

EVALUACIÓN DE LA FITOTOXICIDAD DE JALES MINEROS EN CUATRO ESPECIES EMPLEADAS COMO BIOINDICADORAS DE METALES PESADOS

Dante CAMARILLO-RAVELO*, Martha BARAJAS-ACEVES y Refugio RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Avenida IPN 2508, San Pedro Zacatenco, C.P. 07300, México, D.F., México

*Autor para correspondencia: dante.camarillo@gmail.com

(Recibido septiembre 2013; aceptado diciembre 2014)

Palabras clave: *Lactuca sativa*, *Cucumis sativus*, *Brassica juncea*, *Nasturtium officinale*, índice de toxicidad

RESUMEN

Los desechos de las minas, se caracterizan por tener una amplia heterogeneidad en la composición química y física que puede alterar la respuesta de las plantas susceptibles de diferentes maneras. En este trabajo exploramos el efecto de los desechos de minas abandonados con pruebas de toxicidad para metales pesados. Cuatro especies de plántulas fueron cultivadas en extractos de seis jales mineros, con diferente capacidad para producir drenes ácidos de minas (DAM) y concentraciones de metales pesados (Pb, Zn, Cd y Cu). Los jales fueron modificados con o sin composta. La estimación de la toxicidad fue evaluada a través de la elongación radicular y el porcentaje de germinación sobre cuatro especies: *Lactuca sativa*, *Cucumis sativus*, *Brassica juncea* y *Nasturtium officinale*. El fenómeno de hormesis fue encontrado en el crecimiento de *B. juncea* en casi todos los jales con y sin composta y para *L. sativa* en sólo tres jales. Las especies *L. sativa* y *C. sativus* fueron más sensibles comparadas con *B. juncea* y *N. officinale*. El índice radicular fue la mejor alternativa para evaluar la fitotoxicidad de los jales mineros por sobre el cálculo del NOEL y LOEL que aportaron una evaluación cualitativa.

Key words: *Lactuca sativa*, *Cucumis sativus*, *Brassica juncea*, *Nasturtium officinale*, toxicity index

ABSTRACT

The mine tailings are characterized by a wide heterogeneity in physical and chemical composition that can alter the response of susceptible plants in different ways. In this work we explore the effect of abandoned mine waste on the toxicity of plant test for heavy metal. Four seedlings species were grown on extracts from six mine tailing samples with different capacity of producing acid mine drainage (AMD) and heavy metal concentrations (Pb, Zn and Cu). The mine tailings were amended with or without compost. Root elongation and germination rate were used as indicators to assess phytotoxicity on four species: *Lactuca sativa*, *Cucumis sativus*, *Brassica juncea* and *Nasturtium officinale*. Hormesis was found in *B. juncea* growth in almost all the mine tailings with or without compost and in *L. sativa* in only three mine tailings. The most sensitive species were *L. sativa* and *C. sativus*, compared to *B. juncea* and *N. officinale*. Root index was the best alternative to assess the phytotoxicity of mine tailings even above the calculation of NOEL and LOEL, which provided a qualitative evaluation.

INTRODUCCIÓN

El impacto global de cada sitio de disposición de residuos mineros o jales es enorme, tan sólo en México se estima una producción de 2000 millones de toneladas anuales (INECC 2012). Un sitio minero no rescatado generalmente permanece sin vegetación entre decenas y cientos de años, por lo que los jales expuestos pueden dispersarse sobre decenas de hectáreas por erosión eólica y/o hídrica, con el potencial de contaminar comunidades cercanas y áreas ambientales sensibles (Carrillo-González y González-Chávez 2006, Méndez y Maier 2008). El establecimiento de plantas vegetales en dichos jales es impedido por numerosos factores fisicoquímicos, entre los que se incluyen el drenaje ácido de minas (DAM), temperaturas extremas, especialmente en la superficie de los jales, baja precipitación y fuertes vientos. Estos factores, asociados a la alta evaporación y a la baja infiltración de agua, contribuyen al desarrollo de altas concentraciones de sal con valores mayores a 22 mS/cm (Munshover 1994, Hesketh *et al.* 2010, Martínez-Pagán *et al.* 2011).

Algunos investigadores han reportado el uso de composta adicionada a jales, ya que ésta libera nutrientes principales lentamente a las plantas, como N, P y K, así como una amplia proporción de nutrientes secundarios, micronutrientes y materia orgánica, con lo que se mejora el crecimiento de las plantas. Las aplicaciones de materia orgánica, tales como compostas pueden también mejorar la retención de agua y el contenido de nutrientes en el suelo, además de reducir la erosión y las fluctuaciones de pH (de-Bashan *et al.* 2010, Solís-Domínguez *et al.* 2011, Weindorf *et al.* 2011).

Por otra parte, los criterios de factibilidad para seleccionar pruebas biológicas en laboratorio y realizar una evaluación toxicológica son: 1) su bajo costo, 2) materiales y reactivos disponibles en la localidad, 3) el tiempo máximo de desarrollo no debe exceder los cinco días, 4) el procedimiento de la prueba debe ser simple y 5) la evaluación de la respuesta debe de ser fácil de medir (Castillo 2004). Los ensayos toxicológicos intercalibrados para agua emplean entre otros bioindicadores a *Daphnia magna*, *Allium cepa*, *Hydra attenuata*, *Selenastrum capricornutum*, semillas de lechuga o peces. Los ensayos dirigidos a suelos utilizan a la lombriz de tierra (*Eisenia andrei*, *Eisenia foetida*), la elongación radicular en semillas como *Allium cepa* y *Glycine max* o los ensayos del metabolismo microbiano (Castillo 2004).

En el caso de los ensayos toxicológicos para evaluar la toxicidad por metales, generalmente se evalúa

el efecto individual del metal sobre diferentes bioindicadores (Schultz y Joutti 2007, Villatoro-Pulido *et al.* 2009, Charles *et al.* 2011). Esta evaluación es considerada como parcial, ya que en el ambiente estos receptores no están expuestos a un metal individual pero sí a una mezcla de diferentes contaminantes, por lo que se han desarrollado alternativas para evaluar globalmente la toxicidad (Tiquia y Tam 1998, Charles *et al.* 2011). La evaluación de la toxicidad por metales pesados es fácilmente observada a través de la respuesta de especies vegetales en su elongación radicular (Öncel *et al.* 2000, Di Salvatore *et al.* 2008, Soudek *et al.* 2010).

