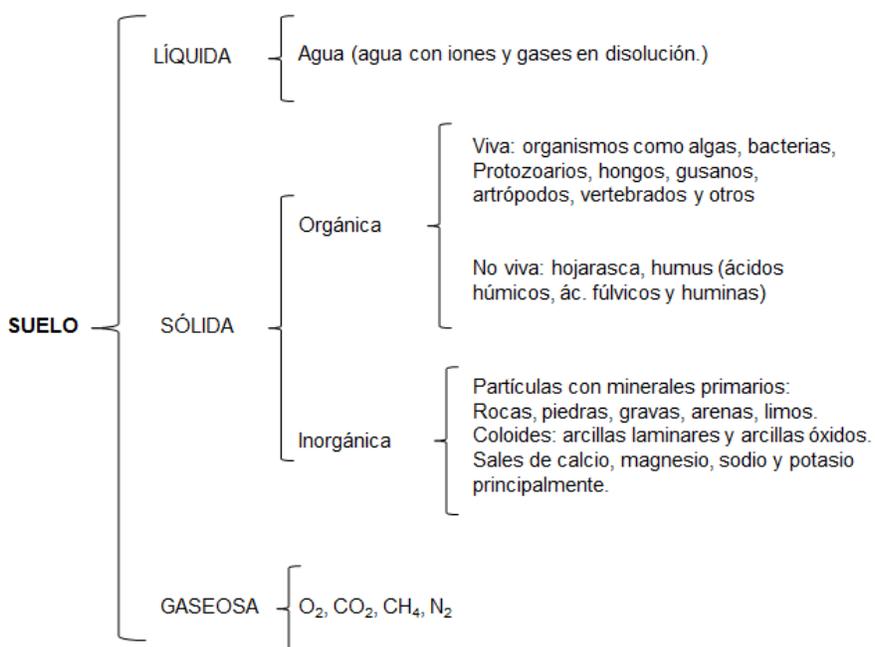


Figura 6. Componentes de las fases del suelo. Figura tomada de: Bautista, 1999.

La fracción orgánica está constituida por desechos vegetales y animales, además de cantidades variables de materia orgánica amorfa llamada humus. Esta fracción puede ser muy variable: un suelo árido puede contener cerca de 0.5%, mientras que una turba puede tener alrededor de 95% de materia orgánica, sin

embargo, la mayoría de los suelos, en general, tienen un contenido de materia orgánica entre 0.5 y 5% (Volke *et al.*, 2005).

Los elementos más comúnmente encontrados en la fracción inorgánica del suelo, en orden de abundancia son: Si>Al>Fe>C>Ca>K>Na>Mg>Ti. Además esta fracción está compuesta por partículas de diferente tamaño como la arcilla con tamaño de partícula menor a 0.002 mm, limo que va de 0.002-0.05 mm el tamaño de la partícula, arena con 0.05-2 mm y la grava con partículas mayores a 2 mm (Volke *et al.*, 2005).

Entre los múltiples elementos y compuestos que conforman el suelo se encuentran sustancias añadidas por la actividad humana, que por sus características son considerados contaminantes, por ejemplo el Pb, Cd, Zn, As, Se y Hg (ver elementos potencialmente tóxicos) (Volke *et al.*, 2005). Un suelo contaminado es una porción delimitada de terreno superficial o subterráneo, donde las cualidades originales han sido modificadas por la acción humana, produciendo: a) contaminación física con variaciones en parámetros como temperatura y radioactividad; b) contaminación biológica, al inducir la proliferación de especies o cepas patógenas ajenas a los microorganismos presentes en el suelo de forma natural y c) contaminación química por adición de elementos o compuestos en concentraciones que alteren la composición originaria del suelo, tales como los metales pesados (Ruda *et al.*, 2004).

Metales pesados

El término “metal pesado” es impreciso, debido a que no tiene una base científica rigurosa o una definición química. Sin embargo, muchos de los elementos que se enlistan dentro de éste término, se definen como aquellos elementos químicos que presentan una densidad igual o superior a 5 g cm^{-3} cuando están en forma elemental. Rigurosamente, y desde el punto de vista químico, los metales pesados están

constituidos por elementos de transición y post-transición incluyendo algunos metaloides como el arsénico y selenio. Una forma opcional de nombrar a este grupo es como “elementos potencialmente tóxicos” (EPT), los cuales, de acuerdo a la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA, por sus siglas en inglés), incluyen a los siguientes elementos: arsénico, cromo, cobalto, níquel, cobre, zinc, plata, cadmio, mercurio, titanio, selenio y plomo (INECC, 2009).

Elementos potencialmente tóxicos

La toxicidad de los EPT depende en gran medida de dos factores conocidos como geodisponibilidad y biodisponibilidad que a su vez están controlados tanto por la química intrínseca de la sustancia, así como por el medio receptor. La geodisponibilidad es la cantidad de elementos que pueden ser liberados (de jales) y transportados por erosión hídrica a otras zonas, generando daños a los ecosistemas (como daño al ADN en raíces de plantas); y la biodisponibilidad, es la fracción de la sustancia que puede ser absorbida por los seres vivos, y generalmente se asocia con su solubilidad (Corrales y Martín, 2013; Saucedo, 2014).

La toxicidad individual de los EPT es variable en cada caso, pero la interacción con las biomoléculas se puede englobar de la siguiente manera: A) desplazamiento de un nutriente ligado a una biomolécula por un ETP; B) daño de un EPT a una biomolécula que bloquea la participación de esta en la bioquímica del organismo y C) modificación en la conformación de la biomolécula que es crítica para su funcionamiento bioquímico (Saucedo, 2014). Algunos de los elementos potencialmente tóxicos se describen a continuación.

Plomo

El Pb es un metal tóxico presente de forma natural en la corteza terrestre en una concentración promedio de 15 mg/Kg. En sedimentos arcillosos, sedimentos

Ríos Martínez

calcáreos y rocas ígneas las concentraciones de Pb van de 14-40 mg/Kg, 3-10 mg/Kg y 10-25 mg/Kg, respectivamente (Kabata-Pendias, 2011). El Pb es uno de los metales pesados más abundantes en medios terrestres y acuáticos, a causa de actividades humanas como la minería, la fundición, el uso de combustibles y explosivos. La toxicidad del Pb causa síntomas similares a otros metales pesados, tales como inhibición del crecimiento y clorosis, entre otros (Furini, 2012).

Cadmio

Es un metal que se encuentra en la corteza terrestre en un promedio de 0.1 mg/Kg; asociado con minerales de zinc, plomo y cobre (ATSDR, 2016c). El Cd y el Zn tienen estructura iónica, electronegatividad y propiedades químicas similares. Sin embargo, el Cd tiene una fuerte afinidad para el S, y por lo tanto su movilidad en un ambiente ácido es más alta que la del Zn. Durante los procesos de meteorización, el Cd forma compuestos simples, tales como CdO, Cd (OH)₂, CdCl₂ y CdF₂ que son fácilmente móviles. El Cd es considerado como uno de los metales más tóxicos que muestran efectos adversos en todos los procesos biológicos de los seres humanos, animales y plantas (Kabata-Pendias, 2011).

Cobre

El cobre se presenta en la corteza terrestre a concentraciones entre 25 y 75 mg/Kg, en promedio de 55 mg/kg; y tiene una fuerte afinidad por el S, por lo cual sus principales minerales son calcopirita (CuFeS₂), bornita (Cu₅FeS₄), calcosina (Cu₂S) y covelina (CuS). El contenido de Cu está estrechamente asociado con la textura del suelo y por lo general, se encuentra más bajo en suelos arenosos (3-30 mg/Kg) y más alto en suelos arcillosos (7-140 mg/Kg) (Kabata-Pendias, 2011). El Cu es uno de los metales menos móviles en el suelo, aunque a menudo se encuentran grandes cantidades en la solución de los suelos (3-135 µg/L) (Bautista, 1999). El cobre es

considerado perjudicial para el crecimiento o metabolismo de las células al exceder la concentración media en suelos (Rojas, 2011).

Mercurio

El Hg se ha conocido desde los tiempos prehistóricos, y durante más de un siglo ha sido conocido como un contaminante ambiental. Se presenta en la corteza en una concentración media de 0.07 mg/Kg. Se concentra mayormente en suelos arcillosos (0.02-1.5 mg/Kg), y en menor medida en suelos arenosos (0.08-0.7 mg/Kg). Las características geoquímicas más importantes del Hg son las siguientes: 1) afinidad para formar enlaces fuertes con el S (por ejemplo el cinabrio); 2) formación de compuestos organomercurícos, que son relativamente estables en medios acuosos; 3) formación de compuestos gaseosos y; 4) la volatilidad del Hg elemental (Kabata-Pendias, 2011). La USEPA considera al Hg el elemento más tóxico, debido a que es muy perjudicial aun en pequeñas cantidades (Posada y Arroyave, 2006).

Arsénico

El As es un elemento natural de la corteza terrestre; ampliamente distribuido en todo el ambiente (aire, agua y tierra) (WHO, 2012). El contenido medio de As en la corteza terrestre se estima como 1.8 mg/Kg. Se encuentra abundantemente en sedimentos arcillosos (1-23 mg/Kg), que en cualquier otra roca. Sus estados de oxidación son variables (As^0 , As^{3+}). As^{5+} son absorbidos preferentemente por sedimentos que otros iones As. Hay muchos minerales con As, de los cuales cerca del 60% son arseniatos. El As se combina con algunos metales como Fe, Pb y Cu. El valor medio de As en los diferentes suelos se estima como 6.83 mg/Kg (Kabata-Pendias, 2011). La fitotoxicidad del As viene determinada por la forma química presente en el suelo. El arsenito es más fitotóxico que el arseniato debido a que es un análogo del fosfato, y es altamente soluble, lo que ayuda a su rápida absorción por las raíces de las plantas (Carbonell *et al.*, 1995).

Metales pesados como nutrientes esenciales

Los minerales encontrados en los organismos se consideran esenciales si son necesarios para el crecimiento, reproducción y salud, o no esenciales, si no tienen un papel fisiológico claro (González *et al.*, 2009).

Como se ha visto anteriormente hay ETP (Zn, Cd, As, Hg, Pb, Fe, Cu) presentes en el ambiente ya sea de forma natural o “añadidos” por medio de actividades humanas. Algunos de estos elementos son considerados esenciales para el crecimiento vegetal. Se define un elemento esencial como aquél cuya ausencia impide a la planta completar su ciclo vital (Taiz y Zeiger, 2006). Los elementos esenciales se clasifican normalmente en macronutrientes (N, K, Ca, Mg, P, B, Si) y micronutrientes (Cl, Fe, B, Mn, Na, Zn, Cu, Ni, Mo), los cuales son esenciales para el metabolismo y estructura de las plantas (Furini, 2012).

Factores que influyen la biodisponibilidad de metales pesados en plantas

La absorción de los metales por las plantas depende de su biodisponibilidad en el suelo (Diez *et al.*, 2002) y la tolerancia de la especie vegetal al elemento considerado (Moreira, 2009). La biodisponibilidad de algún metal se define como la fracción del contenido total del metal en el suelo que puede ser absorbido por un receptor (Shahid *et al.*, 2012). Existen diversos factores que influyen la disponibilidad de los metales a las plantas, entre los que se encuentran: materia orgánica, pH, arcilla y conductividad eléctrica, entre otros (Rieuwerts *et al.*, 1998; Reichman, 2002; Silveira *et al.*, 2003; Basta *et al.*, 2005).

Materia orgánica (MO)

La materia orgánica del suelo es uno de los indicadores más importantes de la calidad del suelo. Influye en muchas de las propiedades del suelo, incluyendo el suministro de nutrientes (N, P, S), la capacidad de intercambio catiónico, adsorción

de contaminantes, infiltración y retención del agua, estructura y color del suelo. La MO se compone de células microbianas, ácidos húmicos, residuos animales y vegetales en sus diferentes etapas de descomposición, etc. (Sherameti y Varma, 2010).

La MO es un factor importante respecto a la acumulación y liberación de metales pesados debido a que tiene la capacidad de interactuar con iones metálicos, óxidos, hidratos y minerales formando complejos que pueden ayudar a disolver, movilizar y transportar metales en los suelos y que al ser liberados podrían entrar en contacto directo con las raíces de las plantas (Moreno *et al.*, 2002; Bannon *et al.*, 2009; Collins y Finnegan, 2010).

pH

La biodisponibilidad de los ETP depende del pH del suelo. Cuando más bajo sea éste, mayor será la concentración de metales en solución y por consiguiente estarán más disponibles para las plantas. La movilidad de los ETP está determinada decisivamente por el pH del suelo, a pH ácido aumenta la movilidad del Al, Zn, Mn, Cu, Co, Fe, y a pH básico la de Mo y Se (Ruda *et al.*, 2004).

Textura del suelo

La textura del suelo es la descripción de un horizonte de suelo o tierra en términos del tamaño de componentes minerales dominantes (Mauser y Prash, 2006). Los suelos se clasifican, en función al tamaño de partículas, en cuatro principales componentes: arcilla (<0.002 mm), limo (0.002-0.05 mm), arena (0.05-2 mm) y grava (>2 mm). Las cantidades relativas de cada tipo de partícula mineral determinan la textura de un suelo y tienen un impacto directo sobre sus propiedades físicas, químicas y biológicas (Volke *et al.*, 2005).

La textura del suelo interviene en la dinámica de los metales, ya que la formación de macroporos puede causar una rápida infiltración y redistribución del agua y de los solutos del suelo, modificando el pH y la capacidad de intercambio catiónico y por consecuencia la disponibilidad de los metales (Mauser y Prash, 2006). Saeki y colaboradores (1993) mencionan que existe un incremento general en la concentración de metales pesados de las fracciones gruesas a las finas, por lo tanto, las arcillas contienen mayores cantidades de metales pesados. Por otro lado, los suelos con textura fina o con horizonte con altos niveles de MO tienen una mayor capacidad de adsorción de metales que los suelos con textura arenosa a baja cantidad de MO (Stahl y James, 1991)

Conductividad eléctrica

La conductividad eléctrica es la capacidad de una solución acuosa para conducir la corriente eléctrica, generalmente se expresa en dS/m a 25°C (NOM-021-SEMARNAT-2000). Es una propiedad de las soluciones que se encuentra muy relacionada con el tipo y valencia de los iones presentes, sus concentraciones total y relativa, su movilidad, la temperatura del líquido y su contenido de sólidos disueltos (Fernández *et al.*, 2006). Todos los suelos fértiles contienen por lo menos pequeñas cantidades (<1.0 dS/m) de sales solubles. Cuando un suelo tiene un exceso de sales solubles se le denomina suelo salino (4.1-8.0 dS/m) (NOM-021-SEMARNAT-2000). Los suelos contaminados con metales pesados pueden generar alta CE, esto debido a las interacciones de los metales con otros elementos como el oxígeno, calcio, potasio, carbonatos (CO_3^{2-}), fosfatos (PO_4^{3-}), para formar sales como carbonato de cadmio (CdCO_3), cloruro de cadmio (CdCl_2) y sulfato de cadmio (CdSO_4) (Bautista, 1999).

La química de los metales en el suelo es compleja. La forma habitual de presentación de los metales en el suelo es en forma catiónica, tendiendo a hidrolizarse rápidamente en las soluciones del suelo (Fergusson, 1990; Vázquez *et*

al., 2001). La distribución de los metales añadidos a los suelos se puede resumir de la siguiente manera: los metales que se incorporan en el suelo, podrán distribuirse en la fase sólida o en la fase líquida. Los metales disponibles a las plantas y los susceptibles a lixiviación están presentes siempre en la solución del suelo, es decir, en la fase líquida, ya sea como iones metálicos libres, como complejos y/o quelatos. Cuando éstos son absorbidos por las plantas, o son lixiviados a las capas inferiores, la solución del suelo se requiebra restituyendo nuevamente estos metales de su fase sólida. De modo que se establece un equilibrio constante entre ambas fases del suelo.

Importancia ecológica de las plantas

Las plantas tienen un rol importante en los ecosistemas terrestres debido a que proporcionan refugio y son un sitio de anidamiento para numerosos organismos, igualmente participan de forma primordial en el reciclaje de nutrientes y en la estabilización y/o fertilización de los suelos. También son las responsables de transformar la energía solar en energía química, al tiempo que absorben dióxido de carbono proveyendo alimento y oxígeno al resto de los organismos (Cuevas *et al.*, 2012). Otra importancia de las plantas, es que regulan el ciclo del agua, ayudan a distribuir y purificar el agua del planeta; ayudan a mover el agua del suelo a la atmósfera a través de la transpiración. Además de la importancia ecológica que tienen las plantas en algunos estudios se han encontrado plantas con ciertas características para remediar sitios contaminados con PAHs y metales pesados (Kvesitadze *et al.*, 2006; Olguín *et al.*, 2007; Marengo, 2008; Mendoza *et al.*, 2008; Delgadillo-López *et al.*, 2011).

De forma general, el daño a las plantas por los contaminantes puede afectar directamente a la estructura y la función de los ecosistemas, al reducir la producción primaria, incrementar el lavado y erosión del suelo y degradar el hábitat de la vida silvestre. Los efectos letales de los contaminantes sobre las plantas pueden significar

pérdidas ecológicas y económicas muy importantes; incluso los efectos subletales tienen un impacto significativo sobre la producción de alimentos y el desarrollo de la vegetación natural, e implicaciones adversas para los organismos pertenecientes a niveles superiores en la cadena alimenticia (Cuevas *et al.*, 2012).

Efectos de ETP sobre algunas funciones biológicas en plantas.

Al igual que todos los organismos vivos, las plantas suelen ser sensibles tanto a la deficiencia como al exceso de algunos elementos tanto tóxicos (As, Pb, Cr) como esenciales (Fe, Mo, B, Zn), los cuales son considerados como contaminantes del suelo, debido a su amplia ocurrencia y efecto tóxico agudo y crónico en plantas (Nagajyoti *et al.*, 2010). Una vez absorbido por la planta la interacción de los ETP con los diferentes compuestos de las células, puede ocasionar alteraciones en los procesos metabólicos normales a nivel celular/molecular por la inactivación de enzimas, el bloqueo funcional de grupos de moléculas metabólicamente importantes, desplazando o sustituyendo a los elementos esenciales y dañando las membranas (Sherameti y Varma, 2010). Una de las consecuencias más comunes de intoxicación por metales pesados es la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), debido a la interferencia con las actividades del transporte de electrones. Este aumento de ERO expone a las células al estrés oxidativo que conduce a la peroxidación de lípidos, el deterioro de macromoléculas biológicas, el desmantelamiento de la membrana, fugas de iones y la escisión de la cadena de ADN (Figura 7) (Zitka *et al.*, 2013; Shahid *et al.*, 2014).

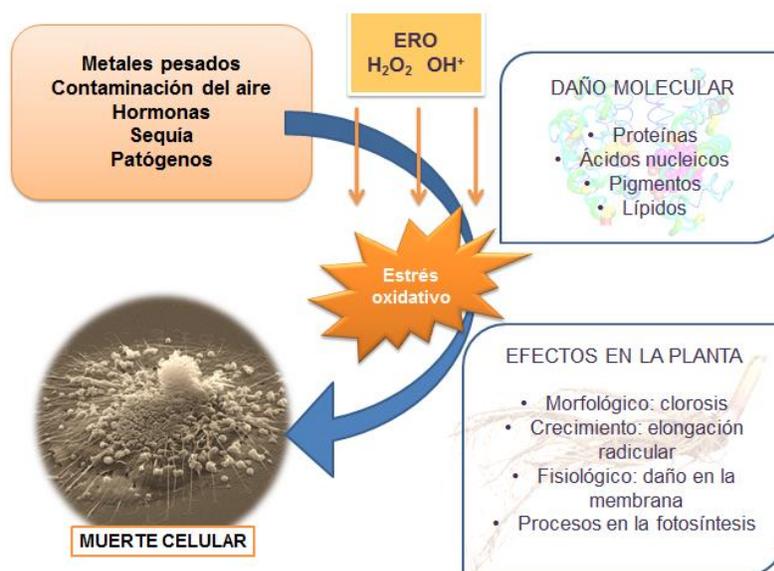


Figura 7. Estresores que conducen a la muerte celular en plantas. Elaborado con información de: Sherameti y Varma, 2010; Zitka *et al.*, 2013; Shahid *et al.*, 2014

Las altas concentraciones de metales pesados han inducido en las plantas un mecanismo de resistencia, los cuales son la evasión y tolerancia. 1) La evasión es la capacidad de las plantas para prevenir una captación excesiva del metal; esta puede ser por medio de cambios en la capacidad de la pared celular para unir metales en raíces o bien por la alteración en la composición de la membrana celular para prevenir la difusión pasiva de iones metálicos, también puede ser por el incremento en la exudación de sustancias quelantes de metales; y 2) la tolerancia, que es la capacidad de las plantas a enfrentarse con los metales que se acumulan de manera excesiva en su organismo, donde pueden asignar el exceso de metales a las hojas viejas o restringir el transporte de raíz al tallo (González, 2006).

A continuación se presentan algunos efectos que presentan las plantas ante un metal pesado.

Efecto de las plantas ante la presencia de arsénico

La fitodisponibilidad del arsénico (As) se encuentra determinada por las concentraciones, la forma química que se produce en el medio y la especie de la planta. Las principales formas de As son el arsenito (As II, forma más fitotóxica), y el arseniato (As V), que son absorbidos fácilmente por las plantas, debido a la textura y fosfatos presentes en el suelo (Patra *et al.*, 2004). El arseniato es un análogo del fosfato (P) y ambos compiten para ser portadores de absorción en la membrana plasmática de la raíz de las plantas (Meharg y Macnair, 1992). El arsénico inorgánico inhibe la actividad de la enzima y el arsénico trivalente inorgánico reacciona con los grupos sulfhídricos de las proteínas que afectan a muchas enzimas que contienen tales grupos; además reemplaza el fósforo en los grupos fosfato del ADN (Patra *et al.*, 2004). En vista de que existen un sin fin de reacciones en las plantas, las cuales implican a grupos sulfhídricos y fósforo, el arsenito y el arseniato pueden interferir en procesos fisiológicos y bioquímicos, los cuales podrían tener efectos adversos en las plantas.

Efecto de las plantas ante la presencia de plomo

El plomo (Pb) es uno de los elementos tóxicos más distribuidos y abundantes en el suelo. La absorción del Pb por las raíces se produce a través de la vía apoplástica o por medio de los canales de Ca^{2+} , que es controlada por su especiación, el pH del suelo, tamaño de las partículas del suelo, capacidad de intercambio catiónico, área de la raíz superficial y la exudación de la raíz (Pourrut *et al.*, 2011a), además se ha demostrado que sin quelantes, gran parte del Pb (casi el 95%) tiende a acumularse en células de raíz, debido a factores como secuestro en la vacuolas, precipitación, inmovilización o acumulación en la membrana plasmática (Shahid *et al.*, 2012).

El efecto antimitótico del Pb es uno de los efectos tóxicos mejor conocidos en plantas. En raíces de *Vicia faba* se ha demostrado que se acorta la etapa mitótica y

Ríos Martínez

se prolonga la interfase, extendiendo así el ciclo celular (Qun y Xiao, 1995). Asimismo, resultados de estudios *in vitro* han demostrado que el Pb crea roturas en cadenas simples y dobles de ADN y con ello afecta a enlaces ADN-ADN y proteínas-ADN (Rucinska *et al.*, 2004; Gichner *et al.* 2008; Shahid *et al.* 2011; Pourrut *et al.*, 2011b; Arya *et al.*, 2013). Adicionalmente se ha reportado que genera efectos adversos en la morfología (clorosis, engrosamiento radicular), en el crecimiento (inhibición en la germinación de semillas, elongación de las raíces), en la fisiología (inhibición de actividad enzimática, estado hídrico, alteraciones en la permeabilidad de la membrana, perturbación en la nutrición mineral, estrés oxidativo, daño al ADN) y en los procesos fotosintéticos (Paivoke, 1983; Sharma y Dubey, 2005; Pourrut *et al.*, 2011a; Kumar *et al.*, 2016). Las plantas poseen varias estrategias de defensa para hacer frente a la toxicidad del Pb, tales estrategias incluyen el secuestro del Pb en las vacuolas, unión del Pb por fitoquelatinas, glutatión y aminoácidos, y la síntesis de osmolitos. Además, la activación de diversos antioxidantes para combatir el aumento de la producción de ERO (Pourrut *et al.*, 2011a).

Efecto de las plantas ante la presencia de cobre

El cobre (Cu) es considerado como un micronutriente para las plantas y forma parte como grupo prostético de enzimas que participan en procesos fundamentales, tales como el transporte de electrones en la fotosíntesis y la respiración (Demirevska-kepova *et al.*, 2004; Kasim, 2006). Otras enzimas que requieren del cobre son las que catalizan las reacciones de lignificación de la pared celular y de la eliminación de las ERO, por ejemplo las plastocianinas, citocromo oxidasa, tirosina, D-galactosa oxidasa, ascorbato oxidasa y superóxido dismutasa (Fernandes y Henriques, 1991; Stadtman y Oliver 1991; Maksymiec, 1998). Las plantas realizan de forma normal sus funciones a una concentración de 5-30 mg de cobre por Kg de tejido en peso seco (Pasternak *et al.*, 2005; Groppa *et al.*, 2008; Lequeux *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2010). Niveles superiores de cobre son considerados tóxicos, ya que afectan el crecimiento y la fotosíntesis. En las raíces, la inhibición del crecimiento por el cobre puede ser

resultado de una reducción en el proceso de división celular y el daño estructural o la muerte de las células del meristemo apical (Jiang *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2009), ocasionando una disminución del diámetro de raíces y tallos (Pasternak *et al.*, 2005; Kasim, 2006). La inhibición del crecimiento de la raíz principal, generalmente va acompañada de una reducción de la zona de elongación y de un incremento en la formación de raíces laterales o de pelos radicales que se desarrollan lejos del meristemo apical. Este re-arreglo en la morfología de las raíces involucra cambios en la distribución de auxinas y citocininas, y en el metabolismo de ERO (Pasternak *et al.*, 2005; Lequeux *et al.*, 2010).

Algunas plantas como *Arabidopsis thaliana* exudan ácidos orgánicos como el citrato en respuesta al estrés por cobre (Murphy *et al.*, 1999), que a su vez pueden formar complejos con el metal o cambiar el pH de la rizósfera y alterar la absorción del cobre (López-Bucio *et al.*, 2000). Cuando las concentraciones internas de cobre son altas (>20 mg/Kg), hay plantas que no translocan el metal a la parte aérea (Russo *et al.*, 2008; Kabata-Pendias, 2011). En otras plantas, el exceso de cobre es almacenado en las vacuolas de las hojas como mecanismo de tolerancia (Boojar y Goodarzi, 2007; Ke *et al.*, 2007). La unión del cobre a otras moléculas (quelación) es una forma de mantener el metal en una baja concentración en el citosol. Los ligandos de alta afinidad por cobre son ácidos orgánicos (málico, cítrico, oxálico), aminoácidos (prolina, histidina, asparagina y cisteína), péptidos (glutación y fitoquelatinas) y metalotioneínas (Hall, 2002; Sharma y Dietz, 2006).

Efecto de las plantas ante la presencia de zinc

El Zinc (Zn) es un micronutriente esencial que afecta a varios procesos metabólicos de las plantas, como la fotosíntesis, la regulación y síntesis de proteínas, el mantenimiento de la integridad de la membrana de la raíz; así mismo, interviene en el crecimiento y la fisiología de la planta. Una de las funciones importantes del zinc es la regulación de la expresión de genes al formar parte de factores de

transcripción, particularmente en los dominios de las proteínas conocidos como dedos de zinc; varias de estas proteínas han sido implicadas en la regulación de procesos biológicos importantes como desarrollo de la flor, morfogénesis regulada por la luz y respuestas a patógenos (Cañas *et al.*, 2012). Las concentraciones de Zn que se encuentra en suelos contaminados con frecuencia superan a las requeridas como nutrientes (20 mg/Kg de peso seco) (Ebbs y Kochian 1997; Fontes y Cox 1998; Casierra-Posada y Poveda, 2005).

Bioensayos en plantas

Los bioensayos son pruebas en las que se usan organismos vivos para detectar o medir la presencia y efectos de una o más sustancias tóxicas, así como determinar el límite de tolerancia de dichas sustancias con respecto a los organismos (DGECyTM, 2009).

El uso de organismos en condiciones controladas *in vivo* e *in vitro* ofrece múltiples ventajas en estudios de toxicología y en específico en el área de la toxicología genética (Gaytán, 2006). Entre más de 200 ensayos biológicos conocidos en la literatura (Ma, 1999), los bioensayos de plantas son en general más sensibles que la mayoría de los otros sistemas para el diagnóstico ecotoxicológico de contaminantes en el medio ambiente (Saghirzadeh *et al.*, 2008; Dhawan *et al.*, 2009; Yıldız *et al.*, 2009; Bandyopadhyay y Mukherjee, 2011; Pentreath *et al.*, 2015). El Programa de Toxicología Genética (Gene-Tox) de la USEPA ha revisado 26 grandes sistemas biológicos desde los años 70s, en donde se demostró que las plantas son únicas por su capacidad de servir como monitores *in situ* para contaminantes genotóxicos, presentes en el ambiente que existen ya sea en forma individual o complejo. Los principales sistemas de plantas incluidas en el programa de Gene-Tox fueron *Arabidopsis thaliana*, *Allium cepa*, *Vicia faba*, *Hordeum vulgare*, *Zea mays*, *Tradescantia* y *Glycine max* (Ma, 1999). Estos sistemas en plantas se utilizan como parte de la evaluación del riesgo ecológico de productos agrícolas y productos

Ríos Martínez

químicos industriales, residuos sólidos, aditivos alimentarios, metales pesados, entre otros; además en suelos y agua contaminada (Bandyopadhyay y Mukherjee, 2011; Morais y Marin-Morales, 2009). A ciertas concentraciones (por ejemplo el Cd, Hg, Pb a concentraciones de 0.005-0.0005 mol/L) estas sustancias tienen un efecto mutagénico en los organismos, lo que provoca diversos grados de daño en el material genético (Cheng, 2003; Firbas, 2011). Por ejemplo, los metales son conocidos por interferir en el funcionamiento fisiológico y bioquímico de la membrana celular de la planta que resulta en alteraciones en su composición, rigidez, fluidez, flujo de agua y nutrientes, reducción en el crecimiento del tejido y biomasa, perturbación del ciclo celular y división celular, así como una reducción en el contenido de clorofila y perturbación del proceso de fotosíntesis incluyendo el estrés oxidativo (Geremias et al., 2012). Diversos contaminantes pueden estar presentes en frutas y verduras, representando un riesgo para la salud humana, es por ello que, es de suma importancia detectar las zonas en donde estén presentes los contaminantes genotóxicos.

