



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN
CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE EDAFOLOGÍA

ENMIENDAS, BACTERIAS PROMOTORAS DEL
CRECIMIENTO VEGETAL Y *Ricinus communis* EN LA
ESTABILIZACIÓN DE ELEMENTOS POTENCIALMENTE
TÓXICOS

YAZMIN STEFANI PEREA VÉLEZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2014

La presente tesis titulada: ENMIENDAS, BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL Y *Ricinus communis* EN LA ESTABILIZACIÓN DE ELEMENTOS POTENCIALMENTE TÓXICOS realizada por la alumna Yazmín Stefani Perea Vélez bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS
EDAFOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO

Dra. Ma. del Carmen Ángeles González Chávez

ASESOR

Dr. Rogelio Carrillo González

ASESOR

Dr. Fernando Amílcar Solís Domínguez

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Noviembre de 2014

**ENMIENDAS, BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL Y
Ricinus communis EN LA ESTABILIZACIÓN DE ELEMENTOS
POTENCIALMENTE TÓXICOS
Yazmín Stefani Perea Vélez, MC
Colegio de Postgraduados, 2014**

La presente investigación se dividió en tres fases experimentales. La primera consistió en caracterizar bioquímicamente como bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV) a 82 cepas bacterianas aisladas de varios sustratos. Por sus relevantes características, las cepas Mc188 y N9 se propusieron como inoculantes para la última fase experimental. En la segunda etapa se evaluó la estabilización de elementos potencialmente tóxicos (EPT) como Cu, Zn, Cd y Pb en un residuo de mina por dos enmiendas orgánicas: estiércol ovino y vermicompost; y una enmienda inorgánica, perlita expandida. Vermicompost y estiércol ovino fueron efectivos para reducir la disponibilidad de Pb. En la tercera etapa se evaluó el efecto de estiércol ovino, vermicompost, K_2PO_4 , $CaCO_3$ y las BPCV en el establecimiento de *R. communis* en el residuo de mina y para estabilizar EPT. Las BPCV no tuvieron efecto sobre el crecimiento de *R. communis*; sin embargo, disminuyeron la absorción de Cd en follaje. Así mismo, las enmiendas y la inoculación bacteriana protegieron a *R. communis* de los efectos tóxicos de los EPT, ya que por una parte no se observaron signos visibles de toxicidad y el estrés oxidativo (malondialdehído y H_2O_2) fue significativamente menor en comparación con el tratamiento testigo. El sistema de fitorremediación *R. communis*-enmiendas-BPCV fue efectivo para estabilizar Pb y disminuir la solubilización de Zn.

Palabras clave: estiércol ovino, vermicompost, estrés oxidativo, elementos potencialmente tóxicos, malondialdehído.

AMENDMENTS, PLANT GROWTH PROMOTING BACTERIA AND *Ricinus communis* ON THE ESTABILIZATION OF POTENCIAL TOXIC ELEMENTS
Yazmín Stefani Perea Vélez, MC
Colegio de Postgraduados, 2014

This research was conducted in three experimental phases. In the first one, a collection of 82 strains isolated from different substrates was biochemically characterized as plant growth promoting bacteria (PGPB). For their relevant characteristics, the N9 and Mc188 strains were selected as inoculants for the last experimental study. In the second stage, the effect of two organic amendments (fresh sheep manure and vermicompost) and an inorganic amendment (expanded perlite) on the Cu, Zn, Cd and Pb stabilization was studied. The results showed that vermicompost and sheep manure were the best amendments to reduce the availability of Pb. In the third phase, the effect of sheep manure, vermicompost, K₂PO₄, CaCO₃ and PGPB on *R. communis* growth and stabilization of PTE in a mine waste were evaluated. No differences between PGPB and the application of amendments on the growth of *R. communis* were observed. However, the PGPB decreased the shoot uptake of Cd on *R. communis*. In addition, both amendments and PGPB protected to *R. communis* against the toxic effects of PTE. Visible toxicity symptoms were not observed and the concentration of H₂O₂ and malondialdehyde were lower in these both treatments than plants from the control treatment. The system of phytoremediation *R. communis*-amendments-PGPB was effective to stabilize Pb and decrease the solubilization of Zn.

Keywords: sheep manure, vermicompost, oxidative stress, potentially toxic element, malondialdehyde.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para realizar mis estudios de Maestría.

Al Colegio de Postgraduados y especialmente al Programa de Edafología por brindarme la oportunidad de crecer profesionalmente.

Al Área de Química por facilitar sus laboratorios e instalaciones para el desarrollo de esta investigación.

Agradezco profundamente el apoyo que se me brindo de manera incondicional por parte de los miembros de mi Consejo Particular en el desarrollo de la investigación y elaboración del manuscrito: Dra. Ma. del Carmen A. González Chávez, Dr. Rogelio Carrillo González y Dr. Fernando Amilcar Solís Domínguez.

Al M.C. Jaime Cruz Díaz por la asesoría técnica para realizar los análisis químicos. Y al C. Bibiano Ramírez Vega del laboratorio de Química de suelos y Ambiental por su apoyo técnico.

A todos mis profesores, compañeros, amigos y familia que de alguna manera me han acompañado hasta hoy, aun en la distancia.

DEDICATORIA

Con todo mi cariño y mi amor para las personas que hicieron todo en la vida para que yo pudiera lograr mis sueños, por motivarme y darme la mano cuando sentía que el camino se terminaba, a ustedes por siempre mi corazón y mi agradecimiento.

CONTENIDO

RESUMEN.....	ii
ABSTRACT.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
DEDICATORIA	v
CONTENIDO.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE CUADROS.....	xiv
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
OBJETIVO GENERAL.....	3
HIPÓTESIS GENERAL.....	3
CAPITULO I REVISIÓN DE LITERATURA	4
1.1. ¿Qué son las bacterias promotoras de crecimiento vegetal?	4
1.2. Fito-tecnologías para la remediación de suelos contaminados con elementos potencialmente tóxicos	5
1.2.1. Fitoestabilización asistida	7
1.3. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal en programas de fitoestabilización de residuos de mina.	10
1.4. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal y <i>Ricinus</i> <i>communis</i>	13
CONCLUSIONES	15
LITERATURA CITADA.....	16
CAPÍTULO II CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE BACTERIAS.....	25
RESUMEN	25
INTRODUCCIÓN	25
Solubilización de fósforo inorgánico.....	26
Producción de sideróforos.....	27
Producción de fitohormonas.....	28
OBJETIVO	28
MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
2.1. Microorganismos empleados	29
2.3. Determinación cualitativa de solubilización de fósforo inorgánico.....	29
2.4. Determinación cuantitativa de solubilización de fósforo inorgánico	30
2.5. Actividad de la fosfatasa acida y alcalina	31
2.6. Producción de sideróforos.....	31
2.7. Producción de ácido indolacético.....	32
2.8. Actividad de la 1-aminociclopropano-1-carboxilato desaminasa (ACC-desaminasa)	32
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33

2.9. Solubilización de fósforo inorgánico en medio líquido.....	34
2.10. Producción de sideróforos.....	35
2.11. Síntesis de ácido indolacético y ACC desaminasa	37
CONCLUSIONES	38
LITERATURA CITADA.....	38
CAPÍTULO III SELECCIÓN DE ENMIENDAS PARA LA ESTABILIZACIÓN DE ELEMENTOS POTENCIALMENTE TÓXICOS	45
RESUMEN	45
INTRODUCCIÓN	46
OBJETIVO	52
HIPÓTESIS	53
MATERIALES Y MÉTODOS.....	53
3.1. Caracterización del residuo de mina y enmiendas.....	53
3.1.1. Determinación de la textura	54
3.1.2. Determinación de pH y conductividad eléctrica	55
3.1.3. Contenido de materia orgánica procedimiento de Walkley y Black (1934).....	55
3.1.4. Contenido de materia orgánica por incineración.....	56
3.1.5. Nitrógeno total	57
3.1.6. Determinación de sulfatos solubles	58
3.1.7. Concentración total de elementos potencialmente tóxicos	58
3.1.8. Concentración total de S.....	59
3.1.9. Concentración extractable de elementos potencialmente tóxicos.....	59
3.1.10. Análisis cualitativo de enmiendas y residuo de mina en espectrofotometría infrarroja	60
3.1.11. Determinación de la capacidad de campo	60
3.2. Selección de enmienda	60
3.2.1. Experimento de equilibrio	60
3.2.2. Experimento de incubación.....	61
3.2.3. Análisis estadístico	62
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	62
3.3. Caracterización química de residuo de mina y enmiendas	62
3.4. Análisis cualitativo de enmiendas y residuo de mina en espectrofotometría infrarroja.....	66
3.5. Variación de la concentración de EPT al utilizar enmiendas orgánicas e inorgánicas en experimentos de equilibrio	71
3.5.1. Plomo	71
3.5.2. Cadmio	74
3.5.3. Cobre	75

3.5.4. Zinc.....	76
3.5.5. Arsénico.....	78
3.6. Variación de la concentración de EPT al utilizar enmiendas orgánicas e inorgánicas en experimentos de incubación.....	81
3.6.1. Plomo	81
3.6.2. Cadmio	86
3.6.3. Cobre.....	87
3.6.4. Zinc.....	88
CONCLUSIONES	90
LITERATURA CITADA	92
CAPÍTULO IV FITOESTABILIZACIÓN DE UN RESIDUO DE MINA ASISTIDA POR BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL Y ENMIENDAS.....	103
RESUMEN	103
INTRODUCCIÓN	104
OBJETIVO	105
HIPÓTESIS	106
MATERIALES Y MÉTODOS.....	106
4.1. Estabilización de EPT en el residuo de mina	106
4.1.1. Determinación de color	107
4.1.2. Determinación de la densidad aparente	107
4.1.3. Determinación de la densidad real	108
4.1.4. Volumen de poros.....	109
4.1.5. Resistencia a la penetración.....	109
4.1.6. Determinación de P disponible	109
4.1.7. Determinación de N inorgánico.....	110
4.2. Diseño de experimentos y análisis estadístico.....	111
4.3. Germinación de semillas de <i>Ricinus communis</i>	111
4.3.1. Selección de bacterias resistentes a antibióticos.....	112
4.3.2. Preparación del inóculo bacteriano.....	112
4.3.3. Germinación de semillas.....	113
4.4. Trasplante e inoculación de plántulas de <i>Ricinus communis</i> en residuo de mina	113
4.4.1. Preparación de las unidades experimentales	113
4.4.2. Trasplante de plántulas de <i>Ricinus communis</i>	114
4.5. Manejo en invernadero.....	114
4.5.1. Monitoreo de crecimiento de <i>Ricinus communis</i>	114
4.5.2. Determinación del contenido de clorofila relativa.....	115
4.6. Cosecha y evaluación	115
4.6.1. Evaluación de la actividad fotosintética	115
4.6.2. Altura de la planta y diámetro de tallo.....	115

4.6.3. Área foliar	115
4.6.4. Contenido de clorofila	115
4.6.5. Peroxidación de lípidos.....	116
4.6.6. Determinación del contenido de H ₂ O ₂	117
4.6.7. Longitud y volumen radical	117
4.6.8. Biomasa seca	118
4.6.9. Concentración de elementos potencialmente tóxicos en tejido vegetal.....	118
4.7. Evaluación de la colonización de <i>Ricinus communis</i> con bacterias promotoras del crecimiento vegetal.....	119
4.7.1. Tinción vital.....	119
4.7.2. Colonización de <i>Ricinus communis</i> por N9 y Mc188	119
4.8. Análisis del residuo minero	120
4.8.1. Concentración extractable-Ca(NO ₃) ₂ de elementos potencialmente tóxicos	120
4.8.2. Capacidad de producción de ácido indolacético de microorganismos nativos del residuo de mina y de la mezcla residuo de mina con enmiendas e inoculación bacteriana.....	121
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	121
4.9. Cinética de estabilización.....	121
4.9.1. Plomo	122
4.9.2. Cobre.....	124
4.9.3. Cadmio	126
4.9.4. Zinc.....	128
4.10. Propiedades fisicoquímicas del residuo minero después de aplicación de enmiendas	129
4.11. Contenido de EPT y propiedades químicas del sustrato al final del experimento	131
4.12. Capacidad de producción de ácido indolacético (AIA) por microorganismos nativos de residuo de mina y mezcla residuo de mina con enmienda e inoculación bacteriana	135
4.13. Promoción de <i>Ricinus communis</i> en residuo minero por efecto de bacterias promotoras del crecimiento vegetal y enmiendas	136
4.14. Contenido de elementos potencialmente tóxicos en <i>Ricinus communis</i>	140
4.15. Actividad fotosintética, contenido de clorofilas y estrés oxidativo	146
4.16. Evaluación de la colonización de <i>Ricinus communis</i> con bacterias promotoras del crecimiento vegetal.....	150
4.17. Análisis en espectroscopia de infrarrojo del sustrato después del experimento	152

CONCLUSIONES	154
LITERATURA CITADA	156
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES GENERALES	167
ANEXOS	170
Anexo I. Composición medio Pikovskaya.....	170
Anexo II. Curva de calibración para solubilización de P inorgánico por BPCV.....	170
Anexo III. Composición medio CAS (cromo azurol S).....	171
Anexo IV. Composición medio mineral con L-triptófano.....	172
Anexo V. Curva de calibración de ácido indolacético (AIA).....	173
Anexo VI. Composición medio líquido Pseudomonas F (BPF)	174
Anexo VII-1. Composición de medio mineral SM	174
Anexo VII-2. Composición medio mínimo mineral (SMN)	175
Anexo VIII. Curva de calibración para determinar la actividad de la enzima ACC-desaminasa	175
Anexo IX-1. Composición de solución mezcla de ácido sulfúrico- ácido salicílico.....	176
Anexo IX-2. Composición mezcla digestora.....	176
Anexo X. Solución acondicionadora para sulfatos	176
Anexo XI. Curva de calibración para determinación de sulfatos solubles en residuo de mina	176
Anexo XII. Curva de calibración para determinación de azufre total.....	177
Anexo XIII. Curva de calibración para fósforo disponible (Olsen).	177
Anexo XIV. Gráficos de cinética de temperatura e intensidad luminosa	178
Anexo XV. Curva de calibración para determinación de concentración de H ₂ O ₂ en tejido vegetal	179
Anexo XVI. Composición del reactivo succinato deshidrogenasa (SDH).....	179
Anexo XVII. Curva de calibración para determinación de ácido indolacético (AIA) producido por microorganismos nativos del residuo de mina y mezcla de residuo con emiendas	179
Anexo XVIII-1. Cuadro de análisis de medidas repetidas para cinética de altura de <i>Ricinus communis</i>	180
Anexo XVIII-2. Cuadro de análisis de medidas repetidas para cinética de clorofila relativa de <i>Ricinus communis</i>	181
Anexo XIX. Productos de la tesis	181

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos implicados en la fitorremediación.	7
Figura 2. Las funciones de las enmiendas y las plantas en la aplicación de enmiendas de suelos contaminados con EPT.	8
Figura 3. Mecanismos de promoción de crecimiento de bacterias promotoras de crecimiento vegetal (BPCV) en sustratos contaminados con elementos potencialmente tóxicos.	11
Figura 4. Solubilización de P inorgánico prueba cualitativa.	30
Figura 5. Producción de sideróforos.	31
Figura 6. Solubilización de P inorgánico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) en medio líquido Pikovskaya y variación del pH del medio.	34
Figura 7. a) Ubicación del Residuo de mina Santa María en el distrito minero de Zimapan, Hidalgo, b) detalle del depósito Santa María.	54
Figura 8. Población cercana al residuo de mina Santa María del distrito minero de Zimapan, Hidalgo.	65
Figura 9. Espectro de absorción en infrarrojo de perlita expandida.	67
Figura 10. Espectro de absorción en infrarrojo de vermicompost.	68
Figura 11. Espectro de absorción en infrarrojo de estiércol ovino.	69
Figura 12. Espectro de absorción en infrarrojo de residuo de mina.	70
Figura 13. Concentración de Pb en solución extractante de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ en el residuo de mina (RM) y en función de los tratamientos: vermicompost (V), estiércol ovino (E) y perlita expandida (PE).	72
Figura 14. Variación del pH en el equilibrio en función de los tratamientos: vermicompost, estiércol ovino y perlita expandida.	73
Figura 15. Concentración de Cd en solución extractante de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ en función de los tratamientos: residuo de mina (RM), vermicompost (V), estiércol ovino (E) y perlita expandida (PE).	74
Figura 16. Concentración de Cu en la solución extractante de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ en el residuo de mina (RM) y en función de los tratamientos: vermicompost (V), estiércol ovino (E) y perlita expandida (PE).	76
Figura 17. Concentración de Zn en la solución extractante de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ en el residuo de mina (RM) en función de los tratamientos: vermicompost (V), estiércol ovino (E) y perlita expandida (PE).	77
Figura 18. Concentración de As en la solución extractante de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ en el residuo de mina (RM) y en función de los tratamientos: vermicompost (V), estiércol ovino (E) y perlita expandida (PE).	79

Figura 19. Variación de la conductividad eléctrica en función de los tratamientos: vermicompost, estiércol ovino y perlita expandida.....	80
Figura 20. Concentración de Pb extractable con DTPA en el residuo de mina (RM) y en función de los tratamientos: vermicompost (V), estiércol ovino (E) y perlita expandida (PE).....	81
Figura 21. Variación del pH en el equilibrio en función de los tratamientos: vermicompost, estiércol ovino y perlita expandida.....	83
Figura 22. Espectro en infrarrojo de residuo de mina y de los tratamientos a) estiércol ovino y b) vermicompost a diferentes dosis.....	85
Figura 23. Concentración de Cd extractable con DTPA en el residuo de mina (RM) en función de los tratamientos: vermicompost (V), estiércol ovino (E) y perlita expandida (PE).....	87
Figura 24. Concentración de Cu extractable con DTPA en el residuo de mina (RM) y en función de los tratamientos: vermicompost (V), estiércol ovino (E) y perlita expandida (PE).....	88
Figura 25. Concentración de Zn extractable con DTPA en el residuo de mina (RM) y en función de los tratamientos: vermicompost (V), estiércol ovino (E) y perlita expandida (PE).....	89
Figura 26. Cinética de estabilización de Pb por la adición de estiércol ovino (E), cal (CaCO_3), fosfato (K_2HPO_4) y vermicompost (V) en un residuo de mina (RM).	123
Figura 27. Cinética de estabilización de Cu por la adición de estiércol ovino (E), cal (CaCO_3), fosfato (K_2HPO_4) y vermicompost (V) en un residuo de mina (RM).	124
Figura 28. Cinética de pH por la adición de estiércol ovino (E), cal (CaCO_3), fosfato (K_2HPO_4) y vermicompost (V) en un residuo de mina (RM).....	125
Figura 29. Cinética de estabilización de Cd por la adición de estiércol ovino (E), cal (CaCO_3), fosfato (K_2HPO_4) y vermicompost (V) en un residuo de mina (RM).	127
Figura 30. Cinética de CE por la adición de estiércol ovino (E), cal (CaCO_3), fosfato (K_2HPO_4) y vermicompost (V) en un residuo de mina (RM).....	128
Figura 31. Cinética de estabilización de Zn por la adición de estiércol ovino (E), cal (CaCO_3), fosfato (K_2HPO_4) y vermicompost (V) en un residuo de mina (RM).	129
Figura 32. Capacidad de producción de ácido indolacético de los microorganismos nativos en función de los diferentes	

tratamientos: Residuo de mina (RM), enmiendas (RM+E), e inoculación bacteriana (RM+E+N9, RM+E+Mc188).	136
Figura 33. a) Cinética de emergencia y de b) crecimiento de <i>R. communis</i> en función de los tratamientos: residuo de mina (RM), adición de enmiendas (RM+E) y enmiendas con inoculación bacteriana (RM+E+N9, Mc188).	138
Figura 34. Síntomas visibles de toxicidad en hojas de <i>R. communis</i> en el tratamiento testigo (RM, residuo de mina).	140
Figura 35. Factor de bioacumulación en a) parte aérea y b) de <i>R. communis</i> , y c) factor de translocación en función de los tratamientos: residuo de mina (RM), aplicación de enmiendas (RM+E) e inoculación bacteriana (RM+E+N9, Mc188).	144
Figura.36. Absorción total de EPT en <i>R. communis</i> en función de los tratamientos: residuo de mina (RM), adición de enmiendas (RM+E), e inoculación bacteriana (RM+E+N9, Mc188).	145
Figura 37. Cinética de índice de clorofila relativa de <i>R. communis</i> en función de los tratamientos: residuo de mina (RM), adición de enmiendas (RM+E) e inoculación bacteriana (RM+E+N9, Mc188).	147
Figura 38. a) Contenido de clorofilas, b) fotosíntesis neta (Pn), c) concentración de malondialdehído (MDA) y d) Peroxido de hidrogeno (H ₂ O ₂) en plantas de <i>R. communis</i> en función de los tratamientos: residuo de mina (RM), aplicación de enmiendas (RM+E) y aplicación de enmiendas en conjunto con BPCV (RM+E+N9 y RM+E+Mc188).	149
Figura 39. Bacterias adheridas en raíces de <i>R. communis</i>	151
Figura 40. Espectros en infrarrojo de sustrato antes y después del experimento en función de los tratamientos.	153

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Ejemplos de estudios de fitorremediación asistida con microorganismos para remediar suelos contaminados con EPT.....	13
Cuadro 2. Propiedades bioquímicas relacionadas con la promoción del crecimiento vegetal de cepas aisladas de rizósfera y rizoplano de plantas establecidas en presas de jales del distrito minero de Zimapan, Hidalgo.	36
Cuadro 3. Enmiendas propuestas para la inmovilización <i>in situ</i> de EPT	47
Cuadro 4. Enmiendas orgánicas para la inmovilización de EPT	48
Cuadro 5. Propiedades químicas de residuo de mina y enmiendas.....	63
Cuadro 6. Concentración total de elementos potencialmente tóxicos en residuo de mina y enmiendas.....	64
Cuadro 7. Concentración extractable con DTPA de elementos potencialmente tóxicos en residuo de mina y enmiendas.....	66
Cuadro 8. Coeficientes de correlación de Pearson entre elementos potencialmente tóxicos y pH.....	76
Cuadro 9. Correlaciones de Pearson entre Cu y las variables de pH, CE y Cd.....	126
Cuadro 10. Propiedades físicas del residuo minero y del residuo minero mezclado con enmienda.....	130
Cuadro 11. Propiedades químicas del residuo de mina (RM) y la mezcla residuo de mina con enmienda (RM+E) e inoculación bacteriana (RM+E+N9, Mc188) antes y después del experimento en invernadero.....	133
Cuadro 12. Concentración extractable en DTPA-TEA-CaCl ₂ de EPT en residuo de mina antes y después del establecimiento de <i>R. communis</i> en invernadero.	133
Cuadro 13. Concentración extractable de EPT con Ca(NO ₃) ₂ en residuo de mina después del establecimiento de <i>R. communis</i>	135
Cuadro 14. Variables de crecimiento de <i>R. communis</i> establecidas en residuo de mina y residuo de mina con enmienda e inoculación bacteriana y comparación de medias (Prueba de Tukey, $\alpha=0.05$) para dichas variables.....	139
Cuadro 15. Concentraciones de EPT en parte aérea y radical de <i>R. communis</i>	141

INTRODUCCIÓN GENERAL

La minería es una de las actividades económicas de mayor tradición en México, se practica desde la época prehispánica. Ésta se realiza principalmente en los estados del norte y en menor proporción en el centro del país. Los residuos producidos de dicha actividad usualmente se depositan a cielo abierto, en pilas de dimensiones variables. Estas pilas son denominadas coloquialmente como presas de jales o residuos de mina. Los lodos son materiales difíciles de eliminar, ya que contienen altas concentraciones de elementos potencialmente tóxicos (EPT) y por tanto pueden permanecer durante décadas en el suelo o los sitios de depósito, e incorporarse en la cadena trófica (Hernández-Acosta *et al.*, 2009; Pignattelli *et al.*, 2012).

Desde el punto de vista ambiental la primordial preocupación sobre estos residuos, es la migración de los EPT, favorecida por la oxidación que sufren, así como la generación de drenaje ácido. Aunado a lo anterior, el material que compone el residuo minero es fácilmente arrastrado por las corrientes eólicas, aumentando el riesgo a la salud de las poblaciones cercanas a los depósitos, por los aerosoles que se generan. Este material contiene partículas tipo PM_{10} y $PM_{2.5}$ que pueden inhalarse, llegar directamente a los pulmones y causar alteraciones en las células y daños a corto y largo plazo (Cortés Jiménez *et al.*, 2013).

Actualmente se dispone de una diversidad de tecnologías para la rehabilitación de suelos contaminados con EPT, que van desde métodos de ingeniería civil o química como por ejemplo la excavación, el lavado del suelo, los

tratamientos térmicos y eléctricos; hasta las biotecnologías que involucran el uso de microorganismos y plantas (González-Chávez, 2005).

La fitorremediación es una de las biotecnologías que surgió como alternativa amigable con el ambiente, para el tratamiento *in situ* de los suelos contaminados (Rajkumar *et al.*, 2009; Wenzel *et al.*, 2009). Introducir especies vegetales en los sitios contaminados con EPT, puede disminuir el riesgo de exposición vía eólica e hídrica. Dado que las plantas tienen la capacidad de inmovilizar a los EPT a través de la absorción en las raíces (Alkorta *et al.*, 2004; Dickinson *et al.*, 2009).

No obstante, como parte de un esfuerzo para aumentar la eficiencia de esta tecnología, se propone utilizar la diversidad bacteriana en conjunto con las plantas (Rajkumar *et al.*, 2012; Wenzel *et al.*, 2009). La asociación de plantas con microorganismos mejora la eficiencia de la fitorremediación, debido a que los microorganismos son capaces de alterar la biodisponibilidad de los EPT (Glick, 2010; Kidd *et al.*, 2009). Además, esta asociación incrementa tanto la tolerancia de las plantas a los EPT como la producción de la biomasa (Denton, 2007; Rajkumar *et al.*, 2012) a través de metabolitos como ácido indolacético (AIA), los sideróforos y algunos ácidos orgánicos; así como enzimas que alteran los niveles de hormonas en las plantas.

Por consiguiente, descubrir cepas bacterianas capaces de sintetizar dichos metabolitos abre áreas de oportunidad prometedoras en el campo de la fitorremediación (de-Bashan *et al.*, 2010; Rajkumar *et al.*, 2012). Sin embargo, se requiere de mejor comprensión de los procesos en la rizósfera, lo cual ayudará a trasladar los resultados obtenidos en experimentos a nivel invernadero, a la complejidad y heterogeneidad del campo y, al mismo tiempo, mejorar la eficiencia y

el éxito de la fitorremediación (Compant *et al.*, 2010; Kavamura y Esposito, 2010; Wenzel *et al.*, 2009).

Finalmente en los últimos años, varios autores sugieren cultivar plantas con uso para la generación de bioenergía en sustratos contaminados con EPT (Ruiz-Olivares *et al.*, 2013; González-Chávez *et al.*, 2014). El uso de *Ricinus communis* en procesos de fitoestabilización ofrece una ventaja doble. Por una parte se mejora la calidad del suelo a través de la estabilización de los EPT, y por otra, se da un nuevo valor económico a los suelos contaminados, debido a que se puede usar la biomasa de *R. communis* en la industria de combustibles (Rajkumar y Freitas, 2008b; Ruiz-Olivares *et al.*, 2013). Por lo antes expuesto, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV) y enmiendas en el crecimiento y establecimiento de *R. communis* en un residuo de mina para la estabilización de EPT.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de bacterias promotoras del crecimiento vegetal y enmiendas sobre el crecimiento y establecimiento de *R. communis* en un residuo de mina para la estabilización de elementos potencialmente tóxicos.

HIPÓTESIS GENERAL

La inoculación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal y el uso de enmiendas estimula el crecimiento de *R. communis* en un residuo de mina en condiciones de invernadero

CAPITULO I

REVISIÓN DE LITERATURA

1.1. ¿Qué son las bacterias promotoras de crecimiento vegetal?

Son cepas bacterianas con potencial para influir de manera positiva en el crecimiento y rendimiento de la planta (Glick, 2003). Estas cepas son capaces de colonizar la raíz y sobrevivir en presencia de los microorganismos nativos del suelo (Bakker *et al.*, 2007; Gamalero *et al.*, 2009; Zhuang *et al.*, 2007).

La promoción de crecimiento de plantas por parte de las bacterias sucede a través de dos vías: de forma directa e indirecta. La primera se refiere a que las bacterias pueden estimular el crecimiento de la planta mediante la síntesis de metabolitos (Zhuang *et al.*, 2007) como el ácido indolacético (AIA), giberelinas y citoquininas (Ahemad y Kibret, 2014; Joseph *et al.*, 2007). O pueden alterar la concentración de etileno en la planta (Joseph *et al.*, 2007) a través de la enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminasa (Arshad *et al.*, 2007; Meldau *et al.*, 2012). La cual metaboliza al precursor del etileno en ácido alfa cetobutírico y amoníaco (Gamalero *et al.*, 2009; Kuffner *et al.*, 2008; Turan *et al.*, 2012; Wenzel, 2009; Weyens *et al.*, 2009; Zhuang *et al.*, 2007). También las BPCV pueden suministrar nutrientes que no se encuentran disponibles en el suelo, estos incluyen N, P y Fe (Gamalero y Glick, 2011; Meldau *et al.*, 2012).

La promoción de forma indirecta, se refiere a que las BPCV pueden actuar como agente de control biológico. A través de la competencia por espacio o sustrato con otros microorganismos, mediante la síntesis de compuestos químicos inhibitorios

(Glick, 2003; Saharan y Nehra, 2011), como el HCN, amoníaco y antibióticos (Compant *et al.*, 2005; Saharan y Nehra, 2011; Weyens *et al.*, 2009). Mientras que los sideróforos no solo proporcionan Fe a la planta, sino también funcionan para privar de este elemento esencial a los organismos fitopatógenos (Compant *et al.*, 2005).

Algunas plantas, al asociarse con bacterias, producen enzimas hidrolíticas que causan la lisis de la pared celular de organismos patógenos, por tanto, estas enzimas pueden funcionar para controlar patógenos fúngicos (Weyens *et al.*, 2009). En adición, algunas BPCV provocan cambios físicos o químicos relacionados con la defensa de las plantas; a este proceso se le denomina “resistencia sistémica inducida” (RSI). La RSI que provocan las BPCV suprime enfermedades generadas por una amplia gama de patógenos en la planta (Yang *et al.*, 2009).

En conjunto, ambos mecanismos de acción estimulan el crecimiento de la planta. Una BPCV puede usar más de un mecanismo para afectar el crecimiento y desarrollo de la planta (Glick, 2003). Finalmente, la promoción del crecimiento de la raíz es uno de los principales indicadores por el cual se mide el beneficio de las plantas, debido a la asociación con BPCV (Andreoni y Zaccheo, 2010).

1.2. Fito-tecnologías para la remediación de suelos contaminados con elementos potencialmente tóxicos

La fitorremediación envuelve el uso de ciertas especies vegetales y la asociación de éstas con los microorganismos del suelo para remediar sitios contaminados (Pilon-Smits 2005; Turan *et al.*, 2012; Varun *et al.*, 2012). Ésta puede clasificarse en función de dos mecanismos: la extracción y la inmovilización de los

contaminantes a nivel radical (EPA, 2000). De acuerdo con estos mecanismos, se tiene como resultado dos procesos principales: la fitoextracción y la fitoestabilización.

La fitoextracción es una estrategia que implica el uso de plantas acumuladoras e hiperacumuladoras de EPT (Rajkumar *et al.*, 2012). En este proceso, las plantas se usan para extraer a los EPT del suelo, transportarlos y, subsecuentemente, acumularlos en los tejidos de la planta (Glick, 2010). Si el EPT posee la propiedad de ser volátil, un proceso de transpiración o volatilización continuará (EPA, 2000), como lo ilustra la Figura 1.

La eficiencia de este proceso la determinan dos factores clave: la capacidad de acumulación de los EPT que tiene la planta y el alto rendimiento de la biomasa (Rajkumar *et al.*, 2012; Varun *et al.*, 2012). Sin embargo, la restricción del uso de esta tecnología se liga a dos elementos. En primer lugar, la mayoría de las plantas hiperacumuladoras, identificadas hasta ahora, no son adecuadas para su aplicación en campo, debido a su baja producción de biomasa y lento crecimiento. En segundo lugar, los EPT, a elevadas concentraciones causan daños en el metabolismo y crecimiento de las plantas (Glick, 2003; Ma *et al.*, 2009; Zhuang *et al.*, 2007).

Mientras tanto, la fitoestabilización consiste en inmovilizar a los EPT dentro de la zona de la raíz (Figura 1), a través de la absorción, acumulación o precipitación de éstos (Guo *et al.*, 2012; Qixing *et al.*, 2011). Las plantas ideales para este proceso no deben acumular cantidades excesivas de EPT en la parte aérea (Mendez y. Maier, 2008).

Así, el objetivo final de la fitoestabilización es controlar y mitigar de los posibles riesgos ambientales ligados a los EPT que contiene el suelo (León-Lobos *et al.*, 2011), a través su inmovilización y la reducción de sus fracciones biodisponibles

(Kidd *et al.*, 2009). Además, esta tecnología tiene un enfoque factible para la gestión de sitios contaminados a largo plazo, no causa riesgo de transferencia a la cadena trófica (Dickinson *et al.*, 2009) y permite crear cubiertas vegetales (Alkorta *et al.*, 2004; Dickinson *et al.*, 2009).

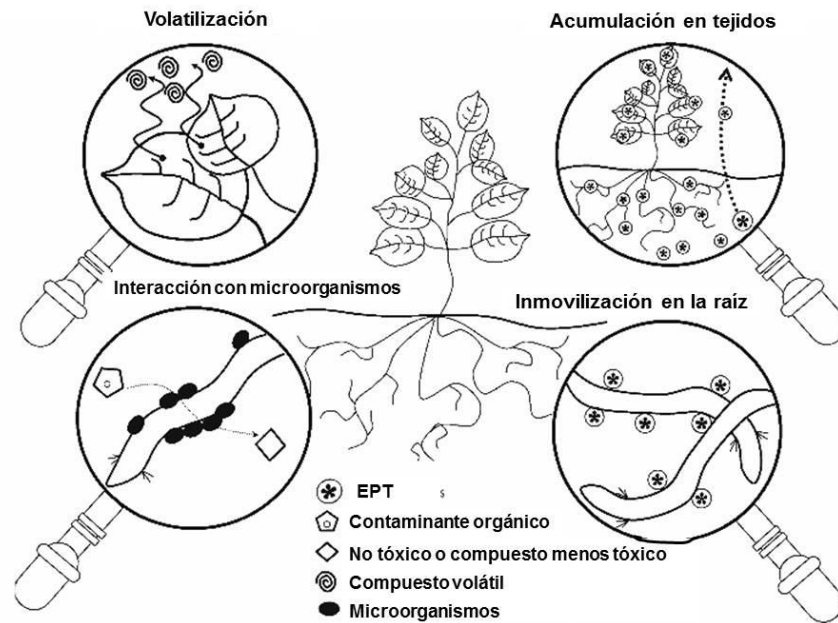


Figura 1. Mecanismos implicados en la fitorremediación (Gómez-Sagasti *et al.*, 2012).

1.2.1. Fitoestabilización asistida

Pese a las ventajas ofrecidas por la fitoestabilización, factores como: la falta de nutrientes esenciales, tales como, N, P y K; el bajo contenido en materia orgánica; las altas concentraciones de EPT, su toxicidad inherente y pH extremo, desde muy ácido (pH 2) a alcalino (pH 9), representan un obstáculo para el desarrollo de cubiertas vegetales y comunidades microbianas en los residuos de mina (Mendez y. Maier, 2008; Puga *et al.*, 2006). Razón por la cual se han ideado estrategias para

mejorar los procesos de fitoestabilización, una de éstas es la fitoestabilización asistida con enmiendas. La cual es un medio eficaz para reducir la biodisponibilidad de los EPT, tanto en suelos contaminados como en residuos mineros (Glick, 2010; Kumpiene *et al.*, 2009).

Incorporar la proporción adecuada de enmienda en suelos contaminados con EPT promueve la sorción, precipitación y secuestro de los EPT por complejación (EPA, 2007). La Figura 2 muestra como las enmiendas pueden ayudar a mitigar la exposición a los EPT y en ciertos casos lograr que la disponibilidad de estos disminuya.

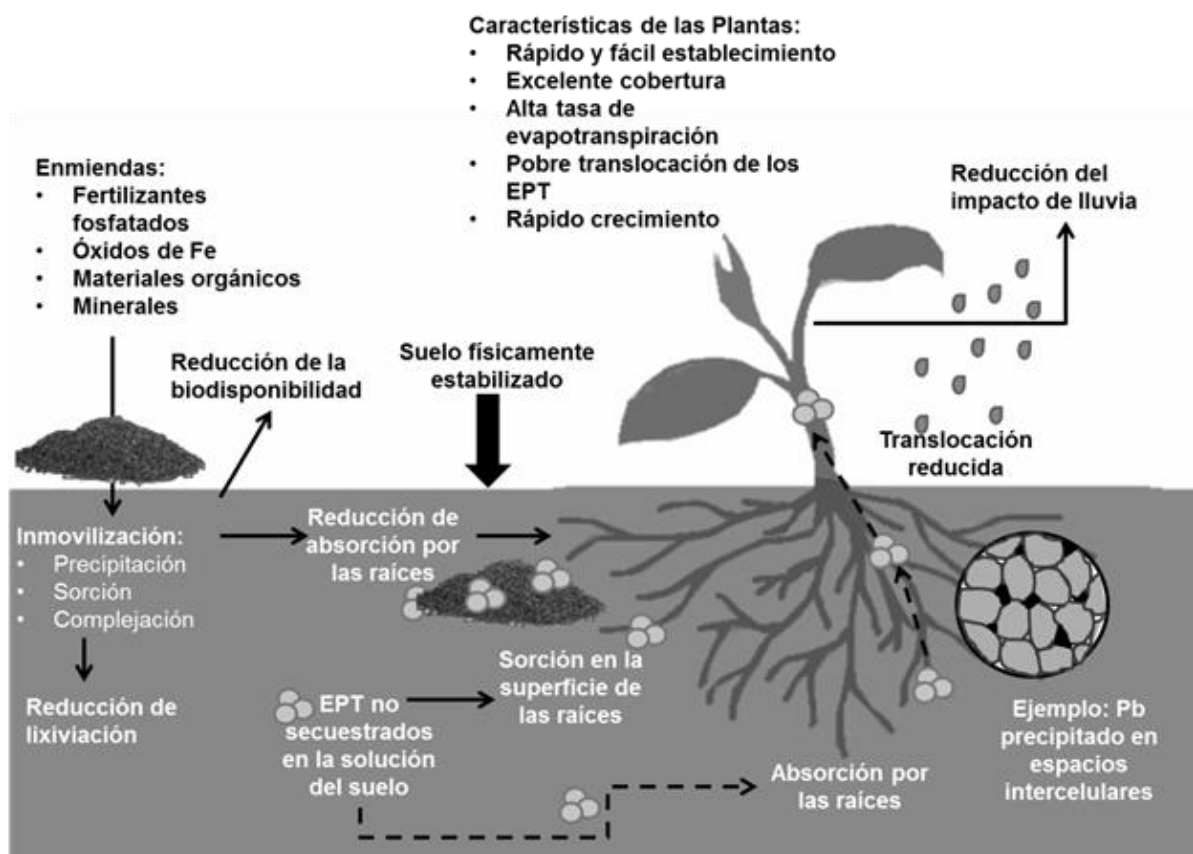


Figura 2. Las funciones de las enmiendas y las plantas en la aplicación de enmiendas de suelos contaminados con EPT (EPA, 2007).

Además de los efectos inmovilizadores, las enmiendas pueden mejorar la fertilidad del suelo mediante el incremento del pH, el contenido de materia orgánica y la actividad biológica, así como facilitar el establecimiento de plantas (Bert *et al.*, 2012; Branzini y Zubillaga, 2010; Kumpiene *et al.*, 2012).

A pesar de que las enmiendas pueden aumentar el éxito de los procesos de fitoestabilización, otro factor crítico que determina la eficiencia de este proceso es la rizósfera. Por lo cual, una alternativa prometedora a las enmiendas es la aplicación de microorganismos (o fitoestabilización asistida por microorganismos), en particular BPCV (Rajkumar *et al.*, 2012), dado que éstas tienen la capacidad de alterar la movilidad y biodisponibilidad de los EPT (Glick, 2010). Además, el crecimiento y la nutrición de la planta se benefician por los diferentes mecanismos de promoción de crecimiento (Belimov *et al.*, 2005; Denton, 2007; Dickison, 2009; Rajkumar *et al.*, 2012).

Las BPCV también tienen efectos benéficos sobre las propiedades del suelo. Estudios reportan aumento significativo en el contenido de N total en el suelo, así como de materia orgánica en suelos enmendados con residuos de mina. Dichos incrementos se atribuyen al desarrollo radical y la producción de exudados, inducidos por la inoculación de BPCV (Wu *et al.*, 2006).

Finalmente, durante estos últimos años los estudios demuestran que la aplicación de la fitoestabilización, en conjunto con enmiendas y la participación de la rizósfera, puede ser una técnica sostenible para rehabilitar suelos contaminados (Alkorta *et al.*, 2004; de-Bashan *et al.*, 2012; Dickinson *et al.*, 2009; Kuffner *et al.*, 2008). Algunos de estos estudios muestran que la cantidad óptima de compost para el establecimiento de algunas especies vegetales en suelos contaminados con EPT

se puede reducir de 15% a 10% mediante el uso de BPCV (de-Bashan *et al.*, 2010) e, incluso se puede sustituir el uso de fertilizantes para ayudar el establecimiento de plantas en residuos de minas (Petrisor *et al.*, 2004). Sin embargo, la falta de conocimiento de las condiciones mínimas necesarias para mantener la cubierta vegetal de manera sostenible y la proporción adecuada de inóculo para garantizar la competencia de las BPCV, limita la aplicación de este proceso. Además, poco se sabe acerca de las interacciones entre las bacterias y las raíces de las plantas, así como de los mecanismos de movilización y transferencia de los EPT. En conjunto, estos factores son la clave para el desarrollo de sistemas de fitoestabilización más eficientes (Alkorta *et al.*, 2004; Dickinson *et al.*, 2009; Kuffner *et al.*, 2008; Wenzel, 2009).

1.3. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal en programas de fitoestabilización de residuos de mina.

Incorporar BPCV estimula el crecimiento de las raíces, en consecuencia se obtiene mayor área de superficie para la adsorción de EPT. Al mismo tiempo, el aumento de la biomasa radical crea estabilidad física contra la erosión eólica e hídrica (de-Bashan *et al.*, 2012). Además de los mecanismos directos de promoción de crecimiento, en sustratos contaminados, las BPCV estimulan el crecimiento por inducción de cambios en la disponibilidad de EPT. Estos cambios suceden a través de la síntesis de agentes quelantes, por medio de reacciones de óxido reducción, modificación del pH del medio y por servir como superficies de adsorción, tal como lo muestra la Figura 3 (de-Bashan *et al.*, 2012; Glick, 2003; Ma *et al.*, 2011; Rajkumar *et al.*, 2010; Turan *et al.*, 2012).

La solubilización de P además de mecanismo directo de promoción de crecimiento, también es un medio para disminuir la concentración de EPT en la solución del suelo. Wu *et al.* (2006) mostraron que las concentraciones de Pb y Zn solubles en agua disminuyeron por el aumento de P disponible en la solución del suelo, ya que Pb y Zn reaccionan con el P para formar compuestos que precipitan. La inoculación de *Enterobacter* sp. en suelos mejorados con P aumentó hasta 51% la inmovilización de Pb extractable con NH_4NO_3 , comparado con el tratamiento testigo, al que sólo se agregó P (Park *et al.*, 2011).

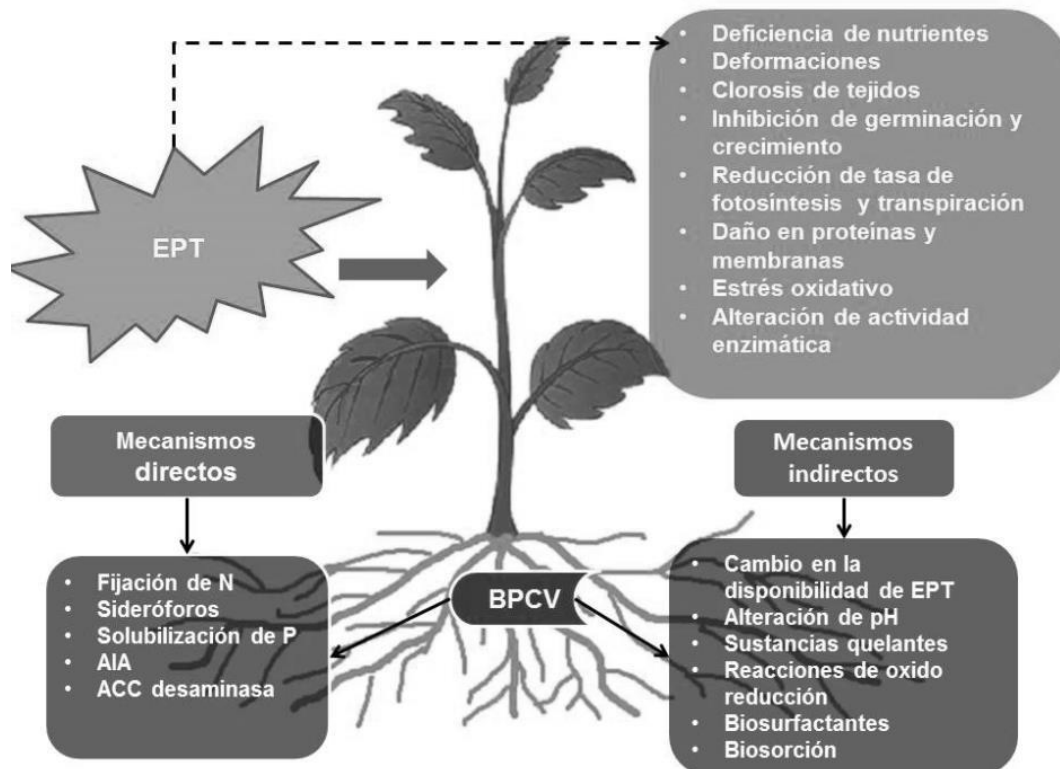


Figura 3. Mecanismos de promoción de crecimiento de bacterias promotoras de crecimiento vegetal (BPCV) en sustratos contaminados EPT.

Los agentes quelantes como sideróforos también han mostrado tener efectos positivos en el crecimiento de plantas de calabaza, mostaza y soya verde. La inoculación de estas plantas con cepas del género *Pseudomonas* redujo significativamente la absorción de Cd y Pb (Sinha y Mukherjee, 2008; Tripathi *et al.*, 2005). Diversas investigaciones han documentado el estímulo en la biosíntesis microbiana de sideróforos con la presencia de EPT (Rajkumar *et al.*, 2010). Por ejemplo, en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* KUCd1 se encontró la máxima producción de sideróforos a la concentración de 1.75 mM de Cd en el medio de cultivo (Sinha y Mukherjee, 2008).

