



COLEGIO DE POSTGRADUADOS
INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS

AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE EDAFOLOGIA

**Fitoestabilización de elementos
potencialmente tóxicos por *Jatropha curcas* L.,**

***Acaulospora* sp. y biochar**

MARIA ISABEL HERNÁNDEZ GODINEZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

2015

La presente tesis titulada: Fitoestabilización de elementos potencialmente tóxicos por *Jatropha curcas* L., *Acaulospora* sp. y biochar

Realizada por el alumno: María Isabel Hernández Godínez

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
EDAFOLOGIA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA



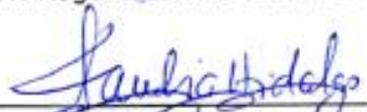
Dra. Ma. del Carmen Ángeles González Chávez

ASESOR



Dr. Rogelio Carrillo González

ASESOR



Dra. Claudia Hidalgo Moreno

ASESOR



Dra. Silvia Evangelista Lozano

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Abril del 2015

Fitoestabilización de elementos potencialmente tóxicos por *Jatropha curcas* L.,

Acaulospora sp. y biochar

Hernández Godínez María Isabel, MC

Colegio de Postgraduados, 2015

Resumen

El objetivo de esta investigación fue evaluar el uso de *Jatropha curca* en asociación con *Acaulospora* sp., para remediar residuo de mina enmendados con biochar. El estudio se dividió en tres etapas de experimentación. En la primera etapa se determinaron las propiedades fisicoquímicas de tres tipos de biochar (caña de azúcar, maíz y pino) y el residuo de mina. Los resultados variaron dependiendo de la naturaleza del biochar. En la segunda etapa se comparó la estabilización de Cu, Cd, Pb y Zn por la adición de porcentajes crecientes de biochar al residuo de mina. El biochar de maíz tuvo mayor capacidad de adsorber elementos potencialmente tóxicos en comparación con el biochar de pino y caña de azúcar. La capacidad de adsorción del biochar se relacionó al aumento del pH y a los grupos funcionales (hidroxilo, carboxilo, fosfina) que están presentes sobre la superficie de este material. En la tercera etapa se cultivó *J. curcas* inoculada con *Acaulospora* sp. en residuos de mina enmendado con biochar de maíz (5%), para determinar la estabilización de Cu, Cd, Pb y Zn. Se encontró que *J. curcas* es capaz de establecerse en el residuo de mina. No se comportó como una planta acumuladora de los EPT. La inoculación con *Acaulospora* sp. y la aplicación de biochar, densidad estomática, contenido de clorofila *a* y *total*, fósforo y nitrógeno de la planta. El biochar de maíz promovió cambios fisicoquímicos positivos en el residuo de mina. Estos cambios pueden actuar sinérgicamente con *J. curcas* y *Acaulospora* sp. en la remediación de sitios contaminados con EPT, al mismo tiempo que se promueve la producción de cultivos con potencial bioenergético como *J. curcas*.

Palabras clave: *Terra preta*; metales pesados; fitorremediación; inmovilización; micorriza.

Jatropha curcas for assisted phytoremediation of mine tailing with biochar and a
arbuscular mycorrhizal.fungi

Hernández Godínez María Isabel, MC
Colegio de Postgraduados, 2015

Abstract

The purpose of this study was to evaluate the use of *Jatropha curcas* L. in association with *Acaulospora* sp., and biochar for remediation of a mine tailing. The research was divided in three experimental phases. The physicochemical properties of three types of biochar (from sugar cane, corn stalks and pine branches) and the mine residue were determined during the first stage. The results varied depending on the nature of biochar. At the second phase, stabilization of Cu, Cd, Pb and Zn was evaluated after amended the mine tailing with biochar. Corn biochar has greater capacity to adsorb potentially toxic elements (PTE) than the sugar cane and pine biochars. Furthermore, it was determined that the adsorption capacity of biochar is due to increase of pH and functional groups (hydroxyl, carboxyl, phosphine) that are present on the surface of this material. For the third phase mine waste was amended with corn biochar (5%) and sowed whit *J. curcas* inoculated with *Acaulospora* sp to evaluate the effect on Cu, Cd, Pb and Zn availability. It was found that *J. curcas* was able to survive and grow on the mine residue used in this study. It did not behave as an accumulator plant of PTE. Inoculation with *Acaulospora* sp. and application of biochar contributed to the increase biomass, stomatal index, chlorophyll content *a* and *total*, phosphorus and nitrogen in plant. Corn biochar promoted positive physicochemical changes on the mine residue. These changes may act synergistically with *J. curcas* and *Acaulospora* sp. on the remediation of EPT contaminated sites. Bioenergy crops could be planted on waste land reducing the risk of transfer EPT in the food chain.

Keywords: Terra preta; heavy metals; phytoremediation; immobilization; mycorrhiza.

Agradecimientos

- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para mis estudios de maestría en el colegio de Postgraduados.
- Al proyecto Fideicomiso: La micorriza arbuscular para la producción de *Jatropha curcas* L., planta de interés energético. Por el apoyo económico para culminar este trabajo de investigación.
- Agradezco de manera especial a la Dra. Carmen González y al Dr. Rogelio Carrillo por sus atenciones, ayuda incondicional y por la oportunidad de pertenecer a su gran equipo de trabajo.
- A la Dra. Claudia Hidalgo y a la Dra. Silvia Evangelista por ser partícipes en la realización de esta tesis y ser parte de mi consejo particular.
- Al M.C. Jaime Cruz y Sr. Viviano por toda la ayuda y facilidades que me brindaron en el área de química para realizar mis análisis químicos.
- A la Dra. Hilda Silva, Biol. Greta Hanako y Biol. Simón por todas las facilidades que me brindaron en el área de laboratorios generales.
- Al centro de desarrollo de productos bióticos (CEPROBI) en Yauhtepec, Morelos y a las encargadas del área por permitirme llevar a cabo la última etapa experimental en el laboratorio de propagación *ex vitro*.
- Al Dr. Juan Almaraz y al Área de Microbiología de COLPOS por las facilidades en el préstamo de equipos.
- A Patricio, Víctor, Ariadna, Lupita, Miriam, Alfredo, Alex, Stef, Arthur, Magda, Ere, maestro Jaime y David por su invaluable amistad, sus palabras, por todos los grandes momentos y por la ayuda desinteresada que me brindaron cuando más lo necesitaba. ¡¡¡Gracias por ser mis amigos, espero que se acuerden de mí, porque yo nunca me olvidaré de ustedes!!!
- A mis amigos Claudia, Matías y José Luís por su amistad, cariño y complicidad para que lograra mis metas. Los quiero.

Dedicatoria

Esta tesis la dedico con cariño y respeto a mis padres y a mi hermanito, porque siempre están conmigo sin importar nada.

A mi mejor amigo y compañero de vida Edan, desde que estas en mi vida las cosas no son fáciles, pero has logrado sacar lo mejor de mí. Tu amor y paciencia son parte esencial para que logre mis metas. Siempre contigo, te amo.

A mi dulce y amada Elena, tu sonrisa siempre ilumina mi vida y tu bienestar son el motivo para que luche incansablemente. Sabes que todo el tiempo voy a luchar a tu lado y que siempre aré de nuestro mundo un lugar feliz para ti. Te amo mi hermosa nenita.

Gracias por existir...

Contenido

	Pág.
Resumen	i
Abstract	ii
Agradecimientos	iii
Dedicatoria	iv
Contenido	v
Índice de figuras	ix
Índice de cuadros	xi
Marco teórico	1
Introducción	1
La minería en México	3
Minería como fuente de contaminación	4
Disponibilidad de los EPT en el suelo	5
Técnicas utilizadas para la remediación de suelos contaminados con EPT	6
Fitorremediación	6
Biología de <i>J. curcas</i>	8
Tolerancia de <i>J. curcas</i> a altas concentraciones de EPT	8
Uso de enmiendas en la remediación de suelos contaminados	10
Relevancia de los HMA en los procesos de estabilización de EPT	14
Conclusiones de la revisión bibliográfica	16
Planteamiento de la investigación	17
Objetivos e hipótesis	18
Objetivo general	18
Hipótesis general	18

Objetivos específicos	18
Hipótesis específicas	19
Materiales y métodos	19
Etapa I. Caracterización del residuo de mina y los diferentes biochar	19
Colecta del residuo de mina	19
Materiales de biochar	20
Análisis fisicoquímico del residuo de mina y los diferentes biochar	20
pH	21
Conductividad eléctrica	21
Concentración total de EPT	22
Concentración extractable de EPT	22
Fósforo disponible	23
Capacidad de intercambio catiónico	24
Nitrógeno total	25
Materia orgánica	26
Capacidad de campo	27
Color	27
Textura	28
Densidad aparente	28
Análisis de infrarrojo	29
Etapa II. Estabilización de EPT por adición de biochar al residuo de mina	30
a) Pruebas de equilibrio	30
<i>Concentración extractable de EPT con $Ca(NO_3)_2$</i>	30
b) Cinética de estabilización	30

<i>Preparación de unidades para incubación</i>	31
Etapa III. Capacidad fitoestabilizadora de <i>J. curcas</i> inoculada con <i>Acaulospora</i> sp. en residuos de mina enmendados con biochar	31
Preparación, estabilización y caracterización fisicoquímica de la muestra de residuo de mina y biochar	31
<i>Preparación de la mezcla</i>	31
<i>Estabilización de la mezcla</i>	32
<i>Caracterización de la mezcla</i>	32
Producción y calidad del inóculo	32
<i>Número de esporas</i>	33
<i>Evaluación de la colonización fúngica radical</i>	33
Establecimiento del experimento	34
<i>Germinación e inoculación de las semillas de <i>J. curcas</i></i>	34
<i>Trasplante de semillas a la mezcla estabilizada</i>	35
Diseño experimental y análisis estadístico	35
Evaluación del experimento	36
<i>Cinética de crecimiento</i>	36
<i>Supervivencia de las plantas</i>	36
<i>Biomasa seca parte aérea y raíz de <i>J. curcas</i></i>	36
<i>Cuantificación de clorofila en hojas de <i>J. curcas</i></i>	36
<i>Concentración de EPT en parte aérea y raíz de <i>J. curcas</i></i>	37
<i>Colonización fúngica en raíces de <i>J. curcas</i></i>	37
Resultados y discusión	38
Etapa I. Caracterización del residuo de mina y los diferentes biochar	38
Etapa 2. Estabilización de EPT por adición de biochar al residuo de	45

mina	
<i>a) Pruebas de equilibrio</i>	45
<i>b) Cinética de estabilización</i>	50
Etapa 3. Capacidad fitoestabilizadora de <i>J. curcas</i> inoculada con <i>Acaulospora</i> sp. en residuos de mina enmendados con biochar	59
<i>Caracterización fisicoquímica del residuo de mina</i>	59
<i>Análisis de infrarrojo</i>	61
<i>Efectos de EPT en el desarrollo de <i>J. curcas</i></i>	65
<i>Densidad estomática</i>	70
<i>Concentración de EPT en <i>J. curcas</i></i>	72
Conclusiones generales	80
Contraste de hipótesis	82
Recomendaciones finales y trabajo futuro	83
Literatura citada	84
Difusión de resultados en reuniones científicas	106

Índice de Figuras

	Pág.
1. Depósito de residuos de mina Santa María. Municipio de Zimapán, Hgo	20
2. Espectro de infrarrojo de residuos de mina y los distintos biochar	45
3. Variación en la concentración de Cu en residuo de mina (RM) debido a la adición de biochar	46
4. Variación en la concentración de Cd en residuo de mina (RM) debido a la adición de biochar	47
5. Variación en la concentración de Pb en residuo de mina (RM) debido a la adición de biochar	48
6. Variación en la concentración de Zn en residuo de mina (RM) debido a la adición de biochar	49
7. Cambio en el pH en residuo de mina debido a la aplicación de biochar	50
8. Disponibilidad de Zn bajo diferentes tratamientos de biochar	52
9. Cinética de disponibilidad de Cu en función de diferentes tratamientos de biochar	53
10. Disponibilidad de Cd bajo diferentes tratamientos de biochar	55
11. Disponibilidad de Pb bajo diferentes tratamientos de biochar	56
12. Comportamiento del pH del residuo de mina bajo diferentes tratamientos con biochar de caña (a), maíz (b) y pino (c)	58
13. Análisis de infrarrojo, del residuo de mina sólo y en combinación con biochar, antes (ai) y después de la incubación (di)	63
14. Cinética de la altura de <i>J. curcas</i> bajo diferentes tratamientos	66
15. Área foliar al final del experimento	67
16. Número de hojas en <i>J. curcas</i> creciendo bajo diferentes tratamiento	68
17. Diámetro de tallo de <i>J. curcas</i> bajo diferentes tratamientos	69
18. Se observan estomas en la cara abaxial de hoja de <i>J. curcas</i> bajo la influencia de distintos tratamientos	71
19. Concentración de Cd en parte aérea (verde) y raíz (café) de <i>J. curcas</i> creciendo en residuo de mina con cuatro tratamientos	73

20. Concentración de Cu en parte aérea (verde) y raíz (café) de <i>J. curcas</i> al ser expuestas a distintos tratamientos con residuo de mina	74
21. Concentración de Pb en parte aérea (verde) y raíz (café) de <i>J. curcas</i> después de ser expuesta a distintos tratamientos con residuo de mina	75
22. Concentración de Zn en parte aérea (verde) y raíz (café) de <i>J. curcas</i> después de ser expuesta a distintos tratamientos con residuo de mina	76
23. Factor de bioacumulación en parte aérea de <i>J. curcas</i>	76
24. Factor de bioacumulación en la raíz de <i>J. curcas</i>	77
25. Factor de translocación en parte aérea de <i>J. curcas</i>	78

Índice de cuadros

	Pág.
1. Caracterización química del residuo de mina y los diferentes biochar	41
2. Concentración de EPT en el residuo de mina y los diferentes biochar	42
3. Caracterización física del residuo de mina y los diferentes biochar	43
4. Concentración extractable de EPT en el residuo de mina tras la aplicación de diferentes porcentajes de biochar de caña, maíz y pino	59
5. Caracterización fisicoquímica del residuo de mina enmendado con biochar (5%) en contraste con el residuo de mina	60
6. Concentración de EPT extractables con DTPA del residuo de mina, residuo de mina y biochar de maíz (5%) antes (ai) y después de la incubación (di)	65
7. Pigmentos fotosintéticos (clorofila <i>a</i> , <i>b</i> y <i>total</i>) en <i>J. curcas</i> bajo diferentes tratamientos	68
8. Biomasa de <i>J. curcas</i> bajo la influencia de la aplicación de <i>Acaulospora</i> sp.y biochar	70
9. Concentración de fósforo total y porcentaje de nitrógeno en la parte aérea de <i>J. curcas</i> bajo diferentes tratamientos	73

Marco teórico de la investigación

Introducción

La extracción de rocas minerales para su transformación y uso en nuestro beneficio es tan antigua como la humanidad misma. Con el tiempo, estas prácticas adquirieron mayor importancia por el valor económico y cultural que representan dentro de la sociedad. El hecho de que los minerales se volvieran parte de la vida cotidiana propició el desarrollo de técnicas que aumentaron su extracción. No obstante, esto tuvo un impacto negativo debido a la acumulación en el suelo de elementos potencialmente tóxicos (EPT) (Fellet et al., 2011).

La acumulación de EPT en el suelo se debe a que éstos no son biodegradables, lo cual afecta negativamente la calidad del suelo y la vida que en él se desarrolla. Cuando los EPT se incorporan en las cadenas tróficas tienden a acumularse dentro de los organismos. La bioacumulación provoca intoxicaciones, aumento de la mortalidad y la disminución de las comunidades. Lo anterior repercute en la descomposición de la materia orgánica y con ello, la pérdida de las propiedades físicas y químicas del suelo (Wong et al., 2003; Gode y Pehlivan, 2006; Pehlivan et al., 2008). Salomons (1995), comentó que al disminuir la actividad degradadora de los organismos también disminuye la capacidad de las plantas de tolerar estos ambientes contaminados.

El impacto que causa la acumulación de EPT en suelos circundantes a minas y depósitos, aumenta la necesidad de buscar alternativas que contribuyan a la descontaminación y recuperación de estos sitios. Entre las técnicas, resalta la fitorremediación por considerarse económicamente rentable y amigable con el ambiente (Bernal et al., 2007). El uso de esta técnica implica la búsqueda de aquellas plantas que

son capaces de tolerar altas concentraciones de EPT, sin embargo, esto puede variar aún entre especies (Fischerová et al., 2006).

Asimismo, el arrastre hídrico y la dispersión eólica contribuyen al movimiento de EPT a otras capas del suelo (Duarte et al., 2011). Al respecto, se ha probado que la aplicación de materiales inorgánicos y orgánicos controlan la dispersión de los contaminantes al formar agregados en el suelo, además de mejorar las características intrínsecas que le permiten soportar la vida (Ruttens et al., 2006). Por lo que se ha sugerido que el uso de enmiendas optimiza el proceso de fitorremediación de sitios contaminados con EPT.

Estudios recientes sugieren que el biochar puede ser una enmienda efectiva para suelos contaminados con EPT (Jiang et al., 2012). El biochar promueve cambios relevantes en las propiedades de los suelos contaminados como: estabilidad del pH, mayor capacidad de intercambio catiónico, capacidad de retención de agua y disminución en la disponibilidad de EPT. Estos cambios pueden beneficiar el establecimiento de una cobertura vegetal que permita la recuperación de sitios contaminados con EPT (Fellet et al., 2011).

Sus múltiples propiedades también pueden proporcionar un hábitat adecuado para los microorganismos benéficos del suelo como los hongos micorrízico arbusculares (HMA) y las bacterias promotoras del crecimiento. Lo anterior sugiere que el uso de biochar en sitios contaminados puede contribuir al proceso de fitoestabilización, considerando el uso de microorganismos como los HMA.

Bajo este contexto este proyecto tiene como objetivo estimar la capacidad de *J. curcas*, *Acaulospora* sp. y biochar para estabilizar EPT.

La minería en México

La minería es una actividad importante en el desarrollo económico de nuestro país, la diversidad y abundancia de minerales es una de sus mayores riquezas. Actualmente el país ocupa un lugar privilegiado en la producción mundial de minerales; pues se encuentra dentro de los primeros lugares en la extracción plata, celestina y bismuto, segundo en fluorita, cuarto en arsénico, cadmio y grafito, quinto en zinc y sexto en plomo y sal (INE, 2013). Asimismo, la minería contribuye en el desarrollo industrial de México. Los minerales se utilizan como materia prima en gran número de ramas industriales, entre las que destacan la siderúrgica, petrolera, la producción de vidrio, electrónica, cerámica y construcción. El territorio nacional cuenta con ricos depósitos de minerales: la región argénifera que comprende parte de los estados de Chihuahua, Coahuila, Zacatecas, Baja California Sur y San Luís Potosí, y la región con importantes depósitos de fierro, que se extiende por la Costa del Pacífico, en los estados de Jalisco, Colima, Michoacán, Guerrero, Oaxaca y Durango (INE, 2006).