Los bioensayos en plantas como *Vicia faba*, *Allium cepa*, *Nicotiana tabacum*, *Calamagrostis epigejos*, *Impatiens balsamina*, *Arabidopsis thaliana* y la *Hordeum vulgare* (Saghirzadeh et al., 2008; Morais y Marin-Morales, 2009), son bioindicadores eficaces para la detección química, el monitoreo *in situ* e *in vitro* de genotoxicidad de contaminantes ambientales (Bagatini et al., 2009; Morais y Marin-Morales, 2009; Geremias et al., 2012; Türkoğlu, 2012), son rutinariamente utilizados debido a su sensibilidad, mayor porcentaje de dividir células, tamaño uniforme de los cromosomas, de fácil cultivo en el laboratorio (Setha et al., 2008), reducido tiempo de germinación, disponibilidad, requisitos mínimos de instalación (Bandyopadhyay y Mukherjee, 2011), y además, tiene una buena correlación con los sistemas de prueba de mamíferos (Yıldız et al., 2009; Setha et al., 2008; Morais y Marin-Morales, 2009).

Vicia faba

Vicia faba (Figura 8) ha sido utilizada como una planta de prueba, ya que tiene un mayor número de células en división, los cromosomas tienen un buen tamaño para realizar los estudios citológicos y/o genéticos, se distinguen con claridad a un aumento de 40X en su análisis al microscopio, es muy sensible, fácil de conservar y manejar (Zhong *et al.*, 2001; Prieto *et al.*, 2006; Song *et al.*, 2009; Dhyevre *et al.*, 2014). En el Cuadro 3 se presentan algunos estudios realizados en *Vicia faba*, en donde se pueden observar la diferencia de contaminantes estudiados y las diversas técnicas utilizadas para comprobar daños genotóxicos y/o citotóxicos.



Figura 8. Semillas y plántula de haba (*Vicia faba*).Figura propia.

Cuadro 3. Estudios realizados en *Vicia faba*

Estresor	Biomarcador	Tipo de célula	Resultados	Referencia
Cd	EA, MN, EC	Raíz, hoja	Efectos citotóxicos y genotóxicos	Arya y Mukherjee, 2014
Suelos agrícolas	EC	Raíz	Efectos genotóxicos	Juarez-Santacruz <i>et al.</i> , 2015
Cr VI	EA, EC	Raíz	Efectos citotóxicos y genotóxicos	Kaur <i>et al.</i> , 2014
Cd	EA, EC	Raíz, hoja	Efectos citotóxicos y genotóxicos	Lin <i>et al.</i> , 2007
Líquido iónico	EA, EC	Hoja	Efectos citotóxicos y genotóxicos	Liu <i>et al.</i> , 2016
Pb	MN, EC	Raíz	Efectos genotóxicos	Pourrut <i>et al.</i> , 2011b
MMS, EMS, MMC, CH, CdCl₂, K₂CrO₂	EC	Raíz	Efectos genotóxicos	Koopen y Verschaeve, 1996

EA: Enzimas antioxidantes, MN: Micronúcleos, EC: Ensayo cometa, MMS: metil metanosulfonato, EMS: etil metasulfonato, MMC: mitomicina C, CH: cicloheximida, CdCl₂: Cloruro de cadmio, K₂CrO₂: dicromato de potasio

Biomarcadores de genotoxicidad

Ma (1999) describe a las plantas superiores como organismos sensibles para la detección de los efectos mutagénicos y genotóxicos de contaminantes en el ambiente. A pesar de ser ecológicamente pertinentes para la evaluación de la toxicidad del suelo, las plantas no son los organismos más utilizados en las pruebas de genotoxicidad, debido a que no se le da la importancia que deberían de tener.

La genotoxicidad, se define como la toxicidad para el genoma, es decir, todo cambio que signifique una alteración de la estructura habitual de la doble hélice. Dichos cambios se pueden dividir en dos clases: 1) los cambios de una sola base,

que no alteran la estructura global del ADN, sino sólo su secuencia dando como consecuencia la aparición de cambios en la secuencia del ADN de futuras generaciones; y 2) las distorsiones estructurales que pueden constituir un impedimento físico para la replicación o la transcripción. Las incisiones en una cadena o la pérdida de una base pueden hacer que una cadena no sea un molde adecuado para la síntesis de ADN o ARN (Lewin, 1996; INE, 2012).

Para la evaluación de la genotoxicidad en plantas se han desarrollado diferentes marcadores biológicos o biomarcadores, como la prueba de micronúcleos, índice mitótico y el ensayo cometa, los cuales se han aplicado a diferentes sistemas de plantas, entre ellos *Vicia faba*.

Los biomarcadores pueden ser definidos como cambios medibles a nivel bioquímico, fisiológico o morfológico que se asocian con la exposición a un tóxico. En general, se consideran como biomarcadores a los fluidos corpóreos, las células, los tejidos que indican en términos bioquímicos o celulares la presencia de un contaminante, que presentan respuestas o alteraciones bioquímicas rápidas y sensibles. Así como las respuestas fisiológicas y de comportamiento de los organismos expuestos (Díaz *et al.*, 2004; Vázquez *et al.*, 2005).

Los biomarcadores se utilizan fundamentalmente para: a) detectar una exposición; b) determinar las consecuencias biológicas de la exposición; c) detectar los estados iniciales e intermedios de un proceso patológico; d) identificar a los individuos sensibles de una población y e) fundamentar la decisión de intervenir, tanto a nivel individual como ambiental (Díaz *et al.*, 2004).

Se utilizan biomarcadores en estudios tanto *in vitro* como *in vivo* que pueden incluir a seres humanos. Se clasifican por lo general en tres tipos: de exposición, de efecto y de susceptibilidad (Grandjean *et al.*, 1994).

Ríos Martínez

- Los biomarcadores de exposición, corresponden a cualquier alteración biológica medible que evidencie la exposición de los organismos a un contaminante. Indican que el tóxico ha entrado al organismo, proporcionan información cuantitativa sobre la exposición y corroboran el ingreso de tóxicos al organismo. Igualmente pueden ser concentración de los xenobióticos y sus metabolitos en los medios biológicos (Díaz et al., 2004; Repetto, 1997).
- Los biomarcadores de susceptibilidad, definen la capacidad del organismo, inherente o adquirida, para adaptarse a las consecuencias derivadas de la exposición a xenobióticos o grupos de compuestos tóxicos (Olea et al., 2002). Los marcadores de susceptibilidad se utilizan para identificar a los individuos más susceptibles a daños en una población (Repetto, 1997; Díaz et al., 2004).
- Los biomarcadores de efecto, se definen en términos de la alteración hormonal, bioquímica o fisiológica cuantificable, con respecto a los niveles naturales, y que, según su magnitud, produzcan un efecto adverso o un signo de enfermedad (Argemi et al., 2005); es decir, los biomarcadores de efecto serán aquellos que evidencian un efecto tóxico asociado con la exposición del organismo a un contaminante e indican que el tóxico ya ha producido daños en el organismo (Repetto, 1997; Díaz et al., 2004). Un ejemplo es la peroxidación de lípidos o el daño al ADN, este último se puede cuantificar por medio de la técnica llamada ensayo cometa.

Ensayo cometa

El ensayo cometa o también conocido como electroforesis de geles de células individualizadas, es un biomarcador rápido, simple, visual y sensible (Kumaravel et al., 2007), que consiste en cuantificar el daño inducido en el ADN de células que son embebidas en agarosa, lisadas y posteriormente sometidas a una electroforesis en pH alcalino, para así lograr que los fragmentos de cromosomas se dirijan hacia el

ánodo y se revelen como la cola de un cometa que pueden ser sitiosapurínicos, roturas de cadena simple (SSB, por sus siglas en inglés) y roturas de doble cadena (DSB, por sus siglas en inglés), que se visualiza luego de teñir con un colorante fluorescente (Tice *et al.*, 2000, Abele *et al.*, 2011).

La detección de la migración del ADN dañado depende de varios parámetros, tales como: la concentración de la matriz de agarosa, el pH, la temperatura y duración del desenrollamiento, voltaje, amperaje y duración de la electroforesis (Tice *et al.*, 2000). El ensayo ha sido modificado en las etapas clave (lisis, electroforesis, voltajes, amperajes, etc.) para su adecuación para la evaluación de diversos tipos de daños en diferentes células (Dhawan *et al.*, 2009). Variando el pH durante la electroforesis y la lisis, se puede detectar los diferentes tipos de rupturas de las cadenas. Cuando las células se lisan y se someten a electroforesis en condiciones neutras sólo rupturas de cadena doble se detectan. Bajo condiciones de pH 12.3 rupturas de cadena doble y sencilla se detectan mientras que bajo condiciones de pH>13 las SSB, DSB y lesiones álcali lábiles son detectadas (Lee y Steinert, 2003).

El ensayo cometa ha revolucionado el área de la toxicología ambiental mediante la evaluación del daño, de su reparación y de la muerte celular, en diferentes especies (Figura 9), sin necesidad de conocer previamente el cariotipo de las mismas. Se pueden evaluar plantas y/o animales que han crecido de forma natural en ambientes contaminados o en laboratorio y que han sido expuestos a agentes potencialmente genotóxicos durante distintos periodos de tiempo. El ensayo cometa ha sido utilizado en bacterias hasta el ser humano, para realizar estudios que van desde la toxicología ambiental hasta la epidemiología molecular, siendo en el biomonitoreo de poblaciones humanas donde el ensayo cometa ha sido mayormente aplicado en los últimos años (Zúñiga, 2009).

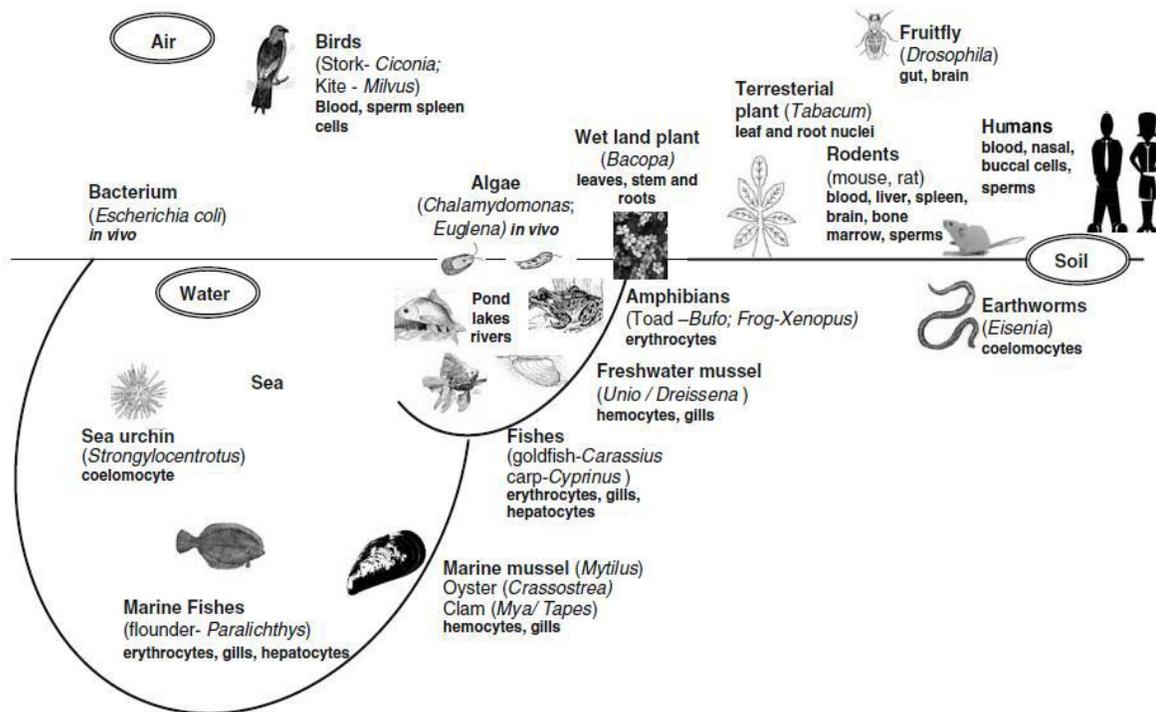


Figura 9. Aplicación del ensayo cometa para la evaluación del daño en el ADN en distintos modelos de especies. Fuente: Dhawan *et al.*, 2009

Aplicaciones del ensayo cometa

El ensayo cometa ha ganado amplia aceptación como una herramienta esencial para la evaluación de genotoxicidad y estudios de biomonitorio, debido a la sensibilidad para detectar bajos niveles de daño en el ADN, su aplicación fácil y rápida, la flexibilidad y bajo costo en su aplicación (González *et al.*, 2010). Entre las aplicaciones que tiene el ensayo al realizar evaluaciones de daño al ADN, están:

- Estudios en población humana: biomonitorio, estudios nutricionales, diagnósticos (cáncer, diabetes), mujeres expuestas al humo de la leña (Collins y Horváthová, 2001; Sardas *et al.*, 2001; Pitozzi *et al.*, 2003; Collins, 2004; Herrera *et al.*, 2009)
- Radiobiología (Olive, 1999)

- Monitoreo acuático (Lee y Steinert, 2003; Sotil et al., 2007; Simoniello et al., 2009)
- Hibridación fluorescente *in situ* en cometas para la identificación de secuencias de ADN dañado y reparado en las células individuales (McKelvey et al., 1998)
- Prueba de genotoxicidad de contaminantes (Collins, 2004; Moller, 2005)
- Eco-genotoxicología (Jha, 2008)
- Riesgo y beneficios en el consumo de plantas medicinales (Carballo et al., 2005)
- Evaluación del potencial de fitorremediación de algunas plantas (Rodríguez et al., 2015).
- Evaluación de la genotoxicidad de algunos metales como Cd, Pb y Cr hexavalente en raíz y hoja de plantas (Arya y Mukherjee, 2014, Kaur et al., 2014, Lin et al., 2007, Pourrut et al., 2011b).

MATERIALES Y MÉTODOS.

Identificación de los sitios de muestreo.

Los sitios estudiados se encuentran en el estado de San Luis Potosí, México, en la región Altiplano Potosino. En la cual se encuentran ocho de 14 distritos mineros (Sánchez-Crispín *et al.* 1994).

Los sitios estudiados (Figura 10) fueron: 1) el *Cerro de San Pedro* localizado a 22°12'58" de latitud Norte y 100°47'59" de longitud Oeste. Este sitio ha sido explotado desde finales del siglo XVI y todavía sigue siendo explotado, dejando expuestos los desechos generados (Martínez *et al.*, 2010; SNIM, 2010). 2) *Charcas* con coordenadas 23°07'47" de latitud Norte, 101°06'48" de longitud Oeste. En este distrito se explotan minerales como Au, Ag, Zn y Cu. El descubrimiento del mineral de Charcas fue hecho en 1563 y a la mina principal se le impuso el nombre de San Cristóbal (INAFED, 2010; SNIM, 2010). 3) *Cedral* se encuentra localizado a 23°49'10" de latitud Norte y 100°43'35" de longitud Oeste. En la comunidad se ubicaron haciendas de beneficio que procesaban el mineral que procedía de las minas de Real de Catorce, utilizando el método de patio (amalgamación con mercurio). Como desechos de este método, se generaron los jales de Jesús María y el Caballo, localizados dentro de la zona urbana de Cedral desde hace aproximadamente 300 años (Flores-Ramírez *et al.*, 2012; SNIM, 2010). 4) *Villa de la Paz* con coordenadas de 23°40'31" de latitud Norte y 100°42'47" de longitud Oeste. Este distrito ha estado funcionando por más de 200 años, teniendo actualmente actividad de extracción y beneficio de minerales a partir de los yacimientos localizados en la llamada Sierra del Fraile, siendo uno de los principales distritos mineros activos del estado de San Luis Potosí (Fernández *et al.*, 1986; Razo *et al.*, 2004; SNIM, 2010).

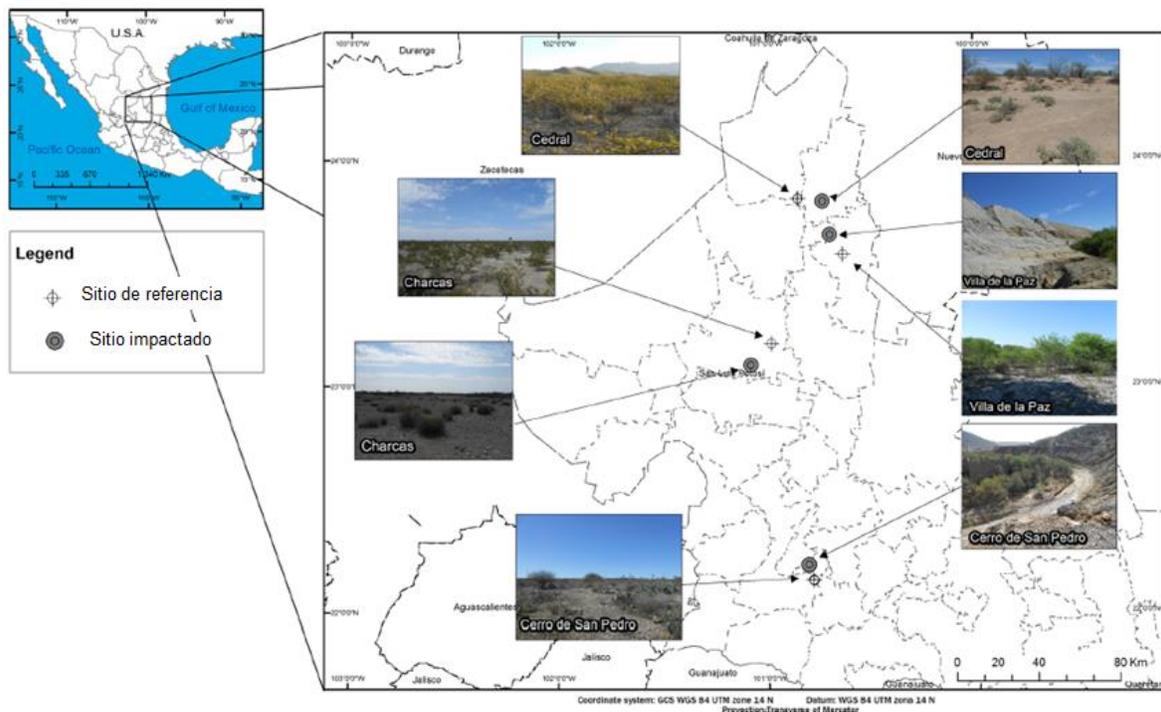


Figura 10. Localización de los sitios de muestreo. Fuente: Martínez-Toledo, 2016.

Dentro de los sitios de estudio se seleccionaron sitios de referencia que se ubicaron de 10 a 15 km del sitio impactado. Para ubicar los sitios de referencia se tomaron en cuenta los siguientes criterios: que tuvieran características similares al sitio que se va a evaluar, excepto la presencia de contaminantes, se consideró el gradiente de contaminación en relación a la fuente de emisión del contaminante y por último que se encontrará lo más cercano al sitio de estudio.

Recolección de muestras de suelo.

La recolección de muestras de suelo se llevó a cabo de acuerdo a la norma mexicana NMX-AA-132-SCFI-2006 en los meses de febrero y marzo del año 2014. Para ello primero se realizó un reconocimiento del área de muestreo y después se procedió a obtener las muestras. En cada sitio, se realizó un trayecto de 200 m en el que cada 20 m se tomó una muestra compuesta, para ello en cada punto se limpió la superficie del suelo (descartando la cobertura vegetal) y se marcó un cuadrado de 1

Ríos Martínez

m², y se tomaron cinco submuestras (una en cada vértice del cuadrado y una central) de 10 cm³ para formar una muestra compuesta superficial. Una vez tomada la muestra se prosiguió a cribar con ayuda de un tamiz de 2 mm y posteriormente se colocaron en bolsas plásticas debidamente etiquetadas y se almacenaron en hieleras para su traslado al laboratorio (Figura 11) y posterior análisis. El total de muestras compuestas fue de 10 en cada sitio contaminado y 10 en los sitios de referencia.



Figura 11. Recolección de muestras de suelo.

Cuantificación de metales y metaloides (As, B) en muestras de suelo

Para la cuantificación de cada EPT (Cr, Mn, Ni, Cu, Zn, Cd, Hg, Pb, Fe, Co, Mo, B, As) se utilizó un espectrómetro de masas con plasma acoplado inductivamente cuadrupolo (ICP-MS) marca Thermo Fisher, Modelo X Series 2.

Análisis de parámetros fisicoquímicos en muestras de suelo

La materia orgánica en suelo fue obtenida usando el método de digestión húmeda de acuerdo a Metson *et al.*, 1979 y Combs y Nathan 2010. El pH y la conductividad eléctrica de suelo fue determinada a través de la medición del método en agua en una relación 1:2 y 1:5 (suelo:agua) con la ayuda de un potenciómetro (Hanna HI 2216), de acuerdo con Jones, 2001. Para cuantificar el contenido de arcilla en suelo se procedió con el método AS-09, de acuerdo a la norma oficial mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000.

Estandarización del ensayo cometa en células de raíz de haba (*Vicia faba*)

Para realizar la estandarización de la técnica ensayo cometa, primeramente se probaron diferentes cortes en la raíz de haba, los cuales fueron en rodaja, cuadritos y macerado, esto se realizó para poder observar un mayor número de células intactas. Una vez estandarizados los cortes se probaron diferentes tiempos de desenrollamiento y electroforesis a diferentes voltios y amperajes (12, 15, 20, 25 V y 200, 250, 300 mA) (Lin *et al.*, 2005; Valencia-Quintana *et al.*, 2012; Arya *et al.*, 2013; Kaur *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2015; Juárez-Santacruz *et al.*, 2015; Pourrut *et al.*, 2015). Además, se probaron diferentes concentraciones de agarosa regular (0.5%, 0.8 % y 1%) y agarosa bajo punto de fusión (0.5%, 0.8 % y 1%) para *Vicia faba* de acuerdo a Liu y colaboradores (2016) (Figura 12). Una vez estandarizada la técnica ensayo cometa, se llevó a cabo controles de calidad utilizando como agente genotóxico el arsenito de sodio (AsNaO_2) a diferentes concentraciones (0, 1, 10, 100 mg/L de AsNaO_2). Estos tratamientos se realizaron con la finalidad de generar daño al ADN en las células meristemáticas de raíces de *V. faba* y así evaluar la sensibilidad y factibilidad del ensayo cometa.



Figura 12. Estandarización de la técnica ensayo cometa para células de raíz de *Vicia faba*.

Evaluación de genotoxicidad de suelos y residuos mineros en raíces de *Vicia faba*.

Una vez realizada la estandarización del ensayo cometa en las células de raíz de haba, se procedió a evaluar la genotoxicidad de las muestras de los sitios.

Germinación de semillas de haba

Se seleccionaron 300 semillas de haba (*Vicia faba*), las cuales se sometieron a un proceso de lavado con abundante agua, posteriormente se colocaron en un vaso de precipitado de 2000 mL con agua desionizada durante 24 horas para su imbibición, transcurrido el tiempo se volvieron a lavar con agua desionizada. En una charola de plástico se colocó una capa de algodón y se humedeció con ayuda de un atomizador con agua desionizada, posteriormente se ordenaron las semillas de haba sobre el algodón húmedo, al término se colocó otra capa de algodón húmedo y se colocó la charola en una cámara para crecimiento de plantas (Allen-Bradley, Pico 1760-L12AWA) a 23 ± 2 °C en oscuridad durante 4 días, tiempo en el cual se llevó a cabo la germinación (Figura 13).



Figura 13. Proceso de lavado y germinación de semillas de haba (*Vicia faba*).

Preparación de elutriados

Para cada muestra recolectada se realizó la preparación de extractos acuosos de la siguiente manera: Se colocaron 25 g del suelo contaminado o de referencia en tubos de polipropileno de 50 ml, el cual se asentó al fondo del recipiente (golpeando ligeramente la base del tubo sobre una superficie plana). Después se vertieron 25 ml de agua desionizada en cada uno de los tubos con suelo para tener una relación 1:1 (una parte de suelo por una de agua) y se agitaron vigorosamente con el fin de mezclar homogéneamente el suelo con el agua. Posteriormente, se colocaron los tubos en una parrilla de agitación a 250 rpm por 60 minutos. Al término, se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 min, para separar el suelo del elutriado. Después de este tiempo, se vertió el elutriado en cajas Petri previamente etiquetadas para proseguir con la exposición de las raíces de haba (Figura 14).



Figura 14. Preparación de muestras de suelo para elutriados. A) Pesado de muestras de suelo de referencia y contaminado con metales pesados; B) Medición de agua desionizada (25 ml); C) Vaciado del agua desionizada al tubo con muestras de suelo; D) Agitación de las muestras (1h-250 rpm); E) Centrifugación de las muestras a 3000 rpm por 10 min; F) Obtención del elutriado

Exposición de raíces de haba a elutriados.

La exposición a raíces de *Vicia faba* se realizó en las cajas Petri con los elutriados, en ellas se colocaron 10 semillas germinadas de haba, cuidando que los meristemas de la raíz queden en contacto con el elutriado de la muestra. Las cajas Petri con los elutriados y semillas se colocaron en una cámara para crecimiento de plantas durante 48 horas a 23 ± 2 °C en oscuridad. Al mismo tiempo se colocaron un testigo negativo (agua desionizada y 10 semillas germinadas) en las mismas condiciones que el suelo problema (Figura 15).

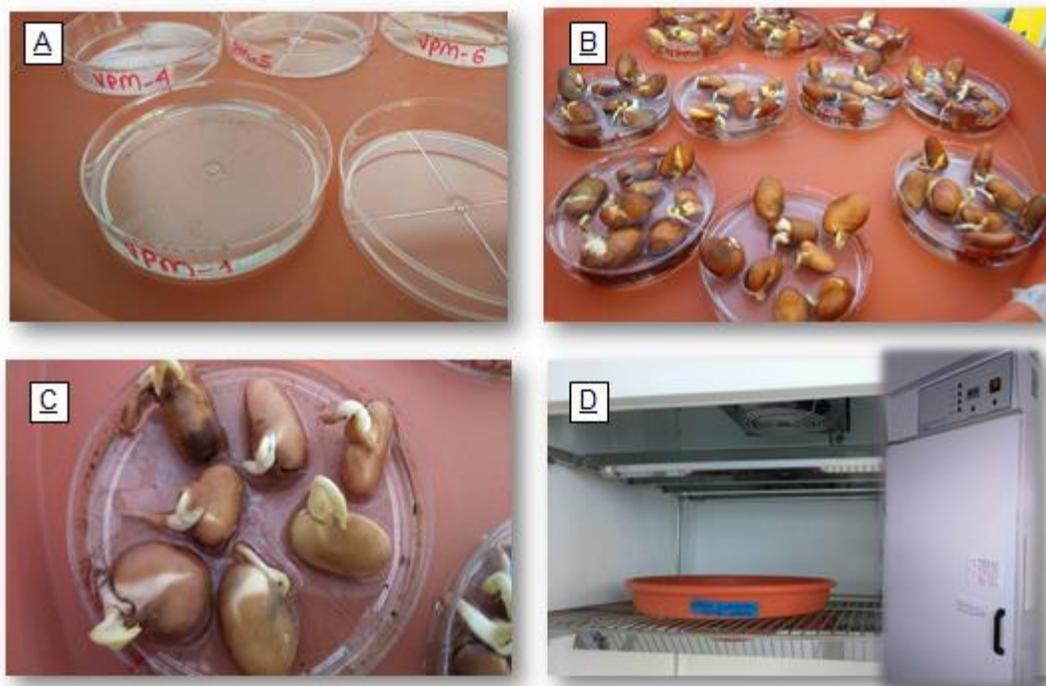


Figura 15. Exposición de raíces de haba a Elutriados. A) Obtención de elutriados; B) Exposición por contacto directo de raíces de *V. faba* a elutriados. C) Raíces expuestas a agua desionizada (testigo negativo); D) Exposición de semillas de haba (*V. faba*) a elutriados (48h, 23 °C, en oscuridad).

Ensayo cometa en raíces de *Vicia faba*

Una vez que transcurrió el tiempo de exposición, las raíces de *Vicia faba* se limpiaron con agua desionizada y se procedió al aislamiento de núcleos. Para ello, en una bandeja con hielo se colocó una caja Petri de 60 mm a la cual se le agregó 400 μ L de solución buffer PBS, pH 7.4 (Anexo I) y se prosiguió a cortar cuidadosamente las raíces de las habas expuestas dentro de la solución buffer. Una vez realizados los cortes, se transfiere la solución nuclear, es decir, la solución en donde se realizaron los cortes de las raíces, a tubos Eppendorf debidamente etiquetados que se mantuvieron en hielo. Posteriormente en un tubo nuevo de Eppendorf se agregaron 100 μ L de agarosa de bajo punto de fusión al 1% (Anexo II) y 100 μ L de la suspensión nuclear y se mezclaron en un agitador tipo vórtex por tres segundos; 75 μ L de ésta mezcla se colocó en una cama de electroforesis (Anexo I) y se cubrió con

un cubreobjetos cuidando de no formar burbujas. Las laminillas se colocaron en una charola de aluminio en refrigeración por 10 minutos. Transcurrido el tiempo, se retiró de forma delicada el cubreobjetos de la laminilla y se le agregó 75 μ L de agarosa bajo punto de fusión al 0.5% (Anexo I). Se colocó un nuevo cubreobjeto y se llevaron a refrigeración por 10 minutos más. Se realizaron un total de dos laminillas por tratamiento.

