



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**



FACULTAD DE BIOLOGÍA

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

OPCIÓN: ECOLOGÍA Y CONSERVACIÓN

**“EVALUACIÓN DE LA TOLERANCIA Y CRECIMIENTO DE LA ESPECIE
Linum usitatissimum EN UN JAL DE MINA.”**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

QFB. Martha Patricia Mendoza Nava.

ASESOR DE TESIS

Dra. Mariela Gómez Romero.

Co-asesor:

Dr. Alejandro Alarcón.

Morelia, Michoacán. Marzo 2024

Agradecimientos

A la UMSNH y a la facultad de Biología por haberme acogido en su seno, por brindarme la guía y el conocimiento necesarios, así como permitirme hacer uso de sus instalaciones.

A CONAHCYT por el apoyo otorgado en pro de esta investigación mediante el Programa Institucional de Maestría en Ciencias biológicas.

A mis padres, por su apoyo incondicional en todo momento y por el respeto a las decisiones que he decidido tomar en mi desarrollo profesional. Han sabido guiarme con su ejemplo, inculcando en mí, valores que me han llevado a convertirme en la persona que soy ahora.

A mi asesora, la Dra. Mariela, por su paciencia y guía. De ella aprendí que, sin importar la cantidad de trabajo, siempre se pueden tener momentos de diversión. Por mostrarme diferentes puntos de vista cuando se presenta un obstáculo y enseñarme que hasta los errores son importantes, pues nos generan experiencia. Pero, sobre todo, por la confianza puesta en mí y mis capacidades.

A mis compañeros de maestría, por su compañerismo, amistad y aceptación, a pesar de ser de una carrera diferente a la de ellos. Me enseñaron con paciencia y aconsejaron en cada momento de esta bonita etapa. Ampliaron mi visión desde su conocimiento, mostrándome nuevas formas de aprender. Poder contar en los buenos y en los malos momentos con ellos, fue de gran importancia para mí.

A mis compañeros de laboratorio, por las risas, las bromas, el compañerismo, el apoyo incondicional, el trabajo en equipo, por los detalles, las sorpresas, las largas pláticas y sobre todo por la hermosa amistad que me brindaron.

Dedicatoria

*Esta investigación está dedicada, con mucho cariño y respeto
a mis padres...*

ÍNDICE

Contenido	
ÍNDICE.....	5
ÍNDICE DE FIGURAS	7
ÍNDICE DE TABLAS.....	10
Resumen	11
Abstract.....	12
I. INTRODUCCIÓN	13
1.1 Justificación	15
II. ANTECEDENTES	16
2.1 Minería.....	16
2.2 Metales pesados	16
2.3 Fitominería.....	17
2.4 Estudios sobre hiperacumulación de Au y Ag.....	18
2.5 Plantas hiperacumuladoras	19
2.5.1 Procesos de fitoextracción.....	20
2.6 Fitoextracción continua o natural y mecanismos moleculares	21
2.6.1 Mecanismos moleculares en la absorción de metales	21
2.6.2 Fitoquelatinas y Metalotioneínas	25
2.6.3 Limitantes en la fitoextracción natural.....	26
2.7 Fitoextracción inducida.....	27
2.8 Brasinoesteroides	29
2.8.1 Historia.....	29
2.8.2 Definición.....	29
2.8.3 Estructura	30
2.8.4 Receptores celulares y mecanismos moleculares.....	31
2.9 <i>Linum usitatissimum</i> L.....	32
III. HIPÓTESIS	35
3.1 Hipótesis	35
IV. OBJETIVOS.....	35
4.1 Objetivo general.....	35

4.2 Objetivos particulares	35
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
5.1 Descripción del sitio de estudio	36
5.2 Recolecta del residuo de mina y análisis	36
5.3 Colecta de la semilla de Linaza	36
5.4 Fase experimental en invernadero	36
5.5 Diseño experimental	38
5.6 Aplicación del microorganismo y los agentes químicos.....	39
VI Resultados	40
6.1. Análisis de suelo y tejido vegetal	49
VII Discusión.....	55
VIII Conclusiones.....	61
IX. REFERENCIAS	62
X Anexos.....	71
Anexo I	71
Anexo II	72
Anexo III.....	73
Anexo IV.....	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Procesos llevados a cabo en la fitorremediación de metales pesados (modificado de Parmar y Singh, 2015).	14
Figura 2. Principales vías de transporte de metales y en células desde la raíz a los brotes (Modificado de Clemens <i>et al.</i> , 2002). El transporte de metales desde la raíz a los brotes: La carga eléctrica de las membranas celulares lipofílicas, evita que los iones metálicos se dispersen libremente hacia el citosol, por lo que el transporte de iones metálicos al interior de la célula está mediado por proteínas de membrana, que funcionan como transportadores (Jabeen <i>et al.</i> , 2009).	22
Figura 3. Transportadores de tonoplastos (MTP, CAX, MHX y NRAMP) y la bomba primaria HMA3, que catalizan la captación o liberación de MP divalentes. También se indica Z1F1 que transporta Nicotiamina a las vacuolas y facilita la acumulación de Zn por formación de complejos (tomado de Gavrilescu, 2021).	24
Figura 4. Transportadores de tonoplastos (VIT, VTL, COPT, IREG, SALI Y ACR). Se muestran también las bombas ABC, que trasladan los complejos fitoquelatina + metal al interior de la vacuola (tomado de Gavrilescu, 2021).	24
Figura 5. Estructura general de los brasinoesteroides (Modificado de Hernández-Silva y García Martínez, 2016).	30
Figura 6. Estructura química del brasinólido (Modificado de Yuzhu <i>et al.</i> , 2022).	31
Figura 7. Representa la acción de la proteína BIN2 en presencia y en ausencia de brasinólido (Modificado de Carbonell <i>et al.</i> , 2006).	32
Figura 8. <i>Linum usitatissimum</i> L.	33
Figura 9. Municipio de Tlalpujahua de Rayón, Michoacán, México. Mapa elaborado por Alejandro López, 2023.	37
Figura 10. Unidad experimental, cada maceta contará con siete plantas de <i>L. usitatissimum</i>	39
Figura 11. Altura (cm) de <i>Linum usitatissimum</i> (linaza) con los tratamientos de Brasinoesteroides, <i>Azospirillum brasilense</i> , Tiocianato y Tiosulfato, individual y combinados. Las barras indican el error estándar. Control (C), Brasinoesteroides (B), <i>Azospirillum brasilense</i> (Ab), Brasinoesteroides + <i>A. brasilense</i> (BAb), Tiocianato (Tio), Tiocianato + Brasinoesteroides (TioB), Tiocianato + <i>A. brasilense</i> (TioAb), Tiocianato + Brasinoesteroides + <i>A. brasilense</i> (TioBAb), Tiosulfato (Tios), Tiosulfato + Brasinoesteroides (TiosB), Tiosulfato + <i>A. brasilense</i> (TiosAb), Tiosulfato + Brasinoesteroides + <i>A. brasilense</i> (TiosBAb).	40
Figura 12. Longitud de raíz (cm) de <i>Linum usitatissimum</i> , en base a los tratamientos de Brasinoesteroides, <i>Azospirillum brasilense</i> , Tiocianato y Tiosulfato, individual y combinados. Las barras indican el error estándar y las letras, grupos de acuerdo a la prueba de comparaciones múltiples por medio de Tukey. Control (C), Brasinoesteroides (B), <i>Azospirillum brasilense</i> (Ab), Brasinoesteroides + <i>A. brasilense</i> (BAb), Tiocianato (Tio), Tiocianato + Brasinoesteroides (TioB), Tiocianato + <i>A. brasilense</i> (TioAb), Tiocianato +	

Brasinoesteroides + <i>A. brasilense</i> (TioBAb), Tiosulfato (Tios), Tiosulfato + Brasinoesteroides (TiosB), Tiosulfato + <i>A. brasilense</i> (TiosAb), Tiosulfato + Brasinoesteroides + <i>A. brasilense</i> (TiosBAb).	41
Figura 13. Longitud de raíz (cm), en presencia (B+) o ausencia (B-) de Brasinoesteroides en plantas de <i>Linum usitatissimum</i> (linaza). Las barras indican el error estándar.....	42
Figura 14. Longitud de raíz (cm), en presencia (Tio+) o ausencia (Tio-) de Tiocianato en plantas de <i>Linum usitatissimum</i> (linaza). Las barras indican el error estándar.	42
Figura 15. Longitud de raíz (cm), en presencia (Tios+) o ausencia (Tios-) de Tiosulfato en plantas de <i>Linum usitatissimum</i> (linaza). Las barras indican el error estándar.	43
Figura 16. Área de raíz (cm ²) de <i>Linum usitatissimum</i> (linaza) con los tratamientos de Brasinoesteroides, <i>Azospirillum brasilense</i> , Tiocianato y Tiosulfato, individual y combinados. Las barras indican el error estándar y las letras, grupos de acuerdo a la prueba de comparaciones múltiples por medio de Tukey. Control (C), Brasinoesteroides (B), <i>Azospirillum brasilense</i> (Ab), Brasinoesteroides + <i>A. brasilense</i> (BAb), Tiocianato (Tio), Tiocianato + Brasinoesteroides (TioB), Tiocianato + <i>A. brasilense</i> (TioAb), Tiocianato + Brasinoesteroides + <i>A. brasilense</i> (TioBAb), Tiosulfato (Tios), Tiosulfato + Brasinoesteroides (TiosB), Tiosulfato + <i>A. brasOilense</i> (TiosAb), Tiosulfato + Brasinoesteroides + <i>A. brasilense</i> (TiosBAb).	44
Figura 17. Área de raíz (cm ²), en presencia (B+) o ausencia (B-) de Brasinoesteroides en plantas de <i>Linum usitatissimum</i> (linaza). Las barras indican el error estándar.	44
Figura 18. Área de raíz (cm ²), en presencia (Tios+) o ausencia (Tios-) de Tiosulfato en plantas de <i>Linum usitatissimum</i> (linaza). Las barras indican el error estándar.	45
Figura 19. Las barras negras, representan la biomasa fresca aérea (g) de <i>Linum usitatissimum</i> (linaza) con los tratamientos de Brasinoesteroides, <i>Azospirillum brasilense</i> , Tiocianato y Tiosulfato, individual y combinados. Las barras indican el error estándar y las letras, grupos de acuerdo a la prueba de comparaciones múltiples por medio de Tukey. Las barras grises, representan la biomasa fresca raíz (g) de <i>Linum usitatissimum</i> (linaza) con los tratamientos de Brasinoesteroides, <i>Azospirillum brasilense</i> , Tiocianato y Tiosulfato, individual y combinados. Las barras indican el error estándar y las letras, grupos de acuerdo a la prueba de comparaciones múltiples por medio de Tukey. Control (C), Brasinoesteroides (B), <i>Azospirillum brasilense</i> (Ab), Brasinoesteroides + <i>A. brasilense</i> (BAb), Tiocianato (Tio), Tiocianato + Brasinoesteroides (TioB), Tiocianato + <i>A. brasilense</i> (TioAb), Tiocianato + Brasinoesteroides + <i>A. brasilense</i> (TioBAb), Tiosulfato (Tios), Tiosulfato + Brasinoesteroides (TiosB), Tiosulfato + <i>A. brasilense</i> (TiosAb), Tiosulfato + Brasinoesteroides + <i>A. brasilense</i> (TiosBAb).	46
Figura 20. Biomasa fresca aérea (g), en presencia (Tios+) o ausencia (Tios-) de Tiosulfato en plantas de <i>Linum usitatissimum</i> (linaza). Las barras indican el error estándar.....	47
Figura 21. Las barras negras, representan la Biomasa seca aérea (g) de <i>Linum usitatissimum</i> (linaza) con los tratamientos de Brasinoesteroides, <i>Azospirillum brasilense</i> , Tiocianato y Tiosulfato, individual y combinados. Las barras indican el error estándar. Las barras grises, representan la biomasa seca raíz (g) de <i>Linum usitatissimum</i> (linaza) con los	

tratamientos de Brasinoesteroides, *Azospirillum brasilense*, Tiocianato y Tiosulfato, individual y combinados. Las barras indican el error estándar y las letras, grupos de acuerdo a la prueba de comparaciones múltiples por medio de Tukey. Control (C), Brasinoesteroides (B), *Azospirillum brasilense* (Ab), Brasinoesteroides + *A. brasilense* (BAb), Tiocianato (Tio), Tiocianato + Brasinoesteroides (TioB), Tiocianato + *A. brasilense* (TioAb), Tiocianato + Brasinoesteroides + *A. brasilense* (TioBAb), Tiosulfato (Tios), Tiosulfato + Brasinoesteroides (TiosB), Tiosulfato + *A. brasilense* (TiosAb), Tiosulfato + Brasinoesteroides + *A. brasilense* (TiosBAb). 48

Figura 22. Biomasa seca de raíz (g), en presencia (Tios+) o ausencia (Tios-) de Tiosulfato en plantas de *Linum usitatissimum* (linaza). Las barras indican el error estándar..... 49

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Aplicación de los agentes químicos con y sin <i>Azospirillum brasilense</i> y brasinoesteroides	39
Tabla 2. Análisis factorial, aplicado a la altura (cm) en plantas de <i>Linum usitatissimum</i> (linaza).....	40
Tabla 3. Análisis factorial, aplicado a Longitud de raíz (cm), en plantas de <i>Linum usitatissimum</i> (linaza).....	41
Tabla 4. Análisis factorial, aplicado al área de raíz (cm ²), en plantas de <i>Linum usitatissimum</i> (linaza).....	43
Tabla 5. Análisis factorial, aplicado a la biomasa fresca aérea en plantas de <i>Linum usitatissimum</i> (linaza).....	46
Tabla 6. Análisis factorial, aplicado a la biomasa fresca de raíz (g), en plantas de <i>Linum usitatissimum</i> (linaza).....	46
Tabla 7. Análisis factorial, aplicado a la biomasa seca aérea (g), en plantas de <i>Linum usitatissimum</i> (linaza).....	47
Tabla 8. Análisis factorial, aplicado a la biomasa seca de raíz, en plantas de <i>Linum usitatissimum</i> (linaza).....	48
Tabla 9. Análisis fisicoquímicos del jal de mina de Tlalpujahua de Rayón, Michoacán, México.....	50
Tabla 10. Tabla 10. En la tabla se muestran los resultados de los análisis de minerales del jal de mina (T0), la absorción de minerales en el tejido vegetal de raíz del tratamiento control (1R7), <i>A. brasilense</i> (3R7) y <i>A. brasilense</i> en combinación con brasinoesteroides (4R7), así como el suelo de los tratamientos con <i>A. brasilense</i> (T3) y <i>A. brasilense</i> combinada con brasinoesteroides (T4), después de la cosecha de las plantas.	51
Tabla 11. Estudios sobre fitoextracción de Au y Ag (modificado de Dinh <i>et al.</i> , 2022). ...	71
Tabla 12. Principales especies hiperacumuladoras reportadas en 2012 (Modificado de Bhargava <i>et. al.</i> , 2012).	72
Tabla 13. Principales genes transportadores de metales en diferentes plantas, también involucrados en la tolerancia y acumulación de metales pesados (Modificado de Bhargava <i>et al.</i> , 2012).....	73
Tabla 14. Algunos agentes quelantes utilizados en estudios de Fitorremediación. Modificado de Alkorta <i>et al.</i> , 2004.....	74

EVALUACIÓN DE LA TOLERANCIA Y CRECIMIENTO DE LA ESPECIE *Linum usitatissimum* EN UN JAL DE MINA

Resumen

Debido a la minería tradicional, ha habido un incremento de residuos de mina al aire libre. Estos residuos (jales mineros), ocasionan un gran impacto ambiental debido a que están contaminados con MP (metales pesados), los cuales, no son degradados y pueden permanecer en el sitio por largo tiempo, así como ser arrastrados contaminando aire y suelo. Es difícil que cualquier planta logre establecerse en estos sitios contaminados. Determinar alternativas que ayuden a la supervivencia de la planta, es fundamental si se plantea su uso en una tecnología como la fitorremediación. El presente trabajo evaluó la capacidad de *Linum usitatissimum* L. (linaza), para establecerse en un jal de mina de Tlapujahua de Rayón, Michoacán, México, con la inoculación de *Azospirillum brasilense* y brasinoesteroides, en combinación con tiocianato de amonio (NH_4SCN), tiosulfato de amonio ($[(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_3]$). Esto con la finalidad de proponerse como potencial hiperacumuladora en materia de fitoextracción de oro (Au) y plata (Ag). El NH_4SCN y el $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_3$, se aplicaron después de 19 semanas de crecimiento de la planta (en presencia o ausencia del microorganismo y la hormona vegetal), en condiciones de invernadero. Una semana después de la aplicación de las sustancias químicas al residuo de mina, las plantas fueron cosechadas, se secaron a 70°C por dos días, se molieron y finalmente, se determinó la longitud y el área de raíz, la biomasa peso fresco y la biomasa peso seco de la planta, así como, la concentración de Au y Ag en sus órganos vegetales por el método de Fluorescencia de rayos X. Los resultados mostraron que *L. usitatissimum* desarrolló alta tolerancia al jal de mina, teniendo una germinación de semillas del 90% y logrando establecerse en el jal. El adicionar brasinoesteroides y *A. brasilense* promovió el desempeño de la planta de lino y modificó su estructura radical al mostrar mayor longitud y área de raíz. En cuanto a la fitoextracción, se obtuvieron niveles bajos de Au y Ag en raíz, sin embargo, mostró niveles mayores a 15,000 ppm de minerales como Fe, K, S, Al. Gracias al desempeño de *L. usitatissimum*, esta especie tiene potencial para la fitorremediación.

Palabras clave: Residuo de mina, Hiperacumulación, *Azospirillum brasilense*, fitohormonas.

Abstract

Due to traditional mining, there has been an increase in open-air mine waste. These wastes (mining tailings) cause a great environmental impact because they are contaminated with MP (heavy metals), which are not degraded and can remain on site for a long time, as well as being carried away, contaminating air and soil. It is difficult for any plant to establish itself in these contaminated sites. Determining alternatives that help the plant survival is essential if its use in a technology such as phytoremediation is considered. The present study evaluated *Linum usitatissimum* L. ability (linseed), to establish in a mine tailings of Tlapujahua de Rayón, Michoacán, Mexico, with *Azospirillum brasilense* and brassinosteroids inoculation, in combination with ammonium thiocyanate (NH_4SCN), ammonium thiosulfate ($[(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_3]$). By proposing itself as a potential hyperaccumulator by gold (Au) and silver (Ag) phytoextraction. NH_4SCN and $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_3$ were applied after 19 weeks plant growth (in presence or absence of the microorganism and the plant hormone), under greenhouse conditions. One week after chemicals application to the mine waste, the plants were harvested. They were dried at 70°C for two days, ground and finally, the length and root area, biomass, fresh weight and dry weight biomass of the plant, as well as the concentration of Au and Ag in its plant organs by the X-ray Fluorescence method. The results showed that *L. usitatissimum* developed high tolerance to mine tailings, having a 90% germination seeds and managing to establish themselves in the soil. Adding brassinosteroids and *A. brasilense* promoted performance of flax plant and modified its root structure by showing greater length and root area. Regarding phytoextraction, low levels of Au and Ag were obtained in root, however, it showed levels greater than 15,000 ppm of minerals such as Fe, K, S, Al. Thanks to the performance of *L. usitatissimum*, this species has the potential to phytoremediate.

Keywords: Mine tailings, Hyperaccumulation, *Azospirillum brasilense*, Phytohormones.

I. INTRODUCCIÓN

La minería se denomina como una actividad económica importante a nivel mundial y México es considerado una potencia en este sector. Sin embargo, esta actividad genera gran cantidad de residuos conocidos como “jales mineros” (Blaylock *et al.*, 1997; Rendina *et al.*, 2014; González-Valdez *et al.*, 2015). Los jales mineros son restos de roca molida de partículas pequeñas, con un tamaño de 1-600 μm , altamente reactivos, contienen un pH extremo, alta salinidad y casi nula capacidad para retener el agua, así como escasa materia orgánica y grandes concentraciones de metales pesados (MP) como cadmio (Cd), mercurio (Hg), arsénico (As), cobre (Cu), hierro (Fe), manganeso (Mn), níquel (Ni), cromo (Cr) y plomo (Pb) (Ceniceros-Gómez *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2017). Los MP al no ser biodegradables, pueden acumularse indefinidamente o dispersarse hasta contaminar suelo, aire o agua (Ali *et al.*, 2013; Alaboudi *et al.*, 2018). Una alternativa económica y viable para la restauración de estos sitios contaminados, es mediante el uso de plantas, con ayuda de la técnica conocida como fitorremediación, que aprovecha la capacidad que tienen algunas plantas conocidas como hiperacumuladoras para estabilizar (fitoestabilización), absorber (fitoextracción) o acumular contaminantes en sus órganos (Blaylock *et al.*, 1997; Rendina *et al.*, 2014; González-Valdez *et al.*, 2015; González-Valdez *et al.*, 2019).

La fitorremediación es una técnica biológica que se puede dividir en diferentes categorías, de acuerdo a los mecanismos de eliminación de contaminantes, entre los que se encuentran:

- 1) Fitoestabilización: Permite mejorar las características y propiedades del suelo contaminado, reduciendo así, en gran medida, la movilidad y biodisponibilidad de los contaminantes inorgánicos presentes en éste, evitando que bajen a aguas subterráneas y puedan ingresar a la cadena alimenticia (Rizzi, 2004; López-Martínez *et al.*, 2005; Delgadillo-López *et al.*, 2011; Ali *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2017; Shah y Daverey 2020). Este proceso, lo lleva a cabo la raíz de la planta, a través de mecanismos como la excreción de exudados con enzimas óxido-reductoras, que transforman la valencia de los metales peligrosos a un estado menos reactivo y tóxico, logrando la precipitación de los metales o inmovilizándolos con la formación de complejos quelantes, con ello se disminuye el estrés y el daño que éstos puedan ocasionar (Rizzi, 2004; Ali *et al.*, 2013; Shah y Daverey 2020). La fitoestabilización es más efectiva en suelos con una gran concentración de materia orgánica y de textura fina con contaminación superficial principalmente, además de que, solo brinda

una solución temporal al problema con los MP, ya que éstos permanecen presentes en el suelo pero su movilidad se encuentra reducida (Ali *et al.*, 2013; Delgadillo-López *et al.*, 2011; Yadav *et al.*, 2018) (Figura 1); 2) Fitovolatilización: Es la absorción del contaminante inorgánico por la planta y que es translocado hacia las hojas y de ahí, es liberado hacia la atmósfera. Se cree que la fitovolatilización no es totalmente eficaz ya que no hay estudios que demuestren que elimina el contaminante, solo lo transfiere de un lugar a otro (López-Martínez, 2005; Ali *et al.*, 2013; Yadav *et al.*, 2018); 3) Fitoextracción: Es la absorción o concentración de los MP en los órganos aéreos de la planta (tallo y hojas) (Yang *et al.*, 2005; Placek *et al.*, 2016). La eficiencia de esta técnica, depende de las características y propiedades de los MP concentrados en el suelo y de la capacidad de la planta utilizada para la fitoextracción (Ali *et al.*, 2013). Una vez realizado el proceso, el metal puede ser removido de los órganos aéreos de la planta al cosechar la biomasa seca después de su desarrollo (Yadav *et al.*, 2018). Sin embargo, muchos metales en el suelo se encuentran en formas no disponibles, por lo que, deben ser solubilizados con la aplicación de un agente solubilizante, como tiocianato de amonio (NH_4SCN), tiosulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_3$, o con la inoculación de algún microorganismo. En México, la fitorremediación es un reto aún para su implementación, debido a los pocos estudios que se tienen sobre esta técnica.