Sin embargo, la minería afronta una serie de dificultades. A nivel nacional ésta se rige por un marco jurídico complejo y con prácticas administrativas inoperantes y lentas. Como consecuencia de las acciones comprendidas, la ley minera publicada en el Diario Oficial de la Federación (DOF) del 26 de junio de 1992 (última reforma publicada), permite la venta de concesiones al sector privado, lo que hace a estas áreas zonas casi inaccesibles para la regulación ambiental, pues solo se ingresa a ellas con un permiso anticipado que debe contar con la aprobación de los propietarios.

Minería como fuente de contaminación

La minería se considera una fuente importante de ingresos monetarios en el país, no obstante, los problemas de contaminación que genera son de gran impacto (Hamzah et al., 2012). El desarrollo y optimización de las tecnologías de extracción en la minería, propició la introducción en México de procesos metalúrgicos como la flotación y la cianuración a inicios del siglo XX (Martín y Gutiérrez, 2010). Esto permite explotar grandes volúmenes de mineral con valor comercial, pero también la generación de gran volumen de residuos.

Los residuos que se generan en el proceso de concentración de minerales como plata, zinc y cobre, generalmente contienen sulfuros metálicos. Algunos como pirita (FeS_2), pirrotita (Fe_{1-x}S), galena (PbS), esfalerita (ZnS), calcopirita (CuFeS_2) y arsenopirita (FeAsS), son fuente de arsénico (As), cadmio (Cd), plomo (Pb), cobre (Cu), zinc (Zn), hierro (Fe), etc. (Romero et al., 2007). Otra forma de contaminación se relaciona con la dispersión eólica, la generación de drenaje ácido y su dispersión a través de los escurrimientos superficiales (Baing et al., 2000).

Los problemas de contaminación por residuos de mina también se delimitan por las condiciones climáticas, ya que al dejarlos expuestos pueden aumentar su biodisponibilidad y esto contribuye a la generación de suelos con limitaciones físicas, químicas y biológicas (Lee et al., 2013; Beesley et al., 2014). Los suelos contaminados se caracterizan por tener pobre estructura edáfica, composición química alterada, disminución o desequilibrio del contenido de nutrientes, ruptura de los ciclos biogeoquímicos, baja profundidad efectiva, baja capacidad de intercambio catiónico, baja retención de agua y presencia de compuestos tóxicos (Tordoff et al., 2000; Ruttens et al., 2006; Sujana et al., 2014).

Una de las zonas en nuestro país que vive esta problemática, es el municipio de Zimapán, en el estado de Hidalgo. Este sitio se caracteriza por ser un importante distrito minero, en el cual, se extraen minerales como Au, Ag, Zn y Pb (Armienta et al., 2000). Sin embargo, este sitio es un depósito constante de residuos de mina, lo que ha dado lugar, a la pérdida de la vegetación a través del tiempo (Ortega et al., 2010). Los riesgos de que no exista una barrera física que impida la dispersión de los residuos tóxicos, puede desencadenar eventos trágicos en las zonas pobladas que se encuentran alrededor, por ejemplo el aumento de la mortalidad por intoxicación (Ruiz-Olivares et al., 2013).

Disponibilidad de los EPT en el suelo

Los EPT en el suelo se encuentran en formas diferentes: como iones, como sales solubles, adsorbidos en arcillas, co-precipitados con carbonatos, sulfatos, fosfatos, sulfuros, en complejos con óxidos e hidróxidos de Fe y Mn, o bien, disueltos en la solución del suelo (Rulkens et al., 1995; Pagnanelli et al., 2004). En cada caso la disponibilidad va a ser diferente dependiendo del pH, el contenido de humedad y el estado de óxido-reducción del suelo (Alloway, 1995). En este sentido Kabata y Pendias (1994), señalaron que según sea la especiación del EPT retenido en el suelo, así será su disponibilidad relativa para las plantas. Al respecto, se sabe que ciertas fracciones biodisponibles de EPT afectan la morfología y la fisiología de las plantas. En algunos casos ocurren daños en la síntesis de pigmentos, lo cual afecta el proceso de fotosíntesis, en otros, se puede dar oscurecimiento y deterioro de las raíces, lo que entorpece el crecimiento de las plantas (Denton, 2007).

Por otro lado, existen plantas que son capaces de tolerar y crecer en estos ambientes. Con este antecedente, se inició la búsqueda de nuevas alternativas que contribuyen a la caracterización y remediación de suelos con este problema. Esta tarea se ha vuelto

constante, ya que las técnicas que se emplean deben sujetarse al grado de acumulación y disponibilidad de estos contaminantes, además del costo económico que este pueda representar.

Técnicas utilizadas para la remediación de suelos contaminados con EPT

De acuerdo con lo anterior, los EPT no se degradan como los compuestos orgánicos y su permanencia puede estar disponible por periodos muy largos (Boulabah et al., 2006). Entre las técnicas convencionales para la remediación de sitios contaminados con EPT están la inmovilización química, haciendo uso de compuestos inorgánicos como la cal, los fosfatos, y compuestos orgánicos como los biosólidos. Otras técnicas recurrentes son el lavado químico, electroremediación y el confinamiento, cuya principal implicación es su elevado costo económico y su impacto ambiental.

Al mismo tiempo, se exploran técnicas más amigables con el ambiente, por un lado se encuentra la biorremediación, tecnología que consiste en emplear sistemas biológicos naturales, algunos con modificaciones genéticas que permiten acumular altas concentraciones de EPT. Por otro lado la fitorremediación, que hace uso de especies vegetales para el saneamiento del terreno (Iqbal y Saeed, 2006).

Fitorremediación

Estudios recientes demuestran que la fitorremediación es una alternativa eficaz y prometedora. Además el uso de microorganismos que se asocian a la plantas aumentan la capacidad de éstas de absorber, acumular y estabilizar los EPT. Esta técnica cuenta con múltiples ventajas como el bajo costo, la velocidad con la que se puede cubrir un

área afectada, la preservación de las propiedades físicas del suelo y la estética (Vamerali et al., 2010).

Dentro de la fitorremediación existen varias técnicas aplicables a suelos con altas concentraciones de EPT, una de ellas es la fitoestabilización. Esta técnica se basa en el uso de las plantas tolerantes a EPT, las cuales disminuyen su disponibilidad por medio de la secreción de compuestos que inmovilizan a los EPT presentes en la interface de la raíz y el suelo (González-Chávez, 2005).

La aplicación de la fitoestabilización en los suelos contaminados con EPT se ha propuesto con mayor frecuencia en los últimos años. Un factor determinante para el uso de esta técnica es caracterizar los suelos, lo cual se basa en el estudio de sus condiciones físico-químicas, pues estas propiedades tienen una función muy importante al disminuir o aumentar la toxicidad de los EPT en el suelo (Beesley et al., 2010). Estas propiedades se reflejan en las dificultades para que las plantas enraícen, además, puede disminuir la capacidad de la planta y los microorganismos (bacterias y hongos) del suelo para interactuar con los EPT mediante mecanismos de acumulación y estabilización de éstos (Puga et al., 2006).

Para aumentar el éxito de esta técnica, es importante seleccionar la especie de planta más adecuada según el tipo de EPT presente en el suelo. Considerables estudios se han realizado para identificar una amplia diversidad de especies de plantas estabilizadoras de EPT (Delgadillo et al., 2011). Lo anterior, tiene como propósito establecer cubiertas vegetales que actúen como una barrera física al inmovilizar y disminuir la dispersión de los EPT (Freitas et al., 2004; Sánchez-López et al., 2015). Adicionalmente, se busca la recuperación a largo plazo, de las propiedades físicas y químicas del suelo, así como el restablecimiento de las comunidades, para hacer estos sitios autosustentables.

Biología de *J. curcas*

La planta *J. curcas* pertenece a la familia de las Euphorbiaceae y es originaria de México y Centroamérica, pero crece en la mayoría de los países tropicales, subtropicales, además de zonas áridas y semiáridas (Webster, 1994). Puede llegar a medir cinco metros de altura, sus raíces están dispuestas en una central y cuatro pivotantes. Las hojas son caducifolias y normalmente se forman con cinco a siete lóbulos acuminados, poco profundos. Los pecíolos miden de 10 a 15 cm. Las flores miden entre 6 y 8 mm, cada inflorescencia rinde un manojito de aproximadamente 10 frutos ovoides o más. La maduración de las semillas requiere de un periodo de 90 días (desde la floración hasta la maduración del fruto) (Heller, 1996). Los frutos son del tipo drupa y produce tres semillas, cada una mide aproximadamente dos centímetros de largo y un centímetro en el diámetro. Esta planta se caracteriza por tener alta plasticidad genética, es decir, puede crecer bajo condiciones marginales (suelos pobres en nutrientes, áridos o con problemas de salinidad) (Manurung et al., 2009). Por ser una especie de origen tropical tolera altas temperaturas, aunque puede llegar a soportar temperaturas bajas, incluso puede resistir hasta una escarcha ligera (Zheng et al., 2009). Sin embargo, en fase de plántula es vulnerable a esta última condición (Windauer et al., 2012). Su requerimiento de agua es sumamente bajo y puede soportar periodos largos de sequía (Silva et al., 2012).

Tolerancia de *J. curcas* a altas concentraciones de EPT

La planta *J. curcas* es una planta que ofrece múltiples beneficios, tanto ambientales como sociales. Sus semillas contienen un aceite no comestible que es útil para la producción de biodiesel (Agbogidi y Eruotor, 2012). La extracción de aceite a partir de

semillas ha cobrado importante valor, debido a que su explotación podría tener impacto positivo en la industria energética. Además, se sugiere que el cultivo de esta planta puede contribuir a la generación de fuentes de trabajo para su producción (Openshaw, 2000). La sustitución de combustibles fósiles por biocombustibles contribuye notablemente a la reducción de gases de efecto invernadero (Makkar y Becker, 2009). Su cultivo también puede ayudar a mejorar las propiedades químicas y físicas de suelos degradados (Marques et al., 2013).

Con base a lo anterior, se propone que la abundancia de raíces puede contribuir a la generación de agregados en el suelo, disminuyendo paulatinamente el deterioro de la erosión del suelo y el lavado de nutrientes (Hinsinger, 1998). Conjuntamente, la raíz provee una superficie para el restablecimiento de microorganismos benéficos para el suelo (Shun et al., 2010). Al mismo tiempo, algunos reportes han probado que *J. curcas* tiene la capacidad de tolerar altas concentraciones de EPT (Agamuthu et al., 2010).

Garófalo-Chaves et al., (2010) evaluaron los efectos de Cu y Zn en el crecimiento de *J. curcas*. El experimento se llevo a cabo en invernadero por un periodo de 110 días. Utilizaron un suelo contaminado artificialmente; los tratamientos consistieron en cinco dosis de Cu (0, 25, 50, 75 y 100 mg dm⁻³) y cuatro dosis de Zn (0 , 50, 100 y 150 mg dm⁻³). Al termino del experimento se evaluó la concentración de Cu y Zn en la planta, así como algunas variables de crecimiento (altura, diametro de tallo y área foliar). Los resultados probaron que *J. curcas* es capas de tolerar concetraciones de Cu y Zn por encima de 75 y 50 mg dm⁻³ respectivamente. Sin embargo, estas concentraciones promovieron la disminución de las altura, diametro y bimasa de la planta.

Majid et al., (2012) realizaron un experimento *J. curcas* para evaluar su crecimiento, tolerancia y capacidad para fitoestabilizar EPT en lodos de depuradora. Estos lodos contenían altas concentraciones de Cu, Fe y Al (56, 779 y 3505 mg kg⁻¹,

respectivamente). Por otra parte, se probaron diferentes porcentajes de aserrín (20, 40, 60, 80 y 100%), para mejorar las condiciones de crecimiento de *J. curcas*. Los resultados probaron que *J. curcas* es capaz de tolerar y concentrar EPT en la raíz. Aunque la acumulación varió según el porcentaje de enmienda que se aplicó, la raíz de *J. curcas* pudo acumular hasta 85, 66 y 37 mg kg⁻¹ de Cu, Fe y Al, respectivamente.

Uso de enmiendas en la remediación de suelos contaminados

Las enmiendas desempeñan tres funciones relevantes cuando se aplican a suelos contaminados: (I) mejoramiento de la naturaleza física y química del suelo; (II) suministro de nutrientes en una forma de liberación lenta, lo que facilita el establecimiento de la planta; y (III) promoción de la inmovilización química y física de EPT, por reducción de la lixiviación, dispersión y la fitotoxicidad (Alvarenga et al., 2008). Estos efectos pueden ser de larga duración, aunque se busca que sean permanentes. No obstante, las enmiendas deben cumplir con ciertos requisitos: que sean económicas, de fácil adquisición y manejo, no tóxicas para los humanos, compatibles con las plantas que se emplean y la más importante que tengan efectos favorables en la disminución de la disponibilidad de EPT (Berti y Cunningham, 2000).

En este contexto, un número considerable de estudios señalan que la combinación de enmiendas, inoculantes microbianos o fertilizantes químicos, contribuyen al establecimiento y desarrollo de las plantas; ya sea mediante el suministro de oligoelementos o el establecimiento de una relación favorable planta-microorganismo. Por otra parte, más allá de la inmovilización del EPT en los suelos, se debe tomar en cuenta que es posible reutilizar desechos orgánicos que se generan en grandes volúmenes (estiércol, residuos forestales, biosólidos entre otros) como subproductos industriales o del sector agropecuario (Ciccu et al., 2003; Lombi et al., 2004; Burgos et

al., 2010). El costo-efectividad de estas enmiendas suena muy atractivo, tomando en cuenta las implicaciones consideradas en la recuperación de sitios contaminados (altos costos, necesidad de equipos o mano de obra especializada, difícil manejo y disponibilidad limitada a las técnicas convencionales).

En este sentido se han probado diferentes enmiendas, pero poco se ha estudiado el efecto del biochar como enmienda para reducir la disponibilidad de los EPT en residuos de minas. El biochar es un producto biológico, de grano fino, poroso y de baja densidad. Se obtiene de la descomposición térmica de la biomasa por un proceso llamado pirolisis. Este se realiza en ausencia o en niveles muy bajos de oxígeno (Bridgwater et al., 2012).

En comparación con otros materiales orgánicos, el biochar que se forma de manera natural es muy estable (de cientos a miles de años), cuando se mezcla con el suelo. El uso del biochar como enmienda en suelos contaminados ha cobrado interés, por los beneficios que confiere al suelo. Además, al mismo tiempo que mejora la calidad del suelo, puede ser un medio para reducir la emisión de CO₂ que es un gas de efecto invernadero y puede utilizarse para el almacenamiento de carbono en el suelo (Lehmann et al., 2011).

La estructura física microscópica de biochar y su abundancia de grupos funcionales polares, tales como carboxílico, hidroxilo y grupos amino (Wang, et al., 2013) son las piezas clave de su éxito en la reducción de la contaminación por EPT (Suppadit, 2012), ya que estos grupos tienen alta afinidad por los EPT. Por otra parte, es rico en componentes alcalinos (Ca, Mg, K); los cuales contribuyen a la neutralización de la acidez del suelo y a su vez se vuelve una fuente de estos iones requeridos por las plantas (Martin et al., 2012).

Con fundamento en estas consideraciones surgió la idea de usar biochar en suelos contaminados con EPT, al mismo tiempo mejora las condiciones para la revegetación. Además, la estructura de este material es altamente porosa, esto da lugar a mayor área de contacto, lo que no solo contribuye a una alta adsorción de EPT, sino también, a la captura e intercambio de nutrientes y carbono necesarios para el restablecimiento de microorganismos benéficos para el suelo y las plantas (particularmente, bacterias promotoras de crecimiento, hongos micorrízicos arbusculares y actomicetos) (Thies y Rillig, 2009). Lo anterior, contribuye de manera positiva a la recuperación, restablecimiento y preservación de la fauna del suelo (Beesley et al., 2011); lo que devolvería a los sitios contaminados su capacidad para sustentar la vida. Beesley et al., (2010), reportaron un efecto residual a los 60 días después de aplicar biochar (elaborado a partir de madera de roble) a un suelo contaminado por EPT. Las concentraciones que en un principio habían disminuido (68% en Cd y 88% de Zn), aumentaron 28 días después del inicio del experimento (35% en Cd y 26% en Zn). Esto en consecuencia de la liberación y solubilización del carbono orgánico disuelto (COD) que se encontraba en el agua intersticial del suelo. Del mismo modo, Hartley et al., (2009) encontraron que el aumento de la movilidad de Cu en presencia de biochar ocurrió por la liberación de COD. Esto contrasta con los resultados de Gomez-Eyles et al., (2011) cuyo trabajo demostró una disminución del COD disuelto en agua y una reducción simultánea de la concentración de Cu tras la aplicación de biochar (elaborado a partir de derivados madera). Lo anterior, sugiere que los procesos por los cuales ocurre la estabilización de EPT, están lejos de ser unificados, ya que dependen de múltiples procesos que ocurren en el suelo (Beesley et al., 2011) y la mineralogía de cada sitio. En un suelo contaminado con Pb (campo de tiro), Uchimiya et al., (2012) encontraron que los

grupos funcionales carboxilo presentes en un biochar activado con una mezcla de ácido sulfúrico y nítrico, mostraron mayor estabilización de Pb, Cu y Zn, que el biochar sin activar. La explicación propuesta es que la activación contribuyó a la oxidación del biochar, lo que resultó en la formación de grupos carboxílico, fenólico y otros grupos funcionales que contienen oxígeno en su superficie. Los autores subrayan que los efectos de la oxidación del biochar deben abordarse a futuro si se planea introducir vegetación. En comparación con los estudios anteriores, sólo un número muy limitado de trabajos ha investigado el efecto de biochar en el crecimiento de las plantas en suelos contaminados con EPT. Hartley et al., (2009) probó que el establecimiento de *Miscanthus* sp., en una zona industrial contaminada, dependió del contenido de P en el biochar, al mismo tiempo, señalaron la necesidad de combinar el biochar con otra enmienda para obtener mayor crecimiento de la planta.

Park et al., (2011) investigaron el efecto de estabilización de EPT con dos tipos de biochar (uno elaborado a partir de gallinaza y otro con residuos de plantas). Los objetivos consistieron en evaluar el efecto de cada biochar en la disponibilidad de EPT, además, de su efecto en la promoción del crecimiento de mostaza india. Los autores concluyeron que ambos biochar son útiles para los procesos de estabilización de suelos contaminados con Cd, Cu y Pb. Ocurrió la estabilización de 45 60 y 70%, respectivamente con el biochar de gallinaza (adición 10%); mientras que con el biochar de residuos de plantas se obtuvieron valores de 30, 45 y 63 % en el mismo orden). La eficacia del biochar estuvo en función de los materiales que se emplearon para su elaboración. El biochar de gallinaza fue el que promovió la mayor biomasa. Aunque no lo probaron, los autores sugieren que la estabilización de EPT ocurrió por precipitación.