Transcurrido el tiempo de refrigeración, se retiró de forma cuidadosa el cubreobjetos y se acomodaron las laminillas en la cámara de electroforesis (la cual se mantuvo sobre una charola de metal con hielo alrededor para mantener el sistema a 4°C). Las laminillas se colocaron de forma horizontal en la cámara de electroforesis, se agregó la solución amortiguadora de electroforesis pH >13 (Anexo I), recién preparada y previamente enfriada a 4°C, asegurándose de que las laminillas quedaran cubiertas y sin burbujas por debajo. Se dejaron de esta forma durante 10 min con el fin de permitir el desenrollamiento del ADN. Transcurrido el tiempo, se procedió a encender la fuente de poder con los parámetros configurados (25 V, 300 mA y 10 min) previamente. Una vez finalizado el tiempo de la electroforesis se sacaron las laminillas con pinzas, se secaron por debajo y se colocaron en la charola de lavados. Los lavados consistieron en agregar una solución de Tris-HCl 0.4 M (Anexo I), que se dejó reposar por 5 min y se repitió el lavado. Se escurrieron y se les agregó etanol anhidro, dejándolas reposar durante 5 min y se repitió el lavado con etanol. Finalmente, las laminillas se escurrieron y se colocaron en un vaso Coplin con etanol anhidro por otros 5 min. Se secaron por debajo con papel absorbente, se dejaron secar para ser guardadas en una caja porta-laminillas hasta su lectura. Todo el trabajo del ensayo cometa se realizó en completa oscuridad, sólo con la ayuda de una lámpara de luz amarilla, esto con la finalidad de no dañar el ADN con la luz (Figura 16).

Para llevar a cabo la observación al microscopio, se le colocó 25 μ L de la solución de trabajo de bromuro de etidio (Anexo I) a una laminilla y se le colocó un

Ríos Martínez

cubreobjetos. Se toma la laminilla y se coloca en el microscopio. Con el objetivo de 20X se enfoca y se procede a la lectura con la técnica zig-zag, con ayuda del software Komet v 4.0. En cada laminilla se contabilizaron 38 células (76 en total para cada muestra). Los parámetros considerados para la evaluación del daño al ADN fueron Olive Tail Moment (OTM) y Tail Length (TL).

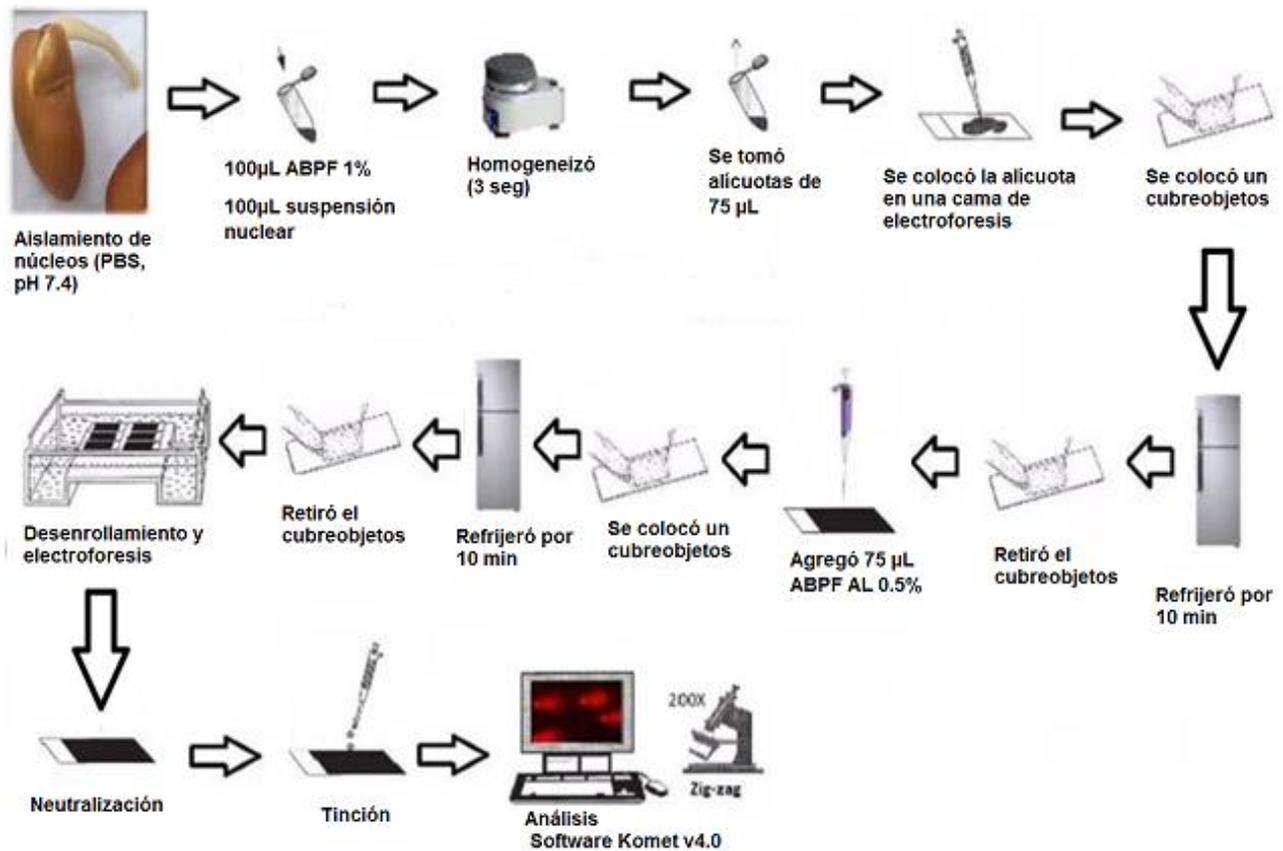


Figura 16. Técnica ensayo cometa en células de raíz de haba.

Análisis estadístico

Se evaluó el control de calidad de la técnica ensayo cometa, tomando en cuenta los parámetros OTM (Olive Tail Moment, por sus siglas en inglés) y TL (Tail Length, por sus siglas en inglés), a través de tratamientos con AsNaO_2 a diferentes concentraciones (0, 1, 10, 100 mg/L) en células de raíz de haba (*Vicia faba*), realizando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, con una p de 0.05.

Se determinaron índices utilizando las concentraciones de metales. Para el índice de contaminación metálica (MPI, por sus siglas en inglés) se utilizó la fórmula propuesta por Usero *et al.*, 1996:

$$MPI = (M1 * M2 * M3 \dots Mn)^{1/n}$$

Dónde:

M_n : es la concentración del metal expresado en mg/Kg

n: es el número total de metales

El valor crítico del IMP es de 100 (Ojekunle *et al.*, 2016).

Y para el índice de riesgo ecológico [*Mean Soil Quality Guideline Quotient Index*, (SQGQI), por sus siglas en inglés] se utilizó la fórmula propuesta por Long y MacDonald (1998):

$$PEL - Q = \frac{\text{contaminante}}{PEL}$$

Dónde:

PEL-Q: es el cociente del nivel de efecto probable

PEL: es el nivel de efecto probable para cada contaminante (concentración a partir del cual los efectos adversos ocurren frecuentemente)

$$SQGQI = \frac{\sum_{i=1}^n PEL - Qi}{n}$$

Para el presente estudio, el PEL fue tomado de la Agencia de Protección Ambiental (Eco-SSL) para el nivel de efecto probable de metales pesados en plantas (NOAA, 2016). Efectos biológicos adversos observados: SQGQI \leq 0.1 bajo potencial

0.1 < SQGQI < 1 potencial de impacto moderado. SQGQI \geq 1 potencial de impacto alto.

Con el resto de los datos obtenidos (Parámetros fisicoquímicos, concentraciones de metales, índice de contaminación, índice de riesgo ecológico, daño al ADN) se utilizaron las pruebas de U de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis. Los datos fueron reportados como mediana y rango intercuartil.

Posteriormente para asociar las relaciones entre el efecto (daño al ADN) y las variables (concentraciones de los elementos y parámetros fisicoquímicos) se realizó un Análisis de Componentes Principales (PCA, por sus siglas en inglés), para encontrar los componentes que explican la variación dentro de los datos. Se realizó un coeficiente de correlación de Pearson con los nuevos componentes para observar la relación que hay entre estos y el efecto causado.

Los análisis anteriores se realizaron con los programas *Statistica* versión 10, Primer 6+&Permanova y GraphPad Prism 6. Las significancias estadísticas fueron determinadas usando el 95% de confianza.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los metales pesados se encuentran en forma natural en la corteza terrestre. Estos se pueden convertir en contaminantes si su distribución en el ambiente se altera mediante actividades humanas (INECC, 2009). Los efectos en la biota dependerán del metal, su biodisponibilidad y el tiempo de exposición (Mejía *et al.*, 1999; Freitas *et al.*, 2004).

Las plantas tienen un rol importante en los ecosistemas terrestres debido a que son la base de la productividad. El daño por los contaminantes puede afectar directamente su estructura y su función en los ecosistemas (Cuevas *et al.*, 2012).

En el presente trabajo se analizaron las propiedades fisicoquímicas, las concentraciones de metales, los índices de riesgo y contaminación de suelos y residuos mineros y el daño al ADN en células de raíz de haba expuestas a éstos.

Análisis de Propiedades fisicoquímicas de suelos y residuos mineros

El suelo es un sistema dinámico que interactúa con el aire, plantas, aguas superficiales y subterráneas; y se caracteriza por las propiedades físicas, químicas y/o biológicas que contiene (Volke *et al.*, 2005). Las propiedades fisicoquímicas pueden darnos un indicio de los procesos que ocurren en los suelos, como por ejemplo la biodisponibilidad y/o movilidad de contaminantes (Reyes y Barreto, 2010).

En el Cuadro 4 se observan los datos obtenidos de MO, pH, fracción arcilla y conductividad eléctrica, mostrando diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los sitios impactados y de referencia.

Cuadro 4. Parámetros fisicoquímicos de suelos y residuos mineros del estado de San Luis Potosí, México.

Parámetro Fisicoquímico	Cerro de San Pedro		Charcas		Cedral		Villa de la Paz	
	Referencia <i>n</i> =10	Impactado <i>n</i> =10	Referencia <i>n</i> =10	Impactado <i>n</i> =10	Referencia <i>n</i> =10	Impactado <i>n</i> =10	Referencia <i>n</i> =10	Impactado <i>n</i> =10
Materia orgánica (%)	3.6* (2.4-4.2)	1.6 ^{ab} (1.5-2)	4.7* (4.5-4.8)	2.7 ^b (2.3-2.8)	3.8* (3.3-4)	0.5 ^a (0.4-0.7)	3.9* (3.3-5.2)	1.8 ^a (1.3-2)
pH	8.3* (8.2-8.3)	4.1 ^a (2.7-5.7)	8.5* (8.2-8.6)	7.4 ^{ab} (7.4-7.8)	8.6* (8.5-8.7)	8 ^b (7.9-8)	8.4* (8.3-8.4)	7.7 ^b (7.5-8)
Arcilla (%)	16.2* (14-20.3)	8 ^{ac} (7.4-12.8)	23.8* (22-25.6)	8.5 ^a (8-12)	19.2* (9.5-20)	6 ^{bc} (3.3-8)	26* (23.1-28.3)	5.8 ^b (5.6-6.7)
Conductibilidad Eléctrica (dS/m)	0.1* (0.08-0.1)	1.3 ^a (1.1-1.7)	0.06* (0.06-0.07)	0.8 ^{ab} (0.8-0.9)	0.1* (0.06-0.07)	0.7 ^b (0.6-0.8)	0.05* (0.05-0.06)	0.7 ^b (0.6-0.7)

* Diferencias significativas $p < 0.05$ comparado con su contaminado (prueba estadística de U de Mann-Whitney). Diferentes letras indica las diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los sitios contaminados, utilizando la prueba de Kruskal-Wallis. Los datos reportados son la mediana y rango intercuartil.

Ríos Martínez

La MO del suelo es un factor importante respecto a la acumulación y liberación de metales pesados debido a que tiene una alta capacidad de acumulación de éstos (Reyes y Barreto, 2010). La cantidad de MO en las muestras estudiadas de los diferentes distritos mineros y Cedral, muestran diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el sitio de referencia y la zona impactada, de tal manera que los sitios de referencia cuentan con mayor cantidad de MO con respecto al sitio impactado. El orden decreciente de MO encontrada en los sitios de referencia fue Charcas > Villa de la Paz > Cedral > Cerro de San Pedro y, en los sitios impactados fue Charcas > Villa de la Paz > Cerro de San Pedro > Cedral. En los sitios impactados, Charcas es el sitio con mayor concentración de MO con 2.7%, que de acuerdo con NOM-021-SEMARNAT-2000, se encuentra en un rango medio de concentración de MO, lo cual podría bajar la biodisponibilidad de metales pesados y; por otro lado, Cedral presenta muy bajas concentraciones de MO (0.4-0.7%), lo cual podría ayudar a la absorción de metales pesados por las plantas, debido a las bajas cantidades de MO en suelo, ya que la MO ayuda a la retención de metales pesados, debido a la formación de complejos órgano-metálicos (Elliott *et al.*, 1986). En un estudio realizado por Huerta (2010), se reportó concentraciones de 0.2% de MO en suelos contaminados con metales pesados, el cual es más bajo que el encontrado en el presente estudio, en Cedral con 0.5% de MO.

El pH es uno de los parámetros más importantes que controla las formas de los elementos en el suelo (López y López, 1990). Influye de manera muy importante en la absorción de los metales por las plantas. A pH ácidos la biodisponibilidad de metales aumenta y a pH básicos disminuye (Ruda *et al.*, 2004). Los suelos alcalinos son característicos de las regiones áridas y semiáridas; la alcalinidad se presenta cuando existe un alto grado de saturación de bases. La presencia de sales especialmente de calcio, magnesio y sodio en formas de carbonatos da también preponderancia a los iones oxidrilos (OH^-) sobre los iones hidrógeno (H^+) en la solución del suelo (Huerta, 2010). El pH medido en las muestras recolectadas en los sitios estudiados se presenta en el Cuadro 4, en donde se puede observar que

Ríos Martínez

existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los sitios impactados y los de referencia de cada zona minera. Asimismo se observa en los sitios impactados un pH medianamente alcalino que va de pH 7.4 a 8, a excepción del Cerro de San Pedro en donde se encontró un pH fuertemente ácido (4.1), esto puede ser debido al drenaje ácido de mina. En un estudio realizado por Rodríguez en el 2011, se determinó que existe una acidificación del suelo en el Cerro de San Pedro encontrando valores de 4.5 a 8.1. De acuerdo con Rieuwerts y colaboradores (1998), el pH ácido influye en la absorción de metales pesados por las plantas, debido a que la solubilidad de metales tiende a incrementar a valores bajos de pH y decrece a pH altos. Cerca de un pH neutro, la formación de complejos puede llegar a ser un mecanismo de inmovilización de metales, es decir, que existe una baja biodisponibilidad de éstos (Elliott *et al.*, 1986). De acuerdo con lo descrito anteriormente, se puede suponer que el sitio impactado en Cerro de San Pedro, existe una alta biodisponibilidad de metales a las plantas, esto debido al bajo pH reportado (2.7-5.7). En los sitios de referencia, los pH son medianamente alcalinos a fuertemente alcalinos (pH de 8.3-8.6), en los cuales se puede llegar a formar complejos, que son difícilmente absorbidos por las plantas. En estos sitios se observa un gradiente ascendiente en donde Cedral > Charcas > Villa de la Paz > Cerro de San Pedro.

La textura del suelo interviene en la dinámica de los metales, ya que la formación de macro poros puede causar una rápida infiltración y redistribución del agua y de los solutos del suelo, modificando por consecuencia la disponibilidad de los metales. Saeki y colaboradores (1993) mencionan que existe un incremento general en la concentración de metales pesados de las fracciones gruesas a las finas. En el Cuadro 4 se puede observar que las mayores cantidades de arcilla las encontramos en los sitios de referencia (16.2-26), siendo estadísticamente diferentes ($p < 0.05$) a los sitios impactados (5.8-8.5). El orden decreciente de arcilla encontrada en los sitios de referencia fue Villa de la Paz > Charcas > Cedral > Cerro de San Pedro. Y en el sitio impactado fue Charcas > Cerro de San Pedro > Cedral > Villa de la Paz. Las arcillas se caracterizan por tener cargas eléctricas principalmente

negativas en su superficie, lo cual le confiere a los suelos la capacidad de retener metales pesados, disminuyendo su solubilidad y biodisponibilidad (Rieuwertz *et al.*, 1998; Reyes, 2010); de acuerdo a esto, en los sitios impactados Villa de la Paz (3.3-8%) y Cedral (5.6-6.7%), el porcentaje de arcilla es bajo, por lo cual se podría suponer que en estos sitios, la absorción de metales por las plantas sería más alta que en los sitios de referencia.

La medida de la conductividad eléctrica (CE) nos permite estimar la cantidad de sales que contiene un suelo, debido a que la CE mide la capacidad de un material para conducir corriente eléctrica, es decir a mayor CE, mayor concentración de sales. Todos los suelos fértiles contienen por lo menos pequeñas cantidades (<1.0 dS/m) de sales solubles. Cuando un suelo tiene un exceso de sales solubles se le denomina suelo salino (4.1-8.0 dS/m) (NOM-021-SEMARNAT-2000). La CE en los sitios de referencia es baja, y va desde 0.05 a 0.1 dS/m, mostrando el siguiente orden: Cerro de San Pedro = Cedral $>$ Charcas $>$ Villa de la Paz. Los sitios impactados mostraron una CE 13 veces mayor con respecto a los sitios de referencia, mostrando diferencias estadísticas ($p<0.05$). Los valores de CE encontrados en los sitios impactados van de 0.7 a 1.3 dS/m, indicando una alta conductividad, lo cual podría ayudar a la movilidad y biodisponibilidad de metales en el suelo a través de dos medios posibles: iones cargados positivamente asociados a las sales (Na y K) que pueden sustituir a metales pesados en los sitios de absorción y, los iones cargados negativamente (por ejemplo de cloruros) que pueden formar compuestos solubles estables con pesado metales (Cd, Zn y Hg), con una tendencia a generar suelos ácidos (Sherene, 2010), como por ejemplo en el Cerro de San Pedro, que tiene un pH ácido (2.7-5.7) y una mayor conductibilidad eléctrica (1.1-1.7 dS/m).

Análisis de metales, As y B en suelo y residuos mineros

Se ha demostrado la presencia de metales pesados en los sitios de estudio. En Villa de la Paz, Razo y colaboradores (2004) demostraron que existe contaminación por As, Cu, Pb y Zn en agua, suelo y sedimento. Rodríguez en el 2011, confirmó la presencia de Pb, As, Cd, Zn y Mn en el distrito Minero Cerro de San Pedro. En Cedral se cuantificó el plomo en polvo y en niños de la comunidad (Flores-Ramírez, *et al.*, 2012).

Comparación de metales y metaloides en suelos y residuos por región minera

Las concentraciones de metales y metaloides encontradas en los sitios de referencia e impactado de cada región minera estudiada se presentan a continuación.

Cerro de San Pedro

En el Cuadro 5 se presentan las concentraciones de metales y metaloides encontrados en el distrito minero Cerro de San Pedro. Se encontraron mayores concentraciones de Pb (2,506.4 - 4,822.1 mg/Kg), Zn (179.7 - 955.6 mg/Kg), As (195.5 – 325 mg/Kg) en los sitios impactados con respecto a los sitios de referencia ($p < 0.05$), en el caso del Fe las concentraciones reportadas en el sitio de referencia (7,960.5 - 10,122.3 mg/Kg) son similares a las del sitio impactado (5,574 - 12,567.8 mg/Kg) ($p > 0.05$). El orden decreciente de concentración por metal encontrada en el sitio impactado fue Fe > Pb > Zn > As > Ni > Mn > Cu > Hg > Cd > Cr > Mo > B > Co mientras que en el sitio de referencia fue Fe > Mn > Ni > Zn > Pb > Cu > Cr > B > As > Co > Mo > Cd > Hg.

Cuadro 5. Concentraciones de metales y metaloides en Cerro de San Pedro.

Parámetro mg/Kg	Cerro de San Pedro	
	Referencia <i>n</i> =10	Impactado <i>n</i> =10
Cr	5.9* (5.5-6.4)	1.7 (1.2-2.2)
Mn	191.8* (167.7-256.8)	44.7 (22.5-117.8)
Ni	77.4* (71.5-88.5)	144.8 (115.9-210.2)
Cu	6.1* (5.4-6.5)	18 (13.1-19.7)
Zn	24.1* (23.2-27.2)	433.2 (179.7-955.6)
Cd	0.2* (0.1-0.2)	2.7 (1.5-7.8)
Hg	0.1* (0.1-0.1)	6.4 (3.7-8.7)
Pb	14.1* (12.5-15.4)	3,592.20 (2,506.4-4,822.1)
Fe	8403.7 (7,960.5-10,122.3)	11,451.10 (5,574-12,567.8)
Co	2.1* (1.9-2.4)	0.2 (ND-0.5)
Mo	0.2* (0.2-0.3)	1 (0.7-1.3)
B	5.8* (5-6.1)	0.2 (ND-1)
As	2.9* (2.4-3.2)	231.6 (195.5-325)

* Diferencias significativas $p < 0.05$, utilizando la prueba estadística U de Mann-Whitney. Los datos reportados son la mediana y rango intercuartil.

Las concentraciones de algunos metales fueron comparados con las Concentraciones de Referencia Total (CR_T) que establece la regulación nacional NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004 de uso residencial o agrícola para Ni (1,600 mg/Kg), Cd (37 mg/Kg), Hg (23 mg/Kg), Pb (400 mg/Kg) y As (22 mg/Kg). En este

Ríos Martínez

sitio de estudio, el 50% de las muestras superaron las CR_T de Pb y As, las cuales se ubicaron en el sitio impactado, y no así las concentraciones de Ni, Cd y Hg. Debido que la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004 no establece criterios para todos los elementos potencialmente tóxicos, se utilizaron como concentraciones de referencia de Cr total (64 mg/Kg), Cu (63 mg/Kg) y Zn (200 mg/Kg) los niveles de la Guías de Calidad Ambiental Canadiense (*Canadian Environmental Quality Guidelines*, 2007). En donde el 35% de las muestras superan el valor de referencia para Zn. No se registraron concentraciones que superen los valores de referencia para Cu y Cr.

En comparación con un estudio realizado por Rodríguez (2011) en el distrito minero Cerro de San Pedro, las concentraciones que reportó de Mn (350 mg/Kg), Cu (19 mg/Kg) y Cd (6 mg/Kg) fueron mayores que las reportadas en el presente estudio. Mientras que las concentraciones de Zn (91 mg/Kg), Pb (136 mg/Kg) y As (46 mg/Kg) fueron menores que las reportadas por este estudio, las cuales fueron de 433.2 mg/Kg de Zn, 3,592.2 mg/Kg de Pb y 231.6 mg/Kg de As. Para el caso de Pb, superan 26 veces la concentración reportada por Rodríguez (2011); mientras que el As y Zn, superan cinco veces estas concentraciones.

Charcas

En el distrito minero de Charcas se encontraron mayores concentraciones de todos los metales y metaloides en el sitio impactado ($p < 0.05$) (ver Cuadro 6), con excepción del Cr, el cual se encontró más alto en el sitio de referencia que con la zona impactada ($p < 0.05$), sin embargo estas concentraciones de Cr no se encuentra por encima del CR_T de la Guía Canadiense (64 mg/Kg).

Las concentraciones de Pb encontradas en el sitio impactado fueron 2,355 veces mayores que las encontradas en el sitio de referencia; el Cd fue 1,183 veces más en el sitio impactado que el de referencia y el Zn se encontró 1,115 veces más en la zona impactada que en la zona de referencia del distrito minero Charcas; la concentración de Cu fue de 379 veces y el As casi 50 veces más por arriba del sitio

de referencia. El orden decreciente de concentración de metales encontrada en el sitio impactado fue Zn > Pb > Fe > Cu > Mn > Cd > As > Ni > B > Hg > Co > Cr > Mo mientras que en el sitio de referencia fue Fe > Mn > Ni > Zn > B > Cr > Cu > Pb > Co > As > Cd > Mo > Hg.

Cuadro 6. Concentraciones de metales y metaloides en Charcas.

Parámetro mg/Kg	Charcas	
	Referencia <i>n</i> =10	Impactado <i>n</i> =10
Cr	8.3 (7.7-8.6)	5.4* (5-5.9)
Mn	281.6* (248.8-308.1)	1,057.80 (928-1,259.1)
Ni	74.9* (69-78.7)	130 (127.3-137.8)
Cu	7.7* (7.2-8)	2,919 (2,659.1-3,058.9)
Zn	24.9* (23.9-26.3)	27,766.80 (23,742.3-29,584.3)
Cd	0.3* (0.2-0.3)	355 (327.4-155.9)
Hg	0.1* (0.1-0.1)	14 (5.7-46.9)
Pb	6* (5.4-7.4)	14,135.40 (11,574.8-17,505.2)
Fe	7,545.50* (7,270.8-8,394.6)	13,304.70 (12,740-13,921.4)
Co	3.1* (2.9-3.2)	7.2 (6.4-7.7)
Mo	0.2* (0.2-0.2)	2 (1.8-2.3)
B	9.2* (8.6-9.4)	94.8 (82.1-110.7)
As	2.7* (2.6-2.9)	132.4 (111.4-155.9)

* Diferencias significativas $p < 0.05$, utilizando la prueba estadística U de Mann-Whitney. Los datos reportados son la mediana y rango intercuartil.

Ríos Martínez

Las concentraciones de referencia de Ni (1,600 mg/Kg), Cd (37 mg/Kg), Hg (23 mg/Kg), Pb (400 mg/Kg) y As (22 mg/Kg) de acuerdo a la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004 para uso residencial o agrícola, se compararon con las concentraciones de las muestras recolectadas en el presente sitio. Se pudo observar que las CR_T para Cd, Pb y As, fueron superadas en un 50% de las muestras y, el Hg en un 20%.

Asimismo se realizó una comparación con los valores de referencia de la Guía Canadiense para Cr total (64 mg/Kg), Cu (63 mg/Kg) y Zn (200 mg/Kg), en donde se observó que el 50% de las muestras superan las concentraciones de Cu y Zn; mientras que las muestras recolectadas no superan el valor de referencia para Cr.

Cedral

Las concentraciones de los metales y metaloides, se muestran en el Cuadro 7. Donde se puede observar que las concentraciones de Cr (11.6 - 13.1 mg/Kg) y Co (3.2 - 3.4 mg/Kg) son mayores en el sitio de referencia que en el sitio impactado, sin embargo todos los demás metales analizados se encuentran con mayores concentraciones en el sitio impactado mostrando diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto a su referencia. El orden decreciente de concentración encontrada en el sitio impactado fue $Fe > Pb > Mn > Zn > Cu > Ni > As > Cd > B > Mo > Hg > Cr > Co$ mientras que en el sitio de referencia fue $Fe > Mn > Ni > Zn > Cr > B > Cu > As > Pb > Co > Mo > Cd > Hg$.

Las concentraciones de Pb encontradas en el sitio impactado fueron 593 veces mayores que las encontradas en el sitio de referencia; el Hg fue 111 veces mayor en el sitio impactado que el de referencia; el Zn, Cd, Cu están aproximadamente 60 veces mayor en el sitio donde se encuentra la zona minera que en el sitio de referencia; el As se mantuvo 10 veces arriba en el sitio impactado que en el sitio de referencia. Lo cual se puede observar que casi todos los EPT se

encuentran muy por encima de los sitios de referencia, excepto por el Cr y el Co, que se encontraron 5 y 4 veces arriba en el sitio de referencia que en el sitio impactado, respectivamente.

Cuadro 7. Concentraciones de metales y metaloides en Cedral.

Parámetro mg/Kg	Cedral	
	Referencia <i>n</i> =10	Impactado <i>n</i> =10
Cr	12.1* (11.6-13.1)	2.1 (2-3.1)
Mn	264.4* (255.9-281)	1,717.70 ^p (1,485.9-1,878.6)
Ni	72.8* (69.5-76.9)	107.8 (100.3-126.3)
Cu	9.6* (9.1-9.9)	638.3 (546-806.1)
Zn	27.8* (27-29.3)	1,695.40 (1,425.5-2,110.4)
Cd	0.9* (0.8-1)	55.9 (52-63.1)
Hg	0.1* (0.1-0.1)	11.1 (8.1-31.1)
Pb	6.5* (5.6-7.8)	3,856.20 (3,100.8-4,283.3)
Fe	7,644.30* (7,249.87-8,117.1)	11,322.90 (10,656-13,500.5)
Co	3.3* (3.2-3.4)	0.8 (0.7-0.9)
Mo	3.1* (2.6-3.4)	13.3 (11.2-15.6)
B	11.1* (10-14.2)	18.2 (13.9-28.8)
As	8.3* (7.7-9.1)	83.8 (68.9-93.9)

* Diferencias significativas $p < 0.05$, utilizando la prueba estadística U de Mann-Whitney. Los datos reportados son la mediana y rango intercuartil.

Al realizar la comparación de las concentraciones de los metales de cada muestra tomada en el sitio con respecto a las concentraciones de CR_T que establece la regulación nacional NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004 de uso residencial o agrícola y la Guía Canadiense (Ver cuadro 6), se pudo observar que las CR_T de Cd, Pb, As, Cu y Zn fueron superadas en un 50% de las muestras, mientras que para el Hg fue en un 15%.

