



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

CENTRO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS

**IDENTIFICACIÓN DE PLANTAS DE LAS ZONAS MINERAS DEL
ESTADO DE HIDALGO CON POTENCIAL PARA
FITORREMEDIACIÓN**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN QUÍMICA

PRESENTA:

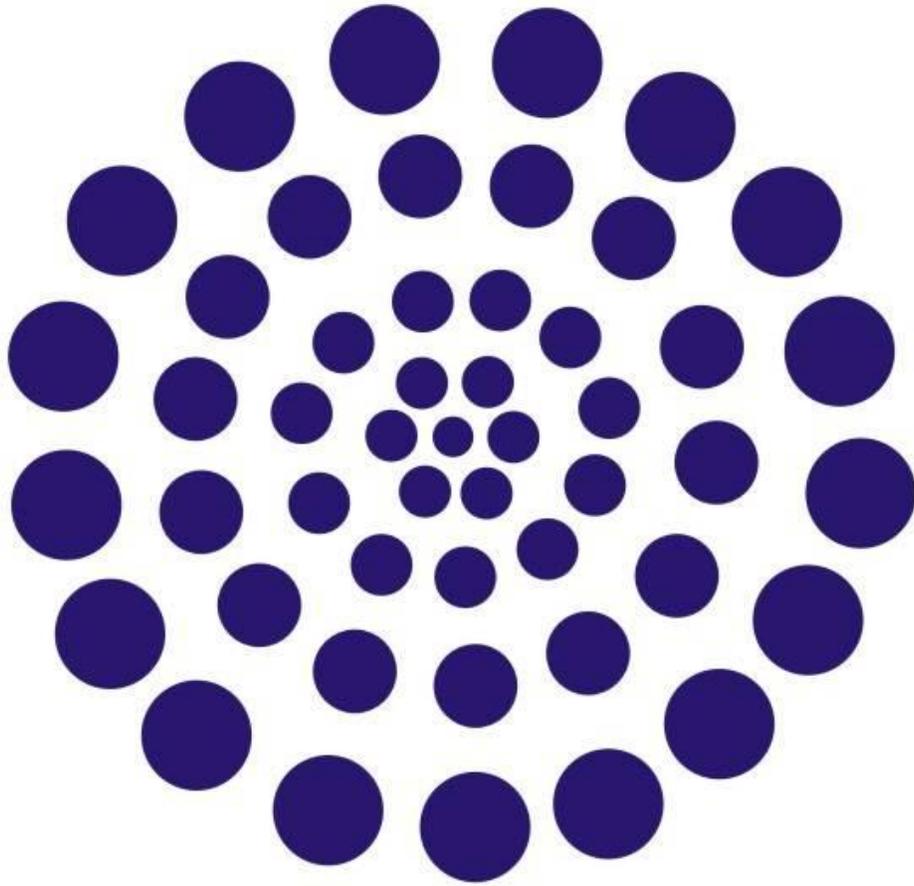
M. en Q. Luis Felipe Juárez Santillán

DIRECTORA:

Dra. Rosa Icela Beltrán Hernández

Pachuca de Soto, Hgo.

Junio 2010



CONACYT

Agradezco a CONACyT por la beca otorgada durante mis tres años en el doctorado.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, pero en especial a mis padres Don Octaviano y Doña Memoria, por darme la vida y apoyarme incondicionalmente en todo momento.

A la Dra. Rosa Icela y al Dr. Carlos Alexander por su apoyo y paciencia a largo de siete años de mi formación profesional, pero sobre todo por su amistad.

A la futura Ingeniero Ambiental Margarita Columba Cruz Méndez, por su apoyo en estos últimos meses.

A mi comité tutorial por sus acertados comentarios y opiniones para la revisión de esta tesis.

Y a mis amigos que he tenido a lo largo de mi vida, créanme que sin su apoyo ésto no hubiera sido posible.

Contenido

ÍNDICE DE TABLAS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
RESUMEN	1
1 INTRODUCCIÓN	3
2 MARCO TEÓRICO.....	6
2.1 Contaminación del suelo por metales	6
2.2 Biodisponibilidad de metales	7
2.3 Los microorganismos en la biodisponibilidad de metales	8
2.4 Arsénico.....	9
2.5 Manganeseo	10
2.6 Plomo.....	12
2.7 Plantas tolerantes, acumuladoras e hiperacumuladoras de metales.....	13
2.8 Metalofitas	14
2.9 Mecanismos de absorción de metales en las plantas.....	15
2.9.1 Metalotioneinas y fitoquelatinas	19
2.9.2 Metalotioneninas (MTs).....	19
2.9.3 Fitoquelatinas (PCs).....	20
2.10 Estrés oxidativo en plantas	20
2.11 Fitorremediación	22
2.11.1 Fitoextracción.....	23
2.11.2 Rizofiltración.....	25
2.11.3 Fitovolatilización	25
2.11.4 Fitoestabilización.....	26
2.11.5 Fitodegradación.....	26
2.12 Antecedentes	26
3 OBJETIVOS	32
3.1 Objetivo general.....	32
3.2 Objetivos específicos	32
4 METODOLOGÍA.....	34
4.1 Descripción del área de estudio.....	34

4.1.1 Localización geográfica de la zona de estudio	34
4.2 Recolección y tratamiento de muestras	35
4.2.1 Prensado de plantas	36
4.2.2 Recolección y caracterización de sustratos	37
4.2.3 Recolección y caracterización del agua	38
4.2.4 Extracción de metales en sustrato, planta y agua	39
4.2.5 Determinación de manganeso, plomo y arsénico	39
4.3 Determinación del factor de translocación y del índice de bioacumulación .	40
4.4 Determinación de estrés oxidativo en plantas (malondialdehído)	41
5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
5.1 Zona 1: Molango, Hidalgo	43
5.1.1 Características fisicoquímicas de los sustratos y del agua	43
5.1.2 Manganeso en los sustratos	44
5.1.3 Identificación y clasificación de las plantas tolerantes al manganeso ...	49
5.1.4 Evaluación de estrés oxidativo en las plantas de Molango, Hidalgo	52
5.2 Zona 2: Zimapán, Hidalgo	55
5.2.1 Características fisicoquímicas en los sustratos	55
5.2.2 Arsénico en sustratos	56
5.2.3 Identificación y clasificación de las plantas tolerantes al arsénico	58
5.2.4 Plomo en los sustratos	62
5.2.5 Identificación y clasificación de las plantas tolerantes al plomo	63
5.2.6 Evaluación de estrés oxidativo en las plantas de Zimapán, Hidalgo	65
CONCLUSIONES	68
7 BIBLIOGRAFÍA	71
ANEXO 1. Preparación de ácido tiobarbiturico (TBA al 0.5%).	84
ANEXO 2. Plantas identificadas como tolerantes y acumuladoras de manganeso en el municipio de Molango, Hidalgo	84
ANEXO 3. Plantas identificadas como tolerantes y acumuladoras de plomo y arsénico en el municipio de Zimapán, Hidalgo	92
ANEXO 4	98
1 PROPAGACIÓN DE <i>Thelypteris kunthii</i> en el laboratorio	98

2 INTRODUCCIÓN	98
3 OBJETIVOS	99
3.1 Objetivo general	99
3.2 Objetivos particulares	99
4 ANTECEDENTES	100
4.1 Helechos y angiospermas empleados en la fitorremediación.....	104
5 METODOLOGÍA.....	106
5.1 Estrategia experimental.....	106
5.2 Material biológico	106
5.3 Medio de cultivo	107
5.4 Desinfección de esporas	107
5.5 Germinación de esporas	108
5.6 Germinación de esporas a diferentes concentraciones de manganeso	108
6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	109
6.1 Desinfección.....	109
6.2 Germinación de las esporas.....	110
6.2.1 Desarrollo protálico	110
6.3 Germinación de las esporas a diferentes concentraciones de manganeso...	113
BIBLIOGRAFÍA	116
ANEXO 5: Artículo.....	120

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Porcentajes de metales y metaloides en plantas para ser consideradas como hiperacumuladoras. 14

Tabla 2. Localización geográfica de los sitios de muestreo en la zona de Molango, Hidalgo 36

Tabla 3. Localización geográfica de los puntos de muestreo en la zona de Zimapán, Hidalgo 36

Tabla 4. Características fisicoquímicas de los sustratos de la zona de Molango, Hidalgo 44

Tabla 5. Concentración de manganeso en sustratos y en los órganos de las plantas colectadas en Molango, Hidalgo 45

Tabla 6. Comparación de la concentración de malodialdehído y manganeso en planta y manganeso en los sustratos de Molango, Hidalgo 53

Tabla 7. Características fisicoquímica de los sustratos de la zona de Zimapán, Hidalgo 55

Tabla 8. Concentración de arsénico en sustratos y en los órganos de las plantas colectadas en Zimapán, Hidalgo 61

Tabla 9. Concentración de plomo en sustratos y en cada órgano de las plantas colectadas en Zimapán, Hidalgo 65

Tabla 10. Comparación de la concentración de malodialdehído, arsénico y plomo en plantas y arsénico y plomo en los sustratos de Zimapán, Hidalgo 67

Tabla 11. Experimentos expuestos a 16 h luz/8 h oscuridad evaluados a los cinco días de haber sembrado las esporas. 109

Tabla 12. Experimentos expuestos a oscuridad evaluados a los cinco días de haber sembrado las esporas 109

Tabla 13. Desinfección con 7% de ClO^- a diferentes tiempos de exposición 109

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Peroxidación de lípidos de la membrana celular	22
Figura 2. Zonas de estudio en el estado de Hidalgo	34
Figura 3. Prensado de plantas	37
Figura 4. Esquema de prereducción	40
Figura 5. Fraccionamiento de manganeso (porcentajes) en sustratos de Molango, Hidalgo F5 F4 F3 F2 F1.....	47
Figura 6. Diagrama de Pourbaix para Mn	48
Figura 7. Diagrama de existencia predominio para Mn	49
Figura 8. Diagrama de Pourbaix para As	57
Figura 9. Diagrama de distribución de especies para As V.....	57
Figura 10. Diagrama de distribución de especies para As III.	58
Figura 11. Ciclo de vida de los helechos.....	103
Figura 12. Estrategia metodológica.....	106
Figura 13. Espora (A). Germinación tipo <i>Vittaria</i> , 2 a 5 días (B). Filamentos cortos de 4-6 células, 6 días (C). Gametofito espatulado, 8 días (D). Gametofito cordiforme, 20 días (E). Gametofito con tricomas, 20 días (F). Gametofito con anteridios y arquegonios cerca de la muesca, 28 días (G).	111
Figura 14. Aparición del esporofito (A). Aparición de las dos primeras hojas en el esporofito (B).....	112
Figura 15. Ciclo de vida de <i>Thelypteris kunthii</i>	112
Figura 16. Germinación de esporas; A) 0 mM de Mn, B) 3 mM de Mn, C) 6 mM de Mn, D) 9 mM de Mn, E) 12 mM de Mn, F) 15 mM de Mn	113
Figura 17. Porcentaje de esporas germinadas (evaluación a los 12 días [-] y a los 20 días [- -]).....	113
Figura 18. Germinación de esporas en los días 12 y 19.	114
Figura 19. Desarrollo de lámina protálica a los 20 días; A) 0 mM de Mn, B) 3 mM de Mn, C) 6 mM de Mn, D) 9 mM de Mn, E) 12 mM de Mn, F) 15 mM de Mn. ...	115
Figura 20. Germinación de esporas en los días 33 y 41.	116

RESUMEN

Una planta con la capacidad para tolerar, acumular o hiperacumular algún contaminante, puede tener gran importancia en los procesos de fitorremediación. En la actualidad existen pocas especies identificadas con dichas capacidades, por lo que es relevante investigar estas especies antes de que se pueda dar un proceso de extinción. En el presente estudio se trabajó con dos zonas mineras del estado de Hidalgo: Molango y Zimapán. En estas zonas se colectaron muestras de plantas y sustratos para identificar nuevas especies tolerantes, acumuladoras o hiperacumuladoras de Mn en Molango, Hidalgo y de As y Pb en el caso de Zimapán, Hidalgo.

Bajo las condiciones fisicoquímicas que presentaron los sustratos de Molango, las 10 plantas identificadas mostraron un comportamiento excluyente con respecto al Mn. En algunas de ellas como *Thelypteris kunthii*, *Equisetum hyemale*, *Equisetum myriochaetum* y *Blechnum occidentale*, este comportamiento fue evidente por su capacidad para acumular el Mn en la raíz y evitar su translocación. En el caso de *Xantosoma robustum*, *Platanus mexicana*, *Cnidioscolus multilobus*, *Asclepias curassavica* L., *Solanum diversifolium* y *Pluchea sympitifolia* es posible que sean acumuladoras. Los sustratos de esta zona presentaron condiciones reductoras, pHs alcalinos, CIC entre media y alta, CE_s menor a 2 dS m^{-1} y textura arenosa. En el análisis de la extracción secuencial el Mn presentó el siguiente orden en las cinco fracciones evaluadas $F_5 > F_3 > F_4 > F_2 > F_1$. El Mn presente en la solución del suelo puede estar en un equilibrio dinámico entre la fase soluble e insoluble por las condiciones de pH y E_h y en el caso del agua se encuentra como Mn^{2+} , los resultados obtenidos de esta zona se publicaron en la revista *Bioresource Technology* (Anexo 5).

En Zimapán se colectaron un total de ocho plantas de las cuales *Eschscholzia californica*, *Viguiera dentata*, *Brickellia veronicifolia*, *Nicotiana glauca* y *Flaveria trinervia* se clasificaron como acumuladoras de As y como posibles acumuladoras

de Pb; *Notholaena sulphurea*, *Argyrochosma formosa* y *Ricinus communis* como tolerantes al As y Pb; en la zona se presentaron dos tipos de sustratos uno fuertemente ácido, con condiciones oxidantes y CIC baja y otro con pH entre ligeramente ácido a alcalino, con condiciones reductoras y CIC media. Ambos sustratos no presentaron problemas de salinidad y tienen una textura arenosa. El arsénico es probable que se encuentre como As (V) y el Pb como hidroxocomplejo insoluble en los sustratos ligeramente ácidos a alcalinos y como As (III) y Pb²⁺ en los sustratos ácidos.

1 INTRODUCCIÓN

En suelos mineralizados se encuentran especies de plantas tolerantes a metales, adicionalmente éstas pueden tener la capacidad de acumular o hiperacumularlos, su identificación es importante para poder emplearlas en la remediación de aguas o suelos afectados por este tipo de contaminantes. El uso de plantas acumuladoras ha dado lugar a la técnica conocida como fitorremediación, la cual se define como el uso de plantas para contener, acumular o degradar un contaminante.

En Latinoamérica hay pocos estudios acerca de especies acumuladoras de metales tóxicos, no obstante, debido a la gran cantidad de zonas mineras presentes en esta área es probable encontrar plantas que puedan ser hiperacumuladoras de metales. A nivel mundial existen 400 especies clasificadas como acumuladoras, la mayoría de ellas se han encontrado en Europa debido principalmente al interés que existe en este continente por conocer estas especies vegetales antes de que se extingan. A la fecha se tienen identificadas para níquel (Ni) 317 especies, para cobre (Cu) 37, para cobalto (Co) 28, para plomo (Pb) 14, para zinc (Zn) 11, para manganeso (Mn) 9, para cadmio (Cd) 2 (Kidd *et al.*, 2007), para arsénico (As) 3 (Ma *et al.*, 2001). Dentro de las especies más estudiadas se encuentran las del género *Alyssum* para Ni (Kidd *et al.*, 2007), *Pteris vittata* para As (Ma *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2006; Sing y Ma, 2006) y *Phytolacca acinosa* y *Phytolacca americana* para Mn (Xue *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2006).

El estado de Hidalgo cuenta con más de 500 años de minería, donde Molango se destaca por la extracción de Mn y Zimapán por la extracción de Cu, Pb y Zn e indirectamente As. En el estado aún no se han realizado estudios de identificación de plantas tolerantes a pesar de que Ortiz (2005) encontró en Zimapán, que el maíz tiene la capacidad de acumular As. Aldape *et al.* (1999), observaron que la población en la zona minera de Molango se encuentra expuesta a contaminación por Mn, el cual proviene de diferentes fuentes, como el aire, el agua que beben y

los vegetales que se cultivan allí. Esto es debido al enriquecimiento natural que presentan los suelos, por tal motivo, el principal objetivo de este estudio es identificar plantas que puedan tolerar, acumular o hiperacumular metales o metaloides, lo que permitirá proponer estas especies para la fitorremediación de suelos contaminados por elementos traza.



MARCO TEÓRICO



2 MARCO TEÓRICO

2.1 Contaminación del suelo por metales

La presencia de metales en el suelo tiene dos orígenes: 1) natural; que es cuando los contenidos de metales se atribuyen a la composición de los distintos minerales presentes en la roca y a erupciones volcánicas y 2) antrópico; que es cuando las concentraciones de los metales en el suelo son mayores a su composición geoquímica y son el resultado de las actividades industriales, mineras y agrícolas. Los suelos cuyos altos contenidos de metales son de origen natural normalmente son identificados como yacimientos. En estos sitios se puede observar que los organismos que habitan se encuentran adaptados a estas condiciones geoquímicas con una alta tolerancia al estrés metálico (Kabata-Pendias *et al.*, 1992).

Diversos sitios en el mundo se encuentran contaminados con metales, debido en gran parte a las actividades mineras, las cuales depositan residuos minerales sobre el suelo, donde tanto las plantas como los animales están expuestos a ellos. Los residuos provenientes de la actividad minera son esparcidos en diferentes compartimientos ambientales debido a la acción del viento y del agua, por medio de la erosión, la lixiviación y la escorrentía (Carrillo y González, 2006). En México el área afectada por la presencia de metales traza es aproximadamente de 21.7 millones de hectáreas y el 65% del total de los residuos que provocan dicha contaminación proviene de la actividad minera (CGM, 2001).

Los metales originados de distintas fuentes pueden llegar a la superficie del suelo, posteriormente su destino dependerá de las propiedades físicas y químicas de éste y especialmente de la especiación del metal.

2.2 Biodisponibilidad de metales

Los metales en el suelo se pueden encontrar formando diferentes compuestos, lo cual complica su estudio, por ello, las técnicas de especiación consideran cinco fracciones principalmente: 1) en solución, como iones de metal libre y complejos metálicos solubles, 2) adsorbidos en los sitios de intercambio de los constituyentes orgánicos, 3) precipitados como óxidos, hidróxidos y carbonatos, 4) ligados a la materia orgánica, y 5) formando parte de las estructuras de los silicatos (Basta, 2004). Para que la planta pueda absorber los metales, éstos deben estar biodisponibles. La biodisponibilidad depende de la solubilidad y movilidad de los metales en la solución del suelo. La concentración total del metal en un suelo no refleja los niveles de biodisponibilidad, ya que sólo los metales presentes en la fracción uno y dos son los disponibles (Silveira *et al.*, 2003).

Dentro de los procesos del suelo que están involucrados en la biodisponibilidad de metales destacan el intercambio catiónico, adsorción/desorción (formación de enlaces formales con minerales del suelo), precipitación/disolución (dependen directamente del producto de solubilidad del sólido en agua) y formación de complejos (interacción de metales con ligandos orgánicos o inorgánicos), todos estos procesos afectan la distribución de los metales entre la solución del suelo y la fase sólida y son los responsables de su movilidad y biodisponibilidad (Rieuwertts *et al.*, 1998; Silveira *et al.*, 2003; Basta, 2004).

La biodisponibilidad de los metales también depende de la naturaleza del metal, su interacción con los coloides del suelo, las propiedades y el tiempo de contacto del suelo con ellos (Naidu *et al.*, 2003). Las propiedades del suelo que afectan la disponibilidad de un metal son: el pH el cual está relacionado con la especiación, solubilidad, adsorción e intercambio de los iones, afectando la carga eléctrica del suelo; el potencial redox (E_h) determina la especie del metal en la solución del suelo y altera su solubilidad; la textura, el contenido y tipo de arcilla influyen en la movilidad del metal; la materia orgánica participa en los procesos de complejación

de los metales debido a los diferentes grupos funcionales que presenta; los óxidos de hierro (Fe), Mn y aluminio (Al) participan en los procesos de adsorción y la presencia de cationes y aniones libres (Rieuwerts *et al.*, 1998; Silveira *et al.*, 2003; Basta, 2004). Otros factores que afectan la biodisponibilidad son la actividad microbiana, las propiedades físicas del suelo así como la actividad de las raíces.

2.3 Los microorganismos en la biodisponibilidad de metales

Las condiciones de la interfase raíz-suelo (rizósfera) pueden ser modificadas por la planta, a través de la producción de exudados radiculares y rizodepósitos (mucílago y restos celulares), y por la actividad microbiana como la liberación de sideróforos o reacciones redox (Adriano, 2001; Lombi *et al.*, 2001).

Los compuestos tóxicos del suelo son frecuentemente modificados por los microorganismos (Van Zwieten *et al.*, 2003), pero algunos de éstos pueden dificultar el crecimiento de los microorganismos del suelo y dañar su habilidad para promover el crecimiento de las plantas. Los hongos del suelo proporcionan una gran área superficial para realizar el enlace con los nutrientes del suelo, tales como el fosfato inorgánico a través de ectomicorrizas y endomicorrizas asociadas con las raíces de la planta. Adicionalmente los hongos del suelo tienen el potencial para incrementar o mejorar la toma de contaminantes inorgánicos por las plantas. Consecuentemente, los hongos micorríticos en suelos contaminados con metales tóxicos, son cruciales en el mantenimiento de diversas poblaciones de vegetación endémica (Leyval *et al.*, 1997).

Los microorganismos que viven naturalmente en altas concentraciones de As pueden coexistir e incluso recibir beneficios de los compuestos de As. El As V puede ser utilizado en el metabolismo vegetal como aceptor terminal de electrones en la respiración desasimilatoria o como donador en la oxidación química autótrofa del arsenito. El metabolismo de bacterias y hongos está asociado con dos procesos importantes; el primero es disminuir la concentración de As dentro de la

célula vegetal, por medio del mecanismo de transporte del As y el segundo; una mejor absorción del fosfato (Cervantes *et al.*, 1994).

Sharples *et al.* (2000) presentaron evidencias que los hongos *Hymenoscyphus ericae* actúan como un filtro para mantener bajas concentraciones de As en el brezo *Calluna vulgaris* cuando está creciendo en suelos contaminados con As. Por otra parte, en un experimento en el cual se empleó la hierba *Holcus lanatus*, González-Chávez *et al.*, (2002) observaron que la micorriza de los hongos del género *Glomus* suprime la afinidad hacia el arsenato y el transporte de fosfato en las raíces.

El Mn es afectado por la actividad microbiana, el cual es oxidado por la acción de varias bacterias y hongos acuáticos. Los organismos tales como *Arthrobacter* y *Leptothrix* oxidan el Mn^{2+} en Mn^{4+} (MnO_2). Otros géneros de microorganismos que oxidan al Mn son: *Bacillus*, *Cladosporium*, *Corynebacterium*, *Curvularia*, *Gallionella*, *Klebsiella*, *Metallogenium*, *Pedonicrobium*, *Pseudomonas* y *Sphaerotilus* (Coyne, 2000).

2.4 Arsénico

El As es un elemento ubicuo en el ambiente, proviene tanto de fuentes naturales como antropogénicas. Las fuentes naturales más importantes son la volatilización y las actividades volcánicas; mientras que las mayores fuentes antropogénicas son la explotación y la fusión de menas metalíferas, la quema de combustibles fósiles y actividades agrícolas (Mitchell y Barr, 1995).

El As es un elemento no esencial para las plantas y aparentemente no está involucrado en las reacciones específicas metabólicas cuando es suministrado en bajas concentraciones. Sin embargo, cuando se presentan altas concentraciones se ha reportado que interfiere en algunos procesos metabólicos, por ejemplo

inhibe el crecimiento de plantas y algunas veces provoca la muerte (Marin *et al.*, 1993).

La biodisponibilidad y la fitotoxicidad del As en el suelo están controladas por un gran número de factores tales como las condiciones de drenaje, así como el tipo y cantidad de materia orgánica entre otros ya comentados (Mitchell y Barr, 1995). El comportamiento químico y tóxico del As está influenciado por la forma y especie química presentes. El As III es más móvil y más tóxico que el As V, las arsinas gaseosas son aún más tóxicas. Como regla general las formas arsenicales inorgánicas son más tóxicas que las orgánicas (Adriano, 2001).

Para que un suelo agrícola se considere contaminado por As debe presentar concentraciones totales entre 1-20 mg As kg⁻¹ suelo (Wauchope, 1983), pero un suelo contaminado asociado con zonas mineralizadas puede contener hasta 2,600 mg de As kg⁻¹ suelo (Meharg *et al.*, 1994). Los niveles de As soluble varían en un rango entre de 0.007 y 13 mg kg⁻¹ dependiendo del grado de contaminación de un suelo. Los niveles de As soluble tienden a incrementar significativamente cuando se presentan potenciales redox bajos (Carbonell *et al.*, 1998).

Los compuestos de As son diferentes en su solubilidad, movilidad, biodisponibilidad y fitotoxicidad. La toxicidad del As hacia los sistemas biológicos lo han hecho un componente útil de insecticidas, herbicidas, fungicidas, entre otros. Sin embargo, el uso indiscriminado de sustancias con As ha provocado su concentración en plantas, así como su disponibilidad en algunos suelos, lo cual reduce la productividad de los mismos (Marin, 1995).

2.5 Manganeso

El Mn es uno de los elementos más abundantes de la corteza terrestre. Se encuentra en el suelo, los sedimentos, las rocas, el agua y los productos biológicos, sin embargo, la intensa actividad humana ha hecho que la disponibilidad del Mn se incremente (Xu *et al.*, 2006).

El Mn se utiliza en la producción del acero, en la industria química se emplea como agente oxidante y para la producción de permanganato de potasio y otros productos químicos derivados de este elemento. También, se utiliza como recubrimiento de electrodos en varillas de soldadura, en los trituradores de rocas, en las agujas y cambios de vía de los ferrocarriles. También se emplea en la fabricación de cerámica, vidrio y tintes (Nordberg, 2001)

Entre los minerales más importantes que contienen Mn están los óxidos, carbonatos y silicatos, dentro de los óxidos más estables de este elemento está el dióxido de manganeso (MnO_2), puede formar diversos compuestos organometálicos. El Mn en la naturaleza puede presentarse en ocho estados de oxidación diferentes, los más importantes son: +2, +3 y +7 (Nordberg, 2001).

La actividad minera y la fundición de metales han incrementado la concentración y disponibilidad del Mn en el suelo, propiciando con esto un efecto en la estructura y composición de la vegetación (Zheljazkov y Nielsen, 1996). La disponibilidad de Mn en el suelo es controlada por el pH (Smith y Paterson, 1990). Sin embargo, el pH de la rizósfera es más importante para determinar la disponibilidad de Mn para las plantas (Reisenaur, 1988). El Mn es un micronutriente esencial para las plantas y funciona como cofactor en algunas enzimas y un constituyente importante de la superoxidasa dismutasa que protege a los tejidos de la toxicidad de los radicales libres del oxígeno, liberados de varias reacciones enzimáticas (Marschner, 1995).

Las plantas absorben al Mn en forma divalente y su disponibilidad se incrementa en suelos ácidos o en condiciones anaerobias. Altos niveles de Mn en el suelo pueden conducir a un desbalance nutricional en las plantas, especialmente en relación con otros cationes divalentes como el Mg^{2+} y Ca^{2+} (Cenni *et al.*, 1998). En general, la absorción de nutrientes, principalmente en relación con los elementos que entran o se difunden por las raíces, puede ser impedida por la inhibición de los vellos de las raíces propiciada por el Mn y por la reducción de los estomas (Lidon, 2002). Por lo tanto altas concentraciones de Mn pueden reducir el

crecimiento de las plantas debido a la deficiencia de nutrientes propiciada por este elemento (Marschner, 1995).

En el ser humano el Mn se acumula en los tejidos ricos en mitocondrias y atraviesa las barreras hematoencefálica y placentaria. También se han observado concentraciones elevadas de Mn en las zonas pigmentadas del organismo, como son la retina, la conjuntiva pigmentada, la piel morena y el pelo negro. Se calcula que la carga total de Mn en el organismo varía entre 10 y 20 mg para un varón de 70 kg. La vida media del Mn en el organismo es de 36 a 41 días, pero en el caso del Mn depositado en el cerebro es considerablemente mayor (Nordberg, 2001).

2.6 Plomo

Es el metal con propiedades tóxicas que más se ha propagado en el ambiente en las últimas décadas. Alteraciones neurológicas, anemia y cáncer de riñón están relacionados con este elemento. Los animales pueden absorber Pb por inhalación o ingestión. Si la absorción es lenta, la excreción lo es aún más, de manera que el Pb tiende a acumularse. La anemia es el primer síntoma de envenenamiento crónico producido por el Pb en los animales, dado que interfiere en la síntesis del grupo hemo, reflejándose en síntomas tales como náuseas, vómitos y dolores abdominales (Navarro- Aviñó *et al.*, 2007).

El Pb suele aprovechar la metabolización del Ca para sustituirlo y dañar la célula. Sin embargo hay un denominador común en la toxicidad de ciertos metales. Las proteínas específicas que se ven principalmente afectadas por mercurio (Hg), Pb, cadmio (Cd) y As pueden diferir de un metal a otro. No obstante, se produce una interacción bioquímica similar que es la responsable de la toxicidad de estos cuatro metales (Navarro-Aviñó *et al.*, 2007).

Un aspecto importante a considerar, concerniente a la toxicidad es que el tiempo de residencia de los metales pesados en el suelo ronda los miles de años. Por

tanto, representa un riesgo permanente para la salud ambiental. No ocurre así con otros productos tóxicos como plaguicidas, insecticidas, derivados del petróleo entre otros, que son, hoy día, factores comunes de contaminación mundial. En consecuencia, surge la necesidad de tratar, descontaminar y remediar suelos contaminados por metales (Navarro-Aviñó *et al.*, 2007).

2.7 Plantas tolerantes, acumuladoras e hiperacumuladoras de metales

Una planta tolerante es la que sobrevive bajo una concentración elevada de algún contaminante, una acumuladora será la que presente concentraciones superiores a la normal de dicho contaminante, pero inferiores a la concentración para poderla considerar como hiperacumuladora, estas últimas son aquellas que sobrepasan una concentración específica de algún contaminante. En el caso de ambientes mineralizados, las plantas pueden sobrevivir en ellos usando dos estrategias; la primera consiste en que las plantas restringen la absorción de los metales, o bien, los acumulan sólo en la raíz, lo que les permite mantener concentraciones bajas en la biomasa aérea a pesar de las concentraciones elevadas de metales en el suelo (estrategia de exclusión); la segunda, es cuando la planta absorbe los metales y los translocan a su parte aérea de forma no tóxica (estrategia acumuladora) (Baker, 1981). La exclusión es más característica de especies sensibles y tolerantes a los metales, mientras que la acumulación es posible que se presente en especies que aparecen en suelos contaminados o metalíferos (Barceló y Poschenrieder, 2003).

Chaney *et al.* (2000), definen de forma general a una planta hiperacumuladora como aquella que alcanza concentraciones de metales en la hoja entre 10-100 veces las concentraciones normales en planta. Actualmente se utiliza el término hiperacumuladora para designar plantas que acumulan más de $10,000 \text{ mg kg}^{-1}$ de Mn y Zn; más de $1,000 \text{ mg kg}^{-1}$ de Co, Cu, Pb, Ni, As y selenio (Se) y más de 100 mg kg^{-1} de Cd (Kidd *et al.*, 2007). Otro criterio para considerar a una planta como hiperacumuladora es el que reportan Gionocchio y Baker (2004) en el cual toman

en consideración el porcentaje de acumulación en base seca de cada elemento (Tabla 1). Se ha observado que estos valores en plantas metalofitas no provocan algún estrés fisiológico.

Tabla 1. Porcentajes de metales y metaloides en plantas para ser consideradas como hiperacumuladoras.

Metal	Concentración (% en base seca)
Arénico	> 0.1
Cadmio	> 0.01
Cobalto	> 0.1
Cobre	> 0.1
Plomo	> 0.1
Manganeso	> 1.0
Níquel	> 0.1
Selenio	> 0.1
Zinc	> 1.0

Tomada de: Gionocchio y Baker, 2004

2.8 Metalofitas

Las metalofitas son especies de plantas que han desarrollado mecanismos fisiológicos para sobrevivir y reproducirse en suelos con altos niveles de metales, los cuales pueden ser micronutrientes o tóxicos. Existen dos grupos de metalofitas; las pseudometalofitas, que pueden desarrollarse en ambientes mineralizados o no y, las eumetalofitas, las cuales son endémicas de suelos con afloramientos naturales de minerales metálicos. Las eumetalofitas tienen muy difícil su supervivencia, debido en parte, por su especialización para sobrevivir en entornos contaminados con minerales específicos, y por otra, por su restringida supervivencia en zonas no mineralizadas (Laboreo y Panadero, 2000; Reervers y Baker, 2000, Shaw, 1990).

América Latina posee una gran abundancia y diversidad de yacimientos minerales metálicos. Sin embargo, se han reportado pocas especies tolerantes, acumuladoras e hiperacumuladoras de metales en comparación con otras

regiones del mundo como Norteamérica, Oceanía, Asia, Europa y África, los datos biogeoquímicos disponibles para los sitios mineros en América Latina son muy pocos. Esto podría deberse tanto a la escasez de estudios científicos sobre la vegetación nativa que se ha desarrollado sobre mineralizaciones superficiales o en suelos enriquecidos antrópicamente con metales, así como a la falta de métodos biogeoquímicos para el análisis de minerales, más que a la ausencia de este tipo de especies vegetales en la región. Latinoamérica es, sin embargo, un área con gran potencial para la presencia de este tipo de especies vegetales, no sólo por el gran número de mineralizaciones y áreas contaminadas con metales, sino por su amplia y única diversidad vegetal. Si las comunidades vegetales presentes sobre mineralizaciones naturales, no se estudian antes de que se lleven a cabo los procesos de extracción de los minerales, podrían perderse para siempre especies y genotipos claves para ser usados en la mitigación de problemas ambientales relacionados con el propio sector minero (Gionocchio y Baker, 2004).