El conocimiento que se tiene hasta ahora acerca del biochar y su efecto en las plantas y su capacidad para estabilizar EPT es disperso. En particular, los estudios han mostrado resultados contradictorios cuando se intenta explicar los mecanismos que ocurrieron para la estabilización de los EPT. No es tarea fácil, entender qué parámetro influye de manera predominante en los procesos de estabilización (pH, CIC, COD, precipitación o bien cambios electrostáticos).

De igual manera, Sparks (2001) puntualizó la importancia de comprender los procesos químicos que se llevan a cabo en la rizosfera (ambiente influenciado por las raíces de las plantas), al remarcar que sería una de las fronteras más importantes que se deben atravesar en el conocimiento de la química del suelo. Aunque en la última década se ha generado información importante que ayudará a desentrañar algunos de los múltiples procesos e interacciones entre los EPT y la rizosfera. Rajkumar y Freitas (2008) enfatizaron la importancia de llevar a cabo más investigaciones para entender mejor las reacciones químicas que ocurren en la rizosfera. Del mismo modo, en una revisión reciente, Bolan et al., (2011) hicieron hincapié en la importancia de estudiar la interacción planta-microorganismo para garantizar el éxito de la fitoestabilización.

Relevancia de los HMA en los procesos de estabilización de EPT

A pesar de que las enmiendas pueden aumentar los procesos de fitoestabilización, otro factor crítico que determina la eficiencia de este proceso es la rizósfera; donde los microorganismos ejercen una modificación del ambiente relevante para la planta y los EPT. Por lo cual, una alternativa prometedora y que puede usarse en forma sinérgica con las enmiendas, es la aplicación de microorganismos (Rajkumar et al., 2012). Como ya se ha mencionado, la fitorremediación puede involucrar el uso de microorganismos, a

este proceso se le denomina fitorremediación asistida por microorganismos (González-Chávez, 2005). Los microorganismos tienen la capacidad de afectar la absorción y la disponibilidad de los EPT (Glick, 2010). En adición, los microorganismos pueden secretar sustancias, por ejemplo fitohormonas que contribuyen a la nutrición de la planta (Rajkumar et al., 2012). Actualmente los estudios demuestran que la aplicación de la fitoestabilización, en conjunto con enmiendas y microorganismos, puede ser una técnica sostenible para la rehabilitación de suelos (Alkorta et al., 2004; Bolan et al., 2011).

Los HMA son capaces de estabilizar EPT a través de la absorción, estabilización y quelatación (González-Chávez, 2005). Lo anterior resalta la importancia de su uso en las prácticas de fitorremediación. Las plantas al estar colonizadas por estos hongos, tienen mayor oportunidad de establecerse y sobrevivir en los sitios contaminados. Las estructuras más importantes de los HMA involucradas en la simbiosis y tolerancia a los EPT son los arbusculos, vesículas y las hifas. La colonización inicia a partir de una ramificación dicotómica repetida de una hifa al interior de una célula vegetal para hacer efectivo el intercambio de nutrientes (Guerrero, 1996). El hongo inicialmente crece en medio de las células corticales, pero rápidamente penetra en la pared celular de la célula hospedera, creciendo con ella. El micelio de estos hongos es capaz de extenderse varios centímetros fuera de la raíz permitiendo una mayor superficie de contacto, esto es benéfico para la planta, pues puede aprovechar nutrientes y humedad, que por sí sola no podría (Hart et al., 2012). No obstante, también tienen una función importante en la protección de la planta en presencia de altas concentraciones de EPT. Debido a que funcionan como filtros absorbiendo estos contaminantes.

Las hifas del micelio externo de estos hongos producen abundantemente una proteína denominada glomalina, la cual participa en el secuestro irreversible de los EPT

(González-Chávez et al., 2004). También esta proteína está fuertemente implicada en el secuestro de carbono en el suelo, por ser altamente recalcitrante a la descomposición y por su alto contenido de carbono (40-50%). Se considera un importante factor en la mitigación del cambio climático (González-Chávez et al., 2010). Por lo tanto los HMA son un grupo microbiano importante, no solo para la remediación de suelos contaminados, sino también en los servicios ambientales que desarrollan.

La mayoría de los estudios muestran que la biomasa microbiana, abundancia y composición de la comunidad microbiana, y la actividad enzimática se incrementan por la adición de biochar. Solo ocasionalmente, disminuye la abundancia de los HMA en suelos tratados con biochar, lo cual probablemente se debe al incremento en la disponibilidad de nutrientes, reduciendo la necesidad de estos simbiontes (Lehmann et al., 2011).

Conclusiones de la revisión bibliográfica

A pesar de que la fitoestabilización es una biotecnología prometedora, la información generada hasta ahora no es suficiente para generar procedimientos metodológicos estandarizados. Una de las estrategias para que ésta se considere con mayor recurrencia, es haciéndola más atractiva a través de enfoques adicionales. Uno de esos ellos es considerar a esta técnica como una herramienta para usar tierras improductivas; como son los depósitos de residuos de mina. Otra perspectiva es la promoción de cultivos con interés bioenergético, como el caso de *J. curcas* y *Ricinus communis*. Ruiz Olivares et al., (2013) y González-Chávez et al., 2014 demostraron que *R. communis* produce semillas con abundante aceite (40-60%) y bioproductos con baja concentración de EPT,

además de que secuestra carbono en su biomasa (43%). Lo cual ofrece valor agregado a la remediación de los sitios contaminados y servicios ambientales.

Como ya se ha revisado *J. curcas* posee múltiples beneficios que pueden explotarse, entre lo que destaca su capacidad para estabilizar EPT. Para lograrlo, es importante conocer la manera de intensificar su capacidad de estabilizar estos contaminantes. Una alternativa, es el uso de biochar como estabilizador de EPT y a su vez, mejorador de las propiedades del suelo. Sin embargo, la incorporación de biochar en el suelo es irreversible, por lo que una mala interpretación de sus efectos podría tener consecuencias dramáticas (por ejemplo, mayor movilidad de EPT), más aún en suelos contaminados con múltiples EPT. Además, ya se ha establecido que la presencia de simbiontes, en este caso los HMA, pueden incrementar no solo la tolerancia de la planta para establecerse en sitios con altas concentraciones de EPT, sino también, contribuir a la estabilización de estos contaminantes. Por lo anterior, es importante realizar experimentos que contribuyan al manejo y optimización de la biotecnología de la fitoestabilización.

Planteamiento de la investigación

Este trabajo explora la interacción *J. curcas*-biochar-HMA, para generar información que ayude a la comprensión de los procesos que le ocurren a los EPT en la rizosfera. Cabe señalar, que se aborda un problema real, como es recuperar sitios contaminados con residuos de mina. Sin embargo, la falta de datos concluyentes en el proceso de fitoestabilización derivados de otros trabajos, hace esencial mayor investigación que conduzca a pruebas en campo.

Objetivos e hipótesis

Objetivo general

Estimar la capacidad de *J. curcas*, *Acaulospora* sp. y biochar para estabilizar EPT en residuos de mina.

Hipótesis general

J. curcas, *Acaulospora* sp. y el biochar actúan sinérgicamente en disminuir la absorción de EPT por la raíz de las planta.

Objetivos específicos

1. Asociar las características de cada biochar con sus efectos en la estabilidad de EPT.
2. Seleccionar el biochar con mayor capacidad para estabilizar EPT para la remediación de un residuo de mina.
3. Determinar la capacidad de *J. curcas* para establecerse en un residuo de mina con altas concentraciones de EPT.
4. Evaluar el efecto del biochar en el establecimiento y crecimiento de *J. curcas* en un residuo de mina.
5. Estimar el efecto de *Acaulospora* sp. en la nutrición de *J. curcas* en el residuo de mina bajo estudio.

Hipótesis específicas

1. El biochar con mayor pH es el que estabiliza más los EPT del residuo minero bajo estudio.
2. *J. curcas* transloca bajas concentraciones de EPT a la parte aérea.
3. El biochar aporta nutrientes al residuo de mina la cual se refleja en el desarrollo de *J. curcas*
4. *Acaulospora* sp. contribuye a la nutrición de *J. curcas*

Materiales y métodos

Etapa I. Caracterización del residuo de mina y los diferentes biochar

Esta etapa considero la caracterización del residuo de mina y los diferentes biochar (caña de azúcar, maíz y pino). La caracterización se realizó para conocer las propiedades fisicoquímicas de los materiales involucrados. Los materiales y métodos empleados en esta etapa se describen a continuación:

Colecta del residuo de mina

El residuo que se utilizó para el experimento se recolectó en el depósito llamado Santa María (Fig. 1), el cual se encuentra en el municipio de Zimapán, Hidalgo (Latitud Norte 20°44'11.78'' y Longitud Oeste 99°23'55.55''). Las muestras se tomaron de manera aleatoria a una profundidad de 30 cm y se depositaron en bolsas de plástico.



Fig. 1 Depósito de residuos de mina Santa María. Municipio de Zimapán, Hgo.

Materiales de biochar

Las muestras de biochar fueron facilitados por el laboratorio de fertilidad de suelos, de Colegio de Postgraduados. Se analizaron tres tipos de biochar elaborados a partir de bagazo de caña, aserrín de pino y rastrojo grueso de maíz.

Análisis fisicoquímico del residuo de mina y los diferentes biochar

El residuo de mina se dejó secar a temperatura ambiente. Todos los materiales (residuo de mina y los diferentes biochar) se tamizaron en una malla con una apertura de 2 mm. Las muestras se analizaron por triplicado. El material de vidrio que se empleó se lavó previo a cada determinación con ácido clorhídrico (HCl, 10%), un enjuague de agua potable, dos enjuagues de agua destilada y un enjuague con agua desionizada. Los reactivos que se emplearon en cada análisis son de grado analítico y para el peso de éstos se utilizó una balanza analítica con precisión de $\pm 0.0001\text{g}$ (SCIENTECH, SA 210). Las concentraciones de EPT se cuantificaron por espectrofotometría de absorción atómica (EAA) (Perkin-Elmer 3110).

pH

Se pesaron 0.25 g de biochar y 10 g de residuo de mina. A éstos se les agregó 20 mL de agua destilada. Las muestras se agitaron 15 minutos a 120 opm (oscilaciones por minuto). Posteriormente se determinó el pH con un potenciómetro el cual se calibró con tres soluciones buffer 4, 7 y 9 antes de utilizarlo. El principio metodológico de la evaluación de pH se basa en la determinación de la actividad del ión H mediante el uso de un electrodo cuya una membrana es sensitiva al H. (Orión Research 601) (Rowell, 1994).

Conductividad eléctrica

Se pesaron 0.25 g de biochar y 10 g residuo de mina. A éstos se los agregó 20 mL de agua destilada. Las muestras se agitaron por 20 minutos a 120 opm y se dejaron reposar 24 h. El equipo (Conductronic CL35) se calibró con una solución de cloruro de potasio (KCl, 0.01N), después se determinó la conductividad eléctrica de cada muestra. La medición se basa en el principio de que las sales presentes en la solución conducen la corriente eléctrica en proporción a la concentración de sales o constituyentes ionizados. Esta propiedad se utiliza para medir la conductividad eléctrica de un extracto acuoso del suelo. Esto se realiza mediante un conductímetro provisto de una celda con un par de electrodos. Cuando se disuelve en agua un ácido, base o sal, una porción se disocia en iones positivos y otra en negativos:



Los iones se mueven independientemente y se dirigen a los electrodos de carga opuesta mediante la aplicación de un campo eléctrico. La cantidad de moléculas que se han

disociado depende de la concentración en la solución. Las soluciones al igual al igual que los conductores metálicos obedecen a la Ley de Ohm (Richards, 1973).

Concentración total de EPT

Se pesaron 0.5 g de muestra (residuo de mina y los distintos biochar) y se colocó en un matraz de digestión. A cada muestra se le agregó 1 mL de agua oxigenada (H_2O_2) y se dejaron en reposo 1 h. Posteriormente, se agregaron 4 mL de una mezcla de ác. nítrico-perclórico ($HNO_3:HClO_4$, relación 4:1). Las muestras se dejaron en predigestión 24 h a temperatura ambiente. A continuación, los matraces se calentaron en una rampa de temperatura de 45 y 65 °C por 30 minutos cada periodo. Posteriormente, la temperatura se elevó hasta 110 °C durante 24 h. Las muestras de biochar se dejaron en digestión por 12 h más, adicionalmente se les agregó 4 mL de la mezcla de $HNO_3:HClO_4$. Una vez terminada la digestión las muestras se aforaron a 50 mL con agua desionizada. Posteriormente, se filtraron con papel Whatman #42, las muestras se guardaron en recipientes de plástico de alta densidad para su posterior análisis.

El método de la determinación de metales por espectrofotometría de absorción atómica (EAA) en suelos, se basa en la generación de átomos en el estado basal y en la medición de la cantidad de energía absorbida por estos, la cual es directamente proporcional a la concentración de ese elemento en la muestra analizada.

Concentración extractable de EPT

Se pesaron 5 g de residuo de mina y 0.5 g de biochar, a los cuales se adicionaron 20 mL de solución de DTPA (DTPA 0.005 M, $CaCl_2$ 0.01 M, trietanolamina 0.1 M con pH 7.3) (Lindsay y Norvell, 1978). Las muestras se colocaron en tubos de alta densidad con tapa. Estas se agitaron por 2 h a 120 opm, posteriormente se centrifugaron por 10

minutos a 2,500 rpm y se filtraron en papel Whatman #42. La concentración extractable de EPT se determinó por (EAA). Los procedimientos analíticos tendientes para evaluar la disponibilidad de EPT, se asocian a su capacidad de disolver o extraer alguna forma química del elemento presente en el suelo. La eficiencia de la extracción dependerá de la capacidad de cada solución para poder recuperar parte de aquellas formas de metales presentes en el suelo, las cuales generalmente se asocian a la cantidad de elemento que es absorbido por los cultivos.

Fósforo disponible

Del residuo de mina y los tipos de biochar se pesaron 2.5 g y se colocaron en vasos de plástico a los que se agregó 50 mL de solución extractora Olsen (ver preparación en anexo A) y un pizca de carbón activado. Los vasos se dejaron en agitación por 30 minutos a 180 rpm. Después, las muestras se filtraron con papel Whatman #40. Del extracto obtenido se tomó una alícuota de 2 mL, al cual se le agregó 5 mL de agua desionizada, 2 mL de molibdato $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y 1 mL de cloruro estañoso $(\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O})$. Cada muestra se agitó en vórtex y se dejó reposar por 15 minutos. Posteriormente se leyó la absorbancia a una longitud de 660nm en un espectrofotómetro de UV-visible (Varian, CARY 50 CONC). Se utilizó un curva de calibración elaborada a partir de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) , con una concentración de 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 mg kg^{-1} de fósforo.

Las formas de fosforo fácilmente soluble en el extracto son determinados colorimétricamente con el método de azul de molibdato de amonio $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. El pH elevado de la solución extractora hace que el método sea apropiado para suelos

con pH alcalino o neutro que contiene fosfatos de Ca, debido a que la concentración de Ca en la solución es contrarrestada por la precipitación del carbonato de calcio (CaCO_3). Como resultado, la concentración de fosfatos en la solución se puede incrementar. (Olsen, 1954).

Capacidad de intercambio catiónico (CIC)

Se pesó 1 g de cada biochar y 5 g de residuo minero. Las muestras se colocaron en una jeringa con capacidad de 60 mL, después se colocaron en un equipo de extracción al vacío (Centurión modelo U123CX). Las muestras se lavaron dos veces con 50 mL de acetato de amonio ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$, 1N, pH 7), el extracto se recuperó para determinar las bases intercambiables (el extracto se aforó a un volumen de 100 mL). Del extracto se cuantificó Ca y Mg por EAA a una longitud de onda de 423 y 285 respectivamente. La determinación de Na y K se realizó por espectrofotometría de emisión de flama.

Para obtener la CIC se continuó con dos lavados de cloruro de amonio (NH_4Cl) 0.25 N, pH 7, el sobrenadante se desechó. Posteriormente, se realizaron tres lavados con alcohol (70%), en donde el sobrenadante también se desechó. Finalmente se realizaron dos lavados de cloruro de sodio (NaCl) 10%. El extracto de este último lavado se recibió en matraces los cuales se aforaron a un volumen de 100 mL con la misma solución. Para determinar la CIC total se tomó una alícuota de 50 mL del extracto con cloruro de sodio (NaCl). La muestra se transfirió a un matraz kjeldhal de 300 mL, al que se le agregó 20 mL de hidróxido de sodio (NaOH) 40% para iniciar su destilización. El producto de la destilación se recibió en un matraz Erlenmeyer (capacidad 150 mL), en el cual previamente se agregó 10 mL de ácido bórico (H_3BO_3) y una pizca de sosa. La

destilación se paró cuando se obtuvo una muestra de 75 mL. La determinación se realizó por titulación con ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0.1 N.

El principio metodológico se basa en que a partir de la muestra percolada con acetato de amonio se puede medir las bases intercambiables. Posteriormente, la muestra se percola con acetato de sodio intercambiable. El amonio desplazado por el sodio en este percolado es una medida de la CIC (Chapman, 1965).

Nitrógeno total

Del residuo de mina y los distintos biochar se pesó 1 g cada muestra se depositó en un tubo de digestión Pyrex a los que se agregó 4 mL de una mezcla de ácido sulfúrico-salicílico (Anexo 2) y una pizca de mezcla digestora (Anexo 3). Las muestras se dejaron en predigestión durante 12 h. Posteriormente se calentaron a una temperatura constante de 150°C hasta obtener que la muestra se tornó claro. Al término de la digestión las muestras se dejaron enfriar, para continuar, a cada tubo se le agregó 10 mL de agua desionizada mientras se agitaban suavemente. La solución se vertió en un matraz microkjeldahl de destilación el cuál contenía 15 mL de una solución de óxido de sodio (NaOH) 38% y se procedió a realizar la destilación. La muestra se recibió en un matraz Erlenmeyer (capacidad 125 mL) que contenía 10 mL de ácido bórico (H_3BO_3) 1%, unas gotas de verde de bromocresol y rojo de metilo. Las muestras se titularon con ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0.008 N. El contenido de nitrógeno total se calculó con la siguiente formula:

$$\%N = (P-T)*N*14/(m*10)$$

Dónde:

P= mL de ácido sulfúrico gastado en la titulación de la muestra

T= mL de ácido sulfúrico gastado en la titulación del testigo

N= normalidad del ácido sulfúrico (H_2SO_4)

m= peso de la muestra

El principio metodológico dice que la muestra se digesta en ácido sulfúrico, con ello el nitrógeno se convierten en sulfato de amonio. La solución se alcaliniza y se destila el amonio. El amonio producido es atrapado en ácido bórico y titulado con ácido sulfúrico (H_2SO_4).