En la evaluación de la toxicidad es posible encontrar un aparente estímulo al crecimiento radicular respecto al testigo llamado hormesis (Stebbing 1982, Barbero *et al.* 2001). La hormesis es definida como una relación dosis-respuesta, en la cual hay una respuesta estimuladora a bajas dosis pero con una respuesta inhibitoria a altas dosis, lo que resulta en una curva dosis-respuesta en forma de U (Calabrese y Baldwin 2001).

Tomando en cuenta lo anterior, este trabajo analiza el efecto de diferentes desechos de minas en la germinación y elongación radicular de cuatro indicadores biológicos (*Lactuca sativa*, *Cucumis sativus*, *Brassica juncea* y *Nasturtium officinale*).

MATERIALES Y MÉTODOS

El efecto sobre los indicadores biológicos fue evaluado con diferentes índices de toxicidad, empleados en la estimación de fitotoxicidad: la germinación, la concentración más baja en la cual se observa efecto (LOEL, por sus siglas en inglés) y la concentración en la cual no se observa efecto (NOEL, por sus siglas en inglés), así como el índice de germinación (IG) y el índice radicular (IR, residual normalizado de la elongación radicular). Estos índices son parámetros útiles en la evaluación de riesgo de suelos (Tiquia y Tam 1998, Bagur-González *et al.* 2011).

Muestreo

Los jales empleados en este estudio formaron parte de un estudio exploratorio de la zona de Vegetación, Zacatecas. Se colectaron aleatoriamente a 2.5 km a la redonda del poblado (N 25°50'02.14, W 102°33'21.19") a donde se pudo tener acceso. Una vez localizada la presa de jales, se identificaron los peligros potenciales del lugar y con base en ello se procedió a tomar 6-7 muestras cada 2000 m². La colecta fue manual a 0-20 cm de profundidad y

etiquetados como $J_1, J_2 \dots J_N$. Para los fines de este estudio, del total de jales muestreados se escogieron seis representativos, *i.e.* con características físico-químicas similares, identificados como J_1, J_2, \dots, J_6 .

Composta

La composta empleada como modificador de los jales se compró en una granja orgánica en Texcoco, Estado de México. Por la concentración de metales pesados encontrados en la composta fue clasificada como tipo A, esto es: Pb y Cu > 100 mg/kg, Zn 200 mg/kg y Cd > 2 mg/kg (en base seca) y evolución de CO₂ o madurez > 8 mg C-CO₂/g de materia orgánica por día (NOCh 2005).

Caracterización de jales

Los jales se secaron al aire libre, posteriormente fueron disgregados, tamizados a través de una malla de 0.25 mm y refrigerados a 5 ± 2 °C hasta su uso final. Cuando fue requerido, los jales mineros se mezclaron con 10 % (peso seco) de composta, porcentaje seleccionado por razones económicas (Méndez *et al.* 2007, Solís-Domínguez *et al.* 2011).

El pH y la conductividad eléctrica (CE; jal:agua destilada = 1:5) se determinó por un instrumento Hanna pH/CE/TDS. El ensayo estático para predecir el DAM, se calculó como la relación entre el potencial de neutralización (PN) y el potencial de acidez (PA), PN/PA (Lawrence y Wang 1997). Los cationes intercambiables (Ca, K, Na y Mg) se midieron por espectrofotometría de absorción atómica (AAS, por sus siglas en inglés) después de su extracción con acetato de amonio a pH 7, agitado por 16 h y filtrado en Whatman No. 40. La proporción de absorción de Na, (SAR, por sus siglas en inglés) se calculó como:

$$SAR = \frac{[Na^+]}{\sqrt{\frac{([Ca^{2+}] + [Mg^{2+}])}{2}}}$$

El contenido total de Pb, Zn, Cd y Cu se determinó por AAS (Avanta M System 3000, GF 3000 S/N 10288) después de su digestión en microondas (MarsXpress). Submuestras de 0.2 g se pesaron en tubos de politetrafluoroetileno (PTFE) adicionando 10 mL de HNO₃ concentrado (CEM 2012). Estos análisis se hicieron de manera paralela con blancos de reactivos y estándares de calibración preparados con soluciones comerciales.

Dilución cero

Para el caso de la evaluación del jal sin dilución se emplearon cajas de Petri (100 × 15 mm), en donde

se depositaron 10 g de submuestra más 5 mL de agua destilada. Sobre esta mezcla se colocó una pieza de papel filtro Whatman No. 1. Finalmente sobre el papel filtro húmedo se colocaron 12 semillas (Barbero *et al.* 2001).

Extractos acuosos

Los extractos acuosos de jales y jales con composta se prepararon por agitación de 10 g de submuestra con 100 mL de agua destilada en frascos de extracción de polipropileno durante 1 h, (dilución 1:10). Con un procedimiento similar se preparó la dilución 1:1 (50 g de submuestra con 50 mL de agua destilada). Para ambas se empleó una agitadora horizontal y posteriormente fueron filtradas (Whatman No. 40).

Ensayos toxicológicos

Tres tratamientos (dilución cero, 1:10 y 1:1) de cada extracto de jales se emplearon para este estudio. Para los ensayos de germinación y elongación radicular se usaron semillas de lechuga (*Lactuca sativa* var. Buttercruch, ITSCO), semillas de pepino (*Cucumis sativus* var. Poinsett, Hortaflor), semillas de mostaza (*Brassica juncea* var. Amarilla) y semillas de berro (*Nasturtium officinale* var. Uplanel, Hortaflor). Las semillas se adquirieron en un mercado local. *L. sativa*, *C. sativus* y el género *Brassica* se encuentran entre las especies vegetales recomendadas por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de Norteamérica y la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económicos, para ensayos de toxicidad (OECD 2003). Por otro lado *Nasturtium officinale* ha sido empleada por otros autores para evaluar la respuesta biológica a herbicidas o metales (Duman *et al.* 2010, Ozturk *et al.* 2010).