Las plantas ideales para ser usadas en procesos de fitorremediación deben crecer rápido, tener gran cantidad de biomasa y ser tolerantes a altas concentraciones de metales. Algunas metalofitas son llamadas hiperacumuladoras porque pueden acumular altas concentraciones de metales o metaloides en sus órganos, concentraciones que exceden sus requerimientos fisiológicos (Baker y Brooks, 1989).

2.9 Mecanismos de absorción de metales en las plantas

Para que una planta pueda absorber algún contaminante del suelo, éste debe estar disponible, para que pueda estar de forma disuelta influirán muchos factores físicos y químicos ya mencionados anteriormente (sección 2.2.). Una vez que el contaminante esté en la solución del suelo, su absorción por las raíces de las plantas dependerá del gradiente hídrico tanto del suelo como de las plantas; mientras más negativo sea el gradiente hídrico de las raíces en comparación con el del suelo más fácil será su absorción (Villego *et al.*, 1996). Una vez que la solución

del suelo se encuentre dentro de las raíces, se transportará en la planta vía el Xilema (parte leñosa) y por capilaridad (Robb y Pierpoint, 1983). Para que la solución del suelo llegue hasta las hojas u órganos aéreos la transpiración jugará un papel muy importante, ya que hará la función de succión. La presencia de la mezcla de nutrientes y contaminantes disparará la actuación de diferentes mecanismos en la planta. Algunos de estos mecanismos se encargarán de transportar los nutrientes hasta las células para que puedan cumplir con su función biológica y otros mecanismos trasladarán a los contaminantes al organelo donde sean menos perjudiciales (Villego *et al.*, 1996).

La presencia de las plantas acumuladoras o hiperacumuladoras a menudo está restringida a suelos ricos en metales, no son competitivas en zonas no contaminadas. Estas plantas se encuentran distribuidas por todo el mundo, y de forma predominante en Nueva Caledonia, Cuba y la región Mediterránea, entre otros lugares (Baker *et al.*, 2000).

Esta capacidad de sobrevivir y crecer en suelos contaminados, y acumular gran cantidad de metales convierte a las hiperacumuladoras en organismos adecuados para la fitoextracción. La planta puede protegerse formando complejos metálicos estables menos tóxicos con quelantes como fitoquelatinas, metalotioneinas, ácidos orgánicos, aminoácidos y fenoles de tipo flavonoide, o bien, secuestrando los metales desde zonas con un metabolismo activo (citoplasma) hacia el interior de las vacuolas o en la pared celular, donde no puedan ocasionar efectos adversos (Vázquez *et al.*, 2006). Parece ser que la capacidad de acumulación de estas plantas no está determinada por la acción de un solo mecanismo interno, sino de varios, que actúan conjuntamente. En general, las hiperacumuladoras presentan una tasa de crecimiento baja, poca producción de biomasa y un sistema radicular pobre, posiblemente debido al costo energético que representa acumular niveles de metales en su interior que pueden exceder valores tan altos como el 1% del peso seco de la planta (Vázquez *et al.*, 2006).

Las plantas que acumulan e hiperacumulan metales tienen la capacidad de solubilizarlos del suelo, eficiencia para absorberlos en las raíces y traslocarlos a sus órganos (Pollard *et al.*, 2002). Algunas plantas hiperacumuladoras excretan ácidos orgánicos tales como cítrico, málico y oxálico, los cuales propician un decremento en el pH y a la vez pueden actuar como queladores de metales, por lo tanto los metales quedan biodisponibles en forma catiónica (Ross, 1994).

Los mecanismos de detoxificación de metales pesados involucran (Xiao *et al.*, 2005):

- a) Enlace del metal a la pared celular
- b) Reducción en la absorción o un bombeo hacia el exterior de la membrana plasmática
- c) Quelación del metal en el citosol por varios ligantes como las fitoquelatinas, metalotioneínas y proteínas que forman enlaces con el metal
- d) Reparación de las proteínas dañadas por el estrés
- e) Compartimentalización de los metales en la vacuola por transportadores localizados en el tonoplasto

El exceso de metales y nutrientes en el suelo es tóxico para las plantas, principalmente por la interacción con otros iones. Esta situación que puede deberse a causas naturales, y generalmente provoca una reducción del crecimiento y de la producción vegetal, además de suponer un riesgo para la salud humana. La raíz constituye el principal tejido de entrada de metales pesados a la planta. Hasta allí los metales pesados pueden llegar fundamentalmente, por un proceso de difusión en el medio, mediante un flujo masivo y por intercambio catiónico. La raíz posee cargas negativas en sus células debido a la presencia de grupos carboxilo del ácido péctico. Las cargas negativas de estas células de la rizodermis interaccionan con las positivas de los metales pesados presentes en el suelo creando un equilibrio dinámico que facilita la entrada al interior celular. De esta forma los cationes se absorben por la pared celular que además es hidrofílica

lo que facilita el transporte iónico. Una vez unidas las cargas positivas a las negativas de la pared celular, los metales se transportarán en parte por la vía apoplástica (entre células) y en parte por la simplástica (en la célula). No obstante se ha demostrado recientemente que parte del flujo de metales pesados, al menos en el caso del Pb puede quedar retenido en la pared celular por la estructura de lignina y celulosa (Xiao *et al.*, 2005).

Uno de los aspectos más importantes de la acumulación de metales pesados es el que se refiere al proceso de complejación. Un complejo o compuesto de coordinación es el resultado de la interacción de un átomo central, esto es, un ion metálico con orbitales de valencia vacíos que puede actuar como ácido de Lewis (aceptor de electrones), y una o varias bases de Lewis (donador de electrones) con pares de electrones libres. Estas bases se conocen como agentes complejantes o ligandos. Esta interacción lleva a la formación de un enlace covalente coordinado o dativo. El átomo central debe disponer de orbitales vacíos capaces de aceptar pares de electrones. En consecuencia, los cationes de los grupos I y II de la tabla periódica tienen poca tendencia a formar complejos, al disponer de orbitales poco profundos y, por tanto, con poca disposición a captar electrones. Por el contrario, los metales de transición sí presentan una elevada tendencia al proceso de quelación, puesto que poseen orbitales profundos (tipo d o f) (Huheey *et al.*, 1997). El metal se rodea de los ligandos formando un complejo, los ligandos simples como el agua, sólo forman un enlace con el átomo central, y se llaman monodentados o monocoordinados. Algunos ligandos son capaces de formar múltiples enlaces de coordinación, y se describen como bidentados (bicoordinados) o tridentados (tricoordinados), lo cual incrementa la estabilidad de los complejos. La planta utiliza este mecanismo de complejación en el interior de la célula para detoxificarse de los metales. De esta manera, el metal queda inmerso en una interacción química que lo mantiene en equilibrio electrónico (complejado), pero que no lo deja fuera del metabolismo, ya que no se ha eliminado del citoplasma de la célula y, por ello, sigue siendo potencialmente tóxico. Los metales muestran gran afinidad por determinados grupos funcionales

como sulfidrilo, radicales amino, fosfato, carboxilo e hidroxilo. Los ligandos que utilizan las plantas son básicamente aminoácidos y ácidos orgánicos, y más específicamente, dos clases de péptidos: fitoquelatinas y metalotioneinas. Entre los aminoácidos se tienen la histidina y la cisteína entre los ácidos orgánicos los más frecuentes son los ácidos cítrico y málico. Posteriormente los metales unidos a estos compuestos son almacenados en la vacuola, donde no son perjudiciales para la planta (Xiao *et al.*, 2005).

2.9.1 Metalotioneinas y fitoquelatinas

Los metales contaminan la atmósfera, geósfera e hidrósfera, los organismos que crecen en estos ambientes adquieren estrategias de adaptación y uno de los principales mecanismos de defensa es la síntesis de fitoquelatinas (PCs) y metalotioneinas (MTs), ambas contienen grupos sulfidrilo de la cisteína, los cuales se enlazan y secuestran al metal formando complejos muy estables (Prasad, 1999).

2.9.2 Metalotioneinas (MTs)

Las metalotioneinas, son polipéptidos de unos 70-75 aminoácidos con un alto contenido en cisteína, aminoácido capaz de formar complejos con cationes mediante el grupo sulfidrilo que posee como radical. Son proteínas que sirven como transportadoras de metales de bajo peso molecular, fueron las primeras proteínas identificadas en mamíferos como transportadoras de Cd. Se cree también que son las responsables de la quelación de metales pesados en el citoplasma de las células de mamíferos y bacterias pero se piensa también que no son proteínas tan decisivas en el proceso de quelación de metales pesados en plantas (Reddy y Prasad, 1990).

2.9.3 Fitoquelatinas (PCs)

Las PCs son ligandos de alta afinidad que complejan metales pesados. Se identificaron después que las metalotioneninas (MTs). Se piensa que las PCs pueden desempeñar en las plantas el papel equivalente al que las metalotioneínas desempeñan en mamíferos y bacterias. La síntesis de PCs se induce en las plantas por tratamiento con metales pesados y su disminución provoca una mayor sensibilidad a ellos, por lo tanto su papel en la tolerancia y acumulación de estos contaminantes en las plantas es importante (Ernst *et al.*, 1992).

2.10 Estrés oxidativo en plantas

La adaptación de las plantas al estrés por metales traza se basa en mecanismos que reducen la entrada de metales en la planta o que una vez absorbidos, permiten su almacenamiento en lugares no perjudiciales para las células principalmente en la vacuola (Eapen y D'Sousa, 2005).

Reacción de Fenton

Es un proceso mediante el cual se generan radicales OH a partir de la ruptura del peróxido de hidrógeno generando un radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) y un ion OH^- , el Fe^{2+} es el causante de esta ruptura como se muestra en la ecuación 1:



Este radical $\cdot\text{OH}$ es muy reactivo y puede producir procesos de oxidación en cascada. En general lo que se produce en la célula son interacciones que causan una fuerte descompensación electrónica, principalmente por la acción de los radicales formados por el radical $\cdot\text{OH}$ o bien, por la generación de otros radicales, por la oxidación o reducción de las especies químicas en el medio. En la práctica, el nombre "reacción de Fenton" se utiliza para metales diferentes al Fe.

Existe otra reacción en la cual el Fe^{3+} reacciona con los radicales libres de oxígeno presentes en un organismo y el Fe^{3+} se reduce a Fe^{2+} , al conjunto de estas reacciones se les llama Haber-Weiss: y se presentan en las ecuaciones 2, 3 y 4.



En este caso el Fe sólo funciona como un catalizador, el cual queda libre para seguir reaccionando con más peróxido de hidrógeno. En el ambiente cuando un organismo acumula metales, estos son los encargados de realizar esta reacción (Prasad, 1999).

Los radicales generados de las reacciones anteriores pueden extraer un hidrógeno de un grupo metilo ($-\text{CH}_2-$) de la poliinsaturación de los ácidos grasos de la membrana lipídica (Figura 1), y dejar al carbono con un par de electrones libre ($\cdot\text{C}-\text{H}$), el radical generado llega a ser estabilizado por reordenamientos moleculares produciendo un dieno conjugado (dos enlaces dobles consecutivos), el cual reacciona con el oxígeno molecular dando un radical peróxido ($\text{R}-\text{OO}\cdot$). El radical peróxido puede quitar un átomo de hidrógeno de otra molécula lipídica para dar lugar a una reacción en cadena. El producto final de esta reacción son fragmentos de aldehído, incluido el malondialdehído (MDA). También puede ocurrir que el oxígeno reaccione directamente con el ácido graso y genere el peróxido y el MDA sin pasar por reacciones intermediarias. El nivel de MDA en los tejidos es considerado como una medida de la peroxidación de lípidos, es decir del estrés oxidativo en organismos (Prasad, 1999; Singh et al., 2004; Singh y Sinha, 2005).

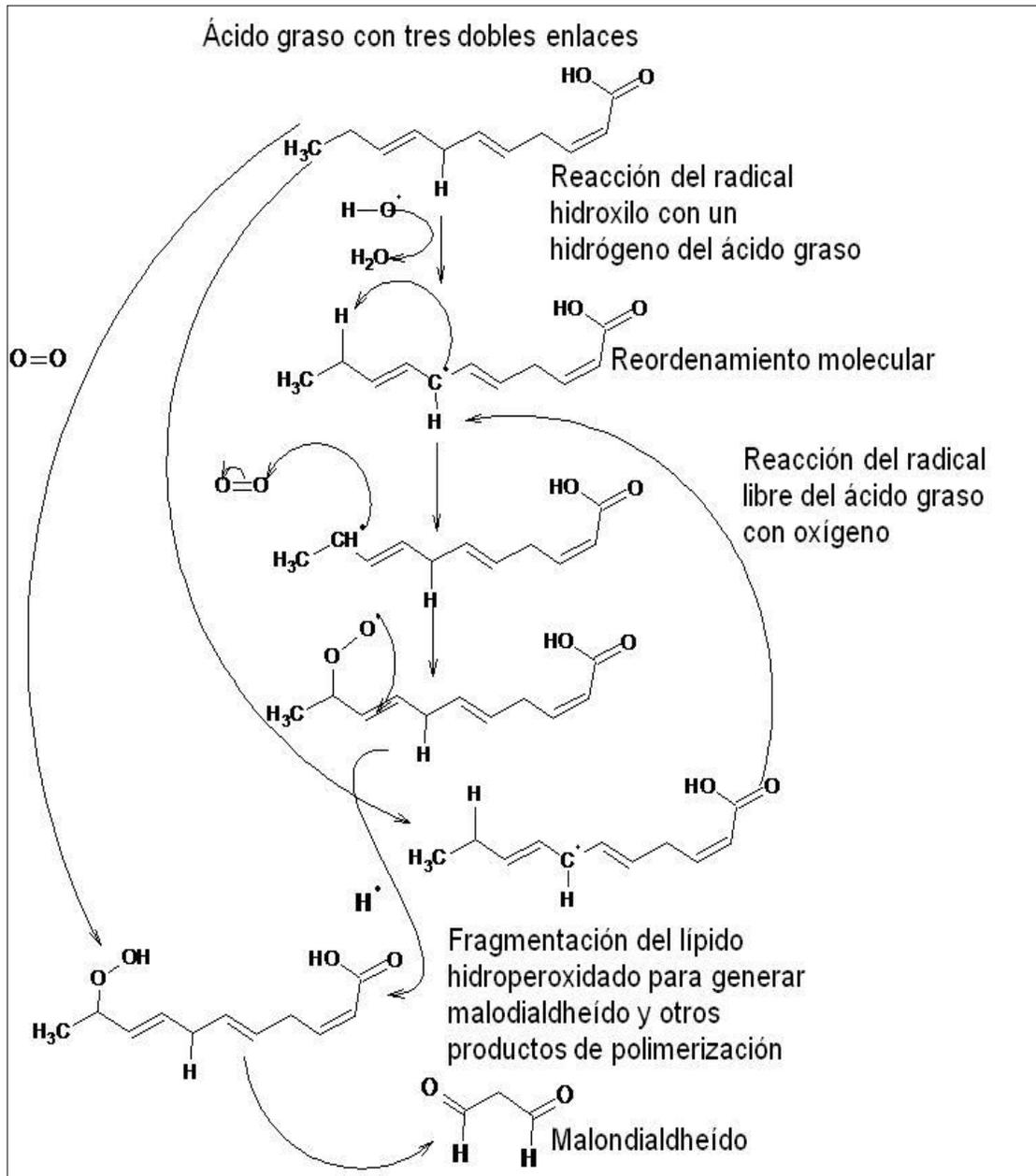


Figura 1. Peroxidación de lípidos de la membrana celular
Tomada de: Prasad, 1999.

2.11 Fitorremediación

El tratamiento de sitios contaminados y la reducción de metales por métodos convencionales son caros y llevan tiempo. Un método alternativo es la fitorremediación de suelos la cual se basa en el uso de plantas (Carrillo y

González, 2006). La fitorremediación ha sido definida por Salt *et al.*, (1995) como una tecnología utilizada especialmente para la acumulación, estabilización, y degradación de contaminantes con la finalidad de limpiar el ambiente.

La fitorremediación involucra procesos como:

- a) Fitoextracción
- b) Rizofiltración
- c) Fitovolatilización
- d) Fitoestabilización
- e) Fitodegradación

2.11.1 Fitoextracción

La fitoextracción es la tecnología más reconocida de la fitorremediación. Los términos fitorremediación y fitoextracción son algunas veces incorrectamente utilizados como sinónimos. Mientras que fitorremediación es el concepto, la fitoextracción es una tecnología limpia específica. El proceso de fitoextracción involucra el uso de plantas para facilitar la remoción de metales en el suelo (Kumar *et al.*, 1995).

En la práctica las plantas acumuladoras de metales son sembradas y trasplantadas en el suelo contaminado, después son cultivadas utilizando prácticas agrícolas establecidas. Las raíces de las plantas absorben metales del suelo y los translocan a otros órganos donde son acumulados a lo largo de su crecimiento. Si la disponibilidad del metal no es la adecuada para que la planta lo pueda tomar, se pueden utilizar agentes quelantes o acidificantes para liberarlos en la solución del suelo (Lasat *et al.*, 1998).

Después de que la planta crece lo suficiente y el metal se acumula, ciertas porciones de la planta son cosechadas y removidas, dando como resultado la

remoción permanente del metal. Algunas investigaciones sugieren que la incineración de los tejidos de las plantas reduce considerablemente el volumen del material que debería ser eliminado (Kumar *et al.*, 1995). En algunos casos los metales valiosos pueden ser extraídos de las cenizas y servir como una fuente de ingreso, para compensar los costos de la remediación (Cunningham y Wo, 1996).

La fitoextracción puede ser vista como una remediación de largo plazo, ya que requiere de varios ciclos de cultivo para reducir la concentración del metal (Kumar *et al.*, 1995). El tiempo para la remediación depende del tipo y extensión de contaminación por el metal, el tiempo y la época de crecimiento de la planta, así como de su eficiencia para remover el metal. El tiempo normal de remoción oscila en un rango de 1 a 20 años (Blaylock y Huang, 2000).

Algunos factores tales como el pH, potencial redox, textura, capacidad de intercambio catiónico, infiltración, entre otros, determinan la eficacia de la fitoextracción y remediación del sitio contaminado (Blaylock y Huang, 2000). La selección del sitio para el cual es aplicada esta tecnología de remediación es primordial. La fitoextracción es recomendable sólo en sitios que contienen de bajos a moderados niveles de contaminantes. Las tres características importantes que debe presentar una planta para la fitoextracción son: (1) capacidad para acumular el metal, (2) producir altas concentraciones de biomasa (Xu *et al.*, 2006) (3) presentar un factor de translocación (TF, relación de la concentración del metal en la parte aérea entre la concentración en las raíces) mayor que uno (Yuan *et al.*, 2007) y (4) un índice de bioacumulación (IB, relación de la concentración del metal en la planta entre la concentración en el suelo) mayor que 1 (Dowdy and McKone, 1997). Estas cuatro características combinadas darán como resultado una eficiente remoción del metal.

2.11.2 Rizofiltración

Los metales que están contenidos en aguas de procesos industriales y aguas subterráneas son comúnmente removidos por precipitación o floculación, seguidas de una sedimentación y posteriormente son eliminados con los lodos generados (Ensley, 2000). Una alternativa prometedora es la rizofiltración; técnica fitorremediativa designada para la remoción de metales en ambientes acuáticos. El proceso involucra el uso de plantas, cuyas raíces están en contacto con el flujo de agua contaminada, de la cual absorben el metal y lo concentran en sus raíces (Zhu *et al.*, 1999). Los exudados de la raíz y los cambios de pH pueden propiciar la precipitación del metal en la superficie de la raíz. Una vez que la planta logra su nivel máximo de acumulación, debe ser cosechada para la disposición final de toda su biomasa o sólo de la raíz (Zhu *et al.*, 1999).

Dushenkov y Kapulnik (2000) describen las características de la planta ideal para la rizofiltración; debe ser capaz de acumular y tolerar cantidades significativas del metal de interés, poseer un sistema radicular abundante con gran área superficial, ser de fácil manejo, bajo costo de mantenimiento y generar un mínimo de residuos secundarios.

2.11.3 Fitovolatilización

Algunos metales o metaloides contaminantes como el Se, As y Hg pueden existir como especies gaseosas en el ambiente. Las plantas sólo pueden volatilizar Se, mientras que los microorganismos son capaces de volatilizar As y Hg. Por ello, se ha buscado modificar genéticamente algunas plantas mediante la inserción de genes microbianos que hagan posible la fitovolatilización de As y Hg (Bizil *et al.*, 1999). La fitovolatilización de Se es un proceso cuya eficacia se ha comprobado en humedales, en condiciones reales. No obstante, su aplicación ha sido cuestionada toda vez que el Se es tóxico y por lo tanto, su presencia en la atmósfera no es deseable (Suszcynsky y Shann, 1995).

2.11.4 Fitoestabilización

La fitoestabilización también denominada fitoinmovilización, se basa en la estabilización de contaminantes por las raíces de las plantas (dentro de ellas o en la zona rizosférica) de manera que eviten o disminuyan su dispersión vía erosión hídrica o eólica, así como su migración hacia las aguas subterráneas (Schnoor, 2000). Esta técnica es una modificación del método de inactivación en el lugar, en el cual la función de las plantas es secundaria, ya que actúan como enmendantes del suelo. A diferencia de otras técnicas fitorremediativas, la meta de la fitoestabilización es no remover el metal del sitio, sino estabilizarlo y reducir el riesgo a la salud humana y al ambiente.

2.11.5 Fitodegradación

La fitodegradación consiste en la degradación de contaminantes orgánicos llevada a cabo por las plantas. En determinadas ocasiones, los compuestos que resultan de la degradación de los contaminantes le sirven a la planta para acelerar su crecimiento. En otras ocasiones, los contaminantes son degradados hasta dióxido de carbono y agua, los cuales son emitidos a la atmósfera. (Engwall y Hjelm, 2000). Con algunos contaminantes como trinitrotolueno, metil terbutil éter, tricloroetileno y algunos herbicidas la fitodegradación ha mostrado ser efectiva. (Morikawa y Erkin, 2003).

2.12 Antecedentes

La fitorremediación ofrece una gama de posibilidades para recuperar o estabilizar los suelos contaminados con metales. Sin embargo, el número de especies vegetales útiles para ser empleadas como fitorremediadoras, es limitado, por lo cual, diversos grupos de investigación se han enfocado a identificar plantas con potencial para acumular o estabilizar metales.

Peng *et al.* (2008), evaluaron la concentración de metales en dos plantas acuáticas (*Potamogeton pectinatus* L. y *Potamogeton malaianus* Miq.), así como en muestras de agua y sedimento obtenidas del río Donghes de la ciudad de Jishou de la provincia de Hunan, China. Estas muestras fueron estudiadas para investigar la contaminación de metales debida a la intensa actividad industrial en los alrededores de esta zona. Los resultados mostraron que las concentraciones de Cd, Mn y Pb en los sedimentos eran mayores que los niveles de ecotoxicidad propuestos por la Agencia de Protección al Ambiente de EUA (EPA, por sus siglas en inglés). De las dos plantas, la que presentó mayores concentraciones de metales en base seca fue *P. pectinatus* (596 mg Cd kg⁻¹, 318 mg Pb kg⁻¹, 62.4 mg Cu kg⁻¹, 6,590 mg Zn kg⁻¹ y 16,000 mg Mn kg⁻¹). También realizaron un experimento en laboratorio con *P. pectinus* y *P. malaianus* con la finalidad de observar la habilidad de estas plantas para remover metales pesados del agua del río Donghes. Los resultados obtenidos del experimento mostraron que las plantas tienen la capacidad de extraer 92% de Cd, 79% de Pb, 86% de Mn, 67% de Zn y 70% de Cu. El uso potencial de *P. pectinatus* y *P. malaianus* en el tratamiento de aguas residuales es de importancia para la remoción de metales, por lo que deberán ser tomadas en cuenta para futuras investigaciones.

Para el Ni, se sabe que la principal familia de plantas acumuladoras es la de las *Brassicaceae*, de la cual sobresalen las del género *Alyssum* L. con 48 especies. Todas estas especies se ubican en el sur de Europa, en el este del Mediterráneo y en Asia menor. Su presencia se correlaciona con la existencia de rocas tipo serpentinas y otras rocas ultrabásicas ricas en Ni (Baker *et al.*, 2000).

La captación y acumulación de metales por las plantas representan la entrada principal de metales tóxicos a la alimentación animal y humana. Un metaloide de preocupación en el ambiente es el As, así como los metales Cd, Hg y Pb. El Cd es uno de los más tóxicos y se presume que la vía de entrada es la de los metales Zn²⁺ y Fe²⁺, y los transportadores de Ca²⁺ son la base molecular de captación de

Cd^{2+} en las células vegetales. Algunos géneros como *Arabidopsis* y *Thlaspi* son acumuladores de Cd (Clemens, 2006).

Algunas especies de *Thlaspi* pueden hiperacumular más de un metal, por ejemplo *T. caerulescences* acumula Cd, Ni, Pb y Zn, *T. goesingense* y *T. ochroleucum* acumulan Ni y Zn, mientras que *T. rotundifolium* acumula Ni, Pb y Zn (Prasad y Freitas, 2003).

Brunner *et al.* (2008) estudiaron la capacidad fitoestabilizadora de *Picea abies* y *Populus tremula*, las cuales fueron colectadas en suelos contaminados con metales. Los resultados mostraron que ambas plantas acumularon entre 10 y 20 veces más de Cu y Zn con respecto a las plantas control. Las raíces de *P. abies* mostraron mayor capacidad de acumulación que las de *P. tremula*. Sin embargo, Brunner *et al.* (2008) concluyeron que la capacidad fitoestabilizadora de ambas plantas es baja, ya que la concentración de metales que lograron acumular representaba sólo entre 0.03 a 0.2% del total presente en el suelo.

Xu *et al.* (2006), reportaron a *Phytolacca acinosa* Robx como una planta hiperacumuladora de Mn, al acumular aproximadamente 19,300 mg Mn kg⁻¹, desarrollando gran cantidad de biomasa. Estas dos características hacen de *P. acinosa* una buena candidata para la fitorremediación de suelos contaminados con Mn. Otra hiperacumuladora es la planta australiana *Gossia bidwillii*, ya que acumuló 1.92 % de Mn en base seca (Bidwell *et al.*, 2002).

Phytolacca americana fue identificada como una planta acumuladora de Mn. La máxima concentración en base seca que se encontró en esta planta fue de 8,000 mg kg⁻¹. La planta se caracterizó por tener un alto factor de translocación (relación que guardan la concentración de hojas y tallo respecto de la raíz) (FT>10.76) (Yuan *et al.*, 2007). *P. americana* no pudo ser clasificada como hiperacumuladora porque no llega a acumular más de 10,000 mg kg⁻¹.

El As es un metaloide acerca del cual se han realizado varias investigaciones para evaluar el potencial de acumulación de diversas plantas. *Pteris vittata* es la planta acumuladora de As más estudiada. Esta especie acumuló cerca de 23,000 mg As kg⁻¹ por lo que se ha clasificado como hiperacumuladora (Ma *et al.*, 2001). Silva *et al.* (2006), realizaron un estudio comparativo entre *Pteris vittata* L. y *Nephrolepis exaltata* L., ambas especies se desarrollaron durante ocho semanas en suelos que contenían 105 mg As kg⁻¹. Los resultados mostraron que *P. vittata* desarrolló mayor cantidad de biomasa (7.38 vs 2.32 mg planta⁻¹) que *N. exaltata* y también removió más As (2.61 vs 0.09 mg As maceta⁻¹).

Una planta fitoestabilizadora de As es *P. umbrosa*, la cual posee una raíz eficiente para absorber el As, por lo que se considera que si se estimula el crecimiento de este órgano, el potencial fitoestabilizador de la planta podría incrementarse (Soller *et al.*, 2007).

Singh y Ma (2006) seleccionaron a *Pteris vittata* (hiperacumuladora de As) y *Pteris ensiformis* (no acumuladora) para estudiar la translocación y reducción del As, así como la distribución de fósforo (P). Las especies fueron expuestas a una concentración de 267 µM de arsenato de sodio durante 10 días. Trascorrido este tiempo, se analizó la cantidad de biomasa, la concentración de arsenato (As V), de arsenito (As III) y de P en ambas plantas. Los resultados mostraron que *P. vittata* absorbió al As como arsenito (As III) y lo acumuló principalmente en hojas, mientras *P. ensiformis* lo acumuló en raíz, pero como arsenato (As V). La capacidad que presenta *P. vittata* para acumular As puede atribuirse a la habilidad que tiene esta especie para reducir el arsenato a arsenito y a la capacidad para translocarlo de la raíz a las hojas, así como a la alta relación P/As en sus raíces. La concentración de As en *P. vittata* después de 10 días llegó a 1,041 mg kg⁻¹ mientras que *P. ensiformis* fue de sólo 155 mg kg⁻¹.

Chao-Yang y Tong-Bin (2006), colectaron muestras de suelo de una mina de As, la cual se ubica en Hunan, provincia al sur de China. El estudio se llevó a cabo

con ocho plantas de *Pteris cretica* y 16 de *Pteris vittata*, todas las plantas fueron sembradas en muestras de suelo extraídas de la mina. Para *Pteris vittata* el rango de concentración de As fue de 3-704 mg kg⁻¹, el IB fue de 0.06-7.43 y el FT fue de 0.17-3.98, mientras que *Pteris cretica* acumuló 149-694 mg As kg⁻¹, presentó un IB de 1.34-6.62 y un FT de 1-2.61. Los resultados indican que estos helechos tienen potencial para ser utilizados en procesos de fitorremediación de suelos contaminados con As.

Visoottiviseth *et al.* (2002), colectaron muestras de dos áreas mineras en Tailandia. Las concentraciones en el suelo variaron entre 21 y 14,000 mg As kg⁻¹ en Ron Phibun y de 540 a 16,000 mg As kg⁻¹ en Bannang Sata. Los criterios para seleccionar plantas para fitorremediación fueron: alta tolerancia al As, IB, ciclo de vida corto, propagación rápida y un gran desarrollo de biomasa. De las 36 plantas estudiadas se encontraron las siguientes: dos helechos (*Pityrogramma calomelanos* y *Pteris vittata*), una hierba (*Mimosa pudica*) y un arbusto (*Melastoma malabathricum*) las cuales parecen adecuadas para la fitorremediación de suelos contaminados con As.

Para 1989 se conocían cinco especies de plantas hiperacumuladoras de Pb: *Auopmeria martima*, *Thlaspi rotundifolium*, *Thlaspi alpestre*, *Alyssum wlfenianum* y *Polycarpaea synandra*, las cuales fueron reportadas por Baker y Brooks (1989). Por su parte, Kumar *et al.* (1995), reportaron que *Brassica juncea* cv 426308 logró concentrar hasta 34,500 mg Pb kg⁻¹ en base seca. Chehregani *et al.* (2009) reportaron como acumuladoras a *Cardaria draba* (827 mg Pb kg⁻¹), *Gundelia tournefortii* (652 mg Pb kg⁻¹), *Polygonum aviculare* (590 mg Pb kg⁻¹) y *Sacriola orientalis* (884 mg Pb kg⁻¹) y *Noea mucronata* (1,485 mg Pb kg⁻¹) como hiperacumuladoras, por tener la capacidad de acumular más de 1,000 mg Pb kg⁻¹.



OBJETIVOS



3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Identificar y clasificar especies vegetales tolerantes, acumuladoras o hiperacumuladoras de metales y metaloides en las zonas mineras de Molango y Zimapán en el estado de Hidalgo.

3.2 Objetivos específicos

Evaluar la disponibilidad del Mn, As y Pb en los sustratos, mediante la determinación de las propiedades fisicoquímicas, el fraccionamiento de Tessier, los diagramas de Pourbaix y de existencia predominio.

Identificar mediante claves dicotómicas las plantas de estudio para conocer las especies de metalófitas en cada zona minera.

Clasificar las plantas de acuerdo a su estrategia de acumulación en relación al Mn, As y Pb, en función de la concentración y distribución de cada elemento en sus órganos.

Evaluar el daño oxidativo en las plantas colectadas mediante la determinación del contenido de Malondialdehído (MDA).

Iniciar estudios de propagación en una de las plantas colectadas.

METODOLOGÍA



4 METODOLOGÍA

4.1 Descripción del área de estudio

4.1.1 Localización geográfica de la zona de estudio

El estudio se realizó en el estado de Hidalgo, en los municipios de Molango y Zimapán. Molango se ubica en el centro-orientado de la República Mexicana, entre las coordenadas $98^{\circ} 33'$ a $98^{\circ} 50'$ O y $20^{\circ} 40'$ a $21^{\circ} 05'$ N; y Zimapán, se localiza en la parte centro-poniente del país, entre las coordenadas $20^{\circ} 57'$ a $20^{\circ} 34'$ N y $99^{\circ} 12'$ a $99^{\circ} 33'$ O (Figura 2).



Figura 2. Zonas de estudio en el estado de Hidalgo

En el municipio de Molango se encuentra una de las minas más grandes en Latinoamérica, de la cual se extrae Mn, dicho mineral es empleado principalmente en la aleación de acero. En Zimapán, los metales de interés económico son Zn, Cu y Pb, cuya extracción ha provocado de manera indirecta la movilización del As presente en las rocas. En ambos lugares la extracción tanto de Mn como de As y Pb propicia que éstos sean transportados a otros compartimentos ambientales a través del viento, lluvia o escorrentía, en donde representan un peligro para los

organismos e incluso para los habitantes de las zonas. La probabilidad de encontrar plantas que puedan tolerar o acumular As, Pb y Mn es muy alta por ser zonas mineralizadas.