Materia orgánica (M.O.)

Se pesaron 0.5 g de residuo de mina y los diferentes biochar tamizados por una malla de 0.5 mm. Las muestras se colocaron en un matraz Erlenmeyer (500 mL) y se les adicionó 5 mL de dicromato de potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 1 N), las muestras se agitaron cuidadosamente por un minuto. Posteriormente se les agregó 10 ml de ác. sulfúrico (H_2SO_4) concentrado, nuevamente se agitaron por un minuto y se dejaron reposar por 30 minutos. A continuación se agregaron 200 mL de agua destilada, 10 ml de ácido ortofosfórico (H_3PO_4) concentrado y 5 gotas de difenilamina. El contenido de M.O. se determinó por titulación con sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0.5 N.

La determinación de la materia orgánica del suelo se evalúa a través del contenido de carbono orgánico. Este método se basa en la oxidación del carbono orgánico del suelo por una solución de dicromato de potasio y el calor de la reacción que se genera al mezclarla con ácido sulfúrico concentrado. Después, la mezcla se diluye, se adiciona ácido fosfórico para evitar interferencias con el Fe^{3+} y el dicromato de potasio residual es valorado con sulfato ferroso. Con este procedimiento se detecta entre un 70% y 84%

del carbón orgánico total por lo que es necesario introducir un factor de corrección, el cual puede variar de suelo a suelo. (Walkley y Black, 1934).

Capacidad de campo (CC)

Se pesó 50 g de muestra y se colocó en un embudo con papel filtro #40. Esta se saturó con agua destilada, una vez húmeda se cubrió con papel parafilm para evitar que se secase y se dejó reposando por 24 h para drenar el exceso de humedad, posteriormente, se tomó nota del peso húmedo y después se colocó en una estufa a 105°C por 24 h. Por último se registró nuevamente el peso final. El cálculo se hizo de la siguiente manera:

$$CC = (psh - pss / pss)(100)$$

Dónde:

CC = capacidad de campo

psh = peso de suelo húmedo

pss = peso de suelo seco

El método se basa en la determinación de la cantidad de agua expresada en gramos que contiene la muestra de suelo. La determinación de la masa de agua se realiza por la diferencia en peso entre la masa del suelo húmedo y la masa del suelo seco.

Color

El color se determinó en seco y en húmedo. Para ello se utilizó una tablilla de porcelana. En cada hueco se colocaron aproximadamente 2 g de muestra y se identificó el color en seco con una carta de colores Munsell. Posteriormente, las muestras se humedecieron con agua destilada sin alcanzar su punto de saturación. Nuevamente se utilizó la carta Munsell y se registró el color en húmedo. La determinación se basa en el igualamiento de color

observado en el suelo tanto en seco como en húmedo respecto al color registrado en las tarjetas de color. Estas se ubican en cada una de las páginas de la carta de colores Munsell, donde se manejan los parámetros de matiz (Hue), brillo (Value) e intensidad (Chroma).

Textura

Se pesaron 50 g de muestra y se colocan en un vaso para mezclarlo mecánicamente (Hamilton beach 60111) con 100 mL de hexametáfosfato de sodio ((NaPO₃)₆) 1 N. La mezcla se dejó reposar 10 minutos, se continuó con la adición de 750 mL de agua destilada y se dejó mezclando nuevamente por 15 min. Posteriormente, el contenido se pasó a una probeta de 1000 mL y se ajustó el volumen a 950 mL. La muestra se agitó con una varilla de aluminio por 1 minuto, se tomó la temperatura y se tomó la primera lectura con el densímetro (Boyocus). Después, la muestra se dejó reposando por 2 h, al término de este tiempo se tomó nuevamente la temperatura y la lectura del densímetro. Los cálculos se realizaron de la siguiente manera:

$$\text{Arena (\%)} = 100 - (1^{\text{er}} \text{lectura} * 2)$$

$$\text{Arcilla (\%)} = (2^{\text{da}} \text{lectura} * 2)$$

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

Este método es básicamente la medición de la densidad de la suspensión, la cual está en función de la concentración (después de un cierto tiempo de sedimentación) y clase de las partículas presentes. Después de agitar con el agente dispersante, la arena se separa de la arcilla y el limo. Estas fracciones se determinan por las lecturas con el densímetro.

Densidad aparente

Se pesaron 300 g de residuo minero y 30 g de cada muestra de biochar. La muestra se colocó en una probeta con capacidad de 250 mL. La probeta se golpeó verticalmente

tres veces contra una mesa, tomando nota del desplazamiento del volumen antes y después de los golpes (Ansorena, 1994). La densidad aparente se calcula con la siguiente ecuación:

$$\text{Densidad aparente (Da)} = \text{peso del sustrato} / \text{Volumen que ocupan las partículas}$$

La densidad aparente de una muestra de suelo es calculada a partir del conocimiento de dos parámetros: la masa del suelo y el volumen total, es decir el volumen de los sólidos y el volumen ocupado por el espacio poroso.

Análisis de infrarrojo

El residuo de mina y los diferentes biochar se molieron en un mortero hasta obtener partículas finas. Posteriormente se realizó un barrido de 4000 a 600 cm^{-1} en un espectrofotómetro de infrarrojo de transformadas de Fourier, para la identificación de posibles grupos funcionales que intervienen en la movilización de EPT.

La espectroscopia de infrarrojo se basa en la interacción electromagnética y las moléculas. Dependiendo de la región del espectro en la que se trabaje y por tanto de la energía de la radiación utilizada (caracterizada por su longitud de onda), esta interacción será de diferente naturaleza: excitación de electrones, vibraciones moleculares y rotaciones moleculares. La molécula al absorber la radiación infrarroja, cambia su estado de energía vibracional y rotacional. Cada vibración viene representada por una curva de energía potencial diferente y da lugar una banda fundamental y sus correspondientes sobretonos en el infrarrojo. Los modos de vibración que se pueden producir incluyen: cambios en la distancia del enlace (elongaciones que pueden ser simétricas o asimétricas) y cambios en el ángulo de enlace.

Etapa II. Análisis de la estabilización de EPT por biochar de diferente procedencia

Esta segunda etapa evaluó la capacidad de adsorción de EPT por tres tipos de biochar elaborados a partir de bagazo de caña, aserrín de pino y rastrojo grueso de maíz, variando las proporciones entre residuos de mina y el biochar. En esta etapa se realizaron dos experimentos: a) el primero fue una prueba de equilibrio (14 h) para seleccionar el biochar y el porcentaje adecuado para estabilizar los diferentes EPT bajo estudio (Cd, Cu, Pb y Zn). b) Mientras que el segundo experimento consistió en una prueba de incubación (6 semanas) para corroborar la selección del biochar y el porcentaje de este a utilizar. Los materiales y métodos se describen a continuación:

a) Pruebas de equilibrio

Concentración extractable de EPT con $Ca(NO_3)_2$

Se pesaron 5 g de residuo de mina y su equivalente en 1, 5, 10, 15 y 20% de biochar. Cada una de las muestras (mezcla de residuos de mina y biochar) se colocó en tubos de plástico de alta densidad. A cada tubo se le adicionaron 25 mL de nitrato de calcio [$Ca(NO_3)_2$] 0.01 M como solución electrolítica base. Las muestras se agitaron por 16 h a 100 opm; posteriormente se centrifugaron por 10 minutos a 2,500 rpm y se filtraron en papel Whatman #42. En el extracto obtenido se evaluó la concentración de Cu, Cd, Pb y Zn por EAA.

b) Cinética de estabilización

Este experimento evaluó la estabilización de EPT a través del tiempo, con el propósito de registrar el periodo necesario de incubación para que ocurra la estabilización de EPT.

Preparación de unidades para incubación

Se prepararon macetas de plástico con 50 g de residuo minero y el equivalente al 5 y 10 % de cada biochar. Las macetas se humedecieron con 15 mL de agua desionizada y se dejaron incubar a temperatura ambiente durante seis semanas. Durante la incubación se realizaron evaluaciones semanales de la concentración extractable de Cd, Cu, Pb y Zn con DTPA. La concentración de EPT extractables se realizó de acuerdo al procedimiento descrito anteriormente.

Etapa III. Capacidad fitoestabilizadora de *J. curcas* inoculada con *Acaulospora* sp. en residuos de mina enmendados con biochar

En la tercera etapa se empleó *J. curcas* inoculada con *Acaulospora* sp. en residuos de mina enmendado con biochar de maíz (5%) para evaluar la capacidad de estos factores en forma independiente o como grupo para estabilizar Cu, Cd, Pb y Zn. Los materiales y métodos para esta etapa se describen a continuación.

Preparación, estabilización y caracterización fisicoquímica de la muestra de residuo de mina y biochar

Preparación de la mezcla

Con base en los resultados anteriores se seleccionó al biochar de maíz como enmienda en esta etapa. Se preparó una mezcla de residuo de mina y el peso equivalente a 5% de biochar. Lo anterior, sirvió para medir la capacidad de fitoestabilización de *J. curcas* en presencia y ausencia de *Acaulospora* sp. Como tratamiento testigo se utilizó residuo de mina sin aplicación de enmienda.

Estabilización de la mezcla

La mezcla se colocó extendida en una mesa de 2X2 m y se humedeció hasta 80% de CC para la estabilización de los EPT. Se incubó por ocho semanas permitiendo ciclos de secado y humedecimiento para la estabilización de EPT por medio de las reacciones de sorción en la superficie coloidal y precipitación.

Caracterización fisicoquímica de la mezcla

La caracterización fisicoquímica del residuo de mina enmendado con biochar consistió en la determinación de las siguientes variables: pH, CE, concentración total y extractable de EPT, fósforo Olsen, CIC, nitrógeno total, MO, retención de humedad, color, textura, densidad aparente y se obtuvo el espectro de análisis en infrarrojo. Las técnicas que se emplearon se describieron anteriormente en apartados previos de la etapa 1 y 2.

Producción y calidad del inóculo micorrízico

Se muestrearon raíces finas de plantas de *Crotalaria pumila* naturalmente establecida en una zona de mina en Zimapán, Hidalgo. La rizosfera de esta planta presentó altas concentraciones de EPT. Una muestra de raíces se llevó al laboratorio de Microbiología Ambiental del Colegio de Postgraduados para procesarla. Las raíces se lavaron con agua corriente y se cortaron en pequeños trozos (1 cm), los cuales se mezclaron con arena estéril para su propagación y se utilizó como planta trampa vaporup (*Plectranthus coleoides* Benth). Posteriormente se preparó un cultivo puro; el cual consistió en seleccionar esporas amarillentas de color uniforme para ser propagadas primero en la rizosfera de lechuga (*Lactuca sativa* L.), luego en cempasúchil enano (*Tagetes* sp. L.), frijol negro (*Phaseolus vulgaris* L.) y finalmente sorgo (*Sorghum vulgare* L.). El cultivo puro aislado fue la especie fúngica *Acaulospora* sp. (Gútu Borraz, 2013), la misma que se utilizó en la inoculación de *J. curcas*. La calidad del inóculo se comprobó

considerando el número de esporas y el porcentaje de colonización de las raíces de sorgo. En todas las etapas, desde el aislamiento y la obtención del cultivo puro, se prepararon macetas con plantas sin inocular, las cuales funcionaron como inóculo testigo para el siguiente experimento.

Número de esporas

La separación de esporas se realizó por el método de tamizado y decantación en húmedo (Gerdemann y Nicolson, 1963). Se pesó 100 g de la mezcla de arena donde se propagó *Acaulospora* sp. proveniente de Zimapán, Hgo. La muestra se colocó en un recipiente y se le agregó 2 L de agua de la llave, posteriormente se agitó vigorosamente por un minuto. Las muestras se pasaron por dos tamices continuos con apertura de 600 y 44 μm respectivamente. La muestra recuperada en el tamiz con menor apertura (44 μm) se transfirió a una caja de Petri para realizar el conteo de esporas. Las raíces recuperadas en el tamiz de 600 μm se colocaron en un frasco de vidrio para evaluar su colonización micorrízica. No se detectaron esporas en esta fracción del tamiz. Los sustratos de las plantas testigo no presentaron esporas.

Evaluación de la colonización fúngica radical

Clareo y tinción de raíces. El clareo y tinción de raíces se realizó de acuerdo al método de clareo y tinción de Phillips y Hayman (1970). A cada una de las muestras de raíces recuperadas en el procedimiento anterior se le agregó 10 mL de hidróxido de potasio (KOH) 10% y se dejaron en reposo por 18 h. Las raíces se lavaron con abundante agua corriente; se les agregó 10 mL agua oxigenada (H_2O_2) 3% por 10 minutos, para después continuar con un lavado de agua corriente. Posteriormente se les agregó ácido clorhídrico (HCl) 10% dejándolas reposar por cinco minutos; el exceso de ácido

clorhídrico se desechó y se agregó azul de tripano (0.05% en glicerol a 50%). El exceso de colorante se retiró enjuagando las raíces con glicerol al 50%.

Estimación de la frecuencia de la colonización. De las raíces teñidas se tomaron segmentos para montarlos en porta-objetos, se adicionaron unas gotas de glicerol (50%). Se les colocó un cubre-objetos y se observaron en un microscopio (Leica DM LB2) a un aumento de 40x. El porcentaje de frecuencia se obtuvo de la relación de segmentos colonizados con respecto al total de segmentos analizados. Las raíces testigo no presentaron colonización micorrízica.

Los diferentes componentes de la asociación micorrízica pueden examinarse por separado. Ya que una parte del hábitat del hongo son las raíces, al examinarlas se puede determinar si las plantas presentan o no asociación micorrízica arbuscular. Debido a que estos hongos modifican la morfología radical, es fundamental someterlas a procesos que revelen las estructuras fúngicas presentes en su interior. El primer paso consiste en exponer a las raíces a agentes químicos para eliminar los contenidos celulares y pigmentos de la pared. Una vez que se logra aclarar las raíces, se puede visualizar las estructuras fúngicas en los tejidos vegetales. Esto se logra a través del uso de colorantes específicos, que tienen afinidad con los componentes de las paredes fúngicas y no con las del hospedero vegetal. Una vez detectada la presencia del hongo en la raíz pueden hacerse diferentes estimaciones.

Establecimiento del experimento

Germinación e inoculación de semillas de J. curcas

Del inóculo de *Acaulospora* sp. se pesaron 10 porciones de la arena (50 g) en bolsas de plástico calibre 200 (12x8 cm) conteniendo en promedio 24 esporas y segmentos radicales colonizados en 67%. Además, se pesaron porciones de arena sin inóculo para

las plantas no micorrizadas. Las semillas de *J. curcas* se limpiaron superficialmente tallándolas con una gasa y alcohol a 70%. Enseguida se enjuagaron cuatro veces con agua destilada estéril. Se colocaron en las bolsitas de plástico que contenían la arena con el inóculo micorrízico (*Acaulospora* sp.) y la arena testigo (en el caso de los tratamiento no inoculados). Estas se mantuvieron a 30 °C durante el día y 19°C por la noche, con 50% de humedad hasta su siembra.

Trasplante de semillas en mezcla estabilizada

Previo a la siembra de las semillas de *J. curcas* se prepararon bolsas de plástico negro de alta densidad, con una altura de 35 cm y ancho de 15 cm, a cada una se les agregó 3.25 kg de residuo de mina estabilizado con biochar. Cuando las semillas germinaron, se sembraron en las bolsas, estas se mantuvieron en invernadero a 50% de CC. La duración del experimento fue de 90 días. El crecimiento de las plantas se evaluó bajo los siguientes tratamientos:

Residuo de mina

Residuo de mina + biochar

Residuo de mina + *Acaulospora* sp.

Residuo de mina + biochar + *Acaulospora* sp.

Después de la siembra las bolsas se regaron cada tres días con agua destilada hasta la cosecha de las plantas, manteniéndolas a una temperatura de 30°C. Las bolsas se cambiaron de lugar de manera aleatoria cada semana para evitar que las condiciones de luz afectaran el desarrollo de la planta.

Diseño experimental y análisis estadístico

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar, con cuatro tratamientos y cinco repeticiones. Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) y una prueba de

Tukey ($\alpha=0.05$). El análisis estadístico se llevó a cabo con el programa Statistical Analysis System (SAS) versión 9.0.

Evaluación del experimento

Cinética de crecimiento

La altura de las plantas se registró cada 15 días a partir del desarrollo completo de las hojas cotiledonales, desde el cuello de la raíz hasta el primer par de hojas verdaderas. Además, se registró el número de hojas. La cantidad de clorofila relativa en las hojas se determinó 30 días después la germinación de las semillas.

Supervivencia de las plantas

Después de 90 días se contaron las plantas vivas y se calculó el porcentaje de supervivencia. Las plantas se cosecharon para medir la altura de las plantas, número de hojas verdaderas y área foliar.

El área foliar se determinó con un medidor de área foliar (Li-Cor, modelo LI-3000A). Esto se hizo pasando las hojas verdaderas por el escáner del equipo para determinar la suma total del área de las hojas.

Biomasa seca parte aérea y raíz de J. curcas

Las plantas se lavaron con agua desionizada y enseguida se colocaron en una estufa a 65°C por 72 h. Una vez secas se pesaron, el peso se registró como biomasa.

Cuantificación de clorofila en hojas de J. curcas

Esta determinación se realizó de acuerdo a Bruuinsma (1963). Al momento de la cosecha se pesó 1 g de tejido foliar fresco que se colocó en frascos ámbar de 25 mL a los cuales se le adicionó 10 mL de acetona a 80%. Las muestras se refrigeraron y dejaron en reposo 24 h en la oscuridad. Cada muestra se trituró en un mortero, enseguida se filtró con un embudo y algodón humedecido con acetona (80%). La

muestra recuperada de aforó a 25 mL y se leyó la absorbancia a 645, 652 y 663 nm en espectrofotómetro de UV visible. La cantidad de clorofila *a*, *b* y *total* se obtuvo de las siguientes expresiones, las cuales se fundamentan en la ley de Lambert-Beer.

$$Ca \text{ (mg L}^{-1}\text{)} = 12.7 A_{663} - 2.7 A_{645}$$

$$Cb \text{ (mg L}^{-1}\text{)} = 22.9 A_{645} - 4.7 A_{663}$$

$$Ca + Cb \text{ (mg L}^{-1}\text{)} = 27.8 A_{652}$$

En donde A es el valor de la absorbancia determinado a las diferentes longitudes de onda.