Actualmente, existen dos enfoques para buscar BPCV con aplicación a la fitoestabilización de EPT. El primer enfoque se basa en aislar cepas nativas de los sitios contaminados y posteriormente utilizarlas como inoculantes. Mientras que el otro, propone usar cepas de BPCV que ya tienen uso en la agricultura (de-Bashan *et al.*, 2012). Sin embargo, se prefiere seguir la primera estrategia, debido a que los microorganismos nativos de los residuos de minas están sujetos a presiones selectivas que los hacen aptos para su uso en la revegetación de desechos de minas (Grandlic *et al.*, 2008). Además de los rasgos deseables como BPCV, los microorganismos aislados de residuos de minas pueden incluir la habilidad de crecer en pH ácido y la capacidad de tolerar elevadas concentraciones de EPT, en comparación con los microorganismos no expuestos a estas condiciones (Grandlic *et al.*, 2008; Turan *et al.*, 2012). El Cuadro 1 lista algunos ejemplos de BPCV que se han propuesto para mejorar la fitoestabilización de EPT.

Cuadro 1. Ejemplos de estudios de fitorremediación asistida con microorganismos para remediar suelos contaminados con EPT.

Cepa bacteriana	Origen de la BPCV	Planta	Condición	Efecto de BPCV en plantas	Característica de BPCV	Referencia
<i>Azotobacter chroococcum</i> HKN-5, <i>Bacillus megaterium</i> HKP-1, <i>B. mucilaginosus</i> HKK-1	Suelos agrícolas de Hong Kong		Experimento en invernadero y suelo contaminado con Pb y Zn	Estimulación del crecimiento de la planta. Protección contra el efecto tóxico del Pb y Zn	Solubilización de P, K, y fijación de N	Wu <i>et al.</i> (2006)
<i>Pseudomonas</i> sp. PsA, <i>Bacillus</i> sp. Ba32	Suelos contaminados con EPT de Chennai, India	<i>Brassica juncea</i>	Cámara de crecimiento	Promoción de crecimiento	Síntesis de AIA y sideróforos. Solubilización de P	Rajkumar <i>et al.</i> (2006)
<i>Pseudomonas</i> sp. Ps29C, <i>Bacillus megaterium</i> Bm4C	Suelos de serpentina de Brangança Portugal		Experimento en invernadero con suelo contaminado con Ni	Aumento de la longitud de las hojas	Síntesis de ACC deaminasa y AIA y solubilización de P	Rajkumar y Freitas (2008a)
<i>Rhodococcus erythropolis</i> MtCC 7905	Suelo contaminado con Cr de la región del Himalaya, India	<i>Pisum sativum</i>	Experimento en invernadero con suelo contaminado con Cr	Promoción del crecimiento. Disminución de la concentración de Cr ⁶⁺ Transformación de a Cr ⁶⁺ a Cr ³⁺	Reducción de Cr ⁶⁺	Trivedi <i>et al.</i> (2007)
<i>Pseudomonas</i> sp. PsM6 y <i>P. jessenii</i> PjM15	Suelos de serpentina de Brangança Portugal	<i>Ricinus communis</i>	Experimento en invernadero con suelo contaminado con Cu, Ni y Zn	Adsorción de Zn en la raíz. Promoción de biomasa radical	Solubilización de P, síntesis de AIA y ACC desaminasa	Rajkumar y Freitas (2008b)

BPCV, bacteria promotora del crecimiento vegetal; ACC, 1-aminociclopropano-1-carboxilato; AIA, ácido indol-3-acético; EPT elemento potencialmente tóxico.

1.4. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal y *Ricinus communis*

Ricinus communis es una de las especies vegetales que ha atraído la atención de los investigadores, debido a su capacidad de crecer en suelos muy contaminados y adaptación en diferentes climas. Además, es un cultivo con alta producción de biomasa que no tiene interés alimentario. Sin embargo, sí tiene alto interés industrial (Rajkumar y Freitas, 2008; de Abreu *et al.*, 2012).

Así mismo, recientes investigaciones sugieren que las BPCV podrían ser aplicadas para la producción de cultivos energéticos y materias primas para procesos industriales en tierras marginales, como los suelos contaminados con EPT. De esta manera, por una parte se contribuye a evitar competencia por los suelos destinados a la producción de alimentos y de energía, además se da nuevo valor económico a los suelos contaminados (Rajkumar y Freitas, 2008; Weyens *et al.*, 2009). Mientras que por otra, la calidad del suelo se mejora a través de la estabilización de los EPT (Weyens *et al.*, 2009).

Existe poca información sobre el uso de BPCV en conjunto con *R. communis* para la estabilización de residuos de mina. Sin embargo, estudios realizados por Rajkumar y Freitas (2008b) en suelos contaminados con Ni, Cu y Zn, reportaron que la cepa *Pseudomonas jesseni* aumentó la biomasa radical de *R. communis*. Los autores atribuyen este resultado a la producción de AIA y la solubilización de P por parte de las bacterias. También remarcan que la mayor concentración de Zn se encontró en la raíz de las plantas que se inocularon con *P. jesseni*.

También se ha evaluado el efecto de la inoculación de *Psychrobacter* sp. en *R. communis* en suelos contaminados artificialmente con Ni. En dicho estudio los autores encontraron que *Psychrobacter* sp. es capaz de estimular el crecimiento de *R. communis* y la acumulación de Ni. Además, también se notó efecto sobre la biomasa vegetal y el contenido de clorofila. Los autores sugieren que la cepa de *Psychrobacter* sp. desarrolló una función importante en la promoción del crecimiento y la eficiencia del proceso de fitorremediación con *R. communis* (Ma *et al.*, 2011).

De Abreua *et al.* (2012) evaluaron el efecto de la materia orgánica adicionada a un suelo contaminado con EPT y el potencial de fitoextracción de *R. communis*.

Encontraron que *R. communis* después de 74 días de su siembra no acumuló Cr, Ni, Cd, Cu, Pb o Zn. Ellos concluyen que deben llevarse a cabo otros estudios para demostrar la utilidad de las plantas que crecen en las zonas contaminadas con fines de rehabilitación y producción de materia prima para biocombustibles.

CONCLUSIONES

A pesar de los avances significativos en la investigación de las interacciones entre microorganismos y plantas aún falta trasladar la información que se ha obtenido en experimentos en invernadero y condiciones controladas y la práctica del campo. La mayoría de los estudios sugiere que la inoculación de BPCV en conjunto con la aplicación de enmiendas, son una herramienta prometedora para crear sistemas de fitorremediación más eficientes. Sin embargo, es crucial encontrar la combinación adecuada de planta-BPCV-enmienda que permitan reducir costos de fitorremediación ya hacer sistemas eficientes y baratos. Por otra parte, la interacción planta microorganismos parece mejorar el desarrollo y establecimiento de cubiertas vegetales en suelos contaminados con EPT. Pero aún se requieren más estudios donde se combine el uso de bioinoculantes y enmiendas. También es importante crear herramientas para rastrear los cambios en la población rizósferica, así como en la disponibilidad de EPT, para evaluar la eficiencia y longevidad del proceso de remediación.

LITERATURA CITADA

- Ahemad, M. and M. Kibret. 2014. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. *Journal of King Saud University – Science* 26: 1-20.
- Alkorta, I., J. Hernández-Allica, J. Becerril, I. Amezaga, I. Albizu, and C. Garbisu. 2004. Recent findings on the phytoremediation of soils contaminated with environmentally toxic heavy metals and metalloids such as zinc, cadmium, lead, and arsenic. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 3: 71-90.
- Andreoni, V. and P. Zaccheo. 2010. Potential for the use of rhizobacteria in the sustainable management of contaminated soils. In: Ashraf M., M. Ozturk, M. S. A. Ahmad (eds.), *Plant Adaptation and Phytoremediation*. Springer, Netherlands. pp 313-334.
- Arshad, M., M. Saleem, and S. Hussain. 2007. Perspectives of bacterial ACC deaminase in phytoremediation. *Trends in Biotechnology* 25: 356-362.
- Bakker, P., J. Raaijmakers, G. Bloemberg, M. Hofte, P. Lemanceau, and B. Cooke. 2007. *New perspectives and approaches in plant growth-promoting rhizobacteria research*. Springer, Dordrecht, Netherlands. 365 p.
- Belimov, A., N. Hontzeas, V. Safronova, S. Demchinskaya, G. Piluzza, S. Bullitta, and B. Glick, 2005. Cadmium-tolerant plant growth-promoting bacteria associated with the roots of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern.). *Soil Biology and Biochemistry* 37: 241-250.

- Bert, V., C. Lors, J.-F. Ponge, L. Caron, A. Biaz, M. Dazy, and J.-F. Masfaraud. 2012. Metal immobilization and soil amendment efficiency at a contaminated sediment landfill site: A field study focusing on plants, springtails, and bacteria. *Environmental Pollution* 169: 1-11.
- Branzini, A. and M. S. Zubillaga. 2010. Assessing phytotoxicity of heavy metals in remediated soil. *International Journal of Phytoremediation* 12: 335-342.
- Compant, S., B. Duffy, J. Nowak, C. Clément, and E. A. Barka. 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 4951-4959.
- Compant, S., C. Clémen, and A. Sessitsch. 2010. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry* 42: 669-678.
- Cortés-Jiménez E. V., V. Mugica-Alvarez, M. C. González Chávez, R. Carrillo-González, M. Martínez Gordillo and M Vaca Mier. 2013. Natural revegetation of alkaline tailing heaps at Taxco, Guerrero, México. *Int. J. Phytoremediation* 15: 127 – 141.
- de Abreu, C. A.; A. R. Coscione, A. Moreno Pires, and J. Paz-Ferreiro. 2012. Phytoremediation of a soil contaminated by heavy metals and boron using castor oil plants and organic matter amendments. *Journal of Geochemical Exploration* 123: 3-7.
- de-Bashan, L. E., J.-P. Hernández, Y. Bashan, and R. M. Maiera. 2010. *Bacillus pumilus* ES4: Candidate plant growth-promoting bacterium to enhance

- establishment of plants in mine tailings. *Environmental and Experimental Botany* 69: 343-352.
- de-Bashan, L. E.; J. P. Hernandez, and Y. Bashan. 2012. The potential contribution of plant growth-promoting bacteria to reduce environmental degradation – A comprehensive evaluation. *Applied Soil Ecology* 61: 171-189.
- Denton, B. 2007. Advances in phytoremediation of heavy metals using plant growth promoting bacteria and fungi. *MMG 445 Basic Biotechnology* 3: 1-5.
- Dickinson, N., A. Baker, A. Dorolina, S. Laidlaw, and R. Reeves. 2009. Phytoremediation of inorganics: realism and synergies. *International Journal of Phytoremediation* 11: 97-114.
- EPA (Environmental Protection Agency). 2000. Introduction to phytoremediation. EPA/600/R-99/107. U.S. Environmental Protection Agency. Cincinnati, Ohio.
- EPA (Environmental Protection Agency). 2007. The use of soil amendments for remediation, revitalization and reuse EPA 542-R-07-013. U. S. Environmental Protection Agency. Cincinnati, Ohio.
- Gamalero, E. and B. R. Glick. 2011. Mechanisms used by plant growth-promoting bacteria. In: Maheshwari D.K. (ed.), *Bacteria in agrobiolgy: plant nutrient management*, Springer, Berlin. pp 17-46.
- Gamalero, E., G. Lingua, G. Berta, and B. R. Glick. 2009. Beneficial role of plant growth promoting bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi on plant responses to heavy metal stress. *Canadian Journal of Microbiology* 55: 501-514.
- Glick, B. R. 2003. Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. *Biotechnology Advances* 21: 383-393.

- Glick, B. R. 2010. Using soil bacteria to facilitate phytoremediation. *Biotechnology Advances* 28: 367-374.
- Gómez-Sagasti, M. T., I. Alkorta, J. M. Becerril, L. Epelde, M. Anza, and C. Garbisu. 2012. Microbial monitoring of the recovery of soil quality during heavy metal phytoremediation. *Water, Air, and Soil Pollution* 223: 3249-3262.
- González-Chávez, M. C. A. 2005. Recuperación de suelos contaminados con metales pesados utilizando plantas y microorganismos rizosféricos. *Terra Latinoamericana* 23: 29-37.
- González-Chávez, M. C. A., Ruíz Olivares, A., Carrillo-González, R., Ríos Leal, E. 2014. Crude oil and bioproducts of castor vean (*Ricinus communis* L.) plants established naturally on metal mine tailings. *International Journal of Environmental Science Technology* DOI 10.1007/s13762-014-0622-z
- Grandlic, C., M. Mendez, J. Chorover, B. Machado, R. Maier. 2008. Plant growth-promoting bacteria for phytostabilization of mine tailings. *Environmental Science and Technology* 42: 2079-2084.
- Guo, B., Y. Liang, Q. Fu, N. Ding, C. Liu, Y. Lina, and N. Li. 2012. Cadmium stabilization with nursery stocks through transplantation: a new approach to phytoremediation. *Journal of Hazardous Materials* 199-200: 233-239.
- Joseph, B., R. Ranjan Patra, and R. Lawrence. 2007. Characterization of plant growth promoting rhizobacteria associated with chickpea (*Cicer arietinum* L.). *International Journal of Plant Production* 2: 141-152.
- Kavamura, V. N. and E. Esposito. 2010. Biotechnological strategies applied to the decontamination of soils polluted with heavy metals. *Biotechnology Advances* 28: 61-69.

- Kidd, P., J. Barcelo, P. Bernal, F. Navari-Izzo, C. Poschenreder, S. Shilev, R. Clemente, and C. Monterroso. 2009. Trace element behavior at the root–soil interface: implications in phytoremediation. *Environmental and Experimental Botany* 67: 243-259.
- Kuffner, M., M. Puschenreiter, G. Wieshammer, and M. Gorfer. 2008. Rhizosphere bacteria affect growth and metal uptake of heavy metal accumulating willows. *Plant and Soil* 304: 35-44.
- Kumpiene, J., G. Guerri, L. Landi, G. Pietramellara, P. Nannipieri, and G. Renella. 2009. Microbial biomass, respiration and enzyme activities after in situ aided phytostabilization of a Pb and Cu contaminated soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72: 115-119.
- Kumpiene, J., J. P. Fitts, and M. Mench. 2012. Arsenic fractionation in mine spoils 10 years after aided phytostabilization. *Environmental Pollution* 166: 82-88.
- León-Lobos, P., R. Ginocchio, y A. J. Baker. 2011. Fitoestabilización de depósitos de relaves en Chile. Guía N° 3: flora y vegetación asociadas a relaves mineros abandonados. Andros Impresores, Chile. 62 p.
- Ma, Y., M. Rajkumar, and H. Freitas. 2009. Improvement of plant growth and nickel uptake by nickel resistant-plant-growth promoting bacteria. *Journal of Hazardous Materials* 166: 1154-1161.
- Ma, Y.; M. Rajkumar, J. A. Vicentea, and H. Freitas. 2011. Inoculation of Ni-resistant plant growth promoting bacterium *Psychrobacter* sp. strain SRS8 for the improvement of nickel phytoextraction by energy crops. *International Journal of Phytoremediation* 13: 126-139.

- Meldau, D. G., H. H. Long, and I. T. Baldwin. 2012. A native plant growth promoting bacterium, *Bacillus* sp.B55, rescues growth performance of an ethylene-insensitive plant genotype in nature. *Frontiers in Plant Science* 3: 1-13.
- Mendez, M. O. y R. M. Maier. 2008. Phytostabilization of mine tailings in arid and semiarid environments an emerging remediation technology. *Environmental Health Perspectives* 116: 278-283.
- Park, J., N. Bolan, M. Megharaj, R. Naidu. 2011. Comparative value of phosphate sources on the immobilization of lead, and leaching of lead and phosphorus in lead contaminated soils. *Science of The Total Environment* 409: 853-860.
- Petrisor, I. G., S. Dobrota, K. Komnitsas, I. Lazar, J. Michael, and M. Serban. 2004. Artificial inoculation-perspectives in tailings phytostabilization. *International Journal of Phytoremediation* 6: 1-15.
- Pignattelli, S.; I. Colzi, A. Bucciatti, L. Cecchi, M. Arnetoli, R. Monnanni, R. Gabbrielli, and C. Gonnelli. 2012. Exploring element accumulation patterns of a metal excluder plant naturally colonizing a highly contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials* 227-228: 362-369.
- Pilon-Smits, E. 2005. Phytoremediation. *Annual Review of Plant Biology* 56:15-39.
- Puga, S.; M. Sosa, T. Lebgue, C. Quintana, y A. Campos. 2006. Contaminación por metales pesados en suelo provocada por la industria minera. *Ecología Aplicada* 5: 149-155.
- Qixing, Z., C. Zhang, Z. Zhineng, and L. Weitao. 2011. Ecological remediation of hydrocarbon contaminated soils with weed plant. *Journal of Resources and Ecology* 2: 97-105.

- Rajkumar, M. and H. Freitas. 2008a. Effects of inoculation of plant-growth promoting bacteria on Ni uptake by Indian mustard. *Bioresource Technology* 99: 3491-8.
- Rajkumar, M. and H. Freitas. 2008b. Influence of metal resistant-plant growth-promoting bacteria on the growth of *Ricinus communis* in soil contaminated with heavy metals. *Chemosphere* 71: 834-42.
- Rajkumar, M., N. Ae, and H. Freitas. 2009. Endophytic bacteria and their potential to enhance heavy metal phytoextraction. *Chemosphere* 77: 153-160.
- Rajkumar, M., N. Ae, M. Prasad, H. Freitas. 2010. Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. *Trends in biotechnology* 28:142–9.
- Rajkumar, M., R. Nagendran, K. J. Lee, W. H. Lee, and S. K. Kim. 2006. Influence of plant growth promoting bacteria and Cr^{6+} on the growth of Indian mustard. *Chemosphere* 62: 741-748.
- Rajkumar, M., S. Sandhya, M. Prasad, and H. Freitas. 2012. Perspectives of plant-associated microbes in heavy metal phytoremediation. *Biotechnology Advances* 30: 1562-1574.
- Ruiz Olivares, A.; R. Carrillo-González, M. C. A. González-Chávez, and R. M. Soto Hernández. 2013. Potential of castor bean (*Ricinus communis* L.) for phytoremediation of mine tailings and oil production. *ScienceDirect.com - Journal of Environmental Management* 114: 316-323.
- Saharan, B. S. and V. Nehra. 2011. Plant growth promoting rhizobacteria: A Critical Review. *Life Sciences and Medicine Research* 2011: 1-30.

- Sinha, S. and S. K. Mukherjee. 2008. Cadmium–induced siderophore production by a highCd-resistant bacterial strain relieved Cd toxicity in plants through root colonization. *Current Microbiology* 56:55–60.
- Tripathi, M., H. P. Munot, Y. Shouche, J. M. Meyer, and R. Goel. 2005. Isolation and functional characterization of siderophore-producing lead and cadmium-resistant *Pseudomonas putida* KNP9. *Current Microbiology* 50: 233–237.
- Trivedi, P., A. Pandey, and T. Sa. 2007. Chromate reducing and plant growth promoting activities of psychrotrophic *Rhodococcus erythropolis* MtCC 7905. *Journal of Basic Microbiology* 47: 513-517.
- Turan, M., A. Esitken and F. Sahin. 2012. Plant growth promoting rhizobacteria as alleviators for soil degradation. In: Maheshwari D.K. (ed.), *Bacteria in agrobiolgy: stress management*. Springer, Berlin. pp 41-63.
- Varun, M., R. D'Souza, J. Pratas, and M. S. Paul. 2012. Metal contamination of soils and plants associated with the glass industry in North Central India: prospects of phytoremediation. *Environmental Science and Pollution Research* 19: 269-281.
- Wenzel, W. W. 2009. Rhizosphere processes and management in plant-assisted bioremediation (phytoremediation) of soils. *Plant and Soil* 321: 385-408.
- Weyens, N., D. Van Der Lelie, S. Taghavi, L. Newman, and J. Vangronsveld. 2009. Exploiting plant–microbe partnerships to improve biomass production and remediation. *Trends in Biotechnology* 27: 591-598.
- Wu, S., K. Cheung, Y. Luo, M. Wong. 2006. Effects of inoculation of plant growth-promoting rhizobacteria on metal uptake by *Brassica juncea*. *Environmental Pollution* 140: 124135.

Yang, J., J. W. Kloepper, and C.-M. Ryu. 2009. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends in Plant Science* 14: 1-4.

Zhuang, X., J. Chen, H. Shim, and Z. Bai. 2007. New advances in plant growth-promoting rhizobacteria for bioremediation. *Environment International* 33: 406-413.

CAPÍTULO II

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE BACTERIAS

RESUMEN

Se caracterizaron bioquímicamente como BPCV 82 cepas bacterianas provenientes de sustratos contaminados con EPT: hidrocarburos, suelos agrícolas, polvo de carretera y costras de aceite. De la colección inicial de microorganismos 71% solubilizó P inorgánico, De las bacterias aisladas 42% fueron productoras de sideróforos y 72% sintetizaron AIA. En el presente capítulo se reportan las 20 mejores cepas bacterianas, todas aisladas a partir de rizósfera y rizoplasma de plantas establecidas en residuos de mina. Las cepas Mc183 y K120 solubilizaron la mayor cantidad de P inorgánico (4.87 y $4.28 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente). Mientras que las cepas Mc173, N9, Mc188 sintetizaron altas concentraciones de AIA (11.55 , 11.2 y $10.73 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente) en comparación con las demás cepas bacterianas. La actividad de la enzima ACC-desaminasa varió en un intervalo de 0.09 a $2.65 \mu\text{M } \alpha\text{-cetobutirato mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

INTRODUCCIÓN

Previos estudios en la agricultura han mostrado la efectividad de las BPCV sobre la disponibilidad de nutrientes y el rendimiento de diversos cultivos (Noumavo *et al.*, 2013; Rodríguez y Fraga, 1999). A partir de estos resultados se ha intentado trasladar el uso de BPCV a la remediación de suelos contaminados con EPT. En este sentido, se busca seleccionar microorganismos tanto nativos como alóctonos

(Grandlic *et al.*, 2008) con características bioquímicas como: la solubilización de P inorgánico, fijación de N atmosférico, liberación de sideróforos, producción de AIA y la enzima ACC desaminasa (Haferburg y Kothe, 2012).

Solubilización de fósforo inorgánico

El P es un macronutriente esencial para las plantas y se considera como uno de los elementos que limita el crecimiento de estas (Rodríguez y Fraga, 1999). Usualmente, en la revegetación de residuos mineros se requiere el uso de enmiendas de fosforo, ya que la disponibilidad de este elemento en los residuos es muy baja (Manis *et al.*, 2006). Sin embargo, las enmiendas fosfatadas no siempre se recomiendan, sobre todo cuando hay As en el residuo (EPA, 2007; Manis *et al.*, 2006).

Aplicar microorganismos solubilizadores de fósforo, supone una alternativa viable para mejorar el rendimiento y la nutrición de las plantas. Algunos estudios han mostrado que la inoculación de bacterias solubilizadoras de fósforo pueden aumentar el rendimiento de los cultivos hasta 13% (Khan *et al.* 2009). Sin embargo, aún se requiere explorar la aplicación de éstas en la remediación de residuos de mina.

Por otra parte, el principal mecanismo que usan las BPCV para la solubilización de fósforo inorgánico, se basa en las síntesis de los ácidos orgánicos de bajo peso molecular, tales como el ácido glucónico, cítrico, oxálico, succínico, propiónico y acético (Bashan *et al.*, 2013; Rodríguez y Fraga, 1999). No obstante, existen otros mecanismos que se han implicado en la solubilización de P inorgánico, como la liberación de H⁺, la producción de sustancias quelantes y ácidos inorgánicos. Además, los exopolisacáridos sintetizados por las BPCV participan indirectamente en

la solubilización de fosfatos (Bashan *et al.*, 2013; Rodríguez y Fraga, 1999; Saharan y Nehra, 2011). Los géneros capaces de solubilizar fosfatos incluyen a *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter* y *Streptomyces* (Rodríguez y Fraga, 1999; Saharan y Nehra, 2011).

Producción de sideróforos

El Fe es el cuarto elemento más abundante en la tierra. Sin embargo, en suelos aeróbicos, éste se precipita principalmente en forma de hidróxidos, oxihidróxidos y óxidos, de tal modo, que la cantidad de Fe disponible para la asimilación por los organismos vivos es muy baja (Kabata-Pendias, 2011; Saharan y Nehra, 2011; Rajkumar *et al.*, 2009). Y tanto microorganismos como plantas tienen que competir por este elemento.

Las bacterias para sobrevivir en condiciones limitantes de Fe, inducen la síntesis de sideróforos. Éstos son moléculas de bajo peso molecular y tienen una gran afinidad por el Fe (Rajkumar *et al.*, 2009). Los sideróforos secuestran Fe de las fases minerales y lo transforman en complejos solubles de Fe^{3+} (Loredo-Osti, *et al.*, 2004). Además, algunos estudios han mostrado que los sideróforos también pueden formar complejos estables con otros elementos como el Al, Cd, Cu, Ga, In, Pb y Zn (Rajkumar *et al.*, 2009). En este sentido, las BPCV que exhiben la propiedad de producir sideróforos pueden promover el crecimiento de plantas en residuos. Por una parte facilitando Fe o bien induciendo tolerancia a los EPT en las plantas, a través de la modificación en las fracciones disponibles de EPT en la solución del suelo.

Producción de fitohormonas

El AIA es una auxina presente en la mayoría de las plantas. La cual regula diversos procesos del desarrollo de la planta (Castillo *et al.*, 2005). De manera general, esta auxina afecta la división, elongación y diferenciación celular. También, ha mostrado estimular la germinación de semillas y el desarrollo de raíces adventicias (Ahemad y Kibret, 2014). La capacidad de producir AIA de los microorganismos de la rizósfera se ha detectado en un amplio género de bacterias, entre los que destacan *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Alcaligenes* y *Bradyrhizobium* (Gamalero y Glick, 2011; Claus y Kutzner, 1983; Jensen *et al.*, 1995; Jarabo-Lorenzo *et al.*, 1998). Por lo anteriormente expuesto, la inoculación de bacterias que exhiben la capacidad de producir AIA, ofrece la ventaja de estimular el crecimiento radical, lo cual supone mejorar la absorción de nutrientes, estimular la proliferación bacteriana en los residuos de mina. Así mismo crear estabilidad en el residuo y evitar la migración de EPT por erosión eólica, a través de la formación de cubiertas vegetales (Gamalero y Glick, 2011; Ahemad y Kibret, 2014).

OBJETIVO

Evaluar propiedades bioquímicas relacionadas con la promoción del crecimiento vegetal de cepas aisladas de suelos contaminados con EPT, hidrocarburos, suelos agrícolas, polvo de carretera y costras de aceite.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Microorganismos empleados

Las cepas bacterianas que se utilizaron en el presente estudio (82 cepas), las proporcionaron los laboratorios de Microbiología Ambiental del Colegio de Postgraduados y de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Estas cepas se aislaron a partir de:

- rizósfera y rizoplano de plantas establecidas en presas de jales del distrito minero de Zimapán, Hidalgo (50 cepas),
- suelos contaminados con hidrocarburos del municipio de Acatzingo, Puebla (10 cepas),
- suelos contaminados con EPT (5 cepas), provenientes de Zimapán, Hidalgo.
- suelos agrícolas (8 cepas), Colegio de Postgraduados
- polvo de carretera (4 cepas), Texcoco, edo. de México y
- costras de aceite (5 cepas), Texcoco, edo. de México.

2.3. Determinación cualitativa de solubilización de fósforo inorgánico

Las cepas bacterianas se propagaron en agar nutritivo, King o Mc Conkey según el medio que se empleó para aislarlas. Del cultivo de 24 h se tomó una colonia aislada y se sembró en medio Pikovskaya ([Anexo I](#)). Las cajas de Petri se incubaron por 48 h a 30° (Husen, 2003). La aparición de un halo de transparencia alrededor de las colonias como lo muestra la Figura 4b se evaluó como positivo a la prueba.

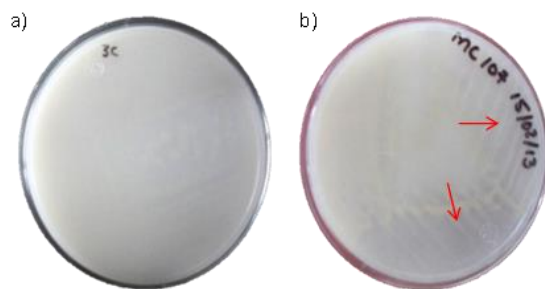


Figura 4. Solubilización de P inorgánico prueba cualitativa a) prueba negativa, b) prueba positiva, las flechas en rojo señala la aparición de halos de transparencia donde crece la cepa bacteriana.

2.4. Determinación cuantitativa de solubilización de fósforo inorgánico

Las cepas positivas a la solubilización de P inorgánico en medio sólido se propagaron en caldo Luria Beratani (LB) y se incubaron durante 24 h a 30 °C. Los cultivos bacterianos se ajustaron a 0.2 de absorbancia (equivalente a 1×10^6 bacterias mL^{-1}). De la suspensión bacteriana se tomaron 500 μL y se depositaron en tubos de ensaye que contenían medio líquido Pikovskaya (misma composición pero sin agar). Los tubos se incubaron a 35 °C durante 15 días. Posterior a la incubación, las muestras se centrifugaron a 9 000 revoluciones por minuto (rpm) durante 15 min, el sobrenadante se traspasó a un tubo de ensaye.

Una alícuota de 0.5 mL del sobrenadante se tomó y depositó en un tubo de ensaye, además se adicionó 1 mL de solución vanado-molibdato y 3.5 mL de agua desionizada. Las muestras se dejaron reposar durante 10 min para el desarrollo de color amarillo e inmediatamente se midió la absorbancia a una longitud de onda de 400 nm (de-Freitas *et al.*, 1997). La cantidad de P soluble en el medio se determinó comparando la absorbancia de la muestra con una curva patrón de PO_4^{3-} que osciló entre 0.2 y 0.75 $\text{mg PO}_4^{3-} \text{L}^{-1}$ ([Anexo II](#)).

2.5. Actividad de la fosfatasa acida y alcalina

Del sobrenadante obtenido del ensayo de solubilización de P inorgánico en cultivo líquido, se tomó una alícuota de 1 mL y se depositó en un tubo de ensaye. Se agregó 1 mL de solución de p-nitrofenilfosfato 25 mM; 4 mL de buffer universal modificado pH 6.5 o pH 11, para el ensayo de fosfatasa acida o alcalina, respectivamente. La mezcla se incubó durante 1 h a 37 °C y concluido el tiempo se adicionó 1 mL de solución de CaCl₂ 0.5 M y 4 mL de NaOH 0.5 M. La muestra se filtró con papel Whatman No. 2 y la absorbancia de la muestra se midió a 405 nm (de-Freitas *et al.*, 1997).

2.6. Producción de sideróforos

Las cepas bacterianas se cultivaron en caldo LB durante 24 h a 30 °C. Del cultivo de 24 h se tomaron 2 µL y se inocularon en placas Petri con el medio CAS (Cromo azurol S, [Anexo III](#)). Estas se incubaron durante 24 h a 35 °C (Schwyn y Neilands, 1987). Concluido el periodo de incubación, se evaluó la aparición de halos de color naranja o rosado alrededor de las colonias bacterianas (Figura 5b), lo cual se consideró como positivo a la síntesis de sideróforos.

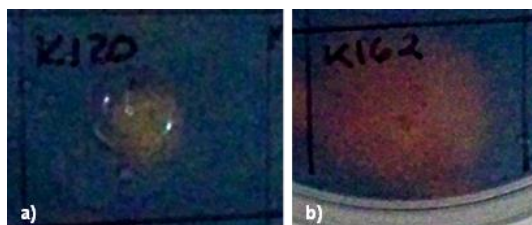


Figura 5. a) Prueba negativa y b) positiva a la producción de sideróforos.

2.7. Producción de ácido indolacético

Las cepas bacterianas se propagaron en caldo LB y se incubaron durante 24 h a 30 °C. Posteriormente, el cultivo bacteriano se centrifugó a 9 000 rpm durante 10 min, el sobrenadante se desechó y la pastilla celular se resuspendió en solución de NaCl 0.9%. La suspensión bacteriana se ajustó a 0.5 de absorbancia a 600 nm para obtener aproximadamente 1×10^9 bacterias mL^{-1} . De la suspensión bacteriana se tomaron 500 μL y se inocularon en medio mineral con L-triptófano ([Anexo IV](#)), las muestras se incubaron a 35 °C durante 72 h. Después de la incubación las muestras se centrifugaron a 9 000 rpm durante 10 min. Se tomó 1 mL del sobrenadante y se depositó en un tubo de ensaye, además, se agregó 2 mL de reactivo de Salkowski. Las muestras se dejaron reposar durante 30 min para el desarrollo de una coloración rosa. La absorbancia de la muestra se midió una longitud de onda de 530 nm (Husen, 2003). La concentración de AIA se determinó comparando la absorbancia de la muestra con una curva patrón de AIA que osciló de 1 a 8 $\mu\text{g AIA mL}^{-1}$ ([Anexo V](#)).

2.8. Actividad de la 1-aminociclopropano-1-carboxilato desaminasa (ACC-desaminasa)

Las cepas bacterianas se propagaron en 5 mL de medio líquido Pseudomonas F (BPF, [Anexo VI](#)), durante 24 h a 30 °C. El cultivo bacteriano de 24 h se centrifugó a 9 000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se desechó y la pastilla celular se lavó dos veces con 5 mL de buffer Tris-HCl 0.1M (pH 7.5). A continuación, ésta se resuspendió en 1 mL de medio mineral (SM, [Anexo VII-1](#)) más 2.5 mL de medio mínimo mineral (SMN, [Anexo VII-2](#)). El cultivo bacteriano se incubó nuevamente durante 24 h a 30 °C.

Después de la incubación, el cultivo bacteriano se centrifugó. El sobrenadante se desechó y la pastilla celular se resuspendió en 1 mL de buffer Tris-HCl 0.1 M (pH7.5). La muestra se centrifugó nuevamente, el sobrenadante se desechó y la pastilla celular resultante se resuspendió en 600 μ L de buffer Tris-HCl 0.1 M (pH 8.5). Para romper las células bacterianas se agregaron 30 μ L de tolueno y la muestra se mezcló con la ayuda de un vortex durante 30 s.

De la suspensión celular se tomaron 100 μ L y se depositaron en un tubo Eppendorf, se agregaron 10 μ L de solución ACC 0.5 M, 100 μ L de buffer Tris-HCl 0.1M (pH 8.5) y 1 mL de HCl 0.56 N. La muestra se dejó reposar por al menos 30 min a 30 °C. Posteriormente, la muestra se centrifugó a 14 000 rpm por 5 min. El sobrenadante se recuperó y 500 μ L de éste se mezcló con 400 μ L de HCl 0.56N, 150 μ L de solución de 2-4dinitrofenilhidrazina 0.2% en HCl 2 N y 1 mL de NaOH 2 N. Se midió la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 540 nm (Honma y Shimomura, 1978; Penrose y Glick, 2003) y la cantidad de α -cetobutirato producido se determinó comparando la absorbancia a 540 nm de la muestra con una curva patrón de α -cetobutirato (concentración entre 0,1 y 1,0 mM; [Anexo VIII](#)).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De la colección de microorganismos 71% presentó la capacidad de solubilizar P inorgánico, 72% de sintetizar AIA y 42% de producir sideróforos. En el presente trabajo se reportan las 20 mejores cepas bacterianas de la colección, las cuales se aislaron en su mayoría del rizoplano y rizósfera (60% y 35%, respectivamente) de plantas establecidas en presas de jales del municipio de Zimapán, Hidalgo. Mientras que el resto se aisló a partir de un residuo de mina rico en Ag del mismo municipio.

2.9. Solubilización de fósforo inorgánico en medio líquido

La solubilización de P por parte de las bacterias osciló entre 0.28 y 2.42 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 6). Las cepas Mc183 y K120 solubilizaron la mayor ($\alpha=0.05$) concentración de P (4.87 y 4.28 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente). Mientras que la cepa K162 solubilizó la menor ($\alpha=0.05$) (0.28 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

No se detectó actividad de las enzimas fosfatasa ácida y alcalina, estos resultados difieren con los reportados por de-Freitas *et al.* (1997). Se sabe que las fosfatasas participan principalmente en la mineralización de compuestos orgánicos de P y no solubilizan P inorgánico (Gamalero y Glick, 2011; Rodríguez y Fraga, 1999; de-Freitas *et al.* 1997; Sharma *et al.*, 2013). Sin embargo, los autores sugieren que las fosfatasas pueden estimularse cuando el P es limitante en el medio.

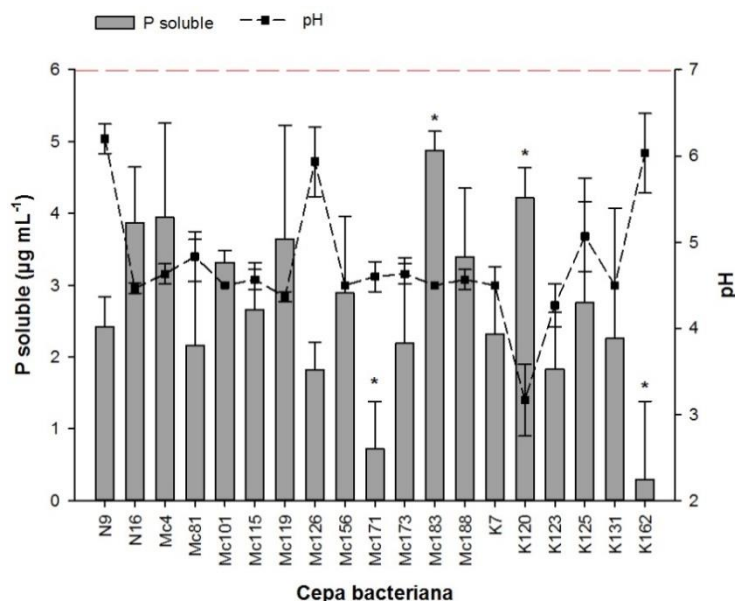


Figura 6. Solubilización de P inorgánico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) en medio líquido Pikovskaya y variación del pH del medio. La línea en rojo representa el pH inicial de medio, los asteriscos indican diferencia significativa (HSD= 3.07, $\alpha=0.05$).

Además, 80% de las cepas bacterianas modificó el pH del medio a moderadamente ácido (pH 3 a 5) y 20% lo cambió a ligeramente ácido (pH 6). Se realizó un análisis de correlación de Pearson entre las variables de pH y contenido de P en el medio, sin embargo no se encontró correlación ($\alpha=0.05$). Muleta *et al.* (2013) no encontraron correlaciones entre el contenido de P y el contenido de ácidos orgánicos y pH en el medio. Sin embargo, sí correlación negativa entre el contenido de ácidos orgánicos y el pH del medio. Los resultados sugieren que las bacterias liberan ácidos orgánicos aunque no se relaciona con la solubilización de P. Se recomienda que en trabajos futuros se complemente el análisis de solubilización de P con técnicas de cromatografía de líquidos, ya que a pesar de que numerosos estudios (Misra *et al.*, 2012; Galamero y Glick, 2011; Paredes-Mendoza y Espinosa-Victoria, 2010; Sharma *et al.*, 2013; Rodríguez *et al.*, 2006) afirman que el principal mecanismo de solubilización de P inorgánico es a través de la liberación de ácidos orgánicos. Algunos otros han observado correlaciones negativas entre el pH del medio de cultivo y el contenido de P (Alikhani *et al.*, 2007), sin embargo, parece ser que los ácidos orgánicos no son el único medio de solubilizar P. También hay otros mecanismos como: la segregación de sustancias quelantes (por ejemplo, sideróforos), la formación de complejos solubles de P inorgánico con iones metálicos como el Ca, Al y Fe, la liberación de H⁺ (Sharma *et al.*, 2013).

2.10. Producción de sideróforos

Trece de las 20 cepas bacterianas (65%) produjeron sideróforos. La cepa K131 formó el mayor diámetro de halo (3 cm) y las cepas K7 y K123 tuvieron el menor diámetro de halo (0.41 cm, Cuadro 2).

Cuadro 2. Propiedades bioquímicas relacionadas con la promoción del crecimiento vegetal de cepas aisladas de rizósfera y rizoplano de plantas establecidas en presas de jales del distrito minero de Zimapán, Hidalgo.

Cepa bacteriana [†]	Síntesis de AIA (µg mL ⁻¹)	Actividad de la enzima ACC desaminasa [‡] (µM α-cetobutirato mg ⁻¹ h ⁻¹)	Síntesis de sideróforos	Diámetro de halo (cm)	Origen
N9	11.12±0.04 b	1.13±0.30 cde	+	0.9	Rizósfera <i>Ricinus communis</i>
N16	9.08±0.04 h	1.82±0.05 abc	+	0.4	Rizoplano <i>Ricinus communis</i>
Mc4	8.89±0.04 i	1.13±0.02 cde	+	0.8	Rizoplano <i>Ricinus communis</i>
Mc81	9.88±0.06 e	1.42±0.28 bcd	-	0.0	Rizoplano <i>Ricinus communis</i>
Mc101	9.19±0.02 h	1.20±0.03 bcde	+	0.8	Rizósfera <i>Crotalaria pumila</i>
Mc107	10.53±0.05 d	0.33±0.12 ef	-	0.0	Residuo minero
Mc115	8.55±0.07 k	1.48±0.33 bcd	+	0.9	Rizósfera <i>Crotalaria pumila</i>
Mc119	8.73±0.02 j	1.04±0.12 cde	+	0.7	Rizoplano <i>Crotalaria pumila</i>
Mc126	9.59±0.03 f	1.40±0.27 bcd	+	0.8	Rizósfera <i>Crotalaria pumila</i>
Mc156	8.75±0.02 ij	1.01±0.12 cdef	-	0.0	Rizoplano <i>Acacia farnesiana</i>
Mc171	8.26±0.02 l	1.19±0.05 bcde	+	0.9	Rizósfera <i>Prosopis laevigata</i>
Mc173	11.55±0.05 a	1.19±0.04 bcde	+	1.6	Rizoplano <i>Prosopis laevigata</i>
Mc183	9.39±0.04 g	1.85±0.21 abc	-	0.0	Rizoplano <i>Prosopis laevigata</i>
Mc188	10.73±0.04 c	1.79±0.11 abc	-	0.0	Rizoplano <i>Prosopis laevigata</i>
K7	7.94±0.04 m	2.13±0.33 ab	+	0.4	Rizoplano <i>Ricinus communis</i>
K120	8.73±0.03 j	2.65±0.45 a	-	0.0	Rizoplano <i>Crotalaria pumila</i>
K123	8.27±0.07 l	1.40±0.42 bcd	+	0.4	Rizósfera <i>Crotalaria pumila</i>
K125	8.87±0.06 ij	0.65±0.13 def	-	0.0	Rizoplano <i>Crotalaria pumila</i>
K131	10.51±0.06 d	0.09±0.01 f	+	3.0	Rizósfera <i>Crotalaria pumila</i>
K162	8.40±0.05 kl	1.68±0.30 bc	+	1.9	Rizoplano <i>Prosopis laevigata</i>

[†] Las letras identifican el medio usado para el aislamiento de las cepas, agar nutritivo, King y Mac Conkey (N, K, y Mc respectivamente), mientras que los números designan el número de aislado

El alto porcentaje de bacterias productoras de sideróforos provenientes de sustratos contaminados concuerda con los resultados reportados por otros autores. Dell'Amico *et al.* (2005) analizaron comunidades bacterianas aisladas de *Graminaceae* que crecía en suelos contaminados. Los autores reportaron 26% del total de cepas aisladas fueron capaces de producir sideróforos. Idris *et al.* (2004) encontraron que la mayoría de cepas aisladas de las raíces de *Thlaspi. goesingense* (planta hiperacumuladora de Ni) pueden producir sideróforos. Mientras que Abou-Shanab *et al.* (2003) reportaron 60% de las bacterias aisladas de suelos de serpentinos producen sideróforos. Argumedo-Delira (2006) encontró 83%, de un total

de 133 rizobacterias aisladas de plantas que crecen en suelos contaminados con EPT, produjeron sideróforos. Hussein y Joo (2014) encontraron que cepas de *Pseudomonas putida* aisladas de suelos contaminados con EPT pueden producir 66% unidades de sideróforos. Así mismo, estos estudios concluyen que las bacterias capaces de sintetizar sideróforos en condiciones de contaminación con EPT, pueden desarrollar una función importante en conferir tolerancia a los EPT para sus plantas hospederas (Rajkumar *et al.*, 2009; Dell'Amico *et al.*, 2005; Idris *et al.*, 2004).

2.11. Síntesis de ácido indolacético y ACC desaminasa

Se encontró diferencias estadísticamente significativas ($\alpha=0.05$) en la producción de AIA. El contenido de esta auxina osciló de 7.94 a 11.55 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Las cepas Mc173, N9 y Mc188 sintetizaron la mayor ($\alpha=0.05$) concentración de AIA, y la cepa K7 produjo el menor contenido ($\alpha=0.05$) de AIA del conjunto de cepas bacterianas. Resultados similares reportó Yu *et al.* (2014). Los autores encontraron 91 cepas productoras de AIA (de un total de 136 cepas). Estas bacterias se aislaron a partir de residuos de una mina de magnetita y la producción de AIA osciló entre 2.2 a 83 $\mu\text{g mL}^{-1}$, no obstante, cabe mencionar que la producción de AIA por las BPCV puede variar entre las especies y cepas (Shahab *et al.*, 2009).

La actividad de la enzima ACC-desaminasa varió en un intervalo de 0.09 a 2.65 $\mu\text{M } \alpha\text{-cetobutirato mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Se ha reportado la presencia de esta enzima en una variedad de organismos que van desde bacterias hasta hongos y en algunos de casos se ha logrado aislar el gen relacionado con la actividad de esta enzima. Además de que la presencia de la enzima ACC desaminasa es relativamente común entre los microorganismos del suelo (Glick *et al.*, 2007).

Por otra parte, es importante resaltar que el uso de bacterias aisladas a partir de residuos de mina o sustratos contaminados con EPT; ofrece doble ventaja. Por una parte se pueden obtener organismos adaptados a las altas concentraciones de EPT y por otra se puede aumentar la capacidad de producción de biomasa, mejorar la posibilidad de supervivencia de éstas como consecuencia de los mecanismos de promoción del crecimiento vegetal que ofrecen las BPCV (Patten y Glick, 2002).

CONCLUSIONES

Los resultados mostraron que se puede obtener BPCV a partir de diferentes sustratos. Además la mayoría de las cepas bacterianas mostraron más de una característica bioquímica asociada a la promoción del crecimiento vegetal. De la colección inicial de microorganismos, aproximadamente 70% de los aislados solubilizó fósforo inorgánico y produjo AIA, mientras que 42% produjo sideróforos.

En cuanto a las bacterias aisladas de la rizósfera de plantas establecidas de residuos de mina, además de producir AIA, sideróforos y solubilizar P, también mostraron ser capaces de sintetizar la enzima ACC desaminasa. Algunas de estas bacterias se aislaron de la rizósfera de plantas de *R. communis*, lo cual sugiere que estas bacterias pudieran asociarse a *R. communis*.

LITERATURA CITADA

Abou-Shanab, R., T. Delorme, J. Angle, R. Chaney, K. Ghanem, H. Moawad, and H. Ghazlan. 2003. Phenotypic characterization of microbes in the rhizosphere of *Alyssum murale*. *International Journal of Phytoremediation* 5: 367-379.