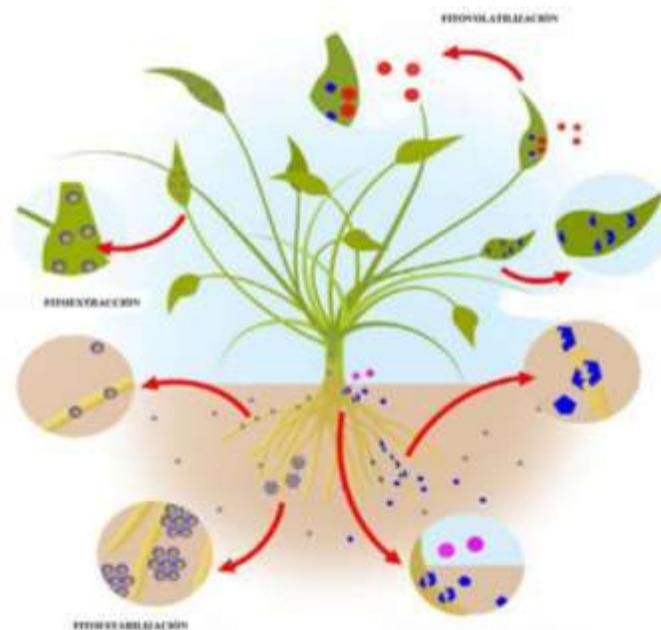


Figura 1. Procesos llevados a cabo en la fitorremediación de metales pesados (modificado de Parmar y Singh, 2015).

1.1 Justificación

La localidad de Tlalpujahua de Rayón, Michoacán, México, tiene una historia de más de 400 años de explotación minera oro (Au) y plata (Ag), principalmente (Uribe-Salas, 2002; Osuna-Vallejo *et al.*, 2018). En esa época, se utilizaban diversos métodos para la separación de estos minerales, destacando la fundición, patio-amalgamación, la cianuración, y el sistema metalúrgico de flotación (Corona-Chávez *et al.*, 2010; Corona-Chávez *et al.*, 2017; Osuna-Vallejo *et al.*, 2020). Dichos métodos generaron gran cantidad de residuos mineros que, en un inicio fueron arrojados a los ríos, sin embargo, en 1902, se formaron las presas de jales mineros, acumulando grandes cantidades de estos residuos a cielo abierto (Corona-Chávez *et al.*, 2010; Corona-Chávez *et al.*, 2017). Se estima que de cada 22'343,740 mg de mineral que era extraído, solo el 8% era de valor económico. Esto ocasionó una grave contaminación ambiental, ya que estos residuos mineros se han regenerado de forma natural (Osuna-Vallejo *et al.*, 2020) lo que representan un peligro potencial para los ecosistemas.

Debido a esta problemática y a la incapacidad de la minería tradicional para recuperar los MP de jales contaminados, se propone investigar sobre la técnica de fitorremediación conocida como fitoextracción, ya que representa una alternativa más amigable para el ambiente, al utilizar plantas conocidas como hiperacumuladoras para absorber el metal y posteriormente recuperarlo, al cosecharlas.

Debido a que el Au y la Ag son insolubles en su estado natural, no pueden ser absorbidos por las plantas, por lo que se estableció la aplicación de agentes químicos como el tiocianato de amonio (NH_4SCN) y el tiosulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_3$, así como la inoculación de microorganismos, con la finalidad de favorecer la biodisponibilidad del metal presente en el residuo de mina y así, poder absorberlo con mayor facilidad por la planta.

Para ello, se eligió trabajar con la especie *L. usitatissimum* ya que se ha observado que logra crecer en sitios contaminados con MP, sin que se observe disminución en la producción de biomasa, por lo que se sospecha que podría ser una potencial planta hiperacumuladora, sin embargo, aún no se ha reportado ningún estudio que utilice esta especie en materia de fitorremediación.

II. ANTECEDENTES

2.1 Minería

La minería es una de las principales actividades económicas a nivel mundial y México se ha caracterizado como una potencia en este sector (Mejía *et al.*, 1999; Mendoza-Hernández *et al.*, 2019). Entre los principales productos de extracción de la industria minera mexicana, se encuentran metales como bismuto (Bi), plomo (Pb), cobre (Cu), zinc (Zn) y molibdeno (Mo). México ocupa en primer lugar a nivel mundial en la producción de plata (Ag), y el noveno lugar en producción de oro (Au). A nivel nacional, según datos del Instituto Nacional de Estadística y Geografía, México tiene producción de Mo (1.65%), Pb (2.76%), Zn (5.62%), Cu (17.99%), Ag (27.19%) y Au (28.84%) siendo este último, el de mayor importancia en cuanto a extracción (Góngora, 2013). Sin embargo, la minería genera gran cantidad de jales mineros, con una estimación de 1150 millones de toneladas, contaminados con MP, los más comunes son cadmio (Cd), mercurio (Hg), arsénico (As), Cu, hierro (Fe), manganeso (Mn), níquel (Ni), cromo (Cr) y Plomo (Pb), y en ocasiones metales preciosos como Ag y Au (Alaboudi *et al.*, 2018; Ceniceros-Gómez *et al.*, 2018 Mendoza-Hernández *et al.*, 2019).

2.2 Metales pesados

Los MP se definen como elementos químicos metálicos con número atómico mayor a 20 y una densidad superior a 5 g cm^{-3} (Mendez *et al.*, 2009; Hernández-Caricio *et al.*, 2022). Se dividen en macroelementos, elementos traza y oligoelementos (Espinoza-Pinca y Vallejo-Caicedo, 2019). Son elementos naturales, presentes en la corteza terrestre de forma natural o como consecuencia de actividades antropogénicas (Hernández-Caricio *et al.*, 2022). Entre los principales MP encontramos el Cd, Cr, Pb, Mn, Ni y Zn, algunos metaloides como As, Sb y Se, así como algunos metales preciosos como Au y Ag (Mendez *et al.*, 2009; Hernández-Caricio *et al.*, 2022).

Estos MP se caracterizan por ser tóxicos a bajas concentraciones, tienden a bioacumularse ya que no son degradados por procesos químicos o microbiológicos en el suelo y suelen estar por largos periodos indefinidos en el sitio (Leyva *et al.*, 1997; Ali *et al.*, 2013; Mendez *et al.*, 2009; Hernández-Caricio *et al.*, 2022). Esto ocasiona graves daños al ambiente ya que se acumulan en aire, agua y suelo, indefinidamente (Ali *et al.*, 2013; Alaboudi *et al.*, 2018).

La contaminación ambiental por MP es un problema a nivel mundial (Alvarado *et al.*, 2011; González-Valdez *et al.*, 2019). Por lo que han surgido alternativas biológicas como la fitorremediación para remediar sitios mineros contaminados con Pb, o para fitoextraer (fitominería) metales valiosos como Au y Ag (Alvarado *et al.*, 2011; González-Valdez *et al.*, 2019).

2.3 Fitominería

En los últimos años, la incapacidad de la minería tradicional para extraer Au y Ag residual, así como la acumulación de millones de toneladas de jales mineros a cielo abierto y el precio cada vez más elevado de los metales preciosos (tan solo en enero del 2021 el costo de Ag fue de 913.48 USD/kg, y de Au de 65,855.79 USD/kg), ha llevado al surgimiento de nuevas tecnologías biológicas autosustentables de extracción, usando plantas hiperacumuladoras, como es el caso de la fitominería (Agudelo *et al.*, 2005; Novo *et al.*, 2017; Dinh *et al.*, 2022).

La fitominería es una fitoextracción inducida implementada para la recuperación de metales valiosos (Au y Ag), de suelos contaminados como jales mineros, mediante el uso de plantas hiperacumuladoras con producción de abundante biomasa (Anderson *et al.* 2005; Sheoran *et al.*, 2009; Maluckov, 2015; González-Valdez *et al.*, 2019). Esta técnica, brinda la posibilidad de generar fuentes de energía renovables basándose en la quema de biomasa, así como la recuperación de metales con suficiente valor económico (Sheoran *et al.*, 2009). Consiste, en recolectar tejidos vegetales como hojas, tallos o raíces de plantas hiperacumuladoras que han extraído una gran cantidad de MP, así como en la reutilización de estos metales (Sheoran *et al.*, 2009; Maluckov 2015; González-Valdez *et al.*, 2019).

Las plantas que son capaces de acumular más de 1 mg kg⁻¹ de Au (este parámetro está basado en la concentración normal de Au en planta el cual es de 0.01 mg kg⁻¹), se les considera hiperacumuladoras (Anderson *et al.*, 2005; Dinh *et al.*, 2022). Para Ag, se reporta que su nivel de absorción de forma natural es de alrededor de 1 mg kg⁻¹ (Harris y Bali, 2007). Estudios realizados por Anderson *et al.* (2003) colaborando con la Companhia Vale do Rio Doce, mencionan que para considerar viable la fitominería de Au en campo, se debe cosechar un cultivo con biomasa seca de 10 t en 1 ha de tierra, en inducir una concentración de 100 mg kg⁻¹; lo que equivale a producir 1 kg de Au por hectárea (Anderson *et al.*, 2005).

Las plantas no son hiperacumuladoras naturales de oro ya que se encuentra en formas no disponibles en el suelo y es altamente insoluble, por lo que es necesaria la aplicación de agentes solubilizantes (Anderson *et al.*, 2005; Sheoran *et al.*, 2009; Maluckov 2015; González-Valdez *et al.*, 2019). La aplicación de agentes químicos, como NH_4SCN o $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_3$, así como la inoculación de microorganismos (hongos o bacterias), pueden contribuir para aumentar la biodisponibilidad del MP en el suelo, ayudando a la solubilización del Au y Ag, facilitando su absorción por la raíz, y la translocación de la raíz a la parte aérea de la planta, permitiendo mayor acumulación del MP en la planta (Blaylock *et al.*, 1997; Maluckov, 2015; Novo *et al.*, 2017; González-Valdez *et al.*, 2018).

2.4 Estudios sobre hiperacumulación de Au y Ag

La recuperación de metales preciosos como el Au por las plantas, ha fascinado a los científicos desde la edad media (Wang *et al.*, 2017; Cobarruvias y Peña-Cabriales, 2017; González-Valdez *et al.*, 2019; Afonso *et al.*, 2020; Shah y Daverey, 2020), pero fue hasta el siglo XX, cuando fue posible analizar los tejidos vegetales en búsqueda de estos metales (Sheoran *et al.*, 2009; González-Valdez *et al.*, 2019). A principios del siglo XX, surgieron los primeros informes sobre la acumulación de Au en plantas (Wilson-Corral *et al.*, 2012), tiempo después, distintos investigadores comenzaron a reportar la presencia de este metal precioso en diversas plantas en diferentes partes del mundo (Novo *et al.*, 2017).

El Au y Ag son minerales que se encuentran de forma insoluble y no biodisponible en el suelo, lo que hace que sea difícil su absorción por las plantas. Se conoce que, en condiciones naturales, las plantas solo pueden absorber aproximadamente 1 mg kg^{-1} de Ag, mientras que, de Au aún no se han reportado especies capaces de absorberlo (Harris y Bali, 2007; Wilson-Corral *et al.*, 2011; González-Valdez *et al.*, 2018; Dinh *et al.*, 2022).

Las técnicas tradicionales utilizadas para recuperar Au y Ag son muy costosas y ocasionan impactos negativos al ambiente, generando elementos potencialmente tóxicos como Pb, Cd, As, Tl, Hg y compuestos como el CN que, al no ser biodisponibles, persisten en suelos o son lixiviados a los mantos acuíferos (Dinh *et al.*, 2022; González-Valdez *et al.*, 2018).

La fitoextracción inducida, ha ayudado a mejorar la absorción de estos metales, como lo muestra un estudio realizado por Harris y Bali (2007) (Anexo I), donde *Brassica juncea* (mostaza india) fue capaz de absorber hasta $124\ 000\ \text{mg kg}^{-1}$ de Ag, y *Medicago sativa*

(alfalfa) absorbió 136.000 g kg⁻¹ de Ag, en un sustrato acuoso que contenía 500 -10.000 mg kg⁻¹ AgNO₃ (Anexo IV). Por su parte, para la recuperación de oro, el primer estudio reportado fue el de Anderson *et al.* (1998), quienes utilizaron la especie *B. juncea* (mostaza india), en arena como sustrato con oro diseminado (5 mg kg⁻¹ Au); como tratamiento, adicionaron tiocianato de amonio (NH₄SCN: 0, 80, 160, 320 y 640 mg kg⁻¹), logrando una acumulación de 57 mg kg⁻¹ Au en la parte aérea de la planta.

Uno de los estudios más recientes, es el realizado por González-Valdez *et al.* (2018), donde llevó a cabo una hiperacumulación inducida en relaves mineros con una concentración de 0,5164 mg kg⁻¹ Au y 22,1 mg kg⁻¹ Ag, en *Brassica napus* (Colza). El tratamiento, consistió en la adición de tiocianato de amonio (NH₄SCN: 1 g kg⁻¹) y tiosulfato de amonio ((NH₄)₂S₂O₃: 2 g kg⁻¹) más la inoculación del hongo *Aspergillus niger*. Como resultado, obtuvieron una concentración de Au (tratado por NH₄SCN): en tallos 1,5 mg kg⁻¹; en raíces 10 mg kg⁻¹ y una concentración de Ag (tratado por (NH₄)₂S₂O₃ e inoculados por el hongo *A. niger*): alrededor de 50.000; 30.000; 15.000 mg kg⁻¹ en raíces, tallos y hojas, respectivamente. Existen pocos estudios sobre la fitoextracción de estos metales valiosos por lo que aún es necesario ahondar más en investigaciones, ya que es difícil encontrar especies de plantas con las características necesarias, como abundante biomasa, rápido crecimiento y capaces de absorber y acumular metales valiosos en sus brotes (Bhargava *et al.*, 2012; Dinh *et al.*, 2022).

2.5 Plantas hiperacumuladoras

Algunas plantas han desarrollado la capacidad de sobrevivir en suelos con gran cantidad de metales (Baran, 2021). Las plantas capaces de crecer en suelos contaminados por MP, se pueden agrupar en tres categorías: A) Excluyentes: Evitan la absorción de metales tóxicos en la raíz; se pueden utilizar en la fitoestabilización, evitando la dispersión del metal y concentrándolo alrededor de la raíz; B) Indicadoras: En éstas la concentración interna de metales, refleja la concentración del metal en el suelo; C) Acumuladoras: En éstas el metal se concentra en la parte aérea de las plantas en grandes cantidades (Bhargava *et al.*, 2012). Las plantas capaces de captar y acumular metales en niveles por encima de lo normal en sus partes cosechables, son conocidas como hiperacumuladoras (Baran, 2021).

Las plantas hiperacumuladoras son un subgrupo de especies acumuladoras, se dividen en dos tipos: 1. Las hiperacumuladoras obligadas o estrictas, que son endémicas de suelos con

concentraciones elevadas de metales; y 2. Las hiperacumuladoras facultativas u opcionales, en los cuales, de una población, solo unas especies son hiperacumuladoras. También existen especies que, aunque se adaptan a diferentes condiciones, solo en pocos de sitios se manifiestan como hiperacumuladoras (Peng *et al.*, 2020; Siromlya y Zagurskaya, 2022).

El término “hiperacumulador” fue utilizado por primera vez por Jaffré *et al.* (1976) para intentar describir la acumulación de Ni. Después, fue aplicado a plantas que acumulaban una cantidad mayor a 1000 µg/g de Ni en sus hojas, el cuál era de 100 a 1000 veces mayor que otras plantas (Siromlya y Zagurskaya, 2022). Las plantas hiperacumuladoras naturales se caracterizan por: A) Acumular en sus tejidos aéreos una cantidad por encima de lo normal de metales o metaloides y, B) Tener una capacidad mejorada para llevar a cabo la desintoxicación de metales (Peng *et al.*, 2020). En 2012 (Anexo II) se dan a conocer algunas de las principales especies hiperacumuladoras, así como el metal que acumuló, encontrándose miembros de la familia *Brassicaceae*, *Asteraceae*, *Poaceae*, *Fabaceae*, *Lamiaceae*, y *Sapotaceae* (Bhargava *et al.*, 2012). Para que una planta sea considerada hiperacumuladora, debe tener un umbral de hiperacumulación para cada metal de: > 100 µg/g de Cd; > 300 µg/g de Co y Cu; > 1 000 µg/g Ni, As, y Pb, > 3 000 µg/g de Zn, > 10,000 µg/g Mn (Jia-Shi *et al.*, 2020).

Para 2020, según la base global de hiperacumuladores (www.hiperacumuladores.org), se reportaron alrededor de 721 hiperacumuladores, de los cuales, hay 532 especies hiperacumuladoras de Ni, 7 de Cd, y 5 de As, y el número sigue aumentando (Bhargava *et al.*, 2012; Jia-Shi *et al.*, 2020).

2.5.1 Procesos de fitoextracción

Existen dos procesos de fitoextracción: A) Fitoextracción natural o continua, la cual aprovecha la capacidad natural de las plantas para acumular y traslocar grandes cantidades de metales; y, B) Fitoextracción inducida, en la cual hay una aplicación de sustancias químicas, conocidas como quelantes al suelo, para mejorar la absorción de metales por las plantas (Alkorta *et al.*, 2004). Actualmente, se está explorando la adición de microorganismos (bacterias u hongos) que ayuden a mejorar la biodisponibilidad del metal presente en el suelo y facilitando su absorción por la planta (Gohre y Paszkowski, 2006; Bhargava *et al.*, 2012).

2.6 Fitoextracción continua o natural y mecanismos moleculares

Las plantas denominadas hiperacumuladores naturales, son capaces de remover MP del suelo, mediante la exudación de compuestos orgánicos de la raíz de la planta, como quelantes o mediante la liberación de protones, que cambian el pH del suelo y favorecen la absorción del metal (Alkorta *et al.*, 2004; Bhargava *et al.*, 2012; Gavrilesco, 2021). Esto, les permite cambiar la biodisponibilidad de los metales presentes en el suelo, absorberlos mediante sus raíces y acumularlos en sus partes cosechables como hojas o tallos. A este proceso, se le conoce como fitoextracción continua o natural (Alkorta *et al.*, 2004; Yabeen *et al.*, 2009; Bhargava *et al.*, 2012).

Estas plantas, pueden resistir concentraciones altas de MP gracias a que contrarrestan el estrés ocasionado por éstos, con mecanismos moleculares bien coordinados que incluyen la inducción de proteínas de estrés, síntesis de transportadores para MP específicos, inducción de ligandos de bajo peso molecular, inmovilización, quelación y secuestro de minerales en vacuolas que ayudan en la homeostasis de los metales (Seregin y Kozhevnikova, 2020; Gavrilesco, 2021; Siromlya y Zagurskaya, 2022).

Uno de los mecanismos de defensa para evitar los daños ocasionados por la toxicidad de los metales, es la capacidad de las plantas para catalizar reacciones redox, así como, para alterar su valencia, por ejemplo, la síntesis de glutatión el cual, puede disminuir las especies reactivas inducidas debido al estrés ocasionado por los MP, lo que permite que se acumulen en formas no tóxicas. También se promueve la unión del metal a ligandos orgánicos de bajo peso molecular; cuando el ligando forma complejos con los metales, se denomina quelación (Bhargava *et al.*, 2012; Seregin y Kozhevnikova, 2020; Gavrilesco, 2021). Estos mecanismos, evitan concentraciones tóxicas de MP en zonas susceptibles dentro de la célula, su funcionamiento depende de la estructura y de la composición de la pared celular, así como de la membrana plasmática, del sistema radical, de la participación de enzimas específicas y de la presencia de agentes quelantes, además de la estructura de las vacuolas (Gohre y Paszkowski, 2006; Gavrilesco, 2021).

2.6.1 Mecanismos moleculares en la absorción de metales

Se cree que hay cuatro procesos (Figura 2), por los cuales la planta realiza la fitoextracción y acumulación del metal (Gavrilesco, 2021):

A) La absorción de metales a través del sistema radical: El sistema radical, tiene una superficie muy grande que es capaz de desarrollar mecanismos de tolerancia al estrés ocasionado por los MP (Bhargava *et al.*, 2012; Seregin y Kozhevnikova, 2020; Gavrilescu, 2021). Primero, ocurre la movilización de los metales, gracias a la exudación de quelantes por parte de la raíz y por acidificación de la rizosfera (Clemens *et al.*, 2002; Yadav *et al.*, 2018). La absorción de los metales por parte de la planta, consiste en interceptar estos iones metálicos que están unidos a moléculas quelantes, por parte de la raíz. Su entrada es probablemente por paso apoplásico. En este proceso de absorción, intervienen sistemas de captación, ubicados en la membrana plasmática. Este paso depende mucho de la solubilidad del metal (Clemens *et al.*, 2002; Jabeen *et al.*, 2009; Yadav *et al.*, 2018).