Concentración de EPT en parte aérea y raíz de J. curcas

La determinación se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Batey (1974). Se tomaron 0.5 g de la muestra molida en molino de acero inoxidable y tamizada por una malla No. 40, a la cual se le agregó 1 mL de agua oxigenada (H₂O₂) y 4 mL de una mezcla de ácidos sulfúrico y perclórico (HClO₄: H₂SO₄) relación 1:4, se dejó predigerir y después se digirieron a 200 °C. Una vez terminada la digestión las muestras se aforaron a 25 mL con agua desionizada y se filtraron con papel Wathman No. 42. La concentración de EPT se determinó por EAA.

El fundamento se basa en la generación de átomos en estado basal y en la medición de energía absorbida por éstos, la cual es directamente proporcional a la concentración de la muestra analizada.

Colonización fúngica en raíces de J. curcas

El clareo y tinción de raíces se realizó de acuerdo a la técnica descrita en el apartado anterior.

Con base en los resultados de la etapa anterior (Etapa 2), se determinó que la aplicación de 5% de biochar de maíz contribuyó a la disminución de las concentraciones de EPT

extractables en el residuo de mina. En esta última etapa, se preparó una mezcla del residuo de mina más el equivalente a 5% de biochar de maíz en relación m/m . Esta mezcla se dejó incubar por un periodo de ocho semanas con el propósito estabilizar los EPT presentes.

Resultados y discusión

Etapa I. Caracterización del residuo de mina y los diferentes biochar

La caracterización química de los diferentes materiales se presenta en el Cuadro 1. Los distintos biochar presentan propiedades químicas diferentes. Esto se debe a que los materiales para su elaboración son de diferente composición química y a las condiciones en las que se llevó a cabo la pirolisis (disponibilidad de oxígeno, tiempo y temperatura) (He et al., 2000; Lehmann, 2007; Zhang et al., 2009; Cantrell et al., 2012). Se observa que el residuo de mina es ligeramente ácido. Los biochar tienen valores de pH que varían de 7-9.5, el biochar de maíz tiene pH fuertemente alcalino. Esto concuerda con otros autores quienes obtuvieron valores de pH de 9.4 en biochars elaborados a partir del mismo material (Lehmann et al., 2011; Mahimairaja et al., 2005). Los biochar de caña y pino muestran valores alcalinos (clasificación de acuerdo a Jones y Wolf, 1984). De acuerdo con Jia et al., (2013) el pH del biochar se relaciona con cantidad de ácidos orgánicos y fenólicos derivados de la descomposición térmica de la celulosa y hemicelulosa. Los valores de pH obtenidos en los diferentes biochar sugieren que pueden tener un efecto parecido al encalado en el residuo de mina.

Por otra parte, los valores de conductividad eléctrica de todos los materiales variaron de 0.05 – 2.1 $dS\ m^{-1}$. De acuerdo con la clasificación de Brady y Weil (2008) no existe riesgo de que ocurran problemas de salinidad, por el empleo de los biochar como

enmienda ya que los niveles son bajos. La concentración de fósforo en el residuo de mina fue bajo ($3 \pm 0.12 \text{ mg kg}^{-1}$). En los diferentes biochar varió de 40.5-743 mg kg^{-1} , en donde el biochar de maíz presentó la concentración más alta. La concentración alta en el biochar de maíz y caña puede deberse a que son cultivos de interés comercial, así que es usual emplear productos ricos en fosfatos para su fertilización. Castellanos et al., (2000) y Wang et al., (2013) proponen que los biochar con alta concentración de fósforo pueden emplearse como fertilizantes de liberación lenta, resaltando la necesidad de establecer correctamente la dosis, frecuencia y el tiempo de aplicación.

El porcentaje de nitrógeno en el biochar varió entre 0.7-0.8%, los valores coinciden con un reporte de Mahimairaja et al., (2005), el cual reportó valores de 0.9% para un biochar de maíz. El residuo de mina tuvo un porcentaje de 0.0011 ± 0.0002 el cual se puede clasificar como extremadamente pobre, mientras que los biochar se clasificaron como muy rico. El porcentaje de materia orgánica en los diferentes biochar va de 1.92-1.83, en donde el biochar de maíz presentó el valor más alto (1.92). De acuerdo con Velazco (1983), Por su contenido de materia orgánica el biochar se clasifica con contenido medio. En contraste el porcentaje en el residuo de mina fue de 0.2 ± 0.002 el cual se clasifica como muy pobre.

La CIC en el residuo de mina fue baja ($5 \text{ cmol}_+ \text{ kg}^{-1}$), mientras que en los biochar se ubicó en un intervalo de 7-22.7 $\text{cmol}_+ \text{ kg}^{-1}$, en donde el biochar de maíz obtuvo el valor más alto. Este valor es superior comparado con el obtenido por Shenbagavalli y Mahimairaja (2012) quienes reportaron un valor de $6.5 \text{ cmol}_+ \text{ kg}^{-1}$, para un biochar derivado de maíz. Kookana et al., (2011) señalaron que esta propiedad aumenta con el envejecimiento del biochar, por lo que es posible esperar un aumento en los valores de biochar de caña y pino a través del tiempo.

Los resultados de la concentración de EPT totales de los diferentes materiales se presentan en el Cuadro 2. El residuo de mina presentó una concentración alta de EPT total, de acuerdo con la los límites permisibles EPA (2006) para suelos agrícolas las concentraciones de Pb, Cd y Cu rebasan los límites permisibles (400, 8 y 426 mg kg⁻¹, respectivamente). Mientras que las concentraciones de estos elementos en los diferentes biochar están por debajo de los límites máximos que se mencionaron. La presencia de una elevada concentración total de Fe en todos los materiales puede ser una ventaja a largo plazo ya que al oxidarse puede adsorber EPT y así contribuir a su estabilización. En general los EPT presentes en los residuos son un constante riesgo ya que existe la posibilidad de que estos se dispersen o lixivien. Además, se realza la necesidad de hacer buen manejo del residuo de mina, pues de aplicarse una enmienda que contribuya a la solubilización de EPT, el problema podría agravarse.

Cuadro 1. Caracterización química del residuo de mina y los diferentes biochar.

ID	pH	C.E (dSm ⁻¹)	CIC	Na	K cmol (+)kg ⁻¹	Ca	Mg	P mg kg ⁻¹	N	M.O. %
Residuo de mina	6.3±0.14	2.11±.01	5.±0.37	0.3±0.06	0.1±0.006	1.8±0.2	0.3±0.04	3±0.12	0.0011±.0002	0.2±0.002
Biochar caña	7.5±0.08	0.14±0.02	2.5±.0.2	1.2±0.006	3.5±0.4	2±0.5	0.7±0.01	743±9.6	0.72±.0.02	1.88±0.15
Biochar maíz	9.5±0.1	0.55±0.02	22.7±0.1	1.2±0.08	18.5±0.4	6±0.3	2.6±0.4	166.5±2.3	0.8±0.05	1.92±0.21
Biochar pino	7±0.3	0.05±0.02	1.4±0.3	2.7±0.18	0.8±0.2	1.7±0.3	0.7±0.08	40.5±0.9	0.78±0.01	1.83±0.11
ND No determinado										

Cuadro 2. Concentración de EPT en el residuo de mina y los diferentes biochar

ID	Cd	Cu	Pb	Zn	Fe
	mg kg ⁻¹				
Residuo de mina	21.6±2.4	1247±85	1400±232	15153±298	39131±3356
Biochar de caña	3.5±1	22±0.9	42±0.8	275±10	1714±187
Biochar de maíz	4.2±0.8	15.6±0.8	51±0.8	138±10	1812±340
Biochar de pino	5±1	17.3±0.6	54±0.5	118±24	1298±199
US EPA, 2006	8	426	400	†	†

† EPT no considerados en la norma; US EPA, 2006

Cuadro 3. Caracterización física del residuo de mina y los diferentes biochar.

ID	Arcilla	Limo	Arenas	CC	DA	Color	
						Húmedo	Seco
		%			g cm^{-3}		
Residuo de mina	15.6	1.4	83	29	1.55	2.5Y 3/2	2.5Y 5/2
Biochar Caña	ND	ND	ND	56	0.43	ND	ND
Biochar Maíz	ND	ND	ND	62	0.32	ND	ND
Biochar Pino	ND	ND	ND	58	0.54	ND	ND

CC=capacidad de campo; DA Densidad aparente; ND = no determinado

El espectro de excitación vibracional de grupos y átomos enlazados covalentemente en los residuos de mina y las muestras de biochar usadas. Es conveniente recordar que las bandas de absorción en la frecuencia de 4000 a 1450 cm^{-1} son visibles debido a la vibración de contracción de unidades diatómicas; mientras que la vibración en la región de los 1450 a 600 cm^{-1} es considerada huella digital.

En la Fig. 2 se presentan los grupos funcionales que se identificaron con espectrofotometría de infrarrojo (IR). Los espectros de los diferentes biochar son cualitativamente diferentes ya que se observa variación en la presencia de ciertos grupos. En el residuo de mina y los diferentes biochar se observó vibraciones de tensión de grupos hidroxilo, los cuales pueden estar ligados a grupos carboxilo. De la misma manera se presentaron picos en 2440 cm^{-1} que pertenecen a vibraciones de tensión de grupos fosfatina y fosfato ($1260\text{-}1230 \text{ cm}^{-1}$). Los picos que se presentan a 1230 cm^{-1}

pertenecen a grupos como fenoles, ésteres y éteres aromáticos, los cuales estuvieron presentes en los biochar de caña, maíz y residuo de mina, pero no en biochar de pino.

En las muestras de biochar se observa vibración en las bandas de Alcoholes, fenoles ($3580-3650\text{ cm}^{-1}$) y de aminas ($3400-3500\text{ cm}^{-1}$), también en la región de ácidos carboxílicos ($3400-2800\text{ cm}^{-1}$).

En la región de huella digital se detectó una vibración de grupos sulfato ($1450-1350\text{ cm}^{-1}$), fosfanatos ($1260-1230\text{ cm}^{-1}$), alcanos ($895-885\text{ cm}^{-1}$); con algunas variaciones dependiendo del tipo de biochar: por ejemplo, en el derivado de maíz y pino hubo vibración en la banda de sulfato-éster ($1260-1230\text{ cm}^{-1}$)

Algunos autores proponen que ciertos grupos funcionales aparecen con el envejecimiento del biochar por ejemplo: carboxilo, fenoles e hidroxilos que están en constante oxidación (Solomon et al., 2002; Cheng et al., 2006; Zimmerman, 2010).

Uchimiya et al., (2010) reportaron que los grupos carboxilo y fosfato presentes en el biochar tienen una función determinante en la estabilización de Pb y Cu. Lo anterior, se debe a que estos grupos aumentan la superficie de reacción, lo cual, contribuye a la estabilización de EPT. También fueron encontradas bandas por debajo de los 600 cm^{-1} producidas por estiramientos vibracionales entre compuestos orgánicos e inorgánicos.

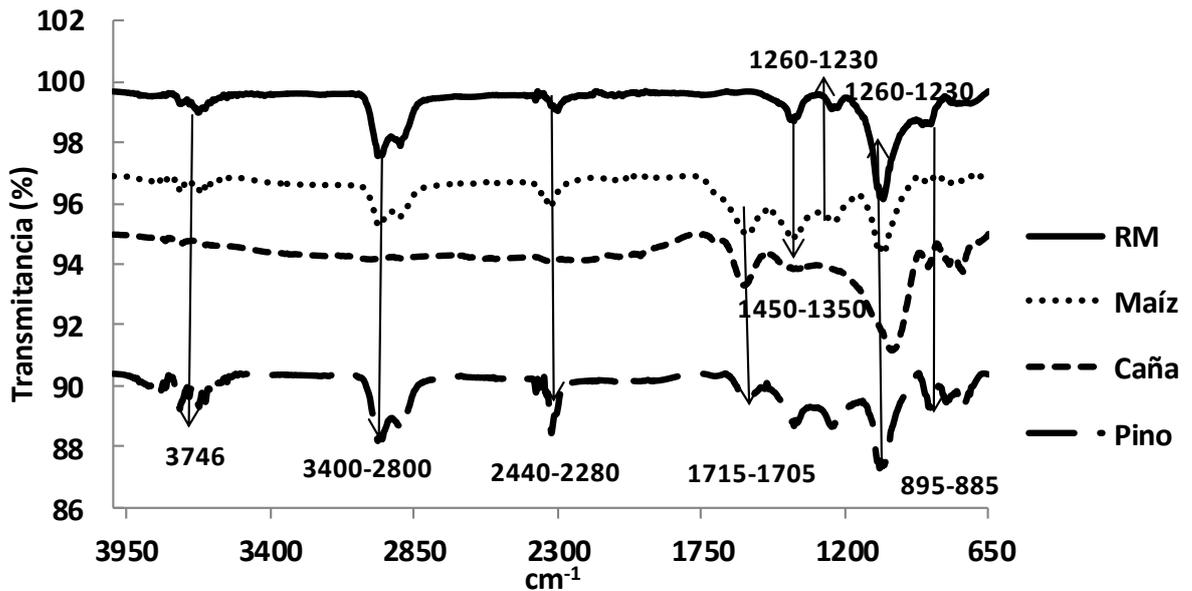


Fig. 2. Espectro de infrarrojo de residuos de mina y los distintos biochar.

Etapa II. Análisis de la estabilización de EPT por biochar de diferente procedencia

a) Pruebas de equilibrio

En general, la estabilización de EPT estuvo influenciada por tipo y porcentaje de biochar que se aplicó (Fig. 3). Lo anterior, produjo cambios importantes en el pH de la mezcla (Fig. 4). Al respecto, se debe tener en cuenta que el aumento del pH induce la estabilización de EPT, ya que favorece su precipitación, disminuye su solubilidad y promueve su adsorción mediante el aumento de la carga negativa sobre los constituyentes del suelo (McBride et al., 1997; Bradl, 2004).

La estabilización de la concentración de Cu extractable ocurrió tras la aplicación de biochar de caña y maíz en proporciones de 1, 5, 10, 15 y 20% (Fig. 3). Estos resultados son consistentes con un trabajo de Jiang et al., (2012). Estos autores reportaron que la aplicación de biochar de arroz en proporciones de 3 y 5% contribuyeron a la estabilización de Cu extractable en residuos de mina, lo anterior, se debió a la formación

de complejos orgánicos-Cu²⁺. Así mismo Chen et al., (2011) reportaron que la aplicación de 1% biochar de maíz disminuye la concentración extractables de Cu, pero no encontraron diferencias significativas al incrementar la dosis de biochar a 5%. En contraste, estos autores reportaron que la aplicación de 1% y 5% de biochar de pino contribuyó a la estabilización de Cu. Estos datos difieren de los resultados del presente trabajo, pues la aplicación de este material en proporciones superiores al 5% contribuyó a la solubilidad de este elemento.

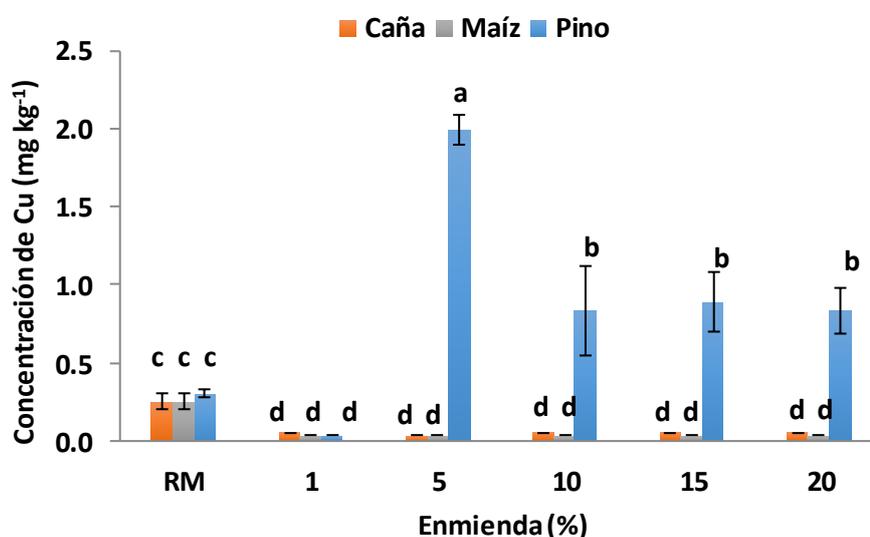


Fig. 3. Variación en la concentración de Cu en residuo de mina (RM) debido a la adición de biochar. Las letras muestran diferencias significativas entre tratamientos según Tukey ($\alpha=0.05$). Las barras indican desviación estándar ($n=3$).

La concentración de Cd disminuyó significativamente con la aplicación de la aplicación de los distintos tratamientos de biochar de maíz (Fig. 4). Sin embargo, el biochar de pino contribuyó a la solubilización de Cd tras aplicarlo en porcentajes de 15 y 20%). Mientras que el efecto del biochar de caña sobre la estabilidad de Cd no fue claro, pues la aplicación de 1 y 10% aumento la concentración extractable de este elemento en comparación con el residuo de mina. El aumento de la movilidad de Cd se puede deber al aumento de la concentración de la materia orgánica disuelta como consecuencia de la

aplicación del biochar. Anju y Banerjee, (2010) reportaron que el Cd puede formar complejos hidrosolubles con óxidos hidratados, los cuales son disueltos en pH alcalinos. Asimismo, Ganne et al., (2006) reportaron que la liberación de Cd ocurrió por la dilución de complejos orgánicos en un rango de pH de 6.5 hasta 7.5 tras el aumento de la materia orgánica.

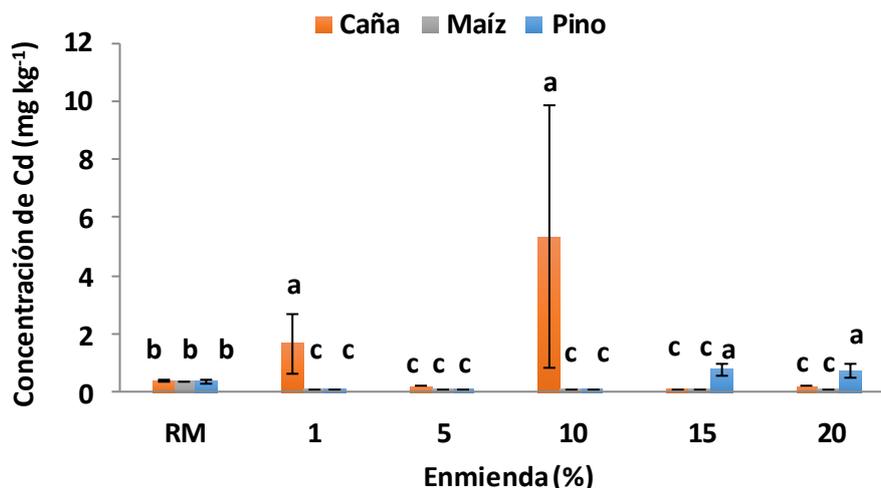


Fig. 4. Variación en la concentración de Cd en residuo de mina (RM) debido a la adición de biochar. Las distintas letras muestran diferencias significativas entre tratamientos según Tukey ($\alpha=0.05$). Las barras indican desviación estándar (n=3).