- Ahemad, M. and M. Kibret. 2014. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. *Journal of King Saud University – Science* 26: 1-20.
- Alikhani, HA; Rastin-Saleh, N; Antoun, H. 2007. Phosphate solubilization activity of rhizobia native Iranian soils. In: Velázquez, E.; Rodríguez-Barrueco, C. (eds). *First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization*. Springer, Netherlands. pp. 35-41.
- Argumedo-Delira, R. 2006. Caracterización de rizobacterias aisladas de suelos contaminados con metales pesados. Tesis, Maestría en Ciencias, especialista en Edafología. Colegio de Postgraduados.
- Bashan, Y., A. A. Kamnev, and L. E. de-Bashan. 2013. Tricalcium phosphate is inappropriate as a universal selection for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth: a proposal for an alternative procedure. *Biology and Fertility of Soils* 49: 465-479.
- Castillo, G., B. Altuna, G. Michelena, J. Sánchez-Bravo, y M. Acosta. 2005. Cuantificación del contenido de ácido indolacético (AIA) en un caldo de fermentación microbiana. *Anales de Biología* 27: 137-142.
- Claus, G. and H. J. Kutzner. 1983. Degradation of indole by *Alcaligenes* spec. *Systematic and Applied Microbiology* 4: 169–180.
- de-Freitas, J. R.; M.R. Banerjee, and J.J. Germida. 1997. Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.). *Biology and Fertility of Soils* 24: 358-364.

- de-Freitas, J., M. Banerjee, and J. Germida. 1997. Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.). *Biology and Fertility of Soils* 24: 358-364.
- Dell'Amico, E.; L. Cavalca, and V. Andreoni. 2005. Analysis of rhizobacterial communities in *perennial graminaceae* from polluted water meadow soil, and screening of metal-resistant, potentially plant growth-promoting bacteria. *FEMS Microbiology Ecology* 52: 153-162.
- EPA (Environmental Protection Agency). 2007. The use of soil amendments for remediation, revitalization and reuse EPA 542-R-07-013. U. S. Environmental Protection Agency. Cincinnati, Ohio.
- Gamalero, E. and B. R. Glick. 2011. Mechanisms used by plant growth-promoting bacteria. In: D.K. Maheshwari (ed.), *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Nutrient Management*. Springer, Berlin. pp.17-46.
- Glick, B. R. 2003. Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. *Biotechnology Advances* 21: 383-393.
- Glick, B. R.; Z. Cheng, J. Czarny, and J. Duan. 2007. Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. *European Journal of Plant Pathology* 119: 329-339.
- Grandlic, C., M. Mendez, J. Chorover, B. Machado, R. Maier. 2008. Plant growth-promoting bacteria for phytostabilization of mine tailings. *Environmental Science and Technology* 42: 2079-2084.
- Haferburg, G. and E. Kothe. 2012. Biogeosciences in heavy metal-contaminated soils. In: E. Kothe and A. Varma (eds.). *Bio-geo interactions in metal-contaminated soils*. Springer, Berlin. pp. 17-34.

- Honma, M. and T. Shimomura. 1978. Metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Agricultural and Biological Chemistry* 42: 1825-1831.
- Husen, E. 2003. Screening of soil bacteria for plant growth promotion activities *in vitro*. *Indonesian Journal of Agricultural Science* 4: 27-31.
- Hussein, K. A. and J. H. Joo. 2014. Potential of siderophore production by bacteria isolated from heavy metal polluted and rhizosphere soils. *Current Microbiology* 68:717-723.
- Idris, R., R. Trifonova, M. Puschenreiter, W. Wenzel, and A. Sessitsch. 2004. Bacterial communities associated with flowering plants of the Ni hyperaccumulator *Thlaspi goesingense*. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 2667-2677.
- Jarabo-Lorenzo A, R. Perez-Galdona, M. Vega-Hernandez, J. Trujillo, and M. Leon-Barrios. 1998. Indole-3-acetic acid catabolism by bacteria belonging to the *Bradyrhizobium* genus. In: Elmerich C., Kondorosi A., Newton W. E. (eds) *Biological nitrogen fixation for the 21st century*. Kluwer, Dordrecht, 484p.
- Jensen J. B., H. Egsgaard, H. Vanonckelen, and B. U. Jochimsen. 1995. Catabolism of indole-3-acetic-acid and 4-chloroindole-3-acetic and 5-chloroindole-3-acetic acid in *Bradyrhizobium japonicum*. *Journal of Bacteriology* 177: 5762-5766.
- Kabata-Pendias, 2011. *Trace Elements in Soils and Plants* (4th ed.), CRC Press, Boca Raton. 548 p.
- Khan, A. A., G. Jilani, M. S. Akhtar, S. M. S. Naqvi, M. Rasheed. 2009. Phosphorus solubilizing bacteria: Occurrence, Mechanisms and their role in crop production. *Journal of Agricultural and Biological Science* 1: 48-58.

- Loredo-Osti, C., L. López-Reyes, and D. Espinosa-Victoria. 2004. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas: Una revisión. *Terra Latinoamericana* 22: 225-239.
- Mains, D., D. Craw, C. G. Rufaut, and C. M. Smith. 2006. Phytostabilization of gold mine tailings from New Zealand. Part 2: Experimental evaluation of arsenic mobilization during revegetation. *International Journal of Phytoremediation* 8: 163-183.
- Misra, N.; G. Gupta, and P. N. Jha. 2012. Assessment of mineral phosphate-solubilizing properties and molecular characterization of zinc-tolerant bacteria. *Journal of Basic Microbiology* 52: 549–558.
- Muleta, D., F. Assefa, E. Börjesson, and U. Granhall. 2013. Phosphate-solubilising rhizobacteria associated with *Coffea arabica* L. in natural coffee forests of southwestern Ethiopia. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences* 12: 73-84.
- Noumavo, P., E. Kochoni, Y. Didagbé, A. Adjanohoun, M. Allagbé, R. Sikirou, E. Gachomo, S. Kotchoni, and L. Baba-Moussa. 2013. Effect of different plant growth promoting rhizobacteria on maize seed germination and seedling development. *American Journal of Plant Sciences* 04: 1013-1021.
- Paredes-Mendoza, M. y D. Espinosa-Victoria. 2010. Ácidos orgánicos producidos por rizobacterias que solubilizan fosfato: una revisión crítica. *Terra Latinoamericana* 28: 61-70.
- Patten, C. L. and B. R. Glick. 2002. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 3795-3801.

- Penrose, D. M. and B. R. Glick. 2003. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiologia Hysiologia Plantarum* 118: 10-15.
- Rajkumar, M.; N. Ae, M. Narasimha, V. Prasad, and H. Freitas. 2009. Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. *Trends in Biotechnology* 28: 142-149.
- Rodríguez, H. and R. Fraa. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances* 17: 319-339.
- Rodríguez, H.; R. Fraga, T. Gonzalez, and Y. Bashan. 2006. Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant and Soil* 287: 15-21.
- Saharan, B. S. and V. Nehra. 2011. Plant growth promoting rhizobacteria: A Critical Review. *Life Sciences and Medicine Research* 2011: 1-30.
- Schwyn, B. and J. B. Neilands. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry* 160:47–56.
- Shahab, S.; A. Nuzhat and S. K. Nasreen. 2009. Indole acetic acid production and enhanced plant growth promotion by indigenous PSBs. *African Journal of Agricultural Research* 4: 1312-1316.
- Sharma, S., R. Sayyed, M. Trivedi, and T. Gobi. 2013. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus* 2: 587.
- Yu, X, Y. Li, C. Zhang, H. Liu, J. Liu, W. Zheng, X. Kang, X. Leng, K. Zhao, Y. Gu, X. Zhang, Q. Xiang, and Q. Chen. 2014. Culturable heavy metal-resistant and

plant growth promoting bacteria in V-Ti magnetite mine tailing soil from Panzihua, China. PLoS ONE doi:10.1371/journal.pone.0106618.

CAPÍTULO III

SELECCIÓN DE ENMIENDAS PARA LA ESTABILIZACIÓN DE ELEMENTOS POTENCIALMENTE TÓXICOS

RESUMEN

Se realizaron experimentos de equilibrio e incubación para seleccionar enmiendas que redujeran la disponibilidad de Cu, Pb, Cd y Zn de un residuo de mina de Zimapan, Hidalgo. Vermicompost y estiércol ovino se utilizaron como enmiendas orgánicas y perlita expandida como enmienda inorgánica. El experimento de equilibrio mostró que el vermicompost fue efectivo para reducir la disponibilidad extractable con $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0.01 M de Cd, Zn y As. La perlita expandida a dosis de 2% también redujo significativamente la concentración de Cd disponible. Por el contrario, el estiércol ovino solubilizó Cu, Pb, Zn y As. En el experimento de incubación vermicompost en dosis de 10% y 15% (m/m) y estiércol ovino en dosis 5% (m/m) redujeron la concentración de Pb extractable con DTPA. Así mismo, el estiércol ovino redujo la disponibilidad de Cu. No se observaron diferencias significativas en la disponibilidad de Zn por la adición de las enmiendas orgánicas. En el caso de Cd todas las enmiendas solubilizaron este elemento. Además, en el experimento de incubación la perlita expandida solubilizó los EPT. Los resultados obtenidos en el experimento de incubación sugieren que es necesario mayor tiempo (períodos de secado-humedecimiento) para la estabilización de EPT por la adición de enmiendas. Finalmente, se recomienda el uso de vermicompost y estiércol ovino para la inmovilización de EPT.

INTRODUCCIÓN

La estabilización química de EPT a través de enmiendas se ha considerado como una alternativa viable y económica para la remediación de sustratos contaminados con EPT. Ésta tiene la ventaja de que se puede aplicar tanto *in situ* como *ex situ* (Galende *et al.*, 2014). El objetivo es reducir la disponibilidad y movilidad de los EPT en el suelo o sustrato contaminado. En el caso de los residuos de mina, la adición de enmiendas permite hacer un preacondicionamiento del residuo al bajar la toxicidad del medio, para posteriormente introducir plantas (Córdova *et al.*, 2011). Las enmiendas también aceleran los procesos de inmovilización que incluyen: la sorción, precipitación, complejación y reacciones redox (Houben *et al.*, 2012). Sin embargo, se puede incrementar la solubilidad de algunos componentes tóxicos (Hernández-Soriano y Jiménez-López, 2012).

Durante los últimos años se ha propuesto una diversidad de enmiendas para la estabilización *in situ* de EPT (Lee *et al.*, 2009). El Cuadro 3 lista algunas de las enmiendas que se recomiendan y que han tenido éxito en la estabilización de Al, As, Cr, Cu, Pb, Mn, Mo, Ni y Zn. Las enmiendas que comúnmente se usan incluyen compuestos fosfatados, carbonatos, óxidos de Fe y Mn, diversos materiales orgánicos (Cuadro 4) y aluminosilicatos. También se ha buscado usar productos secundarios de industrias y últimamente se incursiona en la modificación química de algunos materiales para mejorar su efecto como enmienda.

Cuadro 3. Enmiendas propuestas para la inmovilización *in situ* de EPT (EPA, 2007).

Elemento	Enmiendas	Observación
Al	Materia orgánica y P, yeso mineral u otra fuente de Ca altamente soluble.	A pH ≤ 5.5 es tóxico, bajo contenido de P aumenta la toxicidad, alto contenido de Ca disminuye la toxicidad.
As	Materia orgánica, óxidos de Fe, Mn y Al; sulfatos de Fe con CaO, Fe ⁰ , goethita con sulfato de Fe(II), nanopartículas de Fe ⁰ , materiales arcillosos como limonita y bentonita.	A pH ≥ 8 es tóxico. El P en altas concentraciones causa la solubilidad del As.
CrO ₄ ²⁻	Reductores como: materia orgánica y biosólidos.	La movilidad depende del estado de oxidación del Cr, a pH ≥ 8 es tóxico. La adición de materiales alcalinos promueve la oxidación del Cr(III) a Cr(VI). Por lo que se recomienda acidificar el suelo a menos de 6.5. Su estabilidad es fuertemente dependiente del pH. A pH ≤ 5.5 es más tóxico y móvil, bajo contenido de materia orgánica causa toxicidad. Se recomienda ajustar pH a 6-7.
Cu	Carbonatos, fosfatos, materia orgánica y materiales adsorbentes como la paligorskita.	Bajo contenido de P aumenta la toxicidad del Pb. Se sugiere aumentar pH entre 6 y 8. Sí hay presencia de As elevar pH entre 5.5 – 6.
Pb	Compuestos que contienen P como la hidroxiapatita, roca fosfórica, sales a base de fosfatos, fosfato de diamonio, ácido fosfórico. Compuestos alcalinos como Ca(OH) ₂ , CaCO ₃ , CaO, cenizas, biosólidos, compost, yeso y fosfoyeso, óxidos de Fe y Mn (en caso de presencia de As).	
Mn	Incrementar pH a más de 7.	A pH ≤ 5.5 es tóxico.
Mo	Añadir Cu.	A pH ≥ 8 es más tóxico, se recomienda ajustar pH ente 5.5 y 6.5 y, bajo contenido de Cu promueve toxicidad.
Ni	P, materia orgánica, y materiales adsorbentes.	A pH ≤ 5.5 es más tóxico, se sugiere incrementar pH entre 7 y 8, bajo contenido de P más tóxico.
Zn	Materia orgánica, óxidos de Fe y Mn, arcillas como: paligorkita, sepiolita.	A pH ≤ 5.5 más tóxico, bajo contenido de P más tóxico. Incrementar pH entre 7 y 8.

Cuadro 4. Enmiendas orgánicas para la inmovilización de EPT (Park *et al.* 2011).

Enmienda	Sistema	Observaciones	Referencia
Compost de estiércol de aves	Suelo (Alfisol) contaminado artificialmente con Cd.	La aplicación de compost de estiércol de aves de corral cambio la fracción de Cd soluble e intercambiable a Cd unido a la fracción orgánica de 47.8% a 69.8%, por consiguiente disminuyó la absorción de Cd en plantas de <i>Brassica chinensis</i> L. de 56% a 63% en comparación con el tratamiento testigo.	Chen <i>et al.</i> (2010).
Desperdicios de jardinería, abono derivado de residuos sólidos urbanos.	Residuo de mina ácido con textura franco-arcillosa, altamente contaminado con As, Cu y Pb.	Tanto los desperdicios de jardinería así como el compost derivado de los residuos sólidos urbanos disminuyeron la absorción de metales en plantas de <i>Agrostis capillaris</i> a través de la unión de los metales con la materia orgánica.	Farrell <i>et al.</i> (2010).
Bonote de coco, compost de residuos verdes y corteza de madera.	Residuo de mina con altas concentraciones de Pb, Cu y Zn.	La aplicación de 10% y 20% de compost y bonote de coco redujeron significativamente la disponibilidad de Cu, Pb, y Zn (extractables con EDTA) debido a la capacidad de los residuos para inmovilizar metales en el suelo. También se promovió un aumento en la producción de biomasa en comparación con el suelo no enmendado.	Nwachukwu y Pulford. (2009).
Compost.	Suelo contaminado artificialmente con Cd.	La aplicación de compost disminuyó 70% el contenido de Cd intercambiable	Liu <i>et al.</i> (2009).
Lodos de plantas de tratamiento de aguas residuales, compost de residuos sólidos urbanos, compost de residuos de jardín.	Residuos de mina de explotación de pirita, con altas concentraciones de Cu, Pb y Zn.	La aplicación de enmiendas orgánicas redujo la concentración de Cu, Zn y Pb extractable con CaCl ₂ (0.01M).	Alvarenga <i>et al.</i> (2009).
Biosólidos, inóculante microbiano.	Suelo contaminado artificialmente con As, Cr y Zn.	Reducción significativa en la absorción de metales en <i>Jatropha curcas</i> , cuando sólo se adicionó biosólidos y en combinación con el inóculante. Se atribuyó a la estabilización de EPT en el suelo.	Juwarkar <i>et al.</i> (2008).
Compost de residuos verdes.	El suelo de una fundición desmantelada, contaminado con Cd y Zn.	El compost de residuos verdes redujo la lixiviación de Cd y Zn hasta 48% en el suelo.	Van Herwijnen <i>et al.</i> (2007).
Abonos orgánicos.	Suelos contaminados con Mn, Cr y Ni.	Los abonos orgánicos disminuyen la absorción de Mn, Cr y Ni en plantas de arroz	Chamon <i>et al.</i> (2005).

Cuadro 4. Enmiendas orgánicas para la inmovilización de EPT (modificado de Park *et al.* 2011; continuación).

Enmienda	Sistema	Observaciones	Referencia
Biosólidos.	Suelos de carga variable contaminados con Cu y Cr.	Los biosólidos fueron eficaces en la reducción de la disponibilidad de Cu por formación de complejos metálicos orgánicos y de Cr(VI) a través de la reducción de Cr (VI) a Cr (III).	Bolan <i>et al.</i> (2003).
Lodos de biosólidos municipales, desechos forestales, ceniza de madera, pulpa de papel, y compost.	Suelos urbanos contaminados con Zn, Pb y Cd	La aplicación superficial de biosólidos mezclados con ceniza de madera o de las demás enmiendas disminuyó significativamente la acidez y la concentración de Zn extractable con $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ en el subsuelo. Las enmiendas fueron capaces de restaurar una cubierta vegetal de los suelos contaminados.	Brown <i>et al.</i> (2003).
Cenizas, biosólidos.	Residuos de mina con altas concentraciones de Cd, Pb y Zn.	Las enmiendas redujeron la concentración de Cd, Pb y Zn en la solución del suelo y la fracción extractable con NH_4NO_3 .	Brown <i>et al.</i> (2005).
Vermicompost.	Aguas residuales contaminadas con Zn.	El vermicompost adsorbió un máximo de 2.49 mg de Zn g^{-1} a pH 2. los valores de las constantes de adsorción indicaron que el Zn^{2+} se unen fuertemente al vermicompost	Jordão <i>et al.</i> (2009)
Fibra de coco.	Soluciones acuosas de Ni y Zn.	La fibra de coco funciona como adsorbente si se trata con H_2O_2 para la remoción de EPT.	Shukla <i>et al.</i> (2006).
Carbón activado de fibra de coco.	Soluciones acuosas de Cd.	El carbón activado con tamaño de partícula entre 250 y 500 μm adsorbió 93.4 mg Cd g^{-1} a pH 5.0. El mecanismo de adsorción fue el intercambio catiónico.	Kadively y Namasivayam (2003).
Rastrojo de soja tratado con ácido cítrico.	Soluciones acuosas de Cu.	La capacidad máxima de adsorción de Cu^{2+} fue de 0.64 mmol g^{-1} a pH 6.0. La capacidad de adsorción del rastrojo aumentó cuando el pH de la solución aumentó de 2 a 6.	Zhu <i>et al.</i> (2008).
Fibras de cáñamo.	Soluciones acuosas de Pb, Cd y Zn.	La máxima capacidad de adsorción de Pb, Cd y Zn fue de 78 mmol kg^{-1} , en soluciones individuales. Mientras, que la adsorción en solución ternaria de Pb, Cd y Zn fue de 74.0, 35.0 y 35.0 mmol kg^{-1} , respectivamente.	Pejic <i>et al.</i> (2009).
Cáscara de coco molida.	Soluciones acuosas de Cd.	La capacidad máxima de adsorción de cáscara de coco en polvo fue de 285.7 mg g^{-1} de Cd.	Pino <i>et al.</i> (2006).
Residuos de semilla de olivo.	Soluciones acuosas de Pb, Ni, Cd.	La adsorción máxima de Cd, Pb, Ni, y Cu fue 68.8, 44.7, 36.3 y 31.9 mmol kg^{-1} , respectivamente.	Fiol <i>et al.</i> (2006).

Cuadro 4. Enmiendas orgánicas para la inmovilización de EPT (modificado de Park *et al.* 2011; continuación).

Enmienda	Sistema	Observaciones	Referencia
Carbón activado	Soluciones acuosas de Cu.	La adsorción de Cu^{2+} varió desde 44 a 95 mmol kg^{-1} y de 20 a 44 mmol kg^{-1} para Pb.	Zaini <i>et al.</i> (2009).
Cascara de café y residuos de pulpa, vermicompost y estiércol vacuno.	Soluciones acuosas de Pb.	Vermicompost y estiércol vacuno remueven 98% del Pb en la solución. El Pb precipita, formando óxidos de Pb (PbO) y PbFe .	Duarte <i>et al.</i> (2011).
Carbón (biochar) de residuos de poda de huertos, pellets de árboles de abeto y estiércol.	Residuo de mina de Cave del Predil, Italia, con altas concentraciones de Cd y Pb.	El carbón (biochar) de estiércol a dosis de 1.5% redujo la absorción de Cd y Pb en plantas de <i>Anthyllis vulneraria</i> , <i>Noccaea rotundifolium</i> . Y el carbón (biochar) fabricado a partir de residuos de huerto a dosis de 3% disminuyó la absorción de Cd en plantas de <i>Anthyllis vulneraria</i> , <i>Noccaea rotundifolium</i> y <i>Poa alpina</i> grown.	Fellet <i>et al.</i> (2014).
Compost de olivo y estiércol de vaca, biochar producido a partir de residuos e huertos.	Residuo de la mina Mónica, Madrid, España, con altas concentraciones de Cd, Pb y Zn.	El carbón (biochar) a dosis de 10% fue efectivo para reducir la concentración de Cd, Pb y Zn después de 4 semanas de incubación. Sin embargo, las pruebas de germinación demostraron que el tratamiento con 10% de compost aumentó la tasa de germinación de <i>Lolium perenne</i> (de 16% a 37%) en comparación con el tratamiento testigo. El ensayo de inhibición con <i>Vibrio fischeri</i> demostró que el tratamiento que combina la aplicación de compost y carbón (5% v/v) redujo la toxicidad.	Beesley <i>et al.</i> (2014)
Compost.	Suelos agrícolas contaminados con Pb.	El compost disminuyó la disponibilidad de Pb. El efecto puede deberse a que el compost aumentó el pH del suelo.	Fleming <i>et al.</i> (2013)

Aparentemente se tiene amplia gama de materiales que pueden usarse para reducir la disponibilidad de metales y metaloides tóxicos, sin embargo, dada la variabilidad en el proceso, es necesario hacer pruebas de su efecto en los materiales a estabilizar, para abatir costos y tiempos de respuesta.

Es importante resaltar que los resultados obtenidos después de la aplicación de una enmienda dependen mucho de las propiedades del suelo, sustrato o residuo de mina y de la enmienda (Houben *et al.*, 2012). Y en algunos casos se ha reportado

mayor disponibilidad de algunos elementos (Hernández-Soriano y Jiménez-López, 2012, Zhang y Zhang, 2010).

A pesar de que no se puede estandarizar y generalizar el proceso de estabilización química de EPT a través de enmiendas, dado que la estabilización depende mucho de las condiciones ambientales, propiedades tanto del suelo como de la enmienda, a continuación se listan algunas recomendaciones para la elección de enmiendas.

- Los materiales deben seleccionarse con base en su capacidad de adsorción (Barbafieri *et al.*, 2013), su disponibilidad y costo (Duarte-Zaragoza *et al.*, 2011).
- Evaluar y comparar precios de las enmiendas con la duración de su efectividad (Barbafieri *et al.*, 2013).
- La enmienda debe inmovilizar rápidamente EPT después de su aplicación sin necesidad de tratamientos adicionales (Miller y Miller, 2007).
- Evitar que el material ocasione amplias fluctuaciones de pH y la movilización de uno o más EPT (Kumpiene *et al.*, 2008).
- Efecto sinérgico, varios EPT de carga opuesta pueden tener efecto sinérgico y aumentar la capacidad de retención de los materiales (Kumpiene *et al.*, 2008).
- Efecto antagónico, la aplicación de una enmienda reduce la biodisponibilidad de un EPT, pero aumenta la disponibilidad de otro o más EPT (EPA, 2007; Kumpiene *et al.*, 2008). Por ejemplo, si tenemos un suelo contaminado con Pb y As, una solución es la aplicación de P, lo cual permitiría reducir la biodisponibilidad del Pb (EPA, 2007; Park y Bolan, 2013). No obstante esto

ocasionaría aumentar la solubilidad del As. En este caso la elección de la enmienda depende de los EPT y el riesgo que representan (EPA, 2007).

Es posible aplicar la combinación de dos enmiendas (Kumpiene *et al.*, 2008). Por ejemplo, Beesley *et al.* (2014) mostraron que la aplicación de biochar en conjunto con compost (10% v/v) puede reducir la toxicidad de Pb, Cd y Zn. Así mismo se aumentó el porcentaje de germinación de *Lolium perenne*.

Además de la inmovilización de EPT, las enmiendas pueden modificar propiedades químicas del suelo como pH, conductividad eléctrica (CE), capacidad de intercambio catiónico (CIC) y físicas como la retención de humedad, densidad aparente del suelo e incluso hasta el color (EPA, 2007). Favoreciendo así el desarrollo de cubiertas vegetales y la actividad biológica. En el caso de los microorganismos las enmiendas orgánicas, son fuente de nutrientes (N, C y P) energía para los microorganismos. El objetivo de este capítulo fue proponer una enmienda que reduzca la biodisponibilidad de los EPT de un residuo de mina de Zimapán, Hidalgo, para hacer un precondicionamiento del sustrato y así facilitar el establecimiento de *R. communis* en condiciones de invernadero.

OBJETIVO

Seleccionar una enmienda que reduzca la disponibilidad de los elementos potencialmente tóxicos para facilitar el establecimiento en condiciones de invernadero de *R. communis* en el residuo de mina bajo estudio.

HIPÓTESIS

La perlita expandida es efectiva para estabilizar Pb y Cd en experimentos de incubación.

El estiércol ovino fresco reduce la concentración de Pb extractable en el residuo de mina bajo estudio en experimento de equilibrio.

El vermicompost estabiliza Zn tanto en experimento de equilibrio como de incubación.

El vermicompost estabiliza Pb tanto en experimento de equilibrio como de incubación.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Caracterización del residuo de mina y enmiendas

El residuo de mina bajo estudio proviene de la presa de jales Santa María del distrito minero de Zimapán, Hidalgo ($20^{\circ}44'11.78''N$, $99^{\circ}23'55.55''O$; Figura 7a). Como enmienda inorgánica se utilizó perlita expandida y para el caso de las enmiendas orgánicas, se empleó vermicompost (proveniente del compostaje de desechos de jardín, cocinas y estiércol caballar) y estiércol ovino fresco (proveniente de la granja del Colegio de Postgraduados).



Figura 7. a) Ubicación del Residuo de mina Santa María en el distrito minero de Zimapán, Hidalgo, b) detalle del depósito Santa María.

Tanto enmiendas como residuo de mina se secaron a temperatura ambiente durante 3 días. Éstos se homogenizaron y se tamizaron con un tamiz de acero inoxidable de abertura de malla de 2 mm. Para la caracterización de los materiales se determinaron las variables: pH, conductividad eléctrica (CE), materia orgánica, N, S, P, Ca y Mg totales, sulfatos solubles (solo para el residuo de mina) y concentración de EPT extractables y totales. Las metodologías que se emplearon a continuación se describen a detalle. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

3.1.1. Determinación de la textura

Del residuo de mina se pesaron 50 g y se depositaron en un vaso de aluminio. Se adicionó agua destilada hasta cubrir la superficie con una lámina de 2 cm y 10 mL

de hexametáfosfato de sodio a 5%. La mezcla se agitó durante 15 min con ayuda de un agitador mecánico. Luego, ésta se transfirió a una probeta de 1 000 mL. El hidrómetro de bouyucos se colocó en la muestra y se aforó hasta 1 000 mL con agua destilada y posteriormente se retiró. Enseguida la muestra se agitó con un agitador de mano durante 1 min y 40 seg e inmediatamente se tomó lectura con el hidrómetro, así como de la temperatura de la muestra. 2 h después, la segunda lectura con el hidrómetro y de la temperatura se tomaron. El contenido de arena, limo y arcilla se calculó con las siguientes ecuaciones (Day, 1965):

$$\text{Arena} = 100 - (1^\circ \text{ lectura corregida} \times 2)$$

$$\text{Arcilla} = 100 - (2^\circ \text{ lectura corregida} \times 2)$$

$$\text{Limo} = 100 - (\text{arena} (\%) - \text{arcilla} (\%))$$

3.1.2. Determinación de pH y conductividad eléctrica

Del residuo minero se pesaron 10 g y se depositaron en un tubo de plástico de 50 mL, enseguida se agregaron 20 mL de agua destilada. La muestra se agitó durante 15 min a 120 oscilaciones por minuto (opm). Después de la agitación se midió el pH, la CE se determinó 24 h después en la misma solución (Rowell, 1994). Las muestras de vermicompost, perlita expandida y estiércol ovino se procesaron de la misma manera, sin embargo la suspensión para el análisis se preparó en relación vermicompost:agua de 1:4 y una relación de 1:6 para el estiércol ovino y la perlita expandida, debido a la alta capacidad de absorción de agua de los materiales.

3.1.3. Contenido de materia orgánica procedimiento de Walkley y Black (1934)

Se tomó aproximadamente 1 g de residuo de mina y se tamizó en un tamiz de abertura de malla de 0.5 mm. Del residuo tamizado se pesaron 0.25 g y se

depositaron en un matraz Erlenmeyer de 500 mL. Enseguida se añadieron 10 mL de solución de $K_2Cr_2O_7$ 1 N y la muestra se agitó durante 1 min. Después se agregaron 20 mL de H_2SO_4 concentrado y la muestra se dejó reposar durante 30 min.

Posteriormente, a la muestra se le agregaron 200 mL de agua destilada, 10 mL de H_3PO_4 concentrado y 5 gotas de indicador difenilamina. Finalmente, se tituló el dicromato residual con una solución de $FeSO_4$ 0.5 N hasta el cambio de vire a verde botella. El porcentaje de materia orgánica se calculó a través de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Materia orgánica} = 10 \times \left(1 - \frac{P}{T}\right) \times 1.34$$

donde:

T= mL de $FeSO_4$ 0.5 N para la titulación del testigo.

P= mL de $FeSO_4$ 0.5 N para la titulación de la muestra.

3.1.4. Contenido de materia orgánica por incineración

Para la determinación por incineración aproximadamente 5 g de vermicompost y estiércol ovino se secaron durante 12 h en un horno a 105 °C, para remover el agua. Posteriormente, las muestras se colocaron en un desecador por 30 min. Después, se pesaron 3 g de muestra y se depositaron en crisoles a peso constante. El peso del crisol con la muestra se registró. Enseguida las muestras se colocaron en una mufla a 600 °C por 2 h. Transcurrido este tiempo, las muestras se enfriaron en desecador a temperatura ambiente y se pesaron (Dean, 1974).

3.1.5. Nitrógeno total

Para la determinación de nitrógeno total se pesó 0.1 g de vermicompost o estiércol ovino y se depositó por separado en un tubo Pyrex de 25 x 150 mm. Enseguida se agregaron 4 mL de la mezcla H₂SO₄-ácido salicílico ([Anexo IX-1](#)) y una pizca de mezcla digestora ([Anexo IX-2](#)). Las muestras se dejaron en predigestión durante 12 h. Posteriormente, éstas se calentaron hasta que la solución tomo un color claro y la digestión se continuó durante una hora más.

Las muestras se enfriaron a temperatura ambiente y se agregaron aproximadamente 5 mL de agua destilada. La solución se pasó a un matraz Microkjeldahl de destilación y se procedió a hacer la destilación. El destilado se recibió en un matraz Erlenmeyer de 125 mL que contenía H₃BO₃ a 4% e indicador rojo de metilo y verde de bromocresol. Finalmente, el destilado se valoró con una solución de H₂SO₄ 0.01 N hasta el cambio de vire a rosa. El contenido de N total se calculó con la siguiente formula:

$$\%N = \frac{(P - T) \times N \times 14}{m \times 10}$$

donde:

P= mL de H₂SO₄ para titular la muestra

T= mL de H₂SO₄ para titular el testigo

N= normalidad de la solución H₂SO₄

m= peso de la muestra

3.1.6. Determinación de sulfatos solubles

Se pesaron 10 g de residuo de mina y se colocaron en un vaso de precipitados, enseguida se agregaron 70 mL de agua destilada y 10 mL de HCl. El vaso de precipitados se tapó con un vidrio de reloj y se calentó hasta ebullición durante 15 min. Posteriormente, el extracto se enfrió a temperatura ambiente y se agregó 1 g de carbón activado. El extracto se filtró con papel de poro de 8 μm y se traspasó a un matraz volumétrico de 100 mL y se aforó con agua destilada.

Se tomó una alícuota del extracto de 1 mL y se depositó en un matraz Erlenmeyer de 250 mL. Posteriormente, se añadieron 5 mL de solución estabilizadora ([Anexo X](#)) y aproximadamente 0.8 g de $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. La muestra se mezcló durante 1 min en un agitador magnético. Se midió la absorbancia de la muestra a una longitud de onda de 420 nm. El contenido de sulfatos se determinó por interpolación comparando la absorbancia de la muestra con una curva patrón de SO_4^{2-} que osciló entre 5 y 40 $\text{mg SO}_4^{2-} \text{ L}^{-1}$ ([Anexo XI](#)).

3.1.7. Concentración total de elementos potencialmente tóxicos

Para la digestión siguiendo este procedimiento, 500 mg de residuo de mina se colocó en un matraz de digestión y se agregó 1 mL de H_2O_2 a cada muestra. Las muestras se dejaron en reposo durante 1 h. A continuación, se agregaron 4 mL de $\text{HNO}_3:\text{HClO}_4$ (3:1). Las muestras se dejaron en predigestión durante 8 h a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, los matraces se calentaron en una rampa de temperatura a 45 °C y 65 °C por 30 min cada periodo. Posteriormente, la temperatura se elevó hasta 110 °C durante 24 h. Terminada la digestión, las muestras se filtraron en papel de poro de 2.5 μm , se aforaron a 50 mL con agua

desionizada y se conservaron en frascos de plástico para su posterior análisis (EPA 3050).

La determinación de los elementos Cu, Zn, Cd, Fe, Mn, As, Pb, Ni, Ca y Mg, se realizó por espectrofotometría de absorción atómica por el método de flama. Mientras que los elementos K y P se determinaron por flamometría y espectrofotometría de UV-Visible, respectivamente.

3.1.8. Concentración total de azufre

Se hizo una dilución 1:100 del extracto obtenido para la determinación de EPT totales, posteriormente se tomó una alícuota de 1 mL y se depositó en un matraz Erlenmeyer de 250 mL. Se agregó 1 mL de solución acondicionadora de SO_4^{2-} , 8 mL de agua destilada y una pizca de BaCl_2 . La muestra se agitó durante 1 min e inmediatamente la absorbancia de la muestra se midió a una longitud de onda de 420 nm. El contenido total de S se obtuvo por interpolación al comparar la absorbancia de la muestra contra una curva patrón de sulfatos que oscilo entre 10 y 50 mg S L⁻¹ ([Anexo XII](#)).

3.1.9. Concentración extractable de elementos potencialmente tóxicos

Se pesaron 5 ± 0.001 g de residuo de mina y enmiendas y se depositaron tubos Falcón de 50 mL. Enseguida se agregaron 25 mL de una solución compuesta de DTPA (0.05 M), TEA (0.01 M) y CaCl_2 (0.1 M) pH 7.3. Los tubos se agitaron durante 2 h a 120 opm y se centrifugaron a 2 000 rpm durante 10 min. Después, las muestras se filtraron con papel de poro de 2.5 μm y se conservaron en frascos de plástico para su posterior análisis (Lindsay y Norvell, 1978). El contenido de EPT se determinó por espectrofotometría de absorción atómica por el método de flama.

3.1.10. Análisis cualitativo de enmiendas y residuo de mina en espectrofotometría infrarroja

Las enmiendas y el residuo se secaron y se molieron hasta obtener partículas finas. Posteriormente se les realizó un barrido de 4 000 a 600 cm^{-1} en un espectrofotómetro de infrarrojo de transformadas de Fourier, para la identificación de los posibles grupos funcionales que intervienen en la inmovilización de EPT.

3.1.11. Determinación de la capacidad de campo

En un embudo con papel filtro se colocaron 100 g de residuo de mina y 100 mL de agua destilada. El embudo se cubrió con plástico y se dejó reposar durante 24 h. Posteriormente, el residuo de mina se colocó en un bote de aluminio (previamente secado y a peso constante) y se pesó. La muestra se secó a 105 °C durante 5 h y se enfrió en un desecador a temperatura ambiente por 30 min. La muestra seca se pesó y el contenido de humedad se determinó usando la siguiente formula:

$$\% \text{ Capacidad de campo (CC)} = \frac{\text{Peso humedo} - \text{Peso seco}}{\text{Peso humedo}} \times 100$$

3.2. Selección de enmienda

3.2.1. Experimento de equilibrio

Se pesaron 5 ± 0.001 g de residuo de mina y se depositaron en un tubo de plástico de 50 mL. Se aplicaron de forma independiente las siguientes dosis de perlita expandida: 0.1, 0.25, 0.5 y 1 g. Mientras que para las enmiendas orgánicas se aplicaron tres niveles (5%, 10% y 15%) de vermicompost y estiércol ovino.

Una solución de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0.01 M se usó para simular las condiciones electrolíticas de la solución intersticial del suelo con una fuerza ionica de 30 mM. A

cada mezcla de residuo de mina con enmienda se equilibró con 25 mL de solución de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. Los tubos se agitaron durante 2 h a temperatura ambiente en un agitador rotatorio a 60 vueltas por minuto. Durante el equilibrio se determinaron las variables de pH y CE.

Al terminar la agitación, las muestras se centrifugaron, filtraron con papel filtro de poro 2.5 μm y se conservaron en frascos de plástico para su posterior análisis. La concentración de Cu, Pb, As, Cd y Zn se determinó por espectrofotometría de absorción atómica, a través del método de flama.

3.2.2. Experimento de incubación

Para este experimento se utilizaron los mismos niveles de tratamiento que el experimento de equilibrio ([Capítulo III 3.2.1](#)). Del residuo de mina seco y tamizado se pesaron 50 g y se mezclaron con las cantidades correspondientes a cada tratamiento. La mezcla se depositó en frascos de plástico de 100 mL. A cada mezcla se le agregó 10 mL de agua destilada (correspondientes a 80% de la humedad de capacidad de campo del residuo de mina). Las muestras se incubaron por un periodo de 30 días en la oscuridad a temperatura ambiente y cada semana se homogenizaron. Posteriormente, las unidades experimentales se trasladaron a un invernadero y se sometieron a tres períodos de humedecimiento y secado.

Después del último periodo de humedecimiento y secado, las muestras se homogenizaron y se tomaron 4 g de ésta. La determinación de la concentración extractable de EPT se realizó con la metodología descrita en el [Capítulo III sección 3.1.9](#).

3.2.3. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos del experimento de equilibrio y de incubación se analizaron con el paquete estadístico SAS versión 9.0. Todos los análisis se realizaron usando el procedimiento del modelo lineal generalizado (GLM), para identificar la existencia de diferencia entre las muestras. Así mismo se realizó una comparación de medias con la prueba de diferencia significativa honesta de Tukey (DHS). Para ambos análisis se utilizó $\alpha=0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3. Caracterización química de residuo de mina y enmiendas

El residuo presentó una textura arenosa (82% arena y 18% limo), y pH neutro (NOM-021-SEMARNAT-2000). Mientras que la perlita expandida tuvo pH moderadamente ácido (NOM-021-SEMARNAT-2000), contrario al vermicompost y el estiércol ovino que mostraron pH fuertemente alcalino (NOM-021-SEMARNAT-2000). La CE de los materiales se relaciona a los problemas de salinidad. En los residuos el contenido puede variar por la adición de sales que a veces se usan en el proceso (Farrokhpay, 2011). Tanto el residuo de mina y la perlita expandida tuvieron CE baja y su efecto sobre la salinidad puede ser ligeramente bajo. El vermicompost tuvo CE con un efecto moderadamente salino y el estiércol ovino puede llegar a tener efecto negativo sobre la salinidad del residuo de mina (Cuadro 5).

Cuadro 5. Propiedades químicas de residuo de mina y enmiendas.

Variable	Residuo de mina	Vermicompost	Estiércol ovino	Perlita expandida
pH	6.91±0.04	8.47±0.01	8.96±0.01	5.60±0.07
CE (dS m ⁻¹)	2.10±0.02	5.21±0.05	13.64±0.07	1.71±0.01
Materia orgánica (%)	0.58±0.13	57.67±0.29	22.17±0.27	NA
N total (%)	NA	0.96±0.04	2.20±0.08	NA
Ca total (%)	15.53±1.49	2.04±0.05	1.53±0.01	0.13±0.01
Mg total (%)	0.80±0.05	0.61±0.01	0.80±0.02	0.03±0.00
K total (%)	0.23±0.02	1.79±0.03	5.32±0.25	0.27±0.02
P total (%)	0.06±0.00	0.46±0.02	0.43±0.01	0.02±0.01
S total (%)	1.56±0.59	NA	NA	NA
SO ₄ ²⁻ (mg L ⁻¹)	258.26±12.44	NA	NA	NA

CE, Conductividad eléctrica; NA, No analizado.

El porcentaje de materia orgánica del residuo fue extremadamente pobre. Varios estudios reportan que el bajo contenido de materia orgánica y macronutrientes son característicos de los residuos de mina (Mendez y Maier, 2008), debido a que es roca molida con sales y otros compuestos que se adicionan durante la concentración del mineral. Además, las características de los residuos de mina varían dependiendo del proceso que se usó para la concentración del mineral. La elección del método de concentración depende de la carga acompañante. Para ejemplificar la complejidad de los procedimientos mencionaremos algunos: 1) sulfurización con sulfuro de sodio y flotación con colectores catiónicos y aminas, 2) uso de ácidos grasos, 3) sulfuración y activación a través de iones metálicos y flotación con colectores sulfhidrilo como los xantatos. 4) sulfidrilos colectados con mercaptanos, 5) agentes quelantes y 6) mezcla de cationes y aniones colectados con xantatos (Ejtemaei *et al.*, 2014). Si se adicionan xantatos (R(1-6)-C-CS-SMetal), quelatantes y alcohol la proporción de materia orgánica en los residuos se incrementa (Ejtemaei *et al.*, 2014; Farrokhpay, 2011). Por otra parte, la presencia de metales, como el Cu pueden causar interferencia durante la cuantificación del carbono orgánico.

En cuanto a las enmiendas, vermicompost tuvo el mayor porcentaje de materia orgánica seguido del estiércol ovino. El contenido de N total en vermicompost fue de 0.96% y 2.20% en el estiércol ovino. La aplicación de estos materiales puede servir como suplemento de este macronutriente para las plantas, lo mismo sucede con los demás macronutrientes (P, K, Ca y Mg). Mientras, que el residuo de mina presentó bajo contenido de P, K y Mg.

La concentración total de Cd, Pb y As en el residuo de mina superó las concentraciones de referencia totales (CT_R) para suelos con uso agrícola y residencial que establece la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004. Es decir, hay riesgo potencial; ya que existen asentamientos humanos prácticamente al lado de los montículos de los residuos (Figura 8). Por lo que los depositantes de los residuos no han cumplido con la normatividad ambiental. También, hay alto riesgo para los ecosistemas y cuerpos de aguas naturales cercanos a las presas de jales; debido a las concentraciones de Cd, Pb y As. En cuanto a las enmiendas orgánicas, el elemento que se encontró en mayor abundancia es el Fe seguido del Mn. Mientras que Fe y Pb son los elementos que se encontraron en mayor concentración en la perlita expandida (Cuadro 6).

Cuadro 6. Concentración total de elementos potencialmente tóxicos en residuo de mina y enmiendas.

EPT (mg kg ⁻¹)	Residuo de mina	Vermicompost	Estiércol ovino	Perlita expandida
Fe	91 129±7 396	935±11	965±123	2 575±221
Mn	1 107±49	197±69	138±4	12±0
Cu	1 480±90	36±1	8±1	1±1
Zn	57 569±3 161	72±4	94±3	12±1
Ni	49±3	20±1	22±1	21±2
Cd	53±5	2±1	5±1	5±1
Pb	1 748±215	33±9	28±2	65±17
As	30 075±6 846	Tz	Tz	Tz

EPT= elemento potencialmente tóxico; Tz=trazas



Figura 8. Población cercana al residuo de mina Santa María del distrito minero de Zimapan, Hidalgo.

La extracción de EPT con DTPA-TEA-CaCl_2 representa una estimación de la concentración de EPT que se encuentran en la solución del suelo en forma de iones libres, complejos solubles o bien en formas fácilmente lábiles (Davidson, 2010). La concentración de EPT extractables presente en el residuo de mina tuvo la siguiente tendencia $\text{Zn} > \text{Pb} > \text{Fe} > \text{Cu} > \text{Mn} > \text{Cd} > \text{Ni}$. A pesar de que el Zn se encontró en mayor concentración que los otros elementos, la fracción móvil de éste (concentración de EPT extraída con DTPA como porcentaje del contenido total de EPT) fue 0.15%. Mientras que la fracción móvil de Cd y Pb fue 3.64% y 4.74% respectivamente, por lo que hay alta disponibilidad de estos elementos para las plantas. En adición, la contribución de EPT por parte de las enmiendas es baja (Cuadro 7).

Cuadro 7. Concentración extractable con DTPA de elementos potencialmente tóxicos en residuo de mina y enmiendas.

EPT (mg kg ⁻¹)	Residuo minero	Vermicompost	Estiércol ovino	Perlita expandida
Fe	17.18±3.19	120.10±4.67	40.01±4.03	20.31±3.44
Mn	2.44±0.11	55.91±1.37	45.39±0.32	1.59±0.32
Cu	9.36±0.09	9.15±0.48	5.76±0.68	3.48±0.19
Zn	88.92±5.17	58.70±1.88	5.66±0.20	6.07±0.49
Ni	0.78±0.15	0.29±0.38	11.20±12.85	9.26±2.74
Cd	1.93±0.10	0.99±0.76	2.18±0.75	1.49±0.82
Pb	82.98±2.94	3.38±2.13	0.09±1.35	21.41±2.71

EPT= Elemento potencialmente tóxico

3.4. Análisis cualitativo de enmiendas y residuo de mina en espectrofotometría infrarroja

Los análisis por absorción atómica y plasma son herramientas poderosas que nos dan información de la cantidad de elementos presentes, pero no de las interacciones que ocurre entre los EPT y otras moléculas (Dupuy y Douay, 2001). Por lo que se consideró importante obtener información de los posibles grupos funcionales que pueden participar en la adsorción de EPT, y sobre los mecanismos de interacción que ocurren entre las enmiendas y los EPT durante la estabilización. Hasta el momento poco se entiende como ocurre la reducción de la actividad de los EPT.

Se detectaron grupos funcionales silanos en la perlita expandida (Figura 9). El pico en 1 033 cm⁻¹ es característico de las vibraciones de los enlaces covalentes Si-O, mientras que el pico en 783 cm⁻¹ es resultado las vibraciones de los enlaces Si-O (Al-Oweini y El-Rassy, 2009). Estos resultados sugieren que la perlita expandida está formada por un red de sílice, lo cual no es extraño; debido a que la perlita expandida

usualmente se fabrica a partir de vidrios volcánicos y puede tener en su composición más de 70% de Si (Sari *et al.*, 2007).