En Molango la selección de los sitios de muestreo se realizó conforme a un mapa de isoconcentración facilitado por la minera Autlán, además se consideró la facilidad de acceso para llegar a los sitios de muestreo. Con base en el mapa de isoconcentración se realizó la visita a dos lugares; un Río, el cual localmente es llamado “Río las Bombas” y una mina que se denominó “mina abandonada”. La vegetación presente en la orilla del río fue diferente de la que crecía alrededor, por lo que se colectaron las plantas predominantes de ambos lugares. En el caso de la mina abandonada se encontraron encharcamientos y puntos de vegetación abundante sobre las escorias.

En Zimapán se eligieron tres puntos (escorias, La Sabina y jal Los Sánchez), ya que la concentración de As en estos sitios es elevada.

4.2 Recolección y tratamiento de muestras

En cada zona se realizaron un total de tres muestreos, el primero (octubre de 2006) sólo fue un sondeo para verificar la existencia de vegetación, de dicho muestreo se colectaron plantas y sustratos para realizar el análisis de minerales. Es importante mencionar que para la selección de cada ejemplar se tomó en cuenta su abundancia, así como la cantidad de biomasa aérea que presentaba.

En el segundo muestreo (marzo 2007) realizado en Molango se colectaron un total de siete plantas (Tabla 2), en el tercer muestreo (septiembre 2007) se colectaron tres, dos en la mina abandonada y uno en el primer punto de muestreo. En el caso de Zimapán en el segundo muestreo (octubre 2007) se colectaron un total de cinco plantas (Tabla 3), en el tercer muestreo (noviembre 2007) se realizó

nuevamente un sondeo en los tres puntos ya muestreados y se colectaron tres plantas más.

Tanto en Molango como en Zimapán se colectaron cinco ejemplares de cada planta; dos se destinaron para la identificación y los restantes se emplearon para determinar la concentración de Mn, As y Pb.

Tabla 2. Localización geográfica de los sitios de muestreo en la zona de Molango, Hidalgo

Punto de muestreo	Longitud Norte	Latitud Oeste	Plantas colectadas
Río	20° 57' 026"	98° 44' 078"	Segundo muestreo: 7 Tercer muestreo: 1
Mina abandonada	20° 58' 779"	98° 44' 501"	Tercer muestreo: 2

Tabla 3. Localización geográfica de los puntos de muestreo en la zona de Zimapán, Hidalgo

Punto de muestreo	Longitud Norte	Latitud Oeste	Plantas colectadas
Escorias	20° 44' 056"	99° 23' 149"	Segundo muestreo 3 Tercer muestreo: 1
La Sabina	20° 43' 535"	99° 23' 187"	Segundo muestreo 1 Tercer muestreo: 1
Jal los Sánchez	20° 44' 157"	99° 23' 978"	Segundo muestreo 1 Tercer muestreo: 1

4.2.1 Prensado de plantas

Como se mencionó antes, dos ejemplares de cada especie fueron empleados para la identificación, los cuales fueron limpiados con una brocha y colocados individualmente en medio de una hoja de papel periódico doblada a la mitad. Cada ejemplar se acomodó de manera que fuera visible la raíz, flores y frutos. Las hojas se organizaron de manera que unas mostraran el haz y otras el envés. Una vez acomodados, se apilaron los ejemplares colocando un rectángulo de cartón entre cada uno de ellos, para finalmente poner la pila entre los dos extremos de la prensa y proceder al prensado (Figura 3). Posteriormente fueron enviados a diferentes herbarios (Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Universidad

Autónoma Metropolitana-Iztapalapa y Universidad Nacional Autónoma de México) donde especialistas del área de botánica las identificaron.

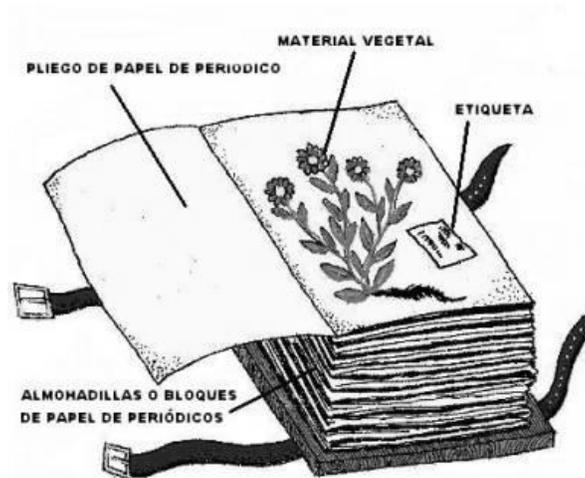


Figura 3. Prensado de plantas

Tomada de: <http://www.unioviado.es/BOS/Herbario/PrepararHerbario/imagen1.jpg>

La identificación de las plantas, así como el secado, montaje, etiquetado y encamisado de las mismas, lo realizaron los siguientes especialistas:

- M. en C. Miguel Ángel Villavicencio, L.Q. Blanca Estela Pérez Escandón y Dr. Arturo Sánchez González, del Centro de Investigaciones Biológicas de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
- Dra. Leticia Pacheco, del Departamento de Botánica Estructural y Sistemática Vegetal de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.
- M. en C. Ramiro Cruz Durán, del Herbario de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México.

4.2.2 Recolección y caracterización de sustratos

De cada lugar donde se colectaron plantas, también se obtuvieron muestras de sustrato (suelo, jal, escorias, sedimento) a una profundidad de 0-30 cm, éstas fueron guardadas en bolsas de polietileno de aproximadamente dos kilogramos.

Para su caracterización fisicoquímica las muestras de sustrato fueron secadas al aire y tamizadas con la ayuda de un tamiz de malla de 2 mm de diámetro con certificado NIST (Tyler, EUA). Por otra parte, la muestra fue secada en un horno a 105 °C y posteriormente molida con la ayuda de un mortero de ágata, esta muestra fue empleada para la determinación de Mn, As y Pb.

Se analizaron algunas propiedades fisicoquímicas que están relacionadas directamente con la disponibilidad y especiación de los minerales: pH medido en una suspensión 1:2.5 suelo agua (Thomas, 1996) utilizando un electrodo de pH/ORP (HANNA, Italy), el potencial redox (E_h) fue medido con el mismo electrodo de pH/ORP de acuerdo a Patrick *et al.* (1996). La conductividad eléctrica fue determinada en el extracto de saturación (CE_s) (Hess, 1972). La capacidad de intercambio catiónico (CIC) fue cuantificada de acuerdo al método de acetato de bario para suelos alcalinos y cloruro de bario para suelos ácidos (Jackson *et al.*, 1986) y la textura fue analizada por el método del hidrómetro descrito por Gee y Bauder (1986).

4.2.3 Recolección y caracterización del agua

En ambos lugares de estudio existen cuerpos de agua, así como pequeños cauces, en los cuales crecían plantas, de éstos se recolectaron muestras que fueron conservadas en refrigeración hasta su análisis. A estas muestras se les determinaron los siguientes parámetros: pH, conductividad eléctrica (CE), y E_h de acuerdo a la metodología reportada en APHA (2005).

De las muestras de agua se tomaron 100 mL y se filtraron con papel filtro (Whatman No. 42) para eliminar los sólidos suspendidos. El filtrado se utilizó para la cuantificación del Mn, As y Pb.

4.2.4 Extracción de metales en sustrato, planta y agua

Para las digestiones de metales totales y metaloide se utilizó un equipo de microondas modelo MarsX (CEM, EUA), con potencia de 1200 W y con un carrusel para 14 vasos de teflón con encamisado.

4.2.4.1 Método de digestión para sustratos, planta y agua

Las muestras de sustrato, planta y agua fueron digeridas de acuerdo a los métodos EPA 3051, 3052 y 3015 respectivamente (EPA, 1995 a, b, c). Además se realizó una extracción secuencial con los sustratos de Molango en función del método de Tessier *et al.* (1979).

4.2.5 Determinación de manganeso, plomo y arsénico

Las muestras digeridas fueron aforadas a 50 mL con una solución de HNO₃ al 3% preparada con agua desionizada, después se analizaron en un espectrofotómetro de absorción atómica (Varian 880) para la determinación de Mn y Pb.

Una vez aforadas, las muestras se guardaron en frascos de polietileno previamente lavados con HNO₃ al 3% y se mantuvieron en refrigeración para su mejor conservación (con esto se asegura que la muestras duren un máximo de seis meses).

Para la determinación de As primero se realizó una prereducción del As V a As III, de la siguiente forma:

- 1) De las muestras digeridas se tomó un alícuota de 5 mL.
- 2) Se adicionó 1 mL de KI al 5%, se dejó reaccionar durante un minuto (Figura 4 Rx 1).
- 3) Se adicionaron 3 mL HCl 5M, se dejó reaccionar durante cinco minutos.

- 4) Finalmente se adicionaron 2 mL de ácido ascórbico al 5% y se aforó a 25 mL con agua desionizada (Figura 4, Rx 2).
- 5) Se tiene un periodo de 15 días para analizar las muestras, antes de que éstas desarrollen coloración, en caso de existir coloración al momento de preparar las muestras adicionar 2 mL ácido ascórbico.

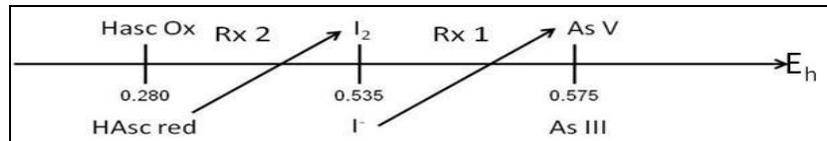


Figura 4. Esquema de pre-reducción

Donde:

Rx = reacción

HAsc = ácido ascórbico

Ox = oxidado

red = reducido

La determinación de As se realizó por generación de hidruros a partir de borohidruro de sodio al 3% como agente reductor en una solución de Hidróxido de Sodio al 1%.

4.3 Determinación del factor de translocación y del índice de bioacumulación

El factor de translocación (FT) fue calculado relacionando la concentración del metal en base seca en los órganos aéreos entre la concentración del metal en la raíz también en base seca (Ecuación 5, Deng *et al.*, 2004).

$$FT = \frac{[M \text{ en órganos aéreos}]}{[M \text{ en raíz}]} \quad (5)$$

Donde M: metal

El índice de bioacumulación (IB) representa la relación de la concentración del metal en la planta entre la concentración del metal en el suelo, ambas concentraciones en base seca (Ecuación 6, Dowdy y McKone, 1997).

$$IB = \frac{[M \text{ en la planta}]}{[M \text{ en el suelo}]} \quad (6)$$

Donde M: metal

4.4 Determinación de estrés oxidativo en plantas (malondialdehído)

Se pesaron 300 mg de planta fresca y se adicionaron 10 mL de ácido tricloroacético al 2.5 %, el sobrenadante se transfirió a un tubo y posteriormente se centrifugó a 4,000 rpm durante 20 minutos, luego se tomó 1 mL y fue transferido a un tubo ependorf de 2 mL, en donde se le adicionaron 50 μ L de sulfato ferroso 20 mM y 50 μ L ácido ascórbico 20 mM, luego se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente y se le añadieron 2 mL de ácido tiobarbiturico al 0.5 % (Preparación anexo 1) y 5 μ L de butil hidroxitolueno al 3.75% en metanol. El tubo fue calentado en baño María durante 30 minutos, posteriormente, para detener la reacción fue colocado en un baño de hielo y finalmente se tomaron las lecturas de absorbancia a 532 y 600 nm (Buege y Aust, 1978).

La concentración de MDA se calculó de acuerdo a la ecuación de Lambert Beer haciendo un ajuste para corregir la absorción no específica (Ecuación 7).

$$C_{MDA} = \frac{(A_{532nm} - A_{600nm})}{\epsilon * l} \quad (7)$$

donde:

$$\xi = 155 \text{ mM} \cdot \text{cm}^{-1}$$

$$l = 1 \text{ cm}$$

Las concentraciones de MDA determinadas en planta se reportan en nmol g^{-1} de peso fresco.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN
Molango



5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Zona 1: Molango, Hidalgo

5.1.1 Características fisicoquímicas de los sustratos y del agua

Las características fisicoquímicas de los sustratos evaluadas de la zona minera de Molango, Hidalgo se presentan en la tabla 4. El pH que presentaron los suelos, sedimentos y escorias va de ligeramente alcalino a alcalino (7.65-8.19), los valores encontrados de E_h indican que existen condiciones reductoras. Los sustratos presentaron valores de CE_s menores a 2 dS m^{-1} ($0.62\text{-}1.99 \text{ dS m}^{-1}$); en cuanto a la clase textural todos fueron arenosos, esto se debe a la explotación minera la cual propicia la eliminación de la capa superficial del suelo (Dorronsor, 2004). La CIC presentó valores en un rango de $17.81\text{-}30.00 \text{ cmol (+) kg}^{-1}$, es probable que la materia orgánica sea la responsable de la CIC, ya que en la zona existe exuberante vegetación por el clima húmedo templado, la abundancia de agua, entre otros. La CIC es un indicativo de que tan fácil el suelo puede intercambiar cationes con la solución del suelo y dejarlos disponibles para las plantas (Porta *et al.*, 1994), en este caso la CIC es uno de los factores que está facilitando que las plantas acumulen al Mn, así como otros elementos.

La concentración de Mn en el agua fue de $3.63 \text{ mg Mn L}^{-1}$ y la de mina $0.022 \text{ mg Mn L}^{-1}$. La concentración de Mn fue mayor en el agua del río, debido a que en ese cuerpo se descargan las aguas provenientes del lavado de las escorias. En cambio, el agua de mina provenía de filtraciones laterales en las paredes que quedaron en los cerros después de la explotación minera. Debido a que el Mn es un elemento esencial para los seres vivos, únicamente está normado su contenido en agua para uso y consumo humano ($0.15 \text{ mg Mn L}^{-1}$; NOM-127-SSA-1994).

Tabla 4. Características fisicoquímicas de los sustratos de la zona de Molango, Hidalgo

Sustrato	pH	E _h (mV)	EC _s (dS/m)	CIC (cmol (+) kg ⁻¹)	Clase textural	Planta colectada
1	8.19 (0.02)*	-35.19 (0.01)	1.95 (0.01)	26.25 (0.88)	Arenoso (suelo)	<i>Platanus mexicana</i>
2	7.70 (0.01)	-8.12 (0.16)	0.38 (0.00)	17.81 (1.33)	Arenoso (suelo)	<i>Cnidioscolus multilobus</i>
3	7.86 (0.01)	-49.90 (0.29)	1.20 (0.00)	30.00 (0.88)	Arenoso (suelo)	<i>Asclepius curassavica</i> L.
4	7.65 (0.01)	-52.45 (0.07)	0.62 (0.00)	18.75 (0.88)	Arenoso (suelo)	<i>Solanum diversifolium</i>
5	7.79 (0.01)	-40.95 (0.08)	1.77 (0.00)	18.44 (2.21)	Arenoso (suelo)	<i>Pluchea sympitifolia</i>
6	7.86 (0.01)	-46.07 (0.75)	1.10 (0.00)	25.00 (0.88)	Arenoso (sedimento)	<i>Equisetum hyemale</i> , <i>Xanthosoma robustum</i> and <i>Thelypteris kunthii</i>
7	7.66 (0.01)	-54.65 (0.49)	0.49 (0.00)	24.38 (1.77)	Arenoso (Escoria)	<i>Blechnum occidentale</i> , <i>Equisetum myriochaetum</i>

*Desviación estándar; E_h: Potencial redox; CE_s: Conductividad eléctrica en el extracto de saturación; CIC: Capacidad de intercambio catiónico

5.1.2 Manganeso en los sustratos

La concentración total de Mn en los sustratos (Tabla 5) varió entre 11,638 y 106,104 mg kg⁻¹. Estas concentraciones son entre 2 y 21 veces mayores que la propuesta por Visser, (1994) y Alloway (1995) de 5,000 mg Mn kg⁻¹ como concentración fitotóxica en un suelo o cualquier otro sustrato. Concentraciones similares a las encontradas en este estudio, han sido reportadas en trabajos realizados en la zona minera de Mn en Xiangtan, China. Wang *et al.*, (2008), encontraron concentraciones totales de Mn de 31,903 mg kg⁻¹ en escorias y 30,899 mg kg⁻¹ en suelo rizosférico. Liu *et al.*, (2006) quienes trabajaron en la misma zona, reportaron concentraciones totales de Mn de 151,684 mg kg⁻¹ en escorias y de 52,924 mg kg⁻¹ en suelos en los que se enterraron escorias.

Tabla 5. Concentración de manganeso en sustratos y en los órganos de las plantas colectadas en Molango, Hidalgo

	Hoja	Tallo	Flor	Raíz	Sustrato	FT	IB
	mg Mn kg ⁻¹						
<i>Platanus mexicana</i>	410.86 (5.11)*	253.71 (11.03)	Np	337.99 (2.18)	100,762.50 (1,354.28)	1.97	0.01
<i>Cnidioscolus multilobus</i>	730.00 (23.55)	333.78 (6.45)	Np	1,055.80 (22.27)	19,054.00 (112.04)	1.01	0.11
<i>Asclepius curassavica</i> L.	1,507.69 (9.78)	148.61 (2.66)	1,130.05 (235.00)	161.34 (1.20)	106,104.17 (3,755.36)	17.27	0.03
<i>Solanum diversifolium</i>	562.57 (49.92)	195.71 (3.46)	Np	110.78 (2.67)	94,220.83 (4,308.28)	6.84	0.01
<i>Pluchea sympitifolia</i>	182.96 (0.63)	1,062.58 (7.00)	Np	34.52 (0.36)	89,616.67 (4,407.92)	36.08	0.01
<i>Xanthosoma robustum</i>	376.28 (10.10)	48.15 (5.59)	Np	70.88 (0.65)	11,637.50 (263.39)A	5.99	0.04
<i>Thelypteris kunthii</i>	1,336.36 (61.43)	605.48 (30.26)	Np	6,842.36 (355.43)	A	0.28	0.75
<i>Equisetum hyemale</i>	Np	229.40 (4.70)	Np	5,266.30 (102.30)	A	0.04	0.47
<i>Equisetum myriochaetum</i>	1,844.31 (136.17)	684.01 (0.29)	Np	2,867.22 (171.15)	20,858.42 (1,288.11) B	0.88	0.26
<i>Blechnum occidentale</i>	69.40 (6.02)	1.52 (0.12)	Np	538.64 (27.66)	B	0.13	0.03

*Desviación estándar; Np: no presenta este órgano; FT: Factor de Translocación; IB: Índice de Bioacumulación; A: Mismo valor que *Xanthosoma robustum*; B: Mismo valor que *Equisetum myriochaetum*

5.1.2.1 Fraccionamiento de Mn

El método de extracción secuencial de Tessier *et al.* (1979) es uno de los más aceptados y utilizados para el análisis de la distribución de elementos traza en el suelo y sedimento (Accomasso *et al.*, 1993; Navas y Lindhorfer, 2002; Liu *et al.*,

2003). Tessier *et al.* (1979) separa los metales traza en cinco fracciones las cuales pueden ser afectadas por varias condiciones ambientales: Fracción 1 (F1); metales fácilmente intercambiables; se ha demostrado que los metales pueden ser adsorbidos y desorbidos por la matriz del suelo, y quedar disponibles en la solución del mismo. Fracción 2 (F2); metales unidos a carbonatos y susceptibles al cambio de pH. Fracción 3 (F3); metales unidos a óxidos de Fe y Mn, cuando los metales están unidos a esta fracción pueden ser termodinámicamente inestables bajo condiciones anóxicas. Fracción 4 (F4); metales unidos a la materia orgánica, cuando la materia orgánica se llega a estabilizar difícilmente los metales unidos a ella pueden ser liberados, pero cuando se presentan condiciones oxidantes la materia orgánica puede ser degradada y liberar metales. Fracción 5 (F5); son los metales ligados a los minerales, forman parte de sus estructuras cristalinas. La liberación de metales de esta fase, sólo es posible por intemperismo.

En función del fraccionamiento que se realizó, se encontró la siguiente tendencia: $F5 > F3 > F4 > F2 > F1$. La secuencia que presentó este fraccionamiento coincide con el de otros autores tales como: Abollino *et al.*, (2002), Álvarez *et al.*, (2006) y Kalembkiewicz *et al.*, (2008) quienes encontraron características fisicoquímicas similares a los sustratos aquí estudiados. En la Figura 5 se observa que más del 90% del Mn está distribuido en las fracciones 5, 4 y 3. Debido a las características físicas y químicas que predominan en la zona, el Mn puede ser liberado de la F3, ya que cuando prevalecen condiciones reductoras los óxidos tienden a solubilizarse y por lo tanto dejan disponibles los metales que están unidos a ellos, además la concentración de Mn en esta fracción es elevada (3,250.75 a 30,474.58 mg kg^{-1}). La F1 (1.06-10.43 mg kg^{-1}) y la F2 (287.48-3,884.72 mg kg^{-1}) son otras de las fracciones de donde el Mn puede estar de forma disponible, ya que cualquier cambio de pH hacia la acidez podría propiciar la disponibilidad del Mn.

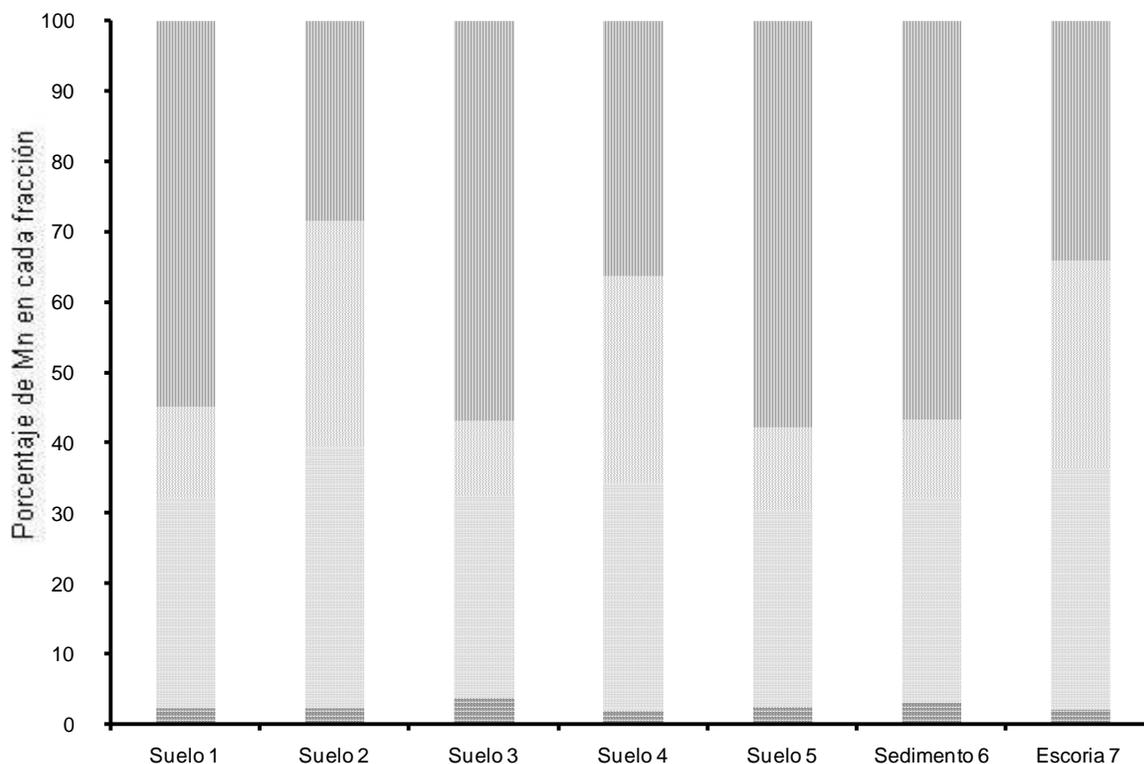


Figura 5. Fraccionamiento de manganeso (porcentajes) en sustratos de Molango, Hidalgo ||F5 ||F4 ||F3 ||F2 □F1

El pH y el E_h determinan la especie de un metal. Por lo que estos parámetros ubicados en el diagrama de Pourbaix (Figura 6) indicaron que la especie de Mn que predomina en Molango, es como hidroxocomplejo cuando se encuentra en la solución del suelo. Los valores de pH y E_h ubicados en el Diagrama de Existencia Predominio (DEP) aparecen en el umbral de la fase soluble e insoluble (Figura 7), por lo que es probable que el Mn esté en un equilibrio dinámico entre estas fases, lo cual permite que el Mn se encuentre como Mn^{2+} especie que asimilan las plantas.

En cuanto al agua se puede observar que la especie predominante es Mn^{2+} , de ahí que ésta sea una fuente importante de este elemento para las plantas que se encontraron en el sedimento, además el agua puede propiciar la disolución del Mn. Datos reportados por Turner *et al.*, (1981) indican que el Mn en solución a pH 6 existe en un 58% como Mn^{2+} , $MnCl_n^{2-n}$ 37%, $MnSO_4$ 4%, $MnCO_3$ 1% y Mn-

Humato 0.01%; a pH de 6 como Mn^{2+} 98% y $MnSO_4$ 2% y a pH 8.5 como Mn^{2+} 62%, $MnCO_3$ 35%, $MnOH^+$ 1% y $MnSO_4$ 1%, lo que indica que en un rango de pH entre 6 y 8.5 predomina la especie de Mn^{2+} , estos datos sustentan lo reportado en este estudio.

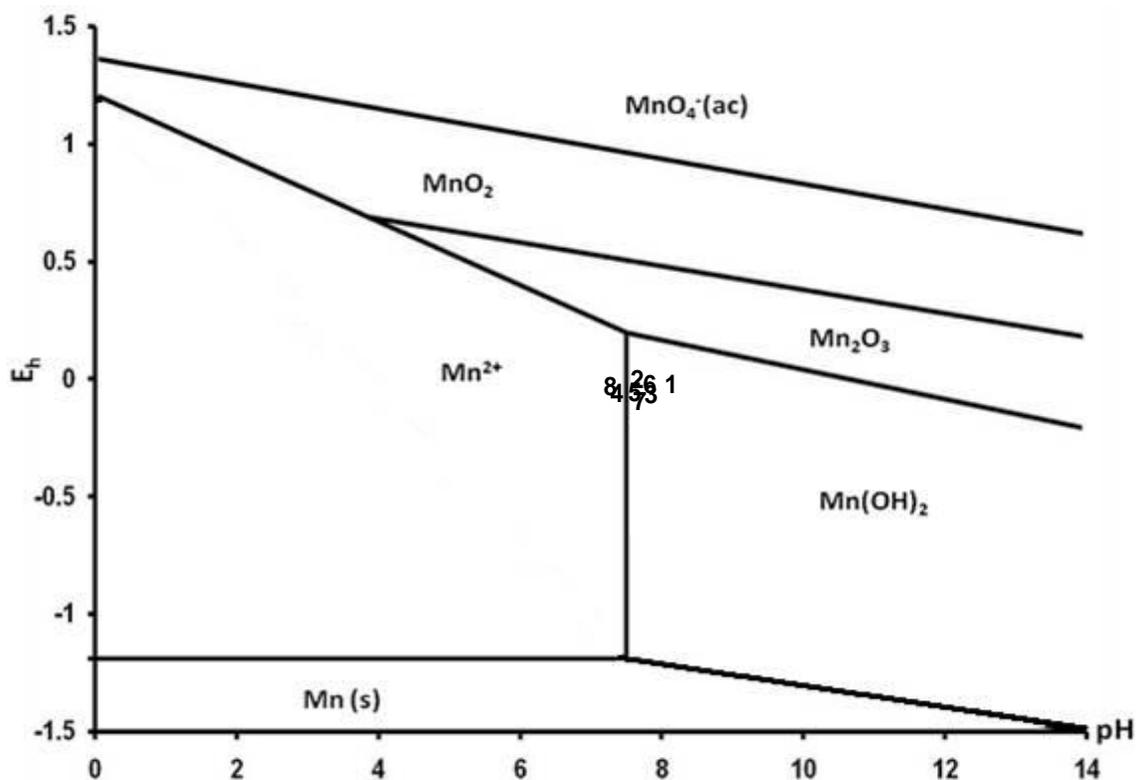


Figura 6. Diagrama de Pourbaix para Mn

1: *Platanus mexicana*; 2: *Cnidocolus multilobus*; 3: *Pluchea sympitifolia*; 4: *Asclepius curassavica* L.; 5: *Solanum diversifolium*; 6: *Equisetum hyemale*, *Xanthosoma robustum* and *Thelypteris kunthii*; 7: *Blechnum occidentale*, *Equisetum myriochaetum*; 8: agua.

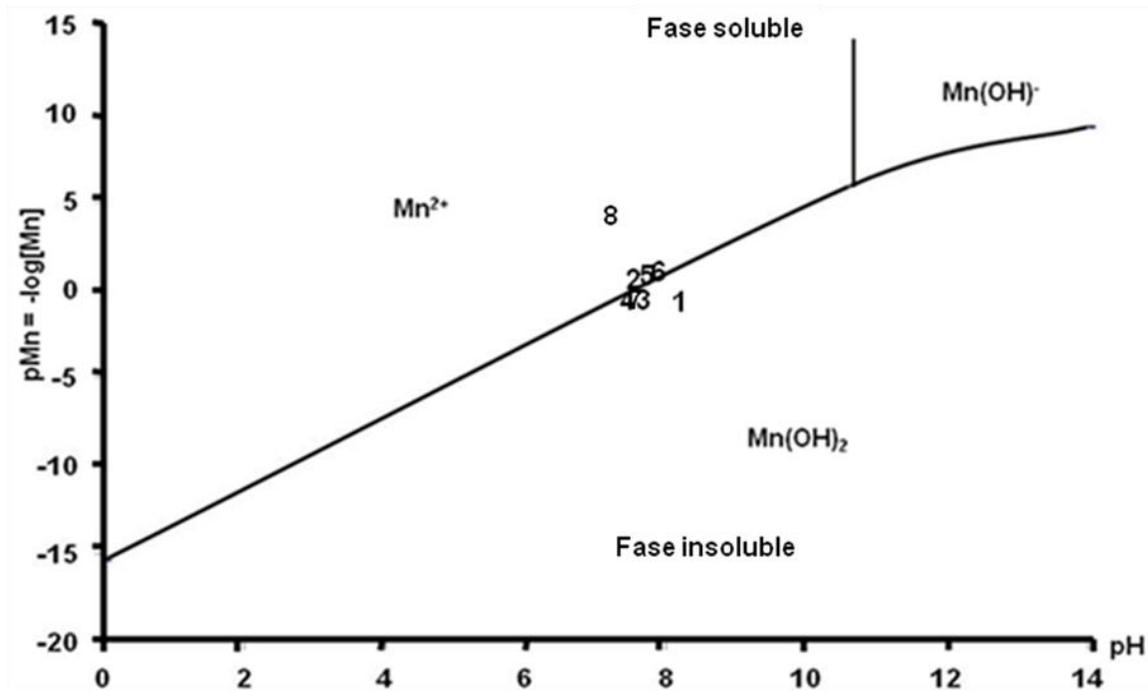


Figura 7. Diagrama de existencia predominio para Mn

1: *Platanus mexicana*; 2: *Cnidocolus multilobus*; 3: *Pluchea sympitifolia*; 4: *Asclepius curassavica* L.; 5: *Solanum diversifolium*; 6: *Equisetum hyemale*, *Xanthosoma robustum* and *Thelypteris kunthii*; 7: *Blechnum occidentale*, *Equisetum myriochaetum*; 8: agua.

5.1.3 Identificación y clasificación de las plantas tolerantes al manganeso

Se lograron identificar un total de 10 plantas de la zona de Molango, Hidalgo, sus nombres científicos son: *Platanus mexicana*, *Cnidocolus multilobus*, *Asclepius curassavica* L., *Solanum diversifolium*, *Pluchea sympitifolia*, *Xanthosoma robustum*, *Thelypteris kunthii*, *Equisetum hyemale*, *Equisetum myriochaetum* y *Blechnum occidentale* (ver imágenes en anexo 2), ninguna de estas plantas ha sido reportada como tolerante, acumuladora o hiperacumuladora de Mn en estudios previos de otros grupos de investigación.

Muchas especies toleran elevadas concentraciones de metales en el suelo porque restringen su absorción y translocación hacia órganos aéreos, lo que les permite mantener concentraciones constantes y relativamente bajas en la biomasa aérea independientemente de la concentración del metal en el suelo. Esta estrategia es empleada por las plantas excloras o tolerantes (Baker *et al.*, 2000). Por el

contrario las plantas acumuladoras absorben los metales activamente a partir del suelo y los acumulan en formas no tóxicas en su biomasa aérea a esto se le denomina estrategia de acumulación. Una respuesta intermedia es la que presentan las plantas indicadoras, cuya concentración metálica refleja la del suelo (Baker *et al.*, 2000).

La evaluación de la concentración de Mn en cada órgano de las plantas antes mencionadas indican que cinco de ellas lo acumulan principalmente en raíz (*Cnidioscolus multilobus*, *Thelypteris kunthii*, *Equisetum hyemale*, *Equisetum myriochaetum* y *Blechnum occidentale*) cuatro en hoja (*Platanus mexicana*, *Asclepius curassavica*, *Solanum diversifolium* y *Xanthosoma robustum*) y una en tallo (*Pluchea sympitifolia*), lo que indica que cada planta tiene diferente comportamiento de asimilación y estrategias de defensa ante un mismo elemento.