La concentración de Pb fue estadísticamente menor tras la aplicación de biochar de maíz y pino en porcentajes de 10, 15 y 20% (Fig. 5). Estos resultados concuerdan con Fellet et al., (2014), quienes reportaron que la aplicación de 5 y 10% de biochar de paja de arroz contribuye a la estabilización de Pb. Por su parte, Park et al., (2011) reportaron que la estabilización de Pb ocurre por la liberación de cationes (Na^+ , Ca^{2+} , K^+ y Mg^{2+}) por el biochar. Fellet et al., (2011) encontraron una correlación entre la estabilización de Pb y la cantidad de grupos funcionales de oxígeno en el biochar. Por lo tanto, es posible que uno de estos mecanismos esté implicado en la estabilización de Pb en la mezcla.

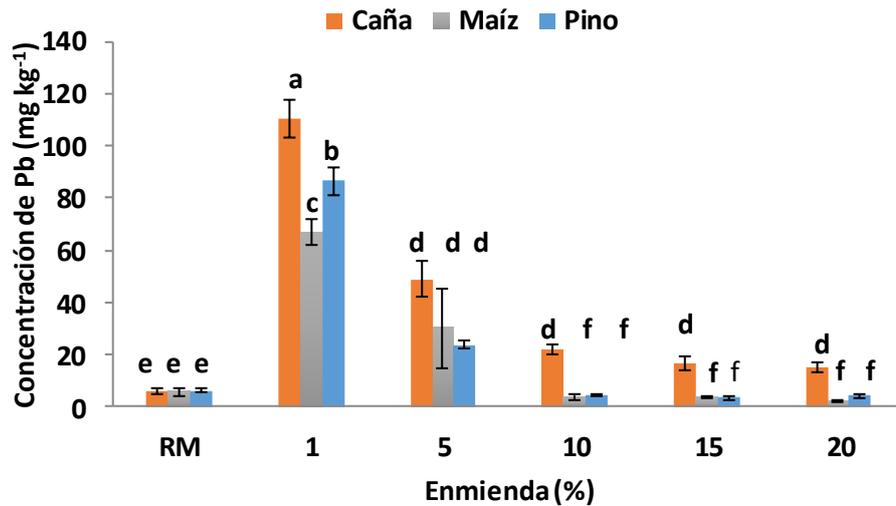


Fig. 5. Variación en la concentración de Pb en residuo de mina (RM) debido a la adición de biochar. Las distintas muestras muestran diferencias significativas entre tratamientos según Tukey ($\alpha=0.05$). Las barras indican desviación estándar ($n=3$).

La concentración extractable de Zn fue estadísticamente menor tras la aplicación de biochar de caña y maíz en porcentajes superiores a 10% (Fig. 6). Otros autores reportaron la relación entre el aumento de la aplicación de biochar y la disminución de las concentraciones extractables de distintos elementos (Fellet et al., 2011; Jiang et al., 2012). Por ejemplo, Houben et al., (2013) reportaron que las concentraciones extractables de Zn se redujo significativamente después de la aplicación de biochar de *Miscanthus giganteus*. Esta reducción fue mayor a medida que se incrementó el porcentaje de biochar (1, 5 y 10%), alcanzando una reducción de 87% de Zn con la aplicación de 10% de biochar. La disminución de Zn se relacionó con el aumento del pH tras la aplicación de biochar, el cual, alcanzó un valor de 6.7 (biochar 10%), mientras que el pH del control fue de 5.6.

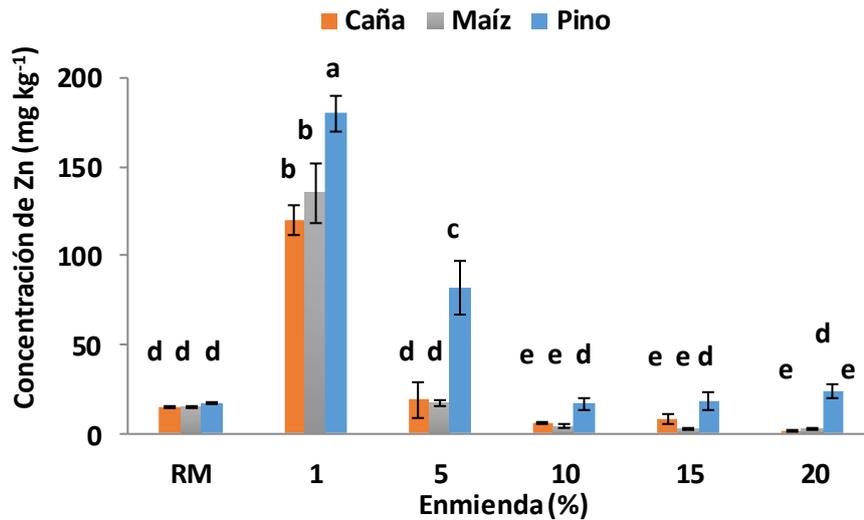


Fig. 6. Variación en la concentración de Zn en residuo de mina (RM) debido a la adición de biochar. Las distintas muestran diferencias significativas entre tratamientos según Tukey ($\alpha=0.05$). Las barras indican desviación estándar ($n=3$).

En este sentido se puede observar en la Fig. 7, que el pH de la mezcla aumentó dos unidades con la aplicación de biochar de maíz en dosis de 5, 10, 15 y 20%, mientras que la aplicación del 1% contribuyó al aumento de una unidad. Estas diferencias de pH pueden explicar porque el biochar de maíz contribuyó de manera eficiente a la estabilización de EPT (Cu, Cd, Pb, y Zn) en el residuo de mina, cuando se aplicó en proporciones mayores a 1% (Fig. 3). Los resultados mostraron que la aplicación de biochar de pino (1, 5, 10, 15 y 20%) contribuyó al aumento de una unidad de pH en el residuo de mina.

El biochar de caña no incremento el pH, incluso la mezcla con 5% este material presentó un valor de pH de 5.1, mientras que el residuo de mina presento un pH de 5.9 (Fig. 7). Sin embargo, este biochar contribuyó a la estabilización de Zn cuando se aplicó en proporciones mayores a 5% (Fig. 6).

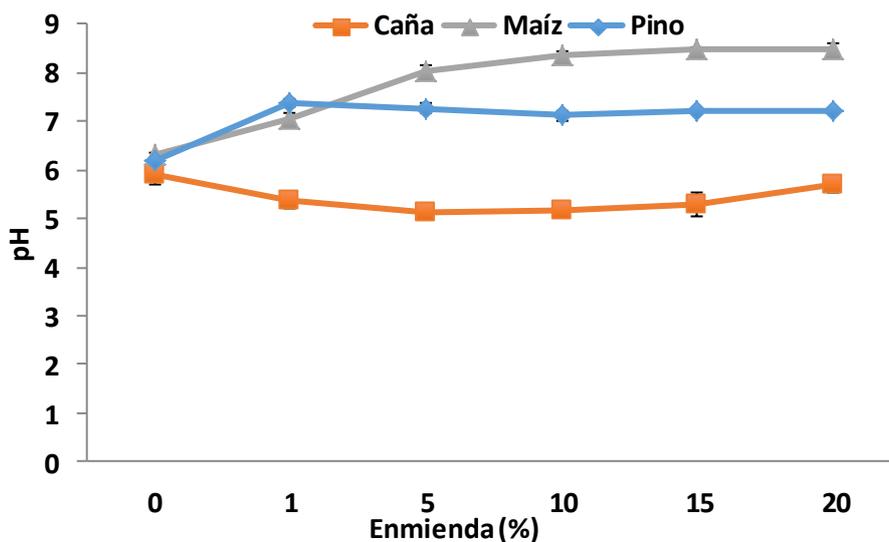


Fig. 7. Cambio en el pH en residuo de mina debido a la aplicación de biochar. Se presenta promedio de n=3.

De manera general, se consideró que el biochar de maíz es la mejor alternativa para promover la estabilización de los EPT que se analizaron, además, mostró menor efecto en la solubilidad de Pb si se compara con el biochar de caña. El biochar de pino tiene desventajas al solubilizar Cd y Cu analizados, aún en dosis bajas (5%) de enmienda. Lo anterior también se observó en Cd, Pb y Zn cuando se aplicaron en dosis de 1 y 5% de biochar de maíz y caña.

b) Cinética de estabilización

Con base a los estudios anteriores, se seleccionaron los tratamientos con 5 y 10% de cada biochar (caña, maíz y pino), para emplearse como enmienda en el residuo de mina. Esta selección se hizo porque aun cuando los tratamientos superiores al 10% podrían dar mejor resultado, se ha reportado que el tiempo es un factor que contribuye a la generación de resultados consistentes. Esto se debe a los cambios en la superficie del

biochar, a lo que algunos autores llaman envejecimiento o maduración (Bruemmer et al., 1988; Ainsworth et al., 1994; Ma et al., 2006). El envejecimiento se refiere al aumento de la adsorción que generalmente se atribuye a mecanismos con tasas de reacción más bajas como la difusión en los microporos o precipitación (Sparks, 2003).

Los resultados que se obtuvieron para Zn muestran que los mejores tratamientos fueron la aplicación de 10% de biochar de maíz y caña (Fig. 8b y 8a), obteniendo una reducción de la concentración extractable de 63 y 61% respectivamente. La aplicación de 5% de biochar de caña disminuyó la concentración de Zn en un 54%, mientras que maíz 5% disminuyó 53%. Todos estos tratamientos muestran diferencias significativas con respecto al residuo de mina sin aplicación de biochar ($\alpha=0.05$) (Cuadro 4). En la Fig. 5c se observa que la aplicación de biochar de pino provocó una solubilización de Zn en las primeras semanas, después de la tercera semana la concentración disminuyó, sin embargo, al final de experimento ningún tratamiento con biochar de pino (5 y 10%) tuvo diferencia significativa con respecto al residuo de mina sin aplicación de biochar (Cuadro 4).

Los cambios en la disponibilidad de Cu bajo diferentes tratamientos con los tres biochar se observa en la Fig. 9. La concentración inicial de este elemento fue de 9.5 mg kg^{-1} . A través del tiempo se observó una disminución de la concentración de Cu, hasta llegar a 5.4 ± 0.2 con la aplicación de biochar de maíz 10% y 6.6 ± 0.4 con la aplicación de biochar de maíz 5% (Fig. 9b). El porcentaje de Cu al final de la incubación mostró una reducción del 39% y 26% respectivamente.

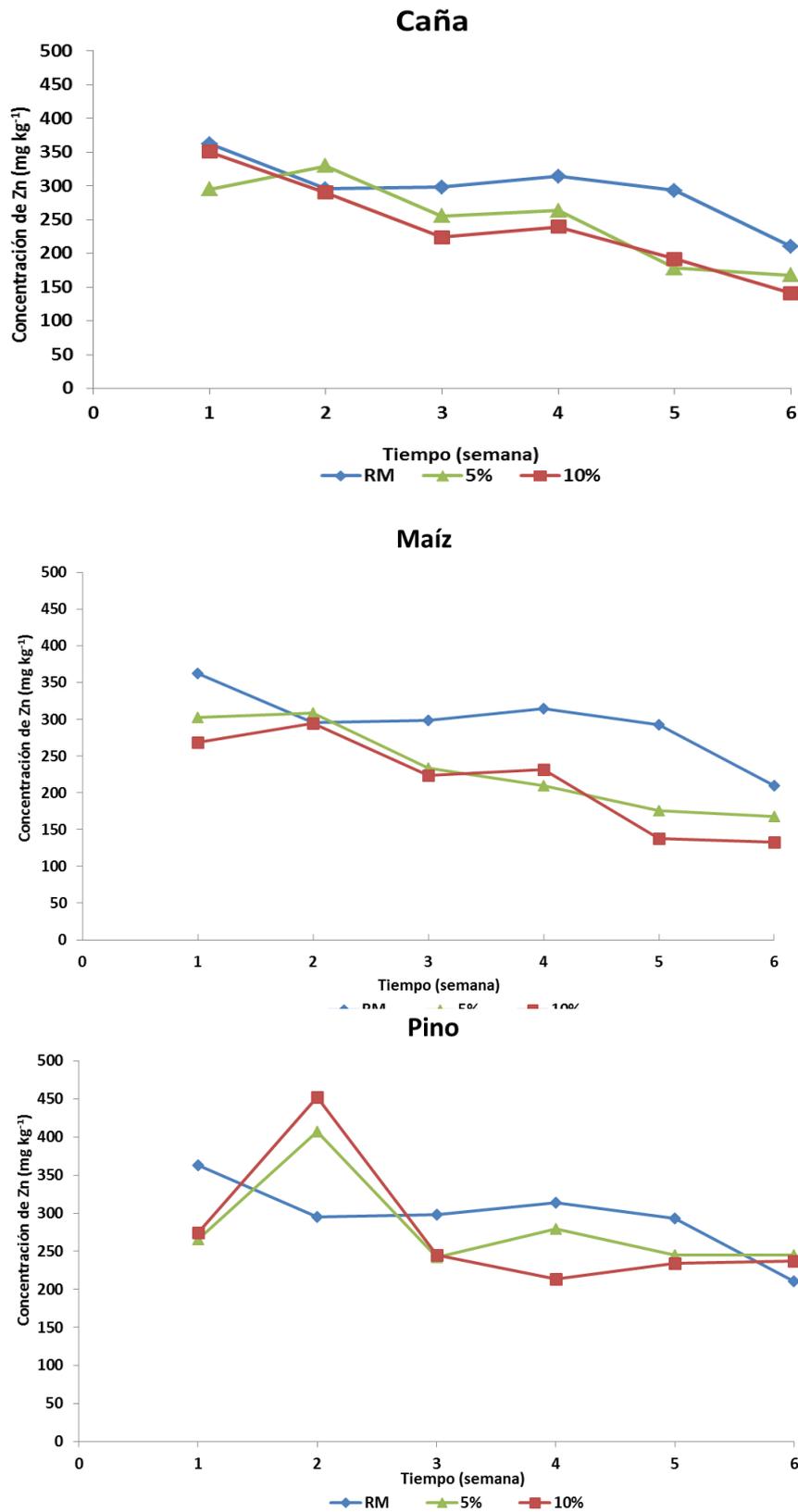


Fig. 8. Disponibilidad de Zn bajo diferentes tratamientos de biochar. Se presenta promedio de n=3

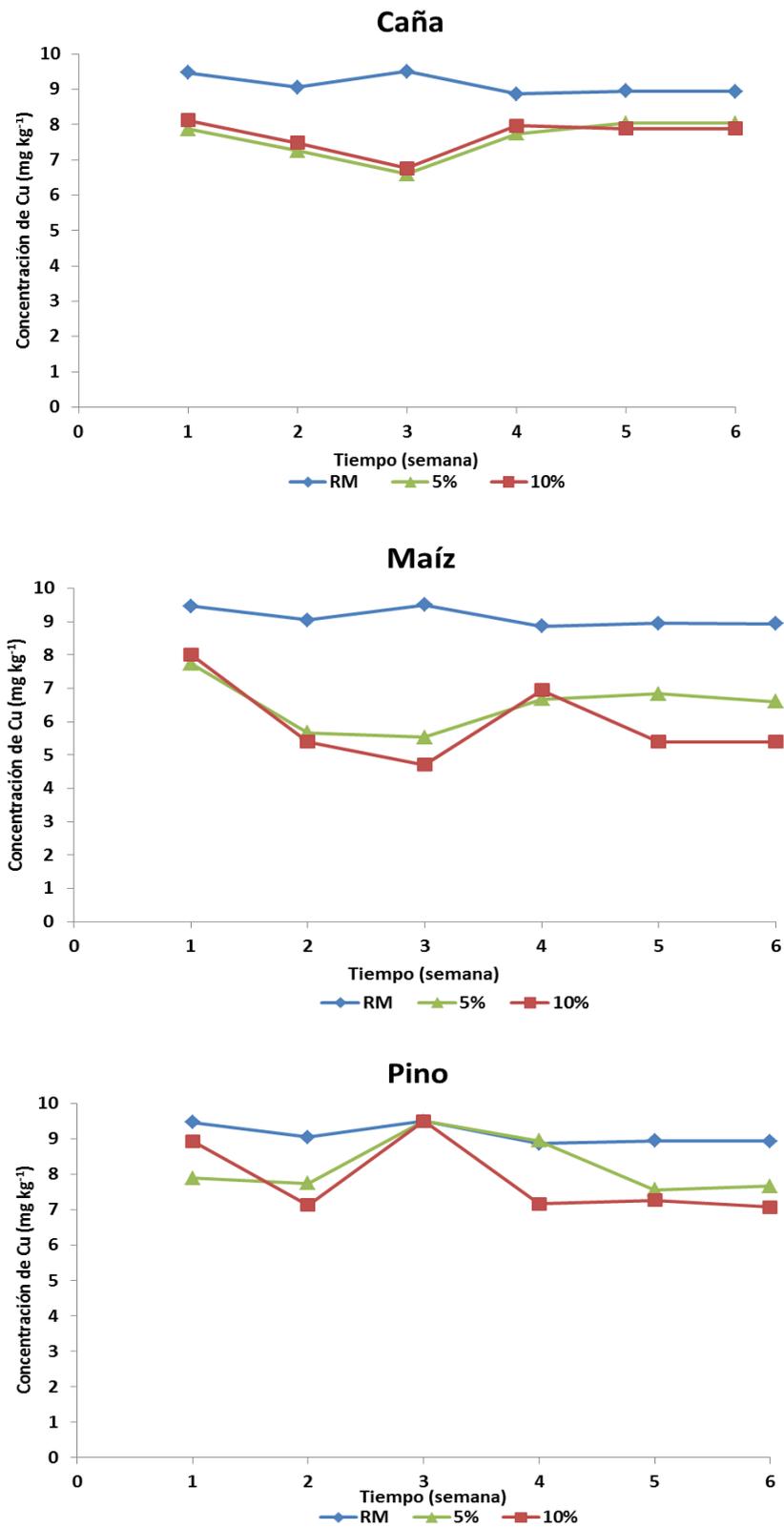


Fig. 9. Cinética de disponibilidad de Cu en función de diferentes tratamientos de biochar. Se presenta promedio de n=3.