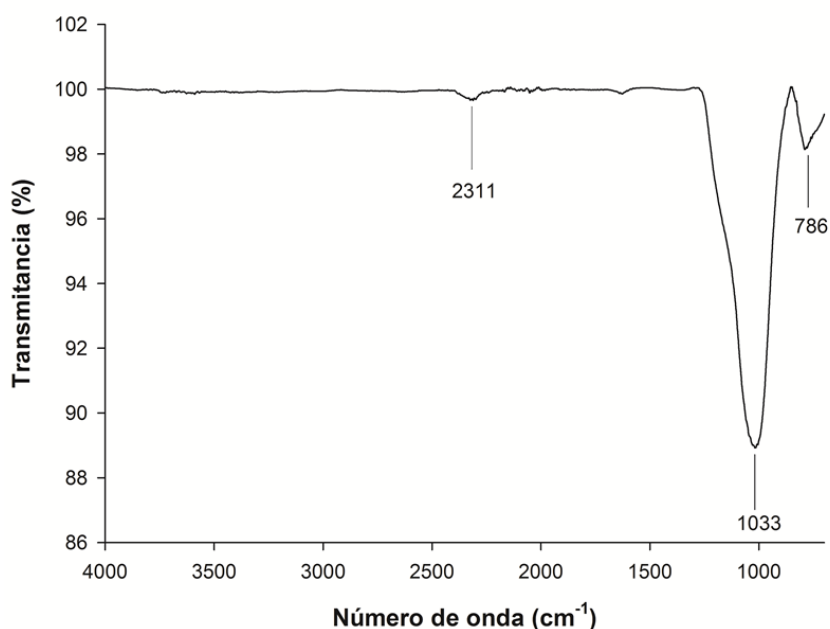


Figura 9. Espectro de absorción en infrarrojo de perlita expandida.

El espectro en IR del vermicompost (Figura 10) mostró la presencia de grupos funcionales amino, alcanos y compuestos fosfatados. El pico en $3\ 652\ \text{cm}^{-1}$ es característico de las vibraciones del enlace O-H que pueden estar unidos a compuestos aromáticos y aminas (Tan, 1998; Rajiv *et al.*, 2013). El pico en $1\ 629\ \text{cm}^{-1}$ es resultado de las vibraciones de los enlaces C=N, RCONH₂ y RNH₂ de grupos amida. Los picos en $2\ 972$ y $2\ 899\ \text{cm}^{-1}$ son característicos de las vibraciones de grupos RCO-OH pertenecientes a los alcanos. Mientras que la intensa banda de absorción que aparece en $1\ 039\ \text{cm}^{-1}$ se puede asignar al enlace C-O, típico de esteroides, éteres y polisacáridos (Rajiv *et al.*, 2013; Senesi y Loffredo, 2005). También se puede notar la presencia de P en la composición del vermicompost, un pico en $2\ 306\ \text{cm}^{-1}$ es producto de las vibraciones de la unión P-H.

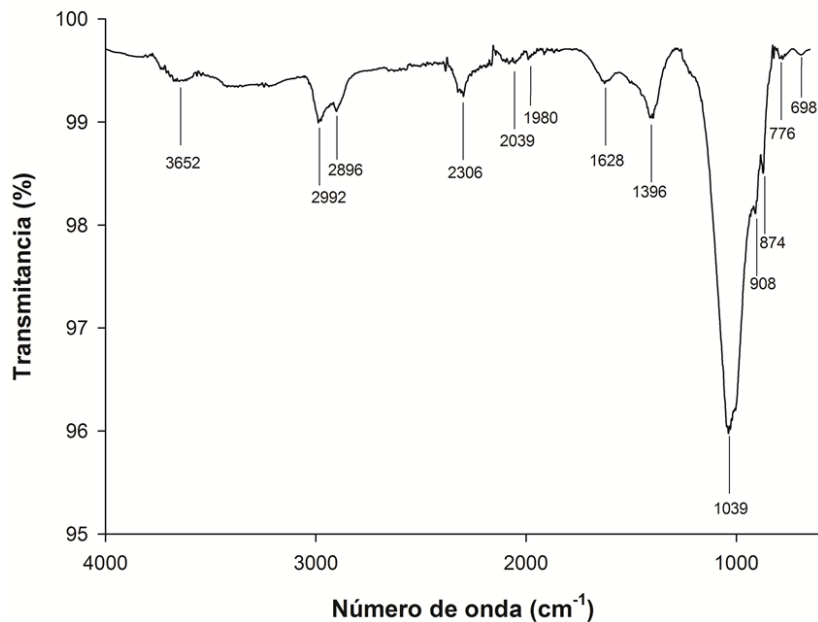


Figura 10. Espectro de absorción en infrarrojo de vermicompost.

En el espectro del estiércol ovino (Figura 11) se observó un pico en $2\,301\text{ cm}^{-1}$ producto de las vibraciones de los enlaces P-H (Skoog *et al.*, 2001). Mientras que el pico en $1\,406\text{ cm}^{-1}$ corresponde a los enlaces C-C anillados. El pico en $1\,646\text{ cm}^{-1}$ se puede atribuir a alcanos anillados y a las vibraciones de los enlaces C=N (Skoog *et al.*, 2001; Tan, 1998). También, se encontró la presencia de grupos carboxílicos y alcanos (picos en $2\,917$, $2\,851$ y $1\,034\text{ cm}^{-1}$). El pico en $3\,652\text{ cm}^{-1}$ es característico de las tensiones del enlace O-H que pueden estar unidos a compuestos aromáticos y aminas (Tan, 1998; Rajiv *et al.*, 2013).

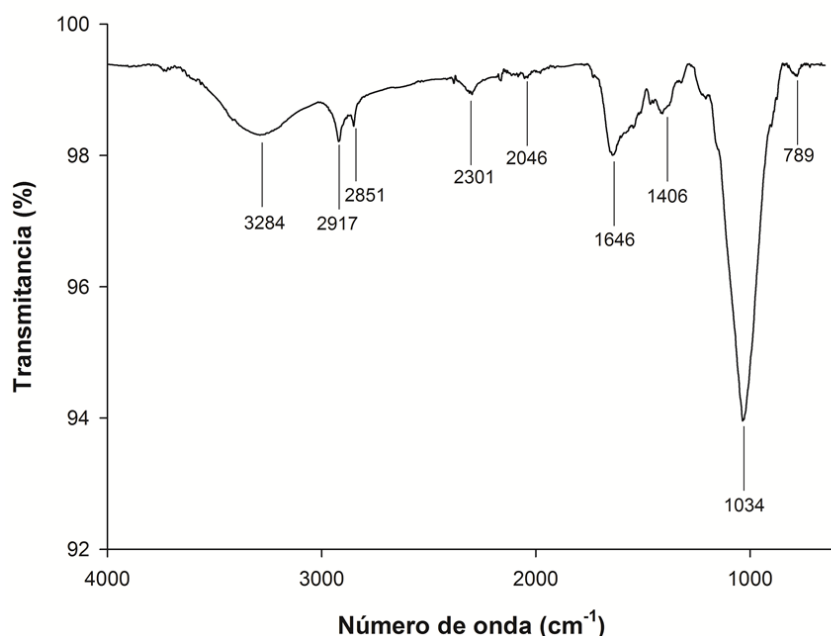


Figura 11. Espectro de absorción en infrarrojo de estiércol ovino.

Finalmente, el vermicompost, como el estiércol ovino, tiene grupos funcionales como: carboxílicos, hidroxílicos, fenólicos y aminos (Figura 10 y 11). Estos grupos funcionales tienen gran afinidad con los EPT (Pérez-Esteban *et al.*, 2014; Rashid, 1985). Son responsables de las reacciones de quelación, intercambio catiónico y formación de sales entre la materia orgánica y los EPT (Rashid, 1985).

Los EPT presentes en el residuo pueden estar unidos a ligandos como CO, NO, OH⁻, CN⁻, produciendo bandas características (Stuart, 2004). El análisis en IR del residuo de mina (Figura 12) mostró la presencia de grupos –OH que corresponden a los picos en 3 692 y 1 600 cm⁻¹ (Stuart, 2004; Skoog *et al.*, 2001, Tan, 1998; Senesi y Loffredo, 2005). La presencia de estos grupos se puede relacionar con el grado de hidratación de algunos compuestos inorgánicos en el residuo (Stuart, 2004, Orlov, 1995). Los picos en 2 969 y 2 868 cm⁻¹ corresponden a

vibraciones del enlace C-H de compuestos alifáticos (Skoog *et al.*, 2001; Senesi y Loffredo, 2005). También se pueden apreciar bandas que corresponden al ion CO_3^{2-} en $1\,411$ y 878 cm^{-1} (Stuart, 2004; Stenber *et al.*, 2010). El pico en $2\,326\text{ cm}^{-1}$ se atribuye al enlace de un metal divalente con el H (M-H), mientras que el pico en 713 cm^{-1} es característico del enlace M-H (Stuart, 2004). Además, el pico en $1\,059\text{ cm}^{-1}$ es producto de las vibraciones del doble enlace entre metales divalentes y el oxígeno (M=O; Stuart, 2004), Este pico también se relaciona a las vibraciones producidas por los enlaces Si=OR y S=O (Skoog *et al.*, 2001).

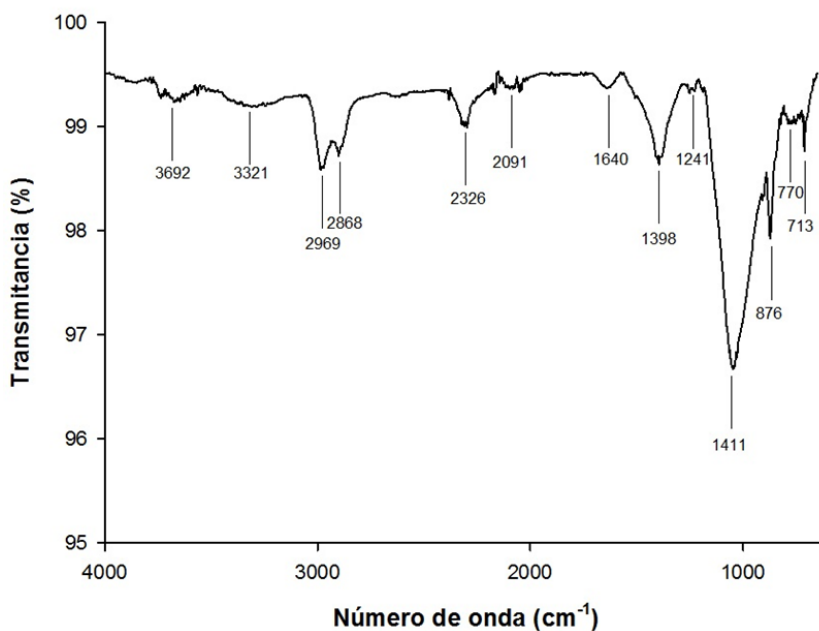


Figura 12. Espectro de absorción en infrarrojo de residuo de mina.

La interpretación del espectro en IR del residuo de mina puede llegar a ser difícil debido a la sobreposición de bandas que pueden generar algunos enlaces, sin embargo el análisis proporciona información útil y se sugiere que en estudios futuros estos resultados se complementen con análisis de difracción de Rayos X o resonancia magnética. También hay que tomar en consideración que durante los

procesos de extracción y concentración ocurren reacciones que hacen que los elementos presentes en el residuo puedan tener una química compleja. Ejtemaei *et al.* (2014) mencionaron que si se usan xantatos durante la extracción de Zn, se pueden formar especies como el ion xantato (ROCS_2^-), monotiocarbonato (ROCOS^-), ácido xántico (ROCS_2H), disulfuro de carbono (CS_2) o dixantogeno ($\text{ROC S}_2\text{S}_2\text{COR}$).

3.5. Variación de la concentración de EPT al utilizar enmiendas orgánicas e inorgánicas en experimentos de equilibrio

3.5.1. Plomo

Se observó aumento estadísticamente significativo ($\alpha=0.05$) en la concentración de Pb extractable con $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ por efecto de la adición de estiércol ovino, como lo muestra la Figura 13. La concentración de Pb en la solución extractante aumentó de 0.98 a 9.99 mg kg^{-1} . Esto puede deberse a la formación de complejos orgánicos-Pb solubles (McBride, 1994; Sauvé *et al.*, 1997) y complejos hidróxido-Pb que se generan en condiciones alcalinas (McBride, 1994; Kumpiene, 2008; Steinnes 2010), como las que se generaron al aplicar estiércol ovino. El pH de la solución en el equilibrio (Figura 14) fue de 8.1 a 8.2. Sauvé *et al.* (1998) mostraron que a partir de un pH de 6.5 a 8, conforme se aumenta el pH se promueve la formación y disolución de complejos orgánicos-Pb y por tanto se aumenta la solubilidad de este elemento debido a un alto contenido de materia orgánica.

La perlita expandida también originó la solubilización de Pb. Estos resultados contrastan con los reportados por Ghassabzadeh *et al.* (2010), quienes concluyeron que la perlita expandida es efectiva para la adsorción de Pb; ya que se puede remover hasta 92% de Pb en solución en condiciones de pH 6.5 y temperatura de 20

°C. Sari *et al.* (2007) reportaron que la perlita expandida puede remover hasta 95% de Pb a pH 5. Sin embargo, los autores señalan que la adsorción en perlita expandida es altamente dependiente del pH, la dosis y el tiempo de contacto.

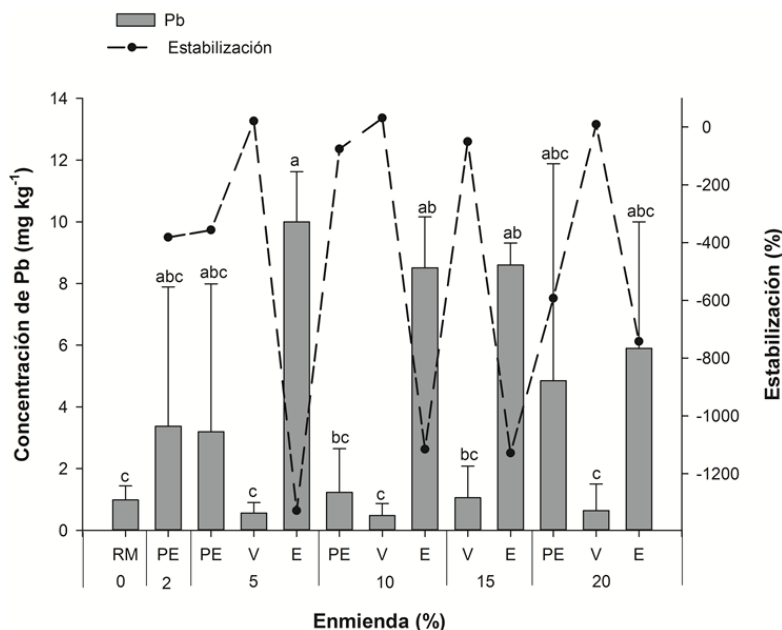


Figura 13. Concentración de Pb en solución extractante de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ en el residuo de mina (RM) y en función de los tratamientos: vermicompost (V), estiércol ovino (E) y perlita expandida (PE).

La baja adsorción de Pb en la perlita expandida se puede explicar debido al incremento de las cargas positivas en la superficie de ésta, y por tanto se genera una repulsión electrostática entre los iones metálicos (M^{2+}) y los grupos cargados positivamente de la superficie de la perlita (Si-OH^{2+} ; Sari *et al.*, 2007; Ghassabzadeh *et al.*, 2010). Esto se puede correlacionar con el pH de la solución en equilibrio, se observó que al agregar perlita expandida se incrementó el pH del residuo de mina de 7.53 a 7.6-7.74 (Figura 14). Se sugiere que el incremento en el pH se debe a la adsorción de iones H^+ de la solución en la superficie cargada negativamente en la perlita con la finalidad generar electroneutralidad en la solución. Estudios también

sugieren que el aumento en el pH es producto del intercambio de H^+ en la solución con algunos cationes alcalinos que se encuentran en la perlita expandida (Alkan *et al.*, 2005). Así mismo, los iones H^+ compiten fuertemente con los iones metálicos en los procesos de adsorción (Sari *et al.*, 2007).

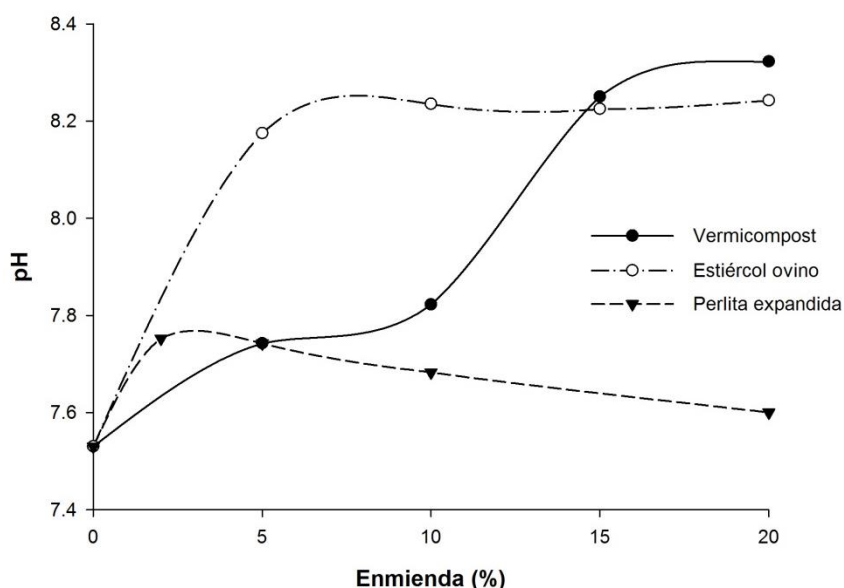


Figura 14. Variación del pH en el equilibrio en función de los tratamientos: vermicompost, estiércol ovino y perlita expandida.

No se observó efecto significativo ($\alpha=0.05$) en la estabilización de Pb al incorporar vermicompost, lo que implica baja adsorción de este elemento sobre la enmienda. Estos resultados discrepan con los obtenidos por Carrillo-González *et al.* (2014), Carrasquero-Durán *et al.* (2006), Carrasquero-Durán y Flores (2009) y Duarte *et al.* (2011) quienes encontraron que la adición de compuestos orgánicos (vermicompost y estiércol de vaca, respectivamente) son efectivos para reducir la disponibilidad del Pb. Aparentemente, el grado de fermentación del estiércol es importante para el efecto que tiene sobre la biosorción de los iones metálicos.

3.5.2. Cadmio

Se encontró disminución estadísticamente significativa ($\alpha=0.05$) en la concentración de Cd en la solución extractante por la adición de vermicompost y perlita expandida (93% y 96% de estabilización, respectivamente), en comparación con el tratamiento testigo (Figura 15). La mayor disminución ($\alpha=0.05$) se observó en el tratamiento con perlita expandida 2% (equivalente a 0.1 g por cada 5 g de residuo de mina).

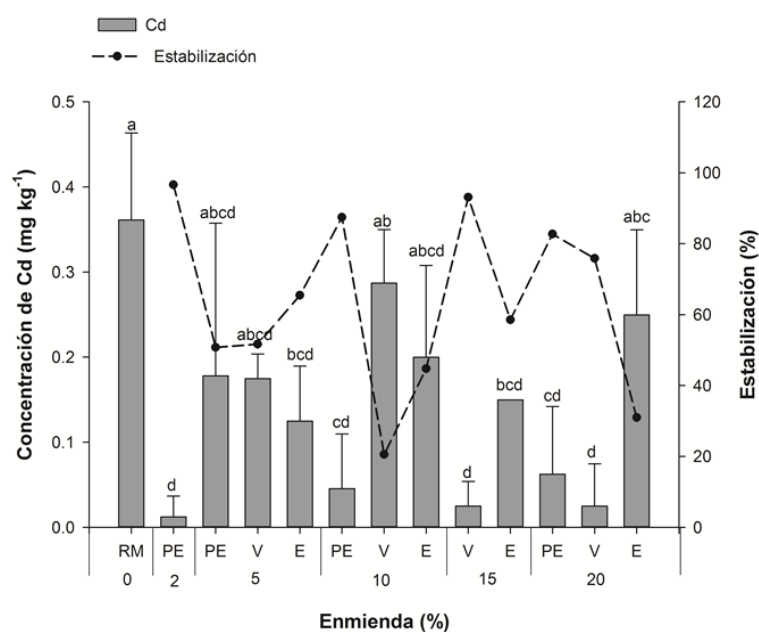


Figura 15. Concentración de Cd en solución extractante de Ca(NO₃)₂ en función de los tratamientos: residuo de mina (RM), vermicompost (V), estiércol ovino (E) y perlita expandida (PE).

Para el caso del tratamiento con vermicompost, las dosis 15% y 20% no mostraron efecto significativamente diferentes ($\alpha=0.05$) entre tratamientos. Estos resultados coinciden con lo reportado por Carrillo-Gonzalez *et al.* (2014), quienes encontraron que aplicar vermicompost disminuyó significativamente la disponibilidad

de Cd a partir de 5%, sin embargo, al aplicar mayor dosis (hasta 30%) no se obtienen resultados significativamente diferentes comparados con la menor dosis. Mientras que Mathialagan y Viraraghavan (2002) reportaron 55% de remoción de Cd en experimentos de equilibrio con perlita expandida. También, se encontró disminución significativa en la disponibilidad de Cd por la aplicación de estiércol ovino a dosis de 5% y 15%.

3.5.3. Cobre

No se obtuvo efecto significativo ($\alpha=0.05$) en la estabilización de Cu por la adición de vermicompost y perlita expandida. Sin embargo, se observó aumento significativo ($\alpha=0.05$) en la concentración de este elemento al adicionar estiércol ovino (Figura 16). El aumento se puede ligar al cambio en el pH inducido por el estiércol ovino, como lo muestra la Figura 14. McBride (1994) mencionó que la movilidad de Cu es fuertemente dependiente del pH y ésta puede incrementar significativamente bajo condiciones de pH muy alcalinos y formar complejos orgánicos-Cu²⁺. Así mismo, el Cuadro 9 muestra correlación positiva entre el contenido de Cu y pH, así como con el contenido de Zn, As y Pb. La nula respuesta a la adición de vermicompost y el aumento derivado de la adición de estiércol contrasta con lo reportado por Soler Rovira *et al.* (2010), quienes encontraron que la adición de biosólido (30 ton ha⁻¹) y leonardita (25 ton ha⁻¹) disminuyó el Cu extractable. Estos autores atribuyeron la estabilidad del Cu a la asociación con ácidos húmicos introducidos con las enmiendas.

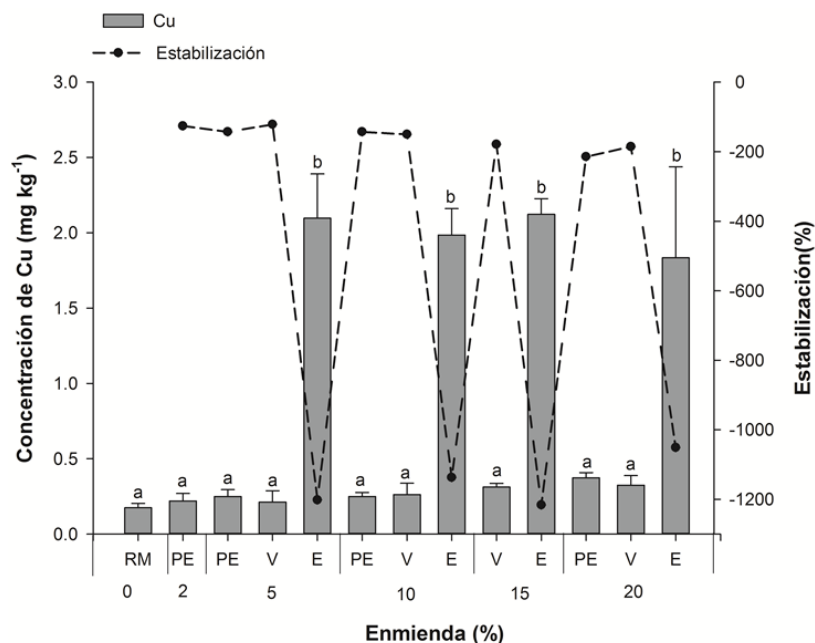


Figura 16. Concentración de Cu en la solución extractante de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ en el residuo de mina (RM) y en función de los tratamientos: vermicompost (V), estiércol ovino (E) y perlita expandida (PE).

Cuadro 8. Coeficientes de correlación de Pearson entre elementos potencialmente tóxicos y pH.

	pH	Zn	As	Pb
Cu	0.63	0.84	0.73	0.74
As	0.41	0.69		
Pb	0.36	0.68		

Significancia a $\alpha=0.05$

3.5.4. Zinc

No se encontraron diferencias significativas ($\alpha=0.05$) en la estabilización de Zn por la adición de vermicompost ni perlita expandida (Figura 17). Sin embargo, si se encontró aumento significativo ($\alpha=0.05$) por la adición de estiércol ovino, lo cual probablemente se explique por la formación de complejos orgánicos-Zn y Zn-

hidróxidos (McBride, 1994) y a la oxidación de los sulfuros por la adición de materia orgánica. Se ha reportado que la aplicación de estiércol fresco puede incrementar la solubilidad de Zn y Cd, debido al alto contenido de carbono orgánico disuelto (COD) que suele contener la materia orgánica fresca, la cual forma complejos solubles con los EPT (Walker *et al.*, 2004; Almás *et al.*, 2000; Sauvé *et al.*, 2000; Tandy *et al.*, 2009). En contraste, se ha reportado que la adición de compost redujó hasta en dos veces la disponibilidad del Zn en suelos contaminados (Farrell y Jones, 2010). Sin embargo, la concentración inicial del Zn fue muy baja comparada con las concentraciones observadas en el presente trabajo. Es muy probable que en este caso la reacción de degradación del estiércol solubilice algunas formas de Zn.

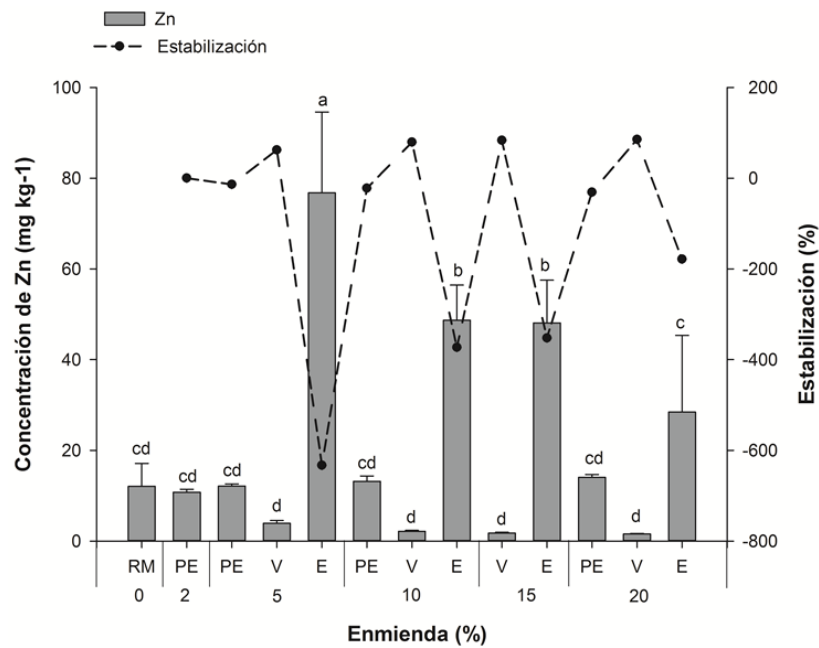


Figura 17. Concentración de Zn en la solución extractante de Ca(NO₃)₂ en el residuo de mina (RM) en función de los tratamientos: vermicompost (V), estiércol ovino (E) y perlita expandida (PE).

3.5.5. Arsénico

Por otra parte, la concentración de As extractable en el residuo fue de 11.82 mg kg⁻¹. Se observó disminución significativa ($\alpha=0.05$, Figura 18) en la concentración de As al adicionar 5% y 15% de vermicompost (0.38 y 1.58 mg kg⁻¹, respectivamente). Sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas entre ellas. La adición de perlita expandida no tuvo efecto significativo ($\alpha=0.05$) sobre la estabilización de este elemento. Mientras que el estiércol ovino generó su solubilización hasta 280% con respecto al tratamiento testigo (Figura 18). Esto contrasta con lo reportado por Farrell y Jones (2010), pues la adición de compost de residuos verdes, residuos de cocina y papel así como de compost derivado de residuos sólidos urbanos disminuyó el As disponible y absorbido por las plantas.

El aumento de As en la solución puede asociarse a la formación de complejos entre el As y los grupos aminos de la materia orgánica disuelta (MOD; Saada *et al.*, 2003). Esto se correlaciona con el espectro en IR del estiércol ovino donde se encontró la presencia de grupos aminos. Por otra parte se ha encontrado que los aniones orgánicos promueven la movilidad del As, en especial cuando el As está asociado a la fracción de óxidos. Así mismo, se ha demostrado que la MOD participa en la oxidación del arsenito o la reducción del arseniato, esto resulta importante ya que hay un cambio en la especiación del As (Bauer y Blodau, 2006), no olvidar que ambas especies químicas coexisten al mismo pH y la dominancia de alguna de ellas depende de la actividad de electrones en el medio. Fleming *et al.* (2013) sugirieron que la solubilización de As por efecto de compost, se debe al aumento en el pH de la

solución del suelo, lo que promueve que disminuya la fuerza de adsorción del As en los minerales. También mencionaron que el As compite con el fosfato por los sitios de adsorción en la materia orgánica. Además la presencia de aniones como el oxalato, acetato entre otros interfieren en la adsorción de fosfato, y dado que el arseniato es homólogo es probable que también haya interferencia en su adsorción.

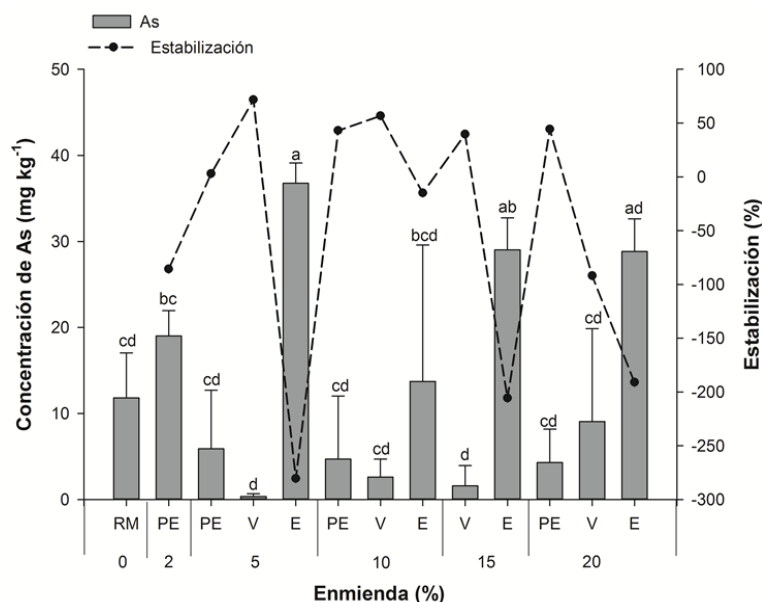


Figura 18. Concentración de As en la solución extractante de Ca(NO₃)₂ en el residuo de mina (RM) y en función de los tratamientos: vermicompost (V), estiércol ovino (E) y perlita expandida (PE).

Finalmente, la formación de compuestos órgano-metálicos móviles es resultado de las diferentes interacciones entre EPT y las sustancias orgánicas presentes en las enmiendas. Diferentes mecanismos de interacción pueden estar ocurriendo, estos incluyen la formación de complejos mono- y bidentados, así como de complejos dentro y fuera de la esfera (Minkina *et al.*, 2006). La estabilidad de estos complejos va estar influenciada por la naturaleza y grado de humificación de la materia orgánica. Así mismo, de factores como pH del medio y la concentración de

electrolitos en la solución del suelo (Rashid, 1985, Schwab *et al.*, 2007). Como se puede observar en la Figura 19, la CE del residuo aumentó con la adición de enmiendas. En el caso de la adición de vermicompost y perlita expandida se considera que la CE tiene efecto moderadamente salino. Sin embargo, la adición de estiércol ovino parece aumentar de manera proporcional la CE y tiene un efecto salino. Los electrolitos pueden interferir con las reacciones de quelación. Se ha demostrado que la formación de complejos metal-orgánicos decrece con el incremento de la fuerza iónica en la solución del suelo (Rashid, 1985).

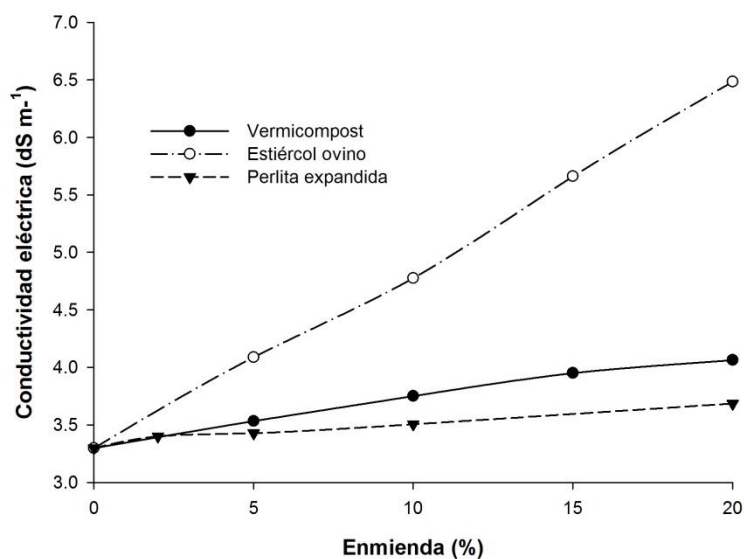


Figura 19. Variación de la conductividad eléctrica en función de los tratamientos: vermicompost, estiércol ovino y perlita expandida.

3.6. Variación de la concentración de EPT al utilizar enmiendas orgánicas e inorgánicas en experimentos de incubación

3.6.1. Plomo

Estiércol ovino en dosis de 5% (m/m) y vermicompost (10% y 15% m/m) fueron efectivas para la inmovilización de Pb (17, 16 y 18% de inmovilización, respectivamente) después de tres periodos de humedecimiento y secado (75 días), como lo muestra la Figura 20. Estos resultados son contrarios con los obtenidos en el experimento de incubación, lo cual sugiere que es necesario mayor tiempo para que ocurran las reacciones lentas entre la enmienda y el residuo de mina para la estabilización de los EPT (Martinez y Motto, 2000).

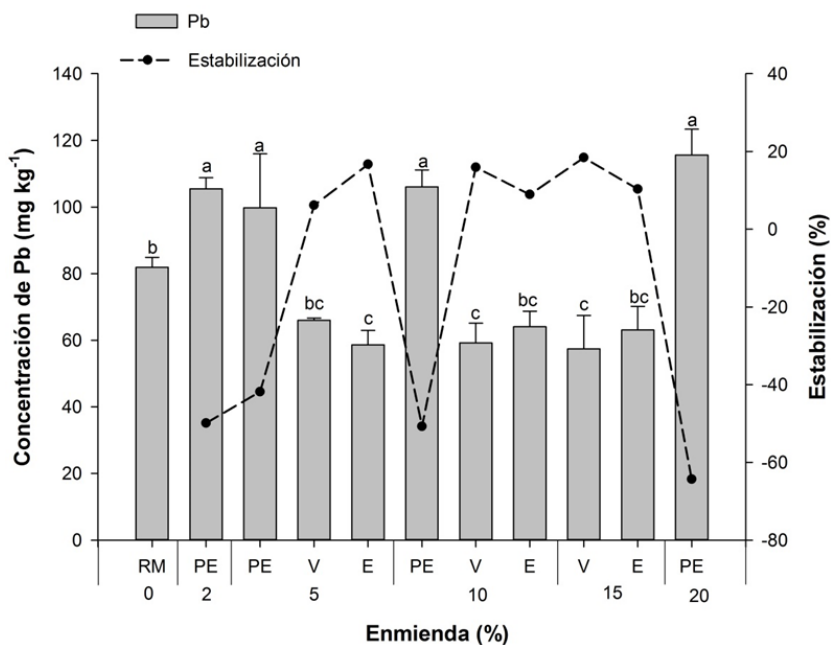


Figura 20. Concentración de Pb extractable con DTPA en el residuo de mina (RM) y en función de los tratamientos: vermicompost (V), estiércol ovino (E) y perlita expandida (PE).

El pH es uno de los factores que afecta la disponibilidad de los EPT en suelo. Se ha observado que la solubilidad del Pb disminuye mientras aumenta el pH (Kabata y Pendias, 1994). Estudios realizados en suelos con pH de 4 a 11 mostraron que la adsorción de Pb mejoró conforme el pH aumentó (EPA, 1999). Además, el Pb puede precipitar en los suelos si la concentración soluble de éste excede aproximadamente los 4 mg L⁻¹ a pH 4 y 0.2 mg L⁻¹ a pH 8 en presencia de P y Cl (EPA, 1999). La Figura 21 muestra la variación de pH en el residuo en función de las enmiendas aplicadas. Se puede observar que la perlita expandida cambió el pH del residuo de 7.7 a 7.8-7.9. El intervalo de variación del pH por efecto del vermicompost fue de 7.5 a 8, en ambos casos tanto perlita expandida como vermicompost mantienen pH moderadamente alcalino. En el caso del estiércol ovino, el pH osciló entre 8.4 y 8.5. Estos resultados difieren con lo obtenido en el experimento de equilibrio. En este sentido, la estabilización de Pb por efecto del estiércol ovino no puede ligarse únicamente al efecto del pH. Como se mencionó anteriormente, la formación de complejos entre la materia orgánica y su estabilidad dependen de la naturaleza y el grado de descomposición de la materia orgánica, así como de las condiciones de temperatura, pH y concentración de electrolitos en la solución del suelo (Rashid, 1995).

La presencia de compuestos orgánicos pueden ayudar a formar complejos de Pb de alto peso molecular poco solubles (Farrell y Jones, 2010), por ejemplo, se ha reportado la formación de complejos coordinados entre el Pb y las sustancias húmicas insolubles (Borůvka y Drábek, 2004). En adición, la materia orgánica humificada contiene moléculas más reactivas que la materia orgánica poco descompuesta (Rashid, 1995). Los grupos carboxílicos y fenólicos son los más

importantes en las reacciones de quelación entre materia orgánica y EPT (Rashid, 1995).

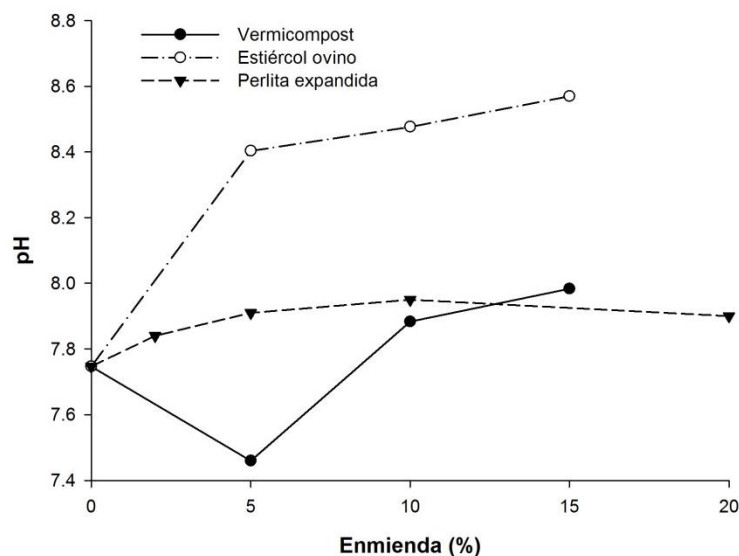


Figura 21. Variación del pH en el equilibrio en función de los tratamientos: vermicompost, estiércol ovino y perlita expandida.

El análisis en IR (Figura 22a) de la mezcla residuo de mina con estiércol ovino, muestra la desaparición de la banda en $1\ 646\ \text{cm}^{-1}$ de la enmienda original (banda asignada a los compuestos anillados C-C). También se puede observar la ausencia de bandas en la región de $1\ 830$ a $1\ 650\ \text{cm}^{-1}$. Esto quiere decir que no se encuentran grupos carbonilo presentes en la mezcla residuo de mina con estiércol ovino. Se ha encontrado que la reacción entre ácido aspártico y Cu hace desaparecer picos en $2\ 080$ y $1\ 640$, $1\ 690$ y $1420\ \text{cm}^{-1}$ en el complejo metal-orgánico (correspondientes a grupos carboxil y NH), sin embargo se observó la aparición de nuevos grupos (Rashid, 1985). Mientras que Dupuy y Douay (2001) observaron que al incrementar la concentración de Pb el espectro en IR de la materia orgánica del

suelo sufrió perturbaciones, es decir, se incrementó la intensidad de las bandas en 1 670 y 1 690 cm^{-1} correspondientes a los grupos carboxílico y el ion carboxilato, mientras que la banda en 1 710 cm^{-1} desapareció. En ambos espectros también se puede observar la formación de nuevas bandas en la región de 772 a 650 cm^{-1} correspondiente a los compuestos aromáticos, esto quiere decir que se están formando nuevos compuestos. También se aprecia la aparición de pequeñas bandas en el intervalo de 3 748 y 3 515 cm^{-1} , las cuales se generan por las vibraciones de tensión de los enlaces O-H y N-H (Stuart, 2004; Stenberg, 2010). Lo cual indica que se están formando algunos compuestos hidratados o bien los grupos OH pueden estar unidos a los compuestos aromáticos o aminas (Tan, 1998; Rajiv *et al.*, 2013)

Tanto de estiércol ovino como de vermicompost muestran aumento de las bandas características de las tensiones del enlace C-H de compuestos alifáticos (2 990, 2 986, 2 926, y 2 905 cm^{-1} ; Stuart, 2004; Stenberg *et al.*, 2010). Y los picos en 2 302, 2 383 y 2 352 cm^{-1} son producto de las vibraciones del enlace P-H. La aparición de estos picos, son indicio del aporte de fosfatos por parte de las enmiendas. Además, las bandas en 1415, 1408, 880 y 875 cm^{-1} también aumentan y corresponden al anión CO_3^{2-} .

La adición de perlita expandida causó la solubilización de Pb en los cuatro niveles de tratamiento, incrementando la fracción móvil (como porcentaje del contenido total de Pb en el residuo de mina) de 4.74% a 6.6%. Este comportamiento también se encontró en el experimento de equilibrio donde la perlita expandida promovió la solubilización de Pb.

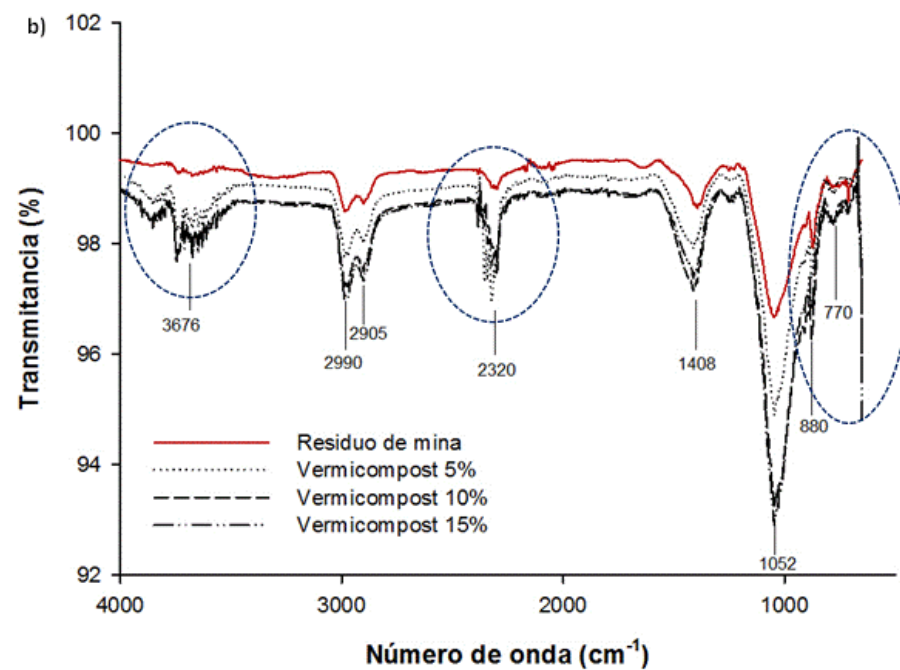
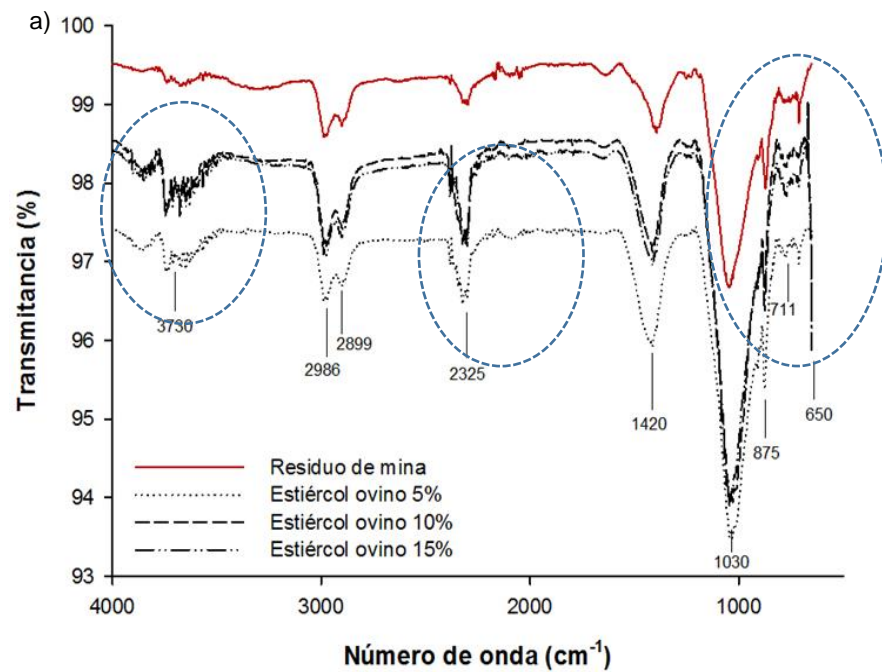


Figura 22. Espectro en infrarrojo de residuo de mina y de los tratamientos a) estiércol ovino y b) vermicompost a diferentes dosis.

3.6.2. Cadmio

Tanto vermicompost como estiércol ovino no mostraron tener efecto significativo ($\alpha=0.05$) en la estabilización de Cd (Figura 23). Estos resultados son diferentes a los que se obtuvieron en el experimento de equilibrio donde las dosis de 15% y 20% de vermicompost, así como 5% y 15% de estiércol mostraron ser efectivas para abatir la disponibilidad de Cd. Además, la adición de estiércol ovino contrasta con los resultados reportados por Galende *et al.* (2014), quienes encontraron que estiércol ovino puede reducir la disponibilidad de Cd (extractable con CaCl_2) en un residuo de mina ácido.

La nula respuesta a la adición de enmiendas orgánicas se puede atribuir a que el Cd se une débilmente a la materia orgánica (McBride, 1994). También se ha reportado que los complejos de Cd con los ácidos húmicos (principalmente con los grupos $-\text{COOH}$ y $-\text{OH}$) forman complejos poco estables. Esto se debe a que el Cd se caracteriza por unirse a través de intercambio catiónico (Borůvka y Drábek, 2004). Las reacciones de intercambio catiónico entre materia orgánica y EPT suelen ser uno de los principales mecanismos de reacción. Estas reacciones son reversibles y se pueden representar por la siguiente ecuación $\text{RCOOH} + \text{M} \leftrightarrow \text{RCOOM} + \text{H}^+$ (Rashid, 1985; McBride, 1994). Cuando los ácidos húmicos de la materia orgánica interactúan con los EPT, las reacciones de intercambio dominan inicialmente. A través del tiempo, las reacciones de quelatación las que prevalecen. Incluso se ha reportado que después de periodos prolongados, algunos cationes no reaccionan con los ligandos orgánicos debido a impedimentos estéricos o bloqueo de los sitios de reacción por otros cationes (Rashid, 1985). En este sentido, los resultados que se

obtuvieron en el experimento de equilibrio son reflejo de las reacciones inmediatas como es el caso de las reacciones de intercambio catiónico, mientras que los resultados del experimento de incubación sugieren que el Cd no formó complejos estables con las enmiendas orgánicas con el paso del tiempo.