Cada experimento se llevó a cabo en cajas de Petri (100 × 15 mm) sobre papel filtro (Whatman No. 1). Para el caso de la dilución cero se trabajaron directamente las cajas de Petri ya antes mencionadas. Para el caso de los extractos, se procedió como se indica a continuación: sobre cada disco de papel filtro se vertieron 3.5 mL de la dilución apropiada o agua destilada (testigo) y doce semillas, esta cantidad es referida a la semilla empleada de mayor tamaño, *i.e.* la de pepino (Tam y Tiquia 1994). Las cajas de Petri se envolvieron individualmente en bolsas de plástico con toallas de papel húmedo para minimizar la pérdida de agua y se colocaron en una cámara de germinación. Cada tratamiento se realizó por cuadruplicado. Las cajas de Petri con las semillas se mantuvieron por 120 h bajo condiciones de oscuridad a 20 ± 2 °C. Las semillas con una raíz mayor a 5 mm se registraron como semillas germinadas (EPA 1982).

Evaluación de la toxicidad

Después de las 120 h de incubación, los datos obtenidos se usaron para analizar la toxicidad a través de índices específicos: i) porcentaje de germinación, ii) ensayo de significancia o comparación de medias (NOEL y LOEL), iii) índice de germinación (IG) y iv) índice radicular (IR).

El porcentaje de germinación es la relación de semillas germinadas contra el total de semillas colocadas en el ensayo. Con respecto al ensayo de significancia, éste determina la más alta concentración de tóxicos (en jales) empleados en el bioensayo para lo cual, no hay significancia relativa con respecto al tratamiento testigo (NOEL) y la más baja concentración de tóxicos (en jales) empleados en el bioensayo que muestre una diferencia significativa relativa con respecto al tratamiento testigo (LOEL). En este caso, las más altas y las más bajas concentraciones consideran el efecto combinado de todos los elementos tóxicos presentes en el jal. El IG se obtuvo a través de la ecuación dada por Barbero *et al.* (2001): $IG (\%) = (G_{muestra} E_{muestra}) / (G_{testigo} E_{testigo}) \times 100$, donde $G_{muestra}$ y $E_{muestra}$ fueron las semillas

germinadas y la elongación radicular (mm) de la muestra, $G_{testigo}$ y $E_{testigo}$ corresponden a los valores del testigo. Se ha sugerido que un $IG \leq 80 \%$ indica un probable evento tóxico (Tiquia y Tam 1998, Barbero *et al.* 2001). Finalmente el IR es calculado por la ecuación: $(E_{muestra} - E_{testigo}) / (E_{testigo})$, representando la elongación residual normalizada de la raíz de semillas germinadas por tratamiento (Bagur-González *et al.* 2011). Los índices calculados pueden designar toxicidad por medio de la variación de sus valores.

Análisis estadístico

Se realizaron análisis de varianza (ANOVA, por sus siglas en inglés) y la media se comparó con una prueba de Tukey a un nivel de 5 % con el paquete SAS versión 9.0 (SAS 2002).

RESULTADOS

Caracterización química y física de jales

La caracterización química y física de los seis jales se puede observar en el **cuadro I**. Los valores

CUADRO I. CARACTERIZACIÓN FÍSICA Y QUÍMICA DE JALES MINEROS, VETAGRANDE, ZACATECAS, MÉXICO

Jal	pH	Cationes intercambiables (cmol/kg)				SAR
		Ca	K	Na	Mg	
J1	5.19	311.85	0.68	14.34	648.30	0.10
J2	6.31	272.16	0.29	3.59	210.00	0.05
J3	6.35	296.21	0.43	59.46	373.86	0.61
J4	6.61	347.34	0.32	22.64	423.53	0.20
J5	6.65	254.84	0.31	18.00	320.07	0.22
J6	6.33	321.13	0.57	117.22	420.65	1.07
Jal	CE (mS/cm)	Metales (mg/kg)				NP/NA
		Pb	Zn	Cd	Cu	
J1	18.18	473 459	27 393	239	296	0.02
J2	1.52	3 320	6 211	47	196	5.12
J3	1.60	2 228	38	71	348	1.93
J4	2.31	3 837	8 745	74	329	1.76
J5	2.35	3 534	3 311	32	281	0.92
J6	10.55	4 887	15 062	120	140	1.02
Límites máximos permisibles de metales pesados en lodos activados usados en agricultura (Europa)*		750-1200	2500-4000	20-40	1000-1750	

SAR, Proporción de absorción de Na; CE, conductividad eléctrica; PN, potencial de neutralización; PA, potencial de acidez. Cuando la proporción PN/PA < 1.2, los jales son considerados productores de drenes ácidos (DAM). * Ver DOCE (1986)

de pH en J4 y J5 fueron cercanos a la neutralidad, J2, J3 y J6 fueron ligeramente ácidos, mientras que J1 fue el que mostró la mayor acidez.

Con el fin de estimar la salinidad se analizaron valores de cationes intercambiables, los resultados mostraron grupos comunes. Los jales J1, J2, J4 y J5 expresaron valores medios de Na^+ de 2 % respecto al total de cationes analizados (excepto J2, con 0.8 %), mientras que J3 y J6 presentaron un 8 y 14 % respectivamente, estos valores comparados con recomendaciones para suelos (0-3 %) los cataloga como jales sódicos (Hazelton y Murphy 2007). Para K^+ el valor medio de todos los jales estudiados se encuentran en 0.06 %, los cuales son menores a las recomendaciones para suelos (2-5 %). Sin embargo para Mg^{2+} todos los jales indicaron valores mayores (media de 53 %) a las mismas recomendaciones señaladas por Hazelton y Murphy (10-20 %). Respecto a la relación $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, los jales muestran deficiencia por Ca^{2+} excepto para J2 (Hazelton y Murphy 2007).

Los valores de las concentraciones de Pb, Zn, Cd y Cu se muestran en el **cuadro I**. En J1 se determinó una mayor proporción de metales entre todos los jales analizados, en el que los niveles de Pb, Zn y Cd representan respectivamente 395, 7 y 6 veces el valor superior de los límites establecidos para todos activados usados en agricultura en Europa (DOCE 1986; 473 459 mg/kg, 27 393 mg/kg y 239 mg/kg respectivamente). El jal J6 fue el segundo con altos niveles de metales, representando en función de los límites antes mencionados, 4 veces para Pb y Zn y 3 veces para Cd (4 887 mg/kg, 15 062 mg/kg y 120 mg/kg respectivamente). Por otra parte ambos jales presentan altas concentraciones de sales con valores de CE de 10.5 y 18.5 mS/cm, respectivamente.