Villa de la Paz

En el Cuadro 8 se muestran las concentraciones de metales y metaloides encontrados en el distrito Villa de la Paz. Se observan diferencias significativas ($p < 0.05$) de los metales y/o metaloides entre el sitio impactado y el sitio de referencia, exceptuando al Mn y Mo ($p > 0.05$).

La concentración de As en el sitio impactado supero casi 155 veces el sitio de referencia; el Pb 93 veces, el Cd casi 30 veces, el Cu, Zn y Hg 9 veces supero las concentraciones del sitio impactado con respecto a su referencia. El orden decreciente de concentración encontrada en el sitio impactado fue $Fe > As > Pb > Zn > Mn > Cu > Ni > Cd > Hg > Cr > Mo > Co > B$ mientras que en el sitio de referencia fue $Fe > Mn > Ni > Zn > Cr > Cu > B > Pb > As > Co > Mo > Cd > Hg$.

Se han realizado diversos estudios para evaluar la contaminación por metales pesados existentes en esta región y determinar su concentración en diversas matrices ambientales (suelo, agua y sedimento) y sus efectos en la salud de la población local. En cuanto a concentraciones en suelo, Mejía y colaboradores (1999), encontraron concentraciones de 2,399 mg/Kg de Pb, 2,904 mg/Kg de As y 828 mg/Kg de Mn, superando los valores de las concentraciones del sitio impactado del presente estudio por casi 4 veces para Pb (608.5 mg/Kg) y 3 veces para As (991.6 mg/Kg) y Mn (237.7 mg/Kg). Otros estudios reportan concentraciones en los rangos de 19-17,384 mg/Kg de As, 15-7,200 mg/Kg de Cu, 31-3,450 mg/Kg de Pb y 26-

Ríos Martínez

6,270 mg/Kg de Zn en suelo (Monroy *et al.*, 2002 y Razo *et al.*, 2004). Razo y colaboradores en el 2006 reportaron concentraciones en suelo entre 7-14,923 mg/Kg de As, 27-6,429 mg/Kg de Pb y 0.2-274 mg/Kg de Cd. Gamiño-Gutiérrez y colaboradores (2013) reportaron concentraciones de As (1,769 mg/Kg) y Pb (1,235 mg/Kg) en suelo del área urbana de Villa de la Paz.

En otro estudio realizado por Espinosa y colaboradores en el 2014, cuyo objetivo fue evaluar el impacto de la actividad minera sobre comunidades bióticas en el distrito minero Villa de la Paz, se cuantificó las concentraciones de As, Cu, Pb y Zn en suelo clasificado por dos tipos de vegetación, el matorral desértico rosetófilo (MDR) y matorral desértico micrófilo (MDM); en donde la concentración media de As para el MDR fue de 222.1 mg/Kg, inferior a la encontrada en este estudio, sin embargo la concentración en el MDM (7,902.9 mg/Kg), fue casi ocho veces superior a la del presente estudio. En cuanto al Pb, fue mayor la concentración (1,228.2 mg/Kg) en MDM, dos veces mayor que en la del presente estudio y en el MDR fue menor la concentración que en este estudio (204.3 mg/Kg). La concentración de Zn (3,513.5 mg/Kg) en el MDM, se encontró mucho mayor que en el MDR (175.4 mg/Kg) y que para este estudio, 20 y 10 veces, respectivamente. Por último el Cu se encontró más alto en el MDR y el MDM (con concentraciones de 231.9 mg/Kg y 703.7 mg/Kg, respectivamente) que la concentración encontrada en este estudio para el sitio impactado.

Cuadro 8. Concentraciones de metales y metaloides en Villa de la Paz.

Parámetro mg/Kg	Villa de la Paz	
	Referencia <i>n</i> =10	Impactado <i>n</i> =10
Cr	11.5* (11.3-12.1)	0.8 (0.5-2.2)
Mn	347.9 (313.9-371.1)	237.7 (156.3-1,695.4)
Ni	96.1* (78.8-98.1)	54.9 (45.8-93.4)
Cu	11* (9.2-11.2)	99.3 (80-115.3)
Zn	35.5* (28.8-36.3)	319.9 (174-1,339.7)
Cd	0.3* (0.3-0.4)	8.8 (4.9-41.9)
Hg	0.1* (0.1-0.2)	0.9 (0.8-1.2)
Pb	6.5* (5.9-9)	608.5 (436.5-1,479.8)
Fe	9,439.50* (7,897.3-9,789.5)	5,738.40 (4,664.2-9,591.1)
Co	3.1* (3-3.3)	0.5 (0.4-1.1)
Mo	0.4 (0.3-0.5)	0.6 (0.4-1.5)
B	7.9* (6.8-10.3)	ND (ND-2.3)
As	6.4* (5.7-7.1)	991.6 (8644.7-3,393.8)

*Diferencias significativas $p < 0.05$, utilizando la prueba estadística U de Mann-Whitney. Mediana y rango intercuartil.

Comparación de las concentraciones de metales en los sitios impactados

En el Cuadro 9, se presentan las concentraciones de los metales y metaloides de los sitios impactados evaluados en el presente estudio.

Cuadro 9. Concentraciones de metales y metaloides de residuos mineros del estado de San Luis Potosí.

Parámetro mg/Kg	Cerro de San Pedro	Charcas	Cedral	Villa de la Paz
	Impactado	Impactado	Impactado	Impactado
Cr	1.7 ^b (1.2-2.2)	5.4 ^a (5-5.9)	2.1 ^{ab} (2-3.1)	0.8 ^b (0.5-2.2)
Mn	44.7 ^a (22.5-117.8)	1,057.80 ^b (928-1,259.1)	1,717.70 ^b (1,485.9-1,878.6)	237.7 ^{ab} (156.3-1,695.4)
Ni	144.8 ^b (115.9-210.2)	130 ^b (127.3-137.8)	107.8 ^{ab} (100.3-126.3)	54.9 ^a (45.8-93.4)
Cu	18 ^b (13.1-19.7)	2,919 ^a (2,659.1-3,058.9)	638.3 ^{ac} (546-806.1)	99.3 ^{bc} (80-115.3)
Zn	433.2 ^b (179.7-955.6)	27,766.80 ^a (23,742.3-29,584.3)	1,695.40 ^{ab} (1,425.5-2,110.4)	319.9 ^b (174-1,339.7)
Cd	2.7 ^b (1.5-7.8)	355 ^a (327.4-155.9)	55.9 ^{ac} (52-63.1)	8.8 ^{bc} (4.9-41.9)
Hg	6.4 ^a (3.7-8.7)	14 ^a (5.7-46.9)	11.1 ^a (8.1-31.1)	0.9 ^b (0.8-1.2)
Pb	3,592.20 ^a (2,506.4-4,822.1)	14,135.40 ^b (11,574.8-17,505.2)	3,856.20 ^a (3,100.8-4,283.3)	608.5 ^a (436.5-1,479.8)
Fe	11,451.10 ^{ab} (5,574-12,567.8)	13,304.70 ^a (12,740-13,921.4)	11,322.90 ^{ab} (10,656-13,500.5)	5,738.40 ^b (4,664.2-9,591.1)
Co	0.2 ^a (ND-0.5)	7.2 ^b (6.4-7.7)	0.8 ^a (0.7-0.9)	0.5 ^a (0.4-1.1)
Mo	1 ^b (0.7-1.3)	2 ^{ab} (1.8-2.3)	13.3 ^a (11.2-15.6)	0.6 ^b (0.4-1.5)
B	0.2 ^a (ND-1)	94.8 ^b (82.1-110.7)	18.2 ^b (13.9-28.8)	ND ^a (ND-2.3)
As	231.6 ^{ac} (195.5-325)	132.4 ^{bc} (111.4-155.9)	83.8 ^b (68.9-93.9)	991.6 ^a (864.7-3,393.8)

Las diferentes letras significan la diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los sitios, se utilizó la prueba estadística de Kruskal-Wallis. Los datos reportados son la mediana y rango intercuartil. n=10 N.D. No detectado.

Ríos Martínez

Se puede observar que las concentraciones de Pb y Co en Charcas son estadísticamente diferentes a los demás sitios. Por otro lado Charcas y Cedral son estadísticamente similares ($p > 0.05$) en cuanto a las concentraciones de Cr, Cu, Zn, Cd y B. Además en Charcas se encontraron las mayores concentraciones de EPT (Cr, Cu, Zn, Cd, Hg, Pb) y de algunos elementos esenciales para las plantas (Fe, Co y B). Se ha reportado que estos elementos esenciales a altas concentraciones podrían causar algún daño en plantas, por ejemplo el exceso de Co puede afectar el crecimiento de las plantas y sus funciones metabólicas. Macnicol y Beckett (1985) reportan niveles críticos de Co en plantas de 30 a 40 mg/Kg. Sin embargo la toxicidad del B en zonas áridas y semiáridas es más común debido a que en estas regiones las concentraciones de B son naturalmente altas. En Cedral se encontraron las mayores concentraciones de Mn y Mo; el Cerro de San Pedro tuvo la mayor concentración el Ni y en Villa de la Paz de As. La mayor concentración de Mn la mostró Cedral seguido de Charcas, Villa de la Paz y Cerro de San Pedro.

Actualmente no se cuentan con normas mexicanas que establezcan valores de referencia de Mn, Fe, Co, Mo y B, sin embargo existen diversos estudios en donde se han establecido los valores naturales de algunos de ellos. El Mn es uno de los elementos traza más abundantes en la litosfera; su concentración promedio en el suelo es de 488 mg/Kg. Los suelos calcáreos o calcisoles tienen una concentración de 50 a 7,750 mg/Kg de Mn, por lo cual, las concentraciones encontradas en este estudio indican concentraciones naturales del suelo. El Fe es el metal más importante y uno de los principales constituyentes de la litosfera. Está en una posición intermedia entre macro y micronutrientes en plantas, animales y seres humanos. La abundancia de Fe en suelos es de 3.5% en promedio, y es muy probable que aumente en suelos arcillosos y en suelos orgánicos. La mayor concentración de Fe la presentó Charcas seguido de Cerro de San Pedro, Cedral y Villa de la Paz. Por otro lado el orden decreciente de la concentración de Co en los sitios fue Charcas > Cedral > Villa de la Paz > Cerro de San Pedro. El valor medio mundial de Co en suelos superficiales se calcula en 10 mg/Kg. Sin embargo en

suelos calcáreos las concentraciones van de 1 a 70 mg/Kg, que comparándolo con la concentración más alta encontrada en los cuatro sitios es de 7.7 mg/Kg. Y por último las mayores concentraciones de B fueron encontradas en Charcas seguido de Cedral, Cerro de San Pedro y Villa de la Paz. El promedio de B en todo el mundo para suelos se estima en 42 mg/Kg. Los suelos calcáreos (calcisoles) presentan la mayor concentración de B, teniendo desde 10 hasta 100 mg/Kg de B, que comparándolo con la concentración más alta encontrada en los cuatro sitios es de 110.7 mg/Kg, superando por poco las cantidades naturales de B en suelos calcáreos (Kabata-Pendias, 2011).

Concentraciones de cromo en residuos mineros

La concentración total de Cr se encuentra repartida en diferentes especies químicas y su toxicidad cambia de una especie a otra (Sotelo, 2012). Se presenta en tres formas estables como: cromo metálico (0), que se usa para fabricar acero y es producido generalmente por procesos industriales; Cr (III), ocurre en forma natural en el ambiente y es un elemento nutritivo esencial; y Cr (VI), que se utiliza en cromado, pinturas y pigmentos, curtido de cuero y para preservar la madera (ATSDR, 2016a). El Cr es el vigésimo primer elemento más abundante de la corteza terrestre, con una concentración promedio de 100 mg/Kg. En el suelo se presenta con una concentración promedio de 60 mg/Kg (Kabata-Pendias, 2011).

En este estudio la mayor concentración de cromo fue de 5.9 mg/Kg en suelos del distrito minero de Charcas. El orden decreciente de concentración de Cr en los cuatro sitios fue Charcas > Cedral > Cerro de San Pedro > Villa de la Paz. Con respecto a normas oficiales, la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004 de uso residencial o agrícola, solo cuenta con la CR_T de Cr (VI), por lo que para este estudio la concentración de referencia para Cr total fue tomada de la Guía Canadiense. Como se observa en la Figura 17, las concentraciones de Cr en los cuatro sitios impactados no rebasan el límite permisible para la Guía Canadiense.

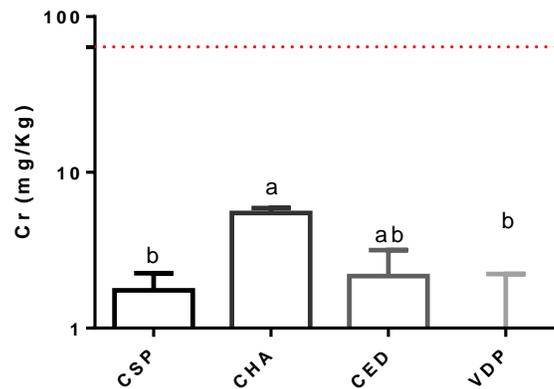


Figura 17. Concentración de cromo en los sitios impactados. Diferentes letras representan diferencias significativas ($p < 0.05$) entre Cerro de San Pedro (CSP), Charcas (CHA), Cedral (CED), Villa de la Paz (VDP). Se graficó la mediana y el rango intercuartil. Se utilizó la prueba estadística de Kruskal-Wallis. Línea punteada marca Límite Permisible por la Guía Canadiense (64 mg/Kg).

Concentraciones de níquel en residuos mineros

El níquel es un elemento natural muy abundante, se encuentra en todos los suelos y es liberado por emisiones volcánicas o por actividades antropogénicas. El Ni y sus compuestos no tienen olor ni sabor característicos (ATSDR, 2005a), y se combina fácilmente con el Fe y Mn, además que es fuertemente absorbido por la MO y la arcilla (Kabata-Pendias, 2011; Muñiz *et al.*, 2015). La abundancia media del Ni en la corteza terrestre se estima en alrededor de 20 mg/Kg. El contenido total de Ni en el suelo es altamente dependiente de su contenido en el material parental (roca formadora) del mismo. No obstante, la concentración del Ni en su superficie, puede reflejar el impacto tanto del proceso de formación del suelo como de la contaminación. Se reporta que el Ni total en los suelos del mundo varía entre 13 y 37 mg/Kg. Los calcisoles presentan la mayor cantidad de Ni que va desde 18 hasta 92 mg/Kg (Kabata-Pendias, 2011).

En la Figura 18 se presenta la concentración de Ni en las distintas zonas impactadas. Se puede observar que las concentraciones rebasan los límites

permisibles de la Guía Canadiense en suelo (50 mg/Kg), pero no así la Norma Mexicana (1,600 mg/Kg). La concentración máxima encontrada fue en Cerro de San Pedro (2010.2 mg/Kg) seguido de Charcas (137.8 mg/Kg), Cedral (126.3 mg/Kg) y Villa de la Paz (93.4 mg/Kg). En un estudio realizado por Villalba y colaboradores en el 2012 reportaron concentraciones de Ni en suelo desde 43.96 mg/Kg a 77.98 mg/Kg en el Ejido Agua Prieta, Sonora.

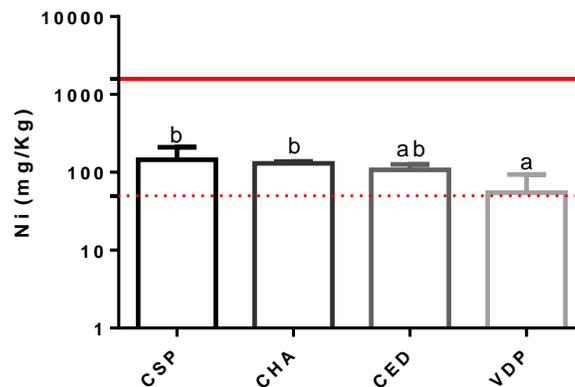


Figura 18. Concentración de níquel en los sitios impactados. Diferentes letras representan diferencias significativas ($p < 0.05$) entre Cerro de San Pedro (CSP), Charcas (CHA), Cedral (CED), Villa de la Paz (VDP). Se graficó la mediana y el rango intercuartil. Se utilizó la prueba estadística de Kruskal-Wallis. Línea punteada marca Límite Permisible por la Guía Canadiense (50 mg/Kg). Línea continua marca Límite Permisible de la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004 (1,600 mg/Kg).

Concentraciones de cobre en residuos mineros

El cobre es un micronutriente esencial para el crecimiento de los organismos, pero es requerido sólo en cantidades traza, ya que a altas concentraciones es tóxico para las células al alterar las funciones de las proteínas y consecuentemente la actividad enzimática (Gaete *et al.*, 2010). El Cu es liberado por la industria minera, actividades agrícolas y de manufactura (ATSDR, 2016b).

Los valores promedio de Cu en los suelos del mundo se encuentran entre 14 y 109 mg/Kg. El contenido de Cu está asociado con la textura del suelo y por lo general los suelos arenosos tienen bajas cantidades de Cu (3-30 mg/Kg), mientras que los suelos margosos (suelo formado por arcilla, limo y arena con abundante materia vegetal descompuesta) tienen cantidades que van desde 7 hasta 140 mg/Kg de Cu. Los suelos calcáreos tienen de 10 a 70 mg/Kg de Cu (Kabata-Pendias, 2011). Ruiz y Armienta (2012), reportan concentraciones de Cu en suelos agrícolas a diferentes distancias de residuos mineros conocido como “El Fraile”, en el estado de Guerrero, México. Ellos encontraron mayores concentraciones en las muestras obtenidas de los residuos mineros o jales, y entre más alejado se encuentren del sitio, el gradiente de contaminación disminuye, así el orden decreciente de las concentraciones encontradas en “El Fraile” son $418.3 > 125.2 > 56.2 > 80.5$ mg/Kg de Cu. Haciendo una comparación con el presente trabajo se observa que el valor máximo encontrado de Ruiz y Armienta (2012) es mayor a las concentraciones del Cerro de San Pedro (18 mg/Kg) y Villa de la Paz (99.3 mg/Kg), sin embargo Charcas supera este valor casi siete veces y Cedral por poco más de una vez. Según la Guía Canadiense, las concentraciones en Charcas, Cedral y Villa de la Paz rebasan el Límite Permisible que es de 63 mg/Kg, en donde Charcas se encuentra 46 veces por arriba y Cedral 10 veces de esta Guía (Figura 19).

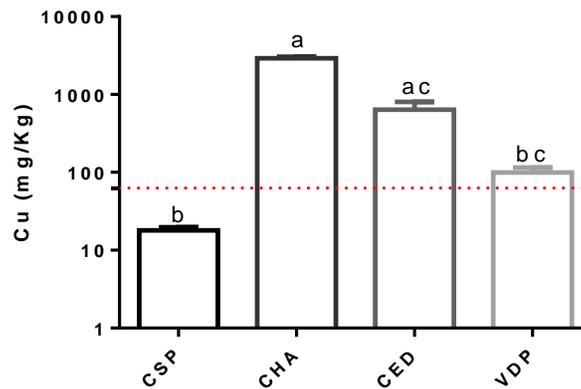


Figura 19. Concentración de cobre en los sitios impactados. Diferentes letras representan diferencias significativas ($p < 0.05$) entre Cerro de San Pedro (CSP), Charcas (CHA), Cedral (CED), Villa de la Paz (VDP). Se graficó la mediana y el rango intercuartil. Se utilizó la prueba estadística de Kruskal-Wallis. Línea punteada marca Límite Permisible por la Guía Canadiense (63 mg/Kg).

Concentraciones de zinc en residuos mineros

El Zn es uno de los elementos más comunes en la corteza terrestre, se encuentra en el aire, suelo y agua, y en todos los alimentos. La mayoría del Zn entra al medio ambiente como resultado de actividades humanas, como minería, combustión de carbón, quema de desechos, aguas residuales e industrias químicas (ATSDR, 2005b).

El contenido promedio de Zn en la corteza terrestre y los suelos del mundo es de 70 mg/Kg. El rango en suelos calcáreos va de 50 a 100 mg/Kg de Zn. El Zn más común y móvil en suelos se cree que es en forma de iones libres y complejos en soluciones del suelo, como por ejemplo Zn^{2+} , $ZnCl^+$, $ZnOH^+$, $ZnHCO_3^+$, ZnO , $ZnCO_3$, entre otros. La fijación de Zn en suelos es relativamente lenta y se encuentra controlado por el pH del suelo y las formas de metales añadidos al suelo (Kabata-Pendias, 2011).

Moreno *et al.* (2012), analizaron las concentraciones de algunos metales en muestras de jales del distrito minero Zimapán, Hidalgo. La concentración mediana encontrada en este sitio fue de 10,450 mg/Kg de Zn, superando 6 veces la concentración de Cedral, 24 veces a Cerro de San Pedro y 32 veces a Villa de la Paz, sin embargo la concentración en el distrito minero Charcas es dos veces más alta que la encontrada en el distrito minero Zimapán.

En la Figura 20 se muestran las concentraciones encontradas en los sitios impactados, donde se puede observar que las concentraciones de Zn en los cuatro sitios impactados son superiores que el límite permisible por la Guía Canadiense (200 mg/Kg). Charcas se encuentra casi 139 veces por encima del límite permisible, Cedral tres veces, Cerro de San Pedro dos veces y poco más de una vez, Villa de la Paz. Las concentraciones de Zn en orden decreciente para los sitio impactados fueron 27,766.8 > 1, 695.4 > 433.2 > 319.9 mg/Kg.

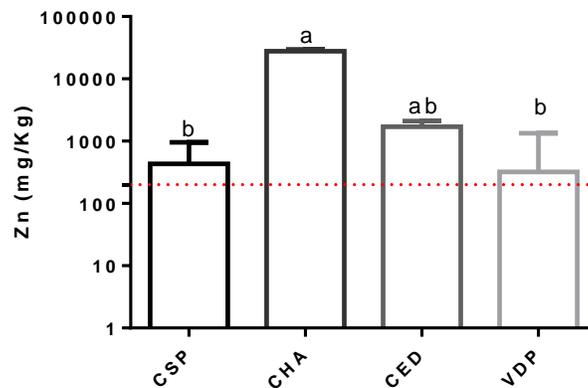


Figura 20. Concentración de zinc en los sitios impactados. Diferentes letras representan diferencias significativas ($p < 0.05$) entre Cerro de San Pedro (CSP), Charcas (CHA), Cedral (CED), Villa de la Paz (VDP). Se graficó la mediana y el rango intercuartil. Se utilizó la prueba estadística de Kruskal-Wallis. Línea punteada marca Límite Permisible por la Guía Canadiense (200 mg/Kg).

Concentraciones de cadmio en residuos mineros

El Cd se encuentra en la corteza terrestre a una concentración promedio de 0.1 mg/Kg, generalmente asociado con minerales de zinc, plomo y cobre (ATSDR, 2016c). Presenta gran afinidad por el azufre, de allí que el compuesto más común es el CdS. Otros compuestos comunes son: CdO, CdCl₂, Cd (OH)₂. La concentración promedio de Cd en suelos ha sido ubicado en 0.41mg/Kg (Kabata-Pendias, 2011). Algunos suelos pueden tener niveles de Cd elevados porque las rocas de las que se formaron tenían el elemento en su composición. El Cd de origen antropogénico, generalmente presente en los horizontes superficiales, será más disponible que el proveniente de la meteorización de rocas, sin embargo su absorción por las plantas depende de factores del suelo (pH, MO, textura, etc.) y del tipo de plantas. Aquellos factores y condiciones (metales en la solución del suelo, iones libres, etc.) del suelo que favorezcan la movilidad del elemento también facilitarán la absorción por las plantas, mientras que los que contribuyan a su retención (MO, textura, pH, etc.) por la matriz del suelo disminuirán la disponibilidad del elemento (Herrera, 2011).

En la Figura 21 se presentan las concentraciones de Cd en los sitios impactados, donde se puede observar que las concentraciones en Charcas y Cedral superan tanto la Norma Mexicana como la Guía Canadiense. En el distrito mineral Villa de la Paz, únicamente algunas muestras superan el valor de la Guía Canadiense.

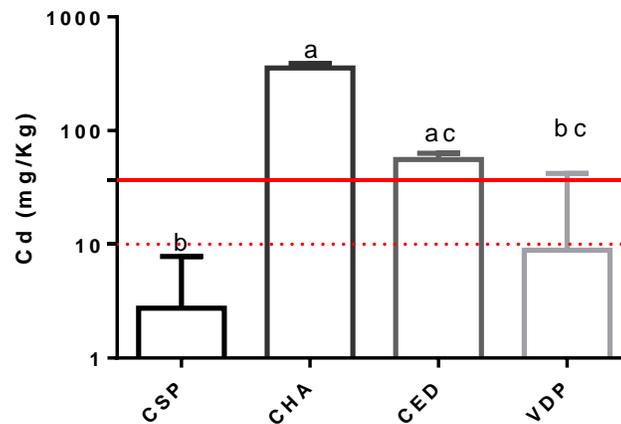


Figura 21. Concentración de cadmio en los sitios impactados. Diferentes letras representan diferencias significativas ($p < 0.05$) entre Cerro de San Pedro (CSP), Charcas (CHA), Cedral (CED), Villa de la Paz (VDP). Se graficó la mediana y el rango intercuartil. Se utilizó la prueba estadística de Kruskal-Wallis. Línea punteada marca Límite Permisible por la Guía Canadiense (10 mg/Kg). Línea continua marca Límite Permisible de la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004 (37 mg/Kg).

En el distrito minero Charcas, las concentraciones de Cd superan 35 veces el valor de la Guía Canadiense y nueve veces la Norma Mexicana; en Cedral se supera cinco veces la Guía Canadiense y poco más de una vez, la Norma Mexicana.

En un estudio realizado por Moreno *et al.*, (2009) en el distrito minero Zimapán, se estudió los minerales que se encuentran en diversas presas de residuos, las cuales fueron, la presa San Miguel, Santa María y El Monte. Mostrando concentraciones significativas de As (13,135 mg/Kg), Pb (3,934 mg/Kg), Zn (11,363 mg/Kg) y Cd (610 mg/Kg). Haciendo una comparación con el presente estudio, la concentración de Cd en el distrito minero Zimapán es casi 2 veces mayor que en el distrito minero Charcas, en comparación con Cedral es 10 veces mayor, con respecto a Villa de la Paz es 69 veces mayor y en el distrito minero Cerro de San Pedro, es 225 veces mayor.

Concentraciones de mercurio en residuos mineros

El Hg es el único elemento metálico líquido a temperatura ambiente, y se encuentra fundamentalmente como sulfuro (cinabrio, metacinabrio). Se ha conocido y utilizado durante más de veinte siglos. El Hg se usa para separar y extraer el oro de las rocas o piedras en las que se encuentra; se adhiere al oro formando una amalgama que facilita su separación de la roca, arena u otro material. Luego se calienta la amalgama para que se evapore el Hg y quede el oro (Navarro *et al.*, s.f.; Español, 2012).

Hasta el momento se sabe que los distritos (Charcas, Villa de la Paz y Cerro de San Pedro) tienen más de 300 años con explotación minera y en Cedral, se ubicaron haciendas de beneficio que procesaban el mineral que procedía de las minas de Real de Catorce, utilizando el método de patio (amalgamación con Hg), generando los jales de Jesús María y el Caballo, localizados en la zona urbana de Cedral. Como se puede observar en la Figura 22, las concentraciones máximas encontradas de Hg en Cedral son más altas que los límites permisibles por la Norma Mexicana y la Guía Canadiense. El valor máximo encontrado en Charcas supera siete veces la Guía Canadiense, y dos veces la Norma Mexicana. En Cedral el valor máximo supera casi cinco veces la Guía Canadiense y poco más de una vez la Norma Mexicana. En Cerro de San Pedro, se observa que las concentraciones máximas encontradas superan casi una vez la Guía Canadiense, pero no así la Norma Mexicana. No se observaron diferencias significativas entre Cerro de San Pedro, Charcas y Cedral ($p > 0.05$), pero sí con respecto a Villa de la Paz ($p < 0.05$), el cual no se encontraron concentraciones por encima de las regulaciones mencionadas anteriormente.

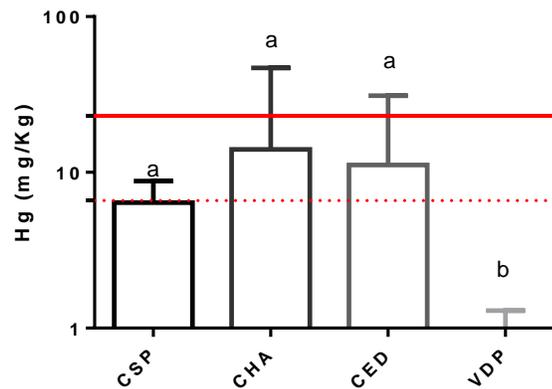


Figura 22. Concentración de mercurio en los sitios impactados. Diferentes letras representan diferencias significativas ($p < 0.05$) entre Cerro de San Pedro (CSP), Charcas (CHA), Cedral (CED), Villa de la Paz (VDP). Se graficó la mediana y el rango intercuartil. Se utilizó la prueba estadística de Kruskal-Wallis. Línea punteada marca Límite Permisible por la Guía Canadiense (6.6 mg/Kg). Línea continua marca Límite Permisible de la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004 (23 mg/Kg).