También se observó aumento significativo ($\alpha=0.05$) en la solubilidad del Cd por efecto de la perlita expandida a dosis de 5%, 10% y 20%. Este resultado es contrario a lo observado en el experimento de equilibrio.

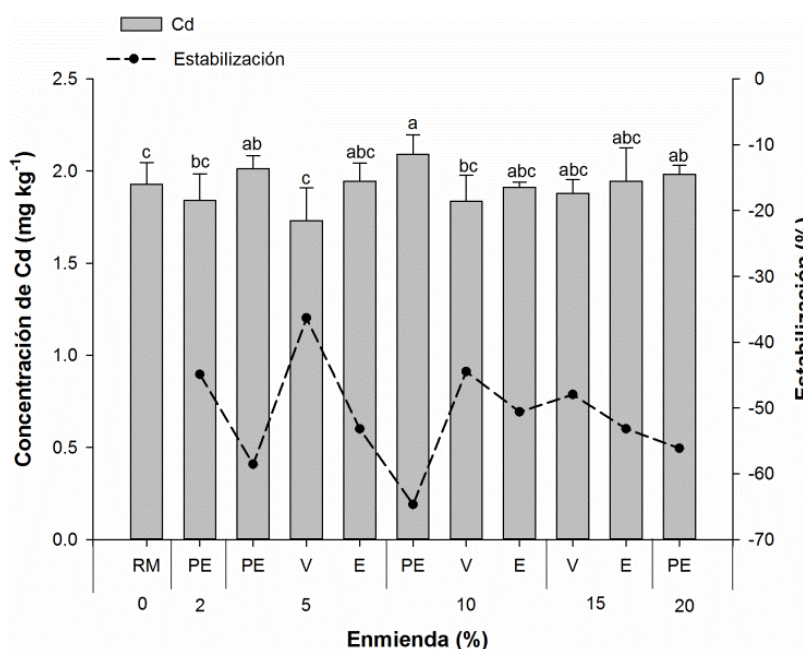


Figura 23. Concentración de Cd extractable con DTPA en el residuo de mina (RM) en función de los tratamientos: vermicompost (V), estiércol ovino (E) y perlita expandida (PE).

3.6.3. Cobre

En el caso del Cu, la mayor inmovilización ($\alpha=0.05$) se encontró en el tratamiento 10% de estiércol ovino, como lo muestra la Figura 24. Walker *et al.* (2004) encontraron que la adición de estiércol fresco de vaca es efectiva para reducir

la fracción soluble e intercambiable de Cu, Zn y Mn en comparación con residuo de mina solo y el residuo enmendado con compost. Por otra parte, se ha observado alta afinidad del Cu para formar complejos coordinados con las sustancias húmicas insolubles de la materia orgánica (Borůvka y Drábek, 2004). La adición de perlita expandida no modificó significativamente la concentración de Cu extractable con respecto al residuo de mina, sin embargo, la adición de vermicompost en dosis de 5% y 10% aumentó la concentración de este elemento significativamente, lo que implica disolución de minerales de Cu.

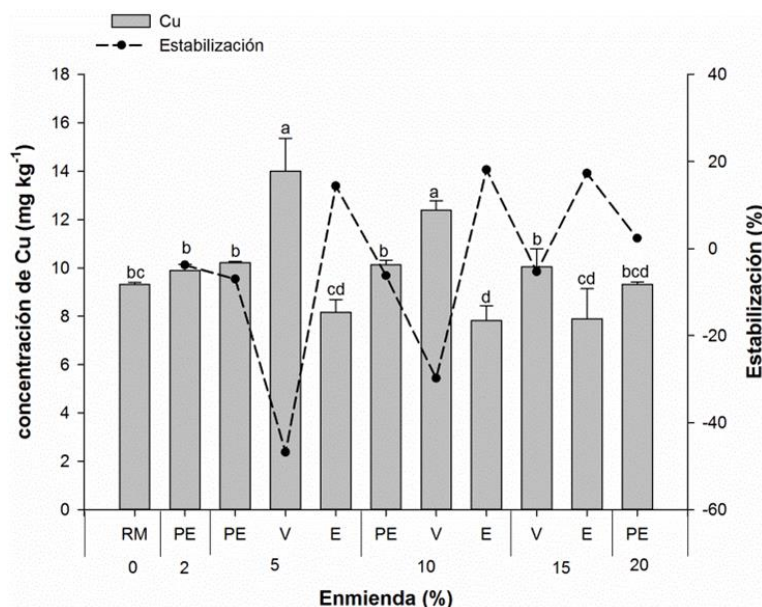


Figura 24. Concentración de Cu extractable con DTPA en el residuo de mina (RM) y en función de los tratamientos: vermicompost (V), estiércol ovino (E) y perlita expandida (PE).

3.6.4. Zinc

Tanto estiércol ovino (dosis de 5%, 10% y 15%) como vermicompost (10 y 15%, respectivamente) no mostraron tener efecto significativo ($\alpha=0.05$) sobre la estabilización del Zn (Figura 25). Algunos autores han reportado que los complejos

de Zn con los grupos $-\text{COOH}$ y $-\text{OH}$ forman complejos menos estables, en comparación con los que forman el Pb y el Cu. Esto se debe a que Cd y Zn se caracterizan por unirse a través de intercambio catiónico (Borůvka y Drábek, 2004). Otros autores creen que el Zn forma complejos fuera de la esfera o complejos inestables dentro de la esfera (Minkina *et al.*, 2006).

Se observó aumento en la concentración de Zn por efecto de la perlita expandida a dosis de 2%, 5% y 10%. De manera general, la nula adsorción de EPT en la perlita expandida, puede deberse al incremento en las cargas positivas de la superficie de ésta, como se explicó anteriormente. Esto ocasiona repulsión electrostática entre los iones metálicos y los grupos cargados positivamente en la superficie de la perlita (Sari *et al.*, 2007; Ghassabzadeh *et al.*, 2010).

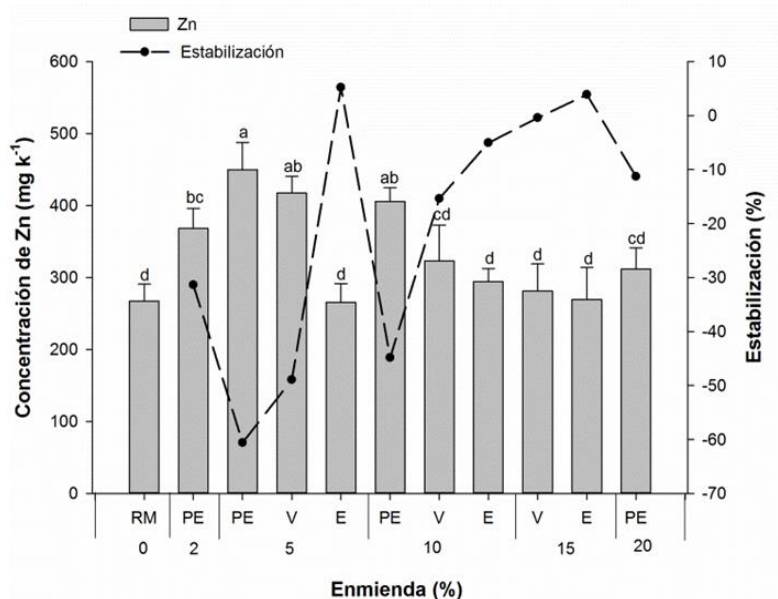


Figura 25. Concentración de Zn extractable con DTPA en el residuo de mina (RM) y en función de los tratamientos: vermicompost (V), estiércol ovino (E) y perlita expandida (PE).

CONCLUSIONES

En la literatura se ha reportado la efectividad de una diversidad de compuestos que se pueden usar como enmiendas. Muchos de estos estudios se han realizado en soluciones acuosas y situaciones idealizadas. Mientras que otros, en efecto han tenido resultados positivos en experimentos de campo. Sin embargo, dada la variabilidad en las propiedades de los residuos de mina, así como de los materiales que se adicionan, es necesario hacer estudios a nivel laboratorio e incluso invernadero para probar la efectividad de las enmiendas sobre la estabilización de EPT. Así mismo, para determinar las dosis y estrategias que se deben aplicar cuando se escala a otro nivel el experimento.

Los resultados obtenidos en el experimento de equilibrio e incubación fueron diferentes, en especial para el estiércol ovino y la perlita expandida. La perlita expandida a dosis de 2% fue la mejor enmienda para estabilizar Cd en los experimentos de equilibrio. Pero en el experimento de incubación se observó que esta enmienda solubilizó Cd. Cabe resaltar que durante los experimentos de equilibrio sólo podemos observar las reacciones que son inmediatas, como las de intercambio catiónico. Pero a mediano plazo la formación de uniones estables entre las enmiendas y los EPT, no siempre se garantiza, tal como se observó con la perlita expandida y el Cd. Por lo que se sugiere realizar estudios como los de incubación para permitir que ocurran las reacciones que son lentas entre los EPT y las enmiendas y así verificar que en efecto la enmienda es capaz de estabilizar EPT.

En el caso del estiércol ovino, en el experimento de equilibrio se observó que la enmienda causó la solubilización de Cu, Cd, Zn, As y Pb. Mientras que el

experimento de incubación reveló que el estiércol ovino redujo (17%) la concentración de Pb extractable. Estos resultados sugieren que es necesario mayor tiempo para que el estiércol estabilice al Pb, asociado a la resíntesis de compuestos orgánicos estables. Por otra parte, el vermicompost resultó ser la enmienda que en ambos experimentos estabilizó Pb. A mediano plazo no se observó efecto significativo sobre la estabilización de Zn.

Finalmente, en cuanto a las hipótesis planteadas al inicio de este capítulo se concluye lo siguiente:

Se rechaza la hipótesis de que la perlita expandida es efectiva para estabilizar Pb y Cd en experimentos de incubación. Ya que se mostró que a largo plazo esta enmienda aumenta la disponibilidad de Pb y Cd. En el caso del plomo la fracción móvil aumenta de 4% a 6%.

El estiércol ovino reduce la concentración de Pb extractable en el residuo de mina bajo estudio en experimento de equilibrio. Esta hipótesis se rechaza, ya que los resultados del experimento de equilibrio muestran que se puede solubilizar este elemento por efecto del estiércol ovino. Sin embargo, a largo plazo se puede lograr su estabilización.

El vermicompost estabiliza Zn tanto en experimento de equilibrio como de incubación. Esta hipótesis se rechaza, debido a que no se encontró efecto significativo para la estabilización de Zn en ambos experimentos por efecto del vermicompost.

El vermicompost estabiliza Pb tanto en experimento de equilibrio como de incubación, esta hipótesis se acepta.

LITERATURA CITADA

- Alkan, M., Ö. Dermibaş, and M. Doğan. 2005. Zeta potential of unexpanded and expanded perlite samples in various electrolyte media. *Microporous and Mesoporous Materials* 84: 192-200.
- Almås, Å. R., M. McBride, B. R. Singh, and L. Ram. 2000. Solubility and lability of cadmium and zinc in two soils treated with organic matter. *Soil Science* 165: 250-259.
- Al-Oweini, R. and H. El-Rassy. 2009. Synthesis and characterization by FTIR spectroscopy of silica aerogels prepared using several $\text{Si}(\text{OR})_4$ and $\text{R}^n\text{Si}(\text{OR}')_3$ precursors. *Journal of Molecular Structure* 919: 140-145.
- Alvarenga, P., P. Palma, A.P. Gonçalvesa, R.M. Fernandes, A. de Varennes, G. Vallini, E. Duarte, and A. C. Cunha-Queda. 2009. Organic residues as immobilizing agents in aided phytostabilization: (II) effects on soil biochemical and ecotoxicological characteristics. *Chemosphere* 74: 1301-1308.
- Barbafieri, M., J. Japenga, P. Romkens, G. Petruzzelli, and F. Pedron. 2013. Protocols for applying phytotechnologies in metal-contaminated soils. In: D. K. Gupta (ed). *Plant-based Remediation Processes, Soil Biology* 35. Springer. New York. pp. 19-38.
- Bauer, M. and C. Blodau. 2006. Mobilization of arsenic by dissolved organic matter from iron oxides, soils and sediments. *Science of the Total Environment* 354: 179-190.
- Beesley, L., O. S. Inneh, G. J. Norton, E. Moreno-Jimenez, T. Pardo, R. Clemente, and J. J.C. Dawson. 2014. Assessing the influence of compost and biochar

- amendments on the mobility and toxicity of metals and arsenic in a naturally contaminated mine soil. *Environmental Pollution* 186: 195-202.
- Bolan, N. S., D.C. Adriano, P. Duraisamy, and A. Mani. 2003. Immobilization and phytoavailability of cadmium in variable charge soils. III. Effect of biosolid compost addition. *Plant and Soil* 256: 231-241.
- Borůvka, L and O. Drábek. 2004. Heavy metal distribution between fractions of humic substances in heavily polluted soils. *Plant, Soil and Environment* 50: 339-345.
- Bremner, J. M. 1965. Determination and isotope-ratio analysis of different forms of nitrogen in soils: i. apparatus and procedure for distillation and determination of ammonium. *Soil Science Society American Journal* 29:504–507.
- Brown, S., B. Christensen, E. Lombi, M. McLaughlin, S. McGrath, J. Colpaert, and J. Vangronsveld. 2005. An inter-laboratory study to test the ability of amendments to reduce the availability of Cd, Pb, and Zn *in situ*. *Environmental Pollution* 138: 34-45.
- Brown, S., R. L. Chaney, J. G. Hallfrisch, and Q. Xue. 2003. Effect of biosolids processing on lead bioavailability in an urban soil. *Journal of Environmental Quality* 32: 100-108.
- Carrasquero-Durán, A and I. Flores. 2009. Evaluation of lead (II) immobilization by a vermicompost using adsorption isotherms and IR spectroscopy. *Bioresource Technology* 100: 1691-1694.
- Carrasquero-Durán, A., I. Flores, C. Perozo and Z. Pernalete. 2006. Immobilization of lead by a vermicompost and its effect on white bean (*Vigna Sinenis* var. Apure) uptake. *International Journal of Environmental Science and Technology* 3: 203-212.

- Carrillo-González R., A. Maldonado-Torres, M.C.A. González-Chávez, y J. Cruz Díaz. 2014. Estabilización de elementos potencialmente tóxicos en residuos de mina por aplicación de roca fosfórica y vermicomposta. *Ciencia en la frontera: revista de ciencia y tecnología de la UACJ* 1: 15-26.
- Chamon, A. S., M. H. Gerzabek, M. N. Mondol, S. M. Ullah, M. Rahman, and W. E. H. Blum. 2005. Influence of soil amendments on heavy metal accumulation in crops on polluted soils of Bangladesh. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 36: 907-924.
- Chen, H.-S., Q. Y. Huang, L. N. Liu, P. Cai, W. Peng, W. Liang, and M. Li. 2010. Poultry manure compost alleviates the phytotoxicity of soil cadmium: influence on growth of pakchoi (*Brassica chinensis* L.). *Pedosphere* 20: 63-70.
- Córdova S., A. Neaman, I. González, R. Ginocchio and P. Fine. 2011. The effect of lime and compost amendments on the potential for the revegetation of metal-polluted, acidic soils. *Geoderma* 166: 135-144.
- Davidson C. M. 2010. Methods for the determination of heavy metals and metalloids in soils. In: B.J. Alloway (ed.). *Heavy metals in soils: trace metals and metalloids in soils and their bioavailability*, *Environmental Pollution* 22 (3rd ed.). Springer. Netherlands. pp. 98-140.
- Day, P. 1965. Particle fractionation and particle size analysis. In: Part 1 Black, C. A. (ed) *Method of soil analysis*. Am. Soc. Agron., Madison, Wisconsin, USA. pp. 565-566.

- Dean, W. E. 1974. Determination of carbonate and organic matter in calcareous sediments and sedimentary rocks by loss on ignition: comparison with other methods. *Journal of Sedimentary Petrology* 44:242-248.
- Duarte Zaragoza, V. M.; R. Carrillo, and C. M. Gutiérrez Castorena. 2011. Lead sorption–desorption from organic residues. *Environmental Technology* 32: 353-361.
- Dupuy N. and F. Douay. 2001. Infrared and chemometrics study of the interaction between heavy metals and organic matter in soils. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 57: 1037-1047.
- Ejtemaei M., M. Gharabaghi and M. Irannajad. 2014. A review of zinc oxide mineral beneficiation using flotation method. *Advances in Colloid and Interface Science* 206: 68-77.
- EPA (Environmental Protection Agency). 1996. METHOD 3050B. Acid digestion of sediments, sludges and soils. 12 p
- EPA (Environmental Protection Agency). 1999. Understanding variation in partition coefficient, K_d , values. Volume II: Review of geochemistry and available K_d values for cadmium, cesium, chromium, lead, plutonium, radon, strontium, thorium, tritium (^3H), and uranium. EPA 402-R-99-004B. U. S. Environmental Protection Agency. Washington, DC.
- EPA (Environmental Protection Agency). 2007. The use of soil amendments for remediation, revitalization and reuse EPA 542-R-07-013. U. S. Environmental Protection Agency. Cincinnati, Ohio.
- Farrell M. and D. L. Jones. 2010. Use of compost in the remediation of heavy metal contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials* 175: 575-582.

- Farrell, M., W. T. Perkins, P. J. Hobbs, G. W. Griffith, and D. L. Jones. 2010. Migration of heavy metals in soil as influenced by compost amendments. *Environmental Pollution* 158: 55-64.
- Farrokhpay S. 2011. The significance of froth stability in mineral flotation- A review. *Advances in Colloid and Interface Science* 166: 1-7.
- Fellet, G., M. Marmiroli, and L. Marchiol. 2014. Elements uptake by metal accumulator species grown on mine tailings amended with three types of biochar. *Science of the Total Environment* 468-469: 598-608.
- Fiol, N., I. Villaescusa, M. Martínez, N. Miralles, J. Poch, and J. Serarols. Sorption of Pb(II), Ni(II), Cu(II) and Cd(II) from aqueous solution by olive stone waste. *Separation and Purification Technology* 50: 132-140.
- Fleming, M., Y. Tai, P. Zhuang, and M. B. McBride. 2013. Extractability and bioavailability of Pb and As in historically contaminated orchard soil: Effects of compost amendments. *Environmental Pollution* 177: 90-97.
- Galende, M. A., J. M. Becerril, M. T. Gómez-Sagasti, O. Barrutia, L. Epelde, C. Garbisu, and A. Hernández. 2014. Chemical stabilization of metal-contaminated mine soil: early short-term soil-amendment interactions and their effects on biological and chemical parameters. *Water Air and Soil Pollution* 225:1863 DOI 10.1007/s11270-013-1863-z.
- Ghassabzadeh, H., M. Torab-Mostaedi, A. Mohaddespour, M. G. Maragheh, S. J. Ahmadi, and P. Zaheri. 2010. Characterizations of Co (II) and Pb (II) removal process from aqueous solutions using expanded perlite. *Desalination* 261: 73-79.

- Hernandez-Soriano M. C. and J. C. Jiménez-López. 2012. Effect of soil water content and organic matter addition on the speciation and bioavailability of heavy metals. *Environmental Science* 423: 55-61.
- Houben, D., J. Piricar, and P. Sonnet. 2012. Heavy metal immobilization by cost-effective amendments in a contaminated soil: effects on metal leaching and phytoavailability. *Journal of Geochemical Exploration* 123: 87-94.
- Jordão, C. P., R. Bragança, A. Fernandes, K. L. Ribeiro, B. S. Nascimento, and P. M. Barros. 2009. Zn(II) adsorption from synthetic solution and kaolin wastewater onto Vermicompost. *Journal of Hazardous Materials* 162: 804-811.
- Juwarkar, A. A., S. K. Yadav, P. Kumar, and S. K. Singh. 2008. Effect of biosludge and biofertilizer amendment on growth of *Jatropha curcas* in heavy metal contaminated soils. *Environmental Monitoring and Assessment* 145:7-15.
- Kabata, P. A. and H. Pendias. 1994. Trace elements in soils and plants. C.R.C. Press Boca Raton Florida, USA. 315 p.
- Kadirvely, K. and C. Namasivayam. 2003. Activated carbon from coconut coirpith as metal adsorbent: adsorption of Cd(II) from aqueous solution. *Advances in Environmental Research* 7: 471-478.
- Kumpiene, J., A. Lagerkvist and C. Maurice. 2008. Stabilization of As, Cr, Cu, Pb and Zn in soil using amendments-a review. *Waste Management* 28: 215-225.
- Lee, S. H.; J. S. Lee, Y. J. Choi and J. G. Kim. 2009. *In situ* stabilization of cadmium-, lead-, and zinc-contaminated soil using various amendments. *Chemosphere* 77: 1069-1075.

- Lindsay W.L. and Norvell W.A. 1978. Development of a DTPA test from soil zinc, iron, manganese and copper. *Soil Science Society of America Journal* 42: 421-428.
- Liu, L., H. Chen, P. Cai, W. Liang and Q. Huang. 2009. Immobilization and phytotoxicity of Cd in contaminated soil amended with chicken manure compost. *Journal of Hazardous Materials* 163: 563-567.
- Martínez, C. E. and H.L. Motto. 2000. Solubility of lead, zinc and copper added to mineral soils. *Environmental Pollution* 107: 153-158.
- Mathialagan, T and T. Viraraghavan. Adsorption of cadmium from aqueous solutions by perlite. *Journal of Hazardous Materials* B94: 291-303.
- McBride B.M. 1994. *Environmental chemistry of soils*. Oxford University Press, New York. 397 p.
- Mendez, M. O. and R. M. Maier. 2008. Phytostabilization of mine tailings in arid and semiarid environments an emerging remediation technology. *Environmental Health Perspectives* 116: 278-283.
- Miller, J. R. and S. M. O. Miller. 2007. *In situ* remediation. In: Miller, J. R. and S. M. O. Miller (eds). *Contaminated rivers a geomorphological-geochemical approach to site assessment and remediation*. Springer Netherlands. pp.327-350.
- Minkina, T. M., G. V. Motuzova, and O. G. Nazarenko. 2006. Interaction of heavy metals with the organic matter of an ordinary chernozem. *Eurasian Soil Science* 39: 720-726.
- Norma Oficial Mexicana NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004. *Diario Oficial*.
- Nwachukwu, O. I. and I. D. Pulford. 2009. Soil metal immobilization and ryegrass uptake of lead, copper and zinc as affected by application of organic

- materials as soil amendments in a short-term greenhouse trial. *Soil Use and Management* 25: 159-167.
- Orlov, D. S. 1995. *Humic substances of soils and general theory of humification*. Oxford & IBH Publishing, New Delhi. 266p.
- Park J.H., D. Lamb, P. Paneerselvam, G. Choppala, N. Bolan, and J.W. Chung. 2011. Role of organic amendments on enhanced bioremediation of heavy metal(loid) contaminated soils. *Journal of Hazardous Materials* 185: 549-574.
- Park, J. H. and N. Bolan. 2013. Lead immobilization and bioavailability in microbial and root interface. *Journal of Hazardous Materials* 261: 777-783.
- Pejic, B., M. Vukcevic, M. Kostic, and P. Skundrica. 2009. Biosorption of heavy metal ions from aqueous solutions by short hemp fibers: effect of chemical composition. *Journal of Hazardous Materials* 164: 146-153.
- Pérez-Esteban, J., C. Escolástico, A. Moliner, A. Masaguer, and J. Ruiz-Fernández. 2014. Phytostabilization of metals in mine soils using *Brassica juncea* in combination with organic amendments. *Plant and Soil* 377: 97-109.
- Pino, G. H., L. M. Souza de Mesquita, M. L. Torem, and G. A. Saavedra Pinto. 2006. Biosorption of cadmium by green coconut shell powder. *Minerals Engineering* 19: 380-387.
- Rajiv P., S. Rajeshwari, and R. Venckatesh. 2013. Fourier transform-infrared spectroscopy and Gas chromatography–mass spectroscopy: reliable techniques for analysis of Parthenium mediated. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 116: 642-645.
- Rashid, M. A. 1985. *Geochemistry of marine humic compounds*. Springer Verlag, New York. 293 p.

- Rowell, D.L. 1994. Soil science. Methods and applications. Logman Group. London UK. 350p.
- Saada, A., D. Breeze, C. Crouzet, S. Cornu, and P. Baranger. 2003. Adsorption of arsenic (V) on kaolinite and on kaolinite–humic acid complexes role of humic acid nitrogen groups. *Chemosphere* 51: 757-763.
- Sarı, A., M. Tuzen, D. Citak and M. Soylak. 2007. Adsorption characteristics of Cu(II) and Pb(II) onto expanded perlite from aqueous solution. *Journal of Hazardous Materials* 148: 387-394.
- Sauvé, S., M. B. McBride and W. Hendershot. 1997. Speciation of lead in contaminated soils. *Environmental Pollution* 98: 149-155.
- Sauvé, S., M. McBride and W. Hendershot. 1998. Soil solution speciation of lead(II): Effects of organic matter and pH. *Soil Science Society of America Journal* 62: 618-621.
- Sauvé, S., W. A. Norvell, M. McBride, and W. Hendershot. 2000. Speciation and complexation of cadmium in extracted soil solutions. *Environmental Science and Technology* 34:291-296.
- Schwab, P., D. Zhu, and M.K. Banks. 2007. Heavy metal leaching from mine tailings as affected by organic amendments. *Bioresource Technology* 98: 2935-2941.
- Senesi, N. and E. Loffredo. 2005. Metal ion complexation by soil humic substances. pp. 563-618. In Tabatabai, M. A. and D. L. Sparks (eds.): *Chemical Processes in Soils*. Number 8, Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin, USA.
- Shukla, S. R., R. S. Pai, A. D. Shendarkar. 2006. Adsorption of Ni(II), Zn(II) and Fe(II) on modified coir fibres. *Separation and Purification Technology* 47: 141-147.

- Skoog, D., J. F. Holler, and T. A. Nieman. 2001. Principios de análisis instrumental. Quinta Edición. Mcgraw Hill Madrid, España. 997 p.
- Soler Rovira P., E. Madejón, P. Madejón y C. Plaza. 2010. In situ remediation of metal contaminated soils with organic amendments: role of humic acids in copper bioavailability. *Chemosphere* 79: 844-849.
- Steinnes, E. 2010. Lead. In: B.J. Alloway (ed.). Heavy metals in soils: trace metals and metalloids in soils and their bioavailability, *Environmental Pollution* 22 (3rd ed.). Springer. Netherlands. pp. 395-409.
- Stenberg, B., R. A. Viscarra Rossel, A. M. Mouazen, and J. Wetterlind, 2010. Visible and near infrared spectroscopy in soil science. pp. 163-215. In D. L. Sparks (ed.): *Advances in Agronomy*, Vol. 107, Burlington: Academic Press.
- Stuart, B. 2004. *Infrared spectroscopy: fundamentals and applications*. Wiley. 242 p.
- Tan K.M. 1998. *Principles of soil chemistry*. 3rd ed. Marcel Dekker, New York. 495 p.
- Tandy, S., J. R. Healey, M. A. Nason, J. C. Williamson and D. L. Jones. 2009. Remediation of metal polluted mine soil with compost: co-composting versus incorporation. *Environmental Pollution* 157: 690-697.
- Van Herwijnen, R., T. R. Hutchings, A. Al-Tabbaa, A. J. Moffat, M. L. Johns and S. K. Ouki. 2007. Remediation of metal contaminated soil with mineral-amended composts. *Environmental Pollution* 150:347-354.
- Walker, D. J., R. Clemente and M. P. Bernal. 2004. Contrasting effects of manure and compost on soil pH, heavy metal availability and growth of *Chenopodium album* L. in a soil contaminated by pyritic mine waste. *Chemosphere* 57: 215-224.

- Walkley, A. and I. A. Black. 1934. An examination of the Degtjareff method for determining organic carbon in soils: effect of variations in digestion conditions and of inorganic soil constituents. *Soil Science* 63: 251-263.
- Zaini, M. A. A., R. Okayama and M. Machida. 2009. Adsorption of aqueous metal ions on cattle-manure-compost based activated carbons. *Journal of Hazardous Materials* 170: 1119-1124.
- Zhang, M. y H. Zhang. 2010. Co-transport of dissolved organic matter and heavy metals in soils induced by excessive phosphorus applications. *Journal of Environmental Science* 22: 598-606.
- Zhu, B., T. Fan, and D. Zhang. 2008. Adsorption of copper ions from aqueous solution by acitric acid modified soybean straw. *Journal of Hazardous Materials* 153: 300-308.

CAPÍTULO IV

FITOESTABILIZACIÓN DE UN RESIDUO DE MINA ASISTIDA POR BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL Y ENMIENDAS

RESUMEN

El objetivo de este capítulo fue evaluar el efecto de las enmiendas (estiércol ovino fresco, vermicompost, K_2HPO_4 y $CaCO_3$) y la inoculación de BPCV sobre el crecimiento de *R. communis*, para la estabilización de EPT de un residuo de mina del distrito minero de Zimapán, Hidalgo. Los resultados mostraron que las enmiendas mejoraron tanto propiedades físicas como químicas del residuo. En adición, las concentraciones de Pb y Zn extractables con DTPA-TEA- $CaCl_2$ se redujeron 22% y 41% respectivamente, después de la aplicación de las enmiendas. La biomasa aérea y área foliar de *R. communis* aumentó 200% y la altura 100% por efecto de las enmiendas y éstas en conjunto con la inoculación de BPCV. No obstante, las enmiendas tuvieron mayor influencia sobre el crecimiento de *R. communis* en comparación con la inoculación con BPCV. El alto contenido de materia orgánica (8-9%) promovió la actividad de los microorganismos nativos de las enmiendas, las bacterias N9 y Mc188 no fueron competitivas. Por lo tanto la inoculación bacteriana no mostró efectos significativos en las variables de crecimiento y biomasa. Además, las concentraciones de Pb y Cd en la parte aérea fueron mayores a los umbrales de fitotoxicidad en todos los tratamientos. Sin embargo, los factores de bioacumulación

de Cd mostraron que las BPCV disminuyeron significativamente la acumulación de este elemento en tejido aéreo en comparación con el tratamiento testigo y las enmiendas. Ningún síntoma visible de toxicidad (necrosis, clorosis o malformaciones) se observó en las plantas de los tratamientos con enmienda e inoculación de BPCV. Por el contrario, baja biomasa se observó en las plantas que crecieron en residuo de mina y la concentración de Zn en el follaje fue 1.5 veces mayor a los umbrales fitotóxicos. El análisis de correlación lineal sugiere que el Zn es el principal factor en disminuir la tasa de fotosíntesis, biomasa aérea y concentración de clorofilas en las plantas testigo. Así mismo este elemento estimuló la generación de especies reactivas del oxígeno como el H_2O_2 . Después de establecer *R communis* en el residuo de mina la concentración de Pb extractable con DTPA disminuyó 50% aproximadamente en todos los tratamientos.

INTRODUCCIÓN

Ricinus communis pertenece a la familia *Euphorbiaceae* (Huang *et al.* 2011), es una planta oleaginosa de rápido crecimiento y con gran capacidad de adaptación a diversos ambientes (Rico-Ponce *et al.*, 2011; Huang *et al.* 2011). El reciente interés en esta planta para su uso en procesos de fitorremediación deriva de dos principales razones. La primera, se refiere a su capacidad de crecer en sustratos contaminados y tolerar altas concentraciones de EPT (Rajkumar y Freitas, 2008; Prasad y Freitas, 2003; Huang *et al.*, 2011; Ruiz-Olivares *et al.*, 2013; González-Chávez *et al.* 2014). Y la segunda, radica en que *R. communis* es un cultivo con interés industrial (Huang *et al.*, 2011; Andreatza *et al.*, 2013).

En los últimos años, varios autores (Rajkumar y Freitas, 2008; Ruiz-Olivares et al. 2013; Andreatza *et al.*, 2013) han sugerido cultivar plantas como *R. communis* para la generación de bioenergía en sustratos contaminados con EPT. Ya que tanto aceite como sub-productos (torta, biomasa, etc) del ricino se pueden emplear para la generación de bioenergía (Andreatza *et al.*, 2013; González-Chávez *et al.* 2014). También se suman servicios ambientales como el secuestro de carbono, reducción de la erosión, estabilización del suelo y por supuesto la remediación de los suelos contaminados con EPT (Ruiz-Olivares *et al.*, 2013 y González-Chávez *et al.*, 2014).

Ruiz-Olivares *et al.* (2013) reportaron que *R. communis* es capaz de crecer de manera natural en residuos de mina. No obstante, los autores encontraron que las altas concentraciones de EPT en la raíz afectan de manera negativa el rendimiento de la producción de aceite. En este sentido, es importante explorar alternativas que permitan mejorar las condiciones agronómicas necesarias que requiere el cultivo de *R. communis*, para incrementar su rendimiento en sustratos contaminados. Como por ejemplo, aplicar sustancias que mejoren las propiedades fisicoquímicas del suelo, que estabilicen EPT y además aporten nutrientes. Además las enmiendas también pueden estimular el crecimiento de microorganismos autóctonos por el aporte de nutrientes. El objetivo del presente Capítulo fue evaluar el efecto de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV) y enmiendas en el crecimiento de *R. communis* en un residuo de mina para la estabilización de EPT.

OBJETIVO

El objetivo de este capítulo fue evaluar el efecto de las enmiendas (estiércol ovino fresco, vermicompost, K_2HPO_4 y $CaCO_3$) y la inoculación de BPCV sobre el

crecimiento de *R. communis* para la estabilización de EPT de un residuo de mina del distrito minero de Zimapan, Hidalgo.

HIPÓTESIS

Las BPCV en conjunto con enmiendas promueven el crecimiento de *R. communis* en comparación con solo agregar de enmiendas.

La aplicación de enmiendas induce el mayor crecimiento de *R. communis* en comparación con el tratamiento testigo.

La aplicación de enmiendas y BPCV mitigan los efectos tóxicos de los EPT en *R. communis*.

Al final del experimento la disponibilidad de Cd disminuye por efecto del proceso de fitorremediación con *R. communis*.

Al final del experimento la disponibilidad de Pb disminuye por efecto del proceso de fitorremediación con *R. communis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Estabilización de EPT en el residuo de mina

El residuo de mina con 0% y 10% de enmienda se sometió a ocho periodos de humedecimiento y secado. Para humedecer el residuo de mina se agregó agua correspondiente al 80% de la capacidad de campo ([Capítulo III, 3.1.11](#)).

El residuo de mina se mantuvo en invernadero y cada semana se homogenizó. Después de cada periodo de humedecimiento y secado se tomó una muestra de 20 g y se determinaron las variables de pH, CE ([Capítulo III, 3.1.2](#)) y

concentración extractable de EPT (Cu, Pb, Zn y Cd, [Capítulo III, 3.1.9](#)). Al final del octavo periodo de humedecimiento y secado, adicionalmente se midieron las variables: color, densidad real y aparente, resistencia a la penetración, contenido de materia orgánica ([Capítulo III, 3.1.4](#)) N inorgánico y P disponible.

4.1.1. Determinación de color

El color del residuo de mina con y sin enmienda se determinó en húmedo y seco. Una muestra de residuo seco de aproximadamente 1 g se tomó y se colocó en una placa de porcelana. El color de la muestra se comparó con éste de las tablas estándar de Munsell. Posteriormente, la muestra se humedeció en la placa de porcelana y nuevamente se comparó el color de ésta contra las tablas estándar, hasta obtener las tres propiedades del color: matiz, brillo e intensidad cromática. La comparación del color tanto húmedo como en seco se realizó bajo la intensidad de la luz solar.

4.1.2. Determinación de la densidad aparente (Db)

Se pesaron 10 g de residuo de mina con 0 o 10% de enmienda y se colocaron en una probeta de 250 mL. La probeta se golpeó suavemente 30 veces contra la mesa, para permitir el acomodo uniforme de las partículas del sustrato. Finalmente, la densidad aparente se calculó con la siguiente ecuación (Ansorena, 1994):

$$Db = \frac{\text{Peso del residuo de mina}}{\text{Volumen ocupado por sus partículas}}$$

4.1.3. Determinación de la densidad real (Dp)

El residuo de mina con 0% o 10% de enmienda se secó en una estufa durante 24 h a 105° C. Posteriormente, del residuo seco se tomaron 10 g y se colocaron en matraces aforados de 100 mL (los cuales previamente se pesaron). Luego, a cada matraz se le agregó agua destilada hasta cubrir el residuo de mina y se dejó reposar durante 24 h. Después, los matraces se colocaron en baño María a 100 °C, se retiraron hasta que no se observaron burbujas y se enfriaron hasta alcanzar la temperatura ambiente. Posteriormente, éstos se aforaron con agua destilada y se pesaron nuevamente. Finalmente, los matraces nuevamente se lavaron y se aforaron con agua destilada y se pesaron. La temperatura del agua se registró. El análisis se realizó por triplicado y la siguiente formula se empleó para calcular la densidad real (Ansorena, 1994; NOM-021-SEMARNAT-2000):

$$ps = (pmr) - (pm)$$
$$vs = \frac{(pma) - (pm)}{\rho_w} - \frac{(pmra) - (pmr)}{\rho_w}$$
$$Dp = \frac{ps}{vs}$$

Donde:

pmr= Peso del matraz con residuo seco.

pm= Peso del matraz.

pmra= Peso del matraz con residuo y aforado con agua.

pma= Peso del matraz aforado con agua.

ps= Peso de las partículas del suelo

vs= Volumen de las partículas del suelo

ρ_w = Densidad del agua

D_p = Densidad real

4.1.4. Volumen de poros

El espacio poroso total o volumen de poros se calculó usando la siguiente fórmula (Ansorena, 1994):

$$\text{Volumen de poros (\%)} = \left(1 - \frac{D_b}{D_p}\right) \times 100$$

4.1.5. Resistencia a la penetración

La resistencia a la penetración del residuo de mina con y sin enmienda se realizó con ayuda de un penetrómetro de resorte. El residuo de mina con y sin enmienda se colocó en bolsas de plástico 15x45 cm, luego las muestras se humedecieron a capacidad de campo y se dejaron reposar durante dos semanas. Posteriormente, la punta del penetrómetro se introdujo en el residuo de mina por la presión ejercida a través de un resorte.

4.1.6. Determinación de P disponible

Del residuo de mina con 0 y 10% de enmienda se pesaron 2.5 g y se colocaron en un tubo de vidrio de 100 mL. A continuación se agregaron 50 mL de una solución de NaHCO_3 pH 8.5 y 1 g de carbón activado. Los tubos que contenían a la muestra se agitaron a 180 rpm durante 30 min. Concluido el periodo de agitación, las muestras se centrifugaron a 1800 rpm durante 10 min. El sobrenadante se filtró, una alícuota de 2 mL se tomó y se colocó en un tubo de ensaye. Se adicionaron 5 mL de agua destilada, 2 mL de solución de molibdato de amonio y 1 mL de solución de cloruro estano. La muestra se homogenizó y se dejó reposar durante 10 min

para el desarrollo del color azul (Olsen *et al.* 1954). Finalmente, la absorbancia de la muestra se midió a una longitud de onda (λ) de 660 nm. Una curva de calibración fue previamente preparada para poder determinar la concentración de P en la muestra ([Anexo XIII](#)).

4.1.7. Determinación de N inorgánico

Del residuo de mina con y sin enmienda se pesaron 5 g y se colocaron en un tubo de 100 mL. A continuación, se agregaron 50 mL de una solución de KCl 2N. Los tubos que contenían a la muestra se agitaron por 1 h a 180 opm. Después, las muestras se centrifugaron a 1800 rpm durante 10 min y luego se filtraron.

Una alícuota de 20 mL del filtrado se tomó y se colocó en un matraz para destilación. El matraz se conectó al aparato de destilación y se añadió 0.2 g de MgO. El destilado se recibió en un matraz Erlenmeyer de 50 mL que contenía 5 mL de H_2BO_3 e indicador verde de bromocresol. La destilación se suspendió al conseguir 30 mL del destilado.

Luego a la misma alícuota (matraz conectado al aparato de destilación) se añadió 0.2 g de aleación de Devarda y la destilación se continuó. Nuevamente el destilado se recibió en un matraz Erlenmeyer con ácido H_2BO_3 e indicador verde de bromocresol. La destilación se detuvo hasta obtener 30 mL de destilado. Posteriormente los destilados se titularon con una solución de H_2SO_4 . La concentración de nitrógeno inorgánico se calculó con la siguiente fórmula (Bremner, 1965):

$$N (mg\ kg^{-1}) = (M - B) \times N \times 14 \times \left(\frac{V_i}{a}\right) \times \left(\frac{1}{p}\right) \times 1000$$

Donde:

M y B= Son los mililitros de H_2SO_4 que se usaron en la titulación de la muestra (M) y el blanco (B).

N= La normalidad del H_2SO_4 .

V_i = Es el volumen del extractante.

a= Es la alícuota destilada.

p= Es el peso de la muestra en gramos.

4.2. Diseño de experimentos y análisis estadístico

Los tratamientos que se evaluaron fueron: residuo de mina (RM) con 0% enmienda y sin inoculación bacteriana, mezcla residuo de mina con enmiendas (RM+E) y mezcla con inoculación bacteriana (RM+E+N9 o RM+E+Mc188). Para evaluar el efecto de los tratamientos se realizó un experimento con diseño de bloques al azar con seis repeticiones.

Para detectar diferencias entre los tratamientos se realizó una comparación de medias usando la prueba de diferencia significativa honesta de Tukey (DSH) con nivel de significancia 5% ($\alpha=0.05$). También se realizó análisis de correlación lineal de Pearson entre las diferentes variables respuesta. Un análisis de medidas repetidas se hizo para analizar las cinéticas de crecimiento y clorofila relativa. Los resultados obtenidos del experimento se analizaron con el software estadístico SAS versión 9.0 y R 3.0.2 (R Core Team, 2013).

4.3. Germinación de semillas de *Ricinus communis*

Las cepas Mc188 y N9 se seleccionaron con base en los resultados que previamente se obtuvieron en la caracterización de BPCV ([Capítulo II](#)). Así mismo, se

eligió la accesión SF7 de *R. communis* para este experimento, debido a la rápida germinación y emergencia. También a que esta accesión fue obtenida de residuos mineros (Ruiz-Olivares et al 2013) y a que produce semillas de gran tamaño y tiene características agronómicas relevantes (Cuellar-Sánchez et al. 2014).

4.3.1. Selección de bacterias resistentes a antibióticos

Las cepas bacterianas (Mc188 y N9) se marcaron con resistencia a amikacina, gentamicina y ampicilina de manera individual con la finalidad de determinar la colonización de *R. communis* al final del experimento. El marcaje de las bacterias se explica a continuación:

Los cultivos bacterianos originales se propagaron en caldo nutritivo durante 24 h a 30 °C. De manera individual, del cultivo de 24 h se tomaron 100 µL y se inocularon en 5 mL de caldo nutritivo con 20 µg mL⁻¹ de antibiótico. Los tubos se incubaron por 48 h a 30 °C. Después, del cultivo que creció en 20 µg mL⁻¹ de antibiótico, se tomaron 100 µL y se inocularon en 5 mL de caldo nutritivo con 30 µg mL⁻¹ de antibiótico y se incubaron durante 48 h. Este proceso se repitió aumentando las concentraciones de antibiótico hasta que el cultivo original no creció en el medio con antibiótico.

4.3.2. Preparación del inóculo bacteriano

Previo a la inoculación de las semillas de *R. communis*, las cepas Mc188 y N9 marcadas con resistencia a amikacina (500 µg mL⁻¹) se propagaron en caldo nutritivo y se incubaron 48 h a 30 °C. De este cultivo se tomaron 50 mL y se depositaron en tubos Falcón de 50 mL (los cuales previamente se esterilizaron). El inóculo bacteriano se centrifugó a 9 000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se desechó. El

paquete celular se lavó dos veces con solución de NaCl 0.9 % (m/v) y se resuspendió en solución de NaCl 0.9%. El inóculo se ajustó a 0.5 de absorbancia a 600 nm para obtener aproximadamente 1×10^9 bacterias mL⁻¹. La suspensión bacteriana se preparó antes de la inoculación.

4.3.3. Germinación de semillas

Se usaron como unidades experimentales para la germinación recipientes plásticos de 100 mL aproximadamente. Éstos se llenaron con 50 g de sustrato turba:agrolita:vermiculita (relación 3:1:1, pH 5.8). La superficie de las semillas de *R. communis* se limpió con una gasa humedecida con solución de etanol a 70% (v/v). Posteriormente, las semillas se enjuagaron con agua destilada estéril y se sumergieron en agua estéril durante 30 min.

En condiciones de esterilidad a cada unidad experimental se le colocó una semilla de *R. communis* a una profundidad de aproximadamente 1 cm. Enseguida se agregó 1 mL de la suspensión bacteriana previamente preparada ([sección 4.3.2](#)). En el caso de los tratamientos sin inoculación bacteriana se agregó 1 mL de solución de NaCl 0.9% estéril. Las semillas se mantuvieron en invernadero durante ocho días.

4.4. Trasplante e inoculación de plántulas de *Ricinus communis* en residuo de mina

4.4.1. Preparación de las unidades experimentales

Se emplearon bolsas negras de 45 cm de largo por 15 cm de ancho. A cada unidad experimental destinada a ser el tratamiento testigo (0% enmienda y sin inoculación) se le agregó 2.5 kg de residuo de mina, mientras que para los demás

tratamientos (10% enmienda, 10% enmienda-N9 y 10% enmienda-Mc188) se les agregó 1.9 kg de la mezcla de residuo de mina con estiércol ovino 10% (m/m). La aleatorización de las unidades experimentales se realizó con el procedimiento proc plan del paquete estadístico SAS versión 9.0.

4.4.2. Trasplante de plántulas de *Ricinus communis*

Después de la germinación de las semillas de *R. communis* (ocho días), plántulas de tamaño similar (de aproximadamente 5 cm) se seleccionaron y se pasaron a bolsas de plástico que contenían el residuo de mina o la mezcla estabilizada de residuo de mina con enmienda. 24 h después al trasplante. Las plántulas de *R. communis* se inocularon con 10 mL de suspensión bacteriana en concentración de 1×10^9 bacterias mL^{-1} ([sección 4.3.2](#)). En el caso de los tratamientos sin inoculación se adicionaron 10 mL de solución de NaCl 0.9% estéril.

4.5. Manejo en invernadero

Las plantas de *R. communis* se mantuvieron en invernadero durante 65 días. La temperatura e intensidad lumínica se monitoreo durante este periodo ([Anexo XIV](#)). Así mismo, el sustrato se mantuvo humedecido (80% de la humedad de capacidad de campo). Adicionalmente, la dinámica de crecimiento de la planta se monitoreo, así como el contenido de clorofila relativa.

4.5.1. Monitoreo de crecimiento de *Ricinus communis*

La emergencia de las plántulas se evaluó una semana después del trasplante de éstas. Mientras que la altura de la planta se midió del cuello de la raíz hasta el ápice, cada 10 días (posterior a 100% de emergencia) con ayuda de una regla.