J2, J4 y J5 formaron un grupo similar en relación con el contenido de metales pesados, los valores promedio fueron: 3 564 mg/kg de Pb, 6 089 mg/kg de Zn, 246 mg/kg de Cu y en menor proporción el Cd con 51 mg/kg. Lo que representa para el Pb 3 veces más que el límite, 1.5 veces para el Zn y 1 vez para el Cd. El valor promedio de CE de estos jales fue de 1.9 mS/cm.

J3 mostró una menor concentración de metales respecto a todos los demás, únicamente Pb y Cd sobrepasaron los límites señalados en el **cuadro I**, con 2 y 0.08 veces, respectivamente. La CE también se encuentra entre los valores más bajos.

Finalmente, los valores de la relación NP/NA clasifican a J1, J5 y J6 como jales productores de drenes ácidos (NP/NA < 1.2).

Ensayos toxicológicos e índices de toxicidad

Los valores de elongación radicular en los testigos (**Cuadro II**), mostraron coeficientes de variación (CV) entre el 15 y el 23 % y entre el 16 y el 35 % en los diferentes ensayos con extractos de jales y sus tratamientos. En términos de la reducción o estimulación de la longitud radicular, todas las especies evidenciaron ser sensibles y mostraron un mismo patrón de comportamiento para cada jal estudiado. En todos los casos se pudo apreciar que no existió diferencia significativa entre jales y jales con composta en extractos no diluidos. Sin embargo, conforme se incrementó la dilución se diferenciaron estadísticamente. En los jales modificados se presentó una elongación radicular semejante o superior al testigo.

i) Porcentaje de germinación

N. officinale mostró en los testigos un porcentaje de germinación del 42 %, con el más alto coeficiente de variabilidad (112 %), razón por la que no se tomó en cuenta como especie útil en este estudio.

El promedio de germinación para las semillas de *L. sativa*, *B. juncea* y *C. sativus* se encontró entre el 85 y el 95 %, algunos promedios fueron superiores al mismo testigo. La estimación de la germinación en los distintos jales, no mostró diferencias significativas en cada uno de los materiales biológicos evaluados, excepto en la interacción con J1 ($P > 0.05$).

ii) Prueba de significancia

Los valores del NOEL en extractos no diluidos de jales sobre la elongación radicular (**Cuadro II**) fueron observados para *L. sativa* en J4 y JC5, para *B. juncea* en J4, mientras que para *C. sativus* en J5 (el menor valor en el que no existen diferencias significativas respecto al testigo). Los valores del LOEL para las mismas especies vegetales fueron observadas en JC4 para *L. sativa*, en J6 para *B. juncea* y en J3 para *C. sativus*, *i.e.* el mayor valor con diferencia significativa respecto al testigo. Los jales por debajo del valor del NOEL, fueron clasificados como los más tóxicos, mientras que los que están por encima del testigo sólo se consideraron con hormesis. Es importante destacar que para *B. juncea*, muchos de los ensayos derivaron en hormesis, por lo que el análisis de comparación de medias se reduce a unos cuantos tratamientos.

En extractos no diluidos la variación de la toxicidad se modificó cuando se comparó con los resultados anteriores, o en su caso presentaron una elongación superior a la que mostró el testigo. En *L. sativa*: J1, JC1 > J3, JC3, J6, JC6 > JC4 > J4, JC5 (J2, JC2 y J5 hormesis), *B. juncea*: J1, JC1 > J3 > J4, J6 > JC3,

CUADRO II. ELONGACIÓN RADICULAR (mm), DE TRES PLANTAS CRECIDAS EN DIFERENTES EXTRACTOS DE JALES MINEROS CON Y SIN COMPOSTA (10 % p/p).

Tratamiento	<i>L. sativa</i> Dilución			<i>B. juncea</i> Dilución			<i>C. sativus</i> Dilución		
	0	1:1	1:10	0	1:1	1:10	0	1:1	1:10
Testigo	45 ± 11	45 ± 11	45 ± 11	64 ± 19	64 ± 19	64 ± 19	47 ± 13	47 ± 13	47 ± 13
J1	4 ± 1*	6 ± 1*	8 ± 2*	5 ± 1*	4 ± 1*	27 ± 13 ^L	3 ± 1*	6 ± 3*	5 ± 3*
JC1	9 ± 3*	9 ± 1*	22 ± 7*	5 ± 2*	17 ± 6 ^L	61 ± 20 ^N	6 ± 2*	7 ± 2*	17 ± 6*
J2	48 ± 14 ^h	50 ± 8 ^h	47 ± 10 ^h	68 ± 20 ^h	75 ± 21 ^h	78 ± 26 ^h	59 ± 9 ^h	64 ± 8 ^h	59 ± 11 ^h
JC2	57 ± 8 ^h	49 ± 13 ^h	51 ± 11 ^h	94 ± 25 ^h	66 ± 21 ^h	69 ± 25 ^h	46 ± 10 ^{**}	40 ± 8 ^{**}	40 ± 8 ^{**}
J3	33 ± 5*	35 ± 5 ^L	38 ± 8 ^N	47 ± 13*	65 ± 15 ^h	78 ± 15 ^h	35 ± 7 ^L	45 ± 10 ^{**}	47 ± 7 ^{**}
JC3	34 ± 6*	31 ± 8*	43 ± 8 ^{**}	53 ± 15 ^{**}	57 ± 19 ^N	67 ± 19 ^h	24 ± 6*	31 ± 8 ^L	33 ± 8 ^L
J4	44 ± 11 ^N	50 ± 8 ^h	53 ± 12 ^h	54 ± 16 ^N	76 ± 23 ^h	81 ± 28 ^h	44 ± 8 ^{**}	38 ± 10 ^N	48 ± 10 ^h
JC4	38 ± 6 ^L	43 ± 9 ^N	41 ± 9 ^{**}	67 ± 15 ^h	67 ± 19 ^h	71 ± 18 ^h	31 ± 28*	43 ± 18 ^{**}	40 ± 8 ^N
J5	58 ± 10 ^h	49 ± 13 ^h	49 ± 12 ^h	81 ± 24 ^h	83 ± 33 ^h	64 ± 23 ^{**}	37 ± 15 ^N	44 ± 13 ^{**}	49 ± 10 ^h
JC5	44 ± 7 ^N	48 ± 6 ^h	50 ± 8 ^h	89 ± 23 ^h	76 ± 28 ^h	89 ± 27 ^h	40 ± 10 ^{**}	47 ± 9 ^{**}	46 ± 1 ^{**}
J6	34 ± 9*	35 ± 10 ^L	35 ± 10 ^L	50 ± 16 ^L	54 ± 16 ^{**}	68 ± 19 ^h	22 ± 6*	27 ± 7*	46 ± 9 ^{**}
JC6	35 ± 6*	37 ± 6*	35 ± 9 ^L	55 ± 17 ^{**}	50 ± 15 ^N	76 ± 20 ^h	25 ± 7*	36 ± 7 ^L	38 ± 7 ^L