En la tabla 5 se muestra que *Platanus mexicana*, *Cnidioscolus multilobus*, *Asclepius curassavica* L., *Solanum diversifolium* y *Pluchea sympitifolia* presentan FTs superiores a uno (1.01-36.08), lo que indica que estas plantas presentan una estrategia de acumulación ante el Mn, pero esto no es indicativo de que puedan ser empleadas en fitoextracción, ya que las concentraciones que acumulan no son lo suficientemente elevadas (10,000 mg Mn kg⁻¹ BS) para considerarlas para este proceso. Posiblemente las raíces de estas plantas están restringiendo el paso al Mn y el que llegan a asimilar lo acumulan en sus órganos aéreos como un mecanismo de defensa (Kidd *et al.*, 2007). En cuanto al IB (0.01-0.11) es claro que la concentración que acumulan estas plantas es muy pequeña en comparación con la que existe en los sustratos.

Thelypteris kunthii, *Equisetum hyemale*, *Equisetum myriochaetum* y *Blechnum Occidentale* son plantas que acumularon mayoritariamente el Mn en raíz, lo que sugiere que estas plantas presentan una estrategia de exclusión ante el Mn, por lo que este metal puede estar formando complejos estables en las células de las raíces lo que impide su translocación hacia órganos aéreos, por presentar estas

características podrían ser empleadas en fitoestabilización o rizofiltración, ya que son plantas que pueden vivir en ambientes con elevada humedad (Schnoor, 2000 y Zhu *et al.*, 1999). Dentro de este grupo resaltan *Equisetum hyemale* y *Telypteris kunthii* por haber acumulado en la raíz 45% y 59% respectivamente, del Mn en el sustrato. Sería interesante evaluar la capacidad de inmovilización que puedan presentar estas plantas ante el Mn, al realizar experimentos en los que se incremente la producción de raíz en ambas plantas mediante cultivo de tejidos vegetales.

Xantosoma robustum a pesar de crecer en las mismas condiciones que *Thelypteris kunthii* y *Equisetum hyemale* no mostró el mismo comportamiento de acumulación, ya que ella presentó un FT superior a uno, lo que indica que puede ser acumuladora, no obstante la concentración acumulada sólo representa el 4.25% del Mn presente en el sustrato. Estos resultados indican que *Xantosoma robustum*, bajo las condiciones de los sustratos estudiados, presenta un comportamiento de exclusión con respecto al Mn, mediante el cual, compleja el metal en la zona de la rizosfera y limita eficientemente la absorción del elemento por las raíces.

Como se mencionó, para que una planta tenga aplicación en tratamientos de fitoextracción de Mn; debe acumular más de 10,000 mg Mn kg⁻¹ planta en base seca, presentar valores de IB y FT mayores que uno y producir grandes cantidades de biomasa. Es difícil encontrar plantas que cumplan con todas estas características, por ello, algunas como *Phytolacca acinosa*, se han clasificado como hiperacumuladoras sin tener un IB mayor a uno, porque acumula hasta 19,300 mg Mn kg⁻¹ planta en base seca y su FT varía entre 13 y 29 (Xue *et al.*, 2004). Esta misma planta, *P. acinosa*, fue reportada por Wang *et al.*, (2008) como acumuladora debido a que su FT fue igual a 1.45 y la concentración de Mn en toda la planta fue 1,374.7 mg kg⁻¹. Es importante mencionar que ambos grupos de investigación trabajaron en la misma zona minera de Mn en Xiangtan, China. Los datos anteriores confirman la complejidad que conlleva un proceso de

fitoextracción, porque la disponibilidad del metal varía espacialmente en una misma zona.

Los resultados mostrados por Xue *et al.* (2004) y Wang (2008), también permiten considerar la posibilidad de estudiar el comportamiento de las plantas del segundo grupo (*Thelypteris kunthii*, *Equisetum hyemale*, *Equisetum myriochaetum* y *Blechnum Occidentale*) bajo condiciones en las que la solubilidad del Mn sea mayor y de esta manera conocer las condiciones en que presentan su potencial máximo de acumulación.

5.1.4 Evaluación de estrés oxidativo en las plantas de Molango, Hidalgo

El contenido de MDA es un indicativo de estrés oxidativo (Prasad, 1999), así, tenemos que a mayor concentración de MDA en la planta mayor estrés y viceversa. Los resultados de MDA (tabla 6), indican que las plantas *Thelypteris kunthii*, *Equisetum hyemale* y *Equisetum myriochaetum*, presentan las concentraciones más bajas de MDA en comparación con las plantas clasificadas como acumuladoras en este estudio. Por lo que las plantas que estabilizan la mayor concentración de Mn en la raíz, limitan su translocación a la parte aérea y por lo tanto presentan un menor estrés. Otra posible razón es la concentración de Mn; si se analizan los datos de la tabla 4, se puede observar que las características fisicoquímicas son muy similares entre suelos y sedimento, e incluso si se considera el fraccionamiento (figura 5) es muy similar, la única diferencia es la concentración de Mn total (tabla 5), ya que en el sedimento la concentración es entre ocho a 10 veces más baja en comparación con los suelos, por lo que a mayor concentración de Mn en el sustrato mayor estrés en las plantas y menor asimilación del mismo.

Tabla 6. Comparación de la concentración de malondialdehído y manganeso en planta y manganeso en los sustratos de Molango, Hidalgo

Planta	Σ [Mn] en los órganos mg kg ⁻¹	Órgano con mayor acumulación	Sustrato [Mn] mg*kg ⁻¹	MDA nmol g ⁻¹ Pf
<i>Platanus mexicana</i>	1,001.70	Hoja	100,762.50 (1,354.28)	69.09 (2.31)
<i>Cnidioscolus multilobus</i>	2,119.58	Raíz	19,054.00 (112.04)	58.24 (8.54)
<i>Asclepius curassavica</i> L	2,947.69	Hoja	106,104.17 (3,755.36)	23.98 (2.47)
<i>Solanum diversifolium</i>	869.06	Hoja	94,220.83 (4,308.28)	154.75 (13.38)
<i>Thelypteris kunthii</i>	8,784.20	Raíz	11,637.50 (263.39) A	35.30 (0.11)
<i>Equisetum hyemale</i>	5,945.70	Raíz	A	12.05 (1.41)
<i>Xanthosoma robustum</i>	495.31	Hoja	A	31.58 (0.77)
<i>Pluchea sympitifolia</i>	1,280.06	Tallo	89,616.67 (4,407.92)	41.81 (0.84)
<i>Eqisetum myriochaetum</i>	5,395.54	Raíz	20,858.42 (1,288.11)B	37.93 (1.87)
<i>Blechnum occidentale</i>	609.56	Raíz	B	96.20 (2.67)

MDA: Malondialdehído; Pf: Peso fresco; A: mismo valor que *Thelypteris kunthii*; B: Mismo valor que *Equisetum myriochaetum*



RESULTADOS Y DISCUSIÓN
Zimapán



5.2 Zona 2: Zimapán, Hidalgo

5.2.1 Características fisicoquímicas en los sustratos

Las características físicas y químicas de la zona de Zimapán (tabla 7), indican que las plantas están sujetas a condiciones muy diferentes en los jales y en las escorias. Los jales presentan un pH que va de ligeramente ácido a alcalino (6.74-7.85), con condiciones ligeramente oxidantes a reductoras (24.53 - -39.20 mV), sin presentar problemas de salinidad, y una CIC media (20.63 -24.17 cmol (+) kg⁻¹). Las escorias presentaron condiciones oxidantes (234.70-279.47 mV) y fuertemente ácidas (2.23-3.02). Ambos sustratos presentaron valores de CE_s menores a 2 dS m⁻¹ y textura arenosa.

Datos reportados por Rodríguez *et al.* (2009) indican que los residuos de mina presentan valores de pH en un rango de 3.06-8.20 y una CIC entre 2.60-21.04 cmol (+) kg⁻¹, lo cual concuerda con lo reportado en este estudio. Los valores de pH ácido se deben a que los residuos de la minería contienen azufre el cual reacciona con el oxígeno y genera un ambiente ácido en la solución del suelo, con lo cual se propicia la disolución de metales y otros minerales (Moreno y Neretnieks, 2006).

Tabla 7. Características fisicoquímica de los sustratos de la zona de Zimapán, Hidalgo

Sustrato	pH	E _h (mV)	CE _s (dS/m)	CIC(cmol (+) kg ⁻¹)	Clase textural	Planta colectada
1	7.85 (0.03)*	-39.20 (0.44)	0.47 (0.01)	24.17 (0.95)	Arenoso (jal)	<i>Eschscholzia californica</i> , <i>Nicotiana glauca</i>
2	7.42 (0.02)	-15.27 (0.32)	0.54 (0.02)	23.13 (0.00)	Arenoso (jal)	<i>Viguiera dentata</i>
3	7.51 (0.02)	-19.07 (0.15)	0.77 (0.01)	20.63 (4.51)	Arenoso (jal)	<i>Brickellia veronicifolia</i>

5	6.74 (0.02)	24.53 (0.15)	0.84 (0.03)	22.50 (7.21)	Arenoso (jal)	<i>Flaveria trinervia</i>
4	3.02 (0.02)	234.70 (0.50)	1.44 (0.04)	9.58 (1.30)	Arenoso (escoria)	<i>Notholaena sulphurea</i> , <i>Argyrochosma formosa</i> ,
6	2.23 (0.03)	279.47 (0.49)	1.24 (0.01)	12.29 (1.44)	Arenoso (escoria)	<i>Ricinus communis</i>

*Desviación estándar; Eh: Potencial redox; CE_s: Conductividad eléctrica en el extracto de saturación; CIC: Capacidad de intercambio catiónico

5.2.2 Arsénico en sustratos

Las concentraciones de As en las escorias son mayores que en los jales, debido a que éstas están constituidas principalmente por arsenopirita (FeAsS), rejalgar (As₄S₄) y oropimente (As₂S₃). Dado que las escorias provienen del material parental, los suelos pueden contener varios cientos de mg kg⁻¹ de dicho elemento. Los valores en suelos contaminados, usualmente, varían dentro del intervalo de 300 a 5,000 ppm de As (Wild, 1974); el valor máximo reportado ha sido de 8,000 mg As kg⁻¹ (Levander, 1977). Lo cual concuerda con lo reportado en este estudio, excepto para el sustrato en el cual se encontró *Argyrochosma formosa* y *Notholaena sulphurea*, en el cual la concentración de As está por arriba de 10,000 mg As kg⁻¹ (Tabla 8).

Para saber en qué estado de oxidación se encontraba el As se elaboró un diagrama de Pourbaix (Figura 8), en el cual se intersecaron los valores promedio de pH y E_h de los sustratos, la intersección indicó que en las escorias fuertemente ácidas predomina As III y en los jales predomina As V. Para saber cuál era la especie predominante de As (III) presente en el sustrato se elaboró un diagrama de distribución de especies (DDE, Figura 9), en donde se observa que en los jales las especies predominantes son: el arsenato diácido (H₂AsO₄⁻) y arsenato ácido (HAsO₄²⁻), lo cual sugiere que estas son las especies que las plantas posiblemente están asimilando. En cuanto a las escorias la especie que probablemente predomina es el ácido arsenioso (H₃AsO₄, Figura 10).

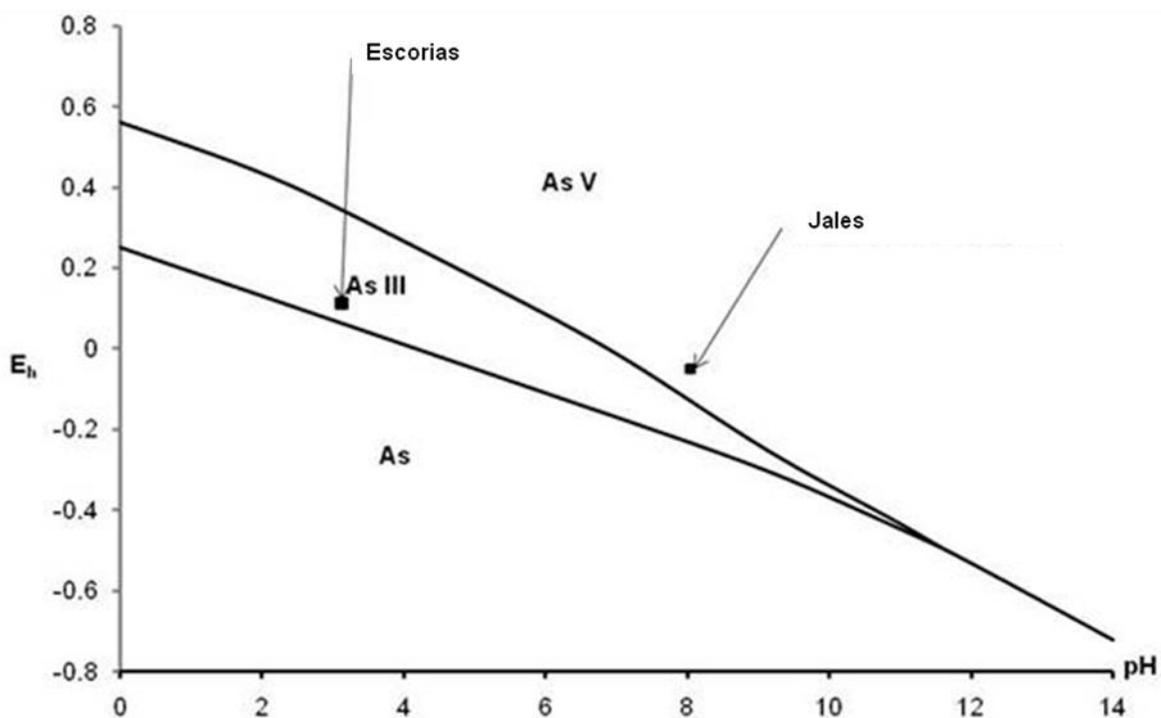


Figura 8. Diagrama de Pourbaix para As

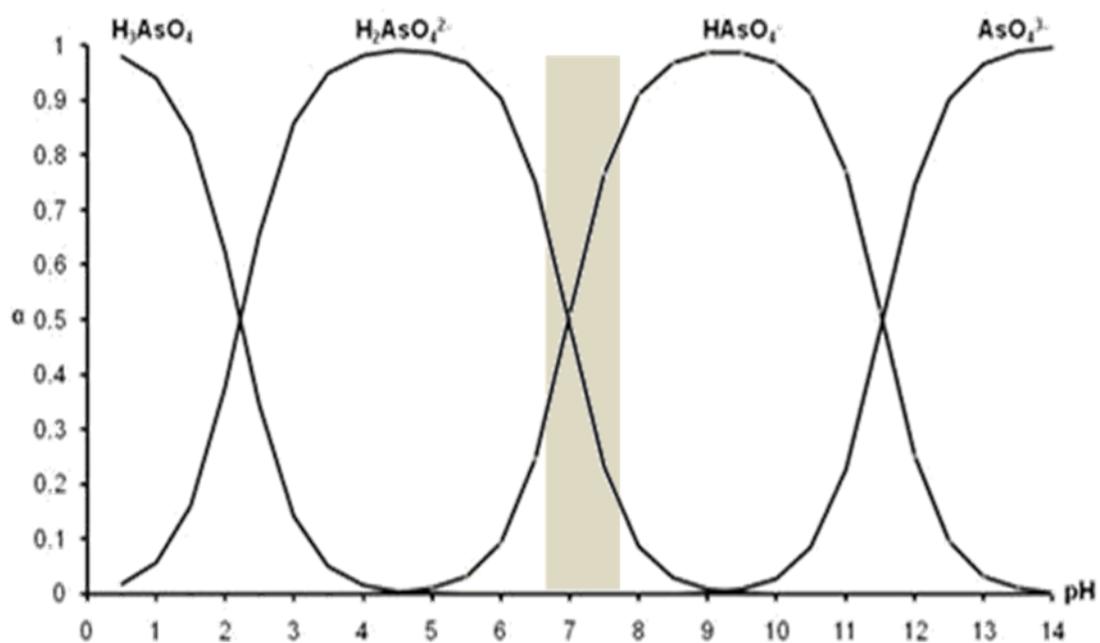


Figura 9. Diagrama de distribución de especies para As V.
 ■ Intervalo de pH en los jales

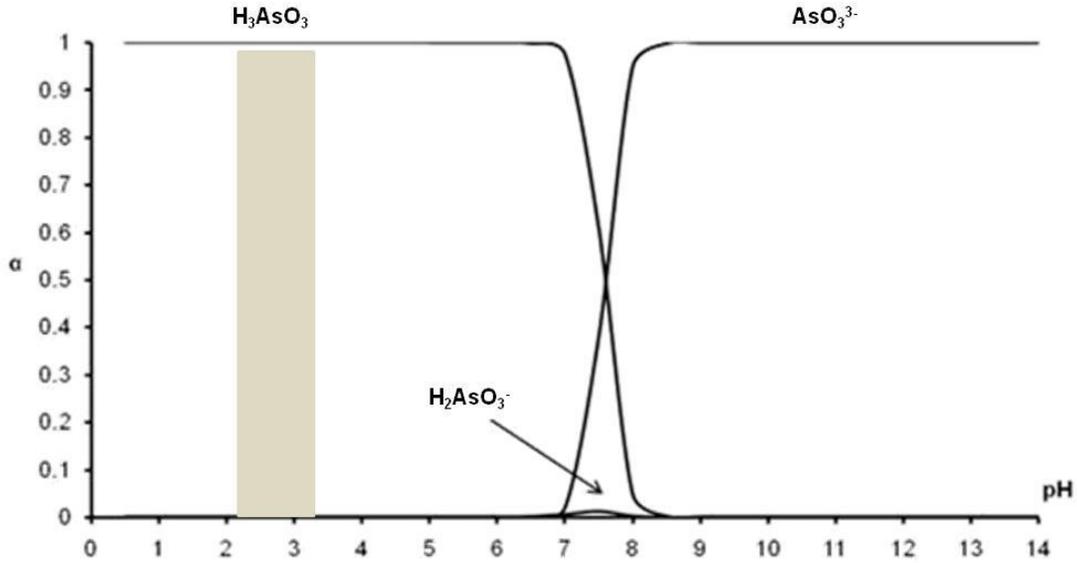


Figura 10. Diagrama de distribución de especies para As III.
 ■ Intervalo de pH en las escorias

Bajo condiciones reductoras, están presentes iones complejos de sulfuros y As, y el arsenato sería probablemente la forma predominante. El As elemental y la arsina también pueden existir en medios fuertemente reductores. Sin embargo, el arsenato sería el estado de oxidación predominante como ácido arsénico (H_3AsO_4) bajo condiciones ácidas y el $H_2AsO_4^-$ que predominó bajo condiciones alcalinas (Bohn, 1976).

5.2.3 Identificación y clasificación de las plantas tolerantes al arsénico

La clasificación hecha indica que las plantas colectadas pertenecen a las siguientes especies (Mickel y Beitel, 1988; Mickel, 1992; Moran y Riba, 1995): *Nicotiana glauca*, *Viguiera dentata*, *Ricinus cumunis*, *Eschscholzia californica*, *Brickellia veronicifolia*, *Flaveria trinervia*, *Notholaena sulphurea* y *Argyrochosma formosa* (ver imágenes en Anexo 3), ninguna de estas especies ha sido reportada por otros autores como tolerante, acumuladora o hiperacumuladora de As y Pb.

Eschscholzia californica, *Viguiera dentata* y *Brickellia veronicifolia* presentaron concentraciones en hoja (471.62-725.41 mg de As kg^{-1}) y tallo (245.05-598.91 mg

de As kg^{-1}) consideradas fitotóxicas, además presentaron FTs superiores a uno (2.11-6.26), por lo que se pueden clasificar como acumuladoras y pueden ser candidatas para fitoextracción de As. De este grupo *Eschscholzia californica* es la que mostró las mejores características para poder ser empleada en fitoextracción, ya que su FT e IB fueron superiores a uno y mostraron buen desarrollo de biomasa.

Nicotiana glauca, *Argyroschisma formosa* y *Flaveria trinervia* en función de la concentración en hoja y tallo y sus FTs (1.41, 1.84 y 10.44 respectivamente) pueden ser clasificadas también como acumuladoras. *Flaveria trinervia* presentó un FT (10.44) elevado y un IB (0.72) cercano a uno, por lo que posiblemente podría ser empleada en procesos de fitoextracción, ya que su capacidad de acumulación es de 72% del As presente en el sustrato. *Ricinus communis*, a pesar de que presentó un FT superior a uno no puede ser considerada como fitoextractora, ya que el IB es muy pequeño (0.08), lo más probable es que esta planta bajo las condiciones fisicoquímicas y ambientales de Zimapán tenga una estrategia de exclusión ante el As y posiblemente el As asimilado lo transloca fácilmente a sus diferentes órganos como un mecanismo de defensa, por lo que puede ser clasificada como tolerante.

Finalmente *Notholaena sulphurea* presentó un FT inferior a uno (0.66), además el IB (0.04) de esta planta indica que está restringiendo el paso del As hacia órganos aéreos (estrategia de exclusión), por lo que sería apta para procesos de fitoestabilización o rizofiltración y por lo tanto puede ser clasificada como tolerante, ya que puede desarrollarse en condiciones de mineralización muy elevada de As.

Hoy en día se sabe que *Pteris vittata* es una planta ideal para la fitorremediación de suelos contaminados con As, pero Chao-Yang y Tong-Bin (2006) realizaron un estudio en el cual colectaron ocho plantas de *Pteris cretica* y 16 de *Pteris vittata* en Hunan, China que está cercana a una mina de As, encontraron que las plantas de *Pteris cretica* presentaron una concentración de As entre 3-704 mg kg^{-1} , IBs de

0.06 a 7.43 y FTs de 0.17 a 3.98; las de *Pteris vittata* presentaron una concentración de As entre 149-694 mg kg⁻¹, IBs de 1.34 a 6.62 y FTs de 1.00 a 2.61, esto es un indicativo que las plantas que son colectadas directamente de una zona mineralizada no presentan el mismo comportamiento de acumulación cuando se encuentran en condiciones adecuadas de nutrición, además los datos reportados por Chao-Yang y Tong-Bin (2006) presentan relación con los encontrados en nuestro estudio. Lo anterior sugiere que cuando se encuentren plantas acumuladoras en zona mineralizadas se deben realizar experimentos a nivel laboratorio en condiciones adecuadas para determinar el potencial real de acumulación o exclusión de una planta. Estos datos comprueban lo complicado que es realizar un proyecto de fitoextracción, porque aún cuando se les proporcionan a las plantas los nutrimentos necesarios, su comportamiento de acumulación no es homogéneo. Además por el tiempo que toma la fitoextracción, no es realmente competitiva, por eso esta técnica no ha demostrado ser eficaz a escala real.

La mayoría de las plantas colectadas en Zimapán presentaron un comportamiento homogéneo de acumulación ante el As en sus diferentes órganos (Tabla 8), esto se podría justificar debido a que una vez que el As ha sido asimilado por la planta, los compuestos de dicho elemento (particularmente como As pentavalente), fluyen a través de ella en pocas horas (Wauchope, 1983), moviéndose tanto simplástica (transporte activo de citoplasma a citoplasma) como apoplásticamente (transporte extracelular) (Carbonell *et al.*, 1995). Los pasos a seguir por los compuestos de As cuando son absorbidos por la raíz son (Wauchope, 1983):

- 1) raíz → xilema → hojas → floema,
- 2) hojas → floema → raíces.

El transporte de arsenito desde las raíces está limitado por su alta toxicidad para las membranas radiculares (Wauchope, 1983). El arsenato es más rápidamente asimilado y translocado, debido a su menor toxicidad, de tal forma, que si se

trabaja con cantidades no letales de este último compuesto, se pueden observar concentraciones similares tanto en hojas como en raíces (Carbonell *et al.*, 1995). Este comportamiento se observó en el presente estudio, ya que las plantas encontradas en los jales presentaron mayores concentraciones de As y una mejor distribución del mismo en sus órganos, posiblemente por las condiciones de pH y E_h que indican que el As está como arsenato ácido principalmente; mientras que las plantas encontradas en las escorias, lo acumularon en raíz y la especie presente de As por las condiciones de pH y E_h es el ácido arsenioso (As III, el cual es tóxico).

Existe una serie de antecedentes que indican que el arsenato compite con el fosfato como sustrato en su sistema de asimilación en una amplia variedad de especies: angiospermas, musgos, líquenes, hongos y bacterias (Meharg y Macnair, 1990). Meharg y Macnair (1990), parten del hecho de que ambos iones (arseniato y fosfato) son tomados por un sistema común (mayor afinidad por el fosfato). Una vez que el arseniato ha entrado en la célula es metilado y convertido en un derivado trimetilado, esto lo hace la planta como un mecanismo de defensa (Meharg y Macnair, 1990). Aunque los compuestos orgánicos de As pueden ser absorbidos desde la disolución de nutrientes a través de la raíz y en una menor proporción desde el suelo, su vía principal de entrada es a través de las hojas y tallos (Hiltbold, 1975). Su entrada es dependiente de la temperatura y de la permeabilidad de la superficie foliar (Carbonell *et al.*, 1995).

Tabla 8. Concentración de arsénico en sustratos y en los órganos de las plantas colectadas en Zimapán, Hidalgo

Planta	Hoja	Tallo	Raíz	Flor	Sustrato	FT	IB
	mg As kg ⁻¹						
<i>Eschscholzia californica</i>	634.62 (20.70)*	597.13 (11.61)	230.26 (3.50)	Np	1,018.30 (1.15)	5.35	1.44
<i>Viguiera dentata</i>	471.62 (41.63)	245.05 (15.24)	177.18 (12.06)	392.30 (33.29)	4,330.12 (54.26)	6.26	0.30
<i>Brickellia veronicifolia</i>	725.41 (33.15)	598.91 (37.39)	626.22 (18.32)	Np	5,474.96 (53.37)	2.11	0.36

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

<i>Nicotiana glauca</i>	289.60 (7.99)	60.06 (2.53)	237.68 (6.11)	Np	1,018.30 (1.15)	1.47	0.58
<i>Argyrochosma formosa</i>	346.83 (2.73)	192.24 (11.03)	293.62 (16.36)	Np	10,946.34 (43.21)	1.84	0.08
<i>Flaveria trinervia</i>	221.26 (18.54)	27.17 (2.31)	40.71 (2.88)	176.51 (12.41)	643.22 (5.55)	10.44	0.72
<i>Notholaena sulphurea</i>	78.78 (6.69)	82.29 (4.72)	244.77 (11.20)	Np	10,946.34 (43.22)	0.66	0.04
<i>Ricinus communis</i>	58.47 (1.84)	44.92 (2.49)	87.41 (1.60)	180.06 (13.63)	4,484.72 (82.89)	3.24	0.08

*Desviación estándar; Np: no presentó órgano; FT: Factor de translocación; IB: Índice de Bioacumulación

5.2.4 Plomo en los sustratos

En la tabla 9 se pueden observar que los valores de Pb son diferentes en los sustratos, las escorias que son los que presentaron las concentraciones más elevadas de (4,899.03-47,263.91 mg Pb kg⁻¹) mientras que los jales presentaron las concentraciones más bajas (16.63-157.51 mg Pb kg⁻¹). Los jales de esta zona no provienen de una mina de Pb, por lo que la presencia de este elemento se puede deber principalmente al viento que transporta las partículas y las deposita en los jales.

En función de las condiciones de pH y E_n, se puede deducir que la especie de Pb predominante en los sustratos ligeramente alcalinos es un hidroxocomplejo, que posiblemente esté en forma de precipitado debido a la baja solubilidad de este tipo de complejos de Pb (Silveira *et al.*, 2003). En las escorias, el Pb se encuentra como Pb²⁺ (especie soluble), y por lo tanto está más disponible que en los jales. Cuando se presentan valores de pH ácido la gran mayoría de metales tiende a oxidarse y por lo tanto presentan una mayor solubilidad, en este caso a un pH superior a 6.1 el Pb(OH)_n²⁻ⁿ estará de forma insoluble y cuando el E_n sea superior a 1.3 volts (Burriel *et al.*, 1994) la especie que predomina es Pb²⁺.

En sustratos ácidos se produce una competencia de los iones H^+ con los cationes metálicos por los sitios de intercambio, así se tiene que a pH ácido se produce desorción de los metales pesados, lo que aumenta su concentración en la solución del suelo y su biodisponibilidad (Alloway, 1995). Los pHs alcalinos pueden deberse a la presencia de minerales calcáreos. Al aumentar el pH los metales pesados son removidos de la solución del suelo y adsorbidos por los coloides del mismo, esto disminuye su biodisponibilidad (Basta y Tabatabai, 1992) debido a su precipitación como hidróxidos insolubles, carbonatos y complejos orgánicos (Silveira *et al.*, 2003). Los metales tóxicos pueden ocasionar varios problemas como fitotoxicidad sin sobrepasan niveles de concentración considerados como normales (10 mg Pb kg^{-1}). El uso de plantas para la restauración de ambientes contaminados es una tecnología que ha ido creciendo con el tiempo, no obstante hasta la fecha hay pocas especies conocidas con la capacidad de acumular altas concentraciones de contaminantes, específicamente metales tóxicos (Lasat, 2002).

5.2.5 Identificación y clasificación de las plantas tolerantes al plomo

La mayor concentración de Pb la presentaron las plantas colectadas en las escorias (*Ricinus communis*, *Notholaena sulphurea* y *Argyrochosma formosa*) lo acumularon principalmente en la raíz, las plantas colectadas en los jales lo acumularon en dos diferentes órganos; *Viguiera dentata*, *Eschscholzia californica* y *Brickellia veronicifolia* en tallo y *Nicotiana glauca* y *Flaveria trinervia* en hoja (Tabla 9).

En función de la concentración de Pb presente en cada uno de los órganos de las plantas, las especies identificadas en este estudio se pueden clasificar de la siguiente manera: *Notholaena sulphurea* y *Argyrochosma formosa* presentaron una estrategia de exclusión, por lo que pueden ser clasificadas como tolerantes y adecuadas para procesos de rizofiltración, debido a que acumulan al Pb principalmente en raíz; *Ricinus communis* es tolerante, ya que acumula

concentraciones superiores a 10 mg Pb kg^{-1} , pero inferiores a $1,000 \text{ mg Pb kg}^{-1}$ y además puede sobrevivir en condiciones de mineralización elevada, si bien estas plantas presentan los FTs e IBs más pequeños (Tabla 9), cabe destacar que la concentración presente en las raíces es muy elevada.

Viguiera dentata, *Eschscholzia californica*, *Brickellia veronicifolia*, *Nicotiana glauca* y *Flaveria trinervia* es probable que sean acumuladoras de Pb, a pesar de estar en un sitio no contaminado, ya que según la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004 un suelo debe presentar concentraciones superiores a $800 \text{ mg Pb kg}^{-1}$ para poderlo clasificar de esa forma. Por lo tanto el Pb presente en las plantas encontradas en los jales es muy probable que el viento haya transportado partículas de este elemento hasta la superficie de las hojas y estando ahí las plantas lo asimilaron, además si se observa la tabla 9 estas plantas presentaron los FTs e IBs mayores, es decir que las plantas están acumulando más Pb del que se encuentra en el sustrato, lo cual hace pensar que estas especies pueden ser acumuladoras, ya que la mayor concentración de Pb se detectó en sus órganos aéreos. En el caso de *Nicotiana glauca* no se pudo calcular el FT, porque la concentración de Pb sólo fue detectada en hoja.

Los resultados indican que *Notholaena sulphurea* y *Argyrochosma formosa* podrían ser empleadas en procesos de rizofiltración, ya que retienen concentraciones considerables de Pb en su raíz. Los contenidos de Pb en las plantas aquí presentes sólo han sido evaluados a nivel de campo, por lo que si se realizarán pruebas a nivel laboratorio es posible que la capacidad de acumulación de este elemento incremente bajo condiciones controladas.

Tabla 9. Concentración de plomo en sustratos y en cada órgano de las plantas colectadas en Zimapán, Hidalgo

	Hoja	Tallo	Raíz	Flor	Sustrato	FT	IB
	mg Pb kg ⁻¹						
<i>Viguiera dentata</i>	15.26 (0.35)*	36.81 (0.82)	14.81 (0.49)	3.78 (0.11)	101.81 (6.92)	3.77	69.40
<i>Eschscholzia californica</i>	24.82 (0.57)	58.32 (0.38)	33.62 (0.82)	Np	16.63 (0.86)	2.47	702.10
<i>Brickellia veronicifolia</i>	33.08 (0.29)	81.12 (0.89)	33.29 (0.61)	Np	157.51 (8.69)	3.43	93.64
<i>Notholaena sulphurea</i>	127.13 (3.32)	269.51 (23.62)	1,102.84 (69.21)	Np	47,263.91 (50.63)	0.35	3.17
<i>Argyrochosma formosa</i>	70.98 (7.01)	227.04 (2.26)	2,385.95 (180.01)	Np		0.12	5.68
<i>Ricinus communis</i>	13.05 (0.72)	Nd	64.03 (5.59)	Np	48,99.03 (66.20)	0.20	1.57
<i>Nicotiana glauca</i>	34.71 (2.73)	Nd	Nd	Np	16.63 (0.86)	-	-
<i>Flaveria trinervia</i>	94.47 (4.48)	22.01 (1.15)	25.98 (2.26)	50.34 (3.94)	23.65 (0.52)	6.42	815.10

*Desviación estándar; Nd: no detectado; Np: no presentó órgano; FT: Factor de translocación; IB: Índice de Bioacumulación

5.2.6 Evaluación de estrés oxidativo en las plantas de Zimapán, Hidalgo

En la tabla 10 se presentan las concentraciones de MDA en las plantas colectadas en la zona de Zimapán. Las plantas que presentaron las concentraciones más altas de MDA son: *Argyrochosma formosa*, *Notholaena sulphurea*, *Eschscholzia californica* y *Viguiera dentata* (167.30, 88.90, 78.32 y 60.80 nmol g⁻¹ pf, respectivamente), las dos primeras fueron colectadas en una escoria y la dos restantes en un jal. *Argyrochosma formosa* presentó capacidad para acumular As en hoja y Pb en raíz, *Notholaena sulphurea* en raíz, *Eschscholzia californica* y *Viguiera dentata*, los acumularon en hoja y tallo respectivamente, en función de esto se esperaría que *Notholaena sulphurea* presentara contenidos menores de MDA, ya que estos elementos no se encuentran presentes en órganos aéreos,

pero no sucedió así, esto puede deberse a una mayor producción de radicales libres oxidativo inducida por la acumulación de As y Pb y a una mayor sensibilidad a los mismos. Singh y Sinha (2005) han reportado que una de las principales causas en el incremento de MDA es debido a las altas concentraciones de metales tóxicos.