4.5.2. Determinación del contenido de clorofila relativa

El contenido de clorofila relativa se determinó con ayuda de un medidor de clorofila SPAD. Las mediciones se realizaron cada 10 d a partir del día 12 después del trasplante en la hoja de mayor madurez.

4.6. Cosecha y evaluación

Las plantas se cosecharon y se analizaron las variables: fotosíntesis, altura de planta, área foliar, longitud y volumen radical, longitud y diámetro de tallo, biomasa seca, contenido de: clorofila, peroxidación de lípidos, contenido de H_2O_2 , concentración de N ([Capítulo III, 3.1.5](#)), P y EPT. Cada metodología se describe a continuación.

4.6.1. Evaluación de la actividad fotosintética

La actividad fotosintética se evaluó con ayuda de un medidor portátil de fotosíntesis (TPS-2 Portable Photosynthesis System).

4.6.2. Altura de la planta y diámetro de tallo

Con ayuda de un vernier se midió el diámetro de tallo, mientras que la altura de la planta se determinó con una regla.

4.6.3. Área foliar

El área foliar se determinó con un integrador electrónico de área foliar.

4.6.4. Contenido de clorofila

Se tomaron 50 mg de material vegetal y se colocaron en frascos ámbar que contenían 5 mL de una solución de acetona 80% (v/v) y una pizca de $CaCO_3$. Las

muestras se almacenaron en refrigeración hasta su uso para la extracción de clorofila.

La extracción de clorofila se realizó en la oscuridad. El material vegetal se maceró en un mortero congelado con una pizca de arena de mar. Después se transfirió a un tubo de centrifuga y se incubó durante 2 h en la oscuridad a 4 °C. Posteriormente, el extracto se centrifugó a 1 500 rpm durante 10 min. Éste se decantó y se aforó a 10 mL. Se midió la absorbancia del extracto a longitudes de onda de 663.6 nm y 646.6 nm.

La concentración de clorofila a, b y total se calculó utilizando las siguientes ecuaciones (Porra, 2005):

$$\text{Clorofila a } (\mu\text{g mL}^{-1}) = (12.25 \times \text{DO}_{663.6}) - (2.55 \times \text{DO}_{646.6})$$

$$\text{Clorofila b } (\mu\text{g mL}^{-1}) = (20.31 \times \text{DO}_{646.6}) - (4.91 \times \text{DO}_{663.6})$$

$$\text{Clorofila total } (\mu\text{g mL}^{-1}) = (17.76 \times \text{DO}_{646.6}) + (7.34 \times \text{DO}_{663.6})$$

Donde:

$\text{DO}_{663.6}$ = Absorbancia a los 663.6 nm.

$\text{DO}_{646.6}$ = Absorbancia a los 646.6 nm.

4.6.5. Peroxidación de lípidos

Se tomaron entre 100 mg de material vegetal fresco (hojas y raíces). Este se maceró en un mortero congelado con una pizca de arena de mar y 5 mL de una solución de ácido tricloroacético al 5% (m/v). La muestra triturada se transfirió a un tubo de centrifugación y se incubó durante 1 min en hielo. Posteriormente, las muestras se centrifugaron durante 20 min a 10 000 rpm. Luego del sobrenadante se tomó 1 mL y se mezcló con 4 mL de solución de ácido tiobarbiturico 0.5% (m/v) en

ácido tricloroacético 20% (m/v). La mezcla se incubó a 90°C durante 30 min, posteriormente la reacción se detuvo incubando los tubos en hielo. Luego las muestras se centrifugaron nuevamente durante 10 min. La absorbancia de la muestra se midió a 532 nm y 600 nm. La concentración de malondialdehído (MDA) se determinó a través del coeficiente de extinción $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Velikova *et al.*, 2000).

4.6.6. Determinación del contenido de H₂O₂

Se tomaron entre 100 mg de material vegetal fresco (hojas y raíces) y se maceraron en un mortero congelado con una pizca de arena de mar y 5 mL de una solución de ácido tricloroacético al 5% (m/v). El material macerado se transfirió a un tubo de centrifugación y se centrifugó a 10 000 g durante 15 min. Una alícuota de 500 μL se depositó en un tubo Eppendorf, también se agregó 500 μL de buffer de fosfatos 10 mM (pH 7) y 1 mL de solución de KI 1M (Velikova *et al.*, 2000). La absorbancia del sobrenadante se midió 390 nm y el contenido de H₂O₂ se calculó comparando la absorbancia de la muestra contra una curva estándar de calibración ([Anexo XV](#)).

4.6.7. Longitud y volumen radical

La raíz de cada planta se separó de la parte aérea. Ésta se lavó tres veces con abundante agua, posteriormente se lavó durante 1 min con solución de EDTA 0.01% y finalmente se enjuagó con agua desionizada.

Para determinar el volumen radical, la raíz se colocó en una probeta con volumen de agua conocido y se registró el volumen de agua que se desplazó por

introducción de la raíz. Después, la longitud de la raíz se midió con ayuda de una regla.

4.6.8. Biomasa seca

Después de realizar todos los análisis de longitud y diámetro de tallo, longitud radical y área foliar, tanto la parte aérea como la raíz se colocaron en bolsas de papel y se secaron a 60 °C durante 72 h, para determinar la biomasa seca de cada planta.

4.6.9. Concentración de elementos potencialmente tóxicos en tejido vegetal

La digestión de las muestras se realizó con base en el siguiente procedimiento: 0.1 g por muestra se colocaron en tubos de plástico antiadherible y se agregaron 4 mL de HNO₃ concentrado. Las muestras se dejaron en predigestión durante 8 h a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, los tubos se introdujeron en el horno de microondas y se sometieron al siguiente programa: 5.5 min a temperatura de 0 a 18°C y 1 200 W, y 9.5 min a 180°C y 1 200 W. Después de la digestión, las muestras se aforaron a 25 mL con agua desionizada y se filtraron en papel de poro de 2.5 µm, los extractos se conservaron en frascos de plástico para su posterior análisis (EPA 3052). La determinación de los elementos Cu, Zn, Cd, Mn, Pb y Fe se realizó a través de absorción atómica por el método de flama. Mientras que los elementos K y P se determinaron por flamometría y espectrofotometría de UV-Visible, respectivamente

Posterior al análisis de EPT, el factor de translocación (FT) y bioacumulación se calculó, como lo indican las siguientes fórmulas (Stoltz y Greger, 2002; Shi y Cai, 2009):

$$FB = \frac{\text{Concentración de EPT en hojas o raíz}}{\text{Concentración de EPT extractable con DTPA en sustrato}}$$

$$FT = \frac{\text{Concentración de EPT en parte aérea}}{\text{Concentración de EPT en raíz}}$$

Mientras que la absorción total de EPT se calculó con la siguiente formula (Shi y Cai, 2009):

$$\text{Absorción total de EPT} = \text{Biomasa parte aérea} \times \text{Concentración de EPT en parte aérea}$$

4.7. Evaluación de la colonización de *Ricinus communis* con bacterias promotoras del crecimiento vegetal

4.7.1. Tinción vital

Segmentos de 1 cm de raíz se tomaron y se colocaron en tubos Eppendorf con 2 mL de una solución succinato deshidrogenasa (SDH, [Anexo XVI](#)) y se dejaron en oscuridad durante 24 h. Posteriormente, la solución SDH se eliminó y la reacción se detuvo con NaClO comercial a 1% durante 5 min. Luego, las raíces se enjuagaron con agua destilada y se agregó fucsina ácida (0.1% en glicerol a 50%). El exceso de colorante se eliminó con glicerol a 50%. Se montaron 15 segmentos de raíces por tratamiento en portaobjetos. Las preparaciones se observaron en un microscopio a 40x (González-Chávez *et al.*, 2007).

4.7.2. Colonización de *Ricinus communis* por N9 y Mc188

Se tomó 500 mg de raíz de *R. communis* y se colocó en un tubo de ensaye con 5 mL de caldo nutritivo estéril con 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de amikacina y 50 mg L^{-1} de ketoconazol (para inhibir el crecimiento de hongos y levaduras). Diluciones seriadas

de la suspensión de la raíz se realizaron (10^{-1} a 10^{-4}). Las muestras se incubaron durante 48 h a 30 °C. Posteriormente 1 mL de las últimas diluciones se sembraron en placas de agar nutritivo, las cuales se incubaron 24 h a 30°C. El conteo de colonias se realizó concluido el periodo de incubación.

4.8. Análisis del residuo minero

Al retirar las plantas del sustrato, éste se homogenizó y se secó durante 5 días a temperatura ambiente. Luego se tomaron muestras para medir las variables: pH y CE ([Capítulo III, 3.1.2](#)), materia orgánica ([Capítulo III, 3.1.4](#)), P disponible ([Capítulo IV, 4.1.6](#)), N inorgánico ([Capítulo IV, 4.1.7.](#)), concentración DTPA-extractable de EPT ([Capítulo III, 3.1.9](#)), y con $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, capacidad de producción de AIA de microorganismos nativos del residuo de mina como de la mezcla residuo de mina con enmiendas y análisis cualitativo en espectrofotometría infrarroja ([Capítulo III, 3.1.10](#)).

4.8.1. Concentración extractable- $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ de elementos potencialmente tóxicos

Del residuo de mina y residuo de mina con enmienda con y sin inoculación bacteriana se pesaron 5 g y se depositaron en tubos Falcón de 50 mL. Enseguida se agregaron 25 mL de una solución de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0.01M. Los tubos se agitaron durante 2 h a 120 opm y se centrifugaron a 2 000 rpm durante 10 min. Después, las muestras se filtraron con papel de poro de 2.5 μm y se conservaron en frascos de plástico para su posterior análisis. El contenido de EPT se determinó por espectrofotometría de absorción atómica por el método de flama.

4.8.2. Capacidad de producción de ácido indolacético de microorganismos nativos del residuo de mina y de la mezcla residuo de mina con enmiendas e inoculación bacteriana (Ingo, 1997).

Se tomaron 2 g de suelo rizosférico y se depositaron en tubos de centrifugación que contenían 6 mL de buffer de fosfatos (pH 7.5) con glucosa (1 g por 100 mL de buffer) y 4 mL de solución de L-triptófano (1 g de triptófano por 100 mL de H₂O). Los tubos se incubaron a 37°C durante 24 h en la oscuridad.

Para inactivar la actividad enzimática se agregaron 2 mL de solución de ácido tricloroacético 5% (m/v) y 1 mL de solución de CaCl₂ 0.5 M. Las muestras se filtraron con papel Whatman No. 2. Finalmente, 3 mL del filtrado se depositaron en un tubo de ensayo y se agregaron 2 mL de reactivo de Salkowski. La mezcla se incubó durante 30 min a 25 °C en la oscuridad. La absorbancia de la solución se midió a 535 nm y el contenido de AIA se determinó comparando la absorbancia de la muestra contra una curva de calibración estándar ([Anexo XVII](#)).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.9. Cinética de estabilización

Con base en los resultados del [Capítulo III](#), en un principio se eligió como enmienda estiércol ovino. Sin embargo, los datos obtenidos en el presente capítulo difieren con los que se obtuvieron anteriormente. De manera general, el estiércol ovino solubilizó Cu, Cd y Zn.

Ross (1994) sugirió que los procesos de maduración de la materia orgánica son importantes para formar complejos metálicos altamente estables. No obstante, la

formación de compuestos metal-orgánicos estables y los cambios en el fraccionamiento de EPT son altamente dependientes de las condiciones en que se lleve a cabo el experimento, tipo de material orgánico y grado de humificación (Tandy *et al.*, 2009; Rashid, 1985; Pérez-Esteban *et al.*, 2013). En este sentido, la discrepancia entre estos resultados y los obtenidos anteriormente, puede atribuirse a las condiciones en que se llevaron a cabo ambos experimentos; las cuales probablemente influyeron en la fermentación del estiércol. Se tuvieron periodos de humedecimiento y secado para este experimento y un mes en la oscuridad a humedad constante, seguida de periodos de humedecimiento y secado en invernadero para el experimento de incubación. Por tanto, se recomienda que en futuros trabajos cuando se trabaje con materiales orgánicos frescos, los experimentos de invernadero se realicen en condiciones lo más parecidas posibles a las condiciones del lugar y material a estabilizar y así facilitar la aplicación de enmiendas a mayor escala.

Por otra parte, para frenar la solubilización de EPT por efecto del estiércol se agregó CaCO_3 (2.5 g por kg de residuo minero), pero no se observó efecto significativo ($\alpha=0.05$) en la estabilización de Cu, Cd y Zn (como se discutirá más adelante). Así que se agregó K_2HPO_4 (equivalente a 40 kg de P ha^{-1}) y 10% de vermicompost. Los resultados obtenidos se discuten a detalle a continuación.

4.9.1. Plomo

La concentración de Pb en el residuo de mina con enmienda (estiércol ovino) se estabilizó significativamente ($\alpha=0.05$; Figura 26) durante el segundo y tercer periodo de humedecimiento y secado (21% y 19%, respectivamente). Estos

resultados coinciden con los obtenidos en el experimento de incubación ([Capítulo III, 3.6.1](#)). Sin embargo, después de agregar $\text{Ca}(\text{CO}_3)_2$ se observó que la concentración de este elemento fue estadísticamente igual ($\alpha=0.05$) al tratamiento testigo (residuo de mina con 0% enmienda). El K_2HPO_4 no mostró tener efecto significativo ($\alpha=0.05$) en la estabilidad de Pb y al agregar vermicompost se obtuvo 25% de estabilización.

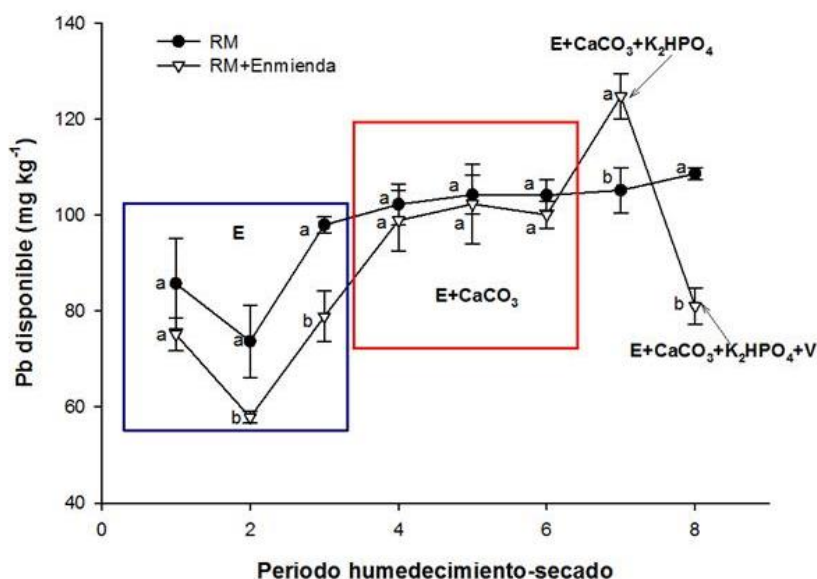


Figura 26. Cinética de estabilización de Pb por la adición de estiércol ovino (E, cuadro azul), cal (CaCO_3 , cuadro rojo), fosfato (K_2HPO_4) y vermicompost (V) en un residuo de mina (RM).

La estabilización del Pb por efecto de las enmiendas orgánicas se puede explicar a la fuerte afinidad de este elemento por los ligandos orgánicos (McLean y Bledsoe, 1997). Varios autores (Veeresh *et al.*, 2003; Basta y Tabatabai, 1992; Echeverria *et al.*, 1998) han encontrado que el Pb se adsorbe preferentemente en materiales orgánicos en comparación con Cu, Cd y Zn. Mientras que el aumento en la concentración de Pb extractable al agregar K_2HPO_4 puede deberse a la

solubilización de compuestos orgánicos y el enlace de Pb a éstos; lo que aumentó su disponibilidad (Park *et al.*, 2011).

4.9.2. Cobre

Por otra parte, todas las enmiendas causaron la solubilización de Cu, además, la variación en el contenido del Cu refleja alta inestabilidad del sistema. Durante el quinto y sexto periodo de humedecimiento y secado se observó 93 y 80% de solubilización, respectivamente (Figura 27). Mientras que para el octavo periodo (que correspondió a la adición de vermicompost) se obtuvo aproximadamente 46% de solubilización con respecto al tratamiento testigo.

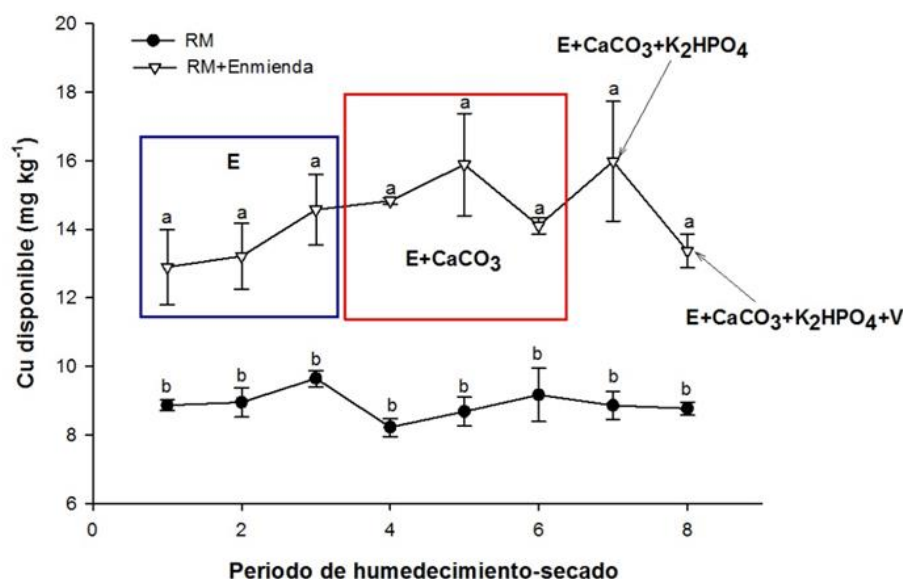


Figura 27. Cinética de estabilización de Cu por la adición de estiércol ovino (E, cuadro azul), cal (CaCO_3 , cuadro rojo), fosfato (K_2HPO_4) y vermicompost (V) en un residuo de mina (RM).

La solubilidad de este elemento puede asociarse a la formación de complejos orgánicos solubles con el Cu. Los cuales se forman como consecuencia de la reacción con materia orgánica a $\text{pH} > 7$ (Ashworth y Alloway, 2008). El pH de la

mezcla residuo de mina con enmiendas se mantuvo entre 8.2 y 9 durante la cinética de estabilización (Figura 28).

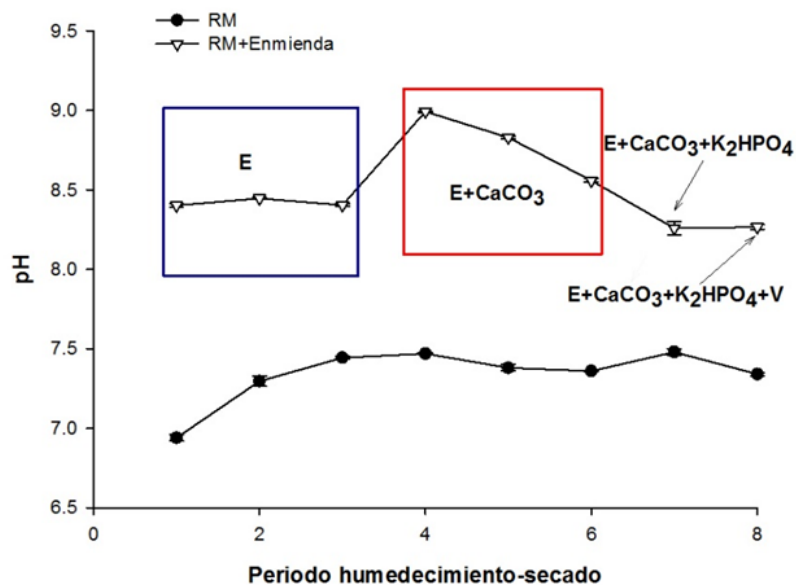


Figura 28. Cinética de pH por la adición de estiércol ovino (E, cuadro azul), cal (CaCO_3 , cuadro rojo), fosfato (K_2HPO_4) y vermicompost (V) en un residuo de mina (RM).

El análisis de correlación de Pearson mostró vinculación positiva entre pH y el contenido de Cu (Cuadro 9). Ashwort y Alloway (2008) sugirieron que la materia orgánica disuelta (MOD) actúa de dos formas: 1) ésta se puede unir al Cu aumentando su disponibilidad, esto involucraría compuestos de bajo peso molecular y solubles como los ácidos fúlvicos o 2) puede afectar las cargas de las partículas. Conforme incrementa el pH, las cargas negativas incrementan y repelan a otras cargas negativas, como al Cu acomplexados por ligantes orgánicos cargados negativamente. No obstante, nótese que las concentraciones encontradas en el presente trabajo son menores comparadas con aquellas donde el Cu es uno de los principales contaminantes. Por ejemplo, Pérez-Esteban *et al.* (2013) encontraron 118

mg kg⁻¹ de Cu extractable en residuos de mina. Andreazza *et al.* (2013) reportaron 207, 142, y 576 mg kg⁻¹ de Cu extractable en dos suelos de viñedos y un residuo de mina respectivamente. En este sentido, el riesgo de contaminación por el efecto de solubilización de Cu es mínimo, en cambio, estas pueden mejorar la disponibilidad de este microelemento.

Cuadro 9. Correlaciones de Pearson entre Cu y las variables de pH, CE y Cd.

Relación	Coefficiente de correlación	Pr>F
pH-Cu	0.8977	<0.0001
CE-Cu	0.8882	<0.0001
Cd-Cu	0.8432	<0.0001

Significancia a $\alpha=0.05$

4.9.3. Cadmio

Ninguna de las enmiendas que se agregaron al residuo de mina estabilizó Cd, como lo muestra la Figura 29. En el séptimo periodo de humedecimiento y secado se observó la mayor solubilización de Cd (74%). El análisis de correlación de Pearson (Cuadro 10) mostró correlación positiva entre el contenido de Cu y Cd, por lo que puede inferirse que el Cu está compitiendo con el Cd por los sitios de adsorción o bien que la adición de enmiendas modificó las formas químicas de estos elementos originalmente presentes. Kuo y Baker (1980) reportaron que la presencia de Cu interfiere con la adsorción de Cd y Zn. También se encontró correlación positiva entre el contenido de Cd y la CE ($\alpha=0.05$). Otras investigaciones han encontrado que el incremento en la movilidad de Cd se puede asociar al contenido de algunos electrolitos, como por ejemplo el ion Cl⁻ (Amrhein *et al.*, 1992; McLean y Bledsoe, 1997) con el que forma complejos solubles, además la variación en la fuerza iónica

de la solución tiene fuerte efecto sobre la disponibilidad de este elemento. En la Figura 30 se observa la cinética de la CE durante la estabilización de los EPT. El estiércol ovino y CaCO_3 cambiaron la CE de 2 dS m^{-1} (efecto muy ligeramente salino) a 7.4 dS m^{-1} (efecto salino). Y el K_2HPO_4 y vermicompost tuvieron efecto fuertemente salino sobre el residuo de mina (10 dS m^{-1}).

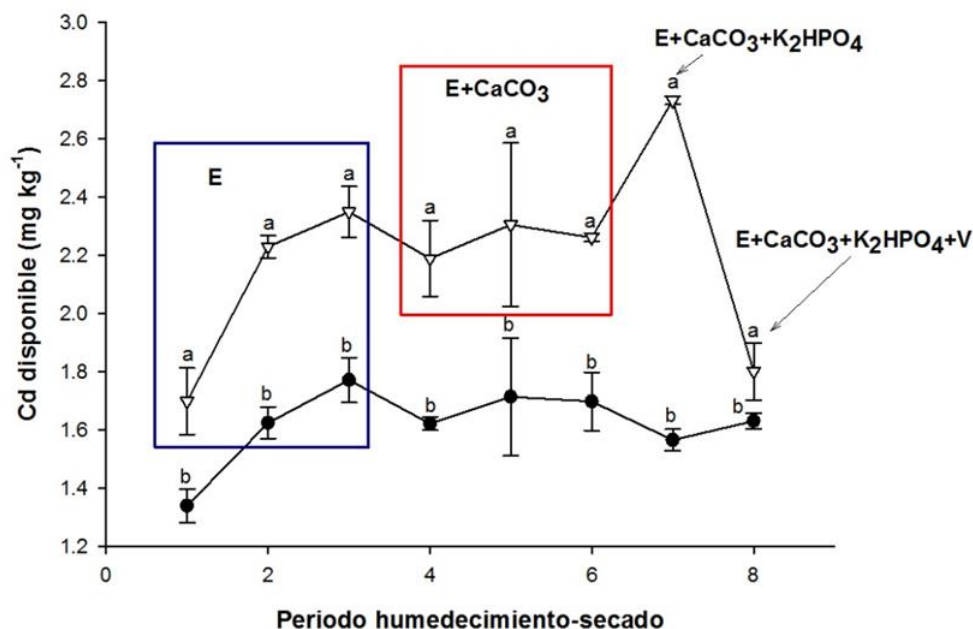


Figura 29. Cinética de estabilización de Cd por la adición de estiércol ovino (E, cuadro azul), cal (CaCO_3 , cuadro rojo), fosfato (K_2HPO_4) y vermicompost (V) en un residuo de mina (RM).

Por otra parte, la nula respuesta de las enmiendas sobre la estabilización de Cd se puede atribuir al hecho de que el Cd se une débilmente a la materia orgánica (McBride, 1994) y se caracteriza por unirse a través de intercambio catiónico (Borůvka y Drábek, 2004), además de la competencia con los iones predominantes como el Ca y Mg introducidos por las enmiendas. También se ha reportado la formación de complejos poco estables entre Cd y ácidos húmicos (principalmente con los grupos $-\text{COOH}$ y $-\text{OH}$; Borůvka y Drábek, 2004).

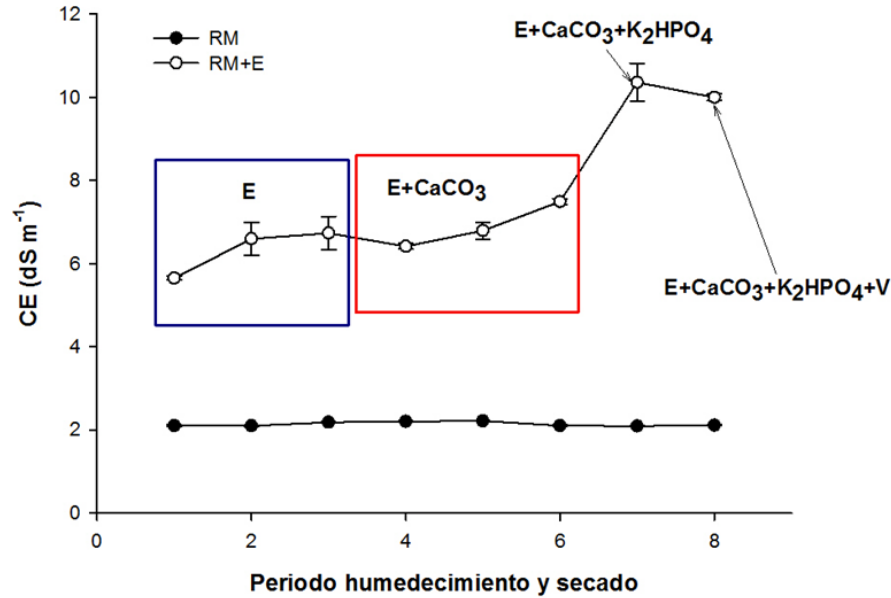


Figura 30. Cinética de CE por la adición de estiércol ovino (E, cuadro azul), cal (CaCO_3 , cuadro rojo), fosfato (K_2HPO_4) y vermicompost (V) en un residuo de mina (RM).

4.9.4. Zinc

Para el caso del Zn, no se observó efecto significativo ($\alpha=0.05$) en la estabilización de este elemento por efecto del estiércol ovino y K_2HPO_4 (durante los primeros cinco periodos de humedecimiento y secado; Figura 31). La nula respuesta del PO_4 sobre la estabilización de Zn, puede deberse a la competencia entre Ca y Zn por el fosfato. Sin embargo, éste puede adsorberse fácilmente a las superficies reactivas del suelo y así bloquear los sitios de adsorción para otros elementos, entre ellos el Zn (McLean y Bledsoe, 1997). Austruy *et al.* (2014) demostraron que las enmiendas de P (KH_2PO_4 e hidroxiapatita) no tienen efecto en la formación de complejos metal-P en ausencia de plantas. Pero, en la presencia de plantas estas enmiendas causaron la inmovilización de Pb y Zn a través de la formación de

complejos metal-P. Finalmente, una estabilización estadísticamente significativa ($\alpha=0.05$) se obtuvo durante el periodo de humedecimiento y secado seis y ocho correspondiente a CaCO_3 y vermicompost (20% y 38% respectivamente).

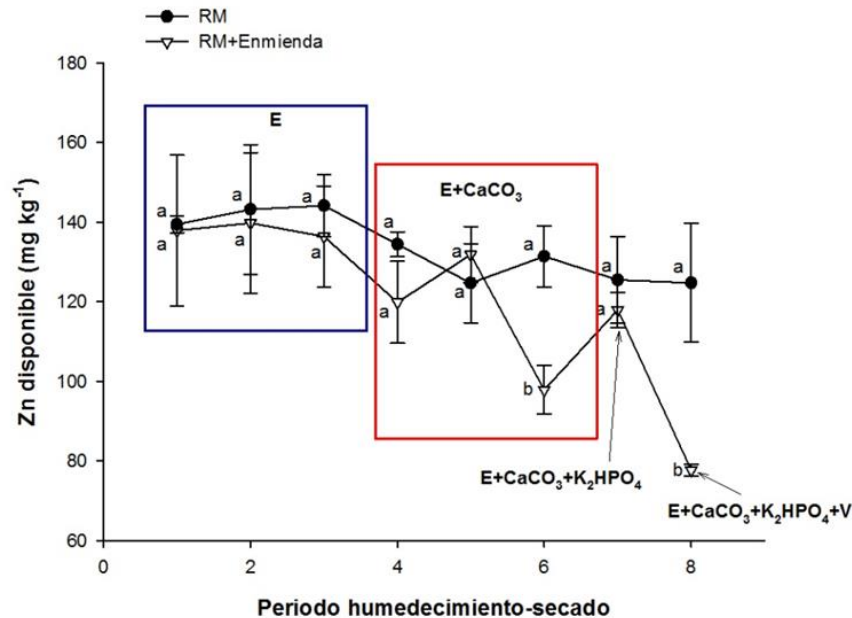


Figura 31. Cinética de estabilización de Zn por la adición de estiércol ovino (E, cuadro azul), cal (CaCO_3 , cuadro rojo), fosfato (K_2HPO_4) y vermicompost (V) en un residuo de mina (RM).

4.10. Propiedades fisicoquímicas del residuo minero después de aplicación de enmiendas

La aplicación de enmiendas redujo significativamente la densidad aparente (22%) del residuo de mina (Cuadro 10). El volumen de poros en el residuo aumentó 15% como consecuencia de la disminución en la densidad aparente. Mientras, que la retención de humedad incrementó 9%. La compactación se clasificó como intermedia baja (Soil survey Division Staff, 1990) tanto para residuo de mina como para la

mezcla, no obstante, el cambio en esta propiedad por efecto de las enmiendas fue diferente al residuo de mina.

Cuadro 10. Propiedades físicas del residuo minero y del residuo minero mezclado con enmienda.

Variable	Tratamiento	
	RM	RM+E
Densidad aparente (g cm ⁻³)	1.64±0.03 a	1.28±0.00 b
Densidad real (g cm ⁻³)	2.88±0.14	2.53±0.29
Volumen de poros (%)	42.55±2.71 a	49.05±6.01 a
Humedad a capacidad de campo (%)	26.12±0.61 b	35.30±0.29 a
Resistencia a la penetración (kg cm ⁻²)	1.52±0.27 b	2.02±0.25 a
Color		
Seco	5Y6/1	5Y4/2
Húmedo	5Y4/1	10YR3/4

RM, residuo de mina; RM+E, residuo de mina con enmienda

El pH del residuo cambio de neutro a medianamente alcalino por efecto de las enmiendas (Cuadro 11). Esta variable se encontró dentro del intervalo de pH (5.5 a 7) que se requiere para el cultivo de *R. communis*. Otros trabajos han documentado que *R. communis* puede crecer sin problemas en suelos con pH 8 (Bonjean, 1991; Jachmanian *et al.* 2009), como el que se observó en la mezcla de residuo con enmiendas. La CE cambió de muy ligeramente salino a fuertemente salino (Cuadro 11). El contenido de materia orgánica, P disponible y N inorgánico, también aumentaron significativamente como consecuencia de la aplicación de las enmiendas (Cuadro 11).

La ventaja de usar materiales orgánicos para inmovilizar EPT en residuos de mina radica en que éstos también aportan nutrientes (como N, P y C) al residuo y facilitan el establecimiento de las plantas y poblaciones microbianas. En adición, Ye *et al.* (1999, 2000), Tordoff *et al.* (2000) y Walker *et al.* (2004) han mostrado que las enmiendas orgánicas son efectivas para la revegetación de residuos de mina, debido

al alto aporte de macronutrientes (N, P y K) y a que se mejoran las propiedades físicas del suelo.

4.11. Contenido de EPT y propiedades químicas del sustrato al final del experimento

Después del establecimiento de *R. communis*, el pH disminuyó 0.25 unidades y 0.47 unidades en el tratamiento testigo y en los tratamientos con enmienda e inoculación bacteriana, respectivamente (Cuadro 11). Este cambio puede deberse a los exudados radicales, ya que las plantas alteran el pH como consecuencia de la respiración radical y la excreción de ácidos orgánicos y otros compuestos, o reabsorción de H^+ o HCO_3^- para equilibrar la absorción de nutrientes (Hashimoto *et al.*, 2010; Neumann y Römheld, 2000; Ahmad *et al.*, 2012; Tao *et al.*, 2005). Así mismo, la CE de la mezcla disminuyó 22% con respecto a la CE al inicio del experimento. Cambios similares observaron Perez-Esteban *et al.* (2013), quienes agregaron compost de estiércol de caballo y ovino a un residuo de mina. Después de establecer *Brassica juncea* L. y crecer durante 110 días, la CE disminuyó entre 27% y 32% en comparación con la CE antes del experimento.

No se observaron cambios significativos ($\alpha=0.05$) en el contenido de materia orgánica, pero sí en el contenido de P disponible. En el tratamiento testigo la concentración de P aumentó de bajo (5.92) a alto (Cuadro 11). Mientras que en el tratamiento con enmiendas e inoculación bacteriana se encontró que el P disponible aumentó aproximadamente 2.4 veces. Además, el N inorgánico disminuyó significativamente ($\alpha=0.05$) en los tratamientos RM+E, RM+E+N9 y RM+E+Mc188 (Cuadro 11). Cabe remarcar que no se encontró diferencia significativa entre el

tratamiento con enmienda y la inoculación bacteriana en todas las variables que se evaluaron (pH, CE, MO, P disponible y N inorgánico).

Al comparar las concentraciones de EPT antes y después del experimento no se encontraron cambios significativos en el contenido de Cd (Cuadro 12). Aproximadamente 50% de Pb extractable se estabilizó en todos los tratamientos al final del experimento. La menor concentración de Pb se encontró en el tratamiento testigo. La concentración extractable de Zn aumentó entre 24% y 30% en comparación con el contenido de Zn antes del experimento. La mayor concentración de Zn se encontró en el tratamiento testigo y no se detectó diferencia significativa ($\alpha=0.05$) entre la adición de enmiendas y la inoculación bacteriana (Cuadro 12).

Correlación negativa entre la concentración extractable de Zn y pH ($r=0.95$, $p<0.0001$) se observó, por lo que la solubilidad de Zn puede explicarse a los cambios inducidos en el pH por efecto de las plantas. Estudios han mostrado que durante la fitorremediación, las plantas inducen cambios en pH, potencial redox, contenido de materia orgánica disuelta y estimulan de la actividad microbiana. Dichos cambios pueden alterar la distribución de los EPT (Tao *et al.*, 2005). Banks *et al.* (1994) demostraron el efecto de las plantas en la lixiviación de Zn en residuos de minas. Los resultados mostraron que altas concentraciones de Zn se lixivian cuando las plantas están presentes. Además analizaron la función de los microorganismos (hongos micorrizicos) y observaron que las plantas inoculadas lixivian menos Zn en comparación con las no inoculadas. En nuestro caso, las enmiendas y la inoculación bacteriana parecen reducir la solubilización de Zn entre 43% y 46% en comparación con el tratamiento testigo.

Cuadro 11. Propiedades químicas del residuo de mina (RM) y la mezcla residuo de mina con enmienda (RM+E) e inoculación bacteriana (RM+E+N9, Mc188) antes y después del experimento en invernadero.

Variable	Tratamiento (inicio experimento)		Tratamiento (final del experimento)			
	RM	RM+E	RM	RM+E	RM+E+N9	RM+E+Mc188
pH	7.34±0.01 b A	8.26±0.01 a A	7.09±0.09 b B	7.79±0.03 a B	7.78±0.03 a B	7.79±0.04 a B
CE (dS m ⁻¹)	2.1±0.02 b A	10.0±0.07 a A	2.12± 0.02 b A	3.88± 0.43 a B	3.67±0.66 a B	4.15±0.53 a B
Materia orgánica (%)	3.68±0.35 b A	8.55±0.83 a A	3.64±0.19 b A	8.71±0.52 a A	9.11±1.74 a A	8.10±.80 a A
P disponible (mg kg ⁻¹)	5.92±0.60 b B	149.78±29.74 a B	16.2±1.9 b A	359.8±67.1 a A	354.7±29.1 a A	372.7±34.3 a A
N inorgánico (mg kg ⁻¹)	6.99±3.50 b A	430.04±37.03 a A	11.29±8.38 b A	48.54±17.05 a B	43.70±33.69 a B	68.75±18.95 a B

Comparaciones significativas con un nivel de significancia del 5% ($\alpha=0.05$). Letras en minúscula representan la comparación entre tratamientos. Letras en mayúsculas designan la comparación antes y después del experimento (RM vs RM; RM+E vs RM+E, RM+E+N9, Mc188).

RM, residuo de mina; RM+E, residuo de mina con enmienda; RM+E+N9, residuo de mina con enmienda e inoculación de la bacteria N9; RM+E+Mc188, residuo de mina con enmienda e inoculación de la bacteria Mc188.

Cuadro 12. Concentración extractable en DTPA-TEA-CaCl₂ de EPT en residuo de mina antes y después del establecimiento de *R. communis* en invernadero.

Tratamiento	Cu	Zn	Pb (mg kg ⁻¹)	Cd
Antes				
RM	9.2±0.8 b A	131.4±7.6 a B	104.1±3.1 a A	1.7±0.1 a A
RM+E	13.4±0.5 a A	77.7±1.6 b B	81.0±3.7 b A	1.8±0.1 a A
Después				
RM	7.4±0.3 b B	179.5±6.1 a A	50.8±4.8 b B	1.5±0.1 b A
RM+E	13.2±0.4 a A	96.5±5.1 b A	68.0±3.9 a B	2.0±0.1 a A
RM+E+N9	13.7±1.8 a A	101.4±13.6 b A	65.7±4.8 a B	1.9±0.2 a A
RM+E+Mc188	13.8±1.1 a A	98.1±10.3 b A	67.2±6.7 a B	2.0±0.2 a A

Comparaciones significativas con un nivel de significancia del 5% ($\alpha=0.05$). Letras en minúscula representan la comparación entre tratamientos. Letras en mayúsculas designan la comparación antes y después del experimento (RM vs RM; RM+E vs RM+E, RM+E+N9, Mc188).

RM, residuo de mina; RM+E, residuo de mina con enmienda; RM+E+N9, residuo de mina con enmienda e inoculación de la bacteria N9; RM+E+Mc188, residuo de mina con enmienda e inoculación de la bacteria Mc188.

Por otra parte, la estabilización de Pb después del crecimiento de *R. communis*, puede deberse a la adsorción de este elemento en los compuestos orgánicos del residuo. Martínez-Alcalá *et al.* (2009) sugieren que los exudados radicales promueven la adsorción de compuestos de EPT solubles en agua o quelatos organometálicos en la fase sólida del suelo. Además, los ligandos orgánicos que exudan las plantas se consideran una de las estrategias más importantes para excluir la absorción de EPT y estos también pueden funcionar como agentes quelantes (Kidd *et al.*, 2009; Tao *et al.*, 2005). Y aparentemente, *R. communis* promueve la estabilización de Pb.

La extracción con solución de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0.01 M se usó para simular las condiciones electrolíticas de la solución intersticial del suelo y así tener información acerca de las concentraciones de EPT que están inmediatamente disponibles para la planta. En el tratamiento testigo se encontró la siguiente secuencia de EPT $\text{Zn} > \text{Pb} > \text{Cd} > \text{Cu}$, y para los tratamientos con enmienda e inoculación bacteriana fue $\text{Pb} > \text{Zn} > \text{Cu} > \text{Cd}$. Dichas secuencias coinciden con la concentración de EPT en parte aérea de *R. communis* ($\text{Zn} > \text{Pb}$ para el tratamiento testigo y $\text{Pb} > \text{Zn}$ para los tratamientos de enmienda e inoculación bacteriana). Las enmiendas y la inoculación bacteriana redujeron significativamente ($\alpha=0.05$) la concentración de Zn y Cd (Cuadro13). En el caso de Cd, las enmiendas y la inoculación de la cepa N9 no se detectó presencia de este elemento. El contenido de Pb fue significativamente menor en los tratamientos con enmienda y la inoculación de la bacteria N9.

Cuadro 13. Concentración extractable de EPT con $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ en residuo de mina después del establecimiento de *R. communis*.

Tratamiento	Cu	Zn (mg kg ⁻¹)	Pb	Cd
RM	0.12±0.11 b	14.14±2.36 a	5.26±0.76 a	0.18±0.05 a
RM+E	1.10±0.19 a	1.85±1.02 b	3.65±0.59 b	nd
RM+E+N9	1.01±0.28 a	2.48±1.55 b	3.91±0.53 b	nd
RM+E+Mc188	0.83±0.09 a	1.20±0.46 b	4.88±0.87 a	0.08±0.04 b

RM, residuo de mina; RM+E, residuo de mina con enmienda; RM+E+N9, residuo de mina con enmienda e inoculación de la bacteria N9; RM+E+Mc188, residuo de mina con enmienda e inoculación de la bacteria Mc188; nd, no detectado. Comparaciones significativas con un nivel de significancia del 5% ($\alpha=0.05$)

4.12. Capacidad de producción de ácido indolacético (AIA) por microorganismos nativos de residuo de mina y mezcla residuo de mina con enmienda e inoculación bacteriana

La concentración de AIA varió de 0.27 a 0.34 mg g⁻¹ (Figura 32). La mayor concentración se encontró en el tratamiento con inoculación de la bacteria Mc188. Además no se observó diferencia significativa entre el tratamiento testigo, la adición de enmiendas y la inoculación de la bacteria N9. Los resultados sugieren que los microorganismos nativos del residuo de mina y de la mezcla son capaces de sintetizar AIA. La presencia de esta fitohormona en el sustrato ofrece la ventaja de aumentar la capacidad de las plantas de anclarse mejor al suelo, de obtener nutrientes y por tanto, mejorar la posibilidad de su supervivencia (Patten y Glick, 2002).

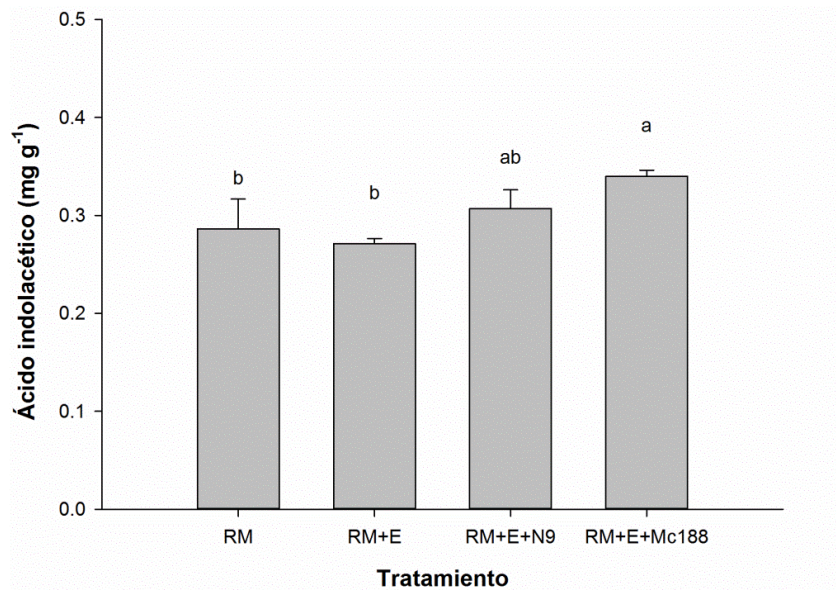


Figura 32. Capacidad de producción de ácido indolacético de los microorganismos nativos en función de los diferentes tratamientos: Residuo de mina (RM), enmiendas (RM+E), e inoculación bacteriana (RM+E+N9, RM+E+Mc188).

4.13. Promoción de *Ricinus communis* en residuo minero por efecto de bacterias promotoras del crecimiento vegetal y enmiendas

La Figura 33a muestra la cinética de emergencia de *R. communis* durante el experimento en invernadero. Las primeras plantas en emerger después del trasplante *R. communis* correspondieron al tratamiento testigo y la inoculación de la bacteria Mc188. Además, siete días después del trasplante se observó 100% de emergencia en el tratamiento testigo y ocho días después en el tratamiento con la inoculación de la bacteria Mc188. Mientras que para los otros tratamientos (residuo de mina con enmiendas y las enmiendas en conjunto con la bacteria N9) el 100% de germinación se observó 12 días después del trasplante. La rápida emergencia en las plantas testigo y la tardía emergencia de los tratamientos con enmienda e

inoculación de N9 puede estar influenciada por la resistencia a la penetración del residuo. Van der Weide (1993) citado por Vleeshouwers (1997) informó que la profundidad de enterramiento, temperatura y la resistencia a la penetración del suelo, son factores determinantes en la tasa de emergencia. Así mismo, Vleeshouwers (1997) reportaron que el porcentaje de emergencia de *Polygonum persicaria* L., *Chenopodium album* L. y *Spergula arvensis* L. fue menor con el incremento de la resistencia a la penetración. Por otra parte, los resultados sugieren que a pesar de la resistencia a la penetración del suelo, la bacteria Mc188 promueve la emergencia de las plantas.

Las plantas que crecieron en residuo de mina tuvieron significativamente menor altura ($\alpha=0.05$) en comparación con las que crecieron en los tratamientos con enmienda e inoculación bacteriana (Figura 33b). Durante la cinética de crecimiento no se observó efecto significativo de la inoculación bacteriana en comparación con las enmiendas ([Anexo XVIII-1](#)).

Biomasa aérea, área foliar y altura de *R. communis* aumentó 200%, 200% y 100%, respectivamente, por efecto de las enmiendas (Cuadro 14). Los resultados sugieren que la aplicación de enmiendas fue el principal factor que influyó positivamente sobre el crecimiento de *R. communis*, ya que no se encontró diferencia entre la adición de enmiendas y la aplicación de BPCV en conjunto con enmiendas (Cuadro14). Resultados similares se han reportado por Juwarkar *et al.* (2008), donde la aplicación de biosólidos fue el principal factor que influyó en el rendimiento de *Jatropha curcas* en comparación con la aplicación en conjunto de biosólidos y biofertilizantes.