Concentraciones de plomo en residuos mineros

El Pb es un metal tóxico presente de forma natural en la corteza terrestre (15 mg/Kg). Entre las principales fuentes de contaminación ambiental destacan la explotación minera, la metalurgia, las actividades de fabricación y reciclaje y, en algunos países, el uso de pinturas y gasolinas con plomo (OMS, 2016). El nivel promedio de Pb en suelos ha sido ubicado en 27 mg/Kg (Kabata-Pendias, 2011). En la Figura 23 se observa que las concentraciones de Pb en todos los sitios estuvieron por encima de la Norma Mexicana y la Guía Canadiense. Charcas mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto a Cedral, Cerro de San Pedro y Villa de la Paz. Observándose en Charcas las mayores concentraciones de Pb, teniendo como valor máximo 17,505 mg/Kg, y superando a la Guía canadiense 125 veces, y 43 veces la Norma Mexicana. Seguido de este, se encontró Cerro de San Pedro con 4,822 mg/Kg, después Cedral con 4,283 mg/Kg y por último Villa de la Paz con 1,480 mg/Kg de Pb. Los últimos tres sitios no mostraron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre ellos.

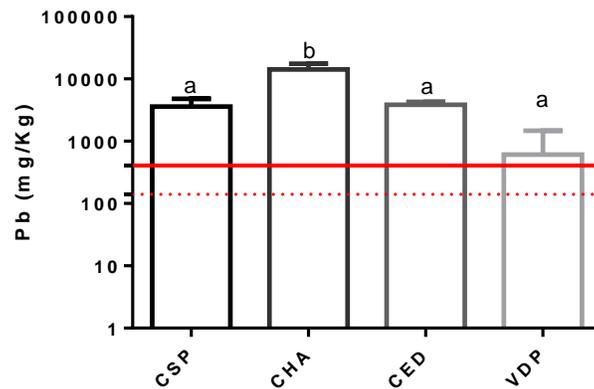


Figura 23. Concentración de plomo en los sitios impactados. Diferentes letras representan diferencias significativas ($p < 0.05$) entre Cerro de San Pedro (CSP), Charcas (CHA), Cedral (CED), Villa de la Paz (VDP). Se graficó la mediana y el rango intercuartil. Se utilizó la prueba estadística de Kruskal-Wallis. Línea punteada marca Límite Permisible por la Guía Canadiense (140 mg/Kg). Línea continua marca Límite Permisible de la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004 (400 mg/Kg).

En otros estudios realizados en los sitios se reportaron altas concentraciones de Pb, por ejemplo, en Cerro de San Pedro se encontraron concentraciones de 137.5 a 19,300 mg/Kg de Pb (Ortega, 2012). En Villa de la Paz, Gamiño-Gutiérrez y colaboradores (2013) reportaron concentraciones de 1,235 mg/Kg en suelo del área urbana; Monroy y Razo con sus respectivos colaboradores en el 2004 encontraron concentraciones que van de 31 a 3,450 mg/Kg de Pb. Y se sabe que desde 1999, las concentraciones de Pb en Villa de la Paz son altas, donde Mejía y colaboradores reportaron concentraciones de 2,399 mg/Kg de Pb. Ruíz y Armienta (2012), reportaron concentraciones de 6,166 mg/Kg de Pb en el jale llamado “El Fraile” en el estado de Guerrero, las cuales son parecidas a las reportadas por este estudio en los sitios Cerro de San Pedro y Cedral.

Concentraciones de arsénico en residuos mineros

El contenido de As de la corteza terrestre está en 1.8 mg/Kg. El nivel promedio de As en suelos ha sido ubicado en 6.83 mg/Kg. Las principales valencias que presenta

este elemento en la naturaleza son -3 , $+3$ y $+5$. El As^{3+} es más tóxico y móvil en el suelo que el As^{5+} . Los compuestos AsO_2^- , AsO_4^{3-} , HAsO_4^{2-} y el H_2AsO_4^- son las formas más móviles del As, y son absorbidos en un rango de pH de 7-9. Los iones de As son conocidos por ser fácilmente fijados en suelos por hidróxidos de Fe y Al, la fracción arcilla, compuestos de P y Ca y la MO (Kabata-Pendias, 2011). El As es un metaloide y por lo tanto, tiene las propiedades de los metales y de los elementos no metálicos (Carbonell *et al.*, 1995), por ejemplo tienden a ser semiconductores, pero conducen la electricidad en menor grado que los metales (Volke *et al.*, 2005).

En la Figura 24 se muestran las concentraciones de As en los sitios impactados. Villa de la Paz muestra una mayor concentración de As con respecto a Charcas ($p < 0.05$) y a Cedral ($p < 0.05$), pero no así con el Cerro de San Pedro ($p > 0.05$). La concentración máxima registrada fue de 3,394 mg/Kg de As en Villa de la Paz; este valor supera 282 veces el límite permisible por la Guía Canadiense y 154 veces la CR_T de la Norma Mexicana. La concentración mediana de As en Cerro de San Pedro supera el valor de referencia de la Guía Canadiense 27 veces y la Norma Mexicana, casi 15 veces. La concentración en Charcas supera la Guía Canadiense y la Norma Mexicana, 11 y seis veces, respectivamente; mientras que en Cedral, las concentraciones de As superan casi ocho veces la Guía Canadiense y cuatro veces la Norma Mexicana.

En el estudio realizado por Puga *et al.*, (2006), se evaluó la contaminación en el suelo por Pb, Cd, Zn y As a diferentes distancias (300, 600, 900, 1200 y 1500 m) y niveles de profundidad (0-40, 40-60, 60-80 cm), en un área de influencia de residuos mineros en San Francisco del Oro, Chihuahua. Los resultados que obtuvieron fue que a mayor distancia de los jales, las concentraciones de As en suelo superficial fueron disminuyendo, sin embargo a la distancia de 300 m a una profundidad de 40-60 y de 60-80 cm, las concentraciones aumentaron de 3,670 a 5,410 mg/Kg, lo cual hacen referencia a que las concentraciones de este elemento han pasado a estratos inferiores de suelo, debido a los años que ha estado expuesto este sitio. En

comparación con el presente trabajo, se observa que las concentraciones encontradas por Puga son mucho mayores que las reportadas en los cuatro sitios impactados; vemos que esta concentración supera una vez a la concentración máxima encontrada y 78 veces la concentración mínima registrada en los sitios impactados.

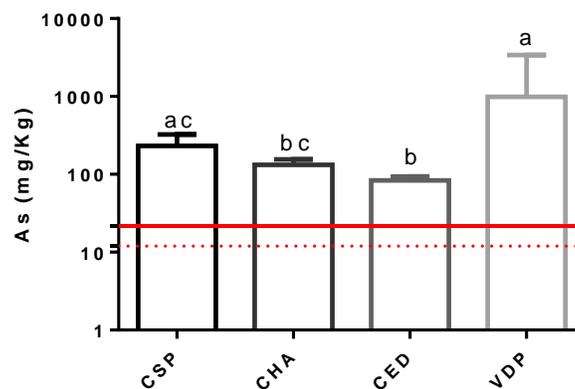


Figura 24. Concentración de arsénico en los sitios impactados. Diferentes letras representan diferencias significativas ($p < 0.05$) entre Cerro de San Pedro (CSP), Charcas (CHA), Cedral (CED), Villa de la Paz (VDP). Se graficó la mediana y el rango intercuartil. Se utilizó la prueba estadística de Kruskal-Wallis. Línea punteada marca Límite Permisible por la Guía Canadiense (12 mg/Kg). Línea continua marca Límite Permisible de la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004 (22 mg/Kg).

Análisis del índice de contaminación

El suelo rico con metales pesados puede tener impactos adversos en la población. La acumulación de metales pesados en el suelo puede plantear riesgos potenciales a largo plazo a plantas, animales y a los humanos que consumen estas plantas y están expuestos a estos suelos. Una forma de evaluar la contaminación por metales en suelos, es a través del índice de contaminación metálica (MPI, por sus siglas en inglés), que es una técnica que permite obtener una visión conjunta del grado de contaminación de un área por varios metales. Si el valor obtenido rebasa el límite

crítico, que es de 100, se dice que el sitio se encuentra contaminado con metales pesados. En el presente trabajo se ha calculado el MPI para cada sitio estudiado, teniendo en cuenta las concentraciones obtenidas de Cr, Mn, Ni, Cu, Zn, Cd, Hg, Pb, Fe, Co, Mo, B, As. En la Figura 25 se observa que existen diferencias significativas ($p < 0.05$) en cuanto al MPI entre el sitio de referencia y el impactado de cada zona minera, excepto para Villa de la Paz ($p > 0.05$). Se puede ver que el sitio impactado en Charcas supera 21 veces al sitio de referencia, Cedral siete veces, Cerro de San Pedro dos veces y Villa de la Paz poco más de una vez.

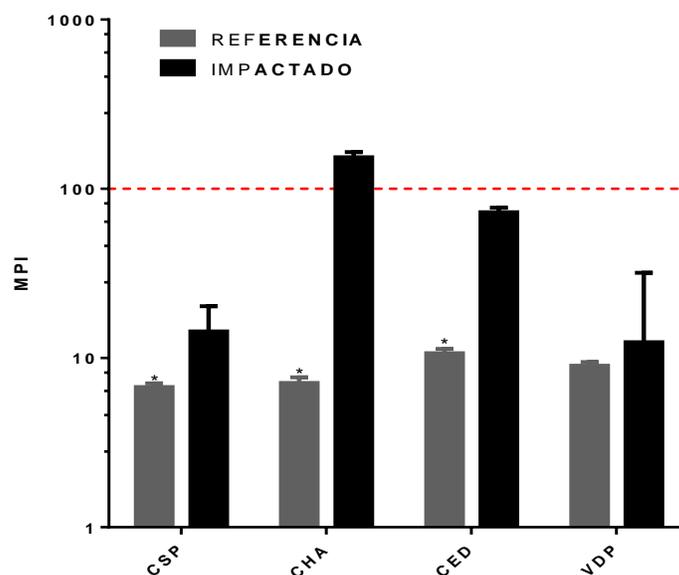


Figura 25. MPI en sitios mineros de San Luis Potosí. * Diferencias significativas $p < 0.05$, utilizando la prueba estadística de U de Mann-Whitney. Se graficó la mediana y el rango intercuartil. Cerro de San Pedro (CSP), Charcas (CHA), Cedral (CED), Villa de la Paz (VDP). La línea punteada marca el valor crítico 100, lo cual indica un sitio contaminado (Ojekunle et al., 2016).

Por otro lado, en la Figura 26 se observan los valores del MPI para los sitios de referencia y los impactados. En el lado izquierdo de la gráfica se muestran los sitios de referencia, registrando a Cedral con un MPI de 10, seguido de Villa de la Paz con 9, Charcas y el Cerro de San Pedro con 7. Estos valores no rebasan el valor

crítico de contaminación. Por el contrario en los sitios impactados con metales pesados, se observa que el distrito minero Charcas es el único sitio que rebasa el valor crítico del MPI, que es de 100 (Ojekunle *et al.*, 2016), lo que indica que el sitio minero Charcas se encuentra gravemente contaminado con metales pesados.

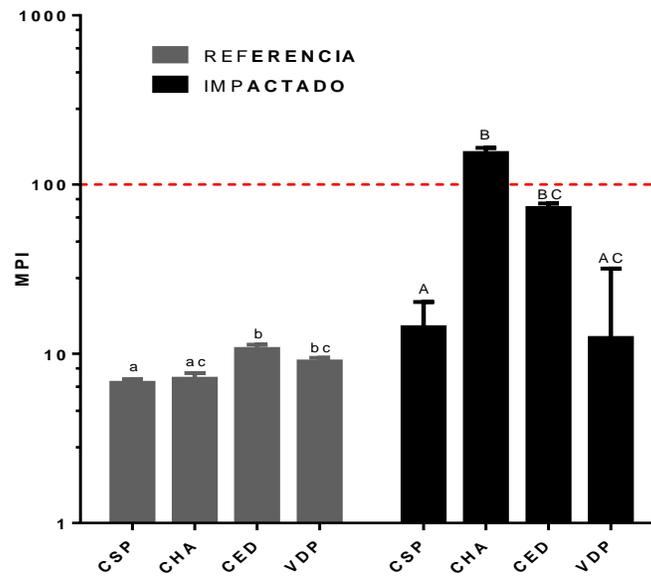


Figura 26. MPI en sitios de referencia e impactado con metales y metaloides. Diferentes letras representan diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los sitios. Se utilizó la prueba estadística de Kruskal-Wallis. Cerro de San Pedro (CSP), Charcas (CHA), Cedral (CED), Villa de la Paz (VDP). Se graficó la mediana y el rango intercuartil. Línea punteada marca valor crítico 100, lo cual indica un sitio contaminado (Ojekunle *et al.*, 2016)

Índice de Riesgo ecológico.

Las fuentes antropogénicas no sólo conducen a aumentar las concentraciones de metales pesados en el ambiente, sino que también pueden causar una contaminación en las zonas y por lo tanto la probabilidad de que exista un riesgo. Una forma de evaluar el riesgo ecológico en las zonas mineras es por medio del índice del cociente de las directrices de calidad de suelos (SQGQI, por sus siglas en inglés), el cual se puede utilizar para evaluar en qué medida los contaminantes depositados en suelos podrían tener impactos adversos sobre los organismos, donde se observan efectos biológicos adversos observados con bajo potencial cuando el

SQGQI ≤ 0.1 ; un potencial de impacto moderado cuando $0.1 < \text{SQGQI} < 1$; cuando el SQGQI ≥ 1 se dice que el potencial de impacto es alto.

En el presente trabajo se ha calculado el SQGQI para cada sitio estudiado, teniendo en cuenta las concentraciones obtenidas de Cr, Mn, Ni, Cu, Zn, Cd, Hg, Pb, Co, Mo, B, As. En la Figura 27 se muestran los sitios impactados con sus respectivas referencias. Cada distrito minero y Cedral, muestran diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) con respecto a su sitio de referencia. El distrito minero de Charcas supera 51 veces a su sitio de referencia, Cedral siete veces, el Cerro de San Pedro seis veces y Villa de la Paz tres veces.

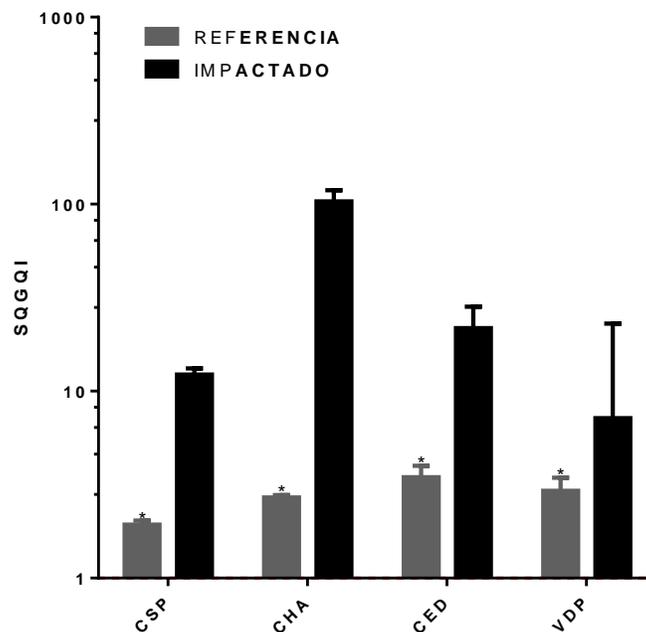


Figura 27. SQGQI en sitios mineros de S.L.P. * Diferencias significativas $p < 0.05$, utilizando la prueba de U de Mann-Whitney. Se graficó la mediana y el rango intercuartil. Cerro de San Pedro (CSP), Charcas (CHA), Cedral (CED), Villa de la Paz (VDP). Línea punteada marca el límite del potencial de impacto más alto para observar efectos biológicos adversos (1).

En Figura 28 podemos observar que los sitios de referencia están dos veces arriba de 1, esto puede ser debido a que estas zonas están mineralizadas de forma natural, como se puede ver en las concentraciones de metales encontradas en estos sitios (ver Cuadros 5, 6, 7, 8). Sin embargo, se puede observar que los rangos del SQGQI son mucho más altos en las zonas impactadas que en los sitios de referencia; donde los valores llegan 100 veces por arriba del potencial de impacto más alto. En el distrito minero de Charcas encontramos el índice de riesgo más alto, que fue de 103, seguido de Cedral con 22, después el Cerro de San Pedro con 12 y por último Villa de la Paz con 7, lo cual puede indicar que las altas cantidades de metales pesados pueden causar efectos adversos en las plantas como es una inhibición en la germinación y crecimiento, estrés oxidativo, disminución en el contenido de clorofila, entre otros. Observamos diferencias significativas entre Charcas y el Cerro de San Pedro y Villa de la Paz, pero no así con Cedral, en los sitios impactados.

Cedral es un sitio en donde se ubicaron haciendas de beneficio que procesaban el mineral que procedía de las minas de Real de Catorce, el cual utilizaban el método de patio (amalgamación con mercurio); y que los distrito mineros Cerro de San Pedro, Villa de la Paz y Charcas, tienen más de 300 años de explotación, lo cual ha generado grandes cantidades de residuos mineros, que contienen altas concentraciones de metales y mezclas de estos. Por lo cual se puede decir que en estas zonas hay un riesgo de que la biota, en este caso las plantas presente un posible efecto, como podría ser por ejemplo a nivel celular, en donde ciertos cationes pueden sustituir a otros que tiene alguna función biológica importante dentro de la célula, si el Zn^{2+} es reemplazado por Ni^{2+} , o el Be^{2+} por Mg^{2+} en enzimas, éstas se desactivan y pierden su función. La sustitución de Ca^{2+} por otros metales en proteínas de la membrana provoca desórdenes funcionales (Volke *et al.*, 2005). El arsénico en su forma inorgánica (arseniato) inhibe la actividad de enzimas que contiene grupos fosfato (P), y lo reemplaza en los grupos fosfato del

ADN, lo que puede ocasionar una disminución en la población vegetal (Mehargy Macnair, 1992; Patra *et al.*, 2004).

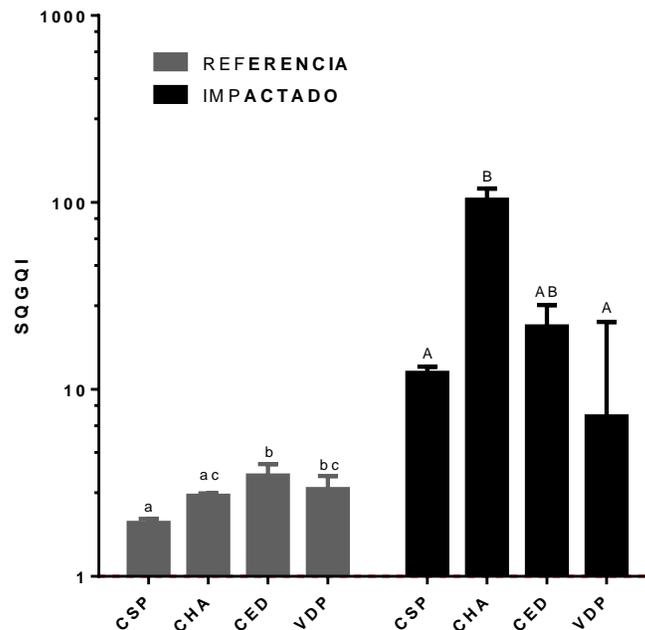


Figura 28. SQGQI en sitios de referencia e impactado con metales y metaloides. Diferentes letras representan diferencias significativas ($p < 0.05$) entre Cerro de San Pedro (CSP), Charcas (CHA), Cedral (CED), Villa de la Paz (VDP). Se graficó la mediana y el rango intercuartil. Se utilizó la prueba estadística de Kruskal-Wallis. Línea punteada marca el límite del potencial de impacto más alto para observar efectos biológicos adversos (1).

Control de calidad del ensayo cometa en células de raíz de haba.

Las respuestas fisiológicas y bioquímicas de las plantas en relación a contaminantes como los metales y metaloides en suelo son complejas. El As es considerado fitotóxico y se considera que afecta negativamente el crecimiento de las plantas (Austruy *et al.*, 2013). Los efectos fitotóxicos que provoca el As son marchitez, clorosis, mortalidad, deshidratación e inhibición de la fotosíntesis a concentraciones en el suelo de 25 a 85 mg/Kg (González, 2006). En un estudio realizado por Bandyopadhyay y Sharma (2000) se expusieron raíces de cebolla (*Allium cepa*) a

Ríos Martínez

arsenito y arseniato de sodio a diferentes concentraciones (0, 0.1, 1, 10, 100, 1000 mg/L) por diferentes tiempos de exposición: aguda a 6, 12, 18, 24 horas y; crónica a 48, 72, 96, 120 horas. Estos autores observaron que la frecuencia de división celular fue reduciendo en ambos tratamientos, encontrando una relación directa a la concentración del químico y a la duración de la exposición. Concluyeron que la exposición prolongada a altas concentraciones de As puede dañar el sistema radicular y por lo tanto el desarrollo de las plantas, sin embargo es raro que la acumulación de As en plantas alcance niveles perjudiciales para los seres vivos, debido a que el crecimiento de las plantas es reducido antes de que se alcancen niveles tóxicos.

Para el presente estudio se utilizaron raíces de *Vicia faba* para llevar a cabo controles de calidad para la técnica ensayo cometa, utilizando como agente genotóxico el arsenito de sodio (AsNaO_2), ya que en la literatura reportan que el arsenito es más fitotóxico que el arseniato, debido a que es soluble en agua. El arsénico tiene la capacidad de reaccionar con los grupos sulfhidrilo de las proteínas afectando muchas enzimas que contienen este grupo. Además es un compuesto similar al fosfato (P), por lo cual tiene la capacidad de reemplazar al P en el grupo fosfato del ADN, interfiriendo en procesos fisiológicos y bioquímicos de las plantas (Patra *et al.*, 2004). Diversos estudios se han realizado en diferentes plantas como *H. vulgare*, *Tradescantia*, *Allium cepa*, *Zea mays*, *Oryza sativa* y *Vicia faba* para ver la influencia del As en estas plantas. Observando una disminución en el porcentaje de germinación, efectos negativos en el crecimiento de la raíz, anomalías cromosómicas, reducción en la actividad enzimática (CAT, SOD, G-POX) y el índice mitótico, incremento en la frecuencia de micronúcleos así como el aumento de daño al ADN (Marin *et al.*, 1992; Gómez-Arroyo *et al.*, 1997; Tu y Ma, 2003; Patra *et al.*, 2004; Duquesnoy *et al.*, 2010).

En la Figura 29 se muestran la comparación de los tratamientos (1, 10, 100 mg/L) de AsNaO_2 y el control negativo. Todos los tratamientos fueron

significativamente diferentes entre ellos ($p < 0.05$), tanto para el OTM como para el TL, e igualmente fueron estadísticamente diferentes ($p < 0.05$) al control negativo. Los valores promedio encontrados de OTM para cada tratamiento fueron: 14 para un mg/L; 30 para 10 mg/L; y 42 para 100 mg/L de AsNaO_2 ; y el control negativo tuvo un OTM medio de 0.075. Por otro lado, los valores promedio de TL para cada tratamiento fueron: 34 μm para un mg/L, 70 μm para 10 mg/L y 99 μm para 100 mg/L de AsNaO_2 ; y el control negativo tuvo un TL medio de 0.4 μm .

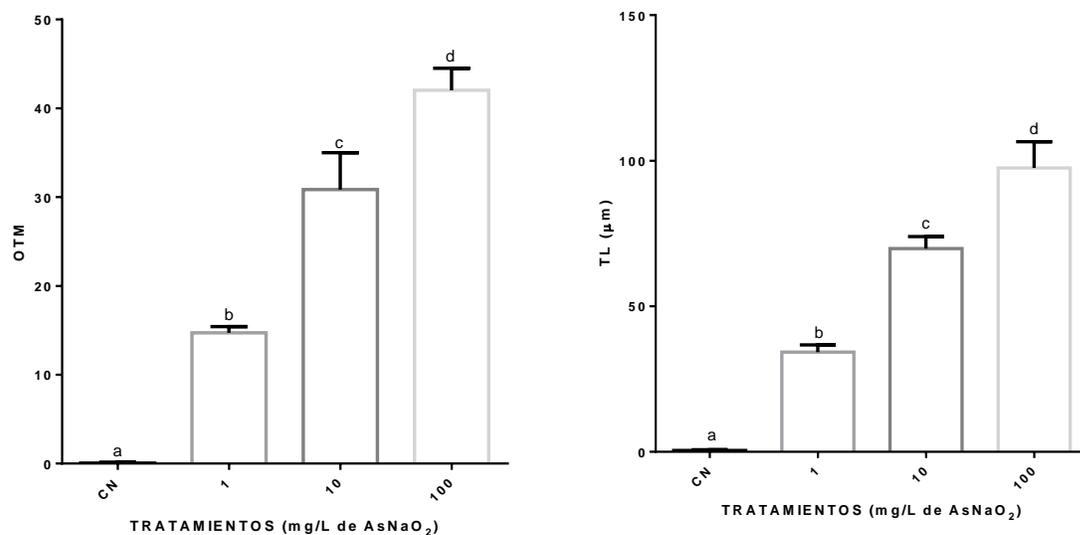


Figura 29. Daño al ADN en células de raíz de haba inducido con AsNaO_2 bajo diferentes tratamientos. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$), utilizando una prueba de ANOVA de una vía. CN: Control negativo. OTM: Olive Tail Moment. TL: Tail Length.

Estos tratamientos se realizaron con la finalidad de generar daño en las células meristemáticas de raíces de *Vicia faba* y así evaluar la sensibilidad y factibilidad del ensayo cometa a diferentes concentraciones de un agente genotóxico, en este caso el AsNaO_2 . Así, el daño al ADN (número y longitud de cometas) encontrado en estas células se puede relacionar con el aumento en las concentraciones de AsNaO_2 , ya que se observó un incremento en la migración del ADN conforme aumentaba la concentración de AsNaO_2 (Figura 30). En diversos

Ríos Martínez

estudios se comprobó que *Vicia faba* es un buen bioindicador debido a que responde a diferentes concentraciones de agentes genotóxicos, se ha visto que esta especie es sensible en la detección de genotoxicidad de agentes ambientales y que puede servir como primera alerta de la presencia de peligros ambientales en agua, aire y suelo (Saghirzadeh *et al.*, 2008).

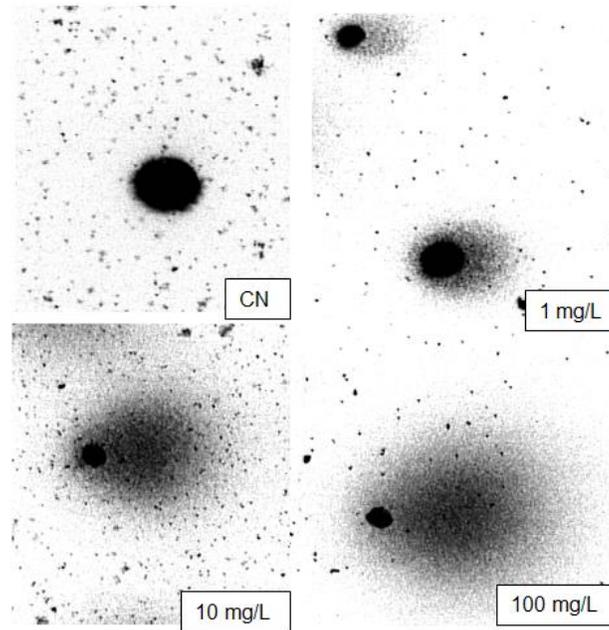


Figura 30. Daño al ADN a diferentes concentraciones de AsNaO_2 . CN: control negativo

Análisis de daño al ADN en células de raíz de *Vicia faba*

Los efectos de los metales pesados en las plantas pueden afectar la reproducción, crecimiento, sobrevivencia y también puede provocar daño genético (Olivares *et al.*, 2015). La genotoxicidad de metales pesados en plantas influye en la síntesis y en la duplicación del ADN. Los efectos se relacionan positivamente con la dosis de metales pesados (Cheng 2003). Por ejemplo Béraud *et al.*, (2007) evaluaron la genotoxicidad del Cd en raíces de *Vicia faba*, a través del ensayo de micronúcleos, y observaron una relación positiva entre las concentraciones de Cd y el aumento de micronúcleos, así como del tiempo de exposición. En otro estudio se analizó la

sensibilidad de *Vicia faba* y *Allium cepa* al Cd a través del ensayo cometa, donde concluyeron que en ambas plantas, los valores del porcentaje de ADN en la cola aumentó significativamente de una manera dependiente de la dosis (Arya y Mukherjee, 2014), sin embargo hay pocos estudios en donde se realiza un análisis de los efectos genotóxicos de suelos contaminados con metales pesados, donde existe una interacción compleja de mezclas de metales pesados con otros compuestos del suelo.

Para el presente estudio, se evaluó el daño al ADN en raíces de haba expuestas a suelos y residuos mineros, por medio del Olive tail moment (OTM) y la longitud de la cola (TL, por sus siglas en ingles), que son los parámetros más utilizados. En la Figura 31 se observa que los valores de OTM y TL fueron altos en los cuatro sitios impactados mostrando diferencias significativas ($p < 0.05$) con su sitio de referencia. El sitio impactado en Cerro de San Pedro y Cedral supero 12 veces a su sitio de referencia, Villa de la Paz 15 veces y, Charcas seis veces para OTM. Y para TL, el sitio impactado en Cerro de San Pedro y Villa de la Paz superó siete veces al sitio de referencia, Cedral seis veces y Charcas cinco veces. Con esto se observa que en cada zona minera, el sitio impactado se encuentra superando por más de cinco veces a su sitio de referencia, lo cual demuestra el daño genotóxico que la mezcla de metales pesados puede provocar.