La concentración de Cd en el residuo minero fue de 1.7 mg kg^{-1} . En la Fig. 7 se observa una solubilización de este elemento en las primeras semanas del experimento, no obstante, la concentración de Cd disminuyó en las semanas consecuentes (Fig. 10). El biochar de maíz en proporción de 10%, fue el mejor tratamiento al reducir la concentración en 47% al final de la incubación (Fig. 10b). El resto de los tratamientos (caña y pino en 5 y 10%) no tuvieron diferencias significativas respecto a la concentración de Cd en el residuo minero (Cuadro 4). Por otro lado, la concentración de Pb extractable disminuyó en mayor porcentaje (35%), por la aplicación de 10 % de biochar caña (Fig. 11a), mientras que la aplicación de 5% disminuyó la disponibilidad 32%. El tratamiento con 10 % de biochar de maíz la disminuyó 27% (Fig. 11b), estos tratamientos tuvieron diferencias significativas respecto al residuo minero ($\alpha=0.05$) (Cuadro 2). La aplicación de 5 y 10% de biochar de pino obtuvieron menor porcentaje de estabilización con 22% y 17% respectivamente, mientras que el 5% de biochar de maíz estabilizó el 19% de la concentración de Pb. El porcentaje de estabilización de EPT al final del experimento siguió este orden $\text{Zn} > \text{Cd} > \text{Cu} > \text{Pb}$ (63, 47, 43 y 35%). El Zn tuvo el mayor porcentaje de estabilización (63%) lo que indica que este elemento fue adsorbido preferentemente por la superficie del biochar. Esta observación fue reportada por otros autores, quienes encontraron que la estabilización de Zn se da preferentemente por la presencia de óxidos de Fe y Mn los cuales son muy inestables, y su dilución conduce a la formación de precipitados (Davidson et al., 2006; Rodríguez et al., 2009; Anju y Banerjee, 2010). Inyang et al., (2012) reportaron que otro mecanismo para la estabilización de EPT, es la difusión entre partículas la cual está en función del tamaño de los poros del biochar.

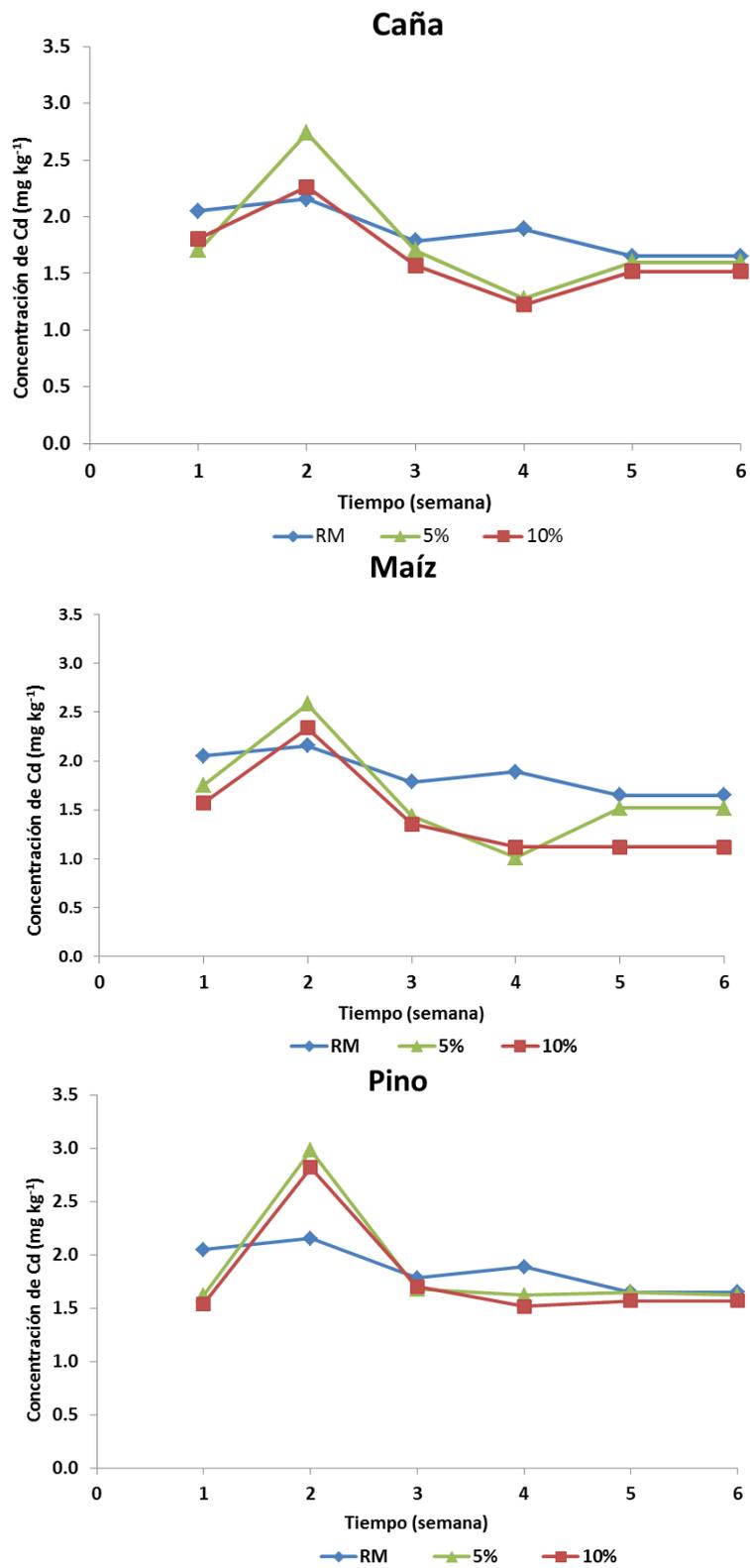


Fig. 10. Disponibilidad de Cd bajo diferentes tratamientos de biochar. Se presenta promedio n=3.

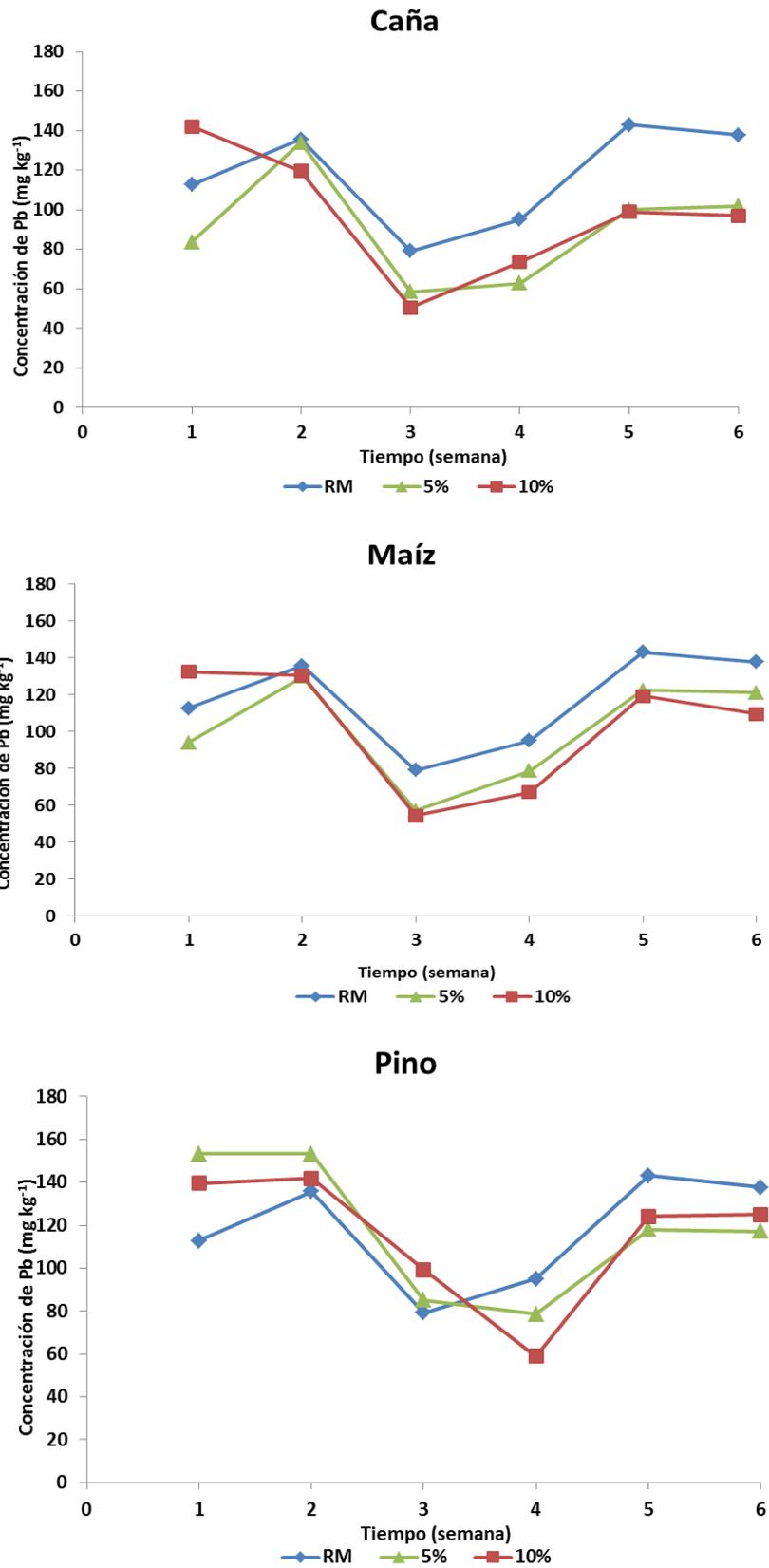


Fig. 11. Disponibilidad de Pb bajo diferentes tratamientos de biochar. Se presenta promedio de n=3.

Por lo general, la tasa de difusión de los EPT en los microporos del biochar están determinados por el radio iónico (Bruemmer et al., 1988), al respecto Fischer et al. (2007), menciona que cuanto más grande sea el radio iónico más lento será el proceso de estabilización de los EPT. Suponiendo que la tasa de difusión del residuo minero sea más alta tras la aplicación de los diferentes tratamientos de biochar, la estabilización de Zn será favorecida pues el radio iónico de este elemento es menor ($0,74 \text{ \AA}$) en comparación con Cd ($0,97 \text{ \AA}$) y Pb ($1,2 \text{ \AA}$). Por otra parte, el pH tiene una función importante en la estabilización de los EPT. El pH de los biochar es alcalino, por lo tanto, el pH del residuo minero aumentó cuando se incorporó el biochar de maíz y pino como se muestra en la Fig. 12b y 12c. El pH en el residuo de mina fue de 5.2 ± 0.3 , y aumento a 8.5 ± 0.2 y 8.1 ± 0.3 con la aplicación de biochar de maíz en 10 y 5 % respectivamente. Mientras que la aplicación de 10% de biochar de pino aumentó el pH del residuo de mina a 7.6 ± 0.4 , y 5% de este mismo material provoco un aumento a 7.7 ± 2 . El biochar de caña no tuvo un aumento significativo en el pH del residuo. El valor del pH aumento a 5.5 ± 0.5 con la aplicación de biochar de caña 10%, y 5.3 ± 0.1 con la aplicación del 5%. El pH es determinante en la reacciones de estabilización de EPT, ya que a medida que aumenta, se produce la precipitación de EPT o bien la adsorción debido al aumento de la carga negativa y de la actividad de los grupos funcionales. Sin embargo se necesitan otros estudios que corroboren los mecanismos que se llevan a cabo en la estabilización de EPT. De manera general los tratamientos con 10% de biochar de maíz y caña resultaron favorables para el proceso de estabilización de los EPT analizados. Sin embargo, el biochar de maíz (10%) resulto más efectivo en la estabilización de Cu, Cd y Zn, con una dosis de 10%, mientras que el biochar de caña contribuyo en mayor medida a la estabilización de Pb. Las dosis con 5% de ambos

biochar también resultaron favorables, aunque requieren más tiempo de incubación para permitir las reacciones propias del proceso de estabilización.

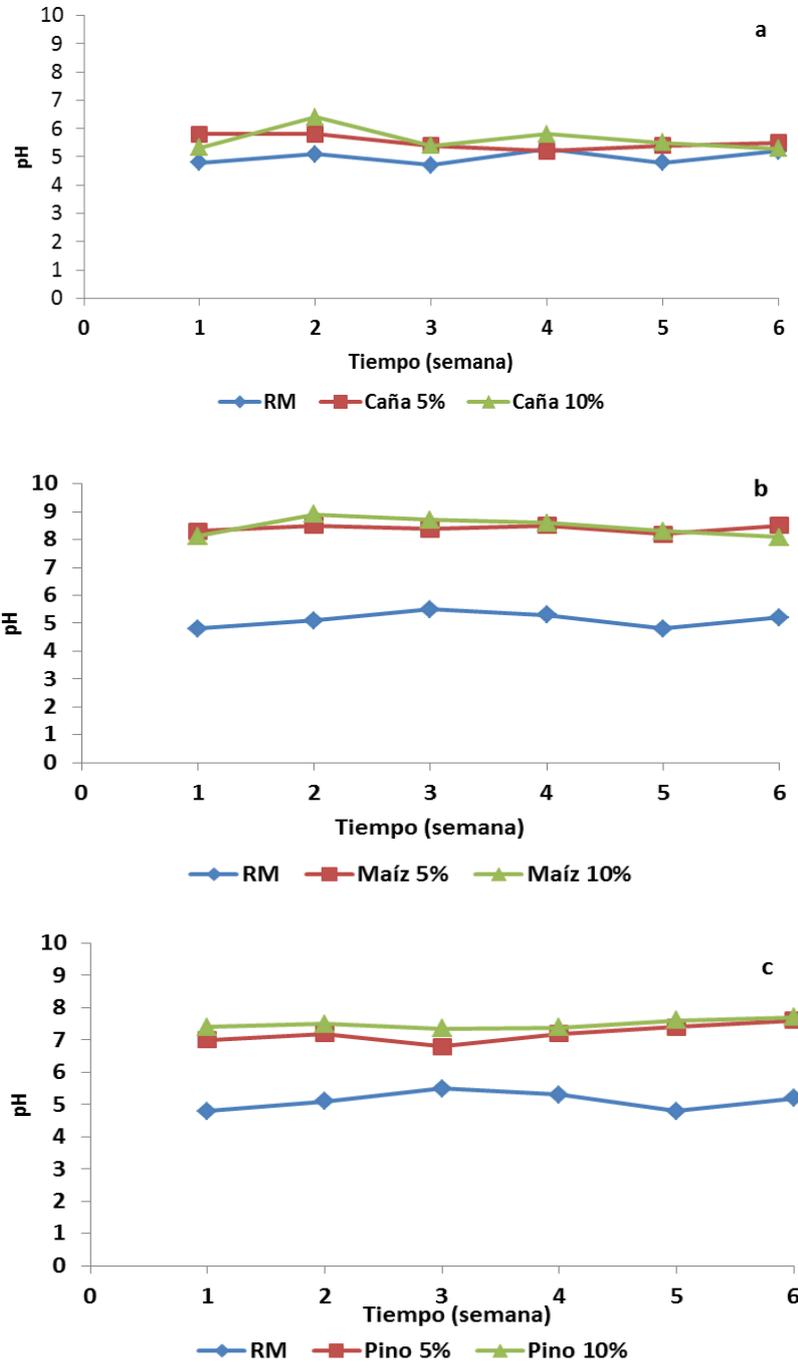


Fig. 12. Comportamiento del pH del residuo de mina bajo diferentes tratamientos con biochar de caña (a), maíz (b) y pino (c) (n=3).

Cuadro 4. Concentración extractable de EPT en el residuo de mina tras la aplicación de diferentes porcentajes de biochar de caña, maíz y pino.

Tratamiento	Cd	Cu	Pb	Zn
Residuo de mina	2±0.04 a	9±0.6 a	138± 15 a	272±8 a
Caña 10 %	1.5±.08 a	8±0.4 ba	97±5 c	141±12 b
Caña 5%	1.6±0.8 a	8±0.4 ba	102±15 bc	168±8 b
Maíz 10 %	1±0.08 b	5.4±0.2 d	110±10 bc	133±12 b
Maíz 5%	1.5±0.08 a	6.6±0.4 c	121±10 bac	168±16 b
Pino 10%	1.6±0.05 a	7.1±0.5 bc	125±1 ba	237±20 a
Pino 5%	1.6±0.12 a	7.7±0.01 bc	117±2 bac	245±5 a
Coefficiente de variación	5.31	5.52	8.51	7.01
Pr>F	<0.0001	<0.0001	0.0027	<.0001
F-Valor	15.4	23.7	6.0	35.5
r ²	0.86	0.91	0.72	0.93
Error de grados de libertad	14	14	14	14
Diferencia mínima significativa	0.22	1.13	27.56	36.44

Etapa III. Capacidad fitoestabilizadora de *J. curcas* inoculada con *Acaulospora* sp. en residuos de mina enmendados con biochar

Caracterización fisicoquímica

La aplicación de biochar de maíz contribuyó a la mejora de las propiedades físico-químicas del RM. El pH del RM cambió de 6 (ligeramente ácido) a 7.5 (neutro) en RM+B, de acuerdo con James & Wolf (1984). En cuanto a la CE varió de 2dS m⁻¹ en el RM a 3 dS m⁻¹ tras la aplicación de biochar, lo cual no tuvo fuertes implicaciones en el contenido de sales (Cuadro 5).

Cuadro 5. Caracterización fisicoquímica del residuo de mina enmendado con biochar (5%) en contraste con el residuo de mina.

Variable	RM	RM+B
pH	6±0.3	7.5±0.5
CE (dS m ⁻¹)	2.5±0.3	3.05±0.1
MO (%)	0.2±0.002	2.5±0.0.09
CIC (cmol _c +kg ⁻¹)	5±0.1	9.6±0.3
Na (cmol _c +kg ⁻¹)	1±0.3	2.4±0.2
K (cmol _c +kg ⁻¹)	1±0.2	4.3±0.7
Ca (cmol _c +kg ⁻¹)	1±0.5	2.1±0.6
Mg (cmol _c +kg ⁻¹)	1±0.04	0.5±0.01
Arcilla (%)	15.6	17.6
Limo (%)	1.4	1.4
Arenas (%)	83	81
Fósforo (mgkg ⁻¹)	6±0.6	7.9±0.2
Nitrógeno total (%)	0.0011±.0002	0.14±0.09
Capacidad de campo (%)	29	46

RM=Residuo de mina; RM+B= residuo de mina enmendado con biochar (95:5 m/m)

La concentración de cationes intercambiables aumentó en el RM+B y el orden de concentración fue el siguiente Ca²⁺>Mg²⁺>K⁺>Na⁺. Asimismo, la CIC se modificó de muy baja (5 cmol_c kg⁻¹) en el RM a baja en el RM+B (9.6±0.3 cmol_c kg⁻¹), según Hazelton y Murphy (2007). El incremento de la CIC tras la aplicación de biochar concuerda con lo observado por otros autores (Liang et al., 2006; Houben et al., 2013). Según Cheng et al (2008) este cambio se puede incrementar con el tiempo; ya que la

superficie del biochar está en constante oxidación además, el biochar adsorbe ácidos orgánicos que contribuyen al aumento de la superficie de carga.