Los números después de ± son la desviación estándar de los promedios de aproximadamente 48 réplicas (radículas), excepto los blancos que constaron de 336 aproximadamente. Promedios con un asterisco (*) son diferentes significativamente, mientras que dos asteriscos (**), no son diferentes de manera significativa (Tukey $P > 0.05$); h, hormesis; N, NOEL y L, LOEL

JC6 (J2, JC2, JC4 y J5, JC5 hormesis), mientras que en *C. sativus*: J1, JC1 > J6, JC6, JC3 > JC4, J3 > J5, JC5 > J4, JC2 (J2 hormesis). Cuando se observa el comportamiento en diluciones sucesivas, es común que los valores del NOEL y LOEL sean desplazados a tratamientos menos tóxicos, como en *L. Sativa*, en la que el desplazamiento se observa de J4 a JC4 y a J3, para *B. juncea* de J4 a JC3 y a JC1 y finalmente para *C. sativus* de J5 a J4 y a JC4.

iii) Índice de germinación (IG)

La reducción del IG (**Cuadro III**) puede ser apreciada sobre todas las especies ensayadas. La toxicidad de los extractos se presentó en el siguiente orden: J1 > J6 > J3. Sin embargo, puede apreciarse una mayor variación entre los tratamientos con *L. sativa* y *C. sativus* que con *B. juncea*. Esta última especie tuvo una menor sensibilidad a los distintos jales ensayados. A pesar de esto *B. juncea* ilustra

CUADRO III. ÍNDICE DE GERMINACIÓN (%) DE TRES ESPECIES DE PLANTAS CRECIDAS EN DIFERENTES JALES MINEROS CON COMPOSTA (JC) Y SIN COMPOSTA (J)

Tratamiento	<i>Lactuca sativa</i> Dilución			<i>Brassica juncea</i> Dilución			<i>Cucumis sativus</i> Dilución		
	0	1:1	1:10	0	1:1	1:10	0	1:1	1:10
J1	3	13	17	2	3	42	0	4	6
JC1	19	20	50	7	27	102	8	11	36
J2	105 h	114 h	106 h	104 h	119 h	125 h	128 h	137 h	128 h
JC2	126 h	110 h	126 h	154 h	106 h	113 h	95	85	85
J3	71	82	90	73	107	129 h	76	97	101
JC3	73	71	79	86	93	110 h	45	61	68
J4	97	113 h	119 h	87	121 h	130 h	92	81	104 h
JC4	93	100	98	102	110 h	121 h	58	93	85
J5	119 h	108 h	111 h	121 h	132 h	103	82	98	103 h
JC5	95	112 h	127 h	130 h	114 h	149 h	84	100	101
J6	62	69	88	75	87	108 h	44	60	97
JC6	82	87	85	81	80	124 h	50	78	85

h = hormesis

una influencia positiva que el uso de composta realiza en el crecimiento radicular, la cual se manifiesta en los incrementos de elongación radicular con respecto al testigo. Todos los experimentos mostraron una depresión importante del IG sobre J1, el cual cambia ligeramente al adicionar composta a los jales.

En cada arreglo de datos presentados en los cuadros II y III, puede observarse un aparente estímulo al crecimiento radicular con respecto al testigo, con valores de porcentaje de germinación mayores al 100 %. Este estímulo puede verse con mayor claridad en J2 y J5 en las tres especies ensayadas, especialmente en *L. sativa* y *B. juncea*. En estas dos especies este incremento en el IG es apreciado en todos los jales (excepto J1), sobre todo cuando el jal es modificado con composta. Este aparente estímulo al crecimiento radicular al ser comparado con el testigo es conocido como hormesis (Stebbing 1982, Calabrese y Baldwin 2001). Pueden existir excepciones en resultados de IG mayores al 100 % y no indicar hormesis, debido a que en el cálculo este valor es influenciado por una germinación superior a la del testigo.

iv) Índice radicular (IR)

Al tomar en cuenta los valores del IR del cuadro IV se observa que todos los jales sin dilución presentan una baja o moderada toxicidad excepto J1 y JIC, los cuales muestran una muy alta toxicidad y J6 que tiene una alta toxicidad sobre *C. sativus*.

Al prestar atención a los resultados cuando se han realizado diluciones en los tratamientos, puede observarse una migración de jales moderadamente tóxicos a jales con baja toxicidad (en relación con la concentración de metales pesados, la CE o la modificación del jal). Sin embargo, cuando un jal presenta hormesis, (IR > 0) y después se da una dilución sucesiva el jal implicado tiende a ser clasificado como no tóxico (ver comportamiento de J5 en *B. Juncea* (ver comportamiento de J5 en *B. juncea*, Cuadro IV).

Independientemente del índice usado (IG o IR), el análisis de correlación de Pearson mostró que existe una correlación positiva entre las variables que son predominantes en originar la toxicidad, esto es: pH, CE, Pb, Zn, Cd y PN/PA (Cuadro V).

DISCUSIÓN

Caracterización química y física

Con base en nuestros resultados, J1 es el jal que más problemas puede ocasionar al desarrollo de plantas, su toxicidad está en función de los altos valores de pH, CE y concentración de metales. Se ha reportado que el pH influye en la movilidad de los metales pesados y que valores por encima de 1.5 mS/cm afectan el crecimiento de las plantas (de Matos *et al.* 2001, Hazelton y Murphy 2007).