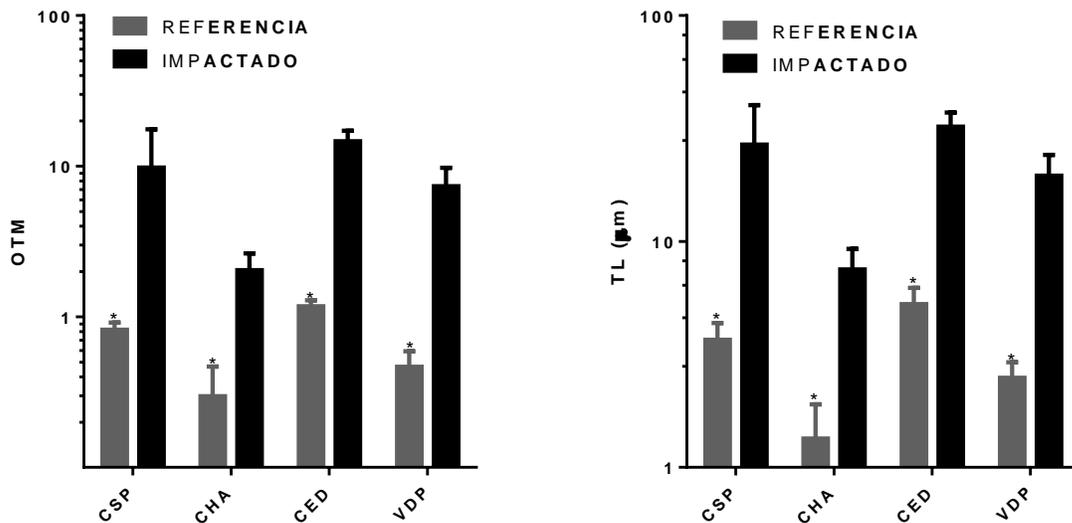


Figura 31. OTM y TL en núcleos de raíces de *Vicia faba* expuestas a suelos y residuos mineros de distintas zonas del estado de San Luis Potosí. * Representa diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los sitios impactados y los sitios de referencia para el Cerro de San Pedro (CSP), Charcas (CHA), Cedral (CED) y Villa de la Paz (VDP). Se graficó la mediana y el rango intercuartil. Se utilizó la prueba de U de Mann-Whitney. OTM: Momento de la cola de oliva; TL: longitud de la cola

En la Figura 32 se muestran imágenes de algunos cometas observados durante la contabilización de núcleos en los sitios impactados Cerro de San Pedro, Charcas, Cedral y Villa de la Paz. Se puede ver que en Cedral, la mayor parte del ADN se encuentra en la cola del cometa y una poca parte en la cabeza, cabe mencionar que fue el sitio con más daño. En comparación con Charcas, que fue el sitio con menos daño al ADN, se observa que en la cabeza del cometa esta mejor formada, es decir, más densa; y la longitud de la cola del cometa es menor y con menor concentración de ADN.

En el Cuadro 10 se observan los valores obtenidos de OTM y TL para cada sitio. Se puede ver que los valores más altos los encontramos en los sitios impactados en comparación con los sitios de referencia. Podemos ver que Cedral, fue el sitio que tuvo mayor daño con un OTM de 14.6 y un TL de 32.2 µm.

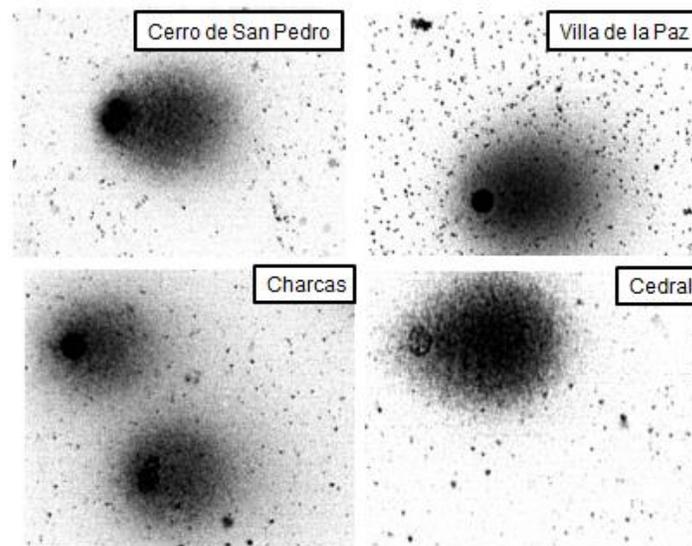


Figura 32. Cometas observados de raíces de habas expuestas a muestras de residuos mineros.

Cuadro 10. Valores de OTM y TL en núcleos de raíz de *Vicia faba*.

Parámetro	Sitio	Tipo de sitio	Valores obtenidos
OTM	Cerro de San Pedro	Referencia	0.8
	Charcas	Referencia	0.3
	Cedral	Referencia	1.1
	Villa de la Paz	Referencia	0.4
	Cerro de San Pedro	Impactado	9.7
	Charcas	Impactado	2
	Cedral	Impactado	14.6
	Villa de la Paz	Impactado	7.3
TL	Cerro de San Pedro	Referencia	3.6
	Charcas	Referencia	1.3
	Cedral	Referencia	5.2
	Villa de la Paz	Referencia	2.4
	Cerro de San Pedro	Impactado	26.8
	Charcas	Impactado	7.5
	Cedral	Impactado	32.2
	Villa de la Paz	Impactado	19.5

Los datos reportados son la mediana.

Los resultados de cada sitio se pueden observar en la Figura 33, donde en el orden decreciente de daño de acuerdo al OTM en los sitios de referencia es Cedral > Cerro de San Pedro > Villa de la Paz > Charca. Existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre Cedral con Charcas y Villa de la Paz, pero no así con Cerro de San Pedro ($p > 0.05$). En los sitios impactados, Charcas es estadísticamente diferente ($p < 0.05$) a Cerro de San Pedro, Cedral y Villa de la Paz. Se observa un orden de daño de acuerdo al OTM de Cedral = Cerro de San Pedro = Villa de la Paz > Charcas. Por otro lado, se observa que el TL es mucho más alto en los sitios impactados que en los sitios de referencia, donde podemos ver un orden de valores de Cedral > Cerro de San Pedro > Villa de la Paz > Charcas para los sitios de referencia y; para los sitios impactados Cedral = Cerro de San Pedro = Villa de la Paz > Charcas.

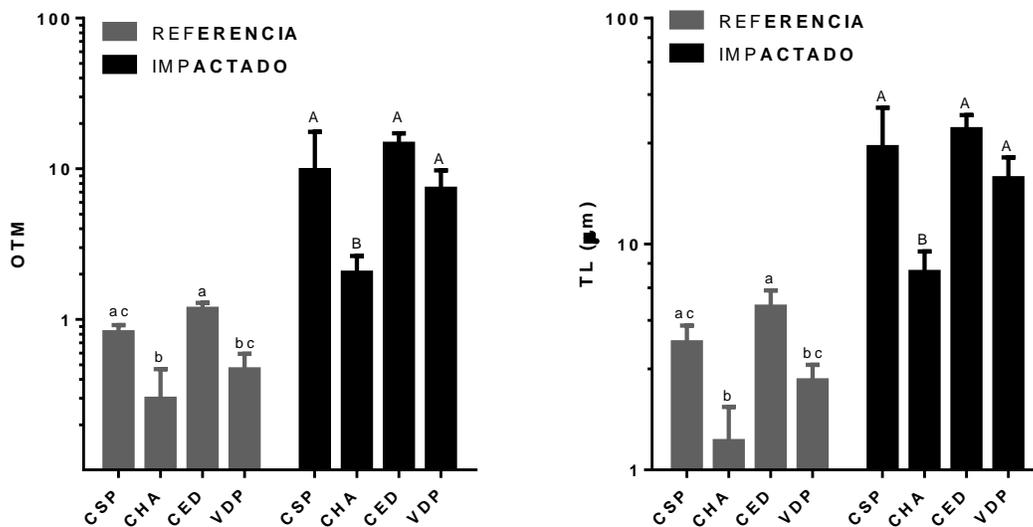


Figura 33. Daño al ADN en núcleos de raíces de *Vicia faba* expuesto a suelos de sitios de referencia y sitios impactados con metales pesados. Diferentes letras representan diferencias significativas ($p < 0.05$) entre Cerro de San Pedro (CSP), Charcas (CHA), Cedral (CED), Villa de la Paz (VDP). Se graficó la mediana y el rango intercuartil. Se utilizó la prueba estadística de Kruskal-Wallis. OTM: Momento de la cola de oliva; TL: longitud de la cola

Ríos Martínez

En cuanto a investigaciones realizadas por otros grupos (Cuadro 11), se encontró que no existen muchos estudios realizados para evaluar la genotoxicidad de suelos de sitios mineros a través de *Vicia faba*. Se puede ver en el Cuadro 11 que a excepción de la investigación realizada por Kaur y colaboradores (2014), los valores de OTM y TL reportados son más altos que en el presente estudio. Zhang *et al.*, (2006), realizó un estudio en donde expuso a raíces de *Vicia faba* a suelos recolectados de una provincia de Fuyang Zhejiang en China, los cuales se encontraban contaminados con mezclas de metales pesados (Cu, Zn, Pb, Cd), obteniendo un OTM de 60 y un TL de 120 μm , que comparados con los valores del presente estudio, superan cuatro y tres veces, respectivamente, los valores encontrados en el sitio impactado de Cedral.

Cuadro 11. Estudios realizados en *Vicia faba* por medio del ensayo cometa.

Sitio estudiado	Contaminante	Concentración	Parámetro	Valor del parámetro	Referencia
Laboratorio	Cr (VI)	0.25 mM	OTM	12	Kaur <i>et al.</i> , 2014
Laboratorio	CdCl ₂ CrCl ₃	10 ⁻³ M	TL	76.21 μm 89.18 μm	Koppen y Verschaeve, 1996
Laboratorio	Cd	1 mg/Kg	OTM TL	15 45 μm	Lin <i>et al.</i> , 2005
Provincia de Fuyang Zhejiang, China	Mezcla de metales como Cu, Zn, Pb y Cd	---	OTM TL	60 120 μm	Zhang <i>et al.</i> , 2006

En el presente trabajo se analizaron algunas variables que pudieran explicar la biodisponibilidad de metales a raíces de *Vicia faba*, es por ello que se analizaron parámetros fisicoquímicos (ver Cuadro 4) y las concentraciones de metales en suelo (ver Cuadros 5, 6, 7 y 8). De acuerdo con las concentraciones de metales, se pudo observar que en todos los sitios impactados, hubo altas concentraciones de metales y metaloides, Charcas y Cedral fueron los sitios con las más altas concentraciones,

seguido del Cerro de San Pedro y Villa de la Paz. Sin embargo los parámetros fisicoquímicos nos dan una idea de lo que pasa en el suelo y la biodisponibilidad de metales, por ejemplo, se obtuvo menos porcentaje de MO y arcilla en Cedral, lo cual nos puede dar un indicio de que existe más biodisponibilidad de metales en este sitio. En el Cerro de San Pedro el pH fue ácido (4.1) y la CE fue muy alta (1.3 dS/m), por lo que se ha discutido anteriormente, el pH ácido es uno de los parámetros que ayudan a la absorción de metales hacia las plantas, causando daño al ADN. En Villa de la Paz se encontró el menos porcentaje de arcilla (5.6-6.7) y; en Charcas, los valores de los parámetros analizados (MO, pH, arcilla) fueron los más altos junto con las concentraciones de metales, lo cual puede explicar el bajo daño al ADN en núcleos de raíz de haba encontrado en este sitio (Cuadro 10), es decir, el alto porcentaje de MO y arcilla, pH básicos, y una baja conductividad, nos indica que existe una baja biodisponibilidad y movilidad de metales, ya que la MO y arcilla ayudan a retener los metales en la fase sólida del suelo y el pH básico ayuda a formar complejos, que son difícilmente absorbidos por las plantas.

Relaciones entre concentraciones de elementos, daño al ADN y cofactores.

Para este estudio se decidió tomar en cuenta los dos primeros PC, debido a que ambos explican el 73% de los datos, es decir, que explican la mayor parte de la variabilidad original.

Cuadro 12. Porcentaje de variación acumulada de cada componente principal

PC	<i>Eigenvalues</i>	% variación	% Variación acumulada
1	8.24	48.4	48.4
2	4.19	24.6	73.1
3	1.62	9.5	82.6
4	1.04	6.1	88.7
5	0.733	4.3	93.0

En el Cuadro 13 se observa que las variables que conforman el PC1 son la MO, arcilla, conductividad eléctrica, Cu, Zn, As, Cd, Hg y el Pb. Y el PC2 se compone de variables como el pH, Cr, Mn, B, Fe y Co. Es importante mencionar que para cada variable se tomó en cuenta una carga factorial mayor a 0.25, que representan una asociación fuerte con el componente.

Cuadro 13. Cargas factoriales de cada componente principal con su respectiva variable.

Variable	PC1	Variable	PC2
MO	0,268	pH	-0,301
Arcilla	0,266	Cr	-0,334
CE	-0,3	Mn	-0,382
Cu	-0,294	B	-0,447
Zn	-0,32	Fe	-0,269
As	-0,285	Co	-0,411
Cd	-0,309		
Hg	-0,309		
Pb	-0,337		

Se obtuvo el gráfico de ordenación en dos dimensiones del PC1 y PC2, en donde se observa la variabilidad de las observaciones por sitios (Figura 34). Se observa una agrupación por sitio de referencia y contaminado en el PC1, en donde se incrementa la variación en las muestras de los sitios contaminados, esto debido a las concentraciones de Pb, Hg, Cd, As, Zn y Cu, las cuales incrementan en los sitios impactados y disminuyen en los sitios de referencia. Por otro lado en el PC2 se observa un gradiente entre las zonas, compuestas principalmente de Mn, B, Fe, Co y Cr, los cuales algunos de estos elementos son nutrientes para las plantas (Furini, 2012).

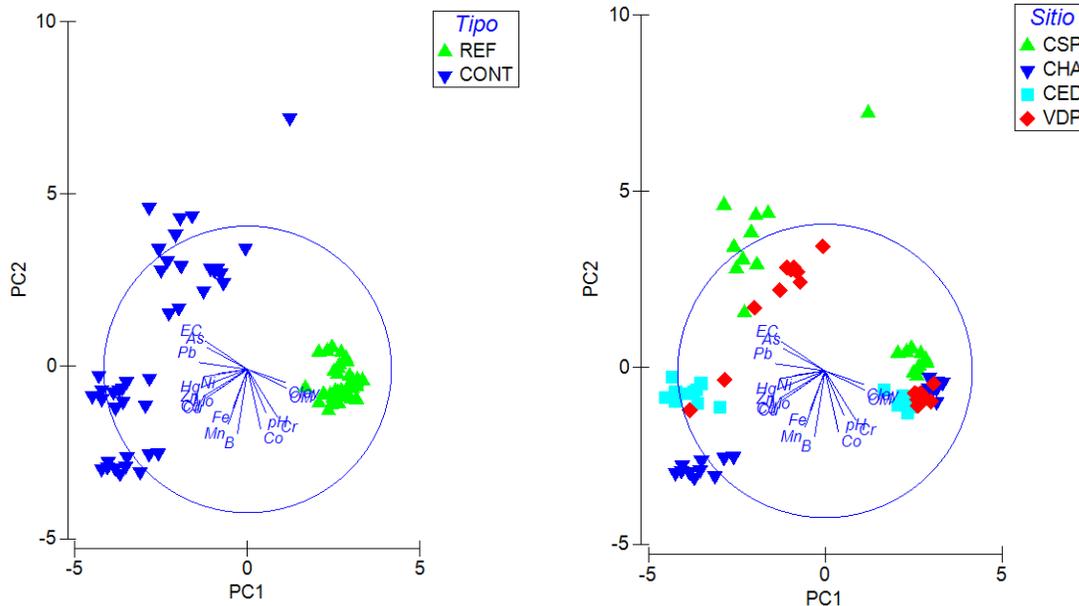


Figura 34. Ordenación de componentes principales por sitios.

Las relaciones que se muestran entre los metales y los sitios impactados son debido a las actividades mineras presentes en los sitios (Figura 34). El CP1 ordena a los metales tóxicos en función de su concentración, es decir existe mayor cantidad de As, Pb y una alta CE en los sitios impactados de Cerro de San Pedro y Villa de la paz; y mayor cantidad de Hg, Zn, Cu, As y Cd en Cedral y en algunas muestras de Villa de la Paz; por el contrario en los sitios de referencia que se agrupan del lado derecho de la gráfica, se observa que tienen un mayor porcentaje de arcilla y MO, los cuales son parámetros que ayudan a la retención de metales y metaloides en el suelo. Sin embargo en las zonas impactadas se mostró un déficit o ausencia general de materia orgánica en los suelos, este hecho es común en zonas mineras (Cruz-Guzmán, 2007). En los distritos mineros de Villa de la Paz y el Cerro de San Pedro se observa que hay asociaciones con el As y el Pb. Existen diversos estudios que desde 1999 han reportado altas concentraciones de As (875-8,100 mg/Kg) y Pb (633-4,013 mg/Kg) en suelo superficial del área urbana de Villa de la Paz, por Mejía y colaboradores. Chávez en el 2012, realizó un estudio en este mismo distrito, reportando concentraciones de 4,000-9,647 mg/Kg de As y 690-3,000 mg/Kg de Pb en jales de estos sitios. Por otro lado, Rodríguez (2011) realizó un estudio en el

Cerro de San Pedro reportando concentraciones que van desde 18 a 250 mg/Kg de As y de 80 a 835 mg/Kg de Pb en el 2011. No hay reportes de investigaciones realizadas en el sitio Cedral, sin embargo en este estudio se encontraron asociaciones de Cu, Zn, Cd y Hg con el sitio impactado, esto pudiera deberse a que en esta comunidad se ubicaron haciendas de beneficio que procesaban el mineral que procedía de las minas de Real de Catorce, utilizando el método de patio, el cual es por amalgamación con Hg, lo cual provoca una grave contaminación en suelos por Hg (Flores *et al.*, 2012).

En la Figura 35 y 36 se presentan las asociaciones ($r=0.80$) entre el CP1 y el daño causado por algunos elementos analizados. Se observa que entre mayor CP1 menor daño al ADN, tanto para OTM y TL. Esto debido a que las mayores concentraciones de elementos tóxicos (As, Cu, Zn, Cd, Hg, Pb) se presentaron en los sitios contaminados y en menor medida en los sitios de referencia, además que se observaron altas concentraciones de arcilla y MO en los sitios de referencia. De acuerdo a diversos estudios realizados en *Vicia faba* se puede decir que el daño al ADN es causado por las altas concentraciones de metales y metaloides presentes en los sitios impactados. Por ejemplo, se ha estudiado que el Pb puede inducir roturas de la cadena de ADN en el tabaco (*Nicotiana tabacum L. var. xanthi*) (Gichner *et al.*, 2008) y en altramuz (*Lupinus luteus*) (Rucińska *et al.*, 2004) a concentraciones de 200 μM y 350 mg/L respectivamente, de nitrato de plomo [$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$]. En raíces de *Vicia faba*, el Pb acorta la fase mitótica, prolonga la interfase y por lo tanto el ciclo celular, además de causar estrés oxidativo provocando lesiones en el ADN a concentraciones de 200 μM de [$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$] (Arya *et al.*, 2013). En un estudio realizado por Lin y colaboradores (2007) demostraron que el cloruro de cadmio (CdCl_2) a concentraciones de 10 mg/L en células de hoja de *V. faba* causa fragmentación de las cadenas de ADN. Este autor menciona que el Cd es un elemento fitotóxico causando efectos perjudiciales en la replicación de cloroplastos y la división celular, así como una reducción en la tasa fotosintética y por lo tanto una inhibición del crecimiento de las plantas. Así mismo diversos estudios realizados en

Ríos Martínez

especies vegetales como *Allium cepa*, *Tradescantia*, *H. vulgare*, *Oryza sativa*, *Zea mays* y *Vicia faba* reportan que el As es un elemento fitotóxico debido causa efectos negativos en el crecimiento de raíz, anomalías cromosómicas, un incremento en la frecuencia de micronúcleos, reducción en actividades enzimáticas así como fragmentación en cadenas de ADN (Marin *et al.*, 1992; Gómez-Arroyo *et al.*, 1997; Tu y Ma, 2003; Patra *et al.*, 2004; Duquesnoy *et al.*, 2010; Boccia *et al.*, 2013).

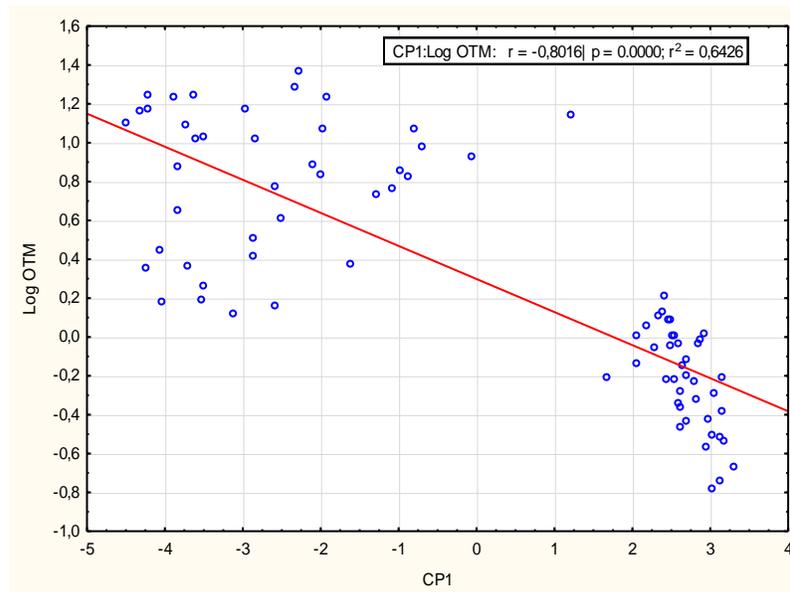


Figura 35. Relación entre el OTM en función del CP1.

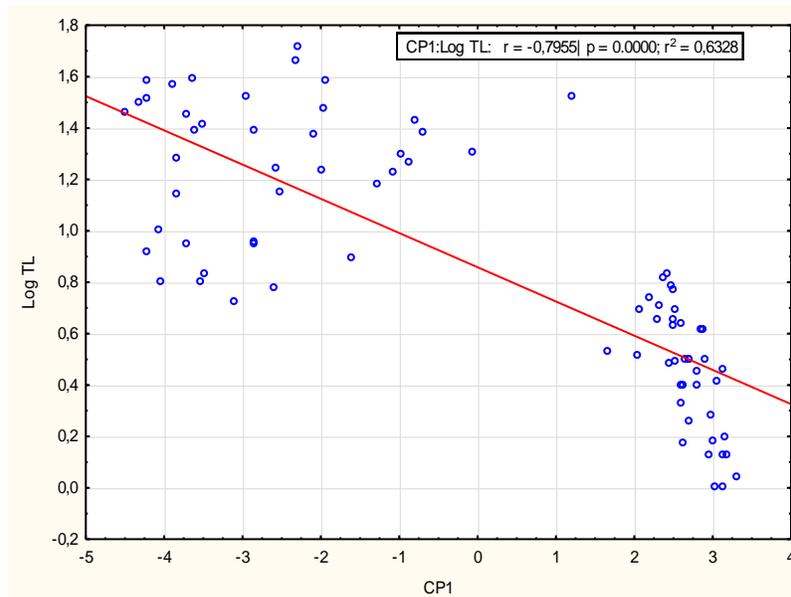


Figura 36. Relación entre el TL en función del CP1.

El CP2 (Figura 34) ordena los metales esenciales para las plantas como el Mn, B, Fe y Co, en función de un gradiente con todos los sitios (independiente de su grado de contaminación). Se observa un mayor gradiente de concentración de Fe, Mn, y B en el sitio contaminado de Charcas en comparación con los sitios contaminados de Villa de la Paz y Cerro de San Pedro; por el contrario se observa un pH ácido y bajas concentraciones de Cr y Co en los sitios impactados de Villa de la Paz y Cerro de San Pedro. Esto pudiera deberse a que existe un rango o intervalo óptimo de concentraciones de nutrientes en las plantas (Figura 37), sin embargo para algunas especie vegetales no existe un rango de suficiencia de concentraciones de nutrientes; cuando el nivel de nutriente en la planta se encuentra por debajo de la zona de suficiencia ocurre una deficiencia del mismo, mientras que si está por encima probablemente ocurra una intoxicación o toxicidad (Barbazán, 1998).



Figura 37. Rango de suficiencia de concentraciones de nutrientes. Fuente: Barbazán, 1998

En la Figura 38 y 39 se observan las asociaciones ($r=0.38$) entre el CP2 y el OTM y el TL. Se observa que a mayor CP2 mayor daño al ADN, esto pudiera deberse a que las menores concentraciones de Fe, Mn, B, Cr, Co y pH ácidos se presentan en los sitios contaminados. Los elementos con funciones específicas y esenciales en el metabolismo de las plantas se clasifican, según su concentración y conforme a sus requerimientos para el adecuado crecimiento y reproducción, en dos grupos: macronutrientes y micronutrientes. El Fe, Mn, B, Co son micronutrientes que en su ausencia provoca en las especies vegetales determinadas anomalías en su crecimiento y/o metabolismo (Raven *et al.*, 1992; Kyrkby y Romheld, 2007). La función importante del Mn es activar ciertas enzimas en procesos metabólicos (Oliveira *et al.*, 2006); el Co interviene en el metabolismo de los carbohidratos y de las proteínas por su participación en diversos sistemas enzimáticos, así como en la síntesis de clorofila (Ortega y Malavolta, 2012); el B participa en la síntesis de paredes celulares, en la integridad de la membrana, en metabolitos fenólicos, en lignificación y en el crecimiento reproductivo, por esta razón, en presencia de una deficiencia de B, no crecen las raíces nuevas y tampoco hay nuevas brotaciones (Yamada, 2000); el Fe tiene como funciones importantes la síntesis de clorofila e

integridad de cloroplastos, sistemas enzimáticos (ciclo de Calvin, citocromos, complejos proteicos, etc.) y la reserva de Fe (Raven *et al.*, 1992; Juárez *et al.*, 2007).

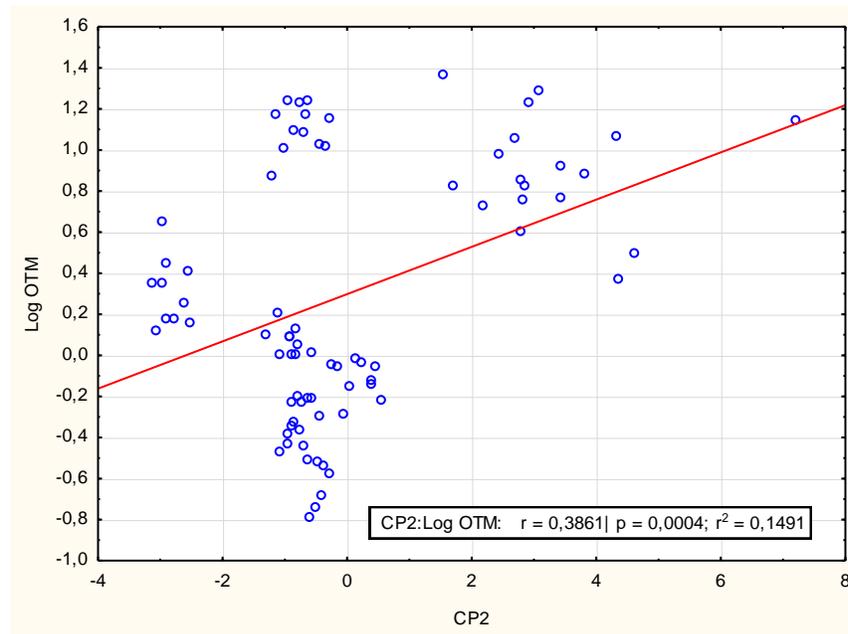


Figura 38. Relación del OTM en función del CP2.

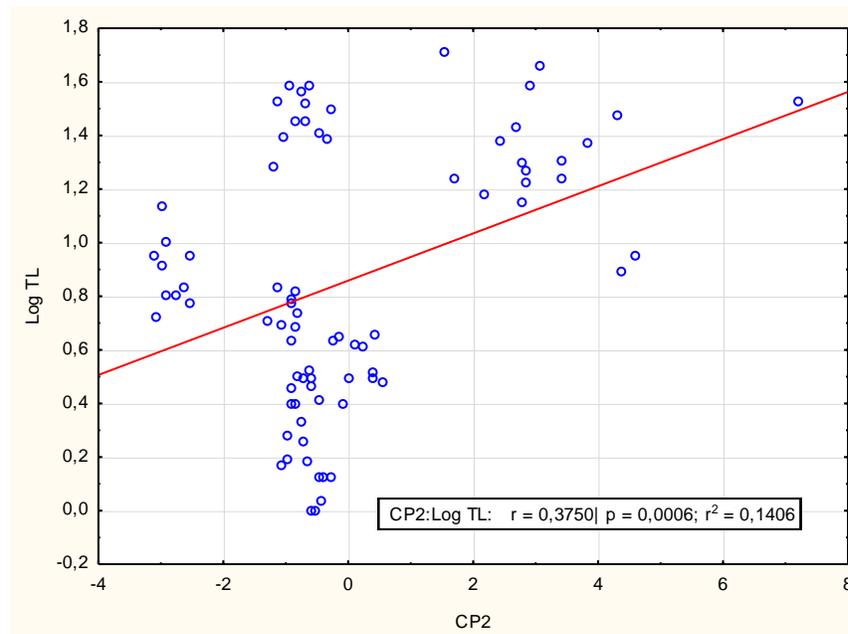


Figura 39. Relación de TL en función del CP2.

Ríos Martínez

De acuerdo con los resultados presentados anteriormente, el daño al ADN se presentó en mayor medida en los sitios impactados de Cedral, Cerro de San Pedro y Villa de la Paz (ver Cuadro 10), resultado de la biodisponibilidad y movilidad de metales y metaloides debido a las bajas concentraciones de MO, arcilla, un pH más ácido y alta conductividad eléctrica (ver Cuadro 9), cabe mencionar que el sitio impactado con mayores concentraciones de metales y metaloides fue Charcas seguido de Cedral, Cerro de San Pedro y Villa de la Paz. Sin embargo en Charcas se obtuvieron los mayores porcentajes de MO, arcilla, pH básicos y baja conductividad, lo cual ayuda a la retención de metales pesados en la fase sólida del suelo y con ello la disminución de la absorción de metales a las plantas, llevando a un menor daño al ADN.