Ricinus communis presentó mayor estrés oxidativo ante As y Pb que *Brickellia veronicifolia*, *Nicotiana glauca* y *Flaveria trinervia*, a pesar de que *Ricinus communis* los acumuló en raíz y las demás en órganos aéreos, lo que indica que esta planta es más sensible a estos elementos tóxicos en comparación con las otras tres que los acumulan en tallo y hoja.

Tabla 10. Comparación de la concentración de malondialdehído, arsénico y plomo en plantas y arsénico y plomo en los sustratos de Zimapán, Hidalgo

Planta de Zimapán	Σ [As] en toda la planta mg kg ⁻¹	Órgano con mayor acumulación de As	Sustrato [As] mg kg ⁻¹	Σ [Pb] en toda la planta mg kg ⁻¹	Órgano con mayor acumulación de Pb	Sustrato [Pb] mg kg ⁻¹	MDA nmol g ⁻¹ pf
<i>Viguiera dentata</i>	1,286.15	Hoja	4,330.12 (54.26)	70.66	Tallo	101.81 (6.92)	60.08 (0.90)
<i>Eschscholzia californica</i>	1,462.01	Hoja y tallo	1,018.30 (1.15)	116.76	Tallo	16.63 (0.86)	78.32 (0.95)
<i>Brickellia veronicifolia</i>	1,950.54	Hoja	5,474.96 (53.37)	147.49	Tallo	157.51 (8.69)	30.68 (2.90)
<i>Notholaena sulphurea</i>	405.84	Raíz	10,946.34 (43.22)A	1,499.48	Raíz	47,263.91 (50.63)B	167.30 (8.58)
<i>Argyrochosma formosa</i>	832.69	Hoja	A	2,683.97	Raíz	B	88.90 (5.54)
<i>Ricinus communis</i>	190.8	Raíz	4,484.72 (82.89)	77.11	Raíz	4,899.03 (66.20)	36.47 (3.55)
<i>Nicotiana glauca</i>	587.34	Hoja	1,018.30 (1.15)	34.71	Hoja	16.63 (0.86)	30.00 (2.71)
<i>Flaveria trinervia</i>	465.65	Hoja	643.22 (5.55)	192.77	Hoja	23.65 (0.52)	28.68 (2.15)

MDA = Malondialdehído; pf: Peso fresco; A y B: Mismo valor que *Notholaena sulphurea*

CONCLUSIONES

En Molango, las condiciones alcalinas y reductoras de los sustratos favorecieron la presencia de Mn^{2+} , la cual es la forma más soluble y más fácilmente asimilada por las plantas. De acuerdo a los resultados de la extracción secuencial, se encontró que la mayor parte del Mn está unida a la fracción residual, y que el Mn unido a las fracciones de óxidos y de materia orgánica es el que más fácilmente puede liberarse.

Las metalofitas más abundantes en la zona de Molango fueron: *Platanus mexicana*, *Cnidoscolus multilobus*, *Asclepius curassavica* L., *Solanum diversifolium*, *Pluchea sympitifolia*, *Xantosoma robustum*, *Thelypteris kunthii*, *Equisetum hyemale*, *Equisetum myriochaetum* y *Blechnum occidentale*. Todas ellas mostraron capacidad para sobrevivir y reproducirse bajo concentraciones fitotóxicas de Mn.

Bajo las condiciones fisicoquímicas encontradas en los sustratos, *Thelypteris kunthii*, *Equisetum hyemale*, *Equisetum myriochaetum* y *Blechnum occidentale* mostraron una estrategia de exclusión frente al Mn; mientras que *Platanus mexicana*, *Cnidoscolus multilobus*, *Asclepius curassavica* L., *Solanum diversifolium*, *Pluchea sympitifolia* y *Xantosoma robustum* presentaron una estrategia de acumulación. Las plantas tolerantes o exclusoras, están realizando un trabajo de rizofiltración por encontrarse en un medio acuático; mientras que las acumuladoras, en realidad están funcionando como fitoestabilizadoras, debido a su bajo IB.

Dado lo anterior, se recomienda que en las próximas campañas de revegetación de las zonas ya explotadas por la minera, se empleen las plantas estudiadas para rizofiltración en las áreas donde se forman pequeños humedales naturales (con la cosecha de la planta completa) y para fitoestabilización en los suelos.

CONCLUSIONES

En función de las propiedades fisicoquímicas de los sustratos y los diagramas tanto de Pourbaix como de existencia la especie predominante de As en sustratos ácido es As III (H_3AsO_3) y en sustratos alcalinos As V (H_2AsO_4^- y HAsO_4^{2-}). La especie de Pb que predomina en los sustratos alcalinos es como hidroxocomplejo de Pb y como Pb^{2+} en los sustratos ácidos.

Las metalofitas más abundantes de la zona fueron: *Eschscholzia californica*, *Viguiera dentata*, *Brickellia veronicifoli*, *Nicotiana glauca*, *Argyrochosma formosa*, *Flaveria trinervia*, *Ricinus communis*, *Notholaena sulphurea*, dichas especies presentaron capacidad para sobrevivir y reproducirse bajo condiciones fitotóxicas de As y Pb.

Bajo las condiciones fisicoquímicas encontradas en los sustratos *Eschscholzia californica*, *Viguiera dentata*, *Brickellia veronicifoli*, *Nicotiana glauca*, *Argyrochosma formosa* y *Flaveria trinervia* se clasificaron como acumuladoras; *Ricinus communis*, *Notholaena sulphurea* tolerante al As. Las plantas clasificadas como acumuladoras podrían ser empleadas en procesos de fitoextracción, mientras que las tolerantes para fitoestabilización o rizofiltración. Para Pb *Notholaena sulphurea* y *Argyrochosma formosa* se clasificaron como tolerantes y adecuadas para procesos de rizofiltración o fitoestabilización; *Ricinus communis* tolerante; *Viguiera dentata*, *Eschscholzia californica*, *Brickellia veronicifolia*, *Nicotiana glauca* y *Flaveria trinervia* es probable que sean acumuladoras y *Nicotiana glauca* se clasificó como tolerante.

De las plantas colectadas tanto en Molango como en Zimapán, cinco pertenecen a la familia de las pteridofitas, de estas cinco tres resultaron con concentraciones de Mn muy por encima de la considerada como normal (*Thelypteris kunthii*, *Equisetum hyemale*, *Equisetum myriochaetum* y *Blechnum occidentale* de Molango), y una con concentraciones elevadas de Pb (*Notholaena sulphurea* de Zimapán), estas plantas se denominan como ancestrales en el planeta, pero a pesar de su antigua existencia parece que han logrado desarrollar mecanismos

que les permiten sobrevivir bajo condiciones de mineralización elevada. Estas plantas acumulan a los metales principalmente en raíz, lo que sugiere que pueden ser empleadas en procesos de rizofiltración o fitoestabilización.

Es interesante ver como las plantas presentan diferente sensibilidad ante un metal o metaloide, esto indica que cada planta presenta un diferente mecanismo de acumulación o defensa para cada elemento que asimila. Hasta la fecha no hay un dato que indique cual es la concentración límite de MDA para poder decir cuando una planta está presentando estrés oxidativo, por lo que es importante trabajar en este aspecto para establecer un límite, ya que para que una planta pueda ser empleada en procesos de fitorremediación no debe presentar estrés o síntomas de daño ante concentraciones elevadas de algún contaminante.

En estudios posteriores se recomienda realizar pruebas de propagación que indiquen una mayor capacidad de acumulación, con la finalidad de obtener organismos con mayor resistencia ante los metales, esto permitirá generar organismos más eficientes para la remoción de metales y por lo tanto es probable que los tiempos de remediación de suelos con el uso de plantas sea más corto.

7 BIBLIOGRAFÍA

- Abollino, O., Aceto, M., Malandrino, M., Mentasti, E., Sarzanini, C., Petrella, F. 2002. Heavy metals in agricultural soils from Piedmont Italy. Distribution, speciation and chemometric data treatment. *Chemosphere*. 49, 545-557.
- Accomasso, G.M., Zelano, V., Daniele, P.G., Gastaldi, D., Ginepro, M., Ostacoli, G. 1993. A study on the reproducibility of Tessier's extraction in a fluvial sediment and a comparison between different dissolution procedures in a reference material. *Spectrochim. Acta A: Mol. Spectrosc.* 49, 1205–1212.
- Adriano, D.C. 2001. Trace elements in the terrestrial environments: Biogeochemistry, bioavailability and risk of metals. Springer. New York. pp. 29-90.
- Aldape, F., Hernández, M.B., Flores, J.M. 1999. Manganese survey in airborne particulate matter from a mining area at Hidalgo State, México. *Nucl. Instr. And Meth.* 150, 363-369.
- Alloway, B.J. 1995. Heavy metals in soils. Blackie Academic and Professional, London. pp 11-37.
- Álvarez, M.J., López-Valdivia, M.L., Novillo, J., Obrador, A., Rico, I.M. 2006. Comparison of EDTA and sequential extraction tests for phytoavailability prediction of manganese and zinc in agricultural alkaline soils. *Geoderma*. 132, 450-463.
- APHA, AWWA, WPCF. 2005. Standard methods for the examination of water and wastewater, 17th edition. Published jointly by the American Public Health Association, American Water Works Association, Washington, D.C.
- Baker, A.J.M. 1981. Accumulators and excluders-strategies in the response of plants to heavy metals. *J. Plant Nutr.* 3, 643-654.
- Baker, A.J.M., Brooks, R.R. 1989. Terrestrial higher plants wich hyperaccumulate metallic elements. A review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery*. 1, 81-126.
- Baker, A.J.M., Mc Grath, S.P., Reeves, R.D., Smith, J.A.C. 2000. Metal hyperaccumulator plants: a review of the ecology and physiology of a biological resource for phytoremediation of metal-polluted soils. En: Terry,

- N., Bañuelos, G. (Eds.), *Phytoremediation of contaminated soil and water*. Lewis Publishers, Florida. pp. 85–107.
- Barceló, J., Poschenrieder, C. 2003. *Phytoremediation: principles and perspectives*. Institut d'Estudis Catalans, Barcelona. *Contributions to Sci.* 3, 333-344.
- Basta, N.T. 2004. Heavy metal and trace element chemistry in residual-treated soil: implications on metal bioavailability and sustainable land. En: Sustainable land application conference, January, 4-8, Florida; University of Florida.
- Basta, N.T., Tabatabai, M.A. 1992. Effect of cropping systems on adsorption of metals by soils: II. Effect of pH. *Soil Sci.* 153, 195-204.
- Bidwell, S.D., Woodrow, I.E., Batiannoff, G.N. 2002. Hyperaccumulation of manganese in the rainforest tree *Austromyrtus bidwilli* (Myrtaceae) from Queensland. *Australian Functional Plant Biology.* 29, 899-905.
- Bizil, S.P., Rugh, C.L., Summers, A.O., Meagher, R.B. 1999. Phytoremediation of methylmercury pollution: expression in *Arabidopsis thaliana* confers resistance to organomercurials. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 96, 6808-6813.
- Blaylock, M.J., Huang, J.M. 2000. Phytoextraction of metals. En: I. Raskin and B. D. Ensley (Eds.) *Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean-up the environment*. John Wiley & Sons, New York. pp 53-70.
- Bohn, H.L. 1976. Arsenic Eh - pH diagram and comparisons to the soil chemistry of phosphorus. *Soil Sci.* 121, 125-7.
- Brunner, I., Luster, J., Günthardt-Goerg, M.S., Frey, B. 2008. Heavy metal accumulation and phytostabilization potential of tree fine roots in a contaminated soil. *Environ. Pollution.* 152, 559-568.
- Buege, J.A., Aust, S.D., 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Meth. Ezym.* 52, 302-310.
- Burriel, M.F., Lucena, C.F., Arribas, J.S. y Hernández, M.J. 1994. Química analítica cualitativa. Paraninfo, España. pp 1012, 1027.

- Carbonell, A.A., Aarabi, M.A., DeLaune, R.D., Gambrell, R.P., Patrick, Jr W.H., 1998. Arsenic in wetland vegetation: availability, phytotoxicity, uptake and effects on plant growth and nutrition. *Sci. Total Environ.* 217, 189–99.
- Carbonell, A.A., Burlo, C.F.M., Beneyto, M.J.J. 1995. Arsénico en el sistema suelo planta: significado ambiental. Espagrafic, España. pp 53-73.
- Carrillo, G.R., González, C.M.C.A. 2006. Metal accumulation in wild plants surrounding mining wastes. *Environ Pollution.* 144, 84-92.
- Cenni, E., Bussotti, F., Galeotti, L. 1998. The decline of a *Pinus nigra* Arn. reforestation stand on a limestone substrate: the role of nutritional factors examined by means of foliar diagnosis. *Annales Des Sciences Forestieres.* 55, 567-576.
- Cervantes, C.J., Ramírez, J.L., Silver, J.L. 1994. Resistance to arsenic compounds in microorganisms. *FEMS Microbial.* 15, 355-367.
- CGM (Coordinación General de Minería), 2001. Informe técnico. Secretaría de Economía. México [On line]. Disponible en: <http://www.economidgm.gob.mx/informe/index.html>.
- Chaney, R.L., Li, Y.M., Brown, S.L., Homer, F.A., Malik, M., Angle, J.S., Baker, A.J.M., Reeves, R.D., Chin, M. 2000. Improving metal hyperaccumulator wild plants to develop commercial phytoextraction systems: approaches and progress. En: *Phytoremediation of Contaminated Soil and Water*. Lewis Publishers, Florida. pp. 129-158.
- Chao-Yang, W., Tong-Bin, C. 2006. Arsenic accumulation by two brake ferns growing on an arsenic mine and their potential in phytoremediation. *Chemosphere.* 63, 1048-1053.
- Chehregani, A., Noori, M., Lari, Y.M. 2009. Phytoremediation of heavy-metal-polluted soils: Screening for new accumulator plants in Angouran mine (Iran) and evaluation of removal ability. *Ecot. and Environ. Safety* 72, 1349-1353.
- Clemens, S. 2006. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie.* 88, 1707-1719.

- Coyne, M. 2000. Microbiología del suelo: un enfoque exploratorio. Paranifo. Madrid, pp. 193-202.
- Cunningham, S.D., Wo, H.J. 1996. Lead phytoextraction: Species variation in lead uptake and translocation. *New Phytologists*. 134, 75-84.
- Deng, H., Ye, Z.H., Wong, M.H. 2004. Accumulation of lead, zinc, copper and cadmium by 12 wetland plant species thriving in metal-contaminated sites in China. *Environ. Pollut.* 132, 29-40.
- Dorronsoró, C.F. 2004. Contaminación del suelo. Universidad de Granada (Ed.) Granada, p 15.
- Dowdy, D.L., McKone, T.E. 1997. Predicting plant uptake of organic chemicals from soil or air using octanol/water and octanol/air partitioning ratios and a molecular connectivity index. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 2448-2456.
- Dushenkov, S., Kapulnik, Y. 2000. Phytofiltration of metals. En: Raskin, I., Ensley, B.D. (Eds.) Phytoremediation of toxic metals using plants to cleanup the environment. John Wiley & Sons, New York. pp. 89-106.
- Eapen, S., D'Souza, S. 2005. "Prospects of genetic engineering of plants for phytoremediation of toxic metals". *Biotech Adv.* 23, 97-114.
- Engwall, M., Hjelm, K., 2000. Uptake of dioxin-like compounds from sewage sludge into various plant species assessment of levels using a sensitive bioassay. *Chemosphere*. 40, 1189-1195.
- Ensley, B.D. 2000. Rational for use of phytoremediation. En: Raskin, I., Ensley, B.D. (Eds.) Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean up the environment. John Wiley & Sons, New York, pp 3-12.
- EPA, 1995 a. Method 3052: Microwave assisted acid digestion of siliceous and organically based matrices. Disponible en: <http://www.sampleprep.duq.edu/dir/epa.html>
- EPA, 1995 b. Method 3051: Microwave assisted acid digestion of sediments, sludge, soils, and oils. Disponible en: <http://www.sampleprep.duq.edu/dir/epa.html>
- EPA, 1995 c. Method 3015: Microwave assisted acid digestion of aqueous sample and extracts. Disponible en: <http://www.sampleprep.duq.edu/dir/epa.html>

- Ernst, W.H.O., Verkleij, J.A.C. y Schat, H. 1992. Metal tolerance in plants. *Acta Bot Neerl* 41, 229-248.
- Gee, G.W., Bauder, J.W., 1986. Particle soil analysis, in: Klute, A. (Ed.), *Methods for Soil 9 Analysis. Part 1: Physical and Mineralogical Methods*. Soil Science Society of America, American Society of Agronomy. Madison Wisconsin, USA. pp. 383-411.
- Gionocchio, R., Baker, A.J.M. 2004. Metalofitas en América Latina: un recurso biológico y genético único poco conocido y estudiado en la región. *Rev. chil. hist. nat.* [online]. mar. 2004, vol.77, no.1 [citado 20 Septiembre 2007], p.185-194. Disponible en: <http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-078X2004000100014&lng=es&nrm=iso>. ISSN 0716-078X.
- González-Chávez, C., Harris, P.J., Dodd, J. y Meharg, A.A. 2002. Arbuscular mycorrhizal fungi confer enhanced arsenate resistance on *Holcus lanatus*. *New Phytol.* 155, 163-171.
- Hess, P. R., 1972. *A Text Book of soil chemical analysis*. Chemical Publishing. New York. pp 204-246.
- Hiltbold, A.E. 1975. Behaviour of organoarsenicals in plants and soils. In: Woolson, E.A. (Ed.) *Arsenical Pesticides*. American Chemical Society Symposium, Vol. 7, ACS, Washington, D.C. pp 53-69.
- <http://www.unioviado.es/BOS/Herbario/PrepararHerbario/imagen1.jpg>. 3 mayo de 2010.
- Huheey, J. E., Keiter, E. A., Keiter, R. L. 1997. *Química inorgánica principios de estructura y reactividad*. Oxford University Press-Harla México. pp 344-349.
- Jackson, M.L., Lim, C.H., Zelazny, L.W., 1986. Oxides, hydroxides, and aluminosilicates, in: Klute, A. (Ed.), *Methods for Soil Analysis. Part 1: Physical and Mineralogical Methods*. Soil Science Society of America, American Society of Agronomy, Madison Wisconsin. pp 101-150.
- Kabata-Pendias, A., Duska, S., Chlopecka, A., Gawinowska, T. 1992. Chapter 3: Background levels and environmental influences on trace metals in soils of the temperate humid zone of Europe. En: Adriano, D.C. (ed.).

- Biogeochemistry of trace metals. Advances in trace substances research. Ed. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida. pp. 62-75.
- Kalembkiewicz, J., Sitarz-Palezak, E., Zapala, L. 2008. A study of the chemical forms or species of manganese found in coal fly ash and soil. *Microchem. J.* 90, 37-43.
- Kidd, P.S., Becerra, C.C., García, L.M., Monterroso, C. 2007. Aplicación de plantas hiperacumuladoras de níquel en la fitoextracción natural: el género *Alyssum* L. *Revista Científica y Técnica de Ecología y Medio Ambiente.* 1-18.
- Kumar, P.B.A.N., Dushenkov, V., Motto, H., Raskin, I. 1995. Phytoextraction: The use of plants to remove heavy metals from soils. *Environ. Sci. and Technol.* 29; 5, 1232-1238.
- Laboreo, R.D., Panadero, A.J.M. 2000. Plantas que acumulan metales. En: Raskin I y BD Ensley (Eds.) Fitorremediación de metales tóxicos: usar las plantas para limpiar encima del ambiente. John Wiley & Sons, Nueva York, EUA, pp. 193-229.
- Lasat, M.M. 2002. Phytoextraction of toxic metals, a review of biological mechanisms. *J. Environ. Qual.* 31, 109-120.
- Lasat, M.M., Fuhrmann, M., Ebbs, S.D., Kochian, L.V. 1998. Phytoremediation of a radio cesium contaminated soil: evaluation of cesium-137 bioaccumulation in the shoots of three plant species. *J of Environ Qual.* 27; 1, 165-168.
- Levander, O. 1977. Nutritional factors in relation to heavy metal toxicants. *Federation Proceedings.* 36; 5, 1683-87.
- Leyval, C., Turnau, K., Haselwandter, K., 1997. Effect of heavy metal pollution on mykorrhizal colonization and function: physiological, ecological and applied aspects. *Mycorrhiza.* 7, 139-153.
- Lidon, F.C. 2002. Rice plant structural changes by addition of excess manganese. *J. of Plant Nutr.* 25, 287-296.
- Liu, W.X., Li, X.D., Shen, Z.G., Wang, D.C., Wai, O.W.H., Li, Y.S., 2003. Multivariate statistical study of heavy metal enrichment in sediments of the Pearl River Estuary. *Environ. Pollut.* 121, 377-388.

- Liu, Y.G., Zhang, H.Z., Zeng, G.M., Huang, B.R., Li, X. 2006. Heavy metal accumulation in plants on Mn mine Tailings. *Pedosphere*. 16; 1, 131-136.
- Lombi, E., Wenzel, W.W., George, G., Adriano, D.C. 2001. Dependency of phytoavailability of metals on indigenous and induced rhizosphere processes: a review. En: Groban, G.R., Wenzel, W.W. y Lombi, E. (Eds.) Trace elements in the rhizosphere CRC Press, Boca Ratón, Florida. pp. 3-24.
- Ma, L.Q., Komar, K.M., Tu, C., Zhang, W., Cai, Y., Kennelly, E.D. 2001. A fern that hyperaccumulates. *Nature*. 409, 579-579.
- Marin, A.R. 1995. Effect of soil redox potential and pH on nutrient uptake by rice with special reference to arsenic forms and uptake. Ph.D. Dissertation, Louisiana State University, Baton Rouge, LA.
- Marin, A.R., Pezeshki, S.R., Masscheleyn, P.H., Choi, H.S. 1993. Effect of dimethylarsenic acid (DMAA) on growth, tissue arsenic, and photosynthesis of rice plants. *J. Plant Nutr.* 16, 865-880.
- Marschner, H. 1995. Mineral Nutrition of higher plants. Academic Press, London, UK. p. 889.
- Meharg, A.A., Macnair, M.R. 1990. An altered phosphate uptake system in arsenate tolerant *Holcus lanatus* L. *New Phytol.* 116, 29-35.
- Meharg, A.A., Naylor, J., Macnair, M.R. 1994. Phosphorus nutrition of arsenate-tolerant and nontolerant phenotypes of velvetgrass. *J. Environ. Qual.* 23, 234-238.
- Mickel, J.T. 1992. Pteridophytes. In: R. McVaugh (Ed.). *Flora Novo-Galiciana*. 17, 120-431.
- Mickel, J.T., Beitel, J.M. 1988. Pteridophyte flora of Oaxaca, Mexico. Memoirs of the New York Botanical Garden. New York, EUA. 568 p.
- Mitchell, P., Barr, D. 1995. The nature and significance of public exposure to arsenic: a review of its relevance to South West England. *Environ. Geochem. Health.* 17, 57-82.
- Moran, R.C., Riba, R. 1995. Flora Mesoamericana. Psilotaceae and Salviniaceae. Universidad Nacional Autónoma de México, D.F., México.

- Moreno, L., Neretnieks, I. 2006. Long-term environmental impact of tailings deposits. *Hydrometallurgy*. 83, 176-183.
- Morikawa, H., Erkin, C.Ö. 2003. Basic processes in phytoremediation and some applications to air pollution control. *Chemosphere*. 53, 1553-1558.
- Naidu, R., Oliver, D., McConnell, S. 2003. Heavy metal phytotoxicity in soils. En: Langley A., Gilbey, M. y Kennedy, B. National Environment Protection Council (NEPC) Australian (Eds.) Proceedings of the fifth national workshop on the assessment of site contamination. pp. 235-241.
- Navarro-Aviñó, J.P., Aguilar-Alonso, I., López-Moya, J.R. 2007. Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. *Ecosistemas*. 2, 10-26.
- Navas, A., Lindhorfer, H. 2002. Geochemical speciation of heavy metals in semiarid soils of the central Ebro Valley (Spain). *Environ. Int.* 29, 61–68.
- NOM-127-SSA-1994 Norma Oficial Mexicana Salud ambiental, agua para uso y consumo humano - límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para potabilización. Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/127ssa14.html> Fecha de consulta: 10 agosto 2009
- NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004, Que establece criterios para determinar las concentraciones de remediación de suelos contaminados por arsénico, bario, berilio, cadmio, cromo hexavalente, mercurio, níquel, plata, plomo, selenio, talio y/o vanadio.
- Nordberg, G., 2001. Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo Capítulo 63: Metales: propiedades químicas y toxicidad. Tercera Edición. SEAS, España. p 63.23-63.28.
- Ortiz, M.R.G. 2005. Evaluación de metales pesados y metaloides en cultivos diversos de la región Zimapán, Hgo. México. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México
- Patrick, W.H., Gambrell, R.P., Faulkner, S.P., 1996. Redox measurements of soils, in: Sparks, D.L. (Ed.), Methods for Soil Analysis. Part 3: Chemical Methods.

- Soil Science Society of America, American Society of Agronomy. Madison Wisconsin, USA. pp. 1255-1273.
- Peng, K., Lou, Ch., Lou L., Li, X., Shen, Z. 2008. Bioaccumulation of heavy metals by the aquatic plants *Potamogeton pectinatus* L and *Potamogeton malaianus* Miq and their potential use for contamination indicators and in wastewater treatment. *Sci. Total Environ.* 392, 22-29.
- Pérez, C.B., Fernández, A.A., Fernández, G.E., Falque, L.E. 2001. Use of microwave single extractions for metals fractionation in sewage sludge samples. *Anal. Chim. Acta.* 431, 209–218.
- Pollard, A.J., Powell, K.D., Harper, F.A., Smith, J.A.C. 2002. The genetic basis of metal hyperaccumulation in plants. *Crit. Rev, Plant Sci.* 21, 539-566.
- Porta, C.J., López-Acevedo, R.M., Roquero, L.C. 1994. Edafología para la agricultura y el medio ambiente. Ed. Mundi-Prensa, Primera edición. Madrid, España, pp 739-744.
- Prasad, 1999. Heavy metal stress in plants from biomolecules to ecosystems. Springer. India. pp. 103-110.
- Prasad, M.N.V., Freitas, de O.H.M. 2003. Metal hyperaccumulation in plants- Biodiversity prospecting for phytoremediation technology. *J. Biotechnol.* 6; 3, 285-321.
- Reddy, G.N., Prasad, M.N.V. 1990. Heavy metal binding proteins/ peptides: Occurrence structure, synthesis and functions. A review. *Envir. Exp. Bot.* 30, 251-264.
- Reevers, R.D., Baker, A.J.H. 2000. Metal accumulating plants. En: Raskin I, Ensley Ed, editors. Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean up the environment. Ed. Wiley. New York. pp 193-229.
- Reisenaur, H.M. 1988. Determination of plant-available soil manganese. En: Graham, H.M., Hannam, R.J., Uren, N.C. (Eds.), Determination of plant-available soil manganese. Kluwer, Dordrecht, pp. 87-100.
- 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, 61-75.
- Robb, D.A., Pierpoint, W.S. 1983. Metals and Micronutrients: Uptake and utilization by plants. Academic Press, Inc. USA. pp 111-123.
- Rodríguez, L., Ruiz, E., Alonso-Azcárate, J., Rincón, J. 2009. Heavy metal distribution and chemical speciation in tailings and soils around a Pb–Zn mine in Spain. *J. of Environ. Management*. 90, 1106-1116.
- Ross, S.M. 1994. Toxic metals in soil-plant systems. John Wiley & Sons, New York, USA, pp. 27-188.
- Salt, D.E., Blaylock, M., Kumar, N.P.B.A., Dushenkov, V., Ensley, D., Chet, I., Raskin, I. 1995. Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. *Biotechnology*. 13, 468-474.
- Schnoor, J.L. 2000. Phytoestabilization of metals using hybrid poplar trees. En: Raskin, I. y Ensley, B.D. (Eds.) *Phytoremediation of toxic metals: using plants to cleanup the environment*. John Wiley & Sons, New York, pp. 133-150.
- Sharples, J.M., Meharg, A.A., Chambers, S.M., Cairney, J.W.G. 2000. Mechanism of arsenate resistance in the ericoid mycorrhizal fungus *Hymenoscyphus ericae*. *Plant Physiol*. 124, 1327-1334.
- Shaw, A. 1990. *Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects*. CRC Press, Boca raton, Florida. 355 pp.
- Silva, G.M.I., Ma, Q.L., Santos, G.A.J. 2006. Arsenic chemistry in the rhizosphere of *Pteris vittata* L. and *Nephrrolepis exaltata* L. *Environ Pollution*. 143, 254-260.
- Silveira, M.L.A., Alleoni, L.R.F., Guilherme, L.R.G. 2003. Biosolids and heavy metals in soils. *Scientia Agricola*. 60, 4, 793-806.
- Singh, N., Ma, Q.L. 2006. Arsenic speciation, and arsenic and phosphate distribution in arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. and non-hyperaccumulator *Pteris ensiformis* L. *Environ Pollution*. 141, 238-246.
- Singh, S., Saxena, R., Pandey, K., Bhatt, K., Singh, S. 2004. Response of antioxidant in sunflower (*Helianthus annuus* L.) grown on different

- amendments of tannery sludge: its metal accumulation potential, *Chemosphere*. 57, 1663-1673.
- Singh, S., Sinha, S. 2005. Accumulation of metals and its effects in *Brassica juncea* (L.) czern. (cv. Rohini) grown on various amendments of tannery waste, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 62, 118-127.
- Smith, K.A., Paterson, J.E. 1990. Manganese and cobalt. En: Alloway, B.J. (Ed.), Manganese and cobalt. John Wiley & Sons, New York, USA, pp. 224–244.
- Soller, E.C., Patrick, W.J., Rose, J.R., Offler, E.C., MacFarlane, R.G. 2007. *Pteris umbrosa* R. br. As an arsenic hyperaccumulator: accumulation, partitioning and comparison with the established As hyperaccumulator *Pteris vittata*. *Chemosphere*. 66, 7, 1256-1263.
- Suszcynsky, E.M., Shann, J.R. 1995. Phytotoxicity and accumulation of mercury subjected to different exposure routes. *Environ Toxicol and Chem.* 14, 61-67.
- Tessier, A., Campbell, P.G.C., Bisson, M. 1979. Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals. *Anal. Chem.* 51, 844–851.
- Thomas, G.W., 1996. Soil pH and soil acidity, in: Sparks, D.L. (Ed.), Methods for Soil Analysis. Part 3: Chemical Methods. Soil Science Society of America, American Society of Agronomy. Madison Wisconsin. USA. pp. 475-490.
- Turner, D.R., Whitfield, M., Dickson, A.G., 1981. The equilibrium speciation of dissolved components in freshwater and seawater at 25 °C and 1 atm pressure *Geochim. Cosmochim Acta.* 45, 855-881.
- Van Zwieten, L., Ayres, M.R., Morris, S.G. 2003. Influence of arsenic cocontamination on DDT breakdown and microbial activity. *Environ Pollut.* 124, 331-339.
- Vázquez, S., Goldsbrough, P., Carpena, R.O. 2006. Assessing the relative contributions of phytochelatinases and the cell wall to cadmium resistance in white lupin. *Physiologia Plantarum.* 128, 3, 487-495.
- Villeg, C., Solomon, E.P., Berg, L.R., Martin, D.W. 1996. *Biología de Villeg*. McGraw-Hill Interamericana. México, D.F. pp 235-251.

- Visoottiviseth, P., Francesconi, K., Sridokchan, W. 2002. The potential of Thai indigenous plant species for the phytoremediation of arsenic contaminated land. *Environ Pollution*. 118, 453-461.
- Visser, J.F.W. 1994. Contaminated land policies in some industrialized countries. The Hague: Technical Soil Protection Committee, The Netherlands.
- Wang, X., Liu, Y., Zeng, G., Chai, L., Xiao, X., Song, X., Min, Z. 2008. Pedological characteristics of Mn tailings and metal accumulation by native plants. *J. Chemosphere* 72, 1260–1266.
- Wauchope, R.D. 1983. "Uptake, translocation and phytotoxicity of arsenic in plants". En: Lederer, W.H y Fensterheim, R. (Eds.) Arsenic: Industrial, Biomedical, Environmental Perspectives. Arsenic Symposium, Gaithersburg, Maryland. Van Nostrand Reinhold Company. New York, N.Y. pp. 348-374.
- Wild, H. 1974. Geobotanical anomalies in Rhodesia. 4. The vegetation of arsenical soils. *Kirkia*. 9, 243-64.
- Xiao, E.Y., Xiao, F.J., Ying, F., Ejazul, I. 2005. Molecular mechanisms and genetic basis of heavy metal tolerance/hyperaccumulation in plants. *J. Integrative Plant Biol.* 9, 1025-1035.
- Xu, X.H., Shi, J.Y., Chen, Y.X., Xue, S.G., Wu, B., Huang, Y.Y. 2006. An investigation of cellular distribution of manganese in hyperaccumulator plant *Phytolacca acinosa* Roxb using SRXRF analysis. *J. Environ. Sci.* 4; 18, 746-751.
- Xue, S.G., Chen, Y.X. y Reeves, R.D. 2004. Manganese uptake and accumulation by two populations of *Phytolacca acinosa* Roxb. (Phytolaccaceae). *J. Environ. Pollution*. 131, 393-399.
- Yuan, M., Tie, B., Tang, M., Isao, A. 2007. Accumulation and uptake of manganese in a hyperaccumulator *Phytolacca americana*. *Mineral Eng.* 20, 188-190.
- Zheljazkov, V.D. y Nielsen, N.E. 1996. Effect of heavy metals on peppermint and cornmint. *Plant and Soil*. 178, 59–66.