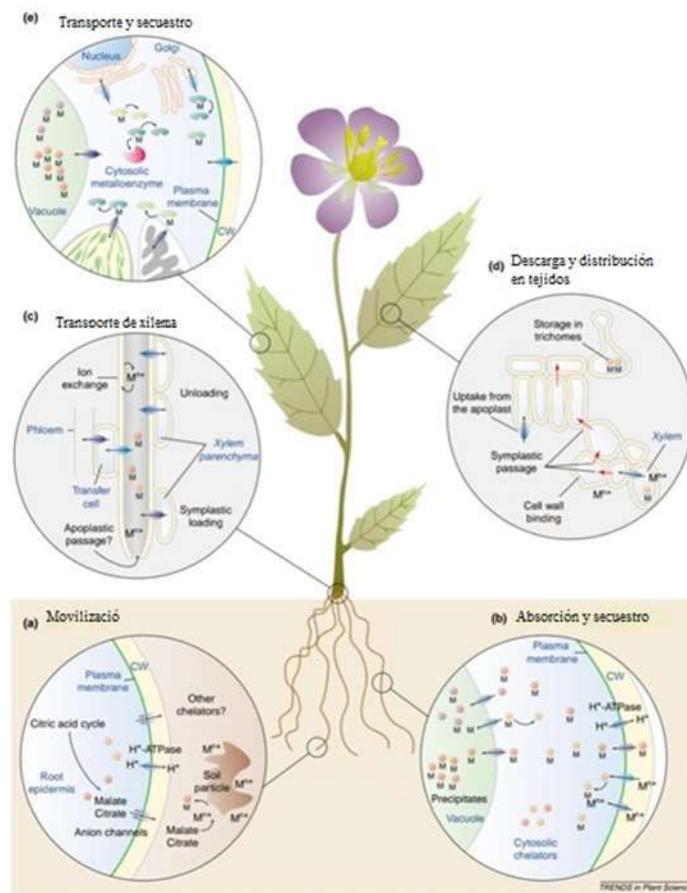


Figura 2. Principales vías de transporte de metales y en células desde la raíz a los brotes (Modificado de Clemens *et al.*, 2002). El transporte de metales desde la raíz a los brotes: La carga eléctrica de las membranas celulares lipofílicas, evita que los iones metálicos se dispersen libremente hacia el citosol, por lo que el transporte de iones metálicos al interior de la célula está mediado por proteínas de membrana, que funcionan como transportadores (Jabeen *et al.*, 2009).

Los metales se mantienen en el citoplasma celular de la raíz por una quelación débil; se unen primero a la pared celular, ya que es poco selectiva con los iones que intercambia, posteriormente, los sitios de unión con mayor afinidad dentro de la célula, impulsan la captación del metal a través de transportadores específicos acoplados (Bhargava *et al.*, 2012; Gavrilesu, 2021); su traslocación a las partes aéreas ocurre por transporte de flujo y difusión. La mayor parte de los metales absorbidos son transportados a través del xilema a los brotes (Clemens *et al.*, 2002; Yadav *et al.*, 2018), y se cree que llegan al xilema a través del simplasto de la raíz como complejos de iones metálicos o iones hidratados. El exceso de metales es secuestrado en las vacuolas (Clemens *et al.*, 2002); puede ser que, quelantes de bajo peso molecular como el citrato y la histidina libre, ayuden en la translocación del metal (Jabeen *et al.*, 2009). Los transportadores de membrana, también juegan un papel importante en el proceso de translocación de MP (Jabeen *et al.*, 2009).

Se han identificado algunas de las familias más importantes de genes transportadores de membrana (Anexo III), entre los que se encuentran los ZIP (Es una proteína similar a IRT); NRAMP (Proteína macrófaga asociada a la resistencia natural, encargada de la homeostasis y la captación de iones); YSL (Transportador de rayas amarillas); NA (Nicotiamina sintasa) involucrado en la homeostasis del Fe, Ni, Zn, Cu y Mn; SAM (S-adenosil-metionina sintetasa), PARA (Unión de ferritina Fe(III)); CDF (Facilitador de la difusión de cationes); HMA (ATPasa de metales pesados); YIREG (Transportador regulado de hierro); así como proteínas involucradas en el transporte de metales como las RAN1 (Figura 3) o proteínas involucradas en el transporte vacuolar como las AtHMA3 (Gohre y Paszkowski, 2006; Bhargava *et al.*, 2012; Ijaz *et al.*, 2021). El transporte del metal, se realiza principalmente a través del xilema. El movimiento de la savia que transporta el metal desde la raíz hasta los brotes, depende de la presión de la raíz y la transpiración de la planta (Bhargava *et al.*, 2012).

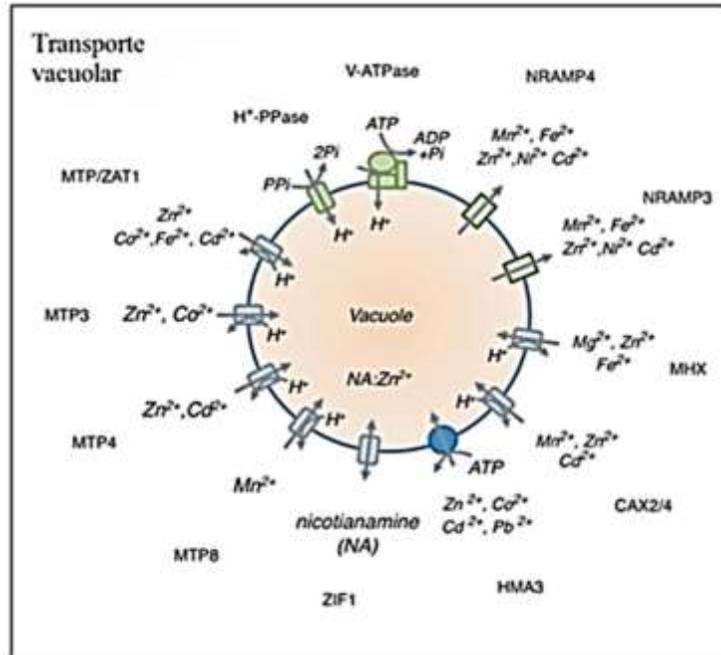


Figura 3. Transportadores de tonoplastos (MTP, CAX, MHX y NRAMP) y la bomba primaria HMA3, que catalizan la captación o liberación de MP divalentes. También se indica ZIF1 que transporta Nicotianamina a las vacuolas y facilita la acumulación de Zn por formación de complejos (tomado de Gavrilescu, 2021).

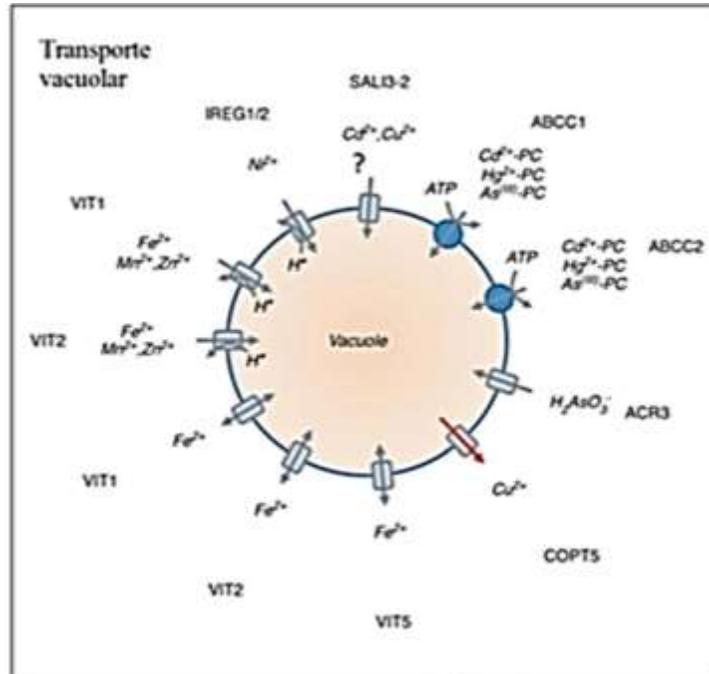


Figura 4. Transportadores de tonoplastos (VIT, VTL, COPT, IREG, SALI Y ACR). Se muestran también las bombas ABC, que trasladan los complejos fitoquelatina + metal al interior de la vacuola (tomado de Gavrilescu, 2021).

- B) Translocación del metal a las hojas: El metal, llega al apoplasto de las hojas donde es capturado por diferentes tipos de células y se mueve de célula en célula por medio de los plasmodesmos, esto gracias a determinados transportadores específicos y son almacenados principalmente en los tricomas, el exceso de metales, es secuestrado en vacuolas (Clemens *et al.*, 2002; Jabeen *et al.*, 2009).
- C) El almacenamiento en las vacuolas: El metal intracelular, se desintoxica uniéndose a compuestos orgánicos de bajo peso molecular y se acumula en las vacuolas y apoplastos de las hojas (Figura 3), formando un complejo ácido-orgánico-metal (Bhargava *et al.*, 2012; Gavrilesu, 2021). Se ha demostrado que, son varios los transportadores que participan en el secuestro de metales en la vacuola, incluidos los tonoplastos (Jabeen *et al.*, 2009).

Algunas proteínas que participan en el secuestro de metales son las antocianinas, así como los ácidos orgánicos. Las fitoquelatinas (PC) y el glutatión (GSH) también tienen un papel importante en el transporte, secuestro y desintoxicación de metales (Jabeen *et al.*, 2009). Aunque se cree que la vacuola es el principal sitio de acumulación de MP, éstos también pueden bioacumularse en paredes y vesículas mucilaginosas en forma de óxidos (Gavrilesu, 2021). Además de que se ha comprobado que el metal se puede desintoxicar en la epidermis, la cutícula y los tricomas de la planta (Gavrilesu, 2021).

2.6.2 Fitoquelatinas y Metalotioneínas

Los dos compuestos involucrados en la acumulación y desintoxicación de los MP acumulados por las plantas, mejor caracterizados hasta la fecha, son las fitoquelatinas (PC) cuyo precursor es el glutatión (GSH) y las metalotioneínas (MT) que son un grupo de proteínas ricas en cisteína que proporcionan tioles, los cuales participan en la quelación de metales (Jabeen *et al.*, 2009; Bhargava *et al.*, 2012; Gavrilesu, 2021). La MT y las PC, son péptidos de bajo peso molecular, ayudan a aumentar la resistencia a la toxicidad de los MP formando complejos con ellos. Las MT participan en la homeostasis de metales esenciales y protegen a la planta del estrés oxidativo (Shah y Nongkynrih, 2007; Gavrilesu, 2021). Las PC se activan con la presencia del metal, formando complejos con iones metálicos estables, que se envían fuera del citoplasma a través del tonoplasto (Figura 4) y quedan inmóviles

dentro de la vacuola, una vez allí, se estabilizan formando complejos con sulfuro o con ácidos orgánicos (Gohre y Paszkowski, 2006; Jabeen *et al.*, 2009). Las PC y MT están distribuidas por toda la planta y muchos estudios indican que son compuestos críticos para la tolerancia y acumulación de metales en las plantas (Bhargava *et al.*, 2012).

Aún con todas estas investigaciones, no se conocen aún todos los mecanismos por los cuales la planta realiza la absorción de metales y logra tener una alta tolerancia a grandes concentraciones de éstos, las funciones exactas que lleva a cabo o los niveles de elementos que ayudan en la supervivencia de las plantas hiperacumuladoras, por lo que todo esto aún es objeto de estudio (Bhargava *et al.*, 2012).

2.6.3 Limitantes en la fitoextracción natural

Las plantas hiperacumuladoras naturales sólo son capaces de crecer en su hábitat natural, suelen tener escasa formación biomasa, crecimiento lento y una fase de madurez larga, no suelen ser selectivas para un solo metal y algunas especies son difíciles de cosechar. Los metales también juegan un papel importante ya que la mayoría se encuentran generalmente inmóviles en el suelo y su acumulación depende de su solubilidad y de su difusión a la raíz (Alkorta *et al.*, 2004; Shah y Nongkynrih, 2007; Wei *et al.*, 2008).

Una solución una de estas limitantes es el uso de plantas no hiperacumuladoras con alta producción de biomasa, sin embargo, éstas presentan poca absorción y poca translocación de MP desde la raíz al tallo y hojas (Alkorta *et al.*, 2004; Bhargava *et al.*, 2012). La necesidad de encontrar alternativas, así como acortar los largos tiempos de remediación, regular variaciones del pH en el suelo, la biodisponibilidad de iones, así como el conocimiento insuficiente de la capacidad de las plantas en materia de fitorremediación, ha llevado a la necesidad de desarrollar técnicas que mejoren el proceso de fitoextracción, como es el uso de agentes químicos, que cambien la disponibilidad del metal. Actualmente, se explora también el uso de microorganismos que promuevan el crecimiento vegetal (Gavrilescu, 2021).

2.7 Fitoextracción inducida

La fitoextracción inducida es una técnica que ayuda a tener mayor absorción de metales que normalmente no pueden acumular las plantas (Wilson-Corral *et al.*, 2011). Consiste en usar agentes químicos, quelantes o lixiviantes, como el EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), NH_4SCN (tiocianato de amonio), o $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_3$ (tiosulfato de amonio), que pueden aumentar la biodisponibilidad de metales como el Cd, Cu, Pb, e incluso metales valiosos como Au y Ag, en plantas que tengan una alta producción de biomasa, un sistema radical extenso, una alta transferencia de raíz a brote y resistencia a plagas y enfermedades, esto con la finalidad de mejorar la capacidad de hiperacumulación (Alkorta *et al.*, 2004; Gohre y Paszkowski, 2006; Wilson-Corral *et al.*, 2011; Bhargava *et al.*, 2012; Gavrilesco, 2021; Ijaz *et al.*, 2021). El metal absorbido es eliminado al momento de ser cosechada la planta y puede ser reutilizado como energía, por combustión o almacenado como material seco (Gohre y Paszkowski, 2006). De forma general, para llevar a cabo una fitoextracción inducida, se debe:

- A) Identificar el agente químico ideal, que permita solubilizar el metal presente en el suelo, ya que la biodisponibilidad de los MP es una de las principales limitantes para su hiperacumulación en las plantas. Diferentes quelatos sintéticos muestran una alta afinidad por ciertos MP; por ejemplo, el EDTA por el Pb, As, o Zn; el tiocianato de amonio (NH_4SCN) y tiosulfato de amonio (NH_4SCN) por el Au y el cianuro de potasio (KCN) por el Pd (Alkorta *et al.*, 2004; Gohre y Paszkowski, 2006; Dinh *et al.*, 2022).

Un quelante, es una molécula grande y compleja que puede formar varios enlaces con un solo ion metálico, formando una estructura de anillo, es decir, un ligando multidentado. Es un agente químico, que encapsula y mantiene la biodisponibilidad del metal para su absorción por la planta (Alkorta *et al.*, 2004; Jabeen *et al.*, 2009). Se han probado diferentes agentes quelantes (Anexo IV) en el estudio de la fitorremediación y ha llevado a la conclusión de que, la eficiencia de la acumulación del metal está relacionada directamente con la afinidad del agente químico sintético por el metal (Alkorta *et al.*, 2004). Es por esto que se recomienda usar agentes químicos que tengan una alta afinidad por el metal que se desea extraer. Sin embargo, muchos agentes químicos realmente no son específicos y pueden tener interferencia con otros metales presentes en el suelo en concentraciones más altas. Esto quiere

decir, que el aumento en la absorción del metal por un quelato, puede ser específico para un metal y al mismo tiempo disminuir la absorción del otro. Además, cada quelato tiene una eficacia diferente para inducir la acumulación de MP en las plantas (Alkorta *et al.*, 2004; Gohre y Paszkowski, 2006).

- B) Preparar y sembrar la planta: Las plantas se siembran o se trasplantan en suelo contaminado con MP, éstas se cultivan como lo indican las prácticas agrícolas (Alkorta *et al.*, 2004; Jabeen *et al.*, 2009).
- C) Una vez que se produce la cantidad óptima de biomasa, se aplica el agente quelante seleccionado: El agente quelante, debe adicionarse por lo general antes de la cosecha, ya que la inducción a absorber esta gran cantidad de metales, lleva a la muerte de la planta. Los agentes quelantes, poseen una toxicidad potencial y pueden ocasionar daños al medio ambiente, por lo que es importante realizar la aplicación de la sustancia, tomando en cuenta la capacidad de absorción de las plantas cultivadas o incluyendo un sistema de contención de agua, esto para evitar la contaminación de las aguas subterráneas debido a los metales movilizados en ellos (Alkorta *et al.*, 2004; Gohre y Paszkowski, 2006; Jabeen *et al.*, 2009).
- D) Permitir la absorción del metal sin que muera la planta: Después se permite la acumulación del metal, esto puede llevar desde varios días hasta semanas, todo esto verificando que la planta no muera en el proceso (Alkorta *et al.*, 2004).
- E) Cosecha: Después de un crecimiento suficiente de la planta y de suficiente acumulación de MP en sus brotes, la planta se cosecha. La tasa de fitoextracción depende del crecimiento de la planta y del total del metal que la planta logra extraer y ésta, se relaciona con la biomasa que produce la planta, la cual, está dada por la cantidad de metal que absorbe. El peso y el volumen de la planta se pueden reducir por incineración y los residuos pueden ser tratados como material peligroso o se puede realizar una recuperación del metal si es económicamente posible, reutilizarse y posteriormente el desecho almacenarse como material seco (Alkorta *et al.*, 2004; Gohre y Paszkowski, 2006; Jabeen *et al.*, 2009; Bhargava *et al.*, 2012).

Actualmente se está trabajando con el uso de bacterias o fitohormonas en la fitoextracción de contaminantes, esto como alternativa al uso o en combinación con los agentes químicos. Estas bacterias habitan los tejidos vegetales sin causar daño a la planta, pueden facilitar el

crecimiento de la planta y su desarrollo, cambiar el estado de oxidación de algunos metales, favoreciendo la acumulación de estos en sus brotes, le ayudan en la fijación de Ni, alivian el estrés de las plantas en ambientes contaminados, aumentan la resistencia a patógenos, a la sequía y a herbívoros (Bhargava *et al.*, 2012; Gavrilesco, 2021). Hasta ahora, su estudio en cuanto a remediación de MP ha sido lento, debido a que no se ha encontrado una cepa con resistencia a los metales y con grandes capacidades de desintoxicación (Bhargava *et al.*, 2012). Mientras que las fitohormonas, se ha demostrado su capacidad de disminuir el estrés ocasionado por MP en las plantas (Núñez *et al.*, 2010).

2.8 Brasinoesteroides

2.8.1 Historia

En 1970 Mitchell y colaboradores reportaron que algunos extractos de la planta *Brassica napus*, producían un efecto de alargamiento en el tallo del frijol. Esta respuesta, era distinta a la producida por otras hormonas vegetales como las giberelinas (Sáenz-Carbonell *et al.*, 2006; Hernández-Silva y García Martínez *et al.*, 2016). Estas sustancias fueron aisladas posteriormente de *Brassica napus* y se les denominó brassinos (Núñez y Mazorra, 2001; Sáenz-Carbonell *et al.*, 2006; Hernández-Silva y García Martínez *et al.*, 2016).

Lamentablemente, se creía que su estructura era parecida a los ácidos grasos y no fue hasta un experimento coordinado por laboratorios de EUA donde se extrajo de una planta piloto de *B. napus*, 227 kg de polen del cual, se logró purificar 4 mg de una sustancia que fue identificada por cristalografía de rayos X, descubriendo que su estructura era como una lactona esteroidal, la cual denominaron brasinólido. En 1988, Mandava acuñó el término de brasinoesteroide (Sáenz-Carbonell *et al.*, 2006). Actualmente, existen diversos compuestos sintéticos de brasinoesteroides, los cuales son estudiados para conocer sus diferentes efectos en las plantas (Núñez y Mazorra, 2001; Sáenz-Carbonell *et al.*, 2006; Hernández-Silva y García Martínez *et al.*, 2016).

2.8.2 Definición

Los brasinoesteroides son considerados fitohormonas naturales, que se distribuyen en pequeñas cantidades en la planta, principalmente en polen, flores y semillas (Hernández-Silva y García-Márquez, 2016); su estructura es esteroidal, e influyen en la división y

expansión celular, estimulando el crecimiento y desarrollo de las plantas (Sáenz-Carbonell *et al.*, 2006; Coll-García *et al.*, 2019). También juegan un papel importante en la germinación, rizogénesis, floración, senescencia, abscisión y en los procesos de maduración, así como en la división y expansión celular (Núñez *et al.*, 2010; Hernández-Silva y García Martínez *et al.*, 2016), y se ha demostrado, que pueden brindar resistencia a las plantas frente a estrés biótico y abiótico (Hernández-Silva y García Martínez *et al.*, 2016).

2.8.3 Estructura

Los brasinoesteroides están conformados por cuatro anillos (A, B, C, D), un grupo cetona en el anillo C6 del anillo B y una cadena lateral en el C17 del anillo D (Figura 5). Cuentan generalmente con 27 a 28 átomos de carbono con diferentes sustituyentes en los anillos A y B y en la cadena lateral (Sáenz-Carbonell *et al.*, 2006; Hernández-Silva y García Martínez *et al.*, 2016). Se ha descubierto 59 brasinoesteroides distintos, los principales brasinoesteroides encontrados en plantas poseen 28 átomos de carbono, con sustituyentes en dos anillos y en la cadena lateral (Hernández-Silva y García Martínez, 2016). El brasinoesteroide con mayor actividad de todos es el brasinólido (Figura 6) (Sáenz- Carbonell *et al.*, 2006).

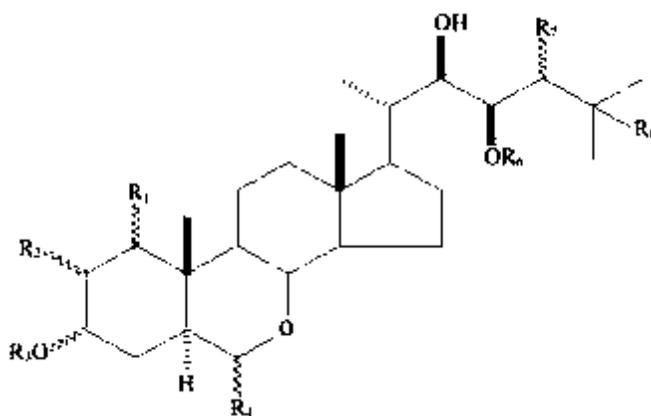


Figura 5. Estructura general de los brasinoesteroides (Modificado de Hernández-Silva y García Martínez, 2016).

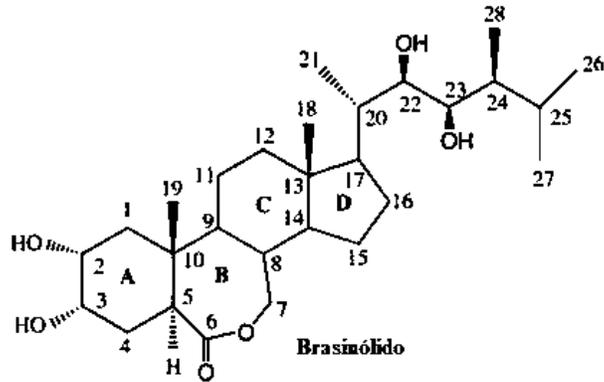


Figura 6. Estructura química del brasinólido (Modificado de Yuzhu *et al.*, 2022).