Los jales minero J1, J5 y J6 como productores de drenajes ácidos son los más tóxicos. Una causa probable de dicha toxicidad, es que en su composición

CUADRO IV. ÍNDICE RADICULAR (IR) DE TRES ESPECIES DE PLANTAS CRECIDAS EN DIFERENTES JALES MINEROS CON COMPOSTA Y SIN COMPOSTA

Tratamiento	<i>L. sativa</i> Dilución			<i>B. juncea</i> Dilución			<i>C. sativus</i> Dilución		
	0	1:1	1:10	0	1:1	1:10	0	1:1	1:10
J1	-0.91	-0.86	-0.83	-0.93	-0.94	-0.58	-0.93	-0.88	-0.90
JC1	-0.80	-0.80	-0.52	-0.92	-0.73	-0.05	-0.88	-0.84	-0.64
J2	0.05	0.11	0.03	0.07	0.17	0.22	0.25	0.37	0.25
JC2	0.26	0.10	0.14	0.47	0.03	0.08	-0.02	-0.15	-0.15
J3	-0.27	-0.22	-0.16	-0.27	0.02	0.21	-0.26	-0.03	0.01
JC3	-0.25	-0.31	-0.26	-0.18	-0.11	0.05	-0.48	-0.33	-0.29
J4	-0.03	0.11	0.16	-0.15	0.19	0.27	-0.05	-0.19	0.02
JC4	-0.15	-0.05	-0.09	0.05	0.05	0.11	-0.34	-0.09	-0.15
J5	0.28	0.08	0.09	0.27	0.29	0.00	-0.21	-0.05	0.05
JC5	-0.03	0.07	0.11	0.40	0.19	0.40	-0.15	0.00	-0.01
J6	-0.27	-0.22	-0.16	-0.21	-0.15	0.06	-0.52	-0.42	-0.01
JC6	-0.24	-0.19	-0.23	-0.13	-0.22	0.18	-0.47	-0.22	-0.18

Escala IR: 0 a -0.25 baja, -0.25 a -0.5 moderada, -0.5 a -0.75 alta y -0.75 a -1 muy alta toxicidad, valores de IR > 0 puede indicar estimulación al crecimiento (hormesis)

CUADRO V. COEFICIENTES DE CORRELACIÓN DE PEARSON ENTRE PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS Y PARÁMETROS RELACIONADOS A PLANTAS. JALES SIN COMPOSTA

<i>Lactuca sativa</i>						
	pH	EC	Pb	Zn	Cd	PN/PA
IG	0.91	-0.89	-0.87	-0.84	-0.96	0.75
IR	0.89	-0.84	-0.84	-0.79	-0.93	0.72
<i>Brassica juncea</i>						
	pH	EC	Pb	Zn	Cd	PN/PA
IG	0.85	-0.82	-0.83	-0.77	-0.91	0.68
IR	0.85	-0.79	-0.82	-0.76	-0.89	0.62
<i>Cucumis sativus</i>						
	pH	EC	Pb	Zn	Cd	PN/PA
IG	0.74	-0.89	-0.76	-0.77	-0.87	0.87
IR	0.73	-0.88	-0.75	-0.75	-0.85	0.88

Todos los valores de los coeficientes de correlación son significativos a una probabilidad de 1 %

contengan minerales de azufre (la piritita y la pirrotita, principalmente) susceptibles a la oxidación, con lo que se liberan elementos tales como Al, As, Cd, Co, Cu, Hg, Ni, Pb y Zn en las escorrentías de aguas a través de los jales (de Matos *et al.* 2001, Placencia-Gómez *et al.* 2010).

Aunque es posible agrupar los jales en función del pH, de la CE o de jales productores de drenes ácidos, es preferible agruparlos de acuerdo con las concentraciones de metales pesados que presenten. Una concentración mayor de estos metales corresponderá a su vez a una mayor toxicidad, por ejemplo concentraciones de Pb, Cd y Zn $\leq 10\ 000$ mg/kg inhiben la respiración y los procesos de mineralización y de nitrificación (Kabata-Pendias y Pendias 2001). Con este criterio establecimos cuatro distintos grupos: J1 en un primer grupo, J2, J4 y J5 en un segundo grupo y finalmente J3 y J6.

Ensayos toxicológicos y parámetros de comparación

El reporte de porcentajes de germinación por encima del 80 %, para semillas de *Lactuca sativa*, *Brassica juncea* y *Cucumis sativus* independientemente de la toxicidad del jal, puede ser explicado al revisar los resultados de Di Salvatore *et al.* (2008), quienes reportan que cuando hay importantes concentraciones de metales en el sustrato, éstos pueden ser absorbidos por el tegumento, lo cual no afecta el crecimiento del embrión. Este parámetro usado para

medir el porcentaje de germinación, no necesariamente significa crecimiento por división celular. En contraste, por ser más sensible que la germinación, el efecto de inhibición por metales es observado en la elongación radicular (Öncel *et al.* 2000, Di Salvatore *et al.* 2008, Soudek *et al.* 2010).

Para analizar la toxicidad a un agente peligroso de forma individual, se emplea generalmente una prueba de comparación de medias en la que se identifican los valores NOEL y LOEL. En este caso no evaluamos una concentración en particular, pero sí la sensibilidad de los materiales biológicos ante un efecto tóxico ejercido por la acción combinada de todos los elementos nocivos en el jal. En este análisis, *B. juncea* mostró una menor sensibilidad ya que la mayoría de los tratamientos mostraron un estímulo al crecimiento en lugar de una posible afectación tóxica por lo que tuvimos pocos tratamientos para el análisis mencionado (**Cuadro II** y **III**). Esta diferencia encontrada respecto a los otros agentes biológicos puede ser debida a la capacidad de la planta para tolerar iones metálicos (Shilev *et al.* 2009).

La información que otorga la elongación radicular y su sensibilidad a cambios tóxicos se refleja en incrementos de talla, sobre todo cuando se agrega composta a los jales. Lo anterior debido a la conocida capacidad de la materia orgánica para inmovilizar metales (Peruzzi *et al.* 2011), haciéndola así menos tóxica.