- Zhu, Y.L., Zayed, A.M., Quian, J.H., De Souza, M., Terry, N. 1999. Phytoaccumulation of trace elements by wetland plants; II. Water Hyacinth. *J. Environ. Quality*. 28, 339-344.

ANEXO 1. Preparación de ácido tiobarbiturico (TBA al 0.5%).

Pesar para 20 mL 3.2 g de ácido tricloroacético (TCA) y 0.1 g de ácido tiobarbitúrico (TBA). Adicionar 5 mL de agua al TCA y después adicionar el TBA disolviéndolo con 5 mL de agua. Agregar 0.5 mL de ácido clorhídrico y aforar a 20 mL. La solución se puede calentar ligeramente para ayudar a disolver el ácido tiobarbitúrico.

ANEXO 2. Plantas identificadas como tolerantes y acumuladoras de manganeso en el municipio de Molango, Hidalgo*Asclepius curassavica* L.**Morfología**

Planta herbácea, de aproximadamente 50 cm de alto, al cortarla produce látex lechoso. Presenta hojas alargadas, de 5 a 6 cm de longitud y flores rojo-anaranjado, en inflorescencias; fruto de aproximadamente 5 cm de largo. Es una planta venenosa. Florece la mayor parte del año.

**Distribución geográfica**

Habita en potreros, en terrenos abandonados y a la orilla de caminos en áreas de bosque mesófilo de montaña y bosque tropical perennifolio. Se localiza en Molango, Xochicoatlán, Yahualica, Calnali, Tlanchinol, Atlapexco, Huautla, Huejutla y Huehuetla, Hidalgo. También se localiza en América tropical y subtropical, desde México hasta Argentina, naturalizada en Asia.

Usos

Planta medicinal.

Fuente: Villavicencio *et al.*, 2002.

Xanthosoma robustum

Morfología

Planta herbácea, robusta de aproximadamente un metro de alto; las laminas de las hojas miden 40 cm de largo por 30 cm de ancho; inflorescencia columnar, blanca, protegida por una hoja modificada.



Distribución geográfica

Crece en lugares abiertos preferentemente a la orilla de arroyos o lugares húmedos en bosque tropical perennifolio. Se localiza en los municipios de Atlapexco, Huautla, Huazalingo, Jaltocán, Orizatlán, Xochiatipan y Yahualica, Hidalgo. Nativa en México, Costa Rica, Guatemala, Honduras y Nicaragua.

Usos

Ornamental, medicinal y plaguicida

Fuente: Vilavicencio *et al.*, 2005.

Platanus mexicana Moric

Morfología

Árbol, de 20 a 40 m de altura; tronco generalmente derecho, con la corteza pardo-amarillenta con manchas blanco-cremosas y rojizas; hojas anchas (de 10 a 20 cm de largo) con tres lóbulos, las hojas nuevas son rojizas y las maduras verde-amarillento o grisáceo; flores masculinas y femeninas en cabezuelas separadas, globosas. Florece de febrero a mayo.



Distribución geográfica

Se encuentra en bosque mesófilo de montaña y bosque tropical perennifolio, principalmente a lo largo de ríos y arroyos. Se observa en Molango, Xochicoatlan, Tepehuacán, Tlanchinol y Huejutla, Hidalgo. Además de Puebla, Veracruz y Chiapas; también en Tamaulipas, San Luis Potosí, Guanajuato, Querétaro, Nuevo León y Oaxaca. A nivel internacional, se extiende desde México hasta Guatemala.

Usos

Medicinal y del tronco se obtiene madera empleada en la construcción

Fuente: Vilavicencio y Pérez 2006

Equisetum myriochaetum

Morfología

Planta de 1 a 2 m de alto, con tallos rectos articulados, verdes, huecos, estriados, ásperos al tacto, ramificaciones numerosas, delgadas; órganos reproductores en

conos que se encuentran en los extremos de las ramas y del tallo principal. Crece por manchones densos.



Distribución geográfica

Se encuentra en sitios húmedos de bosque tropical perennifolio y bosque mesófilo de montaña. En el estado de Hidalgo se localiza en Tepehuacán, Huejutla, Huazalingo y Huehuetla. Este tipo de planta está presente en Nicaragua, Costa Rica, Colombia, Venezuela, Ecuador, Perú y México (Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, Guerrero, Estado de México, Oaxaca, Puebla, Veracruz, Hidalgo, San Luis Potosí, Nuevo León y Chiapas).

Usos

Medicinal

Fuente: Villavicencio y Pérez 2006

Blechnum occidentale

Morfología

Planta con un tallo erecto o reptante, escamoso. La hoja está dividida una vez y la fértil es similar a la estéril



Distribución geográfica

México, Centro y Sur América

Usos

Ornamental, medicinal

Fuente: Red Nacional de Jardines Botánicos, 2008.

Equisetum hyemale

Morfología

Plantas de 60 a 180 cm de largo, tallo delgado en posición vertical, con múltiples surcos de color marrón a negro, aunque pueden ser cremas. No tiene ramas, en primavera se producen tallos cortos y que pueden ser fácilmente removidos en la arena, para su reproducción, sus esporas son transportadas en pequeños conos que se encuentran en las puntas de los tallos.



Distribución geográfica

Se encuentran en Norte América, incluyendo a Canadá y México, además de Europa y Asia.

Usos

Medicinal

Fuente: Olsen, 2007.

Thelypteris kunthii

Helechos de tallos que van de cortos a largos, de 4-8 mm de diámetro, hojas monomórficas, perennes, pecíolo de color paja, con base marrón. Se encuentran en caminos, ríos y bosques, los sumideros de piedra caliza.



Distribución geográfica

Estados Unidos de Norteamérica, México, Centroamérica en Costa Rica, América del Sur desde Colombia hasta Brasil.

Usos

Ornamental

Fuente: http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=1&taxon_id=233501285

Solanum diversifolium

Morfología

Arbusto de la familia de las solanáceas, de uno a tres metros de altura.



Distribución geográfica

Colombia, Costa Rica, México, Panamá, Venezuela.

Usos

Ornamental.

Pluchea sympitifolia

Morfología

Hierba gruesa; hojas alternas, simples, ovaladas, de base redondeada, margen entero redondeado; inflorescencia, flores de color rosa-morado.



Distribución geográfica

Estados Unidos de Nortemericia, México, Centroamérica.

Usos

Medicinal.

Fuente:

http://oncampus.richmond.edu/academics/flora-kiuic/pluchea_symphytifolia.html

Cnidosculus multilobus

Morfología

Arbusto o árbol, de 3 a 6 m de altura; planta urticante, con jugo lechoso; hojas grandes, de aproximadamente 30 cm de largo; con numerosas flores blancas, las cuales florecen en abril y mayo. Crece en los bosques mesófilos de montaña, y en sitios abiertos tales como los potreros.



Distribución geográfica

Xochicoatlán, Tepehuacán, Yahialica y Atlapexco, Hidalgo. Nativa en México, se extiende de México hasta Guatemala.

Usos

Alimenticio (masa para tortillas de maíz) y medicinal.

Fuente: Villavicencio y Perez, 1995.

ANEXO 3. Plantas identificadas como tolerantes y acumuladoras de plomo y arsénico en el municipio de Zimapán, Hidalgo

Viguiera dentata

Morfología

Planta herbácea perenne, de hasta 2.5 m de alto; tallo piloso o hispido; hojas opuestas o alternas en la parte superior, sobre pecíolos de 0.5 a 5.5 cm de largo, limbos generalmente ovados a romboideo-ovados, de 3.5 a 12 cm de largo, de 1 a 8 cm de ancho, de 10 a 13 flores; frutos y semillas de 3.5 a 4 mm de largo, negruzcos.



Distribución geográfica

Planta conocida desde suroeste de Estados Unidos de Norteamérica a Honduras y Cuba.

Usos

Hojas y tallo como forraje y flores como ornato

Fuente: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/viguiera-dentata/fichas/pagina1.htm>

Eschscholzia californica

Morfología

Es una planta anual o perenne de una altura de 30 a 60 cm, con pocas hojas; las flores son solitarias, con un largo pedúnculo y de un color amarillo-anaranjado, tienen forma de copa, con sépalos fusionados y 4 pétalos.



Distribución geográfica

La planta se desarrolla en vastas extensiones y dunas costeras, así como en llanuras, valles áridos y en los márgenes de los desiertos de California. Es una planta común en zonas templadas de América del Norte y del Sur.

Usos

En jardines se cultiva como planta ornamental y medicinal (es de acción sedante, hipnótico de carácter suave, analgésico).

Fuente: <http://www.infojardin.net/fichas/plantas-medicinales/eschscholzia-californica.htm>

Notholaena sulphurea

Morfología

Planta con hojas verdes en forma de estrella de hasta 10 cm de ancho, llega a tener una altura de 20 cm. Helecho nativo de desiertos, los cuales son tolerantes a la

sequía. Se puede encontrar en laderas rocosas, a menudo en la sombra de grandes rocas con otros helechos.



Distribución geográfica

En Nuevo León, México se encuentran alrededor de 12 especies, mientras que en México hay un total de 24 y en total el género incluye 30 especies reconocidas que sólo existen en el continente Americano.

Usos

Ornato.

Fuente: <http://www.flickr.com/photos/aztekium/4017149352/>

Ricinus communis

Morfología

Planta herbácea o arbustiva, anual o perenne, hasta 6 m de alto, con peciolo largo y lámina de la hoja orbicular, flores masculinas de 6 a 12 mm de largo, flores femeninas de 4 a 8 mm de largo; semillas algo aplanadas de 10 a 15 mm de largo, lisas, jaspeadas de café y gris.



Distribución geográfica

Es una maleza que crece en Atlapexco, Huautla, Huejutla, Huazalingo, Jaltocán, Orizatlán, Xochitiapan, Yahialica, Huehuetla, San Bartolo Tutotepec y Tenango, Hidalgo.

Usos

Medicinal: el té de semillas se utiliza para purgar, las hojas aplicadas en el estómago y en las plantas de los pies sirve para bajar la calentura.

Refrescante: Las personas en el campo acostumbran colocarse las hojas en la cabeza abajo del sombrero o el rebozo para refrescarse.

Plaguicida: Las semillas se agregan al maíz para combatir los gorgojos.

Fuente: Villavicencio *et al.*, 2002

Nicotiana glauca

Morfología

De 1.5 a 6 m de alto; tallo verdoso o azul-purpúreo; hojas: ovadas, elípticas o lanceoladas, lámina de 3 a 25 cm de largo, generalmente dos veces más larga que el pecíolo, por 1 a 8 cm de ancho, ápice agudo, base obtusa, sin pelos; flores con cáliz de 5 a 15 mm de largo, de 3 a 4 cm de largo por 4 a 7 mm de ancho, generalmente amarilla; el fruto es una cápsula de 7 a 15 mm de largo, ampliamente elipsoide; semillas más largas que anchas, de aproximadamente 0.5 mm de largo, café.



Distribución geográfica

América tropical, probablemente Sudamérica, naturalizada en muchas partes de América, Australia, África, Oceanía y Asia.

Usos

A veces es cultivado como ornamental.

Fuente:<http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/solanaceae/nicotiana-glauca/fichas/pagina1.htm>

Flaveria trinervia

Morfología

Planta normalmente de menos de 1 m, ocasionalmente hasta de 2 m de alto; tallo con rayas longitudinales (estriado), a menudo rojizas. Muy ramificada; las plantas bien desarrolladas tienen la forma como un arbusto. Pueden ser un poco leñosas en la base; hojas de 3 a 6 cm de largo, 1-2 cm de ancho, flores de hasta 2.5 cm de diámetro, ubicadas en la base de uno o varios pares de hojas; fruto de 2 a 2.5 mm de largo, plano, rojizo-negruzco.



Distribución geográfica

Sur de Estados Unidos de Norteamérica a Guatemala; Antillas, Sudamérica.

Fuente: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/flaveria-trinervia/fichas/pagina1.htm>

Argyrochosma formosa

Morfología

Hojas de dos a cuatro pinadas, monomorfas; peciolo con un haz vascular, es exclusivamente americana la mayor diversidad de especies se encuentra en el desierto de Chihuahuense del norte de México y el área adyacente de Texas.



Universidad Nacional Autónoma de México., 1995. Flora Mesoamericana Volumen 1: Psilotaceae a Salviniaceae, Mexico, D.F. p 119

Brickellia veronicifolia

Es un género de unas 100 especies de plantas de flores perteneciente a la familia Asteraceae. Se encuentran a través de Norteamérica, con muchas especies en el sur, especialmente Tejas. La mayoría son arbustos perennes, otras especies son muy parecidas a los cardos, que son de la misma familia. Algunas especies tienen un agradable aroma y otras son pestilentes.

**ANEXO 4.****1 PROPAGACIÓN DE *Thelypteris kunthii* en el laboratorio****2 INTRODUCCIÓN**

Los residuos provenientes de la actividad minera representan una fuente importante de contaminantes, principalmente metales, dichos residuos propician la contaminación de suelo, agua y aire. Debido al incremento de metales disponibles en los suelos, existe la posibilidad de encontrar especies capaces de tolerarlos y/o acumularlos. El Mn es un elemento esencial para las plantas, pero tóxico cuando sobrepasa concentraciones superiores a 500 mg kg^{-1} , en planta seca (Reeves y Baker, 2000). Adicionalmente, altos niveles de Mn en el suelo pueden conducir a un desbalance nutricional en las plantas, especialmente en relación con otros cationes divalentes tales como el Mg^{2+} y Ca^{2+} (Cenni *et al.*, 1998). En el caso del Mn hay

pocos reportes sobre plantas acumuladoras o hiperacumuladoras, por lo que encontrar nuevas especies resulta de gran interés para proponerlas en procesos de fitorremediación.

La mayoría de los estudios en el área de fitorremediación se han enfocado en angiospermas, dejando a un lado las capacidades de otras divisiones vegetales, como las pteridofitas. *Thelypteris kunthii* es una planta que pertenece a esta familia, en el presente estudio se encontró que acumuló concentraciones superiores a 5,000 ppm en raíz, además es una planta dominante en la zona minera de Molango, Hidalgo, que es un lugar con alta mineralización de manganeso.

La utilización potencial de esta especie en sistemas de fitorremediación de suelos contaminados con metales depende del desarrollo de un sistema de propagación para la especie y del establecimiento de un sistema experimental de bioacumulación que permita conocer más sobre éste. A continuación se describen los objetivos y metas del presente trabajo.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Generar esporofitos de *Thelypteris kunthii* resistentes al manganeso.

3.2 Objetivos particulares

- Propagar a *Thelypteris kunthii* a partir de esporas con el fin de conocer el ciclo de vida de esta especie.
- Establecer la resistencia del gametofito al manganeso, para determinar la concentración de Mn en la cual las esporas pueden germinar y desarrollar gametofitos adultos.

4 ANTECEDENTES

Los helechos son plantas criptógamas (plantas sin flor) vasculares que forman parte de las pteridofitas. Se desarrollaron en el periodo Devónico, hace aproximadamente 400 millones de años y aunque gran número de especies se extinguieron durante el Carbonífero, muchas otras han sobrevivido hasta nuestros días (Reyes *et al.*, 1995).

Los helechos están presentes en diferentes ecosistemas, tanto acuáticos como terrestres, manifestando una gran diversidad de especies y de formas de vida. En asociaciones con otros grupos de plantas forman comunidades vegetales cuya estructura y dinámica han sido estudiadas de manera integral a partir de 1990 en adelante (Pérez *et al.*, 1995).

A los helechos se les ha atribuido propiedades medicinales, pero principalmente son utilizados como ornamentación, específicamente en las regiones en las que el clima es cálido y húmedo lo que les permite sobrevivir en exteriores. Se considera que existen alrededor de 8,000 especies de helechos en el mundo y particularmente en México se calcula que hay aproximadamente 1000 de ellos. Son de gran diversidad en formas y tamaños, y su talla puede variar de unos cuantos centímetros hasta varios metros de altura (Reyes *et al.*, 1995; Riba *et al.*, 2000).

El ciclo de vida de los helechos se compone de dos fases: una generación esporofítica y otra denominada gametofítica. La generación esporofítica es la que normalmente se conoce como planta compuesta (hoja, tallo, raíz), generalmente en el envés de las hojas se forman esporangios, los cuales pueden estar agrupados en estructuras en forma discoidal conocidas como soros. Dentro de los esporangios se forman las esporas, que son resultado de divisiones meióticas de células madres esporofíticas y por tanto son haploides; cada una contiene únicamente un juego de cromosomas. Cuando los esporangios maduran, liberan miles de esporas que son llevadas por el viento azarosamente, lo que favorece su dispersión a través de

grandes distancias a diferentes sitios; en donde encuentran condiciones favorables para producir un gametofito (Reyes *et al.*, 1995).

De la misma forma en que las plantas con flores producen semillas para reproducirse, los helechos forman esporas, que son estructuras microscópicas de diferente origen y complejidad que las semillas. La generación gametofítica comienza con la formación de las esporas en el esporangio del helecho; las esporas germinan y forman diminutas plantas pluricelulares, conocidas como prótalos o gametofitos los cuales forman (estructuras) órganos sexuales masculinos y femeninos (anteridios y arquegonios), en los que se forman gametos que al unirse inician la fase diploide, es decir, la fase esporofítica (Reyes *et al.*, 1995).

El ciclo de vida de estas plantas inicia con la germinación de las esporas, generalmente se forman dos tipos de células: protálicas y rizoidales, las primeras tienen cloroplastos y las segundas generalmente carecen de ellos y son alargadas, la función de las células rizoidales es similar a la de una raíz, proporcionan a la diminuta planta sostén, agua y nutrimentos (Reyes *et al.*, 1995).

El gametofito joven en los primeros días tiene aspecto filamentososo, formado por una hilera de células, resultado de la división mitótica que definen el patrón de germinación. Posteriormente adquieren forma espatulada y presentan un meristemo pluricelular marginal que les permite continuar su crecimiento. Durante su desarrollo, dependiendo de la especie pueden formar tricomas o pelos, cuya función aún se desconoce (Reyes *et al.*, 1995).

La forma de los gametofitos maduros puede ser acintada, reniforme o cordiforme. Esta última en forma de corazón es la más frecuente en los helechos homospóricos. Los gametofitos son las plantas (fase sexual) sexuales de los helechos, cuando alcanzan su madurez forman órganos femeninos (arquegonios) y masculinos (anteridios). Aunque puede variar la localización de los gametangios en el talo, normalmente los arquegonios se forman por debajo de la escotadura meristemática,

en la región anterior al cojinete, y los anteridios en la región posterior del talo cerca de o entre los rizoides. Normalmente son (dioicos) bisexuales y la fecundación ocurre entre gametos del mismo gametofito (intragametofítica), en ocasiones pueden ser unisexuales (monoicos) y entonces la fecundación es entre gametos de gametofitos diferentes (intergametofítica) (Reyes *et al.*, 1995).

Los arquegonios de los helechos tienen una forma similar a la de una botella, donde unas células forman el cuello que sobresale de la superficie del talo y otras en la parte globosa rodean a la oosfera que es el gameto femenino y están sumergidas en el gametofito. Por otra parte los anteridios son estructuras simples, globosas compuestas principalmente de tres células (basal, anular y opercular), donde se producen los anterozoides, es decir los gametos masculinos, los cuales tienen, motilidad y por medio de agua se desplazan hasta el cuello de los arquegonios, por donde se introducen y descienden hasta fusionarse con la oosfera, de esta manera realizan la fecundación de un huevo o cigoto a partir del cual se inicia la generación esporofítica, (de 60 a 90 días para alcanzar la etapa esporofítica) (Figura 11) (Reyes *et al.*, 1995).

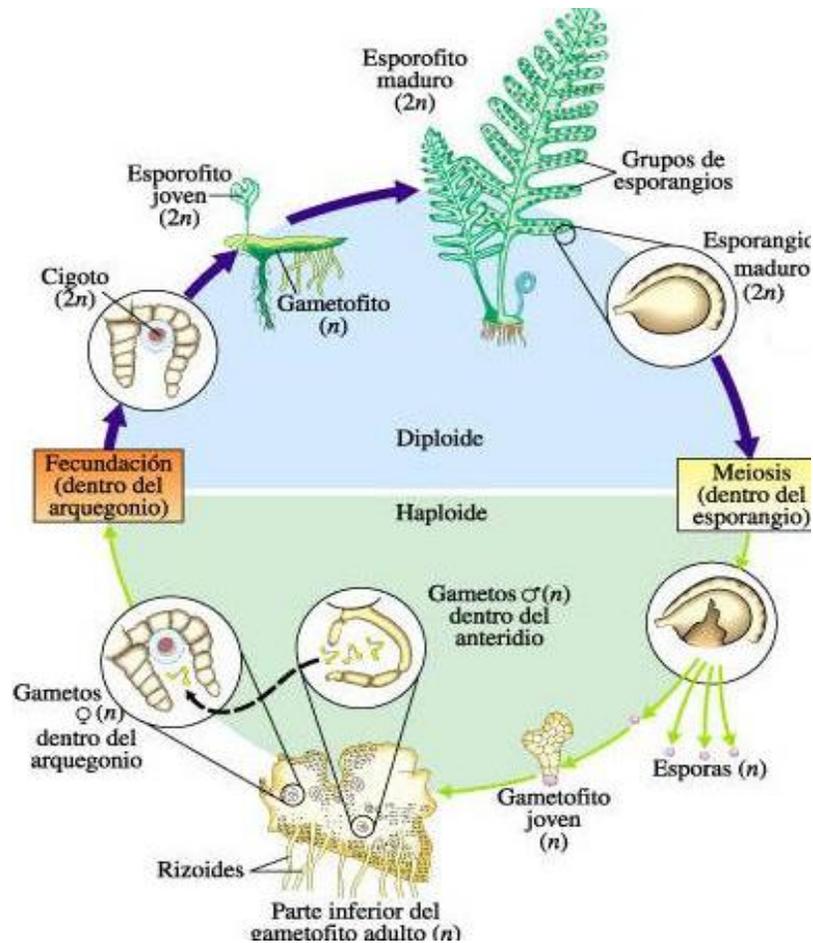


Figura 11. Ciclo de vida de los helechos

Tomada de:

http://www.fisicanet.com.ar/biologia/informacion_genetica/ap1/ciclo_vital_helechos4.j
pg

Los gametofitos de los helechos son plantas pequeñas, que pasan desapercibidas en gran parte por su tamaño y porque los helechos en su mayoría tienen otras formas de propagación vegetativa (Pérez- García y Reyes, 1993), sin embargo, la reproducción sexual y el principal intercambio de material genético, sólo se lleva a cabo por medio y a través de los gametofitos; con lo cual se incrementa su capacidad de adaptación para sobrevivir ante las presiones de selección ambiental, además que de esta forma los genes de restricción pueden expresarse más fácilmente (Reyes *et al.*, 1995).

4.1 Helechos y angiospermas empleados en la fitorremediación

A continuación se describen las principales especies de helechos y angiospermas que se consideran como tolerantes, acumuladores o hiperacumuladores de algunos elementos e incluso algunos se han empleado en procesos de fitorremediación.

Pteris cretica, *P. longifolia* y *P. umbrosa* son especies hiperacumuladoras de As (McGrath y Zhao 2003); *P. vittata* es la pteridofita más mencionada en la literatura debido a su capacidad extraordinaria de acumulación de As (Wei y Chen, 2006).

Se han encontrado además una amplia variedad de especies de pteridofitas en sitios contaminados, ejemplos de ellas son: *Asplenium adiantum-nigrum*, *A. cuneifolium*, *A. hybrida*, *A. presolanense*, *A. ruta-muraria*, *A. septentrionale*, *A. trichomanes*, *A. viride*, *Ceratopteris cornuta*, *Cheilanthes calyculata*, *Cheilanthes hirta*, *C. inaequalis* var. *Lanopetiolata*, *C. inaequalis* var. *inaequalis*, *Mohria lepigera*, *Nardia scalaris*, *Notholaena marantae*, *Oligotrichum hercynicum*, *Ophiglossum lancifolium* y *Pellea calomelanos* (Vara y de Oliveira, 2003).

Reeves y Baker (2000) reportaron 9 plantas hiperacumuladoras para Mn principalmente de las familias Apocynaceae, Cunoniaceae y Proteaceae, algunos estudios más recientes se describen a continuación.

Xu *et al.* (2006), encontraron que *Phytolacca acinosa* Robx es una planta hiperacumuladora de Mn, además desarrolla una gran cantidad de biomasa y crece rápido, por lo que es una buena candidata para la fitorremediación de suelos contaminados con Mn. *Phytolacca acinosa* acumula aproximadamente 19,300 mg Mn kg⁻¹ (Xue *et al.*, 2004), mientras que la concentración normal de este elemento en plantas varía entre 20-500 mg kg⁻¹ (Reeves y Baker, 2000). Liu *et al.* (2006), confirmaron en un experimento con *Phytolacca acinosa*, *Geiffine* y *C. canadienses*

que *P. acinosa* presentó alta capacidad extractiva y un mejor comportamiento para sobrevivir en altas concentraciones de Mn ($2000 \mu\text{mol/L}^{-1}$).

Phytolacca americana ha sido identificada como una nueva planta hiperacumuladora de Mn, la máxima concentración en base seca que se encontró en esta planta fue de $8,000 \text{ mg kg}^{-1}$. Por otro lado la planta se caracteriza por tener un alto factor de translocación (relación que guardan la concentración de hojas y tallo respecto de la raíz) (>10.76) (Yuan *et al.*, 2007). La planta australiana *Gossia bidwillii* es considerada hiperacumuladora de Mn, ya que acumula 1.92 % de Mn en base seca (Bidwell *et al.*, 2002).

En cuanto a estudios relacionados con helechos destacan los de Ma *et al.* (2001) en donde demuestra que *Pteris vittata* tiene un gran potencial para ser usada en la fitorremediación de suelos contaminados con As, esta especie acumula cerca de $23,000 \text{ mg As kg}^{-1}$.

Otras especies son *Pteris biaurita* L., *Pteris quadriaurita* Retz y *Pteris ryukyuensis* Tagawa hiperacumuladoras de As. El promedio de la concentración de As es de $1,770$ a $3,650 \text{ mg kg}^{-1}$ en los órganos aéreos y 182 a 507 mg kg^{-1} en las raíces de *Pteris biaurita* L., *Pteris quadriaurita* Retz y Tagawa después de haberlas colocado en 100 mg As kg de suelo⁻¹ (Srivastava *et al.*, 2006).

5 METODOLOGÍA

5.1 Estrategia experimental

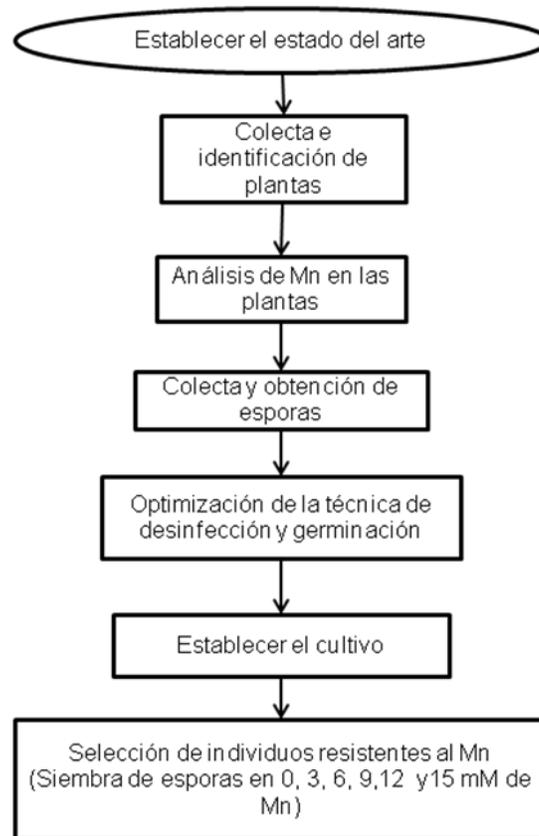


Figura 12. Estrategia metodológica

5.2 Material biológico

Se realizaron diversas visitas de recolección a la localidad Molango, Hidalgo, en dicha zona se encontró un helecho el cual fue colectado e identificado (Mickel y Beitel, 1998). Con el fin de obtener las esporas se recolectaron las pinnas fértiles (Mayo 2008 longitud $98^{\circ} 44' 078''$ O y latitud $20^{\circ} 57' 026''$ N), posteriormente se colocaron en sobres y se sellaron perfectamente para evitar la contaminación y pérdida de esporas. Los sobres con las pinnas fértiles se desecaron en condiciones naturales (temperatura ambiente) durante 15 días. Para obtener las esporas, las pinnas contenidas en los sobres se tamizaron con un tamiz de 0.074 micras de

apertura (Mont inox) con el fin de eliminar los restos de esporangios y parafisas (John, 1994; Jones, 1996; Muñiz, 2005). Una vez obtenidas las esporas, se colocaron en refrigeración (4 °C) para favorecer su viabilidad.

5.3 Medio de cultivo

El medio de cultivo se preparó a partir del propuesto por Murashige y Skoog (MS) en 1962. Se preparó un medio diluido al 50%, se esterilizó y posteriormente se vació en cajas de petri de 5 cm de diámetro, se dejó gelificar. Las cajas se guardaron en refrigeración (4°C) hasta su empleo para la siembra.

5.4 Desinfección de esporas

Para lograr una adecuada desinfección de las esporas y eliminar la contaminación en los cultivos, se realizaron cuatro experimentos a diferentes concentraciones de hipoclorito comercial, las concentraciones de hipoclorito fueron 2, 5, 7 y 10%. Para desinfectar se procedió de la siguiente forma: 1) en un tubo Eppendorf se agregaron 90 mg de esporas, 2) se agregó 1mL de la solución de hipoclorito, 3) se agitó durante 1 minuto, 4) se centrifugó durante 1 minuto, 5) se retiró el sobrenadante y 6) finalmente se lavaron las esporas tres veces con agua destilada estéril. De cada experimento con diferente concentración de hipoclorito se colocaron cinco cajas en un fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad y otras cinco cajas sólo en oscuridad.

Una vez determinada la dosis de desinfección adecuada, se procedió a determinar el tiempo de exposición en la solución de hipoclorito, para lo cual se montaron tres experimentos a 2, 3 y 4 minutos, realizando lo mismo que se hizo en el proceso para determinar la dosis de desinfección, lo único que varió fue el tiempo de agitación y centrifugación.

5.5 Germinación de esporas

Para determinar el tipo de germinación y desarrollo protálico, las esporas después de desinfectadas se sembraron en cajas de petri de 5 cm de diámetro con medio de cultivo, a cada caja se le agregaron 0.15 mL de la solución que contenía las esporas, sólo 15 cajas se dejaron en un fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad, ya que en oscuridad no hay germinación como lo confirmaron los experimentos de la tabla 2.

Cuando aparecieron los gametos en el gametófito, éste se trasplantó a un frasco de vidrio de 100 mL, el cual contenía medio MS, en donde se originaron los esporofitos (los gametofitos trasplantados se regaron con 0.5 mL de agua destilada esterilizada una vez por semana).

5.6 Germinación de esporas a diferentes concentraciones de manganeso

Ya estandarizada la desinfección y la germinación se procedió a realizar pruebas a diferentes concentraciones de Mn (0, 3, 6, 9, 12 y 15 mM), con la finalidad de determinar la dosis en la cual las esporas pueden crecer adecuadamente, esta etapa fue muy importante, porque fue donde se logró crear plantas resistentes al Mn desde el inicio de su ciclo de vida. De cada concentración se sembraron 10 cajas y sólo se dejaron en un fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad. Esta prueba permitió obtener esporofitos resistentes a condiciones ambientales poco aptas y por lo tanto con esto se logrará una mejor adaptación al momento de realizar pruebas de fitorremediación en campo.

Nota: La siembra se realizó en una campana de flujo laminar, la cual se lavó previamente con detergente y posteriormente con etanol 96%, todo el material empleado fue previamente esterilizado. El manipulador se lavó las manos con etanol al 70%, además de utilizar un mechero de alcohol cerca de la caja de siembra.

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Desinfección

La desinfección es una etapa muy importante, ya que a partir de esta se logra obtener un mejor desarrollo en la germinación de esporas. De la desinfección se determinó que la dosis de hipoclorito adecuada es a 7% (Tabla 12), a 2 y 5% germinaron (con contaminación) y a 10% no hubo germinación muy probablemente por que las esporas perdieron su viabilidad; el mejor tiempo de exposición al ClO^- es de 3 min, ya que a 2 min existe bastante contaminación y a 4 min la velocidad de germinación es más lenta (tabla 13), en la siembra se observó que las esporas necesitan de luz para poder germinar, ya que los experimento desarrollados en oscuridad no presentaron germinación (tabla 12).

Tabla 11. Experimentos expuestos a 16 h luz/8 h oscuridad evaluados a los cinco días de haber sembrado las esporas.