CONCLUSIONES

Se determinaron las propiedades fisicoquímicas de los suelos y residuos mineros recolectados de las cuatro zonas mineras, en donde se observaron diferencias significativas entre los suelos y residuos mineros. La diferencia entre los sitios de referencia y los impactados se debe a las concentraciones de metales pesados como Cr, Mn, Ni, Cu, Zn, Cd, Hg, Pb, Fe, Co, Mo y metaloides como el As y B. El orden decreciente del porcentaje de MO en los sitios impactados fue Charcas > Villa de la Paz > Cerro de San Pedro > Cedral; en la concentración de arcilla fue Charcas > Cerro de San Pedro > Cedral > Villa de la Paz; en el pH fue Cedral > Villa de la Paz > Charcas > Cerro de San Pedro y; en la CE fue Cerro de San Pedro > Charcas > Villa de la Paz = Cedral. En los sitios de referencia se observaron altas cantidades de MO, arcilla, pH básicos y baja CE, mostrando diferencias con respecto a su sitio impactado. Las propiedades fisicoquímicas indican la biodisponibilidad de metales pesados para las plantas, y por ello, es importante tomarlas en cuenta en la investigación de suelos contaminados con metales pesados.

Las concentraciones de los metales y metaloides analizados en las zonas mineras muestran diferencias significativas entre los sitios de referencia y los sitios impactados. Se determinaron que algunas concentraciones de metales (Ni, Zn, Pb, As, Cd, Hg, Cu) superan la Guías de Calidad Ambiental Canadiense y la regulación nacional, la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004 de uso residencial o agrícola. En el sitio impactado de Charcas, donde no se registran estudios previos, se mostraron las más altas concentraciones de Cr, Cu, Zn, Cd, Hg, Pb, Fe, Co y B. En el sitio impactado Cedral se mostró altas concentraciones de Mn y Mo al compararlo con las demás zonas impactadas. En Cerro de San Pedro se encontraron altas concentraciones de Ni; y en Villa de la Paz de As. Cabe mencionar que estos sitios han tenido actividad minera desde hace más de 200 años, lo cual ha provocado la liberación en extensas áreas de metales y metaloides, los cuales provocan

contaminación ambiental capaz de alterar a los ecosistemas que se encuentran en áreas circundantes a estos residuos.

Con base en los resultados obtenidos en la realización de tratamientos de AsNaO_2 se puede decir que se comprobó la sensibilidad y factibilidad del ensayo cometa en las células meristemáticas de raíces de *Vicia faba*, debido a que el daño al ADN (número y longitud de cometas) encontrado en estas células se puede relacionar con el aumento en las concentraciones de AsNaO_2 , ya que se observó un incremento en la migración del ADN conforme aumentaba la concentración de AsNaO_2 . En diversos estudios se comprobó que *Vicia faba* es un buen bioindicador debido a que responde a diferentes concentraciones de agentes genotóxicos, se ha visto que esta especie es sensible en la detección de genotoxicidad de agentes ambientales y que puede servir como primera alerta de la presencia de peligros ambientales en agua, aire y suelo.

En cuanto a la genotoxicidad de las muestras recolectadas con núcleos de células de raíz de *Vicia faba*, se observaron diferencias entre los sitios de referencia y los impactados, encontrando un mayor daño al ADN en estos últimos. Se mostró un mayor daño al ADN en Cedral, Cerro de San Pedro y Villa de la Paz con respecto a Charcas, en los sitios impactados. Se encontró que no existen muchos estudios en donde se evalué la genotoxicidad de residuos mineros a través de células de *Vicia faba*, casi todos los estudios realizados son a concentraciones conocidas de algún tipo de metal (As, Cr, Cd) que se sabe que causa daño al ADN. En el presente estudio, además de evaluar la genotoxicidad de suelos y residuos mineros, se analizaron algunas variables que pudieran explicar la biodisponibilidad de metales a raíces de *Vicia faba*, es por ello que se optó por analizar los parámetros fisicoquímicos y las concentraciones de metales. La información encontrada dio indicios para conocer que pasa en los residuos mineros y la biodisponibilidad de metales. Se encontraron altas concentraciones de metales en el sitio impactado en Charcas, sin embargo fue el sitio con menor daño al ADN de los cuatro sitios, esto

Ríos Martínez

debido a que las concentraciones de MO y arcilla fueron altas, se obtuvieron pH básicos y una baja CE, lo cual nos indica que existen factores que ayudan a la retención de metales en el suelo y a una baja movilidad de los mismo, siendo estos menos absorbidos por las raíces de las plantas, y por lo tanto, causando un menor daño al ADN.

Por último se observó una asociación entre los metales tóxicos como el Pb, As, Hg, Zn, Cu con los sitios impactados de Cerro de San Pedro, Villa de la Paz y Cedral. Y por otro lado, en los sitios de referencia se encontró una asociación con la MO, arcilla Co, Mn, Fe y B, que son elementos esenciales para las plantas; además que la MO y la arcilla ayudan a la retención de metales en el suelo, por lo cual se da una relación de la baja absorción de metales tóxicos en los sitios de referencia causando un menor daño al ADN de las células meristemáticas de raíces de *Vicia faba*, las cuales tiene como función el crecimiento a través de la división celular para formar nuevos tejidos diferenciados en la planta.

RECOMENDACIONES

- Realizar evaluaciones de riesgo integral en las zonas afectadas, sobre todo en Charcas, debido a que no existen antecedentes de la contaminación por metales y metaloides en este sitio. Se debería realizar monitoreo a largo plazo con el fin de determinar si las altas concentraciones de estos metales podrían causar daños más graves a plantas, animales y humanos, así también para conocer hasta donde se ha dispersado la contaminación y que estrategias se pueden emplear para disminuir los efectos en la biota y en los humanos.
- Realizar una estandarización previa de la técnica ensayo cometa para no provocar daño al ADN por luz, concentraciones de soluciones, tiempos de desenrollamiento o electroforesis elevados. Para el presente estudio se realizaron diversas modificaciones en la técnica tales como en los tiempos de desenrollamiento, electroforesis, las concentraciones de agarosa regular y de bajo punto de fusión, tipos de corte de las raíces, entre otros.
- Aumentar el tamaño de las muestras, incluir un tipo de cultivo de los lugares afectados, y llevar a cabo un monitoreo en plantas a distintas distancias del lugar impactado.

BIBLIOGRAFÍA

Abele D., Vázquez Medina J.P., Zenteno Savín T. 2011. Oxidative stress in aquatic ecosystems. Ed. Wiley-Blackwell.

Argemi F., Cianni N., Porta A. 2005. Disrupción endocrina: perspectivas ambientales y salud pública. *Acta bioquím. clín. latinoam.* 39(3):291-300.

Arya S.K., Basu A., Mukherjee A. 2013. Lead induced genotoxicity and cytotoxicity in root cells of *Allium cepa* and *Vicia faba*. *Nucleus.* 56(3):183-189

Arya S.K. y Mukherjee. 2014. Sensitivity of *Allium cepa* and *Vicia faba* towards cadmium toxicity. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition.* 14(2): 447-458

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 2005a. Níquel (Nickel). División de Toxicología ToxFAQs. CAS#7440-02-0. Disponible en Línea: https://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts15.pdf

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 2005b. Toxicological profile for Zinc. Disponible en Línea: <http://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp60.pdf>

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 2016c. Resúmenes de Salud Pública- Cadmio (Cadmium). Disponible en Línea: http://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs5.html

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 2016a. Resúmenes de Salud Pública- Cromo (Chromium). Disponible en Línea: http://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs7.html

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 2016b. Resúmenes de Salud Pública- Cobre (Copper). Disponible en Línea: http://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs132.html

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 2016c. Resúmenes de salud pública-Cadmio. Disponible en línea: http://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs5.html

Austruy A., Wanat N., Moussard C., Vernay P., Joussein E., Ledoigt G., Hitmi A. 2013. Physiological impacts of soil pollution and arsenic uptake in three

plant species: *Agrostis capillaris*, *Solanum nigrum* and *Vicia faba*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 90:28-34

Bagatini M.D., Fachinetto J.M., Silva A.C.F., Tedesco S.B. (2009). Cytotoxic effects of infusions (tea) of *Solidago microglossa* DC. (Asteraceae) on the cell cycle of *Allium cepa*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 19(2B): 632-636

Balderas-Plata M.A., Cajuste L.J., Lugo de la Fuente J.A., Vázquez-Alarcon A. (2003). Suelos agrícolas contaminados por metales pesados provenientes de depósitos de vehículos de desecho. *Terra Latinoamericana*. 21(4):449-459

Bandyopadhyay A. y Mukherjee A. (2011). Sensitivity of *Allium* and *Nicotiana* in cellular and acellular comet assays to assess differential genotoxicity of direct and indirect acting mutagens. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 74(4):860-865

Bannon D.I., Drexler J.W. Fent G.M., Casteel A.W. Hunter P.J., Brattin W.J., Major M. 2009. Evaluation of Small Arms Range Soils for Metal Contamination and Lead Bioavailability. *Environmental Sci Technol*. 43 (24), 9071-9076.

Barbazán M. 1998. Análisis de plantas y síntomas visuales de deficiencia de nutrientes. Universidad de la República Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía.

Basta N.T., Ryan J.A., and Chaney L. 2005. Trace element chemistry in residual treated soil: Key concepts and metal bioavailability. *J. Environ. Qual*. 34:49-63

Béraud E., Cotelle S., Leroy P. Féraud J.F. 2007. Genotoxic effects and induction of phytochelatins in the presence of cadmium in *Vicia faba* roots. *Mutation Research*. 633:112-116

Boccia P., Meconi C., Mecozzi M., Sturchio E. 2013. Molecular modifications induced by inorganic arsenic in *Vicia faba* investigated by FTIR, FTNIR spectroscopy and genotoxicity testing. *J Toxicol Environ Health A*. 76(4-5):281-90.

Boojar M.M.A., Goodarzi F. 2007. The copper tolerance strategies and the role of antioxidative enzymes in three plant species grown on copper mine. *Chemosphere* 67(11): 2138-2147.

Boularbah A., Schwartz C., Bitton G., Aboudrar W., Ouhammou A., Louis Morel J. 2006. Heavy metal contamination from mining sites in South Morocco; 2. Assessment of metal accumulation and toxicity in plants. *Chemosphere*. 63(5):811-817.

Canadian Environmental Quality Guidelines, 2007. Canadian Soil Quality Guidelines for the Protection of Environmental and Human Health. Disponible en Línea:

http://www.esdat.net/Environmental%20Standards/Canada/SOIL/rev_soil_summary_tbl_7.0_e.pdf

Cañas Navarro M.A., Carreón Abud Y., Martínez Trujillo M. 2012. Evaluación de la toxicidad ocasionada por el exceso de micronutrientes en plantas de *Arabidopsis thaliana*. *Biológicas*. 14(1):30-36

Carballo M.A., Cortada C.M., Gadano A.B. 2005. Riesgos y Beneficios en el consumo de plantas medicinales. *Theoria*. 14(2):95-108

Carbonell Barrachina A.A., Burló Carbonell F.M., Mataix Beneyto J.J. 1995. Arsénico en el Sistema suelo-planta. Significado Ambiental. *Espagráfic*. España. Disponible en línea:

<http://publicaciones.ua.es/filespubli/pdf/LD8479081929819613.pdf>

Casierra-Posada y Poveda J. 2005. La toxicidad por exceso de Mn y Zn disminuye la producción de materia seca, los pigmentos foliares y la calidad del fruto en fresa (*Fragaria sp. cv. Camarosa*). *Agronomía Colombiana*. 23(2):283-289

Chakraborty R., Mukherjee A.K., Mukherjee A. 2009. Evaluation of genotoxicity of coal fly ash in *Allium cepa* root cells by combining comet assay with the Allium test. *Environ Monit Assess*. 153(1-4):351-357 Doi: 10.1007/s10661-008-0361-z

Chávez Toledo C. 2012. Evaluación de riesgos ambientales para sitios mineros: caso del distrito minero Santa María de la Paz. Tesis de Maestría.

Programa Multidisciplinario de Posgrado en Ciencias Ambientales. Universidad Autónoma de San Luis Potosí

Chehregani A., Malayeri B., Golmohammadi R. 2005. Effect of heavy metals on the developmental stages of ovules and embryonic sac in: *Euphorbia cheirandenia*. *Pakistan J. Biol. Sci.* 8(4):622-625.

Chen S. 2003. Effects of heavy metals on plants and resistance mechanisms. *Heavy metal pollution in China*. 10(4):256-264

Collins A.R. 2004. The comet assay for DNA damage and repair. Principles, applications and limitations. *Molecular Biotechnology*. 26(3):249-261

Collins A.R. y Horváthová E. 2001. Oxidative DNA damage, antioxidants and DNA repair: applications of the comet assay. *Biochemical Society Transactions*. 29:337–341.

Collins C.D. y Finnegan. 2010. Modeling the Plant Uptake of Organic Chemicals, Including the Soil–Air–Plant Pathway. *Environmental Science & Technology*. 44(3): 998-1003

Combs S.M. y Nathan M.V. 2010. Soil organic matter. En: Brown J.R. ed. Recommended chemical soil test procedures of the North Central Region. Missouri Agricultural Experiment station SB1001. 53 pp

Coordinación Estatal para el Fortalecimiento Institucional de los Municipios (CEFIM). 2012. Villa de la Paz, S.L.P., Monografías de los municipios de México, San Luis Potosí., pp.31

Corrales Pérez D. y Martín Romero F. 2013. Evaluación de la peligrosidad de jales de zonas mineras de Nicaragua y México y alternativas de solución. Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana. Vol. 65, Núm. 3, 427-446 pp

Cruz-Guzmán A.M. 2007. La contaminación de suelos y aguas: su prevención con nuevas sustancias naturales. Universidad de Sevilla. España. 54 pp

Cuevas Díaz M.C., Espinosa Reyes G., Ilizaliturri Hernández C., Mendoza Cantú A. 2012. Evaluación de la toxicidad de los suelos mediante bioensayos con semillas. En: Métodos ecotoxicológicos para la evaluación de suelos contaminados con hidrocarburos. México. ISBN: 978-607-790-862-3

Ríos Martínez

Delgadillo-López A.E., González-Ramrez C.A., Prieto-García F., Villagómez-Ibarra J.R., Acevedo-Sandoval O. 2011. Fitorremediación: una alternativa para eliminar la contaminación. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 14:597-612

Demirevska-Kepova K., Simova-Stoilova L., Stoyanova Z., Holzer R., Feller U. 2004. Biochemical changes in barley plants after excessive supply of copper and manganese. *Environ Exp Bot* 52:253–266

Dhyevre A., Foltete A.S., Aran D., Muller S., Cotelte S. 2014. Effects of soil pH on the *Vicia*-micronucleus genotoxicity assay. *Mutation Research* 774:17–21

Dhawan A., Bajpayee M., Parmar D. 2009. Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell Biol Toxicol*. 25:5–32

Díaz Báez M.C., Bustos López M.C., Espinosa Ramirez A.J. 2004. Pruebas de toxicidad acuática: fundamentos y métodos. 1ra Ed. Universidad Nacional de Colombia, unibiblos. Bogotá, Colombia. pp. 42

Dirección General de Educación en Ciencia y Tecnología del Mar (DGE CyTM). 2009. Ejecución de bioensayos y asistencia en estudios de impacto ambiental. Disponible en línea:

http://uecytm.sep.gob.mx/work/models/dgecytm/Resource/313/1/images/laboratorista_amb_modulo_v.pdf

Duquesnoy I., Champeu G.M., Evray G., Ledoigt G., Piquet-Pissaloux A. 2010. Enzymatic adaptations to arsenic-induced oxidative stress in *Zea mays* and genotoxic effect of arsenic in root tips of *Vicia faba* and *Zea mays*. *C.R. Biologies*. 333:814-824

Ebbs S.D. y Kochian L.V. 1997. Toxicity of zinc and copper to Brassica species: implications for phytoremediation. *J Environ Qual* 26:776–781

Enciclopedia Columbia. 2012. Importance of plants. 6ta ed. Columbia University Press.

Espinosa-Reyes G., González-Mille D.J., Ilizaliturri-Hernández C.A., Mejía-Saavedra J., Cilia-López V.G., Costilla-Salazar R., Díaz-Barriga F. 2014. Effect of Mining Activities in Biotic Communities of Villa de la Paz, San Luis Potosi, Mexico.

BioMed Research International. Vol. 2014, Article ID 165046, 13 pages, 2014.
doi:10.1155/2014/165046

Fayiga A.O., Ma L.Q., Cao X., y Rathinasabapathi B. 2004. Effects of heavy metals on growth and arsenic accumulation in the arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. *Environ. Pollut.* 132(2):289-296.

Firbas Peter. (2011). Use of genotoxicity *Allium* anaphase-telophase genotoxicity assay with common onion (*Allium cepa* L.) grown in taken water samples. Laboratory of plant cytogenetics.

Fernandes J.C., Henriques F.S. 1991. Biochemical, physiological, and structural effects of excess copper in plants. *Bot. Rev.* 57(3): 246-273

Fernández L.C., Rojas N.G., Roldán T.G., Ramirez M.E., Zegarra H.G., Uribe R., Reyes Ávila R.J., Flores D., Arce J.M. 2006. Análisis físicos y químicos en suelo. En: Manual de técnicas de análisis suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados. Disponible en línea:

http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/consultaPublicacion.html?id_pub=509

Flores-Ramírez R., Rico-Escobar E., Núñez-Monreal J.E., García-Nieto E., Carrizales L., Ilizaliturri-Hernández C., Díaz-Barriga F. 2012. Exposición infantil al plomo en sitios contaminados. *Salud Pública Méx.* 54(4):383-392

Fontes R.L.S. y Cox F.R. 1998. Zinc toxicity in soybean grown at high iron concentration in nutrient solution. *J Plant Nutri* 21(8):1723–1730

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Las plantas. En *Ecología y enseñanza rural*. Disponible en Línea: <http://www.fao.org/docrep/006/w1309s/w1309s00.htm#TopOfPage>

Furini A. (2012). *Plants and heavy metals*. Springer Briefs in Molecular Science.

Gaete H., Hidalgo M.E., Neaman A., Ávila G. 2010. Evaluación de la toxicidad de cobre en suelos a través de biomarcadores de estrés oxidativo en *Eisenia foetida*. *Quim. Nova.* 33(3):566-571

Gamiño-Gutiérrez S.P., González-Pérez C.I., Gonsebatt M.E. Monroy-Fernández M.G. (2013). Arsenic and lead contamination in urban soils of Villa de la

Ríos Martínez

Paz (Mexico) affected by historical mine wastes and its effects on children's health studied by micronucleated exfoliated cells assay. *Environ Geochem Health*. 35:37-51

Garfias y Ayala J. y Barojas Weber L. 1997. Residuos Peligrosos en México. En: Los residuos en la minería mexicana. 1ra ed. México. Disponible en línea: http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/35/los_residuos.html

Gaytán Oyarzún J.C. 2006. Evaluación ecotoxicológica del estradiol y sus metabolitos primarios liberados al ambiente, a través de la actividad ganadera. **Tesis de doctorado**. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería. Disponible en línea: http://www.uaeh.edu.mx/nuestro_alumnado/icbi/doctorado/documentos/Evaluacion%20ecotoxicologica.pdf

Geremias R., Bortolotto T., Wilhelm-Filho D., Curi Pedrosa R., Tadeu de Fávere V. (2012). Efficacy assessment of acid mine drainage treatment with coal mining waste using *Allium cepa* L. as a bioindicator. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 79:116-121

Gichner T., Znidar I., Száková J. 2008. Evaluation of DNA damage and mutagenicity induced by lead in tobacco plants. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 652(2):186–190

Greger M. 2004. Metal availability, uptake, transport and accumulation in plants. En: Heavy metal stress in plants. *Springer*. 1-27. DOI: 10.1007/978-3-662-07743-6

Groppa M.D., Zawoznik M.S., Tomaro M.L., Benavides M.P. 2008. Inhibition of root growth and polyamine metabolism in sunflower (*Helianthus annuus*) seedlings under cadmium and copper stress. *Biol. Trace Elem. Res.* 126: 246-256.

Gómez-Arroyo S., Armiena M.A., Cortés-Eslava J., Villalobos-Pietrini R. 1997. Sister chromatid exchanges in *Vicia faba* induced by arsenic-contaminated drinking water from Zimapan, Hidalgo, Mexico. *Mutation Research*. 394:1-7

González Mille, D.J.; Ilizaliturri Hernández, C.A.; Espinosa, R.G.; Costilla, S.R.; Díaz, B.F.; Ize, L.I.; Mejía, S.J. 2010. Exposure to persistent organic pollutants

(POPs) and DNA damage as an indicator of environmental stress in fish of different feeding habits of Coatzacoalcos, Veracruz, México. *Ecotoxicology*. 19:1238-1248

González Muñoz M.J., Mesequer Soler I., Mateos Vega C.J. 2009. Elementos ultratrazas ¿Nutrientes o tóxicos?. *Rev. Toxicol.* 26:93-103

Grandjean P., Brown S.S., Reavey P., Young, D.S. 1994. Biomarkers of chemical exposure: State of the art. *Clin Chem* 40(7):1360-1362.

Hall J.L. 2002. Cellular mechanism for heavy metal detoxification and tolerance. *J. Exp. Bot.* 53(366): 1-11.

Herrera Portugal, C., Franco Sánchez G., Pelayes Cruz M., Schlottfeldt Trujillo Y., Pérez Solís B.L. 2009. Daño al ADN en mujeres expuestas al humo de la leña en Chiapas, México. *Acta Toxicol. Argent.* 17 (2): 56-61.

Huerta Cantera H.E. 2010. Determinación de propiedades físicas y químicas de suelos con mercurio en la región de San Joaquín, Qro., y su relación con el crecimiento bacteriano. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Querétaro. Facultad de Ciencias Naturales. Lic. En Biología.

Instituto Nacional de Ecología (INE). 2012. Género, ambiente y contaminación por sustancias químicas. 1ra Ed. SEMARNAT. México.

Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC). 1994. Informe de la situación general en materia de equilibrio ecológico y protección al ambiente 1993-1994. En: Industria minera. Disponible en línea: http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/16/parte3_12.html

Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC). 2009. Metales pesados. Disponible en línea: <http://www.inecc.gob.mx/sqre-temas/763-aqre-metales>

Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). 2011. México en cifras. Villa de la Paz, S.L.P. Disponible en línea: <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/mexicocifras/default.aspx>

Instituto para el Federalismo y el Desarrollo Municipal (INAFED). 2010. Enciclopedia de los municipios y delegaciones de México. Estado de San Luis Potosí: Villa de la Paz, Cerro de San Pedro, Charcas, Cedral. Disponible en línea: <http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/index.html>

Jha A.N. 2008. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. *Mutagenesis*. 23 (3):207-221

Jiang W., Liu D., Liu X. 2001. Effects of copper on root growth, cell division, and nucleolus of *Zea mays*. *Biol. Plant*. 44(1): 105-109

Jones J.J.B. 2001. Laboratory guide for conducting soil test and plant analysis. CRC, vol 28-31. Washington DC. 151-155 pp

Juárez M., Cerdán M., Sánchez-Sánchez A. 2007. Hierro en el sistema suelo-planta. Dpto Agroquímica y Bioquímica. Facultad de Ciencias. Universidad de Alicante. Disponible en línea:

<http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/HIERRO.pdf>

Juárez-Santacruz L., García-Nieto E., García-Gallegos E., Romo-Gómez C., Ortiz-Ortiz E., Costilla-Salazar R., Luna-Zendejas H.S. 2015. DNA damage in *Vicia faba* by exposure to agricultural soils from Tlaxcala, Mexico. *Bull Environ Contam Toxicol*. 95:764-769

Kabata-Pendias A. 2011. Trace elements in soils and plants. Ed. CRC Press. 4ta ed. 534 pp

Kasim W.A. 2006. Changes induced by copper and cadmium stress in the anatomy and grain yield of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Int. J. Agric. Biol.* 8: 123-128.

Kaur P., Sharma N., Kumar M., Kaur S. 2014. Changes in growth and antioxidative enzyme activities in *Vicia faba* L. seedlings under chromium stress. *Ind J Plant Physiol*. 19(2):101-106

Ke W., Xiong Z., Xie M., Luo Q. 2007. Accumulation, subcellular localization and ecophysiological response to copper stress in two *Daucus carota* L. populations. *Plant Soil* 292: 291-304.

Kumaravel T.S., Vilhar B., Faux S.P., Jha A.N. 2007. Comet Assay measurements: a perspective. *Cell Biol Toxicol*. 25:53-64

Kumar R., Kumar M.R., Mishra V., Qidwai A., Pandey A., Kant S.S., Pandey M., Pathak A., Dikshit A. 2016. Detoxification and tolerance of heavy metals

in plants. En: Plant Metal Interaction. *Emerging Remediation Techniques*. 335-359
doi:10.1016/B978-0-12-803158-2.00013-8

Kvesitadze G., Khatisashvili G., Sadunishvili T., Ramsden J.J. 2006. The ecological importance of plants for contaminated environments. En Biochemical mechanisms of detoxification in higher plants. *Springer*

Kyrkby E. y Romheld V. 2007. Micronutrientes en la fisiología de las plantas: funciones, absorción y movilidad. Proceedings 543, *The International Fertilizer Society*, P. O. Box, York, YO32 5YS, United Kingdom.

Lee R.F. y Steinert S. 2003. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (Marine and freshwater) animals. *Mutations Research*. 544:43-64

Lequeux H., Hermans C, Lutts S., Verbruggen N. 2010. Response to copper excess in *Arabidopsis thaliana*: Impact on the root system architecture, hormone distribution, lignin accumulation and mineral profile. *Plant Physiol. Biochem.* 48(8): 673-682.

Lewin B. 1996. Genes. 2da Ed. Reverté. Madrid, España. pp. 497

López J. L. y López J. M. 1990. *El diagnóstico de suelos y plantas*. Ediciones Mundi-Prensa. España. 264 p.

Liman R., Hakkı Cigerci I., Akyıl D., Eren Y., Konuk M. 2011. Determination of genotoxicity of Fenaminosulf by *Allium* and Comet tests. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 99(1):61-64

Lin A., Zhang X., Chen M., Cao Q. 2007. Oxidative stress and DNA damages induced cadmium accumulation. *Journal of Environmental Sciences*. 19:596-602

Lin A., Zhu Y., Tong Y. 2005. Evaluation of genotoxicity of combined soil pollution by cadmium and imidacloprid. *Science in China Ser. C. Life Sciences*. 48:17-13

Liu D., Jiang W., Meng Q., Zou J., Gu J., Zeng M. 2009. Cytogenetical and ultrastructural effects of copper on root meristem cells of *Allium sativum* L. *Biocell* 33(1): 25-32

Liu T., Liu T., Zhu L., Wang J., Wang J., Xie H. 2015. The genotoxic and cytotoxic effects of 1-butyl-3-methylimidazolium chloride in soil on *Vicia faba* seedlings. *Journal of Hazardous Materials*. 285:27-36

Liu T., Zhu L., Wang J., Wang J., Tan M. 2016. Phytotoxicity of imidazolium-based ILs with different anions in soil on *Vicia faba* seedlings and the influence of anions on toxicity. *Chemosphere*. 145:269-276

López-Bucio J., Nieto-Jacobo M.F., Ramírez-Rodríguez V., Herrera-Estrella L. 2000. Organic acid metabolism in plants: from adaptative physiology to transgenic varieties for cultivation in extreme soils. *Plant Sci*. 160(1): 1-13.

Ma Te-Hsiu. 1999. The international program on plant bioassays and the report of the follow-up study after the hands-on workshop in China. *Mutation Research*. 426:103-106

Macnicol R.D. y Beckett P.H.T. 1985. Critical tissue concentrations of potentially toxic elements. *Plant Soil*. 85:107-129

Maksymiec W. 1998. Effect of copper on cellular processes in higher plants. *Photosynthetica* 34(3): 321-342.

Marengo Santiago J.I. 2008. Evaluación de plantas con potencial fitorremediador de hidrocarburos aromáticos policíclicos de la ciénaga las cucharillas. Tesis de Maestría. Universidad metropolitana San Juan, Puerto Rico.

Marin A.R., Masscheleyn P.H., Patrick W.H. 1992. The influence of chemical form and concentration of arsenic on rice growth and tissue arsenic concentration. *Plant and Soil*. 139:175-183

Martínez Chaves P.A., Betancourt Mendieta A., Nicolás Caretta M., Aguilar Robledo M. 2010. Procesos históricos y ambientales en Cerro de San Pedro, San Luis Potosí, México, 1948-1997. *Región y sociedad*. 22(48): 211-241

Martínez-Toledo A., Montes-Rocha A., González-Mille D.J., Espinosa-Reyes G., Torres-Dosal A., Mejía-Saavedra J.J., Ilizaliturri-Hernández C.A. 2016. Evaluation of enzyme activities in long-term polluted soils with mine tailing deposits of San Luis Potosi, Mexico. *J SoilsSediments*. DOI 10.1007/s11368-016-1529-8

Mauser W. y Prasch M. 2006. Soil Texture. En: Regional assessment of global change impacts. *Springer*

McKelvey Martin V.J., Ho E.T.S., McKeown S.R., Johnston S.R., McCarthy P.J., Rajab N.F., Downes C.S. 1998. Emerging applications of the single cell gel electrophoresis (Comet) assay. I. Management of invasive transitional cell human bladder carcinoma. II. Fluorescent in situ hybridization Comets for the identification of damaged and repaired DNA sequences in individual cells. *Mutagenesis*. 13:1-8.