El fenómeno de hormesis está presente también en todos los jales pero especialmente cuando existe una dilución sustancial. Es posible indicar que el estímulo al crecimiento de la raíz respecto al testigo es debido a que muchos elementos, tales como Cu y Zn son micronutrientes esenciales que a bajas concentraciones pueden estimular el crecimiento radicular, pero que son tóxicos a altas concentraciones (Poschenrieder *et al.* 2013). Sin embargo, estos jales tienen altas concentraciones de iones metálicos comparados con algunos medios de cultivo para plantas (como el Hoagland). Por otra parte, Di Salvatore *et al.* (2008) encontró que la concentración más baja para inhibir el crecimiento radicular en *L. sativa* fue 4 mg/L de Cu. En este trabajo encontramos que con el Zn a la concentración más baja (10 mg/L) se obtuvieron efectos inhibitorios en *L. sativa*. Posiblemente este fenómeno puede ser debido a la biodisponibilidad del metal, el cual previene la absorción por la planta dejando una pequeña porción disponible, o que este estímulo representa el primer signo de un disturbio para la elongación radicular, como

semillas que crecen rápidamente con el fin de diluir el tóxico en una masa mayor (Barbero *et al.* 2001, Sobrero y Ronco 2004).

En el **cuadro V** se presentan los coeficientes de correlación de los índices (IG e IR) respecto a las variables de toxicidad analizadas en los jales.

CONCLUSIONES

La toxicidad de los jales estudiados muestra una relación directa con la concentración de algunos metales, con la CE y con la generación de acidez. La toxicidad se redujo al adicionar composta en dichos jales.

Lactuca sativa y *Cucumis sativus* mostraron una mejor sensibilidad con relación a la germinación y a la elongación radicular ante los diferentes jales, no así *Brassica juncea*, debido a su tolerancia a iones metálicos. *Nasturtium officinale* mostró un porcentaje de germinación escaso, con el más alto coeficiente de variabilidad (112 %), aspecto que imposibilitó su empleo.

El IG y el IR, ofrecen información muy similar entre sí. Sin embargo el IG al tomar en cuenta el valor de germinación, pudiera sesgar el resultado sobre un crecimiento que no existe. Los índices calculados para IR, en presencia de niveles de toxicidad son una buena alternativa en la evaluación de la fitotoxicidad.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue apoyado por el Fondo Mixto Zac-07-COI-82037. Dante Camarillo agradece al Consejo Nacional de Ciencia y tecnología por el soporte financiero a través de una beca postdoctoral (44298). Los autores agradecen el soporte técnico otorgado por Haydée Ruiz Montaña. De igual manera los autores agradecen la aportación de revisores y editor por los comentarios que han enriquecido este documento.

REFERENCIAS

- Bagur-González M. G., Estepa-Molina C., Martín-Peinado F. y Morales-Ruano S. (2011). Toxicity assessment using *Lactuca sativa* L. bioassays of the metal (loid)s As, Cu, Mn, Pb and Zn in soluble-in-water saturated soil extracts from an abandoned mine site. *J. Soils Sediments* 11, 281-289.
- Barbero P., Beltrami M., Baudo R. y Rossi D. (2001). Assessment of Lake Orta sediments phytotoxicity after the liming treatment. *J. Limnol.* 60, 269-276.
- Calabrese E. J. y Baldwin L. A. (2001). The frequency of U-shaped dose responses in the toxicological literature. *Toxicol. Sci.* 62, 330-338.
- Carrillo-González R. y González-Chávez M. C. A. (2006). Metal accumulation in wild plants surrounding mining wastes. *Environ. Pollut.* 144, 84-92.
- Castillo M. G. (2004). Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua (IMTA), Jiupetec, Morelos, México, 202 pp.
- CEM (2012). Nota aplicativa para digestión ácida SW846-3051 (lodo, suelo, sedimento o aceite). CEM Corporation, E.U. Consultado el 20 de noviembre de 2014. [en línea]. <http://www.cem.com/mars6-resource-library.html>.
- Charles J., Sancey B., Morin-Crini N., Badot P. M., Degiorgi F., Trunflo G. y Crini G. (2011). Evaluation of the phytotoxicity of polycontaminated industrial effluents using the lettuce plant (*Lactuca sativa*) as a bioindicator. *Ecotox. Environ. Safe.* 74, 2057-2064.
- de-Bashan L. E., Hernández J. P., Nelson K. N., Bashan Y. y Maier R. M. (2010). Growth of quailbush in acidic, metalliferous desert mine tailings: Effect of *Azospirillum brasilense* Sp6 on biomass production and rhizosphere community structure. *Microb. Ecol.* 60, 915-927.
- de Matos A. T., Fontes M. P. F., da Costa L. M. y Martínez M. A. (2001). Mobility of heavy metals as related to soil chemical and mineralogical characteristics of Brazilian soils. *Environ. Pollut.* 111, 429-435.
- Di Salvatore M., Carafa A. M. y Carratù G. (2008). Assessment of heavy metals phytotoxicity using seed germination and root elongation tests: A comparison of two growth substrates. *Chemosphere* 73, 1461-1464.
- DOCE (1986). Directiva 86/278/CEE del Consejo de 12 de junio de 1986 relativa a la protección del medio ambiente y, en particular, de los suelos, en la utilización de los lodos de depuradora en agricultura. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas* No. L181/6 de 4 de julio de 1986. [en línea] <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=OJ:L:1986:181:FULL&from=EN>
- Duman F., Urey E., Temizgul R. y Bozok F. (2010). Biological responses of a non-target aquatic plant (*Nasturtium officinale*) to the herbicide, tribenuron-methyl. *Weed Biol. Manag.* 10, 81-90.
- EPA (1982). Seed germination / Root elongation toxicity test. EG-12, Office of toxic substances, United States Environmental Protection Agency. Washington D.C., EUA. 22 pp.