De acuerdo a la clasificación propuesta por Velazco (1983), el contenido de MO en el RM es extremadamente pobre, no obstante, en la mezcla RM+B aumentó a 2.42%. Esto es benéfico para la retención de humedad y la aportación de nutrientes como el fósforo, el cual se incrementó de 6 ± 0.6 a 7.9 ± 0.2 mg kg⁻¹ respecto al RM. El porcentaje de nitrógeno total en el residuo de mina fue de 0.0011% mientras que en RM+B fue de 0.14. De acuerdo con la clasificación de Hazelton y Murphy (2007) el RM se clasifica como muy bajo en nitrógeno y RM+B como bajo. La adición de biochar proporciona nutrientes fácilmente aprovechables por las plantas (Glaser *et al.*, 2002) y mejora la retención de humedad pues esta cambió de 26% en RM a 46% en la mezcla RM+B.

Análisis de infrarrojo

En la Fig. 13 se muestran los espectros de infrarrojo del RM y RM+B antes y después de la incubación. La adición de biochar de maíz y la incubación provocaron aumento en la intensidad de los picos de vibración con respecto al RM. Este aumento ocurrió en las dos regiones de vibración de extensión (stretching: 4000 – 1450 cm⁻¹) y en la de huella digital (1450 – 600 cm⁻¹); la intensidad de las bandas 3690 y entre los 3400 y 2800 cm⁻¹ (vibraciones de tensión de grupos carboxilo e hidroxilo).

Esto puede deberse al incremento de los compuesto de carbono entre los cuales llevan grupos hidroxilo (O-H) (Chen *et al.*, 2011); en la banda de 3400 correspondiente a la contracción de los enlaces de los alcoholes y fenoles (O-H) y la banda 2800 de aldehidos y cetonas (C-H). También se observó aumento de vibración en la banda 2440 y 2280 cm⁻¹, posiblemente por vibración de grupos carboxílicos, aunque hay un traslape

con la banda de grupo fosfina la cual es menos probable (Chun et al., 2004). Las bandas de 1450 y 1350 cm^{-1} asignadas a los grupos fosfatos aumentó la vibración; al igual que en 1250 y 1050 cm^{-1} que corresponden a O-C por una posible deformación de grupos carboxilo y éteres (Das et al., 2009). También se observa incremento en el número de picos de los grupos hidroxilo que no se presentaron en el espectro del RM. En términos generales, la incorporación de biochar introdujo grupos hidroxilo, carboxilo, fosfina y éter. La presencia de estos grupos ya se ha reportado para biochar elaborados a partir de maíz, canola, soya y cacahuete (Yuan et al., 2011), gallinaza y residuos verdes (Park et al., 2011). También se ha confirmado a través de potencial zeta que tienen una estrecha relación con la alcalinidad del biochar.

La presencia de ácidos carboxilo se debe principalmente a la biopolímeros de origen vegetal como la suberina (Chefetz et al., 2002) los cuales fueron aportados por el biochar de maíz. La predominancia de constituyentes aromáticos en el RM+B es un indicativo de la presencia de componentes húmicos (Nardi et al., 2000). Estos compuestos se reportaron en compost elaboradas a partir de componentes lignificados, las cuales dan pauta a un proceso de oxidación progresiva (Chefetz et al., 2002) que resulta benéfico para la estabilización de EPT.

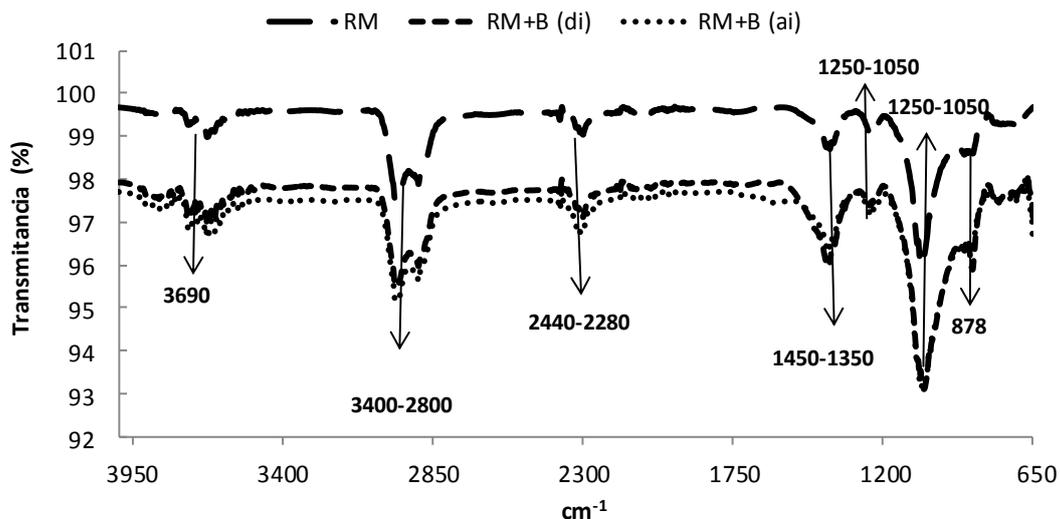


Fig. 13. Análisis de infrarrojo, del residuo de mina sólo y en combinación con biochar, antes (ai) y después de la incubación (di)

Las concentraciones extractables de EPT en el RM+B fueron significativamente menores a las del RM (Cuadro 6) y el porcentaje de estabilización siguió este orden $Cu > Pb > Zn > Cd$. Estos resultados son similares a los obtenidos por Jiang *et al.*, (2012) quienes observaron la misma secuencia de estabilización tras enmendar un ultisol contaminado artificialmente con EPT con 5% de biochar de paja.

En comparación con el RM, la determinación de EPT extractables después de ocho semanas, mostró que la estabilización de Cu, Pb, Zn y Cd fue de 67%, 46%, 58% y 51% respectivamente. La estabilización de Zn y Cd puede atribuirse al aumento del pH, debido al efecto alcalinizante del biochar, ya que el pH aumentó hasta 7.5 (Cuadro 5). Lo anterior, favorece la precipitación de los EPT, disminuye su solubilidad y promueve su adsorción mediante el aumento de la carga negativa sobre la superficie de los componentes del residuo de mina y biochar (McBride *et al.*, 1997; Bradl, 2004). Se sabe que la estabilización del Zn ocurre preferentemente por su interacción con ácidos húmicos (Kiekens, 1990; Shuman *et al.*, 1999). Las interacciones entre el Zn y los

ácidos húmicos presentes en el biochar están fuertemente afectadas por el pH; si el valor del pH es bajo, los ácidos húmicos permanecen preferentemente protonados y el Zn va a estar presente como catión hidratado en solución. A medida que aumenta el pH los grupos carboxilo se deprotonan y ocurre la formación de complejos húmicos. Por lo tanto, el pH del biochar promueve que los ácidos orgánicos como los húmicos, formen quelatos con Zn (Shuman et al., 1990).



La disponibilidad del Cd en el suelo está también influenciada por el pH, lo cual está ligado al contenido de MO (Beesley y Mamiroli, 2011). Con relación a lo anterior es posible que la estabilización de este elemento ocurriera por el aumento de MO en el RM por la adición de biochar. Sin embargo, el porcentaje de estabilización fue menor si se compara con Cu y Pb. Esto sugiere que hay selectividad en la adsorción, hay menos afinidad por el Cd en comparación con el Cu y Pb (Soon et al., 1981; Shrivastava y Banerjee, 2004).

La estabilización de Cu fue mayor a la de Pb debido a la afinidad de los grupos funcionales del biochar por este elemento tales como el fosfato, carboxilo e hidroxilo (Fig. 10). Las asociaciones de Cu con estos grupos tienden a formar precipitados; lo cual aumenta la inmovilización de estos elementos sobre la superficie del biochar (Cao et al., 2010; Uchimiya et al., 2010; Uchimiya et al., 2011). Lo anterior se debe a que las constantes de estabilidad del Cu son mayores a las de Pb (Pandey et al., 2000; Ma et al., 2001; Jiang et al., 2012).

Es posible que los sitios complejantes del RM+B estén ocupados preferentemente por Cu y Pb debido a su mayor concentración. Por otro lado, Naidu et al., (1997) señalaron que las especies hidrox-metal tiene una función determinante en la estabilización de Cd, porque participan activamente en la adsorción de Cd. Esta adsorción está regulada

por el pH, a medida que éste aumenta ocurre un incremento de especies hidrox-metal y es probable que la adición del biochar contribuya a la formación de estas especies químicas, aunque es necesario comprobar experimentalmente esta conjetura.

Cuadro 6. Concentración de EPT extractables con DTPA del residuo de mina, residuo de mina y biochar de maíz (5%) antes (ai) y después de la incubación (di).

ID	Cd	Cu	Pb	Zn
RM	2±0.3 a	12±0.3 a	13±0.5a	184±10a
RM+B (ai)	0.9±0.01b	10±0.3b	11±0.5b	151±5b
RM+B (di)	0.6±0.02 c	8±0.09 c	6±0.3c	108±10c
Estabilización (%)	40	58	51	41
Coefficiente de variación	3.09	3.00	4.69	7.12
Pr>F	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0003
F-valor	3382.78	9946.00	134.91	39.86
r ²	0.99	0.97	0.98	0.93
Error de grados de libertad	6	6	6	6
Diferencia mínima significativa	0.07	0.76	1.17	26.34

Letras diferentes entre columnas muestras diferencias significativas según la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$). RM+B (ai) residuo de mina+biochar (95:5 m/m) antes de la incubación; RM+B (di) Residuo de mina+biochar después de la incubación.

Efecto de los EPT en el desarrollo de J. curcas

Como ya se explicó durante el experimento se midieron algunas variables de crecimiento de la planta para conocer el efecto de los tratamientos durante el desarrollo vegetal. En la Fig. 14 se muestra la cinética de altura de *J. curcas* bajo diferentes tratamientos. Durante los primeros 30 días después del trasplante (ddt) no se observaron diferencias significativas en la altura; sin embargo a los 45 días ddt las plantas que crecieron en RM+A+B mostraron diferencias significativas con respecto a los otros tratamientos. Mientras que a los 80 días los tratamientos RM+B y RM+A también

presentaron diferencias estadísticas con respecto a las plantas testigo (RM) hasta el final del experimento.

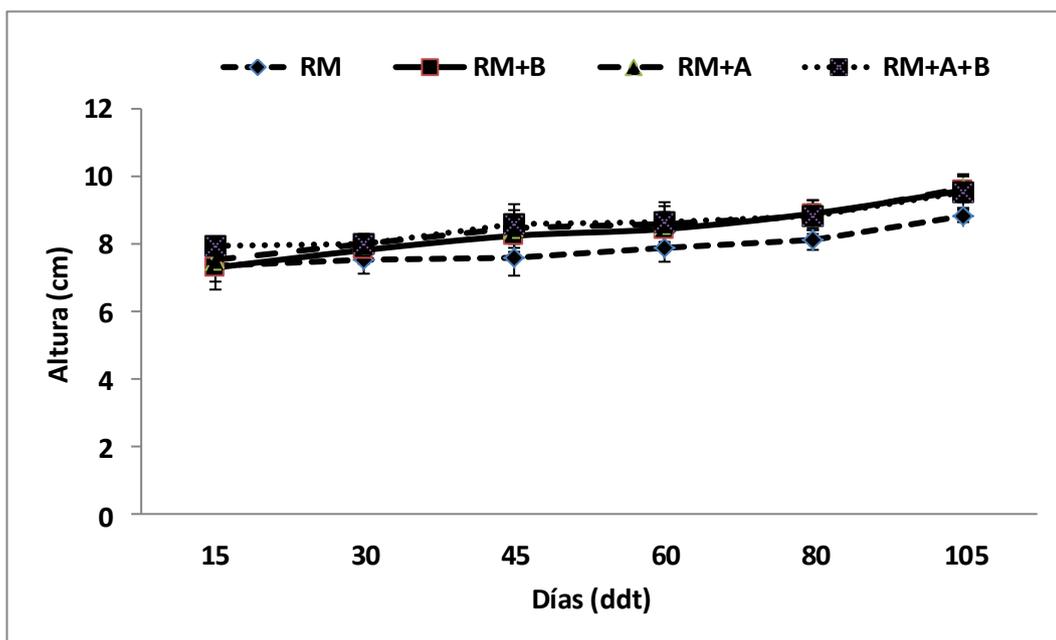


Fig. 14. Cinética de la altura de *J. curcas* bajo diferentes tratamientos: residuo de mina (RM), residuo de mina con aplicación de biochar (RM+B), inoculación de *Acaulospora* sp. (RM+A), inoculación de *Acaulospora* sp y aplicación de biochar (RM+A+B). Las barras indican la desviación estándar (n=5).

Esto concuerda con lo observado por Marques et al. (2013) quienes evaluaron el crecimiento de *J. curcas* en un suelo contaminado artificialmente con Cd (0.03 y 0.04 mM L⁻¹). Ellos observaron que la concentración de 0.04 mM L⁻¹ disminuyó el tamaño de la planta. Así mismo, Pál et al. (2006) investigaron los efectos del Cd en maíz y reportaron que este elemento indujo la inhibición del crecimiento debido cambios en la absorción de agua e inhibición de fotosíntesis. Por otra parte, el área foliar al final del experimento en los distintos tratamientos varió de 156±7 a 204±12 cm² (Fig. 15), en donde los tratamientos RM+B, RM+A y RM+A+B presentaron diferencias significativas con respecto a las plantas testigo (RM).

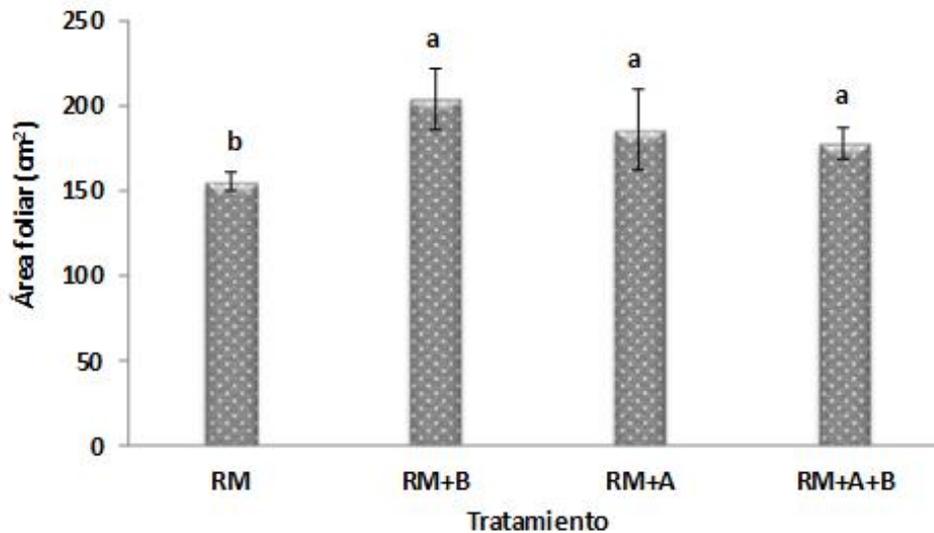


Fig. 15 Área foliar al final del experimento. Las letras distintas muestran diferencias significativas entre tratamientos según la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$). Las barras indican la desviación estándar ($n=5$).

El contenido de clorofila *a* y total fueron estadísticamente mayores en los tratamientos RM+B y RM+A+B (Cuadro 7), en comparación con el tratamiento testigo (RM). Esto es importante, ya que diferentes autores reportaron que los EPT reducen drásticamente los pigmentos fotosintéticos al sustituir al ion Mg^{2+} en la molécula de clorofila (Maurya et al., 2008; Silva et al., 2012; Pietrini et al., 2003; Wang et al., 2000). Lo anterior imposibilita la captación de fotones lo que reduce la actividad fotosintética (Yang et al., 2005).

En las Fig. 16 y 17 se observa el número de hojas y diámetro del tallo de *J. curcas* registradas durante la fase de invernadero. En los primeros 30 días no se observaron diferencias entre los distintos tratamientos. Sin embargo, a partir de los 45 hasta los 80 días se observa que los tratamientos que no incluyeron biochar (RM y RM+A) tienen mayor número de hojas. No obstante, a los 105 días el número de hojas no mostró diferencias estadísticas entre tratamientos. El diámetro del tallo fue estadísticamente

mayor a los 45 días en el tratamiento RM+A. Sin embargo, después de los 60 días y hasta el final del experimento no se observaron diferencias estadísticas entre tratamientos.

Cuadro 7. Pigmentos fotosintéticos (clorofila *a*, *b* y *total*) en *J. curcas* bajo diferentes tratamientos.

Tratamiento	Clorofila (mg g ⁻¹ PF)		
	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>Total</i>
RM	67±7b	17±.3a	84±9c
RM+B	90±8a	19±2a	106±8ba
RM+A	80±12ba	18±0.a	96±17bc
RM+A+B	96±12a	22±3 a	118±8a
Coeficiente de variación	31.10	12.80	26.70
Pr>F	0.01	0.01	0.01
F-valor	4.90	8.20	5.20
r ²	103.45	10.22	118.37
Error de grados de libertad	14	11	14
Diferencia mínima significativa	19.83	7.19	21.21

Letras distintas entre columnas letras indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$) ($\alpha = 0.05$). Se muestran promedios y desviaciones estándar, n=5.

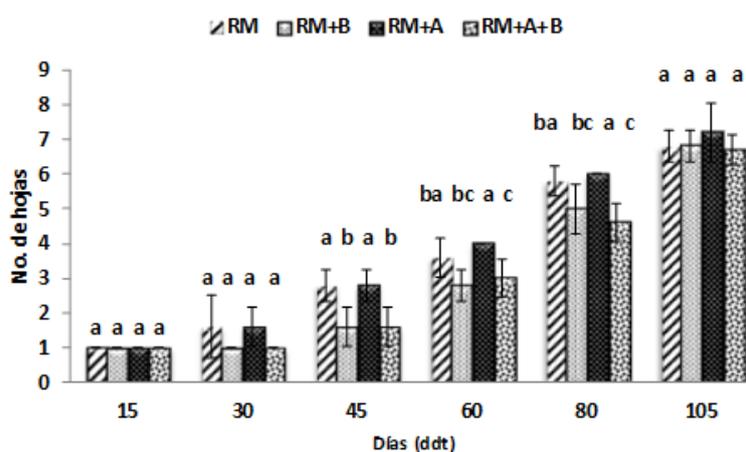


Fig. 16. Número de hojas en *J. curcas* creciendo bajo diferentes tratamientos. Las letras distintas muestran diferencias significativas entre tratamientos según la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$). Las barras indican