Meharg A.A., Macnair M. R. 1992. Suppression of the high affinity phosphate uptake system; a mechanism of arsenate tolerance in *Holcus lanatus* L. *J Exp Bot* 43(519):519–524

Mejía J., Carrizalez L., Rodriguez V.M., Jiménez-Capdeville M.E., Díaz-Barriga F. (1999). Un método para la evaluación de riesgos para la salud en zonas mineras. *Salud Pública Mex.* 41(2):S132-S140

Mendoza Benítez I., Rosa Álvarez M.G., Cruz Jiménez G. 2008. Identificación de especies vegetales relacionadas con jales mineros del Distrito Minero de Guanajuato. *Biológicas*. 10.94-99

Metson A.J., Blakemore L.C., Rhoades D.A. 1979. Methods for the determination of soil organic carbon review and application to New Zealand soils. *New Zeal J Sci* 22:205-228

Moller P. 2005. Genotoxicity of environmental agents assessed by the alkaline Comet assay. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 96:1–42.

Monroy M., Díaz-Barriga F., Razo I., Carrizalez L. 2002. Evaluación de la contaminación por arsénico y metales pesados (Pb, Cu, Zn) y análisis de riesgo en salud en Villa de la Paz-Matehuala, S.L.P. Nota Informativa. Instituto de Metalurgia, U.A.S.L.P.

Morais Leme D. y Marin-Morales M.A. (2009). Allium cepa test in environmental monitoring: A review on its application. *Mutation Research*. Review 682(1):71-81

Moreira M.M. 2009. Aplicación y selección de indicadores de calidad ecológica en la utilización de fertilizantes orgánicos para la producción de forraje.

Tesis de doctorado. Universidad de Santiago de Compostela. Departamento de Biología Celular y Ecología.

Moreno D.A., Vllora G., Hernández J., Castilla N., Romero. 2002. Accumulation of Zn, Cd, Cu, and Pb in Chinese cabbage as influenced by climatic conditions under protected cultivation. *J Agric Food Chem.* 50(7):1964-9.

Moreno Tovar R., Barbanson L., Coreño Alonso O. 2009. Neoformación mineralógica en residuos mineros (jales) del distrito minero Zimapán estado de Hidalgo, México. *Minería y Geología.* 25(2):1-31

Moreno Tovar R., Téllez Hernández J., Monroy Fernández M.G. 2012. Influencia de los minerales de los jales en la bioaccesibilidad de arsénico, plomo, zinc y cadmio en el Distrito Minero Zimapán, México. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 28(3):203-218

Muñiz Ugarte O., Rodríguez Alfaro M., Montero Álvarez A., Estévez Álvarez J., Aguiar Accioly A.M., Araujo Do Nascimento C.W. 2015. El níquel en suelos y plantas de Cuba. *Cult. Trop.* 36(1): 25-33

Murphy A.S., Eisinger W.R., Shaff J.E., Kochian L.V., Taiz L. 1999 Early copper-induced leakage of K⁺ from Arabidopsis seedlings is mediated by ion channels and coupled to citrate efflux. *Plant Physiol.* 121: 1375-1382.

Nagajyoti P.C., Lee K.D., Sreekanth T.V.M. 2010. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environ Chem Lett.* 8:199-216

Navarro A., Mendoza J.L. Doménech L.M. s.f. Movilización de Hg en suelos contaminados por actividades mineras. Universidad Politécnica de Cataluña. 1-10 pp

Nedelkoska T.V. y Doran P.M. 2000. Characteristics of heavy metal uptake by plant species with potential for phytoremediation and phytomining. *Miner. Eng.* 13(5):549–561.

National Oceanic Atmospheric Administration (NOAA). 2016. Office of Response and Restoration. SQuiRT Cards. Disponible en línea: <http://response.restoration.noaa.gov/environmental-restoration/environmental-assessment-tools/squirt-cards.html>

Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000. Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudio, muestreo y análisis. Disponible en línea:

<http://biblioteca.semarnat.gob.mx/janium/Documentos/Ciga/libros2009/DO2280n.pdf>

Ojekunle O.Z., Ojekunle O.V., Adeyemi A.A., Taiwo A.G., Sangowusi O.R., Taiwo A.M. Adekitan A.A. 2016. Evaluation of surface water quality indices and ecological risk assessment for heavy metals in scrap yard neighbourhood. *SpringerPlus*. 5(560):1-16

Olea N., Fernández M.F., Araque P., Olea Serrano F. 2002. Perspectivas en disrupción endocrina. *Gac Sanit*. 16(3):650-656.

Olivares Y., Gaete H., Neaman A. 2015. Evaluación de la fitotoxicidad y la genotoxicidad de suelos agrícolas de zonas con actividades mineras de cobre de la cuenca del río Aconcagua (Chile central). *Rev. Int. Contam. Ambient*. 31(3):237-243

Olive P.L. 1999. DNA damage and repair in individual cells: applications of the comet assay in radiobiology. *Int J Radiat Biol*. 75(4):395–405.

Oliveira Prendes J.A., Afif Khouri E., Mayor López M. 2006. Análisis de suelos y plantas y recomendaciones de abonado. Universidad de Oviedo. 159 pp

Olguín E.J., Hernández M.E. Sánchez Galván G. 2007. Contaminación de manglares por hidrocarburos y estrategias de biorremediación, fitorremediación y restauración. *Rev. Int. Contam. Ambient*. 23 (3): 139-154

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). 2009. Guía para la descripción de suelos. 4ta. Ed. Disponible en línea: <http://www.fao.org/3/a-a0541s.pdf>

Organización Mundial de la Salud (OMS). 2016. Intoxicación por plomo y salud. Nota descriptiva. Disponible en línea:

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs379/es/>

Ortega A.E. y Malavolta E. 2012. Los más recientes micronutrientes vegetales. Nota informativa. Disponible en línea: [http://www.ipni.net/publication/ia-lacs.nsf/0/232B901BB70122F985257A80005228D7/\\$FILE/16.pdf](http://www.ipni.net/publication/ia-lacs.nsf/0/232B901BB70122F985257A80005228D7/$FILE/16.pdf)

Ortega Morales N.B. 2012. Asociación entre la fracción bioaccesible y la bioacumulación en algunas especies vegetales que crecen en el cauce del arroyo de San Pedro. Tesis de Maestría. Programa Multidisciplinario de Posgrado en Ciencias Ambientales. Universidad Autónoma de San Luis Potosí

Paivoke H. 1983. The short-term effect of zinc on growth, anatomy and acid phosphate activity of pea seedlings. *Ann Bot Fennici* 20(2):197-203

Pasternak T., Rudas V., Potters G., Jansen M.A.K. 2005. Morphogenic effects of abiotic stress: reorientation of growth in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Env. Exp. Bot.* 53(3): 299-314.

Patra M., Bhowmik N., Bandopadhyay B., Sharma A. 2004. Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance. *Environmental and Experimental Botany.* 52:199-223

Pentreath V., González E., Barquín M, Ríos SM, Perales S. 2015. Bioensayo de toxicidad aguda con plantas nativas para evaluar un derrame de petróleo. *Rev. salud ambient.* 15(1):4-12.

Pitozzi V., Giovannelli L., Bardini G., Rotella C. M., Dolara P. 2003. Oxidative DNA damage in peripheral blood cells in type 2 diabetes mellitus: higher vulnerability of polymorphonuclear leukocytes. *Mutation Research.* 529 (1-2):123-129

Posada M.I. y Arroyave M.P. 2006. Efectos del mercurio sobre algunas plantas acuáticas tropicales. *Rev. EIA. Esc. Ing. Antioq.* 6:57-67

Pourrut B., Shahid M., Dumat C., Winterton P., Pinelli E. 2011a. Lead uptake, toxicity and detoxification in plants. *Rev Environ Contam Toxicol.* DOI 10.1007/978-1-4419-9860-6_4

Pourrut B., Jean S., Silvestre J., Pinelli E. 2011b. Lead-induced DNA damage in *Vicia faba* root cells: potential involvement of oxidative stress. *Mutation Research.* 726(2):123-128

Pourrut B., Pinelli E., Mendiola V.C., Silvestre J., Douay F. 2015. Recommendations for increasing alkaline comet assay reliability in plants. *Mutagenesis.* 30(1):37-43

Prieto García F., Lechuga Vargas M.A., Méndez Marzo M.A., Barrado Esteban E., Gaytán Oyarzún J.C. 2006. Daños tóxicos en tejidos vegetales, producidos por aguas contaminadas con arsénico en Zimapán, Hidalgo, México. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 26(1):94-97

Puga S., Sosa M., Lebgue T., Quintana C., Campos A. 2006. Contaminación por metales pesados en suelo provocada por la industria minera. *Ecología Aplicada.* 5(1,2):1-7

Qun D.C. Y Xiao W.H. 1995. Cytogenetic toxic effects of heavy metals on *Vicia faba* and studies into the *Vicia* micronucleus. *Acta Bot. Sin.*, 37:14–24

Raven P.H., Evert R.F., Eichhorn S.E. 1992. Biología de las plantas. Ed. Reverté. 4ta, ed. España. 539

Razo I., Carrizalez L., Castro-Larragoitia J., Díaz-Barriga F., Monroy M. (2004). Arsenic and heavy metal pollution of soil, wáter and sediments in a semi-arid. climate minig area in Mexico. *Water, Air and Soil Pollution.* 152:129-152

Razo I., Díaz-Barriga F., Castro J., Monroy M. 2006. Environmental geochemistry studies and health risk assessment to identify priority areas for remediation of polluted soils in the Santa Maria de la Paz (S.L.P., Mexico) mining district. *Chinese Journal Geochemistry.* 21(1):61

Repetto, M. 1997. Toxicología fundamental. 3ra Ed. Díaz de Santos. Madrid, España. pp. 327

Reyes Guzmán M. y Barreto L. 2010. Efecto de la materia orgánica del suelo en la retención de contaminantes. *Rev. Épsilon.* 16:31-45

Riechaman M.S. 2002. The responses of plants to metals toxicity: A review focusing on copper, manganese and zinc. *Australian Minerals and Energy Environment Foundation* 54p.

Rieuwerts J.S., Thonton I., Farago M.E, Ashmore M.R. 1998. Factors influencing metals bioavailability in soils: preliminary investigations for the development of a critical loads approach for metals. *Chemical Speciation and Bioavailability*, 10(2): 61- 75.

Rodríguez y Rodríguez Y. 2011. Evaluación de la contaminación por metales en pasivos ambientales de actividades metalúrgicas históricas en el distrito minero cerro de san pedro, S.L.P (México). Tesis de Maestría. Programa Multidisciplinario de Posgrado en Ciencias Ambientales. Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

Rodríguez Y.A., Fontanetti C.S., Christofolletti C.A., Díaz-Llera S.C. 2015. Aplicaciones del Ensayo Cometa en Genética Ecotoxicológica. *Rev CENIC*. Vol. 46, Núm. 1. Versión en electrónico ISSN: 2221-2450

Rojas-Rodríguez J., 2011. El papel de la minería en la configuración territorial y la problemática socio-ambiental del municipio de cerro de san pedro en el estado de San Luis Potosí. UNAM, Facultad de Economía. Especialización en economía ambiental y ecológica.

Rucińska R., Sobkowiak R., Gwozdz E.A. 2004. Genotoxicity of lead in lupin root cells as evaluated by the comet assay. . *Cell Mol Biol Lett* 9(3):519–528

Ruda de Schenquer E.E., Mongiello A., Acosta A. 2004. Contaminación y salud del suelo. Ed. UNL. Argentina. pp. 39

Ruiz Huerta E.A. y Armienta Hernández M.A. 2012. Acumulación de arsénico y metales pesados en maíz en suelos cercanos a jales o residuos mineros. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 28(2):103-117

Russo M., Sgherri C., Izzo R., Navari-Izzo F. 2008. Brassica napus subjected to copper excess: Phospholipases C and D and glutathione system in signaling. *Env. Exp. Bot.* 62(3): 238-246

Saeki K, Okazaki M y Kubota M. 1993. Heavy metals in a semi-enclosed hypereutropic system: Lake Teganuma, Japan. *Water, Air and Soil Pollution.* 69:69-78

Saghirzadeh M., Gharaati M.R., Mohammadi Sh., Ghiassi-Nejad M. (2008). Evaluation of DNA damage in the root cells of *Allium cepa* seeds growing in soil of high background radiation areas of Ramsar-Iran. *Journal of Environmental Radioactivity.* 99(10):1698-1702

Sánchez-Crispín A., Carrascal E., Silicia Muñoz A. 1994. De la Minería al Turismo: Real de Catorce y Cerro de San Pedro, México. Una Interpretación Geográfico-Económica. *Revista Geografica*. 119:81-106

Sardas S., Yilmaz M., Oztok U., Cakir N., Karakaya A.E. 2001. Assessment of DNA strand breakage by comet assay in diabetic patients and the role of antioxidant supplementation. *Mutation Research/Toxicología Genética y Mutagénesis Ambiental*. 490 (2):123-129

Saucedo Plata E. 2014. Suelos contaminados con elementos potencialmente tóxicos. Un nuevo método de detección. Ed. Palibrio.

Silviera M.L.A., Alleoni L.R.F., Guilherme L.R.G.. 2003. Biosolids and heavy metals in soils. *Scientia Agricola* 60 (4): 793-806.

Secretaría de economía (SE). 2016. Minería. Disponible en línea: <http://www.gob.mx/se/acciones-y-programas/mineria>

Servicio Geológico Mexicano (SGM). 2007. Carta geológica-minera Charcas F14-A43, S.L.P. Disponible en línea: http://portal.sgm.gob.mx/cartas_geoquim/metadatos/geol50/Charcas%20F14-A43_Geol.html

Servicio Geológico Mexicano (SGM). 2011. Panorama minero del estado de San Luis Potosí. Disponible en línea: http://www.sgm.gob.mx/pdfs/SAN_LUIS_POTOSI.pdf

Setha C.S., Misra V., Chauhan L.K.S., Singh R.R. 2008. Genotoxicity of cadmium on root meristem cells of *Allium cepa*: cytogenetic and Comet assay approach. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 71(3):711-716

Shahid M., Pinelli E., Pourrut B., Silvestre J., Dumat C. 2011. Lead-induced genotoxicity to *Vicia faba* L. roots in relation with metal cell uptake and initial speciation. *Ecotoxicol Environ Saf* 74(1):78–84

Shahid M., Pinelli E., Dumat C. 2012. Review of Pb availability and toxicity to plants in relation with metal speciation; role of synthetic and natural organic ligands. *Journal of Hazardous Materials* 219-220: 1-12

- Shahid M., Pourrut B., Dumant C., Nadeem M., Aslam M., Pinelli E.** 2014. Heavy-metal-induced Reactive Oxygen Species: phytotoxicity and physicochemical changes in plants. En: Reviews of environmental contamination and toxicology. *Springer*. 232: 1-44
- Sharma P. y Dubey R.S.** 2005. Lead toxicity in plants. *Braz J Plant Physiol* 17(1):35–52
- Sharma S.S. y Dietz K.J.** 2006. The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. *J. Exp. Bot.* 57(4): 711-726.
- Sherameti I. y Varma A.** 2010. Soil heavy metals. *Soil Biology*. Vol 19. ISBN: 978-3-642-02436-8
- Simoniello M.F., Gigena F., Poletta G., Loteste A., Kleinsorge E., Campana M., Scagnetti J., Parma M.J.** 2009. Alkaline comet assay for genotoxic effect detection in neotropical fish *Prochilodus lineatus* (Pisces, Curimatidae). *Bull Environment Contam Toxicol.* 83:155-158
- Sistema Nacional de Información Municipal (SNIM).** 2010. Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal. Disponible en Línea: <http://www.snim.rami.gob.mx/>
- Song Y., Zhu L.S., Xie H., Wang J., Wang J.H., Liu W., Dong X.L.** 2009. Effects of atrazine on DNA damage and antioxidative enzymes in *Vicia faba*. *Environmental Toxicology and Chemistry.* 28(5):1059-1062
- Sotil G., Alvis R., Francia J.C., Shiga B.** 2007. Application of two biomarkers for the analysis of DNA lesions on marine bivalves. *Rev. peru. biol.* 13(3):249-253.
- Souza F.J., Dolder H. y Cortelazzo A.L.** 2005. Effect of excess cadmium and zinc ion son roots and shoots of maize seedlings. *J. Plant Nutr.* 28(11):1923-1931.
- Stadtman E.R., Oliver C.N.** 1991. Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences. *J Biol Chem* 266:2005–2008
- Stahl R. S. y James B. R.** 1991. Zinc sorption by B horizon soils a function of pH. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 55:1529-1597.

Taiz L. y Zeiger E. 2006. Fisiología vegetal. Universitat Jaume. 3ra ed. Vol I. pp. 118

Tice R.R., Agurell E., Andreson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu J.C., Sasaki F. 2000. Single cell gel/Comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mut.* 35:206-221.

Türkoğlu S. (2012). Determination of genotoxic effects of chlorfenvinphos and fenbuconazole in *Allium cepa* root cells by mitotic activity, chromosome aberration, DNA content, and comet assay. *Pesticide Biochemistry and Physiology.* 103(3):224-230

Tu S. y Ma L.Q. 2003. Interactive effects of pH, arsenic and phosphorus on uptake of As and P and growth of the arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. under hydroponic conditions. *Environmental and Experimental Botany.* 50:243-251

Universidad Autónoma de San Luis Potosí (UASLP). 2008. Opinión técnico-científica sobre los componentes ambientales del Proyecto Cerro de San Pedro de Minera San Xavier, Comisión de la UASLP para la revisión del Proyecto Cerro de San Pedro de Minera San Xavier. Publicado originalmente en: [up://www.slp.gob.mx](http://www.slp.gob.mx).

Usero J., González-Regalado E., Gracia I. 1997. Trace metals in the bivalve molluscs *Ruditapes decussatus* y *Ruditapes philippinarum* from the Atlantic coast of Southern Spain. *Environment International.* 23(3):291-298

Valencia-Quintana R., Gómez-Arroyo S., Waliszewski S.M., Sánchez-Alarcón J., Gómez-Olivares J.L., Flores-Márquez A.R., Cortes-Eslava J., Villalobos-Pietrini R. 2012. Evaluation of the genotoxic potential of dimethyl sulfoxide (DMSO) in meristematic cells of the root of *Vicia faba*. *Toxicol. Environ. Health. Sci.* 4(3):154-160

Vázquez Botello A., Rendón von Osten J., Gold Bouchot G., Agraz Hernández C. 2005. Golfo de México: contaminación e impacto ambiental: diagnóstico y tendencias. 2da Ed. Universidad J. Autónoma de Tabasco. pp. 121

Ríos Martínez

Villalba Atondo A.I., Catillo Alarcón J.M., Gómez Álvarez A., Pérez Villalba A.M., Nubes Ortiz G., Villalba Urquidy S., Salcido Esquer A. 2012. Contaminación del agua y suelo en el ecosistema Río Agua Prieta, Sonora, México. *Rev de Ciencias Biológicas y de la Salud*. 15(1):3-11

Volke Sepúlveda T., Velasco Trejo J.A., Rosa Pérez D.A. 2005. Suelos contaminados por metales y metaloides: muestreo y alternativas para su remediación. Instituto Nacional de Ecología.

Volke Sepúlveda T. y Velasco Trejo J.A. 2002. Tecnologías de remediación para suelos contaminados. En: Fuentes de contaminación en México. 1ra ed. México. Disponible en línea:

<http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/372/fuentes.html>

Wei Z., Xi B., Zhao Y., Wang S., Liu H., Jiang Y. 2007. Effect of inoculating microbes in municipal solid waste composting on characteristics of humic acid. *Chemosphere* 68(2):368–374.

World Health Organization (WHO). 2012. Arsenic. Disponible en línea: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs372/en/>

Yadav S.K., Juwarkar A.A., Kumar G.P., Thawale P.R., Singh S.K., Chakrabarti T. 2009. Bioaccumulation and phyto-translocation of arsenic, chromium and zinc by *Jatropha curcas* L.: impact of dairy sludge and biofertilizer. *Bioresour. Technol.* 100(20):4616-4622.

Yamada T. 2000. BORO: Se están aplicando las dosis suficientes para el adecuado desarrollo de las plantas?. *POTAFOS: Informacoes Agronómicas*. 90:1-5.

Yıldız M., Cigerci I.H., Konuk M., Fidan A.F., Terzi H. (2009). Determination of genotoxic effects of copper sulphate and cobalt chloride in *Allium cepa* root cells by chromosome aberration and comet assays. *Chemosphere*. 75(7):934-938

Zhao S., Liu Q., Qi Y., Duo L. 2010. Responses of root growth and protective enzymes to copper stress in turfgrass. *Acta Biol. Crac. Ser. Bot.* 52(2): 7-11.

Zhong Y., Feng S.L., Luo Y., Zhang G.D., Kong Z.M. 2001. Evaluating the genotoxicity of surface water of Yangzhong city using the *Vicia faba* micronucleus test and the comet assay. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 67:217-224

Ríos Martínez

Zitka O., Krystofova O., Hynek D., Sobrova P., Kaiser J., Sochor J., Zehnalek J., Babula P., Ferrol N., Kizek R., Adam V. 2013. Metal transporters in plants. En: Heavy metal stress in plants. Springer. 19-41 DOI 10.1007/978-3-642-38469-1

Zuluaga Quintero M., Valencia Ruiz A.M., Ortiz Trujillo I.C. 2009. Efecto genotóxico y mutagénico de contaminantes atmosféricos. *Medicina UPB*. 28:33-41

Zúñiga Venegas, L.A. “Optimizaciones metodológicas del ensayo del cometa y su aplicación en biomonitorización humana”. **Tesis doctoral**. Universidad Autónoma de Barcelona, Facultad de Biociencias. Octubre, 2009

ANEXO 1

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA ENSAYO COMETA

Preparación de agarosa regular al 0.8%

Se pesa 0.08 g de agarosa regular (Tipo II-A, SIGMA-ALDRICH) y se disuelve en 10 mL de agua desionizada. Para disolverla se utiliza el horno de microondas durante ocho segundos y se agita, este paso se repite hasta que se disuelva completamente. La agarosa se vierte en tubos de ensayo y se colocan en un baño húmedo a una temperatura de 50°C.

Recomendaciones.

- ❖ La agarosa debe de disolverse completamente, sin dejar residuos en suspensión por lo que debe de tener una tonalidad completamente transparente.
- ❖ Esta solución se debe preparar cada vez que se realice el ensayo.
- ❖ La agarosa no debe de hervir.
- ❖ No dejar que se solidifique.
- ❖ Se debe preparar el día de su uso

Preparación de agarosa bajo punto de fusión al 1%

Se pesan 0.1 g de agarosa de bajo punto de fusión (BioReagent, for molecular biology, SIGMA-ALDRICH) y se disuelven en 10 mL de agua desionizada. Para disolverla se utiliza el horno de microondas durante ocho segundos y se agita, este paso se repite hasta que se disuelva completamente. La agarosa se vierte en tubos de ensayo y se colocan en un baño húmedo a una temperatura de 37 °C.

Recomendaciones.

- ❖ La agarosa debe de disolverse completamente, sin dejar residuos en suspensión por lo que debe de tener una tonalidad completamente transparente.
- ❖ Esta solución se debe preparar cada vez que se realice el ensayo.
- ❖ La agarosa no debe de hervir.
- ❖ No dejar que se solidifique.
- ❖ Se debe preparar el día de su uso

Preparación de agarosa bajo punto de fusión al 0.5%

Se pesan 0.05 g de agarosa de bajo punto de fusión (BioReagent, for molecular biology, SIGMA-ALDRICH) y se disuelven en 10 mL de agua desionizada. Para disolverla se utiliza el horno de microondas durante 8 s y se agita, este paso se repite hasta que se disuelva completamente. La agarosa se vierte en tubos de ensayo y se colocan en un baño húmedo a una temperatura de 37 °C.

Recomendaciones.

- ❖ La agarosa debe de disolverse completamente, sin dejar residuos en suspensión por lo que debe de tener una tonalidad completamente transparente.
- ❖ Esta solución se debe preparar cada vez que se realice el ensayo.
- ❖ La agarosa no debe de hervir.
- ❖ No dejar que se solidifique.
- ❖ Se debe preparar el día de su uso.

Preparación de la solución amortiguadora para la electroforesis pH >13

❖ Solución madre de NaOH 10N

Se pesan 200 g de NaOH para disolverse en 500 mL de agua desionizada. La solución deberá prepararse en la campana de extracción, agregando las perlas de NaOH paulatinamente en un vaso de precipitado con agua desionizada hasta disolverse. Se afora en un matraz de 500 mL y se filtra con papel Whatman No.1 para su almacenaje en un frasco ámbar etiquetado, a 4°C.

❖ Solución madre de EDTA 200 mM pH 10

Se pesan 7.44 g de EDTA para disolverse en 100 mL de agua desionizada; cuando el reactivo este disuelto, se mide el pH, el cual debe de ser de 10. Para ajustar el pH, con una pipeta Pasteur se debe agregar gota a gota NaOH para elevar el valor de pH o en caso de que exceda el valor de 10, se deberá de aplicar HCl para ajustar el valor de pH. La solución se afora en un matraz de 100 mL y se filtra posteriormente con papel Whatman No. 1 para su almacenaje en un frasco ámbar debidamente etiquetado, a 4°C.

Finalmente, para preparar la solución amortiguadora para electroforesis se agregan 30 mL de la solución de NaOH 10 N, 5 mL de la solución de EDTA 200 mM y 950 mL de agua desionizada en un vaso de precipitado de 1 L. Posteriormente de mezclar con un agitador, se mide el pH, el cual debe tener un valor de 13 o mayor. Se ajusta el pH con NaOH 10 N o HCl concentrado si es necesario. Se afora la solución a 1000 mL y se filtra con papel Whatman No. 1 para su almacenaje en un frasco ámbar etiquetado, en el cuarto frío.

Recomendaciones.

- ❖ Hacer uso de un agitador magnético para facilitar la disolución de los reactivos.
- ❖ La solución se puede almacenar durante 30 días a 4°C.
- ❖ Almacenar en frasco ámbar
- ❖ Agregar paulatinamente el NaOH y el EDTA hasta disolverse.

- ❖ La solución de EDTA deberá de almacenarse en frío y protegerse de la luz.
- ❖ Se deberá calibrar el potenciómetro antes de las mediciones.
- ❖ La solución amortiguadora para electroforesis debe de permanecer fría para su utilización.
- ❖ Se puede utilizar las soluciones de hidróxido de sodio (NaOH, 10 N) y de EDTA (200 mM) para preparar posteriores soluciones de electroforesis.

Preparación de la solución de Tris-HCl 0.4 M pH 7.5

Se pesan 31.52 g de Tris-HCl para disolverse en 500 mL de agua desionizada. Posterior a la mezcla, se mide el pH, el cual deberá tener un valor de 7.5. Para ajustar el pH se utiliza la solución de NaOH 10 N o HCl concentrado. La solución se afora a 500 mL y se filtra con papel Whatman No. 1. Se almacena en un frasco ámbar debidamente etiquetado a 4 °C.

Recomendaciones.

- ❖ El Tris-HCl deberá agregarse de forma paulatina en un vaso de precipitado con agua desionizada hasta disolverse.
- ❖ La solución puede prepararse con la ayuda de una placa con agitador.
- ❖ Se debe calibrar el potenciómetro antes de realizar las mediciones.
- ❖ La solución deberá estar fría para su utilización.
- ❖ La solución se puede almacenar durante 30 días a 4°C

Preparación del amortiguador fosfato salino (PBS) pH 7.4

Para preparar 100 ml de amortiguador se requieren los siguientes reactivos:

Reactivo	Concentración	Cantidad
NaCl	137 mM	0.800g
Na ₂ HPO ₄	10 Mm	0.144g
KCl	2.7 mM	0.020g
KH ₂ PO ₄	2 mM	0.024g

Disolver todos los reactivos en 80 ml de agua desionizada, cuando se complete la disolución se ajusta el pH a 7.4 con HCl, posteriormente se afora a 100 ml. Se guarda en frasco ámbar a temperatura de 4 °C por un máximo de dos meses.

Preparación de la solución de trabajo de bromuro de etidio 0.05 mM

Para preparar la solución de stock se pesan 0.002 g de bromuro de etidio y se disuelven en 10 mL de agua desionizada. Se debe almacenar en frasco ámbar o en un tubo cónico de polipropileno cubierto con papel aluminio.

A partir de la solución anterior, se toma 1 mL y se disuelve en 9 mL de agua desionizada. La solución de trabajo de bromuro de etidio debe ser protegida de la luz, almacenándose en un frasco ámbar o en un tubo cónico de polipropileno cubierto con papel aluminio.

Recomendaciones.

- Se deben de usar guantes de nitrilo para la manipulación del bromuro de etidio.
- Evitar el contacto del bromuro de etidio con la piel.
- Mantener protegida de la luz la solución de bromuro de etidio.

- Usar mascarilla industrial con filtros al momento de manipular el bromuro de etidio, debido a que es altamente cancerígeno, y su principal vía de exposición es la inhalatoria.

Preparación de camas de electroforesis.

Se limpian portaobjetos esmerilados con trozos de papel en forma de cuadros y se colocan en una charola forrada de aluminio para ser rotuladas por la parte esmerilada para su identificación.

A cada portaobjeto se le colocan 100 μ L de agarosa regular al 0.8% y se distribuye uniformemente a lo largo de éste, se colocan en charolas y se secan de 60 a 70°C durante 10 minutos. Al estar secas las camas de electroforesis se almacenan en cajas porta-laminillas.

Recomendaciones:

- ❖ Lavarse las manos con jabón antes de hacer las camas de electroforesis y dejar secar a temperatura ambiente.
- ❖ Se debe de cubrir uniformemente la agarosa regular a lo largo de cada portaobjetos.
- ❖ No dejar residuos del papel en los portaobjetos esmerilados.
- ❖ No usar las camas de electroforesis después de un mes.