- Hazelton P. A. y Murphy B. W. (2007). Interpreting soil test results: what do all the numbers mean? CSIRO publishing, Australia, 160 pp.
- Hesketh A. H., Broadhurst J. L. y Harrison S. T. L. (2010). Mitigating the generation of acid mine drainage from copper sulphide tailings impoundments in perpetuity: A case study for an integrated management strategy. *Miner. Eng.* 23, 225-229.
- INECC (2012). Diagnóstico básico para la gestión integral de los residuos 2012, versión electrónica. Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Consultado el 9 de octubre de 2014. [en línea] <http://biblioteca.semarnat.gob.mx/Documentos/Ciga/libros2009/CD001408.pdf>.
- Kabata-Pendias A. y Pendias H. (2001). Elementos traza en suelos y plantas. 3a. Ed. CRC Press. Florida, EUA, 331 pp.
- Lawrence R. W. y Wang Y. (1997). Determination of Neutralization Potential in the Prediction of Acid Rock Drainage. Memorias de la Cuarta Conferencia Internacional sobre Drenaje Ácido de Minas. Vancouver, B.C. Canadá. 30 de mayo al 6 junio, pp. 15-30.
- Martínez-Pagán P., Faz A., Acosta J. A., Carmona D. M. y Martínez-Martínez S. (2011). A multidisciplinary study for mining landscape reclamation: A study case on two tailing ponds in the Region of Murcia (SE Spain). *Phys. Chem. Earth* 36, 1331-1334.
- Méndez O. M., Glenn E.P. y Maier M. R. (2007). Phytostabilization potential of Quailbush for mine tailings: growth, metal accumulation, and microbial community changes. *J Environ. Qual.* 36, 245-53.
- Méndez O. M. y Maier M. R. (2008). Phytostabilization of mine tailings in arid and semiarid environments –an emerging remediation technology. *Environ. Health Persp.* 116, 278-283.
- Munshower F. F. (1994). Practical Handbook of disturbed land revegetation. Lewis Publishing, Boca Raton, Florida, EUA, 288 pp.
- NOCh (2005). Norma Oficial de la República de Chile por Decreto Exento No. 89, NCh2880. Ministerio de Agricultura, publicado en el diario oficial del 22 de febrero de 2005. 23 pp.
- OECD (2003). Organization For Economic Cooperation and Development (OECD). Terrestrial Plants Test: 208: Seedling Emergence and Seedling Growth Test. Guideline For The Testing Of Chemicals Proposal For Updating Guideline 208. Consultado el 9 de marzo de 2015. [en línea] <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/33653757.pdf>.
- Öncel I., Keles Y. y Üstün A. S. (2000). Interactive effects of temperature and heavy metal stress on the growth and some biochemical compounds in wheat seedlings. *Environ. Pollut.* 107, 315-320.
- Oztuk F., Duman F., Leblebici Z. y Temizgyul R. (2010). Arsenic accumulation and biological responses of watercress (*Nasturtium officinale* R. Br.) exposed to arsenite. *Environ. Exp. Bot.* 69, 167-174.
- Peruzzi E., Masciandaro G, Macci C., Doni S., Mora-Ravelo S. G, Peruzzi P y Ceccanti B. (2011). Heavy metal fractionation and organic matter stabilization in sewage sludge treatment wetlands. *Ecol. Eng.* 37, 771-778.
- Placencia-Gómez E., Parviainen A., Hokkanen T. y Loukola-Ruskeeniemi K. (2010). Integrated geophysical and geochemical study on AMD generation at the Haveri Au-Cu mine tailings, SW Finland. *Environ. Earth Sci.* 61, 1435-1437.
- Poschenrieder C., Cabot C., Martos S., Gallego B. y Barceló J. (2013). Do toxic ions induce hormesis in plants? *Plant Science* 212, 15-25.
- SAS (2002). Guía del usuario: Estadística, Version 9.0, Statistical Analysis System, Institute Inc., Cary, EUA.
- Schultz E. y Joutti A. (2007). Arsenic Ecotoxicity in Soils (report). Geological Survey of Finland. Instituto Finlandés de Medio Ambiente. Consultado el 25 de noviembre de 2014. [en línea] <http://193.167.179.3/projects/ramas/reports/Ecotoxicology.pdf>.
- Shilev S., Benlloch M., Dios-Palomares R. y Sancho E. D. (2009). Phytoremediation of Metal-Contaminated Soil for Improving Food Safety. En: Predictive Modeling and Risk Assessment (R. Costa y K. Kristbergsson, Eds.). Springer Science and Business Media, LLC. Nueva York, EUA, pp. 225-242.
- Sobrero M. C. y Ronco A. (2004). Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.). En: Ensayos Toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas (G. Castillo, Ed.). IDRC-IMTA. México, D.F., pp. 71-80.
- Solís-Domínguez F. A., Valentín-Vargas A., Chorover J. y Maier R. M. (2011). Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on plant biomass and the rhizosphere microbial community structure of mesquite grown in acidic lead/zinc mine tailings. *Sci. Total Environ.* 409, 1009-1016.
- Soudek P., Katrušáková A., Sedláček L., Petrová Š., Kočí V., Maršík P., Griga M. y Vaněk T. (2010). Effect of heavy metals on inhibition of root elongation in 23 cultivars of flax (*Linum usitatissimum* L). *Arch. Environ. Con. Tox.* 59:194-203.
- Stebbing A. R. D. (1982). Hormesis-The stimulation of growth by low levels of inhibitors. *Sci. Total Environ.* 22, 213-234.
- Tam N.F.Y. y Tiquia S. (1994). Assessing toxicity of spent pig litter using a seed germination technique. *Resour. Conserv. Recy.* 11, 261-274.
- Tiquia S. M. y Tam N. F. Y. (1998). Elimination of phytotoxicity during co-composting spend pig-manure

- sawdust litter and pig sludge. *Bioresource Technol.* 65, 43-49.
- Villatoro-Pulido M., Font R., De Haro-Bravo M.I., Romero-Jiménez M., Anter J., De Haro-Bailón A., Alonso-Moraga A. y Del Rio-Celestino M. (2009). Modulation of genotoxicity and citotoxicity by radish grown in metal-contaminated soils. *Mutagenesis* 24, 51-57.
- Weindorf D. C., Muir J. P. y Landero-Sánchez C. (2011). Organic compost and manufactured fertilizers: economic and ecology. En: *Integrating agriculture, conservation and ecotourism: Examples from the field, Issues in Agroecology - Present status and future prospectus 1* (W. B. Campbell y S. López-Ortíz, Eds.). Springer Science and Business Media B.V. Nueva York, EUA, pp. 27-53.