% ClO^-	Caja 1	Caja 2	Caja 3	Caja 4	Caja 5
2	gC	gC	gC	gC	gC
5	gC	gC	gC	gC	gC
7	gC	g	g	gC	g
10	ng	ng	ng	ng	ng

g: germinación; gC: Germinación con contaminación; ng: no hay germinación

Tabla 12. Experimentos expuestos a oscuridad evaluados a los cinco días de haber sembrado las esporas

% ClO^-	Caja 1	Caja 2	Caja 3	Caja 4	Caja 5
2	ngC	ngC	ngC	ngC	ngC
5	ngC	ngC	ngC	ngC	ngC
7	ng	ng	ng	ngC	ng
10	ng	ng	ng	ng	ng

ngC: no hay germinación y se contaminó; ng: no hay germinación

Tabla 13. Desinfección con 7% de ClO^- a diferentes tiempos de exposición

Tiempo (minutos)	Caja 1	Caja 2	Caja 3	Caja 4	Caja 5
2	gC	gC	gC	gC	gC
3	G	g	g	g	gC
4	gL	gL	gL	gL	gL

g: Germinación; gC: Contaminación con contaminación; gL: germinación lenta

6.2 Germinación de las esporas

Los resultados más importantes en cuanto a la germinación de esporas de *Thelypteris kunthii* indican que necesitan de luz, y una temperatura de 26°C. El tipo de germinación es *Vittaria*, ya que la célula rizoidal se asoma inicialmente de la espora y en la base de la célula rizoidal se generan células de forma horizontal, esto ocurre a los cinco días después de haber sembrado las esporas (figura 13 B), posteriormente se produjo una lámina en cuadrantes por arriba del rizoide (figura 13 C), cada una de esas células se vuelven multicelulares (figura 13 D) (Atkinson y Stokey, 1964).

6.2.1 Desarrollo protálico

El desarrollo del prótalo de *Thelypteris kunthii* fue Drinaria (Nayar y Kaur, 1969), ya que presentó un delgado filamento germinal uniseriado (en cinco días figura 13 B), se formó una lamina protálica ancha espatulada (figura 13 C y D), con el transcurso del tiempo se hizo cordiforme (ente los 11 y 20 días después de la siembra figura 13 E), los tricomas aparecieron en la orilla de la lámina protálica (figura 13 F) y la aparición de gametos masculinos y femeninos sucedió alrededor de los 28 días de haber realizado la siembra (figura 13 G).

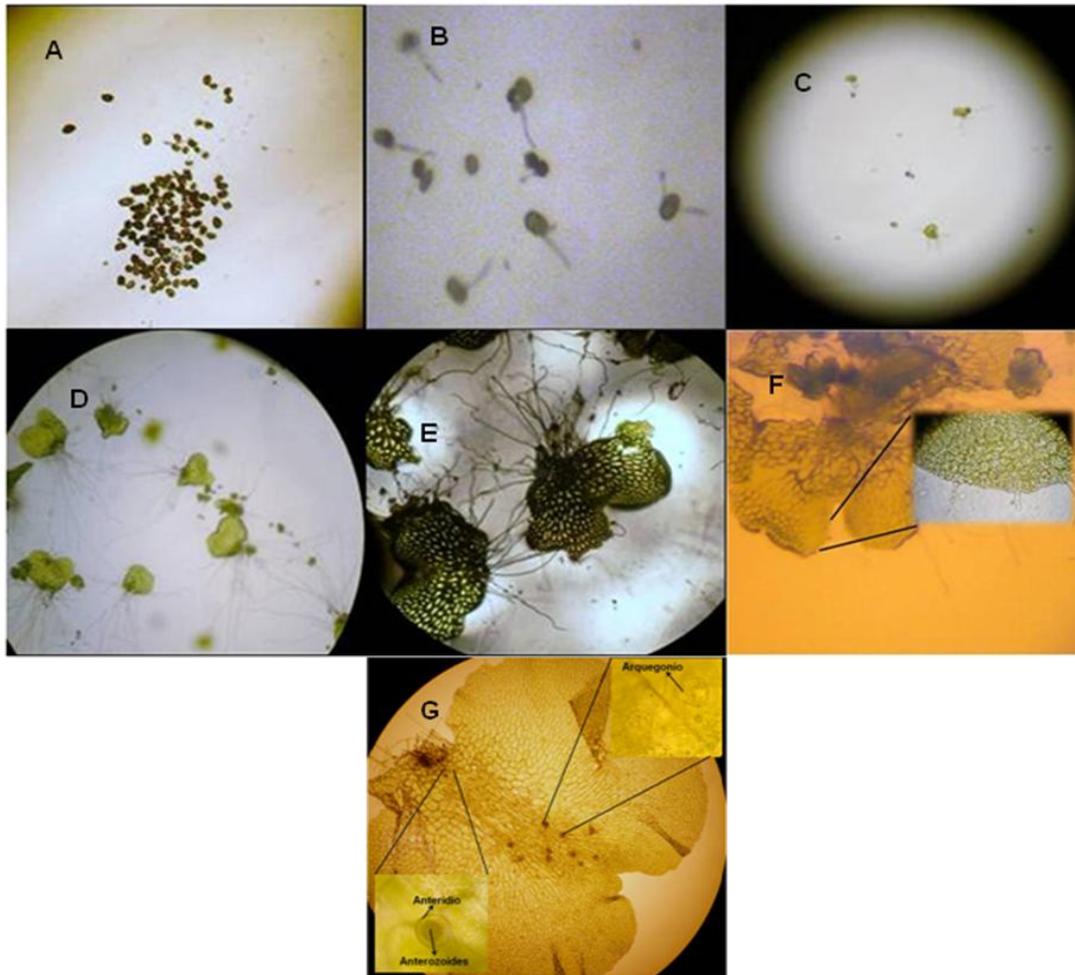


Figura 13. Espora (A). Germinación tipo *Vittaria*, 2 a 5 días (B). Filamentos cortos de 4-6 células, 6 días (C). Gametofito espatulado, 8 días (D). Gametofito cordiforme, 20 días (E). Gametofito con tricomas, 20 días (F). Gametofito con anteridios y arquegonios cerca de la muesca, 28 días (G).

Una vez que aparecen tanto los anteridios (gameto masculino) como arquegonios (gameto femenino) en el gametofito, inicia la fecundación de la oosfera por los anterozoides los cuales son liberados de los anteridios, dando lugar la fase esporofítica (Reyes *et al.*, 1995). La fecundación se lleva a cabo por microcorrientes de agua que transportan a los anterozoides hasta la oosfera. El esporofito aparece entre los 60 - 90 días después de haber hecho la siembra (Riba *et al.*, 2000), en este caso las esporas de *Thelypteris kunthii* lograron la formación del esporofitos en el día 84 (figura 14), coincidiendo con lo antes reportado y de esta manera cerró el ciclo de vida (Figura 15).

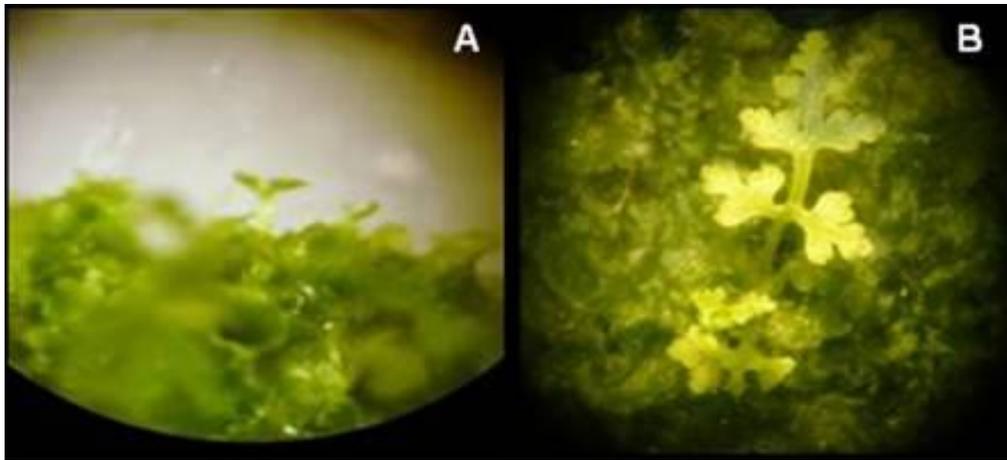


Figura 14. Aparición del esporofito (A). Aparición de las dos primeras hojas en el esporofito (B)

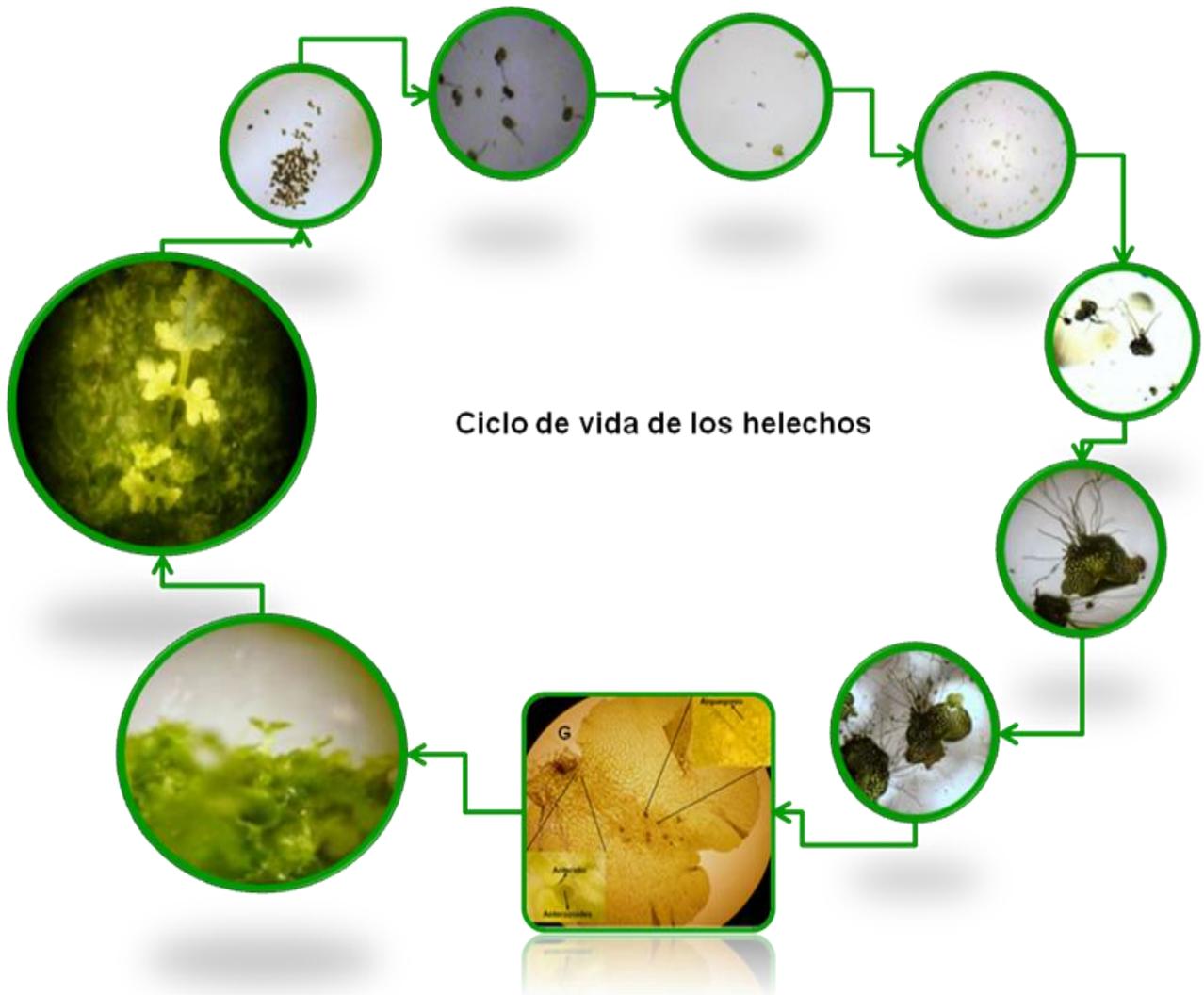


Figura 15. Ciclo de vida de *Thelypteris kunthii*

6.3 Germinación de las esporas a diferentes concentraciones de manganeso

Las esporas lograron germinar a las diferentes concentraciones de Mn. En la figura 16 se observa que a 6 mM de Mn se presentó la mayor germinación de esporas (91.61 %), la primera evaluación se hizo a los 12 días de haber sembrado. En 0, 3, 9, 12 y 15 mM la germinación es menor (58.82, 72.21, 83.67, 74.64 y 71.40 % respectivamente, figura 17).

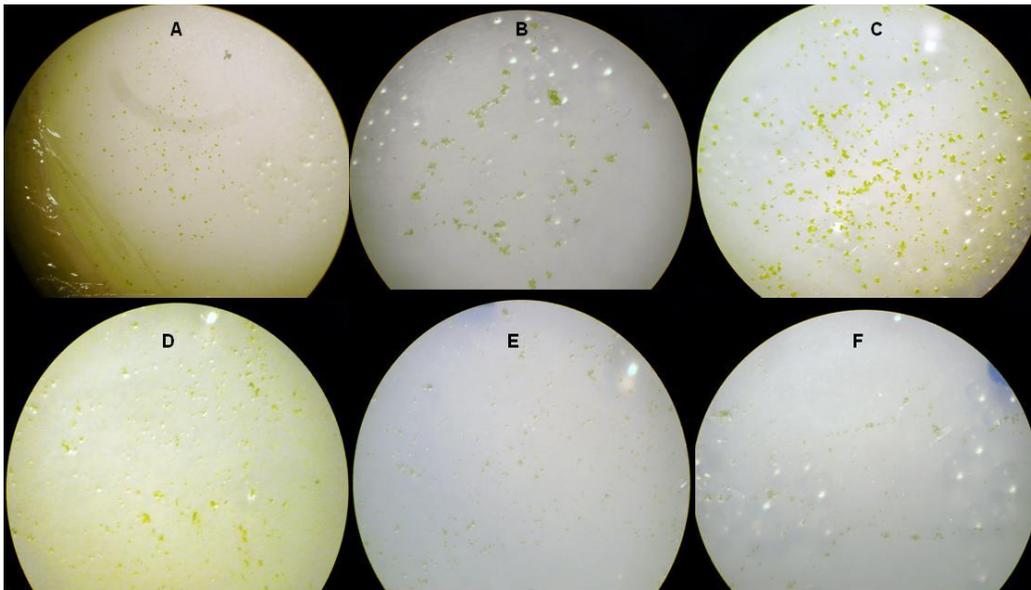


Figura 16. Germinación de esporas; A) 0 mM de Mn, B) 3 mM de Mn, C) 6 mM de Mn, D) 9 mM de Mn, E) 12 mM de Mn, F) 15 mM de Mn

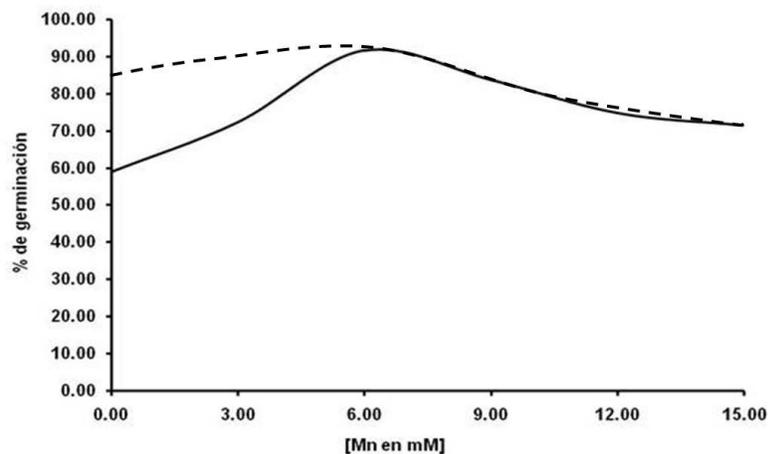


Figura 17. Porcentaje de esporas germinadas (evaluación a los 12 días [-] y a los 20 días [- -])

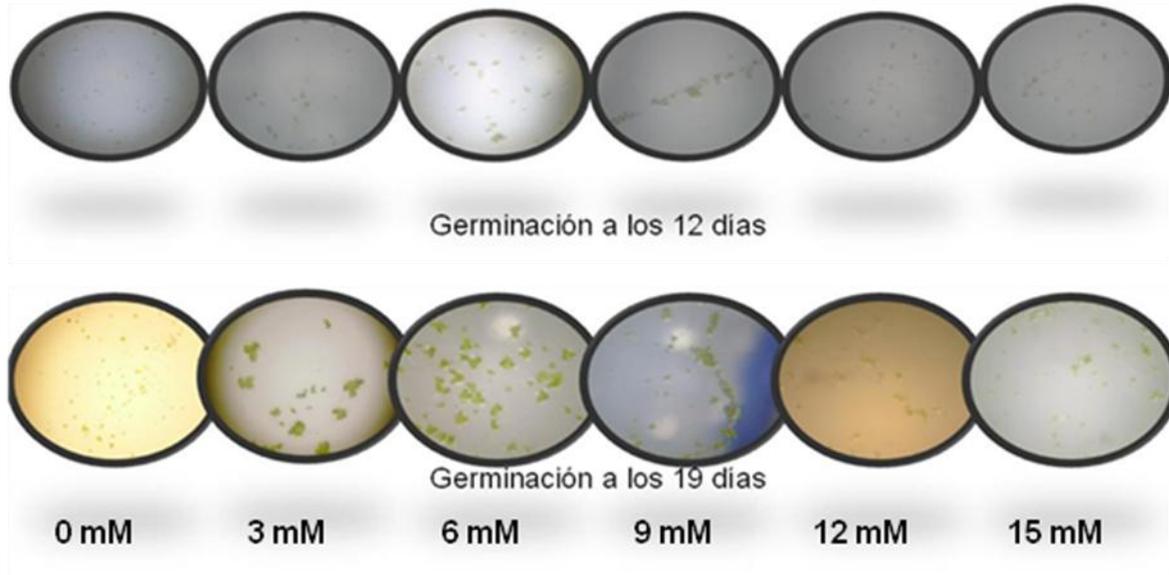


Figura 18. Germinación de esporas en los días 12 y 19.

Cabe hacer mención que la germinación en el control y a 3 mM siguió aumentando hasta el día 19 con lo que se alcanzó el 85 % y 88 % respectivamente (figura 17 y 18), en las demás concentraciones la germinación se mantuvo constante. Esto indica que la germinación de las esporas se logró acelerar conforme se incrementó la concentración de Mn hasta 6 mM. En cuanto al desarrollo protálico se pudo observar un aumento en las concentraciones de 0 a 6 mM y luego decreció (Figura 6).

Hasta el momento no existen estudios que reporten la germinación de esporas a diferentes concentraciones de Mn. Resultados reportados por Xue *et al.*, (2004) indican que las semillas de *Phytolacca acinosa* Roxb, germinan sin ningún problema a una concentración de 5 mM de Mn; por otra parte, Peng *et al.* (2008) primero dejó que germinaran las semillas de *Phytolacca americana* L. y posteriormente las plántulas fueron trasplantadas agregándoles diferentes concentraciones de Mn (0.0091 – 10 mM), bajo estas condiciones las plantas no presentaron efectos de daño alguno, en nuestro caso las esporas germinan de una forma adecuada sin presentar daño a una concentración de 3 mM (figura 19 B). Lo importante es que las esporas de helechos son unicelulares y las semillas son estructuras pluricelulares,

por lo que la resistencia observada en las esporas de este estudio es elevada si la comparamos con las semillas.

En el día 20 a concentraciones de 6, 9, 12 y 15 mM de Mn, el desarrollo de la lámina protálica presentó deformaciones o en algunos casos el desarrollo se retardó (figura 19 C-F), lo que no pasa en la concentración de 0 y 3 (figura 19 A y B). En un inicio la mayor germinación de esporas fue a 6 mM, es importante mencionar que en el día 20 a esta misma concentración se observaron efectos de daño en la lámina protálica (figura 19 C). En cuanto a las concentraciones en las que el gametofito presentó deformaciones, hay algunas esporas que si llegan a la forma cordiforme, por lo que se espera que estos generen esporofitos, en la figura 20 se puede observar la aparición de gametofitos cordiformes en concentraciones de 9, 12 y 15 mM.

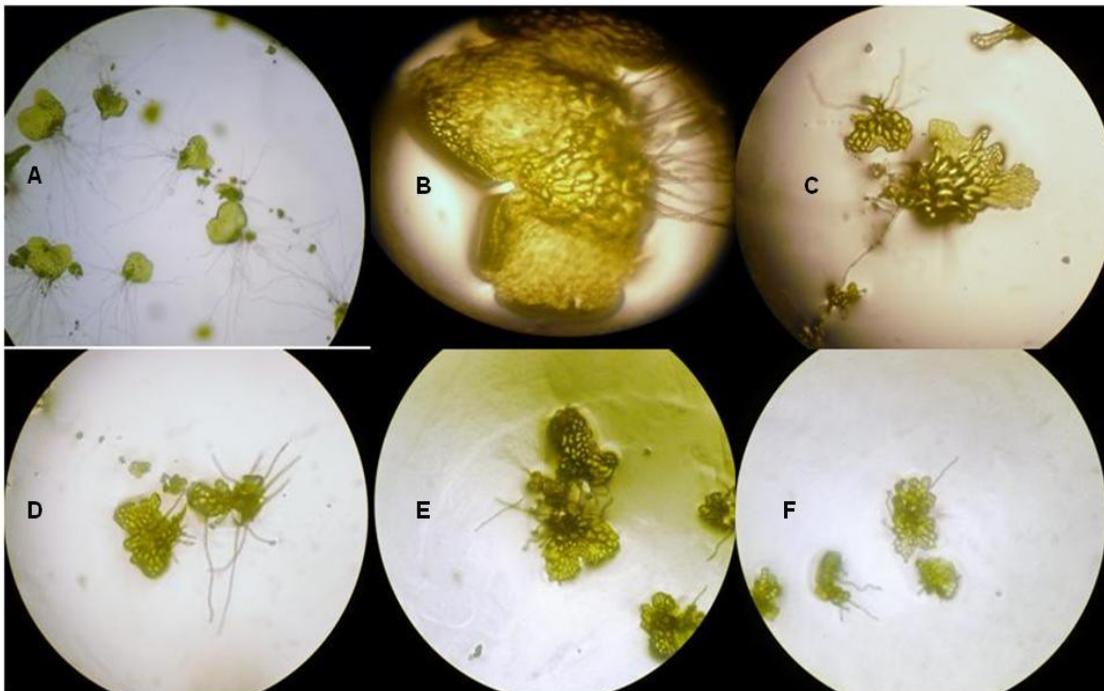


Figura 19. Desarrollo de lámina protálica a los 20 días; A) 0 mM de Mn, B) 3 mM de Mn, C) 6 mM de Mn, D) 9 mM de Mn, E) 12 mM de Mn, F) 15 mM de Mn.

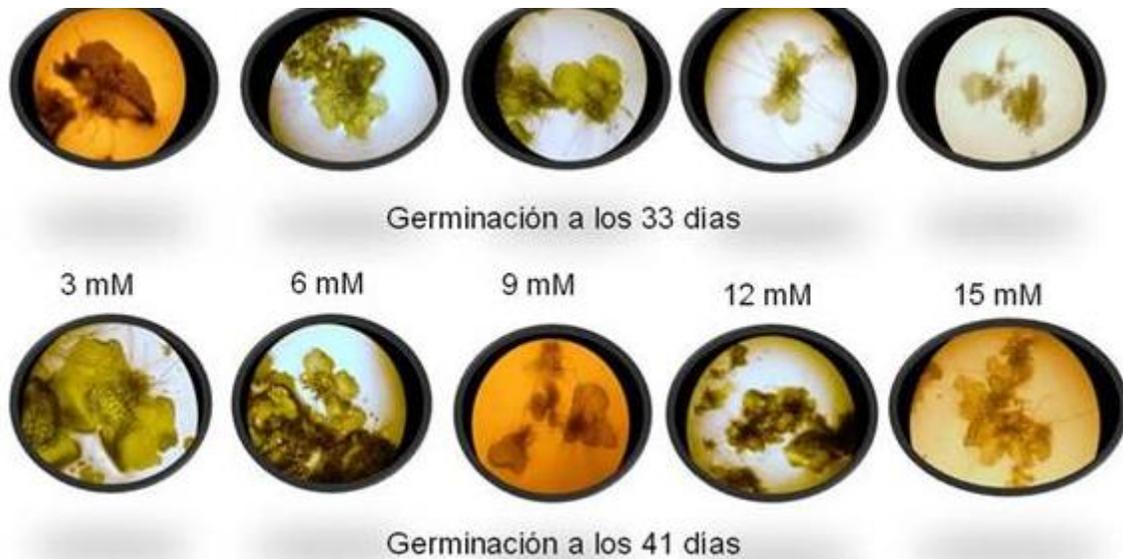


Figura 20. Germinación de esporas en los días 33 y 41.

Al parecer los gametofitos que llegaron a desarrollar la forma cordiforme, darán lugar a esporofitos lo cual es importante, y que en este estudio el principal interés fue obtener los esporofitos y no evaluar el daño.

BIBLIOGRAFÍA

- Atkinson, L.R., Stokey, A.G. 1964. Comparative morphology of the gametophyte of homosporous ferns. *Phytomorphology*. 14, 1, 51-70.
- Bidwell, S.D., Woodrow, I.E., Batianoff, G.N. 2002. Hyperaccumulation of manganese in the rainforest tree *Austromyrtus bidwilli* (Myrtaceae) from Queensland. *Australian Functional Plant Biology*. 29, 899-905.
- Cenni, E., Bussotti, F., Galeotti, L. 1998. The decline of a *Pinus nigra* Arn. reforestation stand on a limestone substrate: the role of nutritional factors examined by means of foliar diagnosis. *Annales Des Sciences Forestieres*. 55, 567-576.
- <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/flaveria-trinervia/fichas/pagina1.htm>. 3 de mayo de 2010
- <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/solanaceae/nicotiana-glauca/fichas/pagina1.htm>. 3 de mayo de 2010.

- http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=1&taxon_id=233501285. 3 de mayo de 2010.
- http://www.fisicanet.com.ar/biologia/informacion_genetica/ap1/ciclo_vital_helechos4.jpg (27 de octubre de 2008)
- http://www.fisicanet.com.ar/biologia/informacion_genetica/ap1/ciclo_vital_helechos4.jpg. 3 de mayo de 2010.
- John, T.M. 1994. Ferns for American Gardens. Macmillan Publishing Company. USA. 70-75 pp.
- Jones, L.D. 1996. Encyclopedia of ferns. Timber press. USA. 142-147 pp.
- Liu, Y.G., Zhang, H.Z., Zeng, G.M., Huang, B.R., Li, X. 2006. Heavy metal accumulation in plants on Mn mine Tailings. *Pedosphere*. 16, 1, 131-136.
- Ma, L.Q., Komar, K.M., Tu, C., Zhang, W., Cai, Y., Kennelly, E.D. 2001. A fern that hyperaccumulate. *Nature*. 409, 579-579.
- McGrath, S., Zhao, F. 2003. Phytoextraction of metals and metalloids from contaminated soils. *Current Opinion in Biotechnology*. 14, 277-282.
- Mickel, J.T., Beitel, J. 1998. Pteridophytes flora of Oaxaca, Mexico. Bot Gard. New York. 46, 1-568.
- Muñiz, M.E. 2005. Morfología de los gametofitos y esporofitos jóvenes de especies selectas del género *Thelypteris* subg. *Ciclorus* (Thelypteridaceae). Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana. México.
- Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant*. 15, 473- 497.
- Nayar B. K. y Kaur S. (1969) Types of prothallial development in homosporous ferns. *Phytomorphology*. 19, 2, 179-188.
- Olsen, 2007. Encyclopedia of garden ferns. Ed. Timberpress. China, p 252.
- Peng, K., Luo, Ch., You, W., Lian, Ch. 2008. Manganese uptake and interactions with cadmium in the hyperaccumulator *Phytolacca americana* L. *J. Hazardous Materials*. 154, 674-681.
- Pérez, G.B., Riba, R., Jaramillo, R.I. 1995. Helechos mexicanos: Formas de crecimiento, hábitat y variantes edáficas. *Contactos*. 11, 22-27.

- Pérez-García, B., Reyes, I. 1993. Helechos: propagación y conservación. *Ciencias*. 30, 11-17.
- Red Nacional de Jardines Botánicos. 2008. *Blechnum occidentale*L.. <http://www.siac.net.co/sib/catalogoespecies/especie.do?idBuscar=1177&method=displayAAT>. 3 de mayo de 2010.
- Reeves, R.D., Baker, A.J.H. 2000. Metal accumulating plants. En: Raskin I, Ensley Ed, editors. *Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean up the environment*. Wiley & Sons. New York, USA. 193-229.
- Reyes, J.I., Pérez, G.B., Mendoza, A. 1995. Plantas miniatura de la naturaleza: gametofitos de helechos. *Contactos*. 12, 5-10.
- Riba, R., Pérez, G.B., Mendoza, A., Jaramillo, R.I., 2000. Morfología de gametofitos y helechos. Universidad Autónoma Metropolitana (Ed.) México. pp. 1-20
- Srivastava, M., Lena Q. Ma, Q.L., Jorge Antonio Gonzaga, S.J.A. 2006. Three new arsenic hyperaccumulating ferns. *Sci of Total Environ*. 364, 24-31.
- Vara M., De Oliveira, H. 2003. Metal hyperaccumulation in plants - Biodiversity prospecting for phytoremediation technology. *Electronic Journal of Biotechnology*. 6, 285-321.
- Villavicencio, M.A., Pérez, B.E., 1995, Plantas útiles del Estado de Hidalgo. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (Ed.) Hidalgo, México.
- Villavicencio, M.A., Pérez, B.E., 2005, Guía de la flora útil de la Huasteca y la zona Otomí-Tepehua, Hidalgo. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (Ed.) Hidalgo, México.
- Villavicencio, M.A., Pérez, B.E., 2006, Plantas útiles del Estado de Hidalgo III. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (Ed.) Hidalgo, México.
- Villavicencio, M.A., Pérez, B.E., Ramírez, A., 2002, Plantas útiles del Estado de Hidalgo II. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (Ed.) Hidalgo, México.
- Villavicencio, M.A., Pérez, B.E., Ramírez, A., 2002. Guía de la flora útil de la Huasteca y la zona Otomí Tepehua Hidalgo I. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (Ed.) Hidalgo, México.

- Wei, C.Y., Chen, T.B. 2006. Arsenic accumulation by two brake ferns growing on an arsenic mine and their potential in phytoremediation. *Chemosphere*. 6, 1048-1053.
- Xu, X.H., Shi, J.Y., Chen, Y.X., Xue, S.G., Wu, B., Huang, Y.Y. 2006. An investigation of cellular distribution of manganese in hyperaccumulator plant *phytolacca acinosa* Roxb using SRXRF analysis. *J. Environ. Sci.* 4, 18, 746-751.
- Xue, S.G., Chen, Y.X., Reeves, R.D. 2004. Manganese uptake and accumulation by two populations of *Phytolacca acinosa* Roxb. (Phytolaccaceae). *J. Environ. Pollutio.* 131, 393-399.
- Yuan, M., Tie, B., Tang, M., Isao, A. 2007. Accumulation and uptake of manganese in a hyperaccumulator *Phytolacca americana*. *Mineral Eng.* 20, 188-190.

ANEXO 5: Artículo



Manganese accumulation in plants of the mining zone of Hidalgo, Mexico

Luis Felipe Juárez-Santillán^a, Carlos Alexander Lucho-Constantino^b,
Gabriela Alejandra Vázquez-Rodríguez^a, Nayeli Mariel Cerón-Ubilla^a, Rosa Icela Beltrán-Hernández^{a,*}

^a Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Centro de Investigaciones Químicas, Laboratorio de Ciencias Ambientales, Carretera Pachuca-Tulancingo km 4.5, Ciudad Universitaria, C.P. 42184, Mineral de la Reforma, Hgo., Mexico

^b Universidad Politécnica de Pachuca, Programa de Ingeniería en Biotecnología, Carretera Pachuca-Cd. Sahagún, km 20, Ex-Hacienda de Santa Bárbara, Zempoala, Hgo., Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 December 2009

Received in revised form 25 February 2010

Accepted 4 March 2010

Available online 13 April 2010

Keywords:

Phytostabilization

Molango

Mn-tolerant plants

Metal-exclusion

Rhizofiltration

ABSTRACT

Soil, sediments, water and plant samples from the mining zone of Molango were collected and analyzed and Mn-tolerant and Mn-accumulator plants were identified. Soil and sediments presented moderately alkaline and reducing conditions, a normal electrical conductivity, a sandy texture and medium-to-high cation exchange capacities. These properties favored the presence of Mn²⁺, which is the form most easily assimilated by plants, and the total Mn concentration (11,637–106,104 mg kg⁻¹ dried weight, DW) was at phytotoxic level. Water was also an important Mn source. *Equisetum hyemale* and *Telypteris kunthii* survived in the presence of such Mn concentrations using an exclusion strategy, while *Cnidocolus multilobus*, *Platanus mexicana*, *Solanum diversifolium*, *Asclepius curassavica* L. and *Pluchea sympitifolia* employed an accumulation strategy. These plants could be useful to re-vegetate and stabilize Mn tailings in order to decrease the erosion effects.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Mining residues represent a significant source of contaminants, mainly of metals, in water, air and soil. The availability of metals in soil is a natural selection factor for plants that are capable of surviving or reproducing under high metal concentrations (Bradshaw et al., 1978). According to their responses to the presence of metals in the growth medium, these plants are classified into two types. The first type is made up of metal-tolerant plants, which utilize a variety of mechanisms, such as complexation by compounds exuded from plant roots, in order to prevent their entry into the root. In other cases, the metal translocation from the roots to above-ground tissues is restricted by the formation of stable complexes into the root cells. The second type includes metal-accumulator plants, which take up large amounts of metal and transfer it to the shoots, where it is accumulated. Plants of the second type are capable of rendering the metals harmless in various ways, for instance by binding them to cell walls, compartmentalizing them in vacuoles or complexing them to certain organic acids or proteins (Reeves and Baker, 2000).