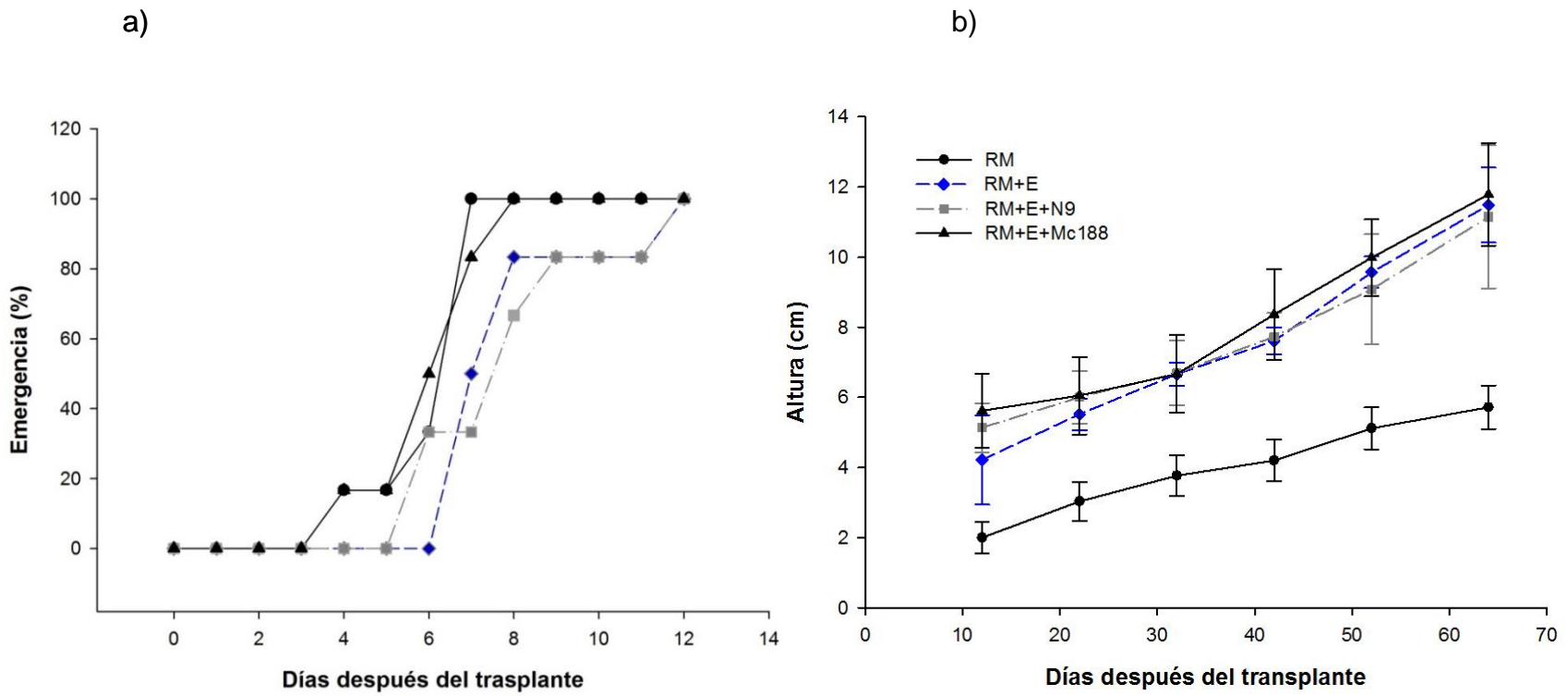


Figura 33. a) Cinética de emergencia y de b) crecimiento de *R. communis* en función de los tratamientos: residuo de mina (RM), adición de enmiendas (RM+E) y enmiendas con inoculación bacteriana (RM+E+N9, Mc188).

No se observaron diferencias significativas ($\alpha=0.05$) en volumen y biomasa radical entre los tratamientos. Sin embargo, la mayor longitud radical total se encontró en plantas que crecieron en residuo de mina solo (Cuadro 14). En este sentido, el crecimiento radical de las plantas testigo se puede beneficiar por la síntesis de AIA por parte de los microorganismos nativos ([sección 4.12](#)).

Cuadro 14. Variables de crecimiento de *R. communis* establecidas en residuo de mina y residuo de mina con enmienda e inoculación bacteriana y comparación de medias (Prueba de Tukey, $\alpha=0.05$) para dichas variables.

Tratamiento	Área foliar (cm ²)	Biomasa aérea (g)	Biomasa radical (g)	Volumen radical (cm ³)	Longitud radical (cm)	Altura de planta
RM	72.9±39.4 b	0.37±0.16 b	0.29±0.08 a	6.75±1.66 a	36.4±6.9 a	5.72±0.62 b
RM+E	235.2±53.7 a	1.30±0.21 a	0.44±0.10 a	6.66±1.60 a	16.5±2.3 b	11.48±1.07 a
RM+E+N9	220.0±89.2 a	1.17±0.46 a	0.49±0.22 a	7.50±3.40 a	17.7±5.2 b	11.15± 2.03 a
RM+E+Mc188	209.5±31.8 a	1.23±0.23 a	0.52±0.13 a	6.66±1.50 a	16.2±2.0 b	11.78±1.46 a

RM, residuo de mina; E, enmienda, N9, inoculación con bacteria N9; Mc188, inoculación con bacteria Mc188

Además de la escasa producción de biomasa que presentó el tratamiento testigo (RM, Cuadro 14), se observaron algunos síntomas de toxicidad como clorosis, marchites y marcas necróticas en hojas (Figura 34). Estos síntomas pueden estar relacionados a los efectos tóxicos de los EPT (Chen *et al.*, 2009; Millaleo *et al.*, 2010; Rodríguez-Serrano *et al.*, 2008; Sharma y Dubey, 2005; Shorrocks y Alloway, 1988). Se observó correlación negativa entre las variables biomasa aérea ($r=-0.80$, $p<0.0001$) y altura ($r=-0.85$, $p<0.0001$) con el contenido de Zn en tejido aéreo vegetal. Kawachi *et al.* (2011) mencionaron que el exceso de Zn (>400 mg kg⁻¹ masa seca) en plantas puede causar clorosis y desordenes de crecimiento. Mientras que Ebbs y Kochian (1997) reportaron que la exposición de *Brassica* sp. a altas concentraciones de Zn causó clorosis en hojas jóvenes. La

clorosis del apice hacia el centro de la hoja se puede deber al efecto tóxico del Cd y Zn.



Figura 34. Síntomas visibles de toxicidad en hojas de *R. communis* en el tratamiento testigo (RM, residuo de mina).

4.14. Contenido de elementos potencialmente tóxicos en *Ricinus communis*

La tendencia de acumulación de EPT en la parte aérea de *R. communis* para los tratamientos RM+E, RM+E+N9 y RM+E+Mc188 fue la siguiente $Pb > Zn > Cd \geq Cu$ y para el tratamiento testigo (RM) fue $Zn > Pb > Cu > Cd$. La concentración de Cu en tejido aéreo de *R. communis* de todos los tratamientos (Cuadro 15) se encontró dentro de las concentraciones normales según los valores propuestos por Kabata-Pendias (2011). En el tratamiento testigo se hallaron concentraciones de Zn por arriba de las concentraciones fitotóxicas propuestas por Varun *et al.* (2012). Estos resultados son contrarios a los reportados por Ruiz-Olivares *et al.* (2013), quienes encontraron concentraciones de Zn en parte aérea de *R. communis* (accesión SF7) por debajo de las concentraciones fitotóxicas, de plantas establecidas naturalmente en residuos de

mina de la región de Zimapan. Además, otros trabajos (Eriksson, 1988; Miller *et al.*, 1983) sugieren que los cultivos que crecen en suelos arenosos y con bajo contenido de materia orgánica (tal es el caso del residuo de mina), pueden absorber más EPT, en comparación con las plantas que crecen en suelos con alto contenido de arcilla y materia orgánica.

Cuadro 15. Concentraciones de EPT en parte aérea y radical de *R. communis*.

Tratamiento	Cu	Zn (mg kg ⁻¹)	Pb	Cd
Parte aérea				
RM	10.64±4.06 a	314.62±42.10 a	98.52±12.38 b	11.82±3.19 ab
RM+E	7.80±3.07 a	30.74±1.74 c	158.18±24.43 a	15.19±2.87 a
RM+E+N9	7.43±1.92 a	34.30±9.83 c	172.32±35.20 a	8.56±2.00 b
RM+E+Mc188	9.29±3.55 a	87.91±17.54 b	195.00±24.02 a	9.29±2.50 b
Límite de fitotoxicidad*	15-20	150-200	10-20	5-10
Raíz				
RM	218±62 a	1749±581 a	375±41 a	97±12 a
RM+E	118±30 b	176±73 b	310±51 a	26±4 b
RM+E+N9	118±42 b	463±85 b	312±55 a	28±3 b
RM+E+Mc188	141±31 ab	521±107 b	333±77 a	31±4 b

* Varun *et al.* (2012)

La concentración de Pb en parte aérea estuvo por arriba los umbrales de fitotoxicidad propuestos por Varun *et al.* (2012) para todos los tratamientos (Cuadro 15). La mayor acumulación de Pb se encontró en los tratamientos con enmienda e inoculación bacteriana. Además, estos resultados difieren con los obtenidos por De Abreau *et al.* (2012), quienes evaluaron el efecto de enmiendas orgánicas y el potencial de fitoextracción de *R. communis*. Los autores observaron que después de 74 días *R. communis* no acumuló Cr, Ni, Cd, Cu, Pb y Zn. Sin embargo, las concentraciones disponibles (extractables con DTPA) de estos elementos fueron menores que las del presente trabajo. Lo cual puede explicar porque los autores no observaron acumulación de EPT en *R. communis*.

Por otra parte, las concentraciones de Cd estuvieron dentro de los umbrales de fitotoxicidad propuestos por Varun *et al.* (2012; Cuadro 15). La mayor acumulación de Cd en la parte aérea de las plantas se halló en el tratamiento con enmiendas (RM+E; 28% más con respecto al testigo). No se detectaron diferencias significativas entre el tratamiento testigo y la inoculación bacteriana. Estos resultados son contrarios a los reportados por Ruiz-Olivares *et al.* (2013). Los autores encontraron concentraciones de Cd en parte aérea de *R. communis* (accesión SF7) por debajo de las concentraciones fitotóxicas propuestas por Varun *et al.* (2012). No obstante, la acumulación de Cd en *R. communis* se ha documentado en otros trabajos. Huang *et al.* (2011) encontraron 1.22, 2.27 y 37.63 mg de Cd kg⁻¹ en hojas, tallo y raíz en plantas de *R. communis* que crecieron en suelos contaminados con Cd y DDT, mientras que Pandey (2013) reportó 17 mg kg⁻¹ de Cd en hojas de *R. communis* que crecieron en suelos contaminados con cenizas. Hay que tener en cuenta que la acumulación de EPT en plantas depende de factores como pH del medio, la presencia de sustancias húmicas, la concentración de otros metales, la especie vegetal y la etapa fenológica (Pandey, 2013).

A pesar de las altas concentraciones de Pb y Cd en las plantas de los tratamientos con enmienda e inoculación bacteriana, no se observaron síntomas visibles de toxicidad relacionados a estos elementos. Y como se discutirá más adelante, las variables que se relacionan con el estrés oxidativo, resultaron ser significativamente menores en comparación con el tratamiento testigo.

De manera general, se encontraron altas concentraciones de EPT en la raíz de *R. communis* en comparación con la concentración de EPT en parte aérea

(Cuadro 15). En los tratamientos con enmienda e inoculación de BPCV se encontró $FB < 1$ para Cu y Zn en parte aérea, y en el tratamiento testigo $FB > 1$. En todos los tratamientos se encontró $FB > 1$ para Pb y Cd en parte aérea y raíz (Figura 35a y 35b). Pero las BPCV parecen disminuir la acumulación de Cd en la parte aérea de *R. communis*, ya que los FB fueron significativamente diferentes a los FB de las plantas del tratamiento testigo y con enmienda (Figura 35 a).

Se observaron factores de translocación (FT) menor a uno en todos los tratamientos y en todos los elementos (Figura 35c). Es decir, que *R. communis* no mueve EPT a la parte aérea y estos se acumulan en la raíz principalmente. Algunos autores sugieren que plantas con altos FB y bajos FT así como tolerantes a los efectos tóxicos de los EPT, son excelentes candidatas para procesos de fitoestabilización de sitios contaminados y así poder crear cubiertas vegetales (Yoon *et al.*, 2006; Ho *et al.*, 2008). Bajo este contexto, *R. communis* es una planta con potencial para la estabilización de Pb, como lo sugirió Ruiz-Olivares *et al.* (2013).

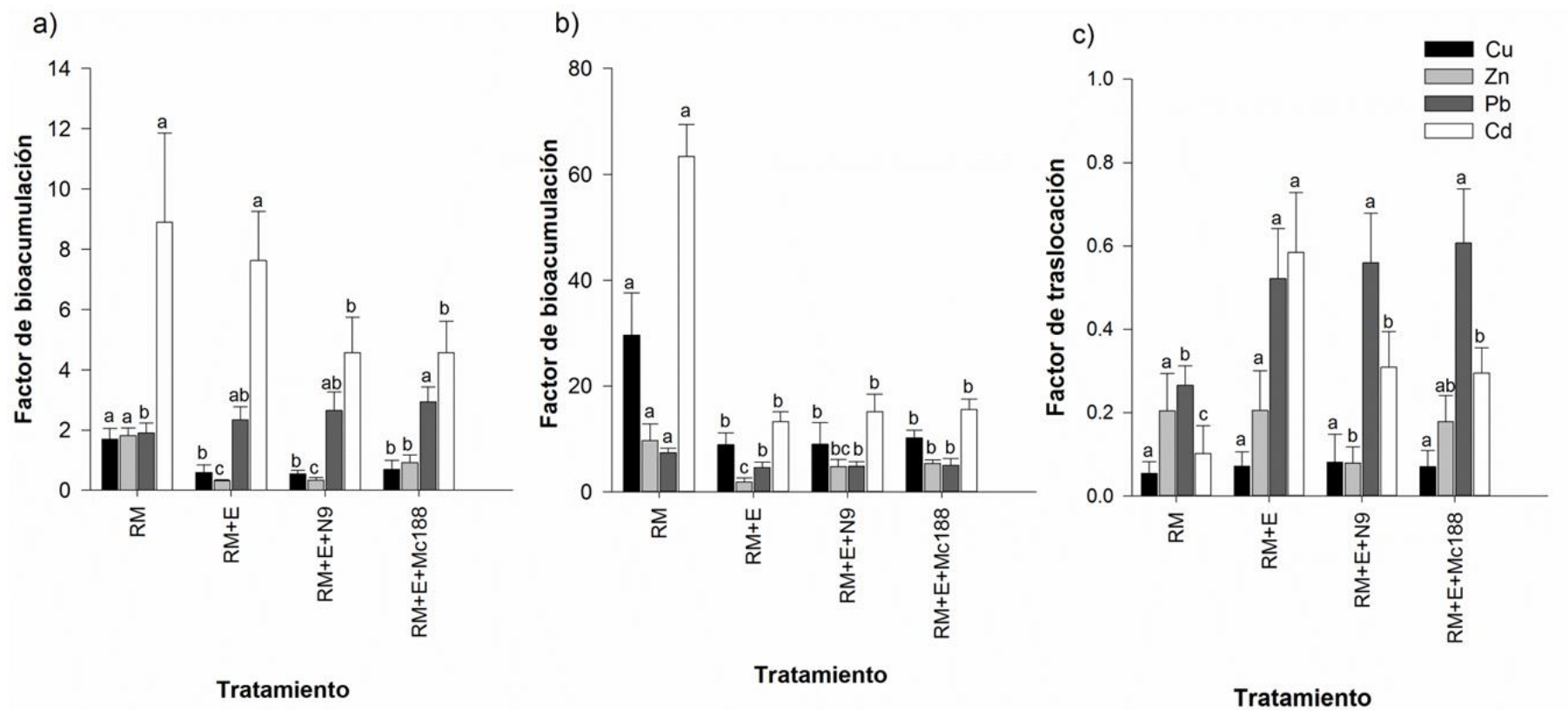


Figura 35. Factor de bioacumulación en a) parte aérea y b) de *R. communis*, y c) factor de translocación en función de los tratamientos: residuo de mina (RM), aplicación de enmiendas (RM+E) e inoculación bacteriana (RM+E+N9, Mc188).

La absorción total de EPT por planta es un indicador de la habilidad de la planta para fitoextracción (Shi y Cai, 2009). En la Figura 36 se observa que la mayor absorción de Zn ocurrió en el tratamiento con la inoculación de la bacteria Mc188 (106.7±22.6 µg por planta). La absorción de Pb por planta de los tratamientos con enmienda e inoculación bacteriana fue significativamente mayor (de seis a ocho veces) en comparación con el tratamiento testigo. La absorción total de Cd osciló entre 3.8 a 11.52 6 µg por planta y la mayor absorción correspondió al tratamiento con enmiendas. Resultados similares encontraron Shi y Cai, 2009, los autores reportaron que la acumulación de Cd en plantas de *R. communis* osciló entre 5 y 11 µg por planta.

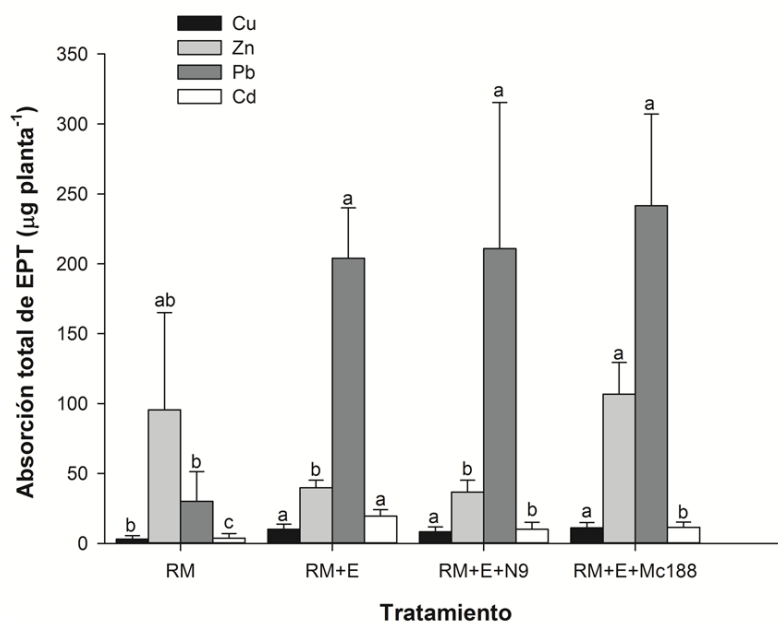


Figura. 36. Absorción total de EPT en *R. communis* en función de los tratamientos: residuo de mina (RM), adición de enmiendas (RM+E), e inoculación bacteriana (RM+E+N9, Mc188).

Finalmente, Ruiz-Olivares *et al.* (2013) han documentado que *R. communis* puede crecer de manera natural en residuos de mina, lo que concuerda con nuestros resultados pues estos mostraron que en efecto *R. communis* puede crecer en el residuo de mina sin la adición de mejoradores de suelo. Además, los autores indicaron que el rendimiento del contenido de aceite se vio afectado por las concentraciones de Zn en parte aérea, y las concentraciones en raíz de Cu, Zn, Pb y Cd. Los datos experimentales del presente trabajo, mostraron que a través del uso de enmiendas y BPCV se puede disminuir la concentración de Zn en tejido aéreo, así mismo reducir la bioacumulación de Cd. En este sentido, se puede proponer el uso de enmiendas para mejorar las propiedades del residuo, aportar nutrientes que ayuden a crear cubiertas vegetales con *R. communis*, promover la biomasa y el rendimiento del cultivo. Y así dar un nuevo valor económico a pasivos ambientales como estos depósitos de residuos de minas.

4.15. Actividad fotosintética, contenido de clorofilas y estrés oxidativo

El análisis de medidas repetidas ([Anexo XVIII-2](#)) mostró que la cinética de clorofila relativa de los tratamientos RM+E, RM+E+N9 y Mc188 fue significativamente ($\alpha=0.05$) mayor en comparación con tratamiento testigo (RM; Figura 37). Los valores de SPAD en el tratamiento con residuo de mina oscilaron entre 33.1 ± 5.7 y 40.0 ± 2.1 , valores similares encontraron Orcen *et al.* (2013) en plantas de tabaco expuestas a Cr. Los bajos valores de SPAD en las plantas testigo indicaron que el contenido de clorofila durante el experimento fue menor en comparación de los otros tratamientos, lo que involucra posible daño en el fotosistema inducido por los EPT (Orcen *et al.*,

2013; Pandey, 2013), o un fuerte estrés que hace que la planta disminuya sus funciones vitales.

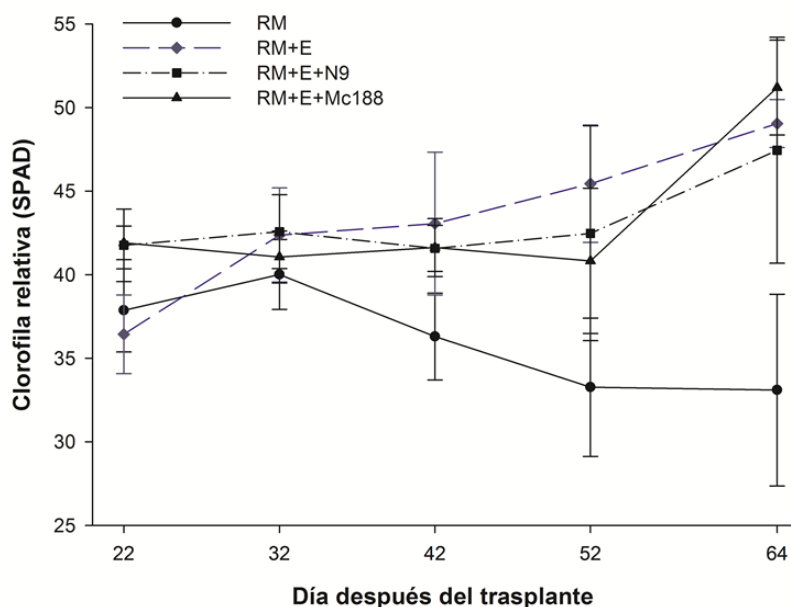


Figura 37. Cinética de índice de clorofila relativa de *R. communis* en función de los tratamientos: residuo de mina (RM), adición de enmiendas (RM+E) e inoculación bacteriana (RM+E+N9, Mc188).

El análisis en laboratorio confirmó que en efecto el contenido de clorofilas a, b y total fue significativamente menor en el tratamiento RM en comparación con los tratamientos donde se adicionó únicamente enmienda (RM+E) o con inoculación de la bacteria Mc188 (Figura 39a). Así mismo, la menor tasa de fotosíntesis correspondió al tratamiento testigo al igual que la mayor concentración de H_2O_2 (Figura 39b y d). Se observó correlación negativa entre la tasas de fotosíntesis y el contenido de Zn ($r=-0.71$, $p<0.0001$) y malondialdehído (MDA) ($r=-0.70$, $p=0.0002$). Es posible que altas concentraciones de Zn pueda alterar el funcionamiento de peroxisomas o algunas de las enzimas que participan en este sistema. Mientras que la clorofila a correlacionó negativamente con el contenido de Zn ($r=-0.68$, $p=0.0002$) y

H₂O₂ ($r=-0.65$, $p=0.0005$). La concentración de Zn en la parte aérea correlacionó positivamente con el contenido de MDA ($r=0.82$, $p<0.0001$) y H₂O₂ ($r=0.90$, $p<0.0001$). En este caso, el Zn puede estar sustituyendo al Mg, suprimir la afinidad de la Rubisco por el CO₂ y la actividad de la clorofila. El exceso de Zn también puede inhibir o interferir con la cadena respiratoria y desencadenar la formación de ROS (como el H₂O₂). Debido a que los EPT forman uniones irreversibles con los componentes fotosintéticos de la cadena de transporte de electrones (Ventrella *et al.*, 2009; Kawachi *et al.*, 2011; Pospíšil y Prasad, 2014).

La peroxidación de lípidos (LPO; expresada a través del contenido de MDA) denota el daño celular ocasionado por los EPT. En este caso, la mayor concentración de MDA se encontró en las plantas del tratamiento testigo (RM) tanto en hojas como raíz (Figura 39c). Las enmiendas y la inoculación bacteriana disminuyeron la concentración de MDA y H₂O₂ tanto en hojas como en raíces, esto indica que las enmiendas y las BPCV protegen a *R. communis* del estrés oxidativo y el daño celular que causan los EPT. Resultados similares han reportado Bauddh y Singh (2014) donde la adición de vermicompost y fertilizantes (urea y difosfato de amonio) disminuyó la concentración de MDA en plantas de *R. communis* en suelos contaminados artificialmente con Cd.

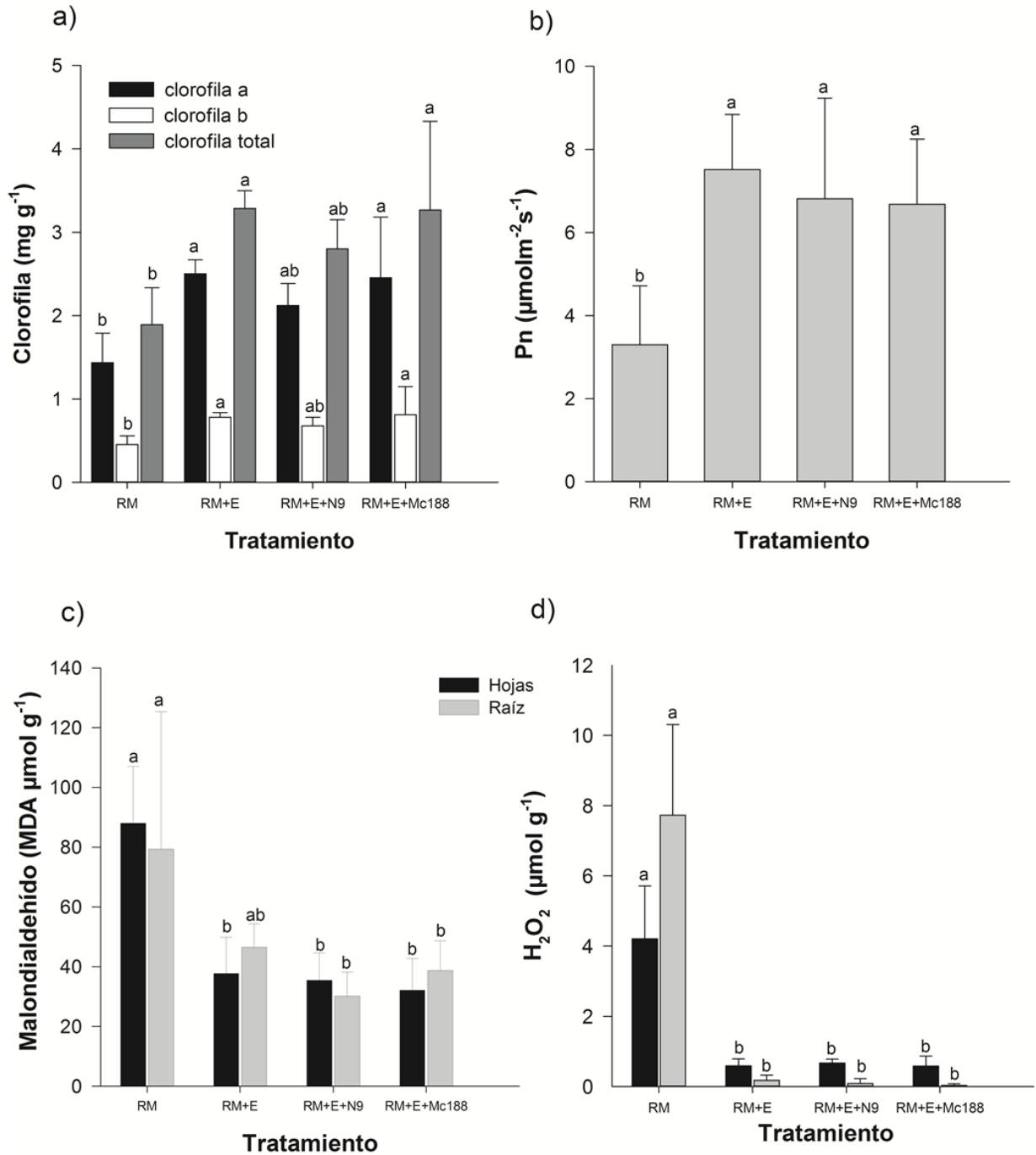


Figura 38. a) Contenido de clorofilas, b) fotosíntesis neta (Pn), c) concentración de malondialdehído (MDA) y d) Peroxido de hidrogeno (H₂O₂) en plantas de *R. communis* en función de los tratamientos: residuo de mina (RM), aplicación de enmiendas (RM+E) y aplicación de enmiendas en conjunto con BPCV (RM+E+N9 y RM+E+Mc188).

4.16. Evaluación de la colonización de *Ricinus communis* con bacterias promotoras del crecimiento vegetal

Al final del experimento, no fue posible cuantificar las bacterias N9 y Mc188 (marcadas con resistencia a amikacina) en las raíces de *R. communis*. Sin embargo, el análisis de tinción vital reveló la presencia de microorganismos (bacterias y hongos) adheridos a la raíz de *R. communis* (Figura 40). La frecuencia de colonización fue 60%, 46%, 41% y 49% en los tratamientos RM, RM+E, RM+E+N9 y RM+E+Mc188, respectivamente. El nulo efecto de la inoculación bacteriana en el presente estudio puede deberse a la baja competitividad de las bacterias N9 y Mc188. Strigul y Kravchenko (2006) evaluaron la supervivencia de BPCV en la rizósfera, a través de modelos matemáticos y simulaciones. Los autores concluyen que suelos ricos en materia orgánica pueden afectar negativamente la supervivencia de las BPCV. Debido a la intensa actividad de descomposición de los compuestos orgánicos, que generan un ambiente altamente competitivo. También, el alto contenido de materia orgánica promueve el rápido crecimiento de los microorganismos autóctonos. Björklöf *et al.* (2003) citado por Strigul y Kravchenko (2006), mostraron que la BPCV *Pseudomonas fluorescens* 31K3 fue incapaz de establecerse en la rizósfera de suelos con alto contenido de materia orgánica, debido a la alta competencia que ejerció la microflora nativa.

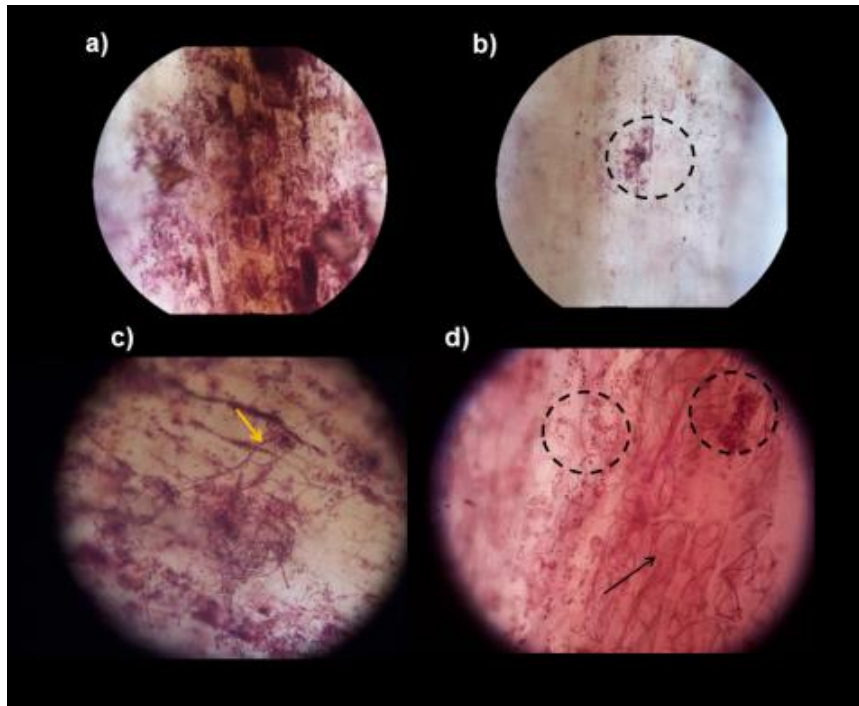


Figura 39. Bacterias adheridas en raíces de *R. communis* a) raíces del tratamiento residuo de mina (40x), b) raíces en el tratamiento residuo de mina y enmiendas (40x), c), d) raíces en el tratamiento residuo de mina+enmiendas e inoculación bacteriana. Los círculos muestran grupos de bacterias con morfología de cocos, la flecha en amarillo y negro muestran la presencia de hongos (100x).

Además de la competencia de las bacterias, otro factor que influye en la supervivencia de éstas, es la cantidad de inóculo y técnica de inoculación. Actualmente se disponen de diversas técnicas para la aplicación de BPCV, éstas incluyen la encapsulación; el uso de ingeniería genética para hacer que los microorganismos transfieran genes de interés a organismos nativos y el uso de surfactantes para promover la movilidad de las BPCV, por mencionar algunos (Lebeau *et al.*, 2011). Se sugiere que en futuros trabajos se realicen ensayos previos para determinar la concentración adecuada de BPCV directamente sobre el sustrato. También algunos experimentos que permitan encontrar la dosis adecuada de

enmienda e inoculación de BPCV, para así garantizar la supervivencia de las bacterias.

4.17. Análisis en espectroscopia de infrarrojo del sustrato después del experimento

Antes de la introducción de *R. communis* en el residuo de mina se observaron bandas 2 965 y 2 898 cm^{-1} (Figura 40a), que corresponden a vibraciones del enlace C-H de compuestos alifáticos (Skoog *et al.*, 2001; Senesi y Loffredo, 2005). La presencia de estos compuestos, puede ser resultado de los aditivos que se usan para la separación de los minerales, como por ejemplo los xantatos (Azañero Ortiz *et al.*, 2002). Después de la introducción de *R. communis* se observó la desaparición de estos picos. Esto puede deberse a que las plantas estimulan la actividad microbiana, en consecuencia los microorganismos de la rizósfera pueden transformar estos compuestos (Dietz y Schnoor, 2001). En los espectros del tratamiento con enmiendas e inoculación bacteriana también se observó la disminución de las bandas asociadas a los compuestos alifáticos (2 980 y 2 891 cm^{-1} ; Figura 41b). Los cuales probablemente se estén transformando a compuestos aromáticos como producto de la descomposición de la materia orgánica (Sparks, 2003). Así mismo, en el espectro de la mezcla residuo de mina con enmiendas (Figura 40b) se observó la aparición de un pico a 1 625 cm^{-1} típico de las uniones aromáticas de los enlaces C=C (Skoog *et al.*, 2001; Lambert *et al.*, 1987). También, en ambos espectros se ve la aparición de diversos picos en la región de 3 700 a 3 300 cm^{-1} características de las vibraciones del enlace O-H y N-H, relacionadas con los compuestos aromáticos y aminias (Skoog *et al.*, 2001; Stuart, 2004)

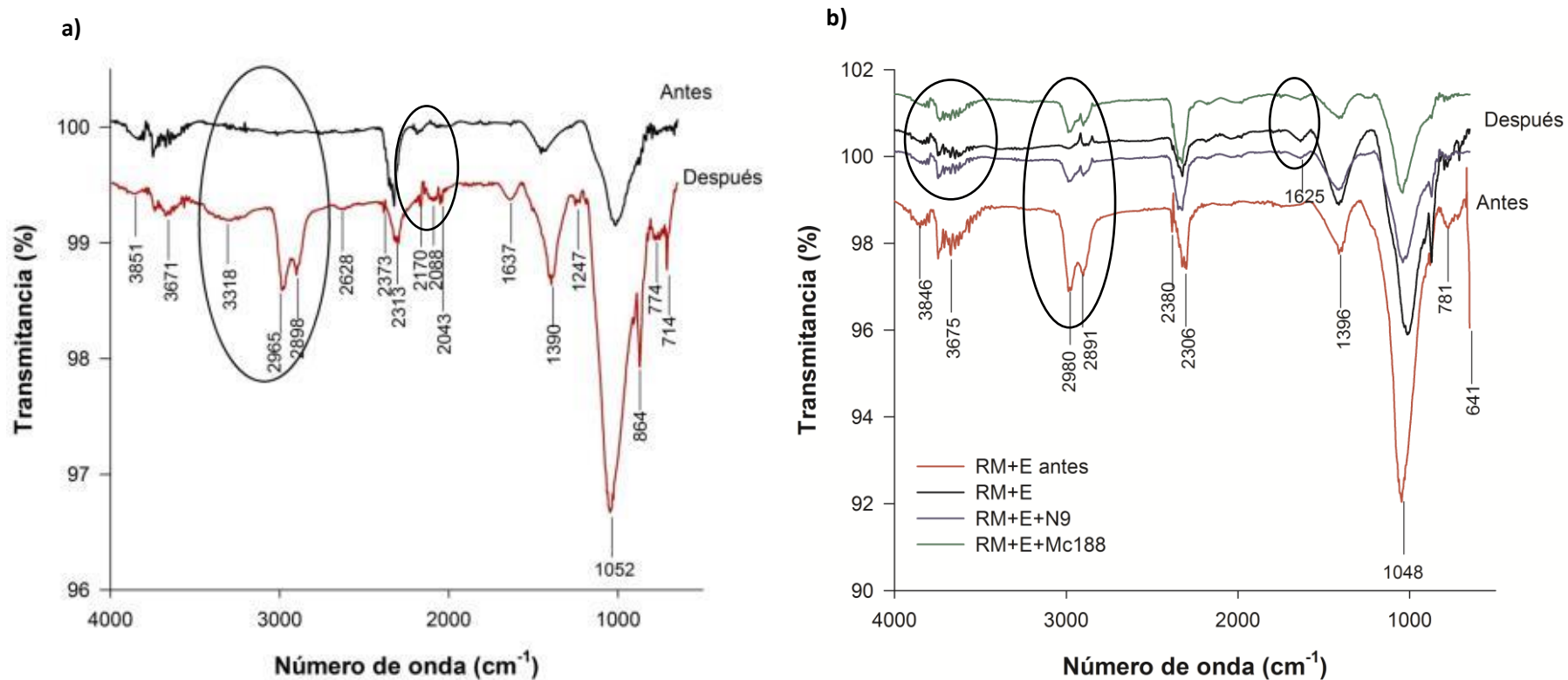


Figura 40. Espectros en infrarrojo de sustrato antes y después del experimento en función de los tratamientos a) residuo de mina (RM) y b) adición de enmiendas (RM+E) e inoculación bacteriana (RM+E+N9, Mc188).

También se observó la desaparición de los picos 2 628, 2 373 y 714 cm^{-1} en el tratamiento testigo (Figura 40a) que se atribuyen a las vibraciones producidas por el enlace de un metal divalente con el H (M-H). La disminución en la intensidad de la banda en 2 313 cm^{-1} también correspondiente a las uniones M-H, y de los pico 1 052 y 1048 cm^{-1} productos de las vibraciones del doble enlace entre metales divalentes y el oxígeno (M=O; Stuart, 2004). Estos cambios pueden estar relacionados con el cambio en el pH del residuo de mina y la solubilización de Zn, como consecuencia de la solubilización de la fracción sólida del residuo de mina.

CONCLUSIONES

Las enmiendas aumentaron significativamente el contenido de materia orgánica y macronutrientes (nitrógeno y fósforo) en el residuo de mina. También mejoraron sus propiedades físicas, específicamente, la retención de humedad y la densidad aparente. Estos cambios tuvieron efecto positivo sobre el crecimiento de *R. communis*, en comparación con las plantas que crecieron en el residuo de mina sin enmienda. Por otra parte, la inoculación bacteriana no tuvo efecto significativo sobre el crecimiento de *R. communis*, probablemente porque las bacterias no fueron competitivas con los microorganismos nativos del residuo de mina y de las enmiendas. Sin embargo, no se descarta el uso de BPCV, sino que se sugiere realizar más estudios para determinar la dosis adecuada de enmienda e inoculantes que promuevan la producción de biomasa de *R. communis* y la estabilización de EPT.

Por otra parte, *R. communis* mostró ser una planta útil para la fitoestabilización de residuos de mina, ya que la concentración de EPT y los FB en raíces fueron

mayores que en el tejido aéreo. Además, los FT indican que *R. communis* tiende a evitar el transporte de EPT desde la raíz a la parte aérea. A pesar que *R. communis* fue capaz de crecer en el residuo sin la adición de enmiendas y bioinoculantes, la producción de biomasa se ve afectada por los efectos tóxicos de los EPT. El análisis de correlación lineal sugiere que el Zn tuvo efecto tóxico en las plantas del tratamiento testigo. Mientras que las enmiendas mostraron proteger a la planta del posible estrés oxidativo que causan los EPT, probablemente se debe al efecto estabilizador de las enmiendas. Ya que además de las mejoras sobre las propiedades fisicoquímicas del residuo, las enmiendas también estabilizaron Zn y Pb, incrementando así la tolerancia a los EPT en *R. communis*.

Después del establecimiento de *R. communis*, se observó que las concentraciones de Pb extractable se reducen casi a la mitad. También las enmiendas y la inoculación bacteriana mostraron prevenir la solubilización de Zn. Finalmente, se recomienda el uso de *R. communis* en conjunto con enmiendas (estiércol ovino, vermicompost, K_2HPO_4 y $CaCO_3$) para la creación de sistemas de fitorremediación.

En cuanto a las hipótesis planteadas al inicio de este capítulo se concluye lo siguiente:

Se rechazó la hipótesis: Las BPCV promueven el crecimiento de *R. communis* en comparación con la aplicación de enmiendas. Ya que en las variables de cinética de crecimiento, biomasa, altura de planta, longitud y volumen radical no se encontraron diferencias entre el tratamiento con enmiendas y la inoculación de BPCV.

Se acepta la hipótesis de que la aplicación de enmiendas promueve el crecimiento de *R. communis* en comparación con el tratamiento testigo.

Se acepta la hipótesis de que las enmiendas y BPCV mitigan los efectos tóxicos de los EPT en *R. communis*. Ya que las variables asociadas al estrés oxidativo fueron significativamente menores en comparación con el tratamiento testigo.

Se rechaza la hipótesis: Al final del experimento la disponibilidad de Cd disminuye por efecto del proceso de fitorremediación con *R. communis*. Ya que no se encontró cambios significativos en la disponibilidad de Cd después del experimento y las enmiendas tuvieron nulo efecto sobre la estabilización de este elemento.

Se acepta la hipótesis: Al final del experimento la disponibilidad de Pb disminuye por efecto del proceso de fitorremediación con *R. communis*. Los resultados mostraron que al final del experimento en todos los tratamientos se redujo aproximadamente 50% de Pb extractable en comparación con los valores antes del experimento.

LITERATURA CITADA

- Ahmad, M., S. S. Lee, J. E. Yang, H. M. Ro, Y. H. Lee and Y. S. Ok. 2012. Effects of soil dilution and amendments (musselshell, cowbone, and biochar) on Pb availability and phytotoxicity in military shooting range soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 79: 225-231.
- Amrhein, C., J. E. Strong and P. A. Mosher. 1992. Effect of deicing salts on metal and organic matter mobility in roadside soils. *Environmental Science and Technology* 26:703-709.

- Andreazza, R., Bortolon, L., Pieniz, S., Camargo, F. A. O. 2013. Use of high-yielding bioenergy plant castor bean (*Ricinus communis* L.) as a potential phytoremediator for copper-contaminated Soils. *Pedosphere* 23: 651-661.
- Ansorena, M. J. 1994. *Sustratos, propiedades y caracterización*. Mundi Prensa, Madrid. 172p.
- Ashworth, D., and B. Alloway. 2008. Influence of dissolved organic matter on the solubility of heavy metals in sewage-sludge-amended soils. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 39: 538-550.
- Austruy, A., M. Shahid, T. Xiong, M. Castrec, V. Payre, N. K. Niazi, M. Sabir and C. Dumat. 2014. Mechanisms of metal-phosphates formation in the rhizosphere soils of pea and tomato: environmental and sanitary consequences. *Journal of Soils and Sediments* DOI 10.1007/s11368-014-0862-z.
- Azañero-Ortiz, A., P. A. Nunez Jara, A. Figueroa Loli, E. León Delgado, S. Fernández Salinas, R. Orihuela Salazar, M. Caballero Ríos, R. Bazán Reyes y S. Y. Choy Aragón. 2002. Flotación de minerales oxidados de plomo. *Revista del Instituto de Investigación de la Facultad de Ingeniería Geológica, Minera, Metalurgica y Geográfica* 5: 34-43.
- Banks, M. K., A.P. Schwab, G.R. Fleming and B.A. Hetrick. 1994. Effects of plants and rhizosphere microflora on leaching of zinc from mine tailing. *Chemosphere* 21: 1691-1699.
- Basta, N.T, and M. A. Tabatabai. 1992. Effect of cropping systems on adsorption of metals by soils: III. Competitive adsorption. *Soil Science* 153:331–337.

- Baueh, K. and Singh, R. P. 2014. Effects of organic and inorganic amendments on bioaccumulation and partitioning of Cd in *Brassica juncea* and *Ricinus communis*. *Ecological Engineering* 74: 93-100.
- Bojean, A. 1991. Le Ricin. Une Culture pour la chimie fine. Galileo/Onidol. 101 p.
- Borůvka, L and Drábek, O. 2004. Heavy metal distribution between fractions of humic substances in heavily polluted soils. *Plant Soil and Environment* 50: 339–345.
- Bremner, J. M. 1965. Determination and Isotope-Ratio Analysis of Different Forms of Nitrogen in Soils: I. Apparatus and Procedure for Distillation and Determination of Ammonium. *Soil Science Society American Journal* 29:504–507.
- Chen C, D. Huang and J Liu. 2009. Functions and toxicity of nickel in plants: recent advances and future prospects. *Clean* 37: 304-313.
- Cuellar-Sánchez, A. Rogelio Carrillo-González, Adriana Delgado-Alvarado, Ma. del Carmen A. González-Chávez. 2014. Propiedades agroproductivas de *Ricinus communis* y caracterización fisicoquímica del aceite. (En preparación)
- De Abreua, C. A.; A. R. Coscione, A. Moreno Pires and J. Paz-Ferreiro. 2012. Phytoremediation of a soil contaminated by heavy metals and boron using castor oil plants and organic matter amendments. *Journal of Geochemical Exploration* 123: 3–7.
- Dietz A. C. and J. L. Schnoor. 2001. Advances in Phytoremediation. *Environmental Health Perspectives* 109: 163-168.
- Ebbs S.D. and L. V. Kochian. 1997. Toxicity of zinc and copper to Brassica species: implications for phytoremediation. *Journal of Environmental Quality* 26:776–781

- Echeverría, J. C, M. T.Morera, C. Mazkiarán and J. J. Garrido. 1998. Competitive sorption of heavy metal by soils. isotherms and fractional factorial experiments. *Environmental Pollution* 101:275–284.
- EPA (Environmental Protection Agency).1998. Method 3051A: Microwave assisted acid digestion of sediments, sludges, soils, and oils; test methods for evaluating solid waste, physical/chemical methods. Office of Solid Waste, U.S. Environmental Protection Agency: Washington, DC, 1–20
- Eriksson, J.E., 1988. The effect of clay, organic matter and time on adsorption and plant uptake of Cd added soils. *Water Air and Soil Pollution* 40: 359 – 373
- González-Chávez, M. C. A., A. Alarcón y R. Ferrera-Cerrato. 2007. Manual de métodos para la investigación y aplicación de hongos micorrízicos arbusculares en laboratorio y campo. In: Fuentes-Dávila, G y R. Ferrera-Cerrato (eds.). *Ecología de la raíz*. Sociedad Mexicana de Fitopatología A. C. Colegio de Postgraduados. Texcoco, estado de México. pp.144.
- González-Chávez, M. C. A., Ruíz Olivares, A., Carrillo-González, R., Ríos Leal, E. 2014. Crude oil and bioproducts of castor vean (*Ricinus communis* L.) plants established naturally on metal mine tailings. *International Journal of Environmental Science Technology* DOI 10.1007/s13762-014-0622-z
- Hashimoto, Y., M. Takaoka and K. Shiota. 2010. Enhanced transformation of lead speciation in rhizosphere soils using phosphorous amendments and phytostabilization: an X-ray absorption fine structure spectroscopy investigation. *Journal of Environmental Quality* 40: 696-703.