2.8.4 Receptores celulares y mecanismos moleculares

La proteína BRI1 es el receptor de brasinoesteroides en la célula (Carbonell *et al.*, 2006; Reyes-Guerrero *et al.*, 2021). Esta proteína, para llevar a cabo su funcionamiento, debe interactuar con otros componentes proteicos presentes (Figura 7), como el BIN2 (Carbonell *et al.*, 2006). Este componente, en ausencia de brasinólido, fosforila los compuestos conocidos como BES/BRZ1, que después son degradados por un complejo proteosómico. En presencia del brasinólido, el componente BRI1 no actúa, y de esta forma, los componentes BES 1/BRZ1 pueden llegar al núcleo para inducir respuestas fisiológicas específicas en la planta (Carbonell *et al.*, 2006). Los brasinoesteroides pueden proteger a la planta del estrés ocasionado por MP, ya que inducen a la formación de péptidos (fitoquelatinas) que participan en la desintoxicación de metales en las plantas (Núñez *et al.*, 2010).

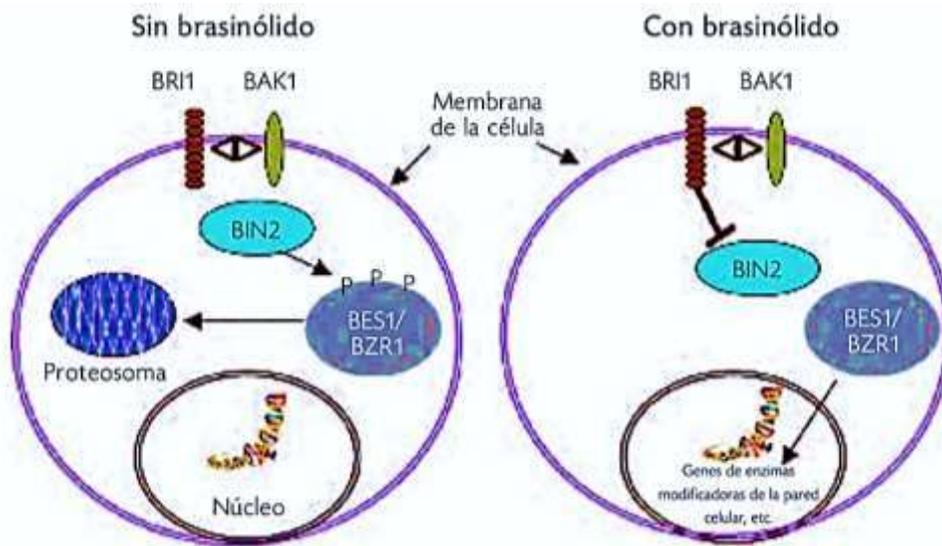


Figura 7. Representa la acción de la proteína BIN2 en presencia y en ausencia de brasinólido (Modificado de Carbonell *et al.*, 2006).

2.9 *Linum usitatissimum* L.

La linaza (lino; familia *Linaceae*) (Figura 8) es una herbácea anual o en ocasiones bianual (Rzedowski y Rzedowski, 1992; Chico-Ulcuango, 2017), originaria de la región oriental del Mediterráneo (Chico-Ulcuango, 2017); puede alcanzar hasta 1 m de altura, su tallo es erecto, estriado, puede ser simple o ramificado cerca de la base y también en la inflorescencia, las ramas basales son erectas o ascendentes (Rzedowzki y Rzedowzki, 1992); sus raíces son cortas y superficiales (Chico-Ulcuango, 2017). Las hojas son lanceoladas o lineales alternas, sésiles, acuminadas en el ápice, 1 o 3 nervadas, de textura membranácea, de 10 a 3.5 mm de largo y de 1 a 3.5 mm de ancho (Rzedowzki y Rzedowzki, 1992; D'Ambrosio *et al.*, 2018).



Figura 8. *Linum usitatissimum* L.

Las flores son de color blanco o azul (Chico-Ulcuango, 2017), presentan forma de panículas laxas, están provistas de numerosas hojas, más o menos reducidas, con pedicelos de hasta 2.5 cm de largo; cáliz con cinco sépalos libres de 7 a 9 mm de largo y de 2.4 a 4 mm de ancho, los exteriores a menudo son más angostos y más cortos que los que se encuentran en el interior (Rzedowzki y Rzedowzki, 1992; D'Ambrosio *et al.*, 2018).

El fruto tiene forma de cápsula globosa, apiculada de 8 a 12 mm de largo. Contiene 10 semillas comprimidas, ovaladas, lanceoladas, de 4 a 6 mm de largo por 2.5 a 3 mm de ancho, color café, negruzcas (Rzedowzki y Rzedowzki, 1992; Chico-Ulcuango, 2017; D'Ambrosio *et al.*, 2018).

La planta de lino es una maleza ruderal que, florece y fructifica casi todo el año (Rzedowzki y Rzedowzki, 1992). Los linos fibrosos prefieren climas húmedos y suaves, por su parte los linos oleaginosos prefieren climas templados y cálidos (Chico-Ulcuango, 2017; D'Ambrosio *et al.*, 2018). La linaza se adapta mejor a terrenos de textura arcillo-arenosa, esto debido a lo

pequeño de sus raíces que no alcanzan grandes profundidades (Chico-Ulcuango, 2017). Es una planta exigente en zinc, requiere de suficiente materia orgánica y requiere un buen drenaje. Sus necesidades de agua pueden elevarse a los 400 a 450 L/m², y es sensible a la sequía (Chico-Ulcuango, 2017; D'Ambrosio *et al.*, 2018).

No es una planta exigente en sus requerimientos nutricionales por lo que se espera pueda ser capaz de crecer en sitios contaminados con MP, esta especie no tiene antecedentes en materia de fitorremediación, pero debido a sus características adaptativas, podría ser una potencial candidata.

III. HIPÓTESIS

3.1 Hipótesis

Las plantas de *Linum usitatissimum* L. inoculadas con *Azospirillum brasilense* y adicionadas con Brasinoesteroides, tiocianato de amonio y/o tiosulfato de amonio, presentarán mayor tolerancia a establecerse en un jal de mina de Tlapujahua de Rayón, Michoacán, México.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar la tolerancia de la especie *Linum usitatissimum* para el establecimiento en un jal de mina de Tlapujahua de Rayón, Michoacán, México, para la potencial fitoextracción de oro (Au) y plata (Ag).

4.2 Objetivos particulares

- Evaluar la tolerancia de *Linum usitatissimum* para la potencial fitoextracción de Au y Ag a partir de sustrato de un jal de mina, en combinación con tiocianato de amonio (NH₄SCN) o tiosulfato de amonio (NH₄)₂S₂O₃, con la inoculación de *Azospirillum brasilense*.
- Evaluar la tolerancia de *Linum usitatissimum* para la potencial fitoextracción de Au y Ag a partir de sustrato de un jal de mina, en combinación con tiocianato de amonio (NH₄SCN) o tiosulfato de amonio (NH₄)₂S₂O₃, con la adición de brasinoesteroides.
- Evaluar el efecto de *Azospirillum brasilense* y brasinoesteroides en la supervivencia y crecimiento de *L. usitatissimum* para la posible extracción de Au y Ag a partir de sustrato de un jal de mina.
- Identificar el tratamiento con mayor potencial para la fitoextracción de oro y plata a partir de un jal de mina utilizando la especie *L. usitatissimum*.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Descripción del sitio de estudio

Tlalpujahua es un pueblo de origen prehispánico mazahua. Su nombre proviene de los vocablos en náhuatl “tlali” y “poxohuac”, que significan “tierra” y “cosa fofa”, su traducción sería “Tierra fofa o esponjosa”, esto por su tipo de suelo. Está ubicado en el estado Michoacán y colinda con los municipios de Maravatío al noreste, con Contepec al norte, con Senguio al oeste (Figura 9); al sur con San José del Rincón y al oeste con El Oro. Su población es de aproximadamente 26000 habitantes, en una superficie de 191088 km². La cabecera municipal, denominada Tlalpujahua de Rayón, concentra el 12.8% de la población municipal que es cerca de 3530 habitantes. En el municipio hay otras 64 localidades rurales con menos de 500 habitantes según el INEGI en 2010 (Aparicio y Poncela, 2019).

5.2 Recolección del residuo de mina y análisis

Para la recolección del residuo de mina, se tomó una muestra compuesta del residuo de mina de Tlalpujahua (30 kg muestra), conformada por cinco muestras simples. La profundidad de muestreo 0-30 cm de acuerdo con las recomendaciones de la NMX 2006. Posteriormente, en el residuo se analizaron parámetros físicos y químicos como pH (1:2 p/v suelo: agua), contenido de materia orgánica, (1:2 p/v suelo: agua), por el laboratorio de suelos. Instituto Tecnológico del Valle de Morelia basado en la NOM-RECNAT 021-2000. Se analizó en suelo el contenido de Ag y Au, mediante Fluorescencia de Rayos X, así como en los órganos vegetales de *L. usitatissimum*

5.3 Colecta de la semilla de Linaza

La semilla de linaza comercial se obtuvo de una distribuidora local (Mercado de abastos en Guadalajara, Jal).

5.4 Fase experimental en invernadero

El experimento, se llevó a cabo en condiciones de vivero con 35% de cobertura, con riego cada 3er día, durante un periodo de diecinueve semanas. Se homogenizó el sustrato de jal de mina obtenido de la Localidad de Tlalpujahua de Rayón, Michoacán, México. Se llenaron contenedores de aproximadamente 350 cm³ con el jal de mina.

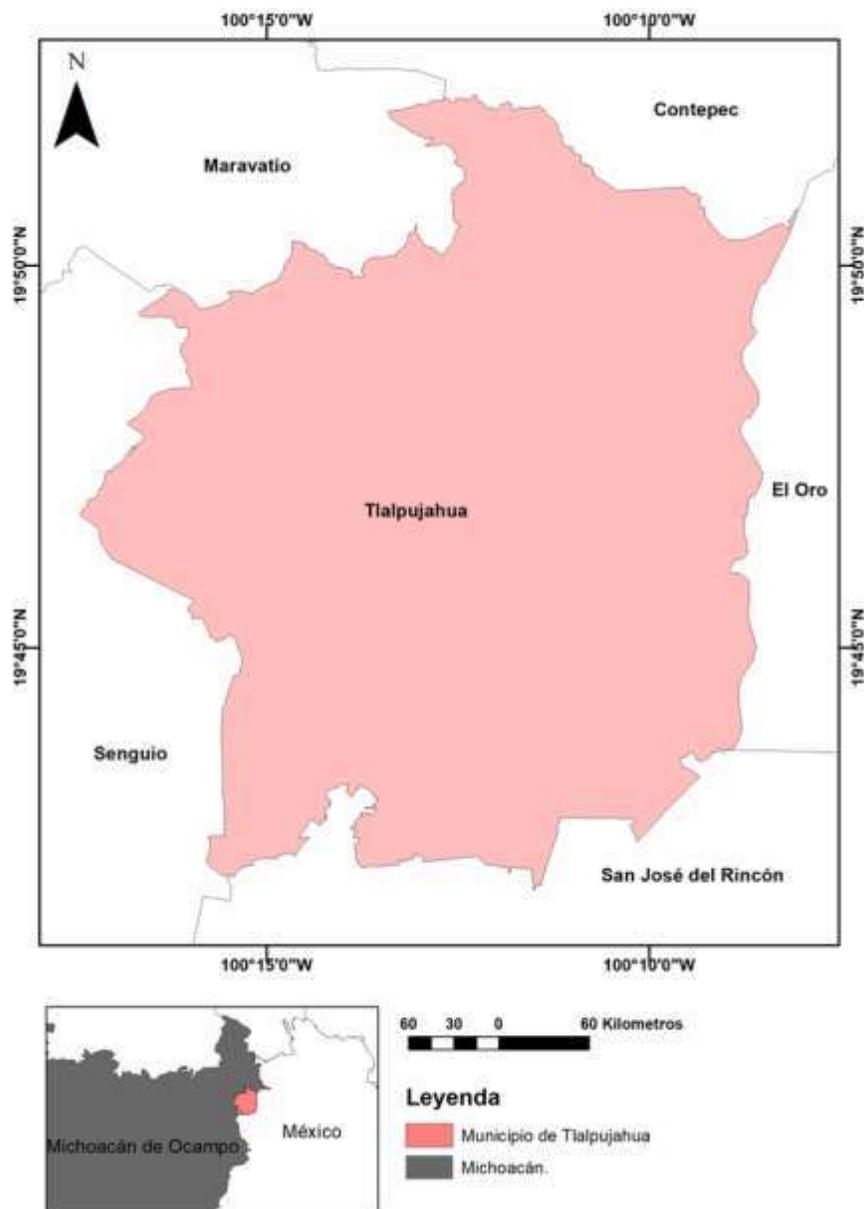


Figura 9. Municipio de Tlalpujahuá de Rayón, Michoacán, México. Mapa elaborado por Alejandro López, 2023.

Se sembraron inicialmente 30 semillas por contenedor (al obtener una germinación del 90%, se redujeron a 10 plántulas por réplica) (Figura 10). Las plántulas de *L. usitatissimum* fueron adicionadas con dos dosis de Brasinoesteroides a una concentración 0.007 mg L^{-1} por plántula y con *A. brasilense* a una concentración de 1.75×10^8 UFC por unidad experimental, separadas por un mes entre cada adición. Las fitohormonas y la bacteria *A. brasilense* se obtuvieron de la distribuidora Biosustenta-Corporativo de Desarrollo Sustentable, S.A. de C.V.

Se evaluó el crecimiento en altura de las plantas durante dieciséis semanas, después de la adición de los microorganismos y las fitohormonas

El tiocianato de amonio $[(\text{NH}_4\text{SCN})]$ y tiosulfato de amonio $[(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_3]$ (1 y 2 g kg^{-1} , respectivamente), se aplicó en un volumen de 100 mL de solución, a una concentración de 1g L^{-1} y 2g L^{-1} , respectivamente, (basándonos en las concentraciones utilizadas por González-Valdez *et al.*, 2018), al jal de mina después de 14 semanas de crecimiento de *L. usitatissimum* (con o sin *Azospirillum brasilense*) en presencia/ausencia de brasinoesteroides (Tabla 1). El tiocianato de amonio, fue obtenido de Reactivos Meyer y el tiosulfato de amonio se obtuvo de Sigma-Aldrich Products.

Una semana después de la aplicación de las sustancias químicas al jal de mina, las plantas fueron cosechadas (Alkorta *et al.*, 2004). Se separó la parte aérea y la raíz de la planta. La raíz fue lavada con agua destilada. Se pesaron por separado parte aérea y raíz, para obtener la biomasa peso fresco, en una balanza semianalítica. Posteriormente, se secaron a 65 °C por dos días y se determinó el peso seco de la raíz y de la parte aérea de la planta, con la finalidad de conocer la biomasa producida por la planta.

Finalmente se determinó la concentración de Au y Ag en los órganos vegetales por Fluorescencia de Rayos X.

5.5 Diseño experimental

El experimento se estableció en un diseño completamente al azar durante las diecinueve semanas. Para su evaluación se consideraron cuatro factores de forma individual y combinada más un control. (brasinoesteroides, *Azospirillum brasilense* tiosulfato, tiocianato y un control), contando con doce tratamientos y siete réplicas (n=7) de cada uno. Se consideró como unidad experimental diez plantas por maceta (Figura 10, Tabla 1).



Figura 10. Unidad experimental, cada maceta contará con siete plantas de *L. usitatissimum*.

5.6 Aplicación del microorganismo y los agentes químicos

Tabla 1. Aplicación de los agentes químicos con y sin *Azospirillum brasilense* y brasinoesteroides

Tratamientos	Dosis
1. Control	-----
2. Brasinoesteroides	5.0 mL
3. <i>Azospirillum brasilense</i>	1.0 mL
4. Brasinoesteroides + <i>Azospirillum brasilense</i>	5.0 mL + 1.0 mL
5. Tiocianato [(NH ₄ SCN)]	1.0 mL
6. Tiocianato [(NH ₄ SCN)] + Brasinoesteroides	1.0 mL + 5.0 mL
7. Tiocianato [(NH ₄ SCN)] + <i>Azospirillum brasilense</i>	1.0 mL + 1.0 mL
8. Tiocianato [(NH ₄ SCN)] + Brasinoesteroides + <i>Azospirillum brasilense</i>	1.0 mL + 5.0 mL + 1.0 mL
9. Tiosulfato [(NH ₄) ₂ S ₂ O ₃]	2.0 mL
10. Tiosulfato [(NH ₄) ₂ S ₂ O ₃] + Brasinoesteroides	2.0 mL + 5.0 mL
11. Tiosulfato [(NH ₄) ₂ S ₂ O ₃] + <i>Azospirillum brasilense</i>	2.0 mL + 1.0 mL
12. Tiosulfato [(NH ₄) ₂ S ₂ O ₃] + Brasinoesteroides + <i>Azospirillum brasilense</i>	2.0 mL + 5.0 mL + 1.0 mL

5.7 Análisis de datos

Los resultados fueron sometidos a un análisis factorial, a un análisis de varianza (ANOVA), respetando los criterios de normalidad., Para las variables longitud de raíz y biomasa radical en peso seco fueron transformadas mediante raíz cuadrada y logaritmo, respectivamente. Se utilizó una prueba de comparaciones múltiples por medio de Tukey. Para los factores que mostraron diferencias estadísticamente significativas, se realizó un análisis mediante una prueba T Student. Se utilizaron los programas estadísticos JMP, S+ y Past.

VI Resultados

Los resultados del Análisis factorial y ANOVA, aplicado a la altura (cm) de las plantas de *Linum usitatissimum* (linaza), muestra que no hay diferencias significativas entre los tratamientos (Tabla 2, Figura 11).

Tabla 2. Análisis factorial, aplicado a la altura (cm) en plantas de *Linum usitatissimum* (linaza).

Factor	G.L.	S.C.	Factor	C.M.	Valor F	P
Brasinoesteroides	1	4.389	B	4.388	0.298	0.586
<i>Azospirillum brasilense</i>	1	33.189	Ab	33.188	2.261	0.136
Tiocianato	1	39.586	Tio	39.585	2.696	0.104
Tiosulfato	1	14.658	Tios	14.657	0.998	0.32

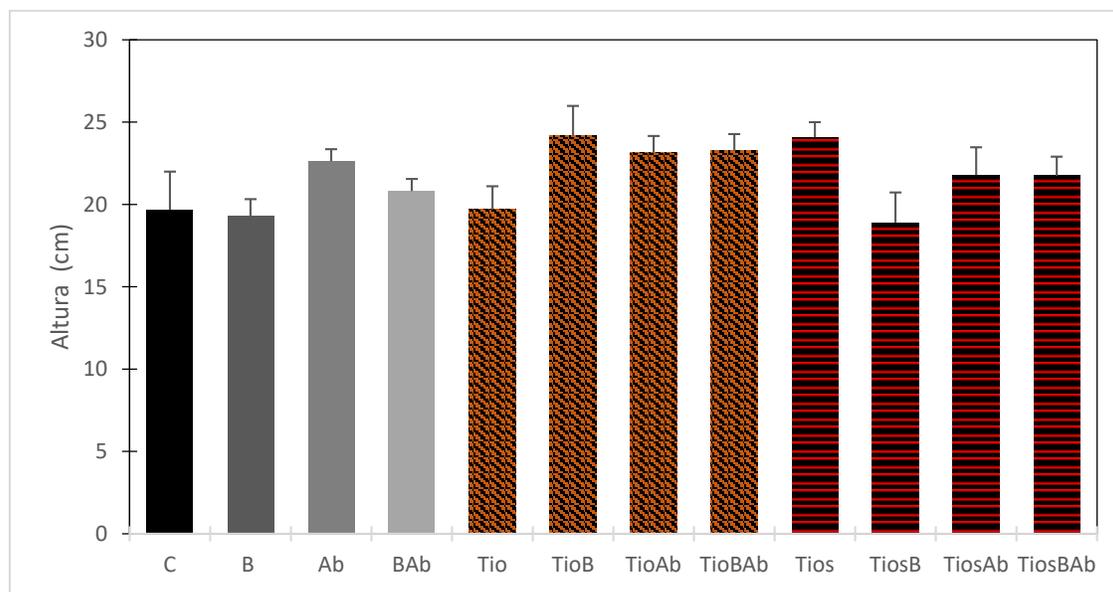


Figura 11. Altura (cm) de *Linum usitatissimum* (linaza) con los tratamientos de Brasinoesteroides, *Azospirillum brasilense*, Tiocianato y Tiosulfato, individual y combinados. Las barras indican el error estándar. Control (C), Brasinoesteroides (B), *Azospirillum brasilense* (Ab), Brasinoesteroides + *A. brasilense* (BAb), Tiocianato (Tio), Tiocianato + Brasinoesteroides (TioB), Tiocianato + *A. brasilense* (TioAb), Tiocianato + Brasinoesteroides + *A. brasilense* (TioBAb), Tiosulfato (Tios), Tiosulfato + Brasinoesteroides (TiosB), Tiosulfato + *A. brasilense* (TiosAb), Tiosulfato + Brasinoesteroides + *A. brasilense* (TiosBAb).

El análisis factorial muestra efectos en la longitud de raíz por los tratamientos, excepto por *A. brasilense* (Tabla 3). En el ANOVA se observan diferencias estadísticamente significativas ($F= 3.39$, $G.L.=11$, $P<0.0001$). En la prueba de Tukey, se muestran valores mayores en los tratamientos de brasinoesteroides de forma individual y en combinación con

A. brasilense. Se observa un efecto negativo del Tiocianato en combinación con brasinoesteroides (Figura 12). En cuanto al factor brasinoesteroides, se muestra una diferencia estadísticamente significativa con un valor de $P= 0.03$ con un efecto positivo en el crecimiento de las plantas de *L. usitatissimum* (Fig13), por otro lado, el Tiocianato (Figura 14) y el Tiosulfato (Figura 15) mostraron un efecto negativo en el crecimiento de las plantas, con una diferencia estadísticamente significativa ($P= <0.0001$ y $P= 0.18$).

Tabla 3. Análisis factorial, aplicado a Longitud de raíz (cm), en plantas de *Linum usitatissimum* (linaza).

Factor	G.L.	S.C.	C.M.	Valor F	P
Brasinoesteroides	1	50.36	50.36	4.37	0.03
<i>Azospirillum brasilense</i>	1	0.9474	0.9474	0.082	0.775
Tiocianato	1	132.266	132.266	11.481	0.001
Tiosulfato	1	98.603	98.603	8.559	0.004

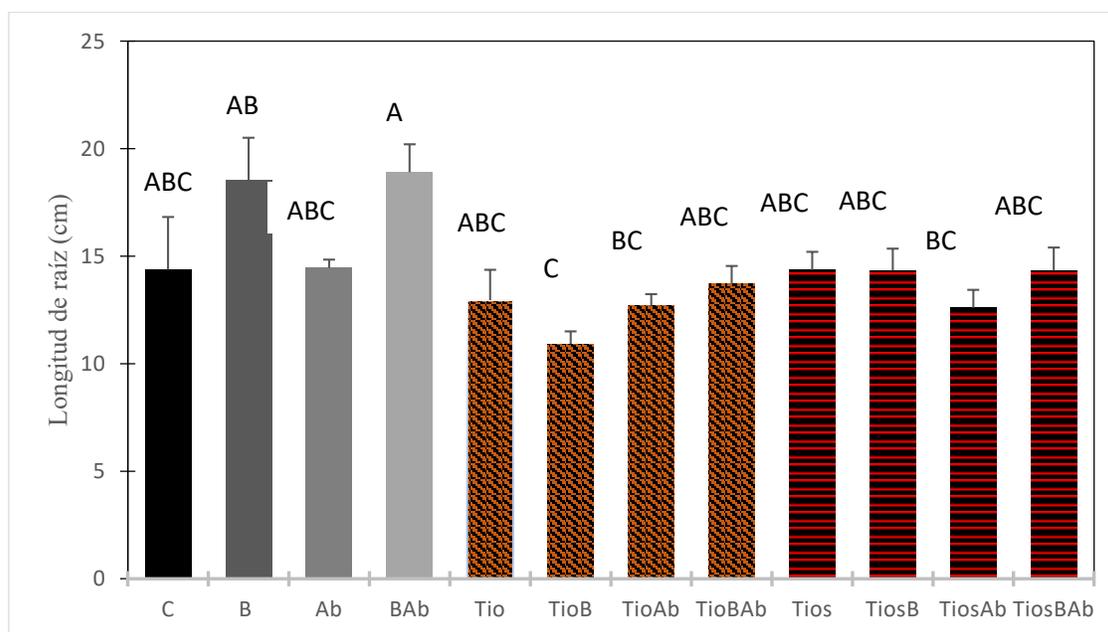


Figura 12. Longitud de raíz (cm) de *Linum usitatissimum*, en base a los tratamientos de Brasinoesteroides, *Azospirillum brasilense*, Tiocianato y Tiosulfato, individual y combinados. Las barras indican el error estándar y las letras, grupos de acuerdo a la prueba de comparaciones múltiples por medio de Tukey. Control (C), Brasinoesteroides (B), *Azospirillum brasilense* (Ab), Brasinoesteroides + *A. brasilense* (BAb), Tiocianato (Tio), Tiocianato + Brasinoesteroides (TioB), Tiocianato + *A. brasilense* (TioAb), Tiocianato + Brasinoesteroides + *A. brasilense* (TioBAb), Tiosulfato (Tios), Tiosulfato + Brasinoesteroides (TiosB), Tiosulfato + *A. brasilense* (TiosAb), Tiosulfato + Brasinoesteroides + *A. brasilense* (TiosBAb).

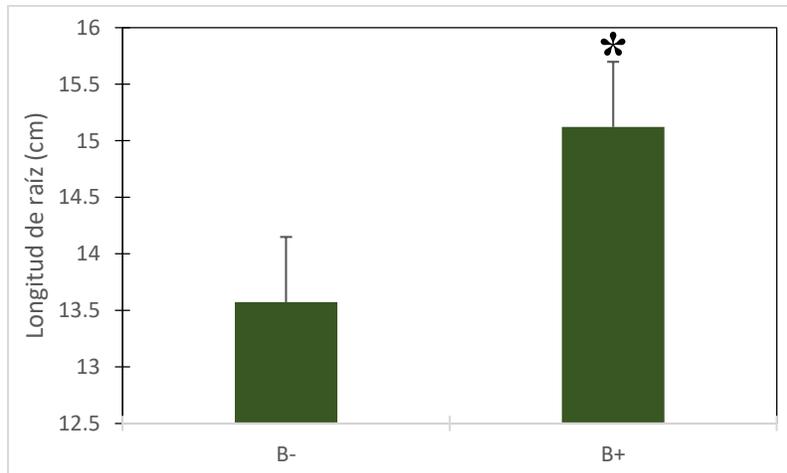


Figura 13. Longitud de raíz (cm), en presencia (B+) o ausencia (B-) de Brasinoesteroides en plantas de *Linum usitatissimum* (linaza). Las barras indican el error estándar.

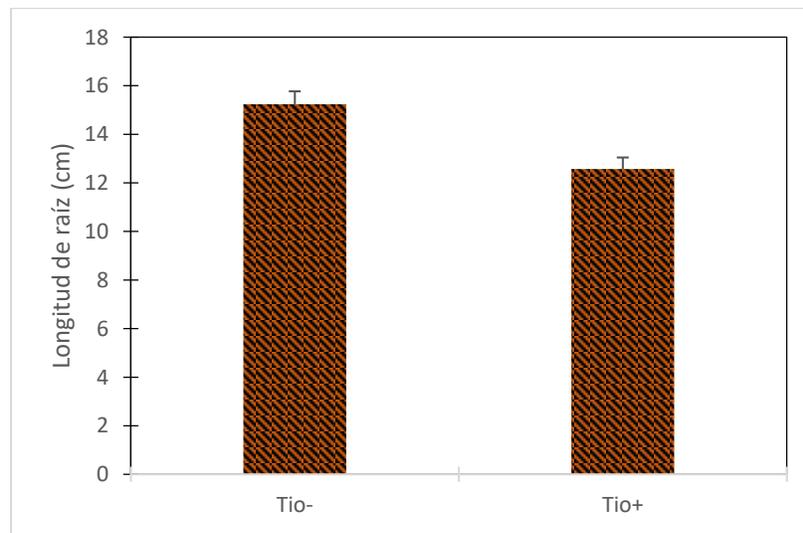


Figura 14. Longitud de raíz (cm), en presencia (Tio+) o ausencia (Tio-) de Tiocianato en plantas de *Linum usitatissimum* (linaza). Las barras indican el error estándar.

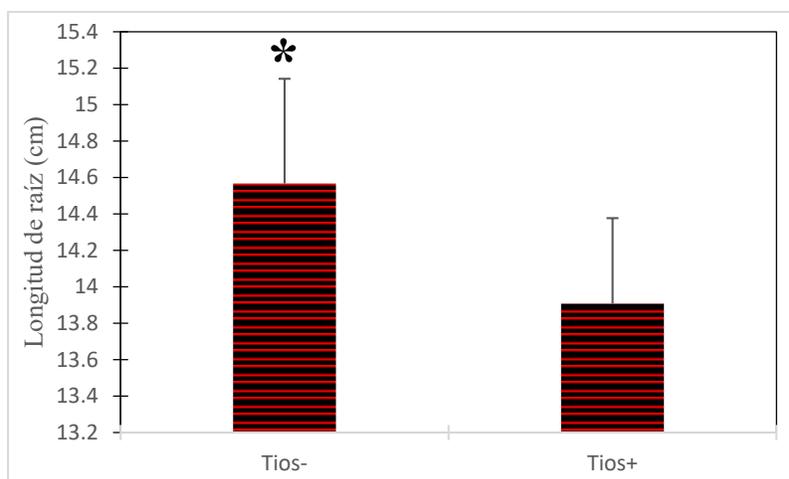


Figura 15. Longitud de raíz (cm), en presencia (Tios+) o ausencia (Tios-) de Tiosulfato en plantas de *Linum usitatissimum* (linaza). Las barras indican el error estándar.

En cuanto a la variable área de raíz en las plantas de *L. usitatissimum*, el análisis factorial (Tabla 4), muestra efectos por los tratamientos de Brasinoesteroides y Tiosulfato. En el ANOVA existen diferencias estadísticamente significativas ($F= 2.93$, G. L. = 11, $P.0.003$). Muestra un mayor efecto los tratamientos *A. brasilense* (Ab) y Brasinoesteroides (B) (Figura 16). Teniendo un menor efecto el tratamiento Tiosulfato en combinación con Brasinoesteroides (TiosB) y Tiosulfato en combinación con Brasinoesteroides y *A. brasilense* (TiosBAb). En cuanto al factor Brasinoesteroides, muestra una diferencia estadísticamente significativa con un valor de $P= 0.01$ con un efecto positivo en el área de la raíz de las plantas de linaza (Figura 17). Por otro lado, el factor Tiosulfato mostró una diferencia estadísticamente significativa con un valor de $P= 0.01$, mostrando efectos negativos en el área de raíz de las plantas de lino (Figura 18).

Tabla 4. Análisis factorial, aplicado al área de raíz (cm^2), en plantas de *Linum usitatissimum* (linaza).

Factor	G.L.	S.C.	C.M.	Valor F	P
Brasinoesteroides	1	328.652	328.651	4.335	0.04
<i>Azospirillum brasilense</i>	1	9.489	9.489	0.125	0.724
Tiocianato	1	64.938	64.938	0.856	0.357
Tiosulfato	1	729.067	729.066	9.617	0.002

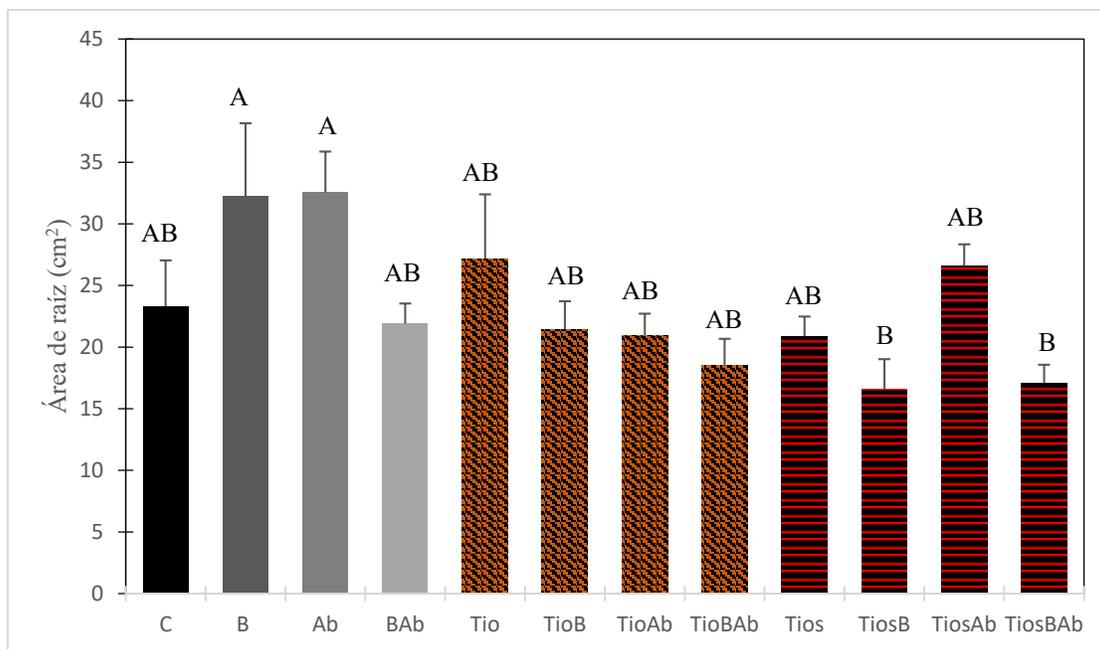


Figura 16. Área de raíz (cm²) de *Linum usitatissimum* (linaza) con los tratamientos de Brasinoesteroides, *Azospirillum brasilense*, Tiocianato y Tiosulfato, individual y combinados. Las barras indican el error estándar y las letras, grupos de acuerdo a la prueba de comparaciones múltiples por medio de Tukey. Control (C), Brasinoesteroides (B), *Azospirillum brasilense* (Ab), Brasinoesteroides + *A. brasilense* (BAb), Tiocianato (Tio), Tiocianato + Brasinoesteroides (TioB), Tiocianato + *A. brasilense* (TioAb), Tiocianato + Brasinoesteroides + *A. brasilense* (TioBAb), Tiosulfato (Tios), Tiosulfato + Brasinoesteroides (TiosB), Tiosulfato + *A. brasilense* (TiosAb), Tiosulfato + Brasinoesteroides + *A. brasilense* (TiosBAb).

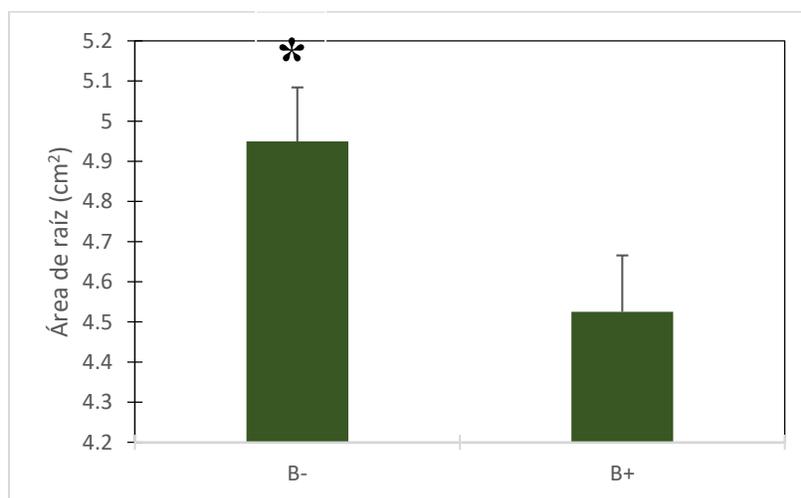


Figura 17. Área de raíz (cm²), en presencia (B+) o ausencia (B-) de Brasinoesteroides en plantas de *Linum usitatissimum* (linaza). Las barras indican el error estándar.

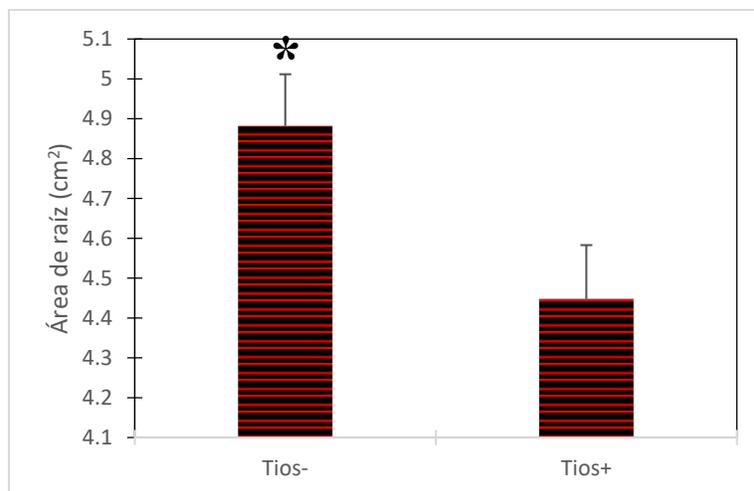


Figura 18. Área de raíz (cm²), en presencia (Tios+) o ausencia (Tios-) de Tiosulfato en plantas de *Linum usitatissimum* (linaza). Las barras indican el error estándar.

Los resultados de la variable biomasa en peso fresco aéreo de las plantas de *L. usitatissimum*, muestran en el análisis factorial (Tabla 5), efecto por los tratamientos con *A. brasilense* y Tiosulfato. En el ANOVA se muestran diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($F = 3.86$, G.L. = 11, $P = 0.0002$). La prueba de Tukey muestra un mayor efecto en los tratamientos con TioB (Tiocianato + Brasinoesteroides) y Tios (Tiosulfato) (Figura 19, barras negras). El menor efecto lo presenta el tratamiento de Brasinoesteroides (B) y Brasinoesteroides en combinación con Tiocianato (TioB). La variable biomasa peso fresco de raíz en las plantas de *L. usitatissimum*, no muestran efectos significativos en los tratamientos aplicados en el análisis factorial (Tabla 6). En cuanto al ANOVA, se observan diferencias estadísticamente significativas ($F = 2.5$, G.L. = 11, $P = 0.009$). De acuerdo con la prueba de comparaciones múltiples por Tukey, observa mayor efecto de los tratamientos de *A. brasilense* (Ab), Brasinoesteroides (B), Tiosulfato (Tios) y la combinación de *A. brasilense* y Brasinoesteroides con Tiocianato y Tiosulfato (TioBAb y TiosBAb) (Figura 19, barras grises). Mientras que los tratamientos con menos efecto, fueron los Brasinoesteroides en combinación con *A. brasilense* (BAb) y *A. brasilense* en combinación con Tiocianato (TioAb) (Figura 20, barras en gris).

Tabla 5. Análisis factorial, aplicado a la biomasa fresca aérea en plantas de *Linum usitatissimum* (linaza).

Factor	G.L.	S.C.	C.M.	Valor F	P
Brasinoesteroides	1	0.114	0.114	0.664	0.417
<i>Azospirillum brasilense</i>	1	0.658	0.658	3.825	0.054
Tiocianato	1	0.172	0.172	1.003	0.319
Tiosulfato	1	1.561	1.561	9.062	0.003

Tabla 6. Análisis factorial, aplicado a la biomasa fresca de raíz (g), en plantas de *Linum usitatissimum* (linaza).

Factor	G.L.	S.C.	C.M.	Valor F	P
Brasinoesteroides	1	0.291	0.291	0.43	0.53
<i>Azospirillum brasilense</i>	1	0.581	0.581	0.856	0.357
Tiocianato	1	0.789	0.789	1.164	0.283
Tiosulfato	1	0.449	0.449	0.662	0.418

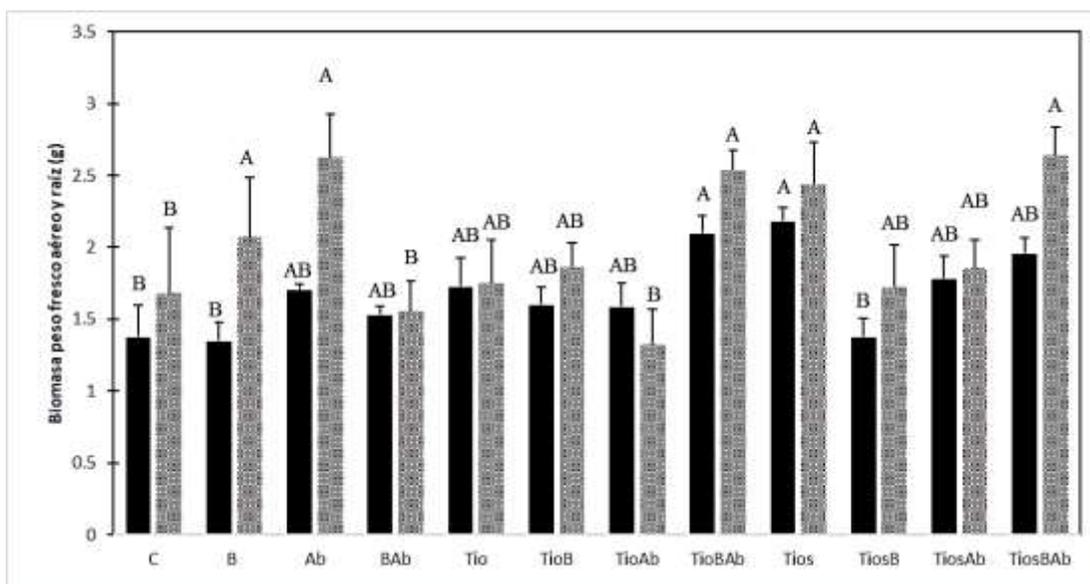


Figura 19. Las barras negras, representan la biomasa fresca aérea (g) de *Linum usitatissimum* (linaza) con los tratamientos de Brasinoesteroides, *Azospirillum brasilense*, Tiocianato y Tiosulfato, individual y combinados. Las barras indican el error estándar y las letras, grupos de acuerdo a la prueba de comparaciones múltiples por medio de Tukey. Las barras grises, representan la biomasa fresca raíz (g) de *Linum usitatissimum* (linaza) con los tratamientos de Brasinoesteroides, *Azospirillum brasilense*, Tiocianato y Tiosulfato, individual y combinados. Las barras indican el error estándar y las letras, grupos de acuerdo a la prueba de comparaciones múltiples por medio de Tukey. Control (C), Brasinoesteroides (B), *Azospirillum brasilense* (Ab), Brasinoesteroides + *A. brasilense* (BAb), Tiocianato (Tio), Tiocianato + Brasinoesteroides (TioB), Tiocianato + *A. brasilense* (TioAb), Tiocianato + Brasinoesteroides + *A. brasilense* (TioBAb), Tiosulfato (Tios), Tiosulfato + Brasinoesteroides (TiosB), Tiosulfato + *A. brasilense* (TiosAb), Tiosulfato + Brasinoesteroides + *A. brasilense* (TiosBAb).

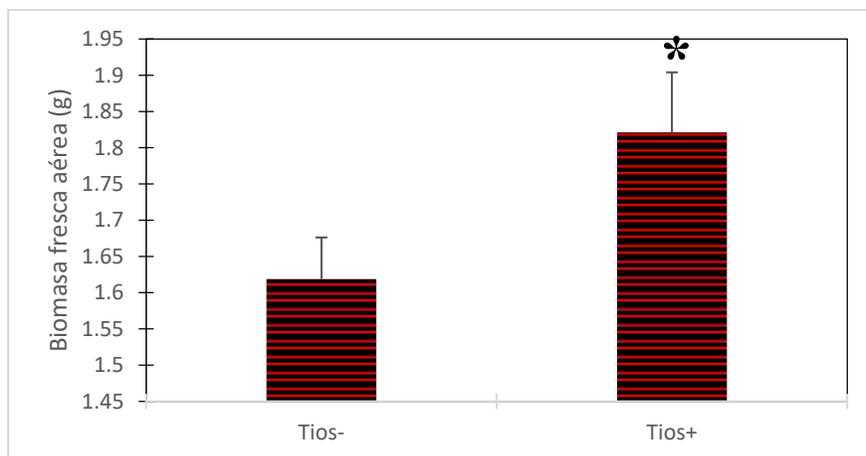


Figura 20. Biomasa fresca aérea (g), en presencia (Tios+) o ausencia (Tios-) de Tiosulfato en plantas de *Linum usitatissimum* (linaza). Las barras indican el error estándar.

Los resultados del Análisis factorial y ANOVA aplicado a la biomasa en peso seco aéreo de las plantas de *Linum usitatissimum* (linaza), muestra que no hay diferencias significativas entre los tratamientos (Tabla 7, Figura 21). Los resultados del análisis factorial de la variable biomasa en peso seco de raíz de las plantas de *L. usitatissimum*, muestran que hay diferencias significativas en el tratamiento Tiosulfato (Tabla 8). El ANOVA muestra diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tratamientos ($F= 7.04$, G.L.=11, $P<0.0001$). De acuerdo con la prueba de comparaciones múltiples por medio de Tukey, se observa mayor efecto en el tratamiento con Brasinoesteroides (B) (Figura 21). Se muestra un menor efecto en los tratamientos de Tiosulfato combinado con Brasinoesteroides (TiosB) y Tiosulfato con *A. brasilense* (TiosAb). En cuanto al factor Tiosulfato, muestra una diferencia estadísticamente significativa con un valor de $P= 0.0001$, observándose un efecto negativo en las plantas de linaza (Figura 22).

Tabla 7. Análisis factorial, aplicado a la biomasa seca aérea (g), en plantas de *Linum usitatissimum* (linaza).

Factor	G.L.	S.C.	C.M.	Valor F	P
Brasinoesteroides	1	0.017	0.017	1.788	0.184
<i>Azospirillum brasilense</i>	1	0.005	0.005	0.54	0.464
Tiocianato	1	0.002	0.002	0.305	0.582
Tiosulfato	1	0.006	0.006	0.626	0.43

Tabla 8. Análisis factorial, aplicado a la biomasa seca de raíz, en plantas de *Linum usitatissimum* (linaza).

Factor	G.L.	S.C.	C.M.	Valor F	P
Brasinoesteroides	1	0.132	0.132	1.137	0.289
<i>Azospirillum brasilense</i>	1	0.038	0.038	0.328	0.528
Tiocianato	1	0.129	0.129	1.118	0.293
Tiosulfato	1	2.423	2.423	20.89	0.00001

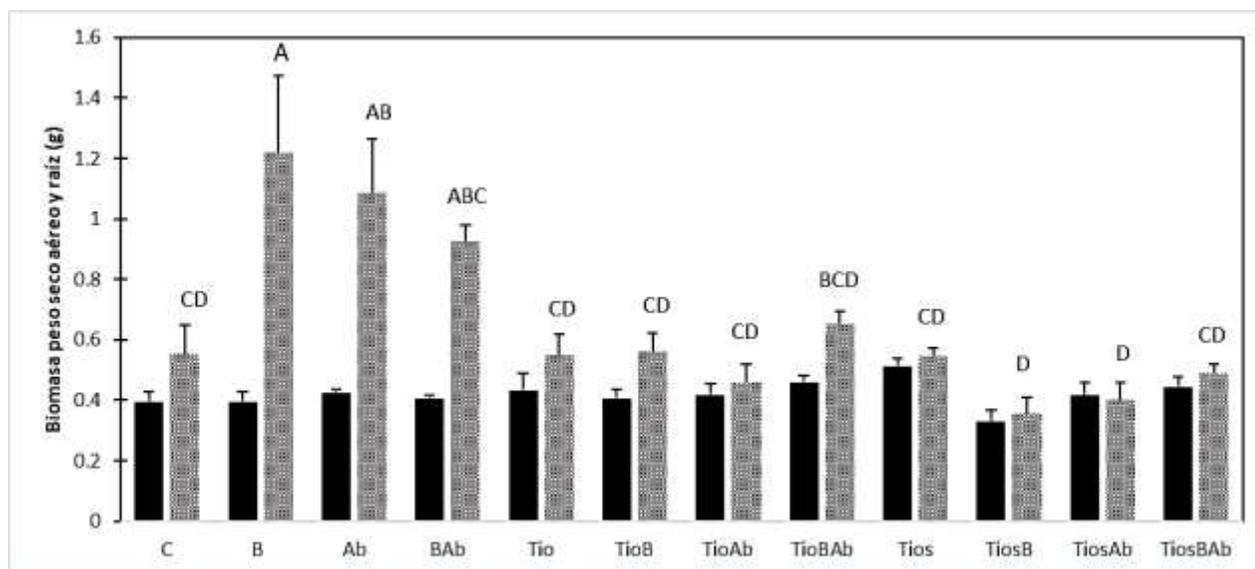


Figura 21. Las barras negras, representan la Biomasa seca aérea (g) de *Linum usitatissimum* (linaza) con los tratamientos de Brasinoesteroides, *Azospirillum brasilense*, Tiocianato y Tiosulfato, individual y combinados. Las barras indican el error estándar. Las barras grises, representan la biomasa seca raíz (g) de *Linum usitatissimum* (linaza) con los tratamientos de Brasinoesteroides, *Azospirillum brasilense*, Tiocianato y Tiosulfato, individual y combinados. Las barras indican el error estándar y las letras, grupos de acuerdo a la prueba de comparaciones múltiples por medio de Tukey. Control (C), Brasinoesteroides (B), *Azospirillum brasilense* (Ab), Brasinoesteroides + *A. brasilense* (BAb), Tiocianato (Tio), Tiocianato + Brasinoesteroides (TioB), Tiocianato + *A. brasilense* (TioAb), Tiocianato + Brasinoesteroides + *A. brasilense* (TioBAb), Tiosulfato (Tios), Tiosulfato + Brasinoesteroides (TiosB), Tiosulfato + *A. brasilense* (TiosAb), Tiosulfato + Brasinoesteroides + *A. brasilense* (TiosBAb).

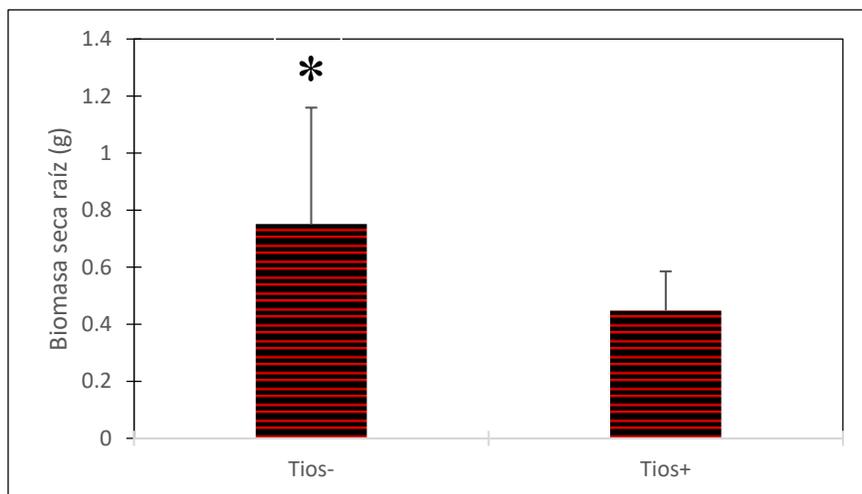


Figura 22. Biomasa seca de raíz (g), en presencia (Tios+) o ausencia (Tios-) de Tiosulfato en plantas de *Linum usitatissimum* (linaza). Las barras indican el error estándar.

6.1. Análisis de suelo y tejido vegetal

Se realizaron los análisis fisicoquímicos correspondientes al jal de mina de Tlalpujahua de Rayón, México, Michoacán (Tabla 9), con la finalidad de conocer su composición y tener un punto de partida en comparación con lo extraído por el tejido vegetal de la especie *L. usitatissimum*. En los análisis, el residuo de mina, muestra un pH neutro, escasa materia orgánica, baja concentración de Nitrógeno y macroelementos insuficientes. Los análisis fueron realizados por el Laboratorio de suelos del Instituto Tecnológico del Valle de Morelia, basado en la NOM-RECNAT 021-2000.

Se realizó el análisis del tejido vegetal de la raíz de la especie *L. usitatissimum* por Fluorescencia de rayos X, con la finalidad, de determinar los minerales que logró extraer (Tabla 10). Mostrando niveles bajos en cuanto a extracción de Au y Ag, sin embargo, se muestran niveles altos en extracción de Sr, Fe, Ti, Ca, K, Al, Si, Cl, Mg y P. También se realizó el análisis del jal de mina antes de la siembra de las plantas de linaza y después de la cosecha, con la finalidad de conocer la composición del suelo y determinar el establecimiento de la especie *L. usitatissimum*, así como, comparar los residuos de mineral con la absorción que logró la planta. Se puede observar que se detectaron bajas concentraciones de Au y Ag en el jal de mina (T0), pero concentraciones altas de Sr, Fe, Ca, Al, Si, Cl, Mg y P.

Tabla 9. Análisis fisicoquímicos del jal de mina de Tlalpujahua de Rayón, Michoacán, México.

Análisis de suelo					
Análisis físicos	Granulometría (%)				
	Arcilla	17			
	Limo	21			
	Arena	61			
	Clase textural	Franco Arenoso			
	Interpretación	Mediano			
	Constantes de humedad (%)				
	Humedad a saturación	25			
	Capacidad de campo	14			
	Punto de marchitez permanente	8			
	Humedad aprovechable	6			
	Lámina de riego (Profundidad. 20 cm)	3.8			
	Color				
	En seco	Gris claro			
	En húmedo	Café grisáceo oscuro			
	Densidad (g cm ⁻³)				
	D. aparente	1.36			
D. real	2.5				
Porosidad (%)	45.5				
Análisis Químicos	Elementos menores		ppm	Interpretación	
	Aluminio	0.0			
	Hierro	0.0			
	Magnesio	0.0			
	Cobre	0.0			
	Boro	0.0			
	pH en agua	7.0		Neutro	
	pH en solución CaCl ₂	6.5		Ligeramente Ácido	
	C. E. (dS/m)	1.0		No salino	
	Materia orgánica (%)	0.7		Muy bajo	
	Nitrógeno. Orgán. (Kg/ha)	17.0		Muy bajo	
	Nitrógeno. Amoniaco. (ppm)	1.3		Muy bajo	
	Elementos		ppm	kg/ha	Interpretación
	Fósforo	21			
	Potasio	154			
	Calcio	2,250			
	Magnesio	900			
	Carbonatos	620			
	Nitrógeno. Mineral	25			
	Intercambio catiónico.	(meq/100g)	%	Interpretación	

Potasio	0.4	1.9	Insuficiente
Calcio	11.3	53.1	Insuficiente
Magnesio	7.5	35.4	Insuficiente
C.I.C.	4.9		Media

Tabla 10. Tabla 10. En la tabla se muestran los resultados de los análisis de minerales del jal de mina (T0), la absorción de minerales en el tejido vegetal de raíz del tratamiento control (1R7), *A. brasilense* (3R7) y *A. brasilense* en combinación con brasinoesteroides (4R7), así como el suelo de los tratamientos con *A. brasilense* (T3) y *A. brasilense* combinada con brasinoesteroides (T4), después de la cosecha de las plantas.

ELEMENTOS	SUELO		RAÍZ	
	Tratamiento	μ y E. estándar	Tratamiento	μ y E. estándar
Mo	T0	$T \pm 2.39$	1R7	7.15 ± 1.11
Zr	T0	40.39 ± 1.77	1R7	38.95 ± 1.78
Sr	T0	100.88 ± 2.14	1R7	117.36 ± 2.29
U	T0	$T \pm 4.09$	1R7	$T \pm 3.92$
Rb	T0	59.38 ± 1.98	1R7	48.27 ± 1.82
Th	T0	$T \pm 2.46$	1R7	$T \pm 2.45$
Pb	T0	84.38 ± 4.82	1R7	76.62 ± 4.74
Au	T0	$T \pm 3.95$	1R7	$T \pm 4.08$
Se	T0	4.52 ± 1.6	1R7	11.31 ± 1.81
As	T0	42.39 ± 4.29	1R7	50.1 ± 4.32
Hg	T0	$T \pm 5.41$	1R7	$T \pm 5.28$
Zn	T0	167.1 ± 7.25	1R7	213.79 ± 8.01
W	T0	$T \pm 23.06$	1R7	$T \pm 22.23$
Cu	T0	14.93 ± 7.11	1R7	46.29 ± 7.86
Ni	T0	$T \pm 18.93$	1R7	$T \pm 18.9$
Co	T0	$T \pm 58.47$	1R7	$T \pm 64.4$
Fe	T0	15531.94 ± 209.26	1R7	18599.86 ± 212.86
Mn	T0	369.03 ± 32.07	1R7	650.1 ± 37.25
Cr	T0	$T \pm 12.85$	1R7	$T \pm 14.56$
V	T0	56.08 ± 8.81	1R7	60.86 ± 9.39
Ti	T0	932.6 ± 28.98	1R7	830.73 ± 30.46
Sc	T0	$T \pm 29.39$	1R7	$T \pm 38.37$
Ca	T0	31955.57 ± 697.17	1R7	46155.88 ± 796.68
K	T0	15029.64 ± 260.72	1R7	23426.33 ± 326.84
S	T0	2368.62 ± 77.45	1R7	17968.55 ± 198.62
Ba	T0	$T \pm 32.18$	1R7	$T \pm 28.04$
Cs	T0	$T \pm 11.24$	1R7	$T \pm 10.02$
Te	T0	$T \pm 21.64$	1R7	$T \pm 18.5$
Sb	T0	$T \pm 8.61$	1R7	$T \pm 6.97$
Sn	T0	$T \pm 6.16$	1R7	$T \pm 5.16$
Cd	T0	$T \pm 6.71$	1R7	$T \pm 5.71$

Ag	T0	46.77 ± 3.41	1R7	34.69 ± 3.07
Pd	T0	T ± 6.2	1R7	T ± 5.27
Nd	T0	T ± 70.05	1R7	T ± 64.83
Pr	T0	T ± 45.44	1R7	T ± 41.9
Ce	T0	T ± 38.46	1R7	T ± 35.34
La	T0	T ± 36.78	1R7	T ± 33.93
Bal	T0	525222.25 ± 1341.62	1R7	626829.88 ± 1205.92
Nb	T0	1.82 ± 1	1R7	4.08 ± 1
Y	T0	T ± 1.5	1R7	T ± 1.5
Bi	T0	T ± 7.73	1R7	T ± 7.89
Al	T0	21288.61 ± 577.07	1R7	15861.87 ± 572.96
P	T0	T ± 564.81	1R7	826.36 ± 211.97
Si	T0	384799.84 ± 1715.89	1R7	243612.84 ± 1404.53
Cl	T0	T ± 57.63	1R7	2274.25 ± 61.66
Mg	T0	2136.81 ± 1314.61	1R7	2891.39 ± 1589.77
Mo	T3	T ± 2.25	3R7	11.52 ± 1.3
Zr	T3	29.4 ± 1.57	3R7	18.3 ± 1.51
Sr	T3	88.62 ± 1.94	3R7	91.23 ± 1.97
U	T3	T ± 3.68	3R7	T ± 1.82
Rb	T3	48.9 ± 1.75	3R7	28.23 ± 1.05
Th	T3	T ± 2.33	3R7	25.23 ± 3.96
Pb	T3	64.97 ± 4.24	3R7	83.71 ± 5.59
Au	T3	T ± 3.86	3R7	T ± 300000
Se	T3	4.45 ± 1.52	3R7	T ± 14.15
As	T3	36.32 ± 3.54	3R7	63.85 ± 5.2
Hg	T3	T ± 5.07	3R7	T ± 300000
Zn	T3	114.93 ± 6	3R7	411.33 ± 13.81
W	T3	T ± 20.61	3R7	T ± 48.3
Cu	T3	13.35 ± 6.7	3R7	91.59 ± 13.32
Ni	T3	T ± 18.35	3R7	T ± 300000
Co	T3	T ± 52.84	3R7	T ± 300000
Fe	T3	13426.74 ± 202.82	3R7	20514.51 ± 245.48
Mn	T3	325.95 ± 29.97	3R7	T ± 300000
Cr	T3	T ± 12.5	3R7	20.42 ± 8.86
V	T3	43.92 ± 8.64	3R7	56.97 ± 8.49
Ti	T3	1132.3 ± 29.71	3R7	701.84 ± 27.42
Sc	T3	T ± 30.93	3R7	T ± 35.62
Ca	T3	32982.98 ± 638.48	3R7	61858.53 ± 1011.3
K	T3	12368.97 ± 227.66	3R7	33378.18 ± 445.02
S	T3	1863.39 ± 70.94	3R7	38160.66 ± 385.21
Ba	T3	T ± 33.19	3R7	T ± 29.74
Cs	T3	T ± 11.52	3R7	T ± 10.69

Te	T3	T ± 22.6	3R7	T ± 19.15	
Sb	T3	63.14 ± 6.5	3R7	T ± 7.04	
Sn	T3	T ± 6.45	3R7	T ± 5.2	
Cd	T3	T ± 7.05	3R7	T ± 5.89	
Ag	T3	47.46 ± 3.33	3R7	T ± 4.28	
Pd	T3	T ± 6.39	3R7	T ± 5.33	
Nd	T3	T ± 70.18	3R7	T ± 71.44	
Pr	T3	T ± 45.12	3R7	T ± 46.15	
Ce	T3	T ± 38.7	3R7	T ± 39.02	
La	T3	T ± 36.66	3R7	T ± 37.76	
Bal	T3	566142.81 ± 1235.33	3R7	555960.94 ± 1507.88	
Nb	T3	T ± 1.5	3R7	6.63 ± 1.15	
Y	T3	T ± 1.5	3R7	T ± 1.5	
Bi	T3	T ± 7.09	3R7	T ± 9.74	
Al	T3	13460.81 ± 481.03	3R7	19804.14 ± 786.49	
P	T3	T ± 328.14	3R7	1661.4 ± 278.04	
Si	T3	355348.84 ± 1627.58	3R7	264670.16 ± 1723.12	
Cl	T3	T ± 53.54	3R7	3014.78 ± 84.4	
Mg	T3	2690.5 ± 1257.38	3R7	T ± 3238.73	
Mo	T4	T ± 2.31	4R7	7.02 ± 1.12	
Zr	T4	29.9 ± 1.63	4R7	49.73 ± 1.89	
Sr	T4	104.63 ± 2.13	4R7	112.94 ± 2.25	
U	T4	T ± 3.83	4R7	4.66 ± 2.82	
Rb	T4	48.97 ± 1.79	4R7	30.41 ± 1	
Th	T4	T ± 2.32	4R7	T ± 2.47	
Pb	T4	70.6 ± 4.43	4R7	64.09 ± 4.49	
Au	T4	T ± 3.82	4R7	T ± 4.24	
Se	T4	3.72 ± 1.51	4R7	13.67 ± 1.9	
As	T4	28.55 ± 3.58	4R7	41.94 ± 3.77	
Hg	T4	T ± 5.12	4R7	T ± 5.39	
Zn	T4	124.64 ± 6.31	4R7	266.1 ± 8.82	
W	T4	T ± 21.08	4R7	T ± 22.86	
Cu	T4	15.62 ± 6.89	4R7	43.16 ± 7.84	
Ni	T4	T ± 18.72	4R7	T ± 18.97	
Co	T4	T ± 50.18	4R7	T ± 68.69	
Fe	T4	11424.96 ± 201.99	4R7	20864.84 ± 216.67	
Mn	T4	330.32 ± 30.57	4R7	469.37 ± 34.33	
Cr	T4	T ± 11.94	4R7	21.48 ± 9.83	
V	T4	48.03 ± 8.2	4R7	63.1 ± 9.73	
Ti	T4	1002.38 ± 27.63	4R7	1090.75 ± 32.34	
Sc	T4	T ± 28.58	4R7	T ± 34.26	
Ca	T4	30363.71 ± 618.02	4R7	39371.5 ± 805.46	

K	T4	12754.21 ± 225.92	4R7	22189.09 ± 324.58	
S	T4	1542.62 ± 66.95	4R7	13507.02 ± 169.99	
Ba	T4	T ± 32.69	4R7	T ± 28.86	
Cs	T4	T ± 11.33	4R7	T ± 10.28	
Te	T4	T ± 22.08	4R7	T ± 19.02	
Sb	T4	62.19 ± 6.42	4R7	T ± 7.19	
Sn	T4	T ± 6.35	4R7	T ± 5.36	
Cd	T4	T ± 6.83	4R7	T ± 6	
Ag	T4	43.21 ± 3.2	4R7	30.1 ± 2.99	
Pd	T4	T ± 6.16	4R7	T ± 5.19	
Nd	T4	T ± 69.41	4R7	T ± 65.2	
Pr	T4	T ± 44.75	4R7	T ± 42.36	
Ce	T4	T ± 38.22	4R7	T ± 35.66	
La	T4	T ± 36.32	4R7	T ± 34.45	
Bal	T4	555207.44 ± 1273.91	4R7	589512.31 ± 1273.35	
Nb	T4	T ± 1.5	4R7	4.66 ± 1	
Y	T4	T ± 1.5	4R7	T ± 1.5	
Bi	T4	T ± 7.32	4R7	T ± 8.1	
Al	T4	14677.29 ± 486.57	4R7	22657.27 ± 649.63	
P	T4	T ± 331.2	4R7	433.53 ± 222.46	
Si	T4	370817.06 ± 1667.37	4R7	288637 ± 1536.89	
Cl	T4	T ± 52.91	4R7	1110.67 ± 53.64	
Mg	T4	T ± 1810.09	4R7	T ± 2966.53	

*T(trazas).

*Bal (Conjunto de elementos de concentración baja no detectadas por el equipo).

VII Discusión

Las plantas de *Linum usitatissimum*, mostraron una germinación del 90% en el jal minero. Rzedowski y Rzedowski (1992), describen a *L. usitatissimum*, como una especie herbácea anual, perteneciente a la familia de las lináceas y originaria de la región oriental del mediterráneo, llegando su distribución hasta la India.

Chico-Ulcungo (2017), menciona que, en cuanto al tipo de suelo, la planta de lino no se desarrolla de manera óptima en aquellos suelos que se compactan con la humedad, ya que impiden la germinación de la semilla. El mismo autor resalta que, tampoco es bueno para la planta tener suelos muy sueltos y permeables, esto debido a lo pequeño de sus raíces, mismas que no son capaces de alcanzar suelos profundos.

Por otro lado, D'Ambrosio *et al.* (2018), mencionan que la planta de linaza se adapta mejor a suelos arcillo-arenosos, con suficiente materia orgánica, un buen drenaje y poco calizo.

El INTA (Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria) en 2018, difiere de las declaraciones anteriores, ya que menciona que la planta de lino puede adaptarse a cualquier tipo de suelo. Los resultados obtenidos en el presente trabajo, concuerdan con este último, ya que la semilla fue sembrada en suelo contaminado con MP, con escasa materia orgánica y compacto al contacto con la humedad, en estas condiciones, se logró obtener el 90% de germinación. Lo anterior demuestra la tolerancia de la semilla de lino a un sustrato contaminado, como son los jales mineros.

Los tratamientos con Brasinoesteroides y la bacteria *A. brasilense*, tanto de forma individual como combinada, presentaron efectos positivos en las variables área de raíz y biomasa seca de raíz de las plantas. Duarte *et al.* (2020), menciona, que *A. brasilense* es una bacteria promotora de crecimiento vegetal, la cual se distribuye en suelos tropicales y subtropicales.

Canto-Martín (2004), afirma que los cultivos con *Azospirillum*, producen en las plantas compuestos conocidos como auxinas y citocininas, estas tienen funciones parecidas a las giberelinas, que son hormonas de crecimiento vegetal, las cuales estimulan el desarrollo vegetal y aumentan la producción de la planta.

Duarte *et al.* (2020), mencionan que *A. brasilense* se asocia a la raíz de la planta, promoviendo la productividad de la planta aumentando su parte aérea y su sistema radical. Licea-Herrera *et al.* (2020), concuerdan con lo anterior, mencionando que esta bacteria ejerce efectos benéficos en los cultivos, destacando el crecimiento vegetal, aumentando el rendimiento de cultivos de cereales en un 30%. Esto derivado de cambios fisiológicos en la raíz de la planta que le permite lograr una mayor absorción de agua y nutrientes.

En cuanto a los brasinoesteroides, Hernández-Silva y García-Márquez (2016), definen a los brasinoesteroides como compuestos esteroidales, considerados como fitohormonas, que se distribuyen en pequeñas cantidades en la planta, principalmente en polen, flores y semillas.

Sáenz-Carbonell *et al.* (2006); Núñez *et al.* (2010) y Coll-García *et al.* (2019), mencionan que estos compuestos influyen en la expansión celular, estimulando la rizogénesis y el crecimiento de las plantas, pueden brindar resistencia a distintos tipos de estrés biótico y abiótico, así como a estrés ocasionado por metales pesados (MP). Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos en la presente investigación, ya que la adición de Brasinoesteroides o de *A. brasilense* tanto de forma individual como combinada, produjo efectos positivos en el área de raíz y en la biomasa seca de raíz de las plantas de *L. usitatissimum*. Esto indica que hubo una modificación en la estructura de la raíz de la planta la cual, de forma natural, suele ser pequeña y superficial. De igual forma, la planta tuvo mayor producción de biomasa en comparación con los demás tratamientos, lo que significa que tanto los brasinoesteroides, como *A. brasilense* tuvieron un efecto positivo en el desempeño de la planta de lino.

Por otro lado, el tiosulfato mostró efectos negativos en las variables área de raíz y biomasa en peso seco de raíz de las plantas de *L. usitatissimum*. En este sentido, en la hoja de Seguridad sobre Sustancias Peligrosas del Departamento de Salud y Servicios para Personas Mayores del estado de New Jersey, se clasifica al tiocianato de amonio (NH_4SCN), como una sustancia química peligrosa. El mismo autos y Reactivos Meyer (2018), mencionan que puede afectar al ser humano por vía inhalada o absorberse fácilmente a través de la piel. La exposición repetida a esta sustancia química, puede ocasionar dolor de cabeza, náuseas y pérdida del apetito. La exposición prolongada puede ocasionar daño a la glándula tiroides, daño reproductivo e incluso, la muerte.

En cuanto al tiosulfato de amonio $[(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_3]$, la comercializadora ISAOSA, lo define como un fertilizante líquido que contiene 12% de nitrógeno en forma de amonio (NH_4) y 26% de azufre (S), y menciona que puede ayudar a acondicionar los suelos, ya que al bajar el pH y reducir las sales, favorece la liberación de nutrientes presentes. En la hoja de seguridad del tiosulfato de amonio, Sigma-Aldrich 2024 y en la ficha de seguridad de Manufacturas Químicas San Juan (2005), se menciona que el riesgo para el ser humano es bajo, sin embargo, debido a su alta solubilidad, es muy móvil en el suelo, puede lixiviarse fácilmente a mantos acuíferos y ocasionar efectos adversos sobre los microorganismos acuáticos.

Tanto el tiocianato como el tiosulfato, han sido ampliamente utilizados en materia de fitoextracción. Anderson *et al.* (1998), fueron de los primeros investigadores en realizar una fitoextracción inducida de Au, utilizando la especie *Brassica juncea* a la cual, le adicionaron tiocianato de amonio, obteniendo una concentración de 57 mg Au kg^{-1} en la parte aérea.

Krisnayanti *et al.* (2016), también realizaron una fitoextracción inducida en campo, utilizando plantas de tabaco sembradas en una parcela de jal minero, a la cual adicionaron cianuro de potasio, cianuro de sodio y tiosulfato de amonio, con lo que obtuvieron en general, concentraciones de $1.2 \text{ mg Au kg}^{-1}$ y de $54.3 \text{ mg Ag k}^{-1}$.

Por último, una de las investigaciones más recientes fue la realizada por González-Valdez *et al.* (2018), quienes realizaron la fitoextracción inducida en condiciones de invernadero, con *Brassica napus* y aplicación de tiosulfato de amonio o el tiocianato de amonio y con la inoculación del hongo *Aspergillus niger*, obteniendo una concentración de $1.5 \text{ mg Au kg}^{-1}$ en tallos y 10 mg kg^{-1} en raíz, esto con la adición de tiocianato de amonio. En cuanto a la adición de tiosulfato de amonio con la inoculación de *A. niger*, se obtuvieron concentraciones de Au de $50\,000 \text{ mg kg}^{-1}$ en raíz, $30\,000 \text{ mg kg}^{-1}$ en tallos, y $15\,000 \text{ mg kg}^{-1}$ en hojas.

Cabe destacar que la mayoría de los trabajos sobre fitoextracción inducida están basados en la mayor concentración del metal en la planta, sin embargo, un aporte importante que se puede destacar, es el establecimiento de la planta en el sitio contaminado, ya que, en la fitorremediación, es uno de los puntos importantes para poder llevarse a cabo. Así, es necesario que una planta sea tolerante a condiciones de estrés ocasionado por MP, pH

extremo, y escasa materia orgánica. En el presente estudio, uno de los principales aspectos a destacar, es la capacidad de *L. usitatissimum* para tolerar y crecer en un jal minero.

Todos los estudios anteriores utilizaron ya sea tiocianato de amonio, tiosulfato de amonio de forma individual o combinada. Todos concordaron en que finalmente, la adición de la sustancia química (cualquiera de las dos), conduce a la muerte de la planta. Por eso se hace la recomendación de agregarlo unas semanas antes de la cosecha, para evitar la pérdida de biomasa y asegurar una mayor hiperacumulación del metal. En los presentes resultados, se concuerda con los investigadores mencionados, ya que el tiosulfato tuvo efectos negativos en el área de raíz y en la biomasa seca de raíz de *L. usitatissimum*. Esto, a pesar de que en las plantas se veía buen crecimiento demostrado en la variable de altura final donde, no hubo diferencias significativas entre los tratamientos. Sin embargo, recordemos que, estos compuestos químicos fueron adicionados una semana antes de la cosecha, por lo que, el crecimiento de la planta, podría explicarse debido a la adición de *A. brasilense* y brasinoesteroides.

En el caso de la biomasa fresca de la parte aérea, el tratamiento con tiosulfato es el que mostró tener mayor cantidad, sin embargo, al momento de determinar el peso seco, se mostró que fue el que más efectos negativos ocasionó en la planta. Esta diferencia puede deberse solo a una acumulación hídrica en la planta. Sin embargo, aun cuando haya retenido una gran cantidad de agua, no demostró que aumentara su productividad. Finalmente, se observó que el tratamiento con tiosulfato de amonio, fue el que tuvo mayor efecto negativo en el desempeño de las plantas de *L. usitatissimum*.

En cuanto a la fitoextracción, el análisis muestra que *L. usitatissimum* puede considerarse como una potencial planta hiperacumuladora. De acuerdo con Baker (1981) las plantas hiperacumuladoras pueden superar en 100 o más veces los valores normales de acumulación de metales en sus tejidos. El mismo autor menciona que estas plantas son especies tolerantes a uno o más metales pesados y que su distribución suele estar restringida a suelos contaminados por estos minerales, ya que no son competitivas en zonas no contaminadas. Según Jia-Shi *et al.* (2020), para que una planta sea considerada como hiperacumuladora, debe ser capaz de acumular en su tejido las siguientes cantidades de metales: $> 100 \mu\text{g Cd g}^{-1}$; $> 300 \mu\text{g Co o Cu g}^{-1}$; $> 1\ 000 \mu\text{g Ni, As o Pb g}^{-1}$; $> 3\ 000 \mu\text{g Zn g}^{-1}$; $> 10\ 000 \mu\text{g Mn g}^{-1}$,

de lo cual, Bhargava (2012) concuerda con este autor. Peng *et al.* (2020), también menciona que para 2020, según la base global de plantas hiperacumuladoras (www.hiperacumuladores.org), se han reportado alrededor de 721 especies hiperacumuladoras, y este número sigue en aumento.

Pérez-Leal (2017), menciona que las concentraciones normales de macroelementos y microelementos en plantas, es de: P y Mg 2 ppm; S y Si 1 ppm; Ca 5 ppm; K 10 ppm; Zn 20 ppm, Fe y Cl 100 ppm, por cada 100 g de materia seca.

En el resultado de nuestros análisis, las muestras de tejido vegetal, mostraron una baja acumulación de los elementos Au, Ag, Cd, Co, Cu, Ni, As, Pb, Zn, Mn, lo cual se explica con la baja concentración de estos mismos metales en el jal de mina, en el que fueron sembradas las plantas de lino. Sin embargo, hubo resultados interesantes en cuanto a la acumulación de otros elementos.

En cuanto al tejido vegetal de raíz del tratamiento control, hubo una absorción de Sr, Fe, Ti, Ca, K, S, Bal, Al, Si, Cl, Mg por encima de lo normal. El tejido de la raíz del tratamiento con *A. brasilense*, dio los mismos resultados, a excepción del Mg, ya que la acumulación es baja, sin embargo, hay un incremento del P. Finalmente, en el tejido de raíz, del tratamiento de *A. brasilense* en combinación con brasinoesteroides, es igual a los anteriores, a excepción del P y el Mg, ya que, en este tratamiento, su concentración es baja. Esto indica que la planta fue capaz de tolerar concentraciones arriba de lo normal de estos elementos y que puede ser un prospecto para la fitorremediación de sitios contaminados. En el caso del Fe, *L. usitatissimum* logró una concentración >18 000 ppm; en condiciones normales, se ha reportado una absorción promedio de 20 ppm de este metal en tejido vegetal. Esto puede catalogar a la planta de linaza como candidata para remediar suelos contaminados con grandes cantidades de Fe, ya que está demostrando una buena tolerancia a la hiperacumulación de este mineral. Para la fitorremediación, esto es un aporte importante.

Queda demostrado que en cuanto al establecimiento de la planta modelo (linaza), la adición de los Brasinoesteroides y la inoculación de *A. brasilense*, disminuyeron el estrés ocasionado por el sustrato contaminado. Se esclarece también que en materia de supervivencia de la planta en un sitio contaminado con MP, tanto brasinoesteroides como *A. brasilense* brindan

protección y mejoran su desempeño. Es difícil, que cualquier planta logre establecerse en un sitio contaminado con las características de un sustrato de jal de mina. Por ello, el determinar alternativas que ayuden a la supervivencia de la planta, es fundamental si se plantea la aplicación en una tecnología como la fitorremediación de suelos contaminados.

Aún falta mucho por investigar, la estrategia a seguir es utilizar tratamientos amigables con el ambiente, que permita extraer contaminantes del suelo de forma eficiente sin dañarlo más, que sea de fácil manejo y autosustentable. Sin embargo, encontrar plantas que logren establecerse, es un gran avance en este proceso y determinar sustancias biológicas que ayuden en su desempeño; lo anterior, asegura una fitoextracción inducida menos agresiva y más manejable.

VIII Conclusiones

Las plantas de *Linum usitatissimum*, presentan tolerancia para establecerse en un jal de mina contaminado con MP, lo que la convierte en una especie potencial como planta hiperacumuladora, que puede ser usada como planta modelo para la fitoextracción.

Los Brasinoesteroides y *Azospirillum brasilense* tanto de forma individual como combinada, presentan efectos positivos en el área de raíz y en la biomasa seca de raíz de las plantas.

Azospirillum brasilense y los brasinoesteroides tienen efectos positivos en el desempeño de *L. usitatissimum*.

El tiosulfato tiene efectos negativos en el área de raíz y en la biomasa seca de raíz de las plantas de *L. usitatissimum*.

El tiosulfato tiene un efecto negativo en el desempeño de las plantas de *L. usitatissimum* (excepto en la variable biomasa fresca de la parte aérea).

La inoculación de *A. brasilense* y la adición de brasinoesteroides, de forma individual o combinada, ayudan al establecimiento y al desempeño de *L. usitatissimum* en jales mineros contaminados con MP, lo cual la coloca como una planta potencial para la fitorremediación.

El tejido de raíz del control, *A. brasilense* y *A. brasilense* combinado con Brasinoesteroides, mostraron baja absorción de Au, Ag, Cd, Zn, Cu, Ni, As, Pb y Mn.

El tejido de raíz del tratamiento control, mostró mayor absorción de los elementos Sr, Fe, Ti, Ca, K, Al, Si, Cl, Mg.

El tejido de raíz, el tratamiento con *A. brasilense* en combinación con brasinoesteroides, mostró mayor absorción en los mismos elementos del tratamiento control (excepto el Mg).

El tratamiento de *A. brasilense* de forma individual, mostró mayor absorción en los elementos Sr, Fe, Ti, Ca, K, Al, Si, Cl y P.

La inoculación de microorganismos y hormonas vegetales pueden ser una estrategia para el establecimiento de la especie *L. usitatissimum* en un jal de mina, lo que puede favorecer para su uso futuro en fitoextracción de MP.

IX. REFERENCIAS

- Afonso, T. F., Demarco, C. F., Pieniz, S., Quadro, M. S., De Oliveira Camargo, F. A., & Andrezza, R. (2020). Bioprospection of indigenous flora grown in copper mining tailing area for phytoremediation of metals. *Journal Of Environmental Management*, 256, 109953. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109953>
- Agustín, B. D. A., & Del Pilar, A. L. S. (2019, 22 enero). *Absorción y bioacumulación de metales pesados de tres especies vegetales introducidas en la amazonia ecuatoriana en relaves mineros*. <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/10578>
- Alaboudi, K. A., Ahmed, B. M., & Brodie, G. (2018). Phytoremediation of Pb and Cd contaminated soils by using sunflower (*Helianthus annuus*) plant. *Annals Of Agricultural Sciences*, 63(1), 123-127. <https://doi.org/10.1016/j.aOAS.2018.05.007>
- Ali, H., Khan, E., & Sajad, M. A. (2013). Phytoremediation of heavy metals—Concepts and applications. *Chemosphere*, 91(7), 869-881. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.075>
- Alkorta, I., Hernández-Allica, J., Becerril, J. M., Amézaga, I., Albizu, I., Onaindia, M., & Garbisu, C. (2004). Chelate-Enhanced Phytoremediation of Soils Polluted with Heavy Metals. *Reviews In Environmental Science And Bio/Technology*, 3(1), 55-70. <https://doi.org/10.1023/b:resb.0000040057.45006.34>
- Alvarado, C. J., Dasgupta-Schubert, N., Ambriz, E., Sánchez-Yañez, J. M., & Villegas, J. (s. f.). Hongos micorrízicos arbusculares y la fitorremediación de plomo. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-49992011000400008&lng=es&tlng=es
- Anderson, C., Brooks, R. R., Stewart, R. B., & Simcock, R. (1999). Gold Uptake by Plants. *Gold Bulletin*, 32(2), 48-52. <https://doi.org/10.1007/bf03214790>
- Anderson, C. W., Robinson, B., Meech, J., Gardea-Torresdey, J. L., Stewart, R. B., Moreno, F. N., & Wreesmann, C. T. J. (2003). *Gold phytomining. Novel developments in a plant-based mining system*. <http://kiwiscience.com/downloads/Van2003.pdf>
- Anderson, C., Moreno, F. N., & Meech, J. (2005). A field demonstration of gold phytoextraction technology. *Minerals Engineering*, 18(4), 385-392. <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2004.07.002>

- Baker, A. J. M. (1981). Accumulators and excluders -strategies in the response of plants to heavy metals. *Journal Of Plant Nutrition*, 3(1-4), 643-654. <https://doi.org/10.1080/01904168109362867>
- Baran, E.J. (2021). Hiperacumulación de metales por plantas. *Anales de la Academia Nacional de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales Argentina*, 72, 76-113.
- Bhargava, A., Carmona, F. F. F., Bhargava, M., & Srivastava, S. (2012). Approaches for enhanced phytoextraction of heavy metals. *Journal Of Environmental Management*, 105, 103-120. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.04.002>
- Blaylock, M. J., Salt, D. E., Dushenkov, S., Zakharova, O. V., Gussman, C. D., Kapulnik, Y., Ensley, B. D., & Raskin, I. (1997). Enhanced Accumulation of Pb in Indian Mustard by Soil-Applied Chelating Agents. *Environmental Science & Technology*, 31(3), 860-865. <https://doi.org/10.1021/es960552a>
- Canto-Martín, J., Medina-Peralta, S., & Morales-Avelino, D. (2004). Efecto de la inoculación con *azospirillum* sp. en plantas de chile habanero (*capsicum chinense jacquin*). *Agroecosistemas tropicales y subtropicales*, 4 (1), 21-27.
- Carbonell, L. S., Lara, I. C., & Paredes, F. R. (2006). Los brasinoesteroides. Una nueva clase de hormonas vegetales. *Ciencia*, 57(4), 80-86. https://revistaciencia.amc.edu.mx/images/revista/57_4/pdf/brasinoesteroides.pdf
- Ceniceros-Gómez, A. E., Macías-Macías, K. Y., De la Cruz-Moreno, J. E., Gutiérrez-Ruiz, M. E., & Martínez-Jardines, L. G. (2018). Characterization of mining tailings in México for the possible recovery of strategic elements. *Journal Of South American Earth Sciences*, 88, 72-79. <https://doi.org/10.1016/j.jsames.2018.08.013>
- CIAFA. Tiosulfato de amonio. Ficha de datos de Seguridad de Materiales. <https://www.ciafa.org.ar/files/Eo9OSzqqSC1fQxL0BSH66pngQIAK21vJ9Wt4LY1Y.pdf>
- Clemens, S., Palmgren, M. G., & Krämer, U. (2002). A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends In Plant Science*, 7(7), 309-315. [https://doi.org/10.1016/s1360-1385\(02\)02295-1](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(02)02295-1)
- CONABIO (2022). La Minería en México. *Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad*. <https://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/verbenaceae/lantanacamara/fichas/ficha.htm>

- Chávez, P. C., Salas, J. A. U., Pérez, N. R., Medina, M. M., Villanueva, R. M., Arroyo, Y. R. R., & Camacho, J. R. (2010). The impact of mining in the regional ecosystems: The mining district of El Oro and Talpujahua, Mexico. *De Re Metallica*, 15, 21-34.
- Corona-Chávez, P., Maldonado, R., Ramos-Arroyo, Y. R., Robles-Camacho, J., Lozano-Santacruz, R., & Martínez-Medina, M. (2017). Geoquímica y mineralogía de los jales del distrito minero Tlalpujahua-El Oro, México, y sus implicaciones de impacto ambiental. *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas*, 34(3), 250. <https://doi.org/10.22201/cgeo.20072902e.2017.3.540>
- Covarrubias, S. A., & Cabriales, J. J. P. (2017). Contaminación Ambiental por Metales Pesados en México: Problemática y Estrategias de Fitorremediación. *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental*, 33(esp01), 7-21. <https://doi.org/10.20937/rica.2017.33.esp01.01>
- Delgadillo-López, A. E., González-Ramírez, C. A., García, F. P., Villagómez-Ibarra, J. R., & Acevedo-Sandoval, O. A. (2011). Fitorremediación: Una Alternativa para eliminar la contaminación. *Tropical And Subtropical Agroecosystems*, 14(2), 597-612. http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/IQM_Fitorremediacion_UAEH_25610.pdf
- Departamento de Salud y Servicios para personas mayores de New Jersey (2002). Tiocianato de amonio. Hoja informativa sobre sustancias peligrosas. <https://www.nj.gov/health/eoh/rtkweb/documents/fs/0119sp.pdf>.
- Dinh, T., Dobó, Z., & Kovács, H. (2022). Phytomining of noble metals – A review. *Chemosphere*, 286, 131805. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131805>
- Duarte, C. F. D., Cecato, U., Biserra, T. T., Mamédio, D., & Galbeiro, S. (2020). *Azospirillum* spp. en gramíneas y forrajeras. Revisión. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 11(1), 223-240. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v11i1.4951>
- Fernando, P. L. (2017). *Fisiología vegetal - I, II, III y IV*. <http://repositorio.unu.edu.pe/handle/UNU/3201>
- García, Y. C., Manchado, F. C., Ferrer, M. P., López, E. C., Campoalegre, G. H., Hidalgo, O. B., Nordelo, C. B., Castillo, E., Morejón, V. N., & Estévez, I. H. (2019). Aportes al conocimiento del papel de esteroides bioactivos en los procesos moleculares y

- fisiológicos de las plantas. *Anales de la Academia de Ciencias de Cuba*, 9(3), 681.
<http://revistaccuba.sld.cu/index.php/revacc/article/download/681/699>
- Gavrilescu, M. (2022). Enhancing phytoremediation of soils polluted with heavy metals. *Current Opinion In Biotechnology*, 74, 21-31.
<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2021.10.024>
- Göhre, V., & Paszkowski, U. (2006). Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation. *Planta*, 223(6), 1115-1122.
<https://doi.org/10.1007/s00425-006-0225-0>
- Góngora Pérez, J.P. (2013). Evolución reciente de la minería en México. *Comercio exterior*, 63, 2-6.
- González-Valdez, E., Alarcón, A., Ferrera-Cerrato, R., Vega-Carrillo, H. R., Maldonado-Vega, M., & Salas-Luévano, M. Á. (2015). Seed Germination and Seedling Growth of Five Plant Species for Assessing Potential Strategies to Stabilizing or Recovering Metals from Mine Tailings. *Water, Air, & Soil Pollution*, 227(1).
<https://doi.org/10.1007/s11270-015-2724-8>
- González-Valdez, E., Alarcón, A., Ferrera-Cerrato, R., Vega-Carrillo, H. R., Maldonado-Vega, M., Salas-Luévano, M. Á., & Argumedo-Delira, R. (2018). Induced accumulation of Au, Ag and Cu in Brassica napus grown in a mine tailings with the inoculation of Aspergillus niger and the application of two chemical compounds. *Ecotoxicology And Environmental Safety*, 154, 180-186.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.02.055>
- González-Valdez, E., Alarcón, A., & Ferrera-Cerrato, R., (2019). Las plantas, nuevos mineros para recuperar metales preciosos. *Ciencia*, 70: 88-92.
- Guerrero, Y. R., Vázquez, M. N., Morales, L. M. M., González, L. M., Agüero, E. R., Rodríguez, J. D.´., Rodríguez, J. L. M., & Domínguez, G. P. (2021). Mecanismos de acción de los brasinoesteroides y sus análogos en las respuestas de plantas sometidas a estrés abiótico. *Anales de la Academia de Ciencias de Cuba*, 11(2), 873.
<http://revistaccuba.sld.cu/index.php/revacc/article/download/873/1082>
- Harris, A. T., & Bali, R. (2007). On the formation and extent of uptake of silver nanoparticles by live plants. *Journal Of Nanoparticle Research*, 10(4), 691-695.
<https://doi.org/10.1007/s11051-007-9288-5>.

- Ijaz, M., Rasul, B., Zaib, P., Masoud, M. S., Zubair, M., Iqbal, M., & Mahmood-Ur-Rahman. (2021). Genetics of metal hyperaccumulation in plants. *En Elsevier eBooks* (pp. 329-340). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-819382-2.00021-1>
- ISAOSA (2015). Tiosulfato de Amonio. Hoja de seguridad. Recuperado de: <https://www.isaosa.mx/site/productos/info/22/THIOSULFATO+DE+AMONIO#:~:text=Es%20un%20fertilizante%20%C3%ADquido%2C%20que,2S2O3>
- Jabeen, R., Ahmad, A., & Iqbal, M. (2009). Phytoremediation of Heavy Metals: Physiological and Molecular Mechanisms. *The Botanical Review*, 75(4), 339-364. <https://doi.org/10.1007/s12229-009-9036-x>
- Krisnayanti, B. D., Anderson, C., Sukartono, S., Afandi, Y., Suheri, H., & Ekawanti, A. (2016). Phytomining for Artisanal Gold Mine Tailings Management. *Minerals*, 6(3), 84. <https://doi.org/10.3390/min6030084>
- Leyval, C., Turnau, K., & Haselwandter, K. (1997). Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: physiological, ecological and applied aspects. *Mycorrhiza*, 7(3), 139-153. <https://doi.org/10.1007/s005720050174>
- Licea-Herrera, J. I., Di Carlo Quiroz-Velazquez, J., & Hernández-Mendoza, J. L. (2020). Impacto de *Azospirillum brasilense*, una rizobacteria que estimula la producción del ácido indol-3-acético como el mecanismo de mejora del crecimiento de las plantas en los cultivos agrícolas. *Revista Boliviana de Química*, 37(1). <https://doi.org/10.34098/2078-3949.37.1.5>
- López-Martínez, S., Gallegos-Martínez, M., Flores, L. J. P., & Rojas, M. G. (2005). Mecanismos de Fitorremediación de Suelos Contaminados con Moléculas Orgánicas Xenobióticas. *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental*, 21(2), 91-100. http://www.atmosfera.unam.mx/editorial/rica/acervo/vol_21_2/5.pdf
- Maluckov, B.S. (2015). Bioassisted Phytomining of Gold. *The Minerals, Metals & Materials Society*, 67, 1075-1078. DOI: <https://10.1007/s11837-015-1329-4>
- Manufacturas químicas Juan Messina (2005). Tiosulfato de Amonio. Hoja de seguridad. <https://www.juanmessina.com.ar/tiosulfato-de-amonio.html>
- Marcela, L., Betancur, A., & Mazo, K. I. M. (2005). Fitorremediación: la alternativa para absorber metales pesados de los biosólidos. *Revista Lasallista de Investigación*, 2(1),

57-60.

<http://repository.lasallista.edu.co/dspace/bitstream/10567/332/1/fitorremediacion.pdf>

- Mendoza-Hernández, J. C., Vázquez-Delgado, O. R., Castillo-Morales, M., Varela-Caselis, J. L., Santamaría-Juárez, J. D., Olivares-Xometl, O., Arriola-Morales, J., & Pérez-Osorio, G. (2019). Phytoremediation of mine tailings by *Brassica juncea* inoculated with plant growth-promoting bacteria. *Microbiological Research*, 228, 126308. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.126308>
- Mejía, J., Carrizales, L., Rodríguez, V., Jiménez, M. E. S., & Díaz, F. (1999). Un método para la evaluación de riesgos para la salud en zonas mineras. *Salud Publica de Mexico*, 41, S132-S140. <https://doi.org/10.1590/s0036-36341999000800010>
- Naila, A., Meerdink, G., Jayasena, V., Sulaiman, A.Z., Ajit, A.B., & Berta, G. (2019). A review on global metal accumulators—mechanism, enhancement, commercial application, and research trend. *Environmental Science and Pollution Research Review Article*. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05992-4>
- Novo, L.A.B., Castro, P.M.L., Alvarenga, P., & da Silva, E.F. (2017). Phytomining of Rare and Valuable Metals. *Springer International Publishing AG*, 469-486. https://doi.10.1007/978-3-319-52381-1_18
- Núñez, M., & Mazorra, L. M. (2001). Revisión bibliográfica: Los brasinoesteroides y la respuesta de las Plantas al estrés. *Cultivos Tropicales*, 22(3), 19-26. <http://www.redalyc.org/pdf/1932/193230161003.pdf>
- Núñez, M., Mazorra, L. M., Reyes, Y., & Martínez, L. (2010). Los brasinoesteroides y las respuestas de las plantas a estrés abióticos: una visión actualizada. *Cultivos Tropicales*, 31(2), 00. <http://www.redalyc.org/pdf/1932/193215930008.pdf>
- Osuna-Vallejo, V., Lindig-Cisneros, R., Blanco-García, A., Cruz-deLeón, J., Sánchez-Vargas, N. M., & Sáenz-Romero, C. (2020). Ensayo de Especies y Procedencias para Restauración Ecológica de Residuos Mineros en Tlalpujahua, Michoacán, México. *Agrociencia*, 54(1), 101-114. <https://agrociencia-colpos.mx/index.php/agrociencia/article/view/1885>
- Peng, J., Guan, Y., Lin, X., Xu, X., Xiao, L., Wang, H., & Meng, S. (2020). Comparative understanding of metal hyperaccumulation in plants: a mini-review. *Environmental*

- Geochemistry And Health*, 43(4), 1599-1607. <https://doi.org/10.1007/s10653-020-00533-2>
- Reactivos Meyer. (2018). Tiocianato de amonio. Hoja de seguridad conforme a la NOM-018-STPS-2015. https://reactivosmeyer.com.mx/datos/pdf/reactivos/hds_0635.pdf
- Remigio, A. C., Chaney, R. L., Baker, A. J. M., Edraki, M., Erskine, P. D., Echevarria, G., & Van Der Ent, A. (2020). Phytoextraction of high value elements and contaminants from mining and mineral wastes: opportunities and limitations. *Plant And Soil*, 449(1-2), 11-37. <https://doi.org/10.1007/s11104-020-04487-3>
- Rendina, A. E., Miniño, H., Bursztyn, A., De los Ríos, A., Barros, M. J., Wassner, D., & De Iorio, A. R. F. (2014b, agosto 14). *Uso de ligandos orgánicos en la fitoextracción de Plomo por Ricino (Ricinus communis L.)*. <https://revistas.unlp.edu.ar/domus/article/view/677>
- Rizzi, L., Petruzzelli, G., Poggio, G., & Guidi, G. (2004). Soil physical changes and plant availability of Zn and Pb in a treatability test of phytostabilization. *Chemosphere*, 57(9), 1039-1046. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.08.048>
- Rzedowski, J., & De Rzedowski, G. C. (1992). Familia *Linaceae*. Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes. <https://doi.org/10.21829/fb.133.1992.6>
- Rzedowski, G. & J. Rzedowski. (2010). Flora Fanerogámica del Valle de México. Instituto de Ecología, A.C. Centro regional del Bajío, Pátzcuaro, Michoacán. *CONABIO*, 1413.
- Sağıroğlu, A., Şaşmaz, A. & Şen, Ö., (2006). Hyperaccumulator plants of the Keban Mining district and their possible impact on the environment. *Polish Journal Of Environmental Studies*, 15(2). https://www.researchgate.net/profile/Ahmet_Sasmaz/publication/228757228_Hyperaccumulator_plants_of_the_Keban_mining_district_and_their_possible_impact_on_the_environment/links/02e7e525267b37fc75000000.pdf?disableCoverPage=true
- Salt, D. E., Blaylock, M. J., Kumar, N. P., Dushenkov, S., Ensley, B. D., Chet, I., & Raskin, I. (1995). Phytoremediation: A Novel Strategy for the Removal of Toxic Metals from the Environment Using Plants. *Nature Biotechnology*, 13(5), 468-474. <https://doi.org/10.1038/nbt0595-468>

- SEMARNAT. (2001). Norma oficial mexicana NOM-021-RECNAT-2000 que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreos y análisis. Diario Oficial de la Nación. México, D.F.: 73.
- Seregin, I.V., Kozhevnikova, A.D. (2021). Low molecular weight ligands in plants: role in metal homeostasis and hyperaccumulation. *Photosynthesis Research*, 150 (1-3), 51-96. <https://doi.org/10.1007/s11120-020-00768-1>
- Shah, K., & Nongkynrih, J. M. (2007). Metal hyperaccumulation and bioremediation. *Biologia Plantarum*, 51(4), 618-634. <https://doi.org/10.1007/s10535-007-0134-5>
- Shah, V., & Daverey, A. (2020). Phytoremediation: A multidisciplinary approach to clean up heavy metal contaminated soil. *Environmental Technology And Innovation*, 18, 100774. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.100774>
- Shakoor, M. B., Ali, S., Hameed, A., Farid, M., Hussain, S., Yasmeen, T., Ullah, N., Bharwana, S. A., & Abbasi, G. H. (2014). Citric acid improves lead (pb) phytoextraction in *brassica napus* L. by mitigating pb-induced morphological and biochemical damages. *Ecotoxicology And Environmental Safety*, 109, 38-47. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.07.033>
- Sheoran, V., Sheoran, A. S., & Poonia, P. (2009). Phytomining: A review. *Minerals Engineering*, 22(12), 1007-1019. <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2009.04.001>
- Sigma-Aldrich (2024). Tiosulfato de amonio. Ficha de datos de seguridad. <https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/sds/sigma/a3678?userType=undefined>
- Silva, E. H., García-Martínez, I., Brioproductos, G., & González, H. (2016). Brasinoesteroides en la agricultura. I. Brassinosteroids in agriculture. I. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, 7(2). <https://www.redalyc.org/pdf/2631/263145278018.pdf>
- Siromlya, T. I., & Zagurskaya, Y. V. (2022). Problems in the Study of the Accumulation and Hyperaccumulation of Chemical Elements by Plants. *Biology Bulletin Reviews*, 12(3), 334-345. <https://doi.org/10.1134/s2079086422030082>
- Inventario Español de los Conocimientos Tradicionales relativos a la Biodiversidad* (IECTB). (s. f.). Ministerio Para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico. <https://www.miteco.gob.es/es/biodiversidad/temas/inventarios-nacionales/inventario->

espanol-de-los-conocimientos-tradicionales/inventario_esp_conocimientos_tradicionales.html

- Ulcuango, C., & Medardo, S. (2017b). Respuesta del cultivo de linaza (*Linum usitatissimum* L.), a la aplicación de varios niveles de fertilización bajo tres sistemas de siembra en el cantón Cayambe provincia de Pichincha. <http://dspace.utb.edu.ec/handle/49000/3192>
- Wang, L., Ji, B., Hu, Y., Liu, R., & Sun, W. (2017). A review on in situ phytoremediation of mine tailings. *Chemosphere*, 184, 594-600. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.06.025>
- Wilson-Corral, V., Anderson, C., Rodríguez-López, M., Arenas-Vargas, M., & López-Pérez, J. (2011). Phytoextraction of gold and copper from mine tailings with *Helianthus annuus* L. and *Kalanchoe serrata* L. *Minerals Engineering*, 24(13), 1488-1494. <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2011.07.014>
- Wilson-Corral, V., Anderson, C., & Rodríguez-López, M. (2012). Gold phytomining. A review of the relevance of this technology to mineral extraction in the 21st century. *Journal Of Environmental Management*, 111, 249-257. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.07.037>
- Yadav, K. K., Gupta, N., Kumar, A., Reece, L. M., Singh, N., Rezaia, S., & Khan, S. (2018). Mechanistic understanding and holistic approach of phytoremediation: A review on application and future prospects. *Ecological Engineering*, 120, 274-298. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2018.05.039>

X Anexos

Anexo I

Tabla 11. Estudios sobre fitoextracción de Au y Ag (modificado de Dinh *et al.*, 2022).

Elementos	Plantas	Sustrato	Concentración obtenida	Referencias
Au	- <i>B. juncea</i> (mostaza india)	- Oro diseminado en arena: 5 mg Au kg ⁻¹ - Tratamiento: NH ₄ SCN 0, 80, 160, 320 y 640 mg kg ⁻¹	- Au en partes aéreas de las plantas: hasta 57 mg kg ⁻¹	(Anderson <i>et al.</i> , 1998)
Au	- <i>Brassica juncea</i> (mostaza india) y <i>Zea mays</i> (maíz) - Hiperacumulación inducida	- Montón de mineral oxidado: 0,6 mg Au kg ⁻¹ - Tratamiento: NaCN, KCN	Au en la planta (tratado por NaCN): - <i>Brassica juncea</i> : 39 mg kg ⁻¹ - <i>Zea mays</i> : 20 mg kg ⁻¹	(Anderson <i>et al.</i> , 2005)
Au y Ag	- Suelo artificial: 48 mg kg ⁻¹ Au y 31 mg kg ⁻¹ Agricultura - Tratamiento: KCN	- Suelo artificial: 48 mg kg ⁻¹ Au y 31 mg kg ⁻¹ Agricultura - Tratamiento: KCN	Concentración en planta: - Au: 760 mg kg ⁻¹ - Ag: 730 mg kg ⁻¹	(Haverkamp <i>et al.</i> , 2007)
Ag, Au	- Acumulación inducida - Tabaco - Hiperacumulación inducido	- Tratamiento: (NH ₄) ₂ S ₂ O ₃ (2 g kg ⁻¹), NaCN (1 g kg ⁻¹) - Relaves de cianuración: 1.03 mg kg ⁻¹ Au y 18,2 mg kg ⁻¹ Agricultura - Tratamiento: NaCN (0,05 g kg ⁻¹ de relaves)	Concentración en planta: - Au: 1,2 mg kg ⁻¹ - Ag: 54,3 mg kg ⁻¹	(Krisnayanti <i>et al.</i> , 2016)
Au, Ag	- <i>Brassica napus</i> (Colza) - Hiperacumulación inducida	- Relaves mineros: 0,5164 mg kg ⁻¹ Au y 22,1 mg kg ⁻¹ Agricultura - Tratamiento: NH ₄ SCN (1 g kg ⁻¹), (NH ₄) ₂ S ₂ O ₃ (2 g kg ⁻¹); inoculación de <i>Aspergillus niger</i> (hongo)	Concentración: - Au (tratado por NH ₄ SCN): en tallos 1,5 mg kg ⁻¹ ; en raíces 10 mg kg ⁻¹ - Ag (tratado por (NH ₄) ₂ S ₂ O ₃ e inoculados por el hongo <i>Aspergillus niger</i>): alrededor de 50.000; 30.000; 15.000 mg kg ⁻¹ en raíces, tallos y hojas respectivamente	(González-Valdez <i>et al.</i> , 2018)
Ag	- Plantas terrestres: <i>Euphorbia macroclada</i> (<i>euforbia</i>), <i>Verbascum cheiranthifolium</i> Boiss (planta con flor de gordolobo), <i>Astragalus gummifer</i> (leguminosa)	- Zona minera contaminada	Concentración máxima de Ag en la planta Spurge: - Ramita: 0,97 mg kg ⁻¹ - Raíz: 3,12 mg kg ⁻¹	(Sagiroglu <i>et al.</i> , 2006)
Au, Ag	- Acumulación natural - <i>Lupinus sp.</i> (altramuz azul) - Hiperacumulación inducida	- Relaves mineros de metales base - Tratamiento químico	- Mayor concentración de Ag: 1253 mg kg ⁻¹ - Concentración de Au: 6,3 mg kg ⁻¹ - Concentración Ag: 126 mg kg ⁻¹	(Anderson <i>et al.</i> , 2003)
Ag	- <i>Brassica juncea</i> (mostaza india) y <i>Medicago sativa</i> (alfalfa) - Acumulación artificial	- Sustrato acuoso: 500–10.000 mg kg ⁻¹ AgNO ₃	Ag en planta: - <i>Brassica juncea</i> : hasta 124.000 g kg ⁻¹ (12,4%) - <i>Medicago sativa</i> : hasta 136.000 g kg ⁻¹ (13,6%)	(Harris y Bali 2008)

Anexo II

Tabla 12. Principales especies hiperacumuladoras reportadas en 2012 (Modificado de Bhargava *et. al.*, 2012).

Metal	Hiperacumuladoras reportadas	Especies de plantas que acumulan metales específicos	Familia
Ni	320	<i>Berkheya coddii</i>	Asteraceae
		<i>Alyssum serpyllifolium</i> , <i>A. Bertolonii</i>	Brassicaceae
		<i>Sebertia acuminata</i>	Sapotaceae
		<i>Phidiasia lindavil</i>	Acanthaceae
Cu	34	<i>Bornmuellera kiyakii</i>	Brassicaceae
		<i>Ipomea alpina</i>	Convolvulaceae
		<i>Crassula helmsii</i>	Crassuaceae
Co	34	<i>Commelina communis</i>	Commelinaceae
		<i>Haumaniastrum robertii</i>	Lamiaceae
Se	20	<i>Crotalariaia cobalticola</i>	Fabaceae
		<i>Astragalus bisulcatus</i>	Fabaceae
Zn	18	<i>Stanleya pinnata</i>	Brassicaceae
		<i>Thlaspi caerulescens</i>	Brassicaceae
Pb	14	<i>Arabis gemmifera</i> , <i>A. paniculata</i>	Brassicaceae
		<i>Sedum alfredii</i>	Crassuaceae
		<i>Arabidopsis halleri</i>	Brassicaceae
		<i>Picris divaricata</i>	Asteraceae
Mn	9	<i>Sesbania drummondii</i>	Fabaceae
		<i>Hemidesmus indicus</i>	Apocynaceae
		<i>Arabis paniculata</i>	Brassicaceae
		<i>Plantago orbignyana</i>	Plantaginaceae
		<i>Austromyrtus bidwillii</i>	Myrtaceae
Cd	04	<i>Phytolacca americana</i>	Phytolaccaceae
		<i>Viotia neurophylla</i>	Proteaceae
		<i>Gossia bidwillii</i>	Myrtaceae
		<i>Maytenus founieri</i>	Celastraceae
Cr	-	<i>Thlaspi caerulescens</i>	Brassicaceae
		<i>Arabidopsis halleri</i>	Brassicaceae
		<i>Bidens pilosa</i>	Asteraceae
Tl	-	<i>Salsola kali</i>	Amaranthaceae
		<i>Leersia hexandra</i>	Poaceae
Tl	-	<i>Gynura pseudochina</i>	Asteraceae
		<i>Iberis intermedia</i>	Brassicaceae
		<i>Brassica oleracea</i>	Brassicaceae

Anexo III

Tabla 13. Principales genes transportadores de metales en diferentes plantas, también involucrados en la tolerancia y acumulación de metales pesados (Modificado de Bhargava *et al.*, 2012).

Familia	Gen	planta	Metal transportado
Transportador regulado por Zn (ZRT)	<i>zip1-12</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Zn
	<i>zip4</i>	<i>Oryza sativa</i>	Zn
	<i>zip</i>	<i>Medicago truncatula</i>	Zn
	<i>znt1-2</i>	<i>T. caerulescens</i>	Zn
Transportador regulado por Fe (IRT)	<i>irt1</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Fe
	<i>irt1-2</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Fe
	<i>irt1-2</i>	<i>T. caerulescens</i>	Fe
Resistencia natural- proteínas asociadas a macrófagos (NRAMP)	<i>nramp1- 3</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Fe
	<i>nramp4</i>	<i>Thlaspi japonicum</i>	Fe
	<i>nramp3</i>	<i>Malus baccata</i>	Fe
Facilitador de difusión de cationes (CDF)	<i>mtp1</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Zn
	<i>mtp1</i>	<i>Arabidopsis halleri</i>	Zn
	<i>mtp1</i>	<i>Thlaspi goesingense</i>	Zn, Ni
	<i>mtp1</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	Zn, Co
Transportador de malato activado por Al (ALMT)	<i>almt1</i>	<i>Triticum sp.</i>	Al
	<i>almt1</i>	<i>Secale cereale</i>	Al
Tipo P, ATPasa (Asociada a metales pesados)	<i>hma8</i>	<i>Glycine max</i>	Cu
	<i>hma9</i>	<i>Oryza sativa</i>	Cu, Zn, Cd
	<i>hma4</i>	<i>Arabidopsis halleri</i>	Cd
	<i>hma3</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Co, Zn, Cd, Pb
Nicotiamina sintasa (NAS)	<i>nas2, nas3</i>	<i>Arabidopsis halleri</i>	Zn
Transportador de cobre	<i>copt1</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Cu
Yellow Stripe Like (YSL)	<i>ysl2</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Fe, Cu
	<i>ysl3</i>	<i>T. caerulescens</i>	Fe, Ni

Anexo IV

Tabla 14. Algunos agentes quelantes utilizados en estudios de Fitorremediación. Modificado de Alkorta *et al.*, 2004.

Acrónimo: nombre completo
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético
NH ₄ SCN: tiocianato de amonio
(NH ₄) ₂ S ₂ O ₃ :tiosulfato de amonio
HEDTA: ácido N-hidroxi-etilendiamino triacético
DTPA: ácido dietilentriamino pentaacético
CDTA: trans-1,2-diaminociclohexano-N,N,N',norte'-tetraácidoacético
EGTA: etilenbis(oxietilentrinitrilo)- N,N,N',norte'-tetraácido acético
EDDHA: etilendiamina-di (o-ácido hidroxifenilacético)
HEIDA: ácido N-(2-hidroxi-etil)iminodiacético
EDDS: etilendiaminosuccinato
NTA: ácido nitrilotriacético
HBED: N,N-di(2-hidroxibencil)etilenamida N,N'-diácidoacético
Ácido cítrico
Ácido málico