Based on the capacity of the plants to tolerate or accumulate high quantities of metals, processes of phytoremediation are possible in metal-contaminated soils. In order to determine the potential usefulness of a plant in phytoremediation processes, certain criteria have been established: (i) the plant capacity to tolerate or accumulate the metal; (ii) a high biomass production (Xu et al., 2006); (iii) a translocation factor (TF, ratio of metal concentration in above-ground biomass to roots) larger than unity (Min et al., 2007); and (iv) a bioconcentration factor (BCF, ratio of metal concentration in plant to soil) larger than unity (Dowdy and McKone, 1997).

However, phytoremediation includes a group of technologies such as phytostabilization, phytoextraction, phytovolatilization, phytodegradation (or phytostimulation) and rhizofiltration, and not all of the aforementioned criteria are required for each phytotechnology. For instance, high biomass production, TF and BCF are important traits in accumulator plants, which are utilized in phytoextraction processes. However, the accumulation of pollutants in above-ground parts of the plants is undesirable in phytostabilization processes, since this may lead to a transfer of metals to the wildlife through herbivores. In these cases, metal-tolerant-plants are employed (USEPA, 2000).

Among the five above-mentioned technologies, only phytostabilization has proved its efficiency at the field level in soils contaminated with metals. In the United States and Canada, 13 sites have been remediated through phytostabilization (Marquès and

* Corresponding author. Tel.: +52 771 71 72000x2211; fax: +52 771 71 72000x6502.

E-mail addresses: icelabeltran@yahoo.com.mx, rosa@uaeh.edu.mx (R.I. Beltrán-Hernández).

Berthomieu, 2006). Bunker Hill, in Idaho, is a Superfund site where phytostabilization was tested in large-scale plots and in the adjacent wetland with the aim of decreasing the phytotoxicity of Pb, Zn and Cd and reestablishing vegetation by applying certain organic wastes to the soil. At the end of the treatment, soluble forms of the metals in the soil decreased substantially and vegetation was successfully re-established (Brown et al., 2003).

A similar project was developed by Li and Chaney (1998) in a Superfund site in Palmerton, Pennsylvania, where the soils were contaminated with Zn. In other countries, e.g. China, researchers have focused their efforts on determining the limiting factors for plant establishment on Mn tailings and the capacity of the vegetal community to tolerate or accumulate this metal (Wang et al., 2008).

Molango, Mexico, has one of the major Mn deposits known in North America, which has been exploited since 1962 (Aldape et al., 1999; Okita et al., 1988). Researchers have calculated that the length of the ore body is larger than 50 km, with reserves of over 200 million tons (Okita et al., 1988). Since Molango is a highly mineralized area, it is interesting to study the strategies adopted by the regional flora allowing their survival and proliferation. Thus the objectives of this work were: (i) to evaluate the Mn availability and mobility in the substrates (soils and sediments) according with their pH, electrical conductivity (EC_e), redox potential (E_h), cation exchange capacity (CEC) and texture; (ii) to determine chemical Mn species; and (iii) to classify the plants present in that area according to their strategy with regard to Mn. This information could be useful to propose the most suitable plants for a re-vegetation project in the mining zone of Molango.

2. Methods

2.1. Sampling and physicochemical characterization of substrates and water

This study was carried out in the mining zone of Molango, Hidalgo, located in the center-east part of Mexico (longitude 98° 44' 078" W and latitude 20° 57' 026" N). Molango has a humid temperate climate (Cw) with an annual average temperature of 17 °C and an annual average rainfall of 1438 mm.

The studied plants were selected according to their abundance in the zone. In order to determine the abundance of each plant species in soils and sediments, three 10 m × 10 m plots were constructed. The plant sampling was carried out during the period from March to June of 2008. Five replicates of each plant were collected; two of which were employed for the purpose of identification by dichotomous keys (Moran and Riba, 1995; Mickel, 1992). The rest of the replicates were mixed to obtain a composite sample, which was then utilized to quantify the Mn concentration. A soil sample was also collected from each place where the plants were sampled. In this way five simple surface samples (0–30 cm) of soil were taken to obtain a composite sample corresponding to each plant or group of plants growing in the same place. Three of the collected plants grew in a shallow stream, in which case also five simple sediment and three simple water samples were taken to make a composite one in each case.

The composite samples of soil and sediment were air-dried and milled so as to pass through a 2-mm sieve. The pH was measured in a 1:2.5 soil/H₂O suspension (Thomas, 1996) using a waterproof pH/ORP meter. The E_h was examined with the same pH/ORP meter according to Patrick et al. (1996). The EC_e was determined in the saturation extract (Hess, 1972) using a pH/EC meter. The CEC was quantified using the barium acetate method (Jackson et al., 1986), and the texture was analyzed by the hydrometer method as described by Gee and Bauder (1986).

Also, a sequential extraction of Mn in the substrates was carried out by employing the method of Tessier et al. (1979). This tech-

nique consists in dissolving the fraction of metal in the sample associated with a particular matrix component. In this procedure, the metal forms of environmental significance can be grouped into five fractions sequentially extracted with 1 N MgCl₂ at pH 7 for exchangeable cations (Fraction 1; F1); 1 M CH₃COOH/CH₃COONa at pH 5 for metals bound to carbonates (F2); 0.04 M NH₂OH-HCl in CH₃COOH (25%) at pH 2 for metals bound to Fe and Mn oxides (F3); 8.8 M H₂O₂ in 0.02 M HNO₃, during 5 h at 85 °C followed by addition of a solution of 3.2 M CH₃COONH₄ in HNO₃ (25%) for metals bound to organic matter and sulphides (F4); and extraction with 10 mL of concentrated HNO₃ and a buffer solution of 1 M CH₃COOH/CH₃COONa at pH 5 for metals in the residue (F5). These fractions represent a progressively decreasing mobility in the soils.

Water samples were analyzed in order to determine the Mn concentration, pH, E_h and EC, the three last parameters were measured in the field according to the methods reported in APHA, AWWA and WPCF (2005). All parameters were determined in triplicate.

2.2. Plant sample preparation

Whole plants were washed with tap water to remove adhering materials, rinsed with deionized water, separated into leaves, stems, flowers and roots, and dried in an oven at 65 °C for 48 h. The dried samples were milled in a stainless steel blender and passed through a 0.250-mm sieve.

2.3. Quantification of manganese

The plant, soil and water samples were digested according to EPA methods 3052, 3051 and 3015, respectively (USEPA 1995a–c). The total amount of manganese in these extracts was determined by flame atomic absorption (AA) spectroscopy using an AA spectrophotometer (Varian 880, Australia). For these determinations an oxidizing air-acetylene flame was used in order to avoid interferences by phosphate, perchlorate, iron, nickel and cobalt. Due to high Mn concentrations in the samples the Zips tool of the spectrophotometer and a wavelength of 321.7 nm were employed; in the case of concentrations minor than 60 mg Mn L⁻¹ the determinations were corroborated using a wavelength of 403.1 nm. The quality of the plant analyses was assured by employing reference material (SMR 1573a and SMR 1570), and a standard reference soil from the National Institute of Standards and Technology (SRM 2709) was analyzed concurrently with the soil samples to determine the total amount of metals. Recoveries ranged from 96.5% to 104% and the coefficient of variation was between 3% and 10% when analyzed in triplicate. To obtain a calibration curve for Mn, a certified standard solution for AAS was used. The limit of detection for Mn was 0.035 mg Mn L⁻¹.

2.4. Determination of the TF and BCF

The TF was defined as (Deng et al., 2004):

$$TF = \frac{\text{Metal in above-ground DW}}{\text{Metal in root DW}} \quad (1)$$

The BCF, representing the ratio of metal concentration DW in the plant to the metal concentration DW in the soil (Dowdy and McKone, 1997), can be expressed according to:

$$BCF = \frac{\text{Metal in Whole plant DW}}{\text{Metal in soil DW}} \quad (2)$$

Typically, the BCF is an indication of the magnification of contaminants from a lower to a higher trophic level. For plants, the BCF has been used as a measure of the metal accumulation efficiency, whereby values greater than 1 are an indication of plants potential to phytoextract (Zhang et al., 2002).

2.5. Determination of the predominant species of Mn

Pourbaix diagrams and predominance zone charts were constructed using the Chemical Equilibrium Diagrams Program (Medusa Program). The pH and E_h values of the soils, sediment and water were intersected in these diagrams in order to determine the predominant species for Mn.

3. Results and discussion

3.1. Characterization of soils, sediments and water

Table 1 lists the physical and chemical properties of the substrates (i.e., soils and sediments) from the Mn mine. Since the behavior of Mn in the surface deposits is highly dependent on the E_h -pH conditions (Kabata-Pendias and Pendias, 2001; Smith and Huyck, 1999), the moderate alkalinity of the substrates ($7.65 \leq \text{pH} \leq 8.19$) and reducing conditions ($-52.45 \leq E_h \leq -35.19$ mV) must favor solubility and availability of Mn. The EC_s values ranged from 0.38 to 1.95 dS m^{-1} , which indicated that the substrates are non saline ($EC_s < 2$ dS m^{-1}).

According to Conesa et al. (2006), pH and EC_s are the most important factors determining plant colonization of land degraded by mining. Due to the moderately alkaline and nonsaline conditions of the substrates, pH and EC_s should not be limiting factors for plant establishment in the studied zone.

Medium (17.81 cmol(+) kg^{-1}) and high (30.00 cmol(+) kg^{-1}) CEC values were measured in the substrates. The CEC represents the ability of the soils to absorb or release cations, and conse-

quently is an important parameter in sites contaminated by heavy metals. Organic matter and clay minerals are responsible for the CEC. However, Mn is not very strongly fixed either by clay minerals or organic matter and can thus be relatively easily released from the cation exchange soil complex (Kabata-Pendias and Pendias, 2001). In the present study, both substrates showed a sandy texture. Sandy substrates generally present oxidizing conditions however, in this case, the water-saturation state of soils and the flooding of sediments explained the reducing environment.

The Mn content in the substrates (Table 2) ranged from 11,637 to 106,104 $mg\ kg^{-1}$ DW; concentrations that were between 2 and 21 times higher than the phytotoxic level (5000 $mg\ Mn\ kg^{-1}$ DW) proposed by Alloway (1995). However, this condition was not limiting for plant growth. Similar concentrations to those found in this study have been reported in the mining zone of Xiangtan, China. Wang et al. (2008) measured total Mn concentrations of 31,903 $mg\ kg^{-1}$ DW in tailings and 30,899 $mg\ kg^{-1}$ DW in rhizosphere soils, and Liu et al. (2006), who worked in the same zone, determined total Mn concentrations of 151,684 $mg\ kg^{-1}$ DW in tailings and 52,924 $mg\ kg^{-1}$ DW in soils containing excavated tailings.

The water presented a moderately alkaline pH (7.51), a EC of 1.053 dS m^{-1} , a reductor E_h (-35.80 mV) and a total Mn concentration of 3.63 $mg\ L^{-1}$. According to the US Geological Survey's National Water Program, the median Mn level in surface waters is 16 $\mu g\ L^{-1}$ (USGS, 2001). Higher levels are usually associated with industrial pollution. In the present study, the high Mn concentration in the water was explained by the concentration of Mn in the substrates, in addition to the mining activity.

Table 1
Chemical and physical characteristics of substrates.

Substrate	pH	E_h (mV) ^b	EC_s (dS m^{-1}) ^c	CEC (cmol (+) kg^{-1}) ^d	Textural class	Plant collected
1	8.19 (0.02) ^a	-35.19 (0.01)	1.95 (0.01)	26.25 (0.88)	Sandy (soil)	<i>Platanus mexicana</i>
2	7.70 (0.01)	-38.12 (0.16)	0.38 (0.00)	17.81 (1.33)	Sandy (soil)	<i>Cnidocolus multilobus</i>
3	7.86 (0.01)	-46.90 (0.29)	1.20 (0.00)	30.00 (0.88)	Sandy (soil)	<i>Asclepius curassavica</i> L.
4	7.65 (0.01)	-52.45 (0.07)	0.62 (0.00)	18.75 (0.88)	Sandy (soil)	<i>Solanum diversifolium</i>
5	7.79 (0.01)	-46.07 (0.75)	1.77 (0.00)	18.44 (2.21)	Sandy (soil)	<i>Pluchea sympitifolia</i>
6	7.86 (0.01)	-40.95 (0.08)	1.10 (0.00)	25.00 (0.88)	Sandy (sediment)	<i>Equisetum hyemale</i> , <i>Xanthosoma robustum</i> and <i>Thelypteris kunthii</i>

^a Standard deviation, $n = 3$.

^b E_h : redox potential.

^c EC_s : electrolytical conductivity.

^d CEC: cation exchange capacity.

Table 2
Manganese concentrations in plants and substrates.

	Leaf	Stem	Flower	Root	Substrate	BCF ^e	TF ^f
	mg Mn kg^{-1} DW ^a						
<i>Platanus mexicana</i> [*]	410.86 (5.11) ^b	253.71 (11.03)	^c	337.99 (2.18)	100762.50 (1354.28)	0.0099	1.97
<i>Cnidocolus multilobus</i> [*]	730.00 (23.55)	333.78 (6.45)	^c	1055.80 (22.27)	19054.00 (112.04)	0.1112	1.01
<i>Asclepius curassavica</i> L. [*]	1507.69 (9.78)	148.61 (2.66)	1130.05 (235.00)	161.34 (1.20)	106104.17 (3755.36)	0.0278	17.27
<i>Solanum diversifolium</i> [*]	562.57 (49.92)	195.71 (3.46)	^c	110.78 (2.67)	94220.83 (4308.28)	0.0092	6.84
<i>Thelypteris kunthii</i> ^{**}	1336.36 (61.43)	605.48 (30.26)	^c	6842.36 (355.43)	11637.50 (263.39)	0.7548	0.28
<i>Equisetum hyemale</i> ^{**}	^c	229.40 (4.70)	^c	5266.30 (102.30)	^d	0.4722	0.04
<i>Xanthosoma robustum</i> ^{**}	376.28 (10.10)	48.15 (5.59)	^c	70.88 (0.65)	^d	0.0426	5.99
<i>Pluchea sympitifolia</i> [*]	182.96 (0.63)	1062.58 (7.00)	^c	34.52 (0.36)	89616.67 (4407.92)	0.0143	36.08

^{*} Plants collected in soils.

^{**} Plants collected in sediments.

^a DW: dry weight.

^b Standard deviation, $n = 3$.

^c Plant without this organ.

^d Same Mn substrate concentration as *Thelypteris kunthii*.

^e BCF: bioconcentration factor (ratio of Mn in above-ground biomass and roots to soil).

^f TF: translocation factor (ratio of Mn in above-ground biomass to roots).

3.2. Mn fractionation and speciation

As can be seen in Fig. 1, the soil and sediment fractions presented the following distribution: F5 (57.84%) > F3 (37.17%) > F4 (32.12%) > F2 (3.66%) > F1 (0.02%). Wang et al. (2008) and Álvarez et al. (2006), who worked with Mn tailings and rhizosphere soils and agricultural alkaline soils, respectively, reported a similar order in the distribution of fractions. In their investigations, the highest fractions for Mn were F5 and F3, and the lowest fractions were F1 and F2. Based on these results, Mn was expected to demonstrate

the same distribution in the substrates when alkaline conditions prevailed. According to the results of the sequential extractions, Mn could be released mainly from F3 and F4, since under reducing conditions oxides release Mn easily as it is a metal only slightly fixed by organic matter (Kabata-Pendias and Pendias, 2001).

Mn can be found as Mn^{2+} , Mn^{3+} and Mn^{4+} , of which Mn^{2+} is the most soluble form (Sajwan and Lindsay, 1986). Fig. 2 shows the Pourbaix diagram, in which it can be observed that the predominating species of Mn was Mn^{2+} . Nevertheless, the predominance zone chart in Fig. 3 demonstrates that Mn was in dynamic

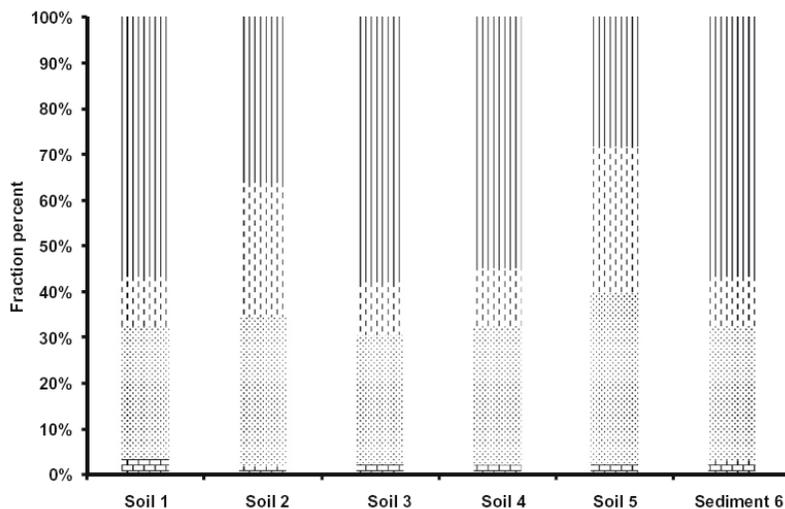


Fig. 1. Manganese fractionation (percentages) in substrates: F5: Mn in the residual fraction; F4: Mn bound to organic matter and sulphides; F3: Mn bound to Fe and Mn oxides; F2: Mn bound to carbonates; F1: Mn exchangeable.

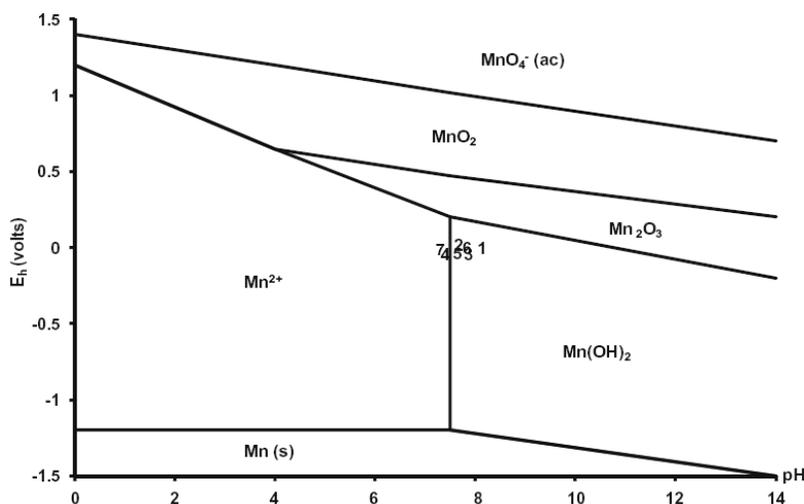


Fig. 2. Intersection pH vs E_h of soil, sediments and water in Pourbaix diagram. 1: *Platanus mexicana*, 2: *Cnidocolus multilobus*, 3: *Pucea symptitifolia*, 4: *Asclepius curassavica* L., 5: *Solanum diversifolium*, 6: *Equisetum hyemale*, *Xanthosoma robustum* and *Thelypteris kunthii*, 7: water.

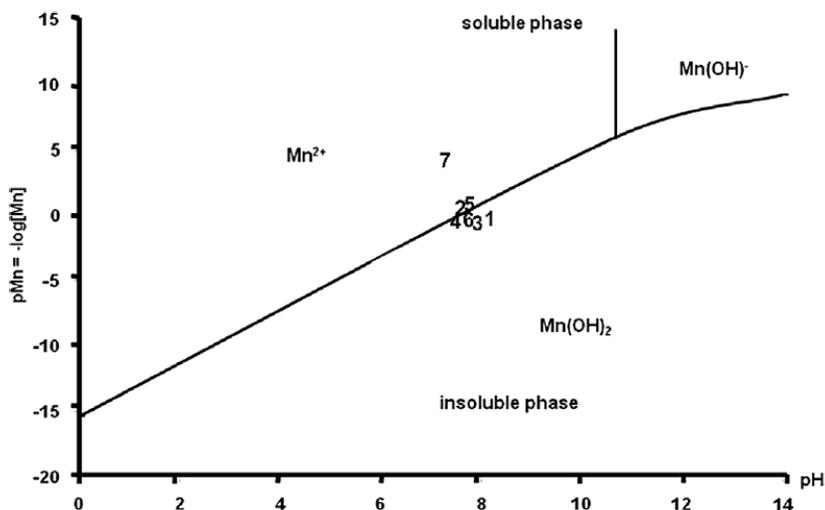


Fig. 3. Predominance zone chart of Mn in the substrates. 1: *Platanus mexicana*, 2: *Cnidioscolus multilobus*, 3: *Pluchea sympitifolia*, 4: *Asclepius curassavica* L., 5: *Solanum diversifolium*, 6: *Equisetum hyemale*, *Xanthosoma robustum* and *Thelypteris kunthii*, 7: water.

equilibrium between the soluble and insoluble phases as a result of substrate conditions not being permanent. In addition, water was another important source of Mn^{2+} (Fig. 3).

3.3. Identification and classification of plants

The plants collected in soils were identified as: *Platanus mexicana*, *Cnidioscolus multilobus*, *Asclepius curassavica* L., *Solanum diversifolium* and *Pluchea sympitifolia*, and the plants collected in sediments were *Equisetum hyemale*, *Xanthosoma robustum* and *Thelypteris kunthii*. According to their TF values, the plants were separated into two groups. The first one contains tolerant plants for which the TF values were below one. These included *E. hyemale* (0.04) and *T. kunthii* (0.28) (Table 2). These results supported the idea that these plants have adopted an exclusion strategy that allows them to form Mn stable complexes in their root cells, which results in a limited metal translocation to above-ground parts. It seems that *E. hyemale* and *T. kunthii* perform a low level of rizofiltration in the sediments (Padmavathiamma and Li, 2007; USEPA, 2000), and therefore it would be interesting to study the maximum tolerance of both plants to the Mn, under the same and different pH and E_h conditions.

The second group, composed of *C. multilobus*, *P. mexicana*, *X. robustum*, *S. diversifolium*, *A. curassavica* and *P. sympitifolia*, demonstrated TF values larger than one (1.01–36.08). These results indicate that the plants adopted an accumulation strategy with regard to Mn. However, the concentrations of accumulated Mn were small (495.03–2947.69 $mg\ kg^{-1}$ DW) and consequently, their BCF were also low (0.0099–0.11). Possibly these plants use a mechanism that avoids excessive uptake of Mn and the metal is absorbed and translocated only in required or non-toxic quantities. These plants would not be useful for phytoextraction in substrates with physicochemical conditions similar to those found in Molango soils, since plants employed in phytoextraction treatments must accumulate more than 10,000 $mg\ Mn\ kg^{-1}$ DW, exhibit values of TF and BCF larger than unity, and produce high quantities of biomass (Min et al., 2007; Reeves and Baker, 2000; Dowdy and McKone, 1997). It is difficult to find plants with all of these characteristics,

and some of them, e.g., *Phytolacca acinosa*, have been classified as Mn-hyperaccumulator by Xue et al. (2004) since it accumulated 19,300 $mg\ Mn\ kg^{-1}$ DW and presented a TF that varies from 13 to 29, despite a BCF < 1. On the contrary, the same plant, *P. acinosa*, was reported by Wang et al. (2008) to be an Mn-accumulator due to its TF being 1.45 and the Mn concentration in the entire plant being 1374.7 $mg\ Mn\ kg^{-1}$ DW. It is important to mention that these results have been obtained by two research groups working in the same Mn mining zone of Xiangtang, China. The results thus confirmed the complexity of a phytoextraction process, due to the availability of metal varying spatially in the zone and affecting the capacity of a plant to accumulate it.

The results obtained with *X. robustum* are inconsistent with the established idea of a TF higher than one being evidence of an accumulator plant capacity, as proposed by Deng et al. (2004). *X. robustum* grew under the same conditions that *E. hyemale* and *T. kunthii*, and while the last two accumulated between 47% and 75.5% of soil Mn in their biomass, *X. robustum* accumulated only 4.25%. These results indicate that *X. robustum* adopts an exclusion strategy with regard to Mn under these substrate conditions and complexes the metal in its root zone and efficiently avoids its absorption by the roots. It could be interesting to study the behavior of *X. robustum* with regard to Mn under different pH and E_h conditions, in order to determine if it uses the same strategy in all cases.

At the present time, none of the identified plants in this study have been reported as Mn-tolerant or Mn-accumulator by other researchers. Thus, the present research has contributed to increasing the list of species with such capacities.

4. Conclusions

Alkaline and reducing substrate conditions favor the presence of Mn^{2+} , which is the most soluble form of Mn, as well as the most assimilable form by plants. This study demonstrated that Mn at the mining zone of Molango was associated with the residual fraction and could be released from Fe–Mn oxides and organic matter. *E. hyemale* and *T. kunthii* survive and reproduce under phytotoxic

Mn concentrations by employing an exclusion strategy, while *C. multilobus*, *P. mexicana*, *S. diversifolium*, *A. curassavica* L. and *P. symptifolia*, showed an accumulation strategy. Thus these plants could contribute to stabilize the tailings of Molango.

Acknowledgements

The authors are grateful to the next persons; Blanca Estela Pérez Escandón, Miguel Ángel Villavicencio and Arturo Sánchez González of Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (Mexico); Leticia Pacheco of Universidad Autónoma Metropolitana (Mexico) and Ramiro Cruz Durán of Universidad Nacional Autónoma de México for identifying the plants. L.F.J-S. received Grant-aided support from CONACyT (Mexico).

References

- Aldape, F., Hernández-Méndez, B., Flores, M.J., 1999. Manganese survey in airborne particulate matter from a mining area at Hidalgo State. Mexico Nucl. Instr. Meth. Phys. Res. B 150, 363–369.
- Alloway, B.J., 1995. Heavy Metals. Blackie and Professional, London, UK, p. 35.
- Álvarez, E.M.J., López-Valdivia, M.L., Novillo, J., Obrador, A., Rico, I.M., 2006. Comparison of EDTA and sequential extraction tests for phytoavailability prediction of manganese and zinc in agricultural alkaline soils. Geoderma 132, 450–463.
- APHA, AWWA, WPCF, 2005. Standard methods for the examination of water and wastewater. American Water Works Association (Eds.), 17th ed. American Public Health Association, Washington, DC, pp. 44–49, 75–78, 86–91.
- Bradshaw, A.D., Humphreys, M.O., Johnson, M.S., 1978. The value of heavy metal tolerance in the revegetation of metalliferous mine wastes. In: Goodman, G.T., Chadwick, M.J. (Eds.), Environmental Management of Mineral Wastes. Sijthoff and Noordhoff, The Netherlands, pp. 311–314.
- Brown, S.L., Henry, Ch.L., Chaney, R., Compton, H., DeVolver, P.S., 2003. Using municipal biosolids in combination with other residuals to restore metal-contaminated mining areas. Plant Soil. 249, 203–215.
- Conesa, H.M., Faz, A., Arnaldos, R., 2006. Heavy metal accumulation and tolerance in plants from mine tailings of the semi-arid Cartagena-La Unión mining district. Sci. Total Environ. 366, 1–11.
- Deng, H., Ye, Z.H., Wong, M.H., 2004. Accumulation of lead, zinc, copper and cadmium by 12 wetland plant species thriving in metal-contaminated sites in China. Environ. Pollut. 132, 29–40.
- Dowdy, D.L., McKone, T.E., 1997. Predicting plant uptake of organic chemicals from soil or air using octanol/water and octanol/air partitioning ratios and a molecular connectivity index. Environ. Toxicol. Chem. 16, 2448–2456.
- Gee, G.W., Bauder, J.W., 1986. Particle soil analysis. In: Klute, A. (Ed.), Methods for Soil Analysis. Part 1: Physical and Mineralogical Methods. Soil Science Society of America. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, USA, pp. 383–411.
- Hess, P.R., 1972. A TextBook of Soil Chemical Analysis. Chemical Publishing, New York, pp. 204–246.
- Jackson, M.L., Lim, C.H., Zelazny, L.W., 1986. Oxides, hydroxides, and aluminosilicates. In: Klute, A. (Ed.), Methods for Soil Analysis. Part 1: Physical and Mineralogical Methods. Soil Science Society of America. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, USA, pp. 101–150.
- Kabata-Pendias, A., Pendias, H., 2001. Trace elements in soils and plants. CRS, CRC Press LLC, Washington, USA, pp. 281–290.
- Li, Y.M., Chaney, R.L., 1998. Case studies in the field, industrial sites: phytostabilization of zinc smelter-contaminated sites. The Palmerton case. In: Vangroveld, J., Cunningham, S. (Eds.), Metal-contaminated Soil: In Situ Inactivation and Phytoremediation. Bioscience, Austin, Texas, USA, pp. 197–210.
- Liu, Y.G., Zhang, H.Z., Zeng, G.M., Huang, B.R., Li, X., 2006. Heavy metal accumulation in plants on Mn mine tailings. Pedosphere 16, 131–136.
- Marqués, L., Berthomieu, P., 2006. Phytoremediation of metal contaminated soils: current state and future prospects. In: What Does the Future Hold for Large Metal-polluted Sites? Difpolmine Conference, Life Environment, Montpellier, France.
- Mickel, J.T., 1992. Pteridophytes. In: McVaugh, R. (Ed.), Flora Novo-Galiciana. A Descriptive Account of the Vascular Plants of Western Mexico, vol. 17. University of Michigan Herbarium, Ann Arbor, pp. 120–431.
- Min, Y., Boqing, T., Meizhen, T., Aoyama, I., 2007. Accumulation and uptake of manganese in a hyperaccumulator *Phytolacca americana*. Miner. Eng. 20, 188–190.
- Moran, R.C., Riba, R. (Eds.), 1995. Psilotaceae and Salviniaceae. Flora Mesoamericana, vol. 1. Universidad Nacional Autónoma de México, México, DF, pp. 1–470.
- Okita, P.M., Maynard, J.B., Spiker, E.C., Force, E.R., 1988. Isotopic evidence for organic matter oxidation by manganese reduction in the formation of stratiform manganese carbonate ore. Geochim. Cosmochim. 52, 2679–2685.
- Padmavathiamma, P.K., Li, L.Y., 2007. Phytoremediation technology: hyperaccumulation metals in plants. Water Air Soil Pollut. 184, 105–126.
- Patrick, W.H., Gambrell, R.P., Faulkner, S.P., 1996. Redox measurements of soils. In: Sparks, D.L. (Ed.), Methods for Soil Analysis. Part 3: Chemical Methods. Soil Science Society of America. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, USA, pp. 1255–1273.
- Reeves, R.D., Baker, A.J.H., 2000. Metal-accumulating plants. In: Raskin, I., Ensley, B.D. (Eds.), Phytoremediation of Toxic Metals Using Plants to Clean Up the Environment. Wiley, New York, USA, pp. 193–230.
- Sajwan, J.S., Lindsay, W.L., 1986. Effects of redox on zinc deficiency in paddy rice. J. Soil Sci. Soc. Am. 50, 1264–1269.
- Smith, K.S., Huyc, H.L.O., 1999. An overview of the abundance, relative mobility, bioavailability, and human toxicity of metals. In: Plumlee, G.S., Logsdon, J.J. (Eds.), The Environmental Geochemistry of Mineral Deposits. Part A. Processes, Techniques, and Health Issues, vol. 6A, Soc. Econ. Geol. Review in Econ. Geol., p. 29.
- Tessier, A., Campbell, C., Bisson, M., 1979. Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals. Anal. Chem. 51, 844–851.
- Thomas, G.W., 1996. Soil pH and soil acidity. In: Sparks, D.L. (Ed.), Methods for Soil Analysis. Part 3: Chemical Methods. Soil Science Society of America. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, USA, pp. 475–490.
- USEPA, 1995a. Method 3052: microwave assisted acid digestion of siliceous and organically based matrices. Available in: <<http://www.sampleprep.duq.edu/dir/epa.html>>.
- USEPA, 1995b. Method 3051: microwave assisted acid digestion of sediments, sludge, soils, and oils. Available in: <<http://www.sampleprep.duq.edu/dir/epa.html>>.
- USEPA, 1995c. Method 3015: microwave assisted acid digestion of aqueous sample and extracts. Available in: <<http://www.sampleprep.duq.edu/dir/epa.html>>.
- USEPA, 2000. Introduction to Phytoremediation. EPA/600/R99/107.
- USGS, 2001. US Geological Survey National Water Quality Assessment Data Warehouse. Available at: <<http://infotrek.er.usgs.gov/pls/nawqa/nawqa.home>>.
- Wang, X., Liu, Y., Zeng, G., Chai, L., Xiao, X., Song, X., Min, Z., 2008. Pedological characteristics of Mn tailings and metal accumulation by native plants. Chemosphere 72, 1260–1266.
- Xu, X.H., Shi, J.Y., Chen, Y.X., Xue, S.G., Wu, B., Huang, Y.Y., 2006. An investigation of cellular distribution of manganese in hyperaccumulator plant *Phytolacca acinosa* Roxb using SRXRF analysis. J. Environ. Sci. 18, 746–751.
- Xue, S.G., Chen, Y.X., Reeves, R.D., 2004. Manganese uptake and accumulation by two populations of *Phytolacca acinosa* Roxb. (Phytolaccaceae). J. Environ. Pollut. 131, 393–399.
- Zhang, W., Cai, Y., Tu, C., Ma, L.Q., 2002. Arsenic speciation and distribution in an arsenic hyperaccumulating plant. Sci. Total Environ. 300, 167–177.