- Ho, W. M., L. H. Ang and D. K. Lee. 2008. Assessment of Pb uptake, translocation and immobilization in kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) for phytoremediation of sand tailings. *Journal of Environmental Sciences* 20: 1341–1347.
- Huang, H., N. Yu, L. Wang, D. K. Gupta, Z. He, K. Wang, Z. Zhu, X. Yan, T. Li and X. Yang. 2011. The phytoremediation potential of bioenergy crop *Ricinus communis* for DDTs and cadmium co-contaminated soil. *Bioresource Technology* 102: 11034–11038.
- Ingo, W. 1997. Auxin-indole derivatives in soils determined by a colorimetric method and by high performance liquid chromatography. *Microbiology Research* 152: 399-405.
- Jachmanian, I., E. Pérez Gomar, J. Villamil, y J. J. Villamil. 2009. El cultivo de tártago (*Ricinus communis* L) en el Uruguay. *Boletín de Divulgación* No. 98. INIA.
- Jackson, M.L. 1976. Análisis químico de suelos. 3ra edición. Ediciones Omega, Barcelona. 662p.
- Juwarkar, A. A., S. K. Yadav, P. Kumar and S. K. Singh. 2008. Effect of biosludge and biofertilizer amendment on growth of *Jatropha curcas* in heavy metal contaminated soils. *Environmental Monitoring and Assessment* 145:7–15.
- Kabata-Pendias, 2011. Trace Elements in Soils and Plants (4th ed.), CRC Press, Boca Raton. 548 p.
- Kawachi, M., Kobae, Y., Tomioka, R., Maeshima, M. 2011. The role of membrane transport in the detoxification and accumulation of Zn in plants. *In: Sherameti, I. and Varma, A. (eds.), Detoxification of heavy metals. Soil Biology* 30. Springer, Berlin. pp.129-142

- Kidd, P., Barcelo, J., Bernal, P., Navari-Izzo, F., Poschenreder, C., Shilev, S., Clemente, R., Monterroso, C. 2009. Trace element behavior at the root–soil interface: implications in phytoremediation. *Environmental Experimental Botany* 67: 243-259.
- Kuo, S. and A. S. Baker. 1980. Sorption of copper, zinc, and cadmium by some acid soils. *Soil Science Society American Journal* 44: 969-974.
- Lambert, J. B., H. F. Shurvell, and D. Lighther. 1987. Introduction to organic spectroscopy. Macmillan Publishing company, New York.
- Lebeau, T., K. Jézéquel and A. Braud. 2011. Bioaugmentation-assisted phytoextraction applied to metal-contaminated soils: state of the art and future prospects. In: I. Ahmad *et al.* (eds.), *Microbes and microbial technology: agricultural and environmental applications*, DOI 10.1007/978-1-4419-7931-5_10
- Martínez-Alcalá, I., Clemente, R., Bernal, M. P. 2009. Metal availability and chemical properties in the rhizosphere of *Lupinus albus* L. growing in a high-metal calcareous soil. *Water Air Soil Pollut* 201: 283-293.
- McBride B.M. 1994. Environmental chemistry of soils. Oxford University Press, New York. 397 p.
- McLean, J. E. and B. E. Bledsoe. 1997. Behavior of Metals in Soils. EPA, Ground Water Issue, U.S. Environmental Protection Agency, EPA/540/S-92/018, U.S. Government printed Office, Washington, D.C.
- Millaleo R, M. Reyes-Díaz, A. G. Ivanov, M. L. Mora and M. Alberdi. 2010. Manganese as essential and toxic element for plants: transport, accumulation

- and resistance mechanisms. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 10: 476-494.
- Miller, W. P., W. W. Mc Fee, and J. M. Kelly. 1983. Mobility and retention of heavy metals in sandy soils. *Journal of Environmental Quality* 12: 579-584.
- Neumann, G., and Römheld, V. 2000. The release of root exudates as affected by the plant physiological status. *In*: Pinton, R., Varanini, Z., Nannipieri, Z. (eds.). *The rhizosphere: biochemistry and organic substances at the soil–plant interface*. CRC Press, Boca Raton. pp.23-72.
- Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000, Diario Oficial.
- Olsen, S.R., Cole, C. V., Watanabe, F. S., Dean, L. A. 1954. Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate. Circular No. 939. U.S. Department of Agriculture, Banderis, 19 p.
- Orcen, N., G. Nazarian and M. Gharibkhani. 2013. The responses of stomatal parameters and SPAD value in Asian tobacco exposed to chromium. *Polish Journal of Environmental Studies* 22: 1441-1447.
- Pandey, V. C. 2013. Suitability of *Ricinus communis* L. cultivation for phytoremediation of fly ash disposal sites. *Ecological Engineering* 57: 336–341.
- Park, J. H., N. Bolan, M. Megharaj and R. Naidu. 2011. Comparative value of phosphate sources on the immobilization of lead, and leaching of lead and phosphorus in lead contaminated soils. *Science of the Total Environment* 409: 853–860.

- Patten, C. L. and B. R. Glick. 2002. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 3795–3801.
- Pérez-Esteban, J., C. Escolástico, A. Moliner, A. Masaguer and J. Ruiz-Fernández. 2014. Phytostabilization of metals in mine soils using *Brassica juncea* in combination with organic amendments. *Plant and Soil* 377:97-109.
- Porra, R. J. 2005. The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b. *Photosynthesis Research* 73: 633–640.
- Pospíšil, P. and A. Prasad. 2014. Formation of singlet oxygen and protection against its oxidative damage in Photosystem II under abiotic stress. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 137: 39–48.
- R Core Team. 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- Rajkumar, M. and Freitas, H. 2008. Influence of metal resistant-plant growth-promoting bacteria on the growth of *Ricinus communis* in soil contaminated with heavy metals. *Chemosphere* 71: 834–42.
- Rashid, M. A. 1985. *Geochemistry of marine humic compounds*. Springer Verlag, New York. 293 p.
- Rico-Ponce, H. R., L. M. Tapia Vargas, R. Teniente Oviedo, A. González Avila, M. Hernández Martínez, J. L. Solís Bonilla, y A. Zamarripa Colmenero. 2011. *Guia para cultivar higuierilla (Ricinus communis L.) en Michoacán*. Centro de

Investigación Regional del Pacífico Centro Campo Experimental Valle de Apatzingán. Folleto Técnico No. 1.

- Rodríguez-Serrano M, N. Martínez-de la Casa, M. C. Romero-Puertas, L. A. del Río y L. M. Sandalio. 2008. Toxicidad del cadmio en plantas. *Ecosistemas* 17: 139-146.
- Ross, S.M. 1994. Retention, transformation and mobility of toxic trace metals in soils. In *Toxic Metals in Soil Plant Systems*; Ross, S.M. (ed.); John Wiley and Sons: Chichester, U.K. 63 – 152.
- Ruiz Olivares, A., R. Carrillo-González, M. C. A. González-Chávez, and R. M. Soto Hernández. 2013. Potential of castor bean (*Ricinus communis* L.) for phytoremediation of mine tailings and oil production. *Journal of Environmental Management* 114: 316–323.
- Senesi, N. and E. Loffredo. 2005. Metal ion complexation by soil humic substances. pp. 563-618. In Tabatabai, M. A. and D. L. Sparks (eds.): *Chemical Processes in Soils*. Number 8, Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin, USA.
- Sharma, P, and S. Dubey. 2005. Lead toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17: 35:52.
- Shi, G. and Q. Cai. 2009. Cadmium tolerance and accumulation in eight potential energy crops. *Biotechnology Advances* 27: 555–561.
- Shorrocks ,V. M. and Alloway, B. J. 1988. Copper in plant, animal and human nutrition. Copper Development Association (CDA) Publication TN35. 107 p.
- Skoog, D., J. F. Holler, and T. A. Nieman. 2001. *Principios de análisis instrumental*. Quinta Edición. Mcgraw Hill Madrid, España. 997 p.

- Soil Survey Division Staff. 1990. Soil Survey Manual. USDA-NRCS, Washintong, DC.
- Sparks, D. L. 2003. Environmental soil chemistry. 2cond edition. Academic press
- Stolz, E., and Greger, M. 2002. Accumulation properties of As, Cd, Cu, Pb and Zn by four wetland plant species growing on submerged mine tailings. *Environ Exp Bot* 47: 271-280.
- Strigul, N. S and L. V. Kravchenko. 2006. Mathematical modeling of PGPR inoculation into the rhizosphere. *Environmental Modelling and Software* 21: 1158-1171.
- Stuart, B. 2004. Infrared spectroscopy: fundamentals and applications. Wiley. 242 p.
- Tandy, S., J. Healey, M. Nason, J. Williamson, and D. Jones. 2009. Remediation of metal polluted mine soil with compost: co-composting versus incorporation. *Environmental Pollution* 157: 690–697.
- Tao, S., Liu, W. X. Y., Chen, J., Cao, J., Li, B. G., Xu, F. L. 2005. Fractionation and bioavailability of copper, cadmium and lead in rhizosphere soil. *In: Huang, P. M. and Gobran, G. R. (eds.). Biogeochemistry of trace elements in the rhizosphere. Elsevier, Amsterdam. pp.313-333.*
- Tordoff, G. M., A. J. M. Baker, and A. J. Willis. 2000. Current approaches to the revegetation and reclamation of metalliferous mine wastes. *Chemosphere* 41: 219–228.
- Varun M, R. D'Souza, J. Pratas and S. Manoj. 2012. Metal contamination of soils and plants associated with the glass industry in north central India: prospects of phytoremediation. *Environmental Science and Pollution Research* 19: 269-281.

- Veeresh, H., S. Tripathy, D. Chaudhuri, B. R. Hart and M. A. Powell. 2003. Competitive adsorption behavior of selected heavy metals in three soil types of India amended with fly ash and sewage sludge. *Environmental Geology* 44:363-370.
- Velikova, V., I. Yordanov, and A. Edreva. 2000. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants. Protective role of exogenous polyamines. *Plant Science* 151: 59–66.
- Ventrella, A., L. Catucci, E. Piletska, S. Piletsky and A. Agostiano. 2009. Interactions between heavy metals and photosynthetic materials studied by optical techniques. *Bioelectrochemistry* 77: 19–25.
- Vleeshouwers L. M. 1997. Modelling the effect of temperature, soil penetration resistance, burial depth and seed weight on pre-emergence growth of weeds. *Annals of Botany* 79: 553-563.
- Walker, D. J., R. Clemente and M. P. Bernal. 2004. Contrasting effects of manure and compost on soil pH, heavy metal availability and growth of *Chenopodium album* L. in a soil contaminated by pyritic mine waste. *Chemosphere* 57: 215–224.
- Ye, Z. H., J. W. C. Wong and M. H. Wong. 1999. Lime and pig manure as ameliorants for the revegetation on lead/ zinc mine tailings: A greenhouse study. *Bioresource Technology* 69: 35-45.
- Ye, Z. H., J. W. C. Wong, and M. H. Wong. 2000. Revegetation of Pb/Zn mine tailings, Guangdong Province, China. *Restoration Ecology* 8: 87–92.
- Yoon, J., X. D. Cao, Q. X. Zhou and L. Q. Ma. 2006. Accumulation of Pb, Cu and Zn in native plants growing on a contaminated Florida site. *Science of the Total Environment* 368: 456–464.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES GENERALES

Los sistemas de fitorremediación de EPT con multipropósito se consideran como una biotecnología emergente y sustentable, que combinan aspectos ambientales con beneficios tanto económicos como sociales. Sin embargo, aun se busca crear métodos eficientes que permitan en efecto, remediar los suelos contaminados y generar bioenergía, para el caso de cultivos como el ricino.

La fitorremediación asistida con enmiendas y microorganismos, supone mejorar la eficiencia de los métodos de fitorremediación. Por una parte, diversos estudios a nivel laboratorio e invernadero han mostrado el potencial de diferentes materiales para la inmovilización de EPT. No obstante muchos de estos estudios se han llevado a cabo en suelos contaminados artificialmente o en soluciones acuosas monoelementales. Por lo que se sugiere explorar la aplicación de enmiendas en suelos contaminados por más de un elemento y en las condiciones lo más parecidas a las condiciones ambientales de donde se encuentran los suelos a remediar. En el presente trabajo se encontró que al escalar la magnitud de los experimentos, se obtuvieron resultados diferentes para dos enmiendas, estiércol de ovino y perlita expandida.

Por otra parte, el uso de enmiendas orgánicas se recomienda, porque éstas además de estabilizar los EPT también aportan cantidades importantes de macro nutrientes que son esenciales para el buen desarrollo de las plantas. También se sugiere el uso de materiales orgánicos estables y maduros como el vermicompost. Algunas investigaciones han mostrado que los materiales orgánicos frescos, como el estiércol de vaca o caballar son efectivos para la inmovilización de EPT. En adición

usar materiales que se consideran desechos de otras actividades da nuevo valor a estos desechos. No obstante, estos materiales tienen la desventaja de ser heterogéneos y no siempre se garantiza la estabilización de EPT. Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que también se puede promover la solubilización de elementos como el Cu, Cd y Zn, además de la inmovilización de Pb.

En cuanto al uso de microorganismos, apesar de que no encontramos diferencias significativas entre la aplicación de enmiendas y éstas en conjunto con las BPCV sobre el crecimiento de *R. communis*, se encontró que la inoculación de las bacterias N9 y Mc188 disminuyeron la bioacumulación de Cd en parte aérea de *R. communis*. Se recomienda no descartar la utilización de éstos como bioinoculantes para asistir la fitorremediación y realizar experimentos para determinar la dosis adecuada de enmiendas y BPCV. Ya que el alto porcentaje de materia orgánica parece generar condiciones de competencia para las BPCV. En este sentido, se sugiere usar una dosis más pequeña de enmiendas, y también emplear algunos modelos matemáticos para determinar la concentración adecuada de inóculo que garantice la supervivencia de las cepas inoculadas.

En cuanto a *R. communis*, esta planta es capaz de crecer en el residuo de mina sin enmiendas, sin embargo, las altas concentraciones de EPT disponibles en el residuo pueden generar efectos negativos en la biomasa de *R. communis*. En este sentido las enmiendas y las bacterias son una alternativa para mejorar la biomasa de *R. communis* y proteger a la planta contra los efectos tóxicos de los EPT.

En cuanto a la caracterización bioquímica de microorganismos como BPCV, la mayoría de los microorganismos presentó más de una característica asociada a la

promoción de crecimiento vegetal. También es posible encontrar en la rizósfera de residuos de mina microorganismos con características de BPCV.

Finalmente, de la presente investigación se puede concluir que los sistemas de fitorremediación asistidos con *R. communis* enmiendas son una alternativa viable para la fitoestabilización de Pb. Sin embargo aun quedan áreas de investigación con respecto al tema de fitorremediación, uso de enmiendas y microorganismos como:

- El desarrollo de métodos de análisis para el efecto de las enmiendas en la inmovilización de EPT que permitan escalar la aplicación de enmiendas sin el riesgo de tener efectos indeseables, como la solubilización.

- Desarrollar métodos de inoculación y dosis recomendadas para la aplicación de BPCV tanto en campo como invernadero.

- Más estudios con respecto a enmiendas y BPCV y su efecto en la absorción de EPT, tolerancia de las plantas contra los efectos tóxicos de los EPT y los mecanismos involucrados.

ANEXOS

Anexo I. Composición medio Pikovskaya

La composición del medio Pikovskaya para la determinación cualitativa y cuantitativa de solubilización de P es la siguiente:

Compuesto	g L ⁻¹
Glucosa	10
Ca ₃ (PO ₄) ₂	5
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5
NaCl	0.2
KCl	0.2
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.1
MnSO ₄	0.004
FeSO ₄	0.002
Extracto de levadura	0.5
Agar bacteriológico	15

Para la preparación del medio líquido se omite agregar agar bacteriológico. El medio se esterilizó por autoclave durante 15 min a 15 lb (121°C).

Anexo II. Curva de calibración para solubilización de P inorgánico por BPCV

A partir de una solución estándar de 100 mg L⁻¹ de KH₂PO₄ se preparó una solución de 2 mg L⁻¹ y se tomaron alícuotas para preparar la curva estándar con concentraciones de 0.2, 0.5 y 0.75 µg mL⁻¹ de PO₄³⁻. El desarrollo del color de la curva de calibración se realizó por el método vanadomolibdofósforico, y la lectura de la absorbancia se hizo a una longitud de onda de 400 nm.

PO_4^{3-} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Absorbancia
0.2	1.66
0.5	2.77
0.75	2.99

Coeficiente de correlación=0.95

Donde:

y= absorbancia de la muestra

x=Concentración de P soluble $\mu\text{g mL}^{-1}$

Anexo III. Composición medio CAS (cromo azurol S)

El material que se utilizó para la preparación del agar CAS, se lavó previamente con una solución 6 M de HCl, con la finalidad de remover cualquier EPT.

Solución colorante azul

Solución 1. Se disolvió 0.06 g de CAS en 50 mL de agua desionizada.

Solución 2. Se disolvió 0.0027 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 10 mL de solución de HCl 10 mM.

Solución 3. Se disolvió 0.073 g de bromuro hexadeciltrimetilamonio en 40 mL de agua desionizada.

La solución colorante azul se obtuvo de mezclar la solución 1 con 9 mL de la solución 2 y la solución 3. La mezcla resultante se mezcló perfectamente y se esterilizó durante 20 min a 15 lb de presión (121 °C).

Solución Stock de glucosa 20%

Se disolvieron 20 g de glucosa en 100 mL de agua destilada.

Solución Stock de medio mínimo mineral 9 (MM9)

En 500 mL de agua destilada se disolvieron los siguientes reactivos:

Compuesto	g
KH ₂ PO ₄	15
NaCl	25
NH ₄ Cl	50

Solución de casaminoácidos

Se disolvió 3 g de casaminoácidos en 27 mL de agua desionizada estéril. Para remover cualquier traza de Fe, enseguida se hizo una extracción con una solución 3% v/v de 8-hidroxiquinolina en cloroformo. Posteriormente, la solución se esterilizó por filtración con membranas de apertura de 0.22 µm.

Preparación de agar CAS

De la solución madre MM9 se tomaron 100 mL y se mezclaron con 750 mL de agua desionizada. Enseguida se agregó 32.24 g de ácido piperazina-N, N'-bis (2-etanosulfónico) PIPES. Como el PIPES no es soluble a pH < 5, se ajustó el pH arriba de 6, cuidando no exceder pH de 6.8. Posteriormente, se agregó 15 g de agar bacteriológico y se calentó el medio hasta ebullición.

El medio se esterilizó por autoclave durante 15 min a 15 lb (121°C). Posteriormente, el medio se dejó enfriar hasta que alcanzó temperatura aproximada de 50°C y se agregó 30 mL de la solución de casaminoácidos estéril y 10 mL de solución de glucosa al 20%. Finalmente, se agregó 100 mL de la solución colorante azul, se mezcló perfectamente el medio y se vertió en cajas de Petri estériles.

Anexo IV. Composición medio mineral con L-triptófano

Solución A

En 900 mL de agua destilada se diluyeron los siguientes compuestos:

Compuesto	Cantidad
NaCl	28.00 g
NH ₄ Cl	5.00 g
Na ₂ MoO ₄	0.01 g
KH ₂ PO ₄	1.36 g
Na ₂ HPO ₄	2.13 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.02 g
CaCl ₂ [†]	0.04 g
FeCl ₃ [‡]	0.008 g
FeSO ₄ 7H ₂ O	1.00 mg
H ₃ BO ₃	10.00 µg
MnSO ₄ H ₂ O	11.00 µg
ZnSO ₄ 7H ₂ O	115.00 µg

[†]El peso corresponde a una concentración de 400 µM de CaCl₂

[‡]El peso corresponde a una concentración de 50 µM de FeCl₃

La solución A se esterilizó en autoclave durante 15 min a 15 lb (121°C). Posteriormente, la solución se dejó enfriar hasta que alcanzó aproximadamente 50°C de temperatura.

Solución B

En 100 mL de agua destilada esteril se diluyeron los siguientes reactivos:

Compuesto	g
Glucosa	10.0
L-triptófano	0.5
Extracto de levadura	0.1

La solución B se esterilizó por filtración y se mezcló con la solución A.

Anexo V. Curva de calibración de ácido indolacético (AIA)

A partir de una solución madre de AIA de 1 000 µg mL⁻¹ se prepararon soluciones de 1 a 8 µg de AIA mL⁻¹. Se tomó 1 mL de cada solución de concentración conocida y se depositó en un tubo de ensaye, enseguida se agregaron 2 mL de reactivo de Salkowski. Las mezclas se dejaron reposar durante

30 min para el desarrollo de una coloración rosa y la absorbancia se midió a una longitud de onda de 530 nm.

AIA ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Absorbancia
1	0.0745
2	0.0960
3	0.1370
4	0.1515
5	0.1517
6	0.1568
7	0.2241
8	0.2562

Coefficiente de correlación= 0.9417

Donde:

y= absorbancia de la muestra

x= Concentración de AIA en $\mu\text{g mL}^{-1}$

Anexo VI. Composición medio líquido Pseudomonas F (BPF)

Se mezclaron los siguientes reactivos con 1 000 mL de agua destilada:

Compuesto	g L^{-1}
Peptona de caseína	20
MgCl_2	1.4
K_2SO_4	10

El medio se esterilizó en autoclave durante 15 min a 15 lb (121°C).

Anexo VII-1. Composición de medio mineral SM

Se mezclaron los siguientes reactivos con 1 L de agua destilada:

Compuesto	g L^{-1}
KH_2PO_4	0.4
K_2HPO_4	2.0
MgSO_4	0.2
CaCl_2	0.1
FeSO_4	0.005
H_3BO_3	0.002
ZnSO_4	0.005
NaMoO_4	0.001
MnSO_4	0.003
CoSO_4	0.001
NiSO_4	0.001
CuSO_4	0.001

Posteriormente, se ajustó el pH del medio a 6.4. El medio SM se esterilizó en autoclave durante 15 min a 15 lb (121°C).

Anexo VII-2. Composición medio mínimo mineral (SMN)

La composición del medio SMN para ensayo determinación de la actividad de la enzima ACC desaminasa, llevó la misma composición que el medio SM (Anexo VII-1) más los siguientes reactivos:

Compuesto	g L⁻¹
ACC	0.5
Glucosa	1.0
Sacarosa	1.0
CH ₃ COONa	1.0
Citrato de sodio	1.0
Acetato de sodio	1.0
Manitol	1.0
Ácido málico	1.0

El medio SMN se esterilizó en autoclave durante 15 min a 15 lb (121°C).

Anexo VIII. Curva de calibración para determinar la actividad de la enzima ACC-desaminasa

La cuantificación de la actividad de la enzima ACC-desaminasa se realizó de acuerdo con los métodos modificados de Honma y Shimomura (1978) y Penrose y Glick (2003). El método consiste en la medición del α -cetobutirato producido por la enzima ACC-desaminasa.

A partir de una solución madre de 10 mM de α -cetobutirato se realizó la curva estándar de calibración. Se tomó una alícuota de 200 μ L de la solución de concentración conocida y se colocaron en un tubo de ensaye, enseguida se agregaron 300 μ L de 2-4 dinitrofenilhidrazina. La mezcla se incubó inmediatamente a 30 °C durante 30 min. Posteriormente se agregaron 2 mL de

NaOH 2 M. Se midió la absorbancia de la curva estándar de calibración a una longitud de onda de 540 nm.

Coefficiente de correlación= 0.937

α -cetobutarato (mM)	Absorbancia
0.3	0.0844
0.4	0.0864
0.5	0.099
0.6	0.1042
0.7	0.1071

Donde:

y= absorbancia de la muestra

x= concentración de α -cetobutarato en mM

Anexo IX-1. Composición de solución mezcla de ácido sulfúrico-ácido salicílico

Se mezcló 1 g de ácido salicílico con 30 mL de H₂SO₄ concentrado

Anexo IX-2. Composición mezcla digestora

Se mezcló 96 g de Na₂SO₄, 3.5 g de CuSO₄ y 0.5 g de selenio en polvo. El Na₂SO₄ y de CuSO₄ se trituraron hasta pasar por una malla No. 20.

Anexo X. Solución acondicionadora para sulfatos

Se pesaron 37.5 g de NaCl y se disolvieron en 300 mL de agua destilada. La mezcla se transfirió a un matraz aforado de 500 mL y se agregaron 25 mL de glicerina pura más 50 mL de alcohol etílico y 15 mL de ácido clorhídrico concentrado. Finalmente se aforó con agua destilada.

Anexo XI. Curva de calibración para determinación de sulfatos solubles en residuo de mina

Se preparó una solución estándar de 100 mg L⁻¹ de Na₂SO₄ y soluciones de 5, 10, 20, 30 y 40 mg L⁻¹ de SO₄²⁻. Las soluciones estándar se mezclaron con una

pizca de BaCl₂ y 5 mL de solución acondicionadora y se agitaron durante 1 min. Posteriormente, la absorbancia de las soluciones se midió a una longitud de onda de 420 nm.

Na ₂ SO ₄ (mg L ⁻¹)	Absorbancia
5	0.2733
10	0.4982
20	0.9631
30	1.2206
40	1.4812

Coefficiente de correlación = 0.97

Donde:

y= absorbancia de la muestra

x= concentración de SO₄²⁻ en mg kg⁻¹

Anexo XII. Curva de calibración para determinación de azufre total

Se preparó una solución estándar de 100 mg L⁻¹ de Na₂SO₄ y las soluciones de 10, 20, 30, 40 y 50 mg L⁻¹: Las soluciones estándar se mezclaron con una pizca de BaCl₂ y se agitaron durante 1 min. Posteriormente, la absorbancia de las soluciones se midió a una longitud de onda de 420 nm.

S (mg L ⁻¹)	Absorbancia
10	0.0461
20	0.158
30	0.4534
40	0.7199
50	0.9387

Coefficiente de correlación = 0.98

Donde:

y= absorbancia de la muestra

x= concentración de S en mg kg⁻¹

Anexo XIII. Curva de calibración para fósforo disponible (Olsen).

A partir de una solución estándar de 100 mg L⁻¹ de KH₂PO₄ se preparó una solución de 2 mg L⁻¹ y se tomaron alícuotas para preparar la curva estándar.

PO ₄ ³⁻ (mg L ⁻¹)	Absorbancia
0.2	0.0901
0.4	0.1606
0.8	0.3134

Coefficiente de correlación = 0.99

Donde:

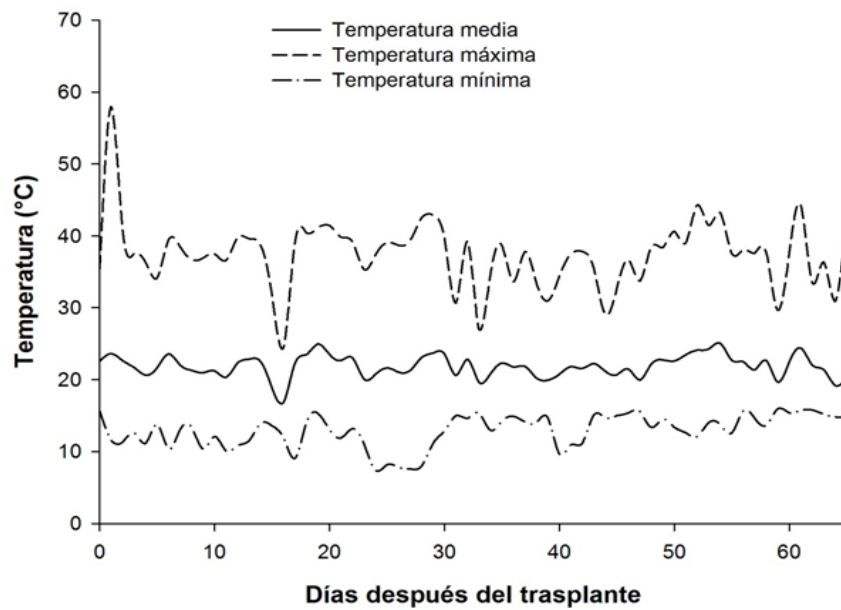
y= absorbancia de la muestra

x= concentración de PO₄³⁻ en mg kg⁻¹

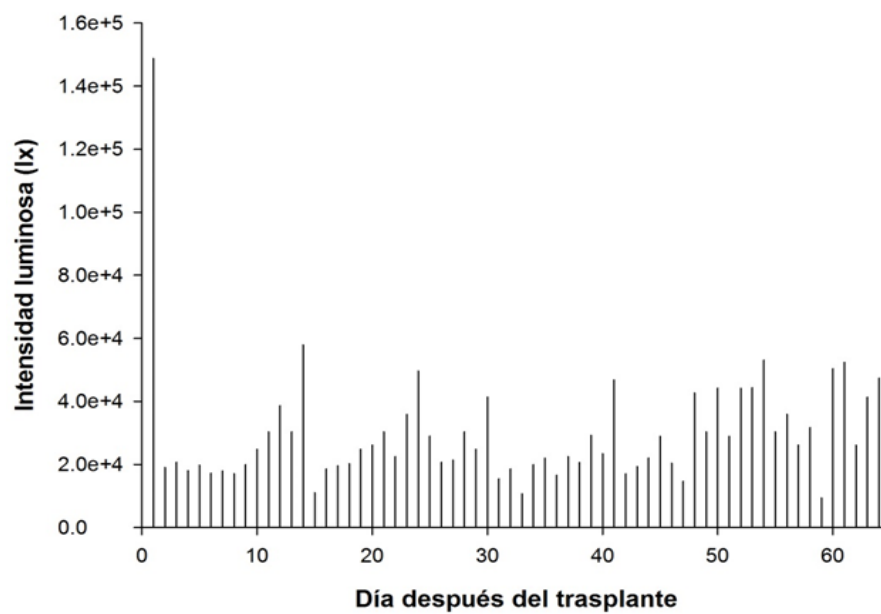
Anexo XIV. Gráficos de cinética de temperatura e intensidad luminosa

Cinética de a) temperatura e b) intensidad luminosa en invernadero durante el experimento de *R. communis*

a)



b)



Anexo XV. Curva de calibración para determinación de concentración de H₂O₂ en tejido vegetal

Se preparó una solución estándar de 0.01M de H₂O₂ y las soluciones de 10, 20, 30, 40 y 60 µmol H₂O₂. Se midió la absorbancia de las soluciones a una longitud de onda de 390 nm.

H₂O₂ (µmol L⁻¹)	Absorbancia
10	0.0768
20	0.1807
30	0.2745
40	0.3538
50	0.4336

Coeficiente de correlación = 0.99

Donde:

y= absorbancia de la muestra

x= concentración de H₂O₂ en µmol L⁻¹

Anexo XVI. Composición del reactivo succinato deshidrogenasa (SDH)

Composición del reactivo succinato deshidrogenasa (SDH). Éste debe prepararse al momento de la cosecha y no exponerse a la luz.

Reactivo	Cantidad para preparar 200 mL
Tris-HCl 0.2M, pH 7.4	50 mL
MgCl ₂ 5 mM	20 mL
P-Iodonitrotetrazolium Violeta (INT) 4 mg L ⁻¹	50 mL
Succinato disódico 0.25 M	20 mL
H ₂ O destilada	60 mL

Anexo XVII. Curva de calibración para determinación de ácido indolacético (AIA) producido por microorganismos nativos del residuo de mina y mezcla de residuo con emiendas

Se preparó una solución estándar de 100 mg L⁻¹ de AIA y soluciones de 12 a 60 mg L⁻¹ de AIA. Se tomó 3 mL de cada solución de concentración conocida y

se depositó en un tubo de ensaye, enseguida se agregaron 2 mL de Salkowski. Las mezclas se dejaron reposar durante 30 min para el desarrollo de una coloración rosa y la absorbancia se midió a una longitud de onda de 530 nm.

AIA (mg L ⁻¹)	Absorbancia
12	0.0599
24	0.3214
36	0.7086
48	1.178
60	1.7918

Coefficiente de correlación: 0.976

Donde:

y= Absorbancia de la muestra

x= Concentración de AIA en mg L⁻¹

Anexo XVIII-1. Cuadro de análisis de medidas repetidas para cinética de altura de *Ricinus communis*

Cuadro de análisis de varianza de medidas repetidas para cinética de altura de *Ricinus communis*

Fuente de variación	Grados de libertad	Valor- F	Pr>F
Tratamiento	3	39.66	<0.001
Tiempo	5	98.16	<0.001
Tratamiento*tiempo	15	2.05	0.0187

Cuadro de comparaciones múltiples para cinética de altura de *R. communis*

Comparación por pares de tratamientos	Diferencia de medias	Valor t	Pr
RM vs E	-3.6437	-8.31	<0.0001
RM vs N9	-3.8073	-8.68	<0.0001
RM vs Mc188	-4.192	-9.56	<0.0001
E vs N9	-0.1637	-0.37	0.7128
E vs Mc188	-0.5483	-1.25	0.2255
N9 vs Mc188	-0.3846	-0.88	0.3907

RM, residuo de mina; E, mezcla residuo de mina con enmiendas; N9, mezcla residuo de mina con enmiendas e inoculación de N9; Mc188, mezcla residuo de mina e inoculación de Mc188

Anexo XVIII-2. Cuadro de análisis de medidas repetidas para cinética de clorofila relativa de *Ricinus communis*

Cuadro de análisis de varianza de medidas repetidas para cinética de clorofila relativa de *R. communis*

Fuente de variación	Grados de libertad	Valor- F	Pr>F
Tratamiento	3	25.201	<0.001
Tiempo	4	10.099	<0.001
Tratamiento*tiempo	12	6.301	<0.0001

Cuadro de comparaciones multiples para cinética de clorifila relativa de *R. communis*

Comparación por pares de tratamientos	Diferencia de medias	Valor t	Pr
RM vs E	7.167	10.062	<0.001
RM vs N9	7.063	9.917	<0.001
RM vs Mc188	7.220	10.137	<0.001
E vs N9	0.103	0.145	1.000
E vs Mc188	0.0533	0.0749	1.000
N9 vs Mc188	0.157	0.220	0.999

RM, residuo de mina; E, mezcla residuo de mina con enmiendas; N9, mezcla residuo de mina con enmiendas e inoculación de N9; Mc188, mezcla residuo de mina e inoculación de Mc188

Anexo XIX. Productos de la tesis

Ponencias:

- Ponencia oral Bacterias promotoras de crecimiento de plantas y remediación de sitios contaminados con metales pesados en el minisimposio Funcionalidad de organismos en las tecnologías ambientales, realizado el día 11 de febrero de 2013.

- Ponencia oral Fitorremediación asistida por microorganismos: bacterias promotoras de crecimiento de plantas en la Reunión Anual 2013 de la Unión Geofísica Mexicana, celebrado del 3 al 8 de noviembre de 2013.

Presentaciones en congresos:

- Gonzalez-Chávez, MCA, Carrillo-González, R., Ruiz-Olivares, A., Perea-Vélez, YS. Ejemplos de alternativas microbianas para remediar residuos de mina en México. XX Congreso Latinoamericano y XVI Congreso Peruano de la Ciencia del Suelo, realizado en Cusco, Perú del 9 al 15 de noviembre de 2014.
- Gonzalez-Chávez, MCA, Carrillo-González, R., Perea-Vélez, YS, Noguez-Iniesta, JA, Hernández-Godínez, MI. Implementando en México el uso de *Ricinus communis* en fitoremediación y como biocombustible. XX Congreso Latinoamericano y XVI Congreso Peruano de la Ciencia del Suelo, realizado en Cusco, Perú del 9 al 15 de noviembre de 2014.
- Gonzalez-Chávez, MCA, Carrillo-González, R., Perea-Vélez, YS, Noguez-Iniesta, JA, Godínez-Hernández, MI. Interactions plants-soil microorganisms for remediation of metal mine residues. 11th International Phytotechnologies Conference, Heraklion, Crete, from 30 September to 3 October of 2014.

Publicaciones:

- Capítulo de libro titulado “Fitorremediación asistida por bacterias promotoras del crecimiento de plantas” (por publicar).

- Perea-Vélez Y.S., R. Carrillo-González, F.A. Solís-Domínguez y M.C.A. González-Chávez. Fitorremediación de un residuo de mina asistida con enmiendas y bacterias promotoras del crecimiento. (por publicar)

Cursos:

- Análisis Espacial de la Contaminación de Suelos Urbanos con Metales Pesados, impartido por el Dr. Francisco Bautista en el marco de la Reunión Anual de la Unión Geofísica Mexicana, del del 3 al 8 de noviembre de 2013.
- Metodologías para la investigación de la micro y nanotecnología Agropecuaria y Ambiental. Celebrado el 24 de septiembre de 2014 en el marco del Simposio Internacional Hacia dónde vamos con la Micro y la Nanotecnología Agropecuaria y Ambiental.

FITO, BIO Y NANOTECNOLOGÍAS PARA LA REMEDIACIÓN DE SITIOS CONTAMINADOS CON METALES PESADOS CONSIDERANDO SERVICIOS AL ECOSISTEMA

Fitorremediación asistida por microorganismos: bacterias promotoras de crecimiento de plantas

Perea Velez Yazmín Stefani¹, González Chávez Ma. del Carmen A²., Carrillo González Rogelio² y Mendoza Hernández José Carlos³

¹Edafología, COLPOS

²COLPOS

³BUAP

steperea0078@yahoo.com.mx

La fitorremediación ha surgido como una alternativa viable para el tratamiento *in situ* de suelos altamente contaminados con elementos potencialmente tóxicos (EPT). Sin embargo, como parte de un esfuerzo para aumentar la eficiencia de esta tecnología, se propone utilizar la diversidad bacteriana en conjunto con las plantas. La asociación de plantas con microorganismos mejora la eficiencia de la fitorremediación, debido a que los microorganismos son capaces de alterar la biodisponibilidad de los EPT. Además, esta asociación mejora tanto la tolerancia de las plantas a los EPT, como la producción de la biomasa vegetal. Metabolitos como los sideróforos, el ácido indolacético y otros ácidos; así como, enzimas que alteran los niveles de hormonas en las plantas participan en procesos que operan en la rizósfera y tienen funciones destacadas en la absorción de nutrientes, el control de organismos patógenos, la elongación celular y la regulación de la actividad metabólica de la raíz. También mejoran los procesos de desintoxicación de EPT en las plantas. Descubrir cepas bacterianas que sean capaces de sintetizar dichos metabolitos (conocidas como bacterias promotoras de crecimiento de plantas, BPCP), abre áreas de oportunidad prometedoras en el campo de la fitorremediación. Actualmente, existen dos enfoques para buscar BPCP con aplicación en la fitorremediación de suelos contaminados con EPT. El primer enfoque se basa en aislar cepas nativas de los suelos contaminados para utilizarlas como inoculantes. Mientras que el otro, propone usar cepas de BPCP que tienen uso en la agricultura. Sin embargo, se prefiere seguir la primera estrategia, debido a que los microorganismos autóctonos están adaptados a la presencia de EPT. Durante los últimos años los estudios de fitorremediación a nivel invernadero se ha observado que la aplicación de BPCP incrementa la tolerancia de las plantas a los EPT, y al mismo tiempo se ha reportado aumento significativo en la producción de biomasa. No obstante, se requiere de mejor comprensión de los procesos en la rizósfera, lo cual ayudará a escalar a campo los resultados obtenidos en experimentos en macetas y al mismo tiempo, mejorar la eficiencia de la fitorremediación.

Este trabajo forma parte del proyecto FORDECyT 191357.

EJEMPLOS DE ALTERNATIVAS MICROBIANAS PARA REMEDIAR RESIDUOS DE MINA EN MÉXICO

González-Chávez, MCA^{1,*}; Carrillo-González; Perea- Vélez, SJ¹; Noguez Iniesta, J.A.; Hernández Godínez, MI¹

¹Colegio de Postgraduados Campus Montecillo.

*Autor de contacto: carmeng@colpos.mx km 36.5 Carretera México Texcoco. Montecillo Texcoco, estado de México. 56230. (052) 595 20200 ext. 1278

RESUMEN

El objetivo del trabajo es presentar diferentes ejemplos del uso de microorganismos benéficos y manejo agronómico para incrementar el establecimiento, supervivencia y crecimiento de diferentes plantas en sitios contaminados con metales pesados. Los residuos de la industria minera representan sustratos difíciles de manejar, porque contienen altas concentración de elementos potencialmente tóxicos (EPT), pobre contenido de nutrientes, alta conductividad eléctrica; así como baja capacidad de retención de humedad y pobre contenido de materia orgánica. Aunque algunas plantas son capaces de crecer en diversos sitios contaminados, estabilizar los EPT en el área de su rizósfera y completar su ciclo biológico; no siempre es fácil establecer la vegetación en estos sitios. Se opta por hacer un preacondicionamiento del suelo contaminado, incorporando materiales que mejoren sus propiedades fisicoquímicas y biológicas. Existen ciertas condiciones biológicas y químicas poco entendidas para que plantas tolerantes logren en la práctica establecerse en un residuo minero. Por tanto, algunos autores han sugerido utilizar microorganismos benéficos, como bacterias y hongos asociados a las raíces de las plantas para remediar un sitio contaminado. Estos organismos pueden contribuir al crecimiento de una planta a través de la producción de hormonas capaces de promover su crecimiento, incrementar tolerancia a EPT a través de diferentes mecanismos, proteger a la planta contra patógenos. Se mostrarán diversos ejemplos de la actividad microbiana en sitios contaminados con residuos de mina útiles para la fitorremediación.

PALABRAS CLAVE

Bacterias promotoras de plantas, hongos micorrízicos, metales pesados



XX Congreso Latinoamericano y XVI Congreso Peruano de la Ciencia del Suelo

“EDUCAR para PRESERVAR el suelo y conservar la vida en La Tierra”

Cusco – Perú, del 9 al 15 de Noviembre del 2014
Centro de Convenciones de la Municipalidad del Cusco

IMPLEMENTANDO EN MÉXICO EL USO DE *RICINUS COMMUNIS* EN FITORREMEDIACIÓN Y COMO BIOCOMBUSTIBLE

González-Chávez, MCA^{1,*}; Carrillo-González, R.¹; Ruiz-Olivares, A.¹; Perea- Vélez, SJ¹

¹Colegio de Postgraduados Campus Montecillo.

*Autor de contacto: carmeng@colpos.mx km 36.5 Carretera México Texcoco. Montecillo Texcoco, estado de México. 56230. (052) 595 20200 ext. 1278

RESUMEN

Los aceites vegetales son la alternativa más aceptable para resolver la declinación global de las fuentes fósiles. *Ricinus communis* L. es una planta de gran interés porque produce abundante aceite que puede utilizarse como biocombustible. Su capacidad para crecer en diversas condiciones edafo-climáticas, como los sitios contaminados con metales pesados y producir aceite no comestible, la ubican como una de las mejores alternativas económicas y ambientales para remediar y producir aceite como materia prima de biocombustibles. El objetivo del trabajo es mostrar los resultados obtenidos del establecimiento natural de *R. communis* en residuos de minas conteniendo altas concentraciones de metales pesados (Zn, Cu, Cd, Pb) y las alternativas que se han seguido para su implementación en campo. Esta planta se comporta como pobre acumuladora de metales en el follaje, cascarilla de semilla, aceite y torta; lo cual permite proponer el uso de sus diferentes bioproductos, sumar su aporte en los servicios ecosistémicos y sugerir el valor agregado a su cultivo en estas condiciones marginales. Su biomasa tiene 43% de contenido de carbono. El aceite producido en suelos contaminados tiene similar contenido de ácidos grasos palmítico y oleico al de aceite de sitio no contaminado, pero mayor contenido de ácido linoléico; el cual es un ácido graso muy deseable en biocombustibles. Se mostrarán las dificultades y retos de la implementación para inducir nuevas plantaciones en sitios contaminados. Se plantea el uso de microorganismos benéficos y algún manejo agronómico adicional para incrementar el establecimiento, supervivencia y crecimiento de *R. communis* en los sitios contaminados.

PALABRAS CLAVE: Remedición sitios mineros, biorremediación, metales pesados.

INTRODUCCIÓN

Dos de los mayores problemas que enfrenta la sociedad mundial actual es la contaminación ambiental y la demanda energética. La minería es una de las principales actividades que produce contaminación por la alta cantidad de residuos que se almacenan a cielo abierto. Éstos se

INTERACTIONS PLANT – SOIL MICROORGANISMS FOR REMEDIATION OF METAL MINE RESIDUES

Ma. del Carmen A. González Chávez, Rogelio Carrillo González, Yazmin Stefani Perea Vélez, José Alfredo Nogues Iniesta, María Isabel Godínez Hernández
Edaphology, Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, Texcoco, México
Corresponding author email: carmeng@colpos.mx

ABSTRACT

Mining has been an important commercial activity in Mexico. As a result tons of mining waste is observed in many areas causing a potential risk not only for the environment, but also for the human population settled very near to mine tailings. In order to reduce the dispersion of potentially toxic elements (PTE) contained in tailings the establishment of a well-developed vegetation cover is required. However, mine tailings are drastically physico-chemical and biological altered environments and natural restoration may occur in many years. Microbe assisted phytoremediation and amendments are eco-friendly and cost-effective alternatives proposed to increase biological productivity; to improve fertility of mine tailings and induce sooner site remediation. The results obtained by using different plants such as *Jatropha curcas*, *Ricinus communis*, *Brassica napus*, *Medicago sativa*, *Acacia farnesiana*, *Senna multiglandulosa*, in combination with soil amendments such as perlite, vermicompost and biochar, as well as different beneficial soil microorganisms for instance arbuscular mycorrhizal fungi or plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) will be presented. The tested plants were selected because they are found as naturally established plants in mine tailings (except *J. curcas*, *M. sativa* and *B. napus*), their tolerance to PTE and role to increase soil fertility, or their use as raw material for potential biodiesel production. Soil amendments were able to decrease PTE availability; perlite reduced Cd availability, biochar (5%) decreased availability of Cd (97%), Cu (32%), Pb (56%) and Zn (34%). Vermicompost at 10% or 15% also diminished availability of several PTE. Several biochemical properties were analyzed for the PGPR (indol acetic acid, ACC-deaminase, phosphate solubilization, tolerance to different PTE, siderophore production) under study and their effect on plant growth into mine tailings substrates amended with organic compounds. All these factors (amendments, tolerant plants, and selected microorganisms) represent a very useful tool to deal with the harsh environment such as mine tailings and propitiate their phytoremediation, but their efficiency varies depending of the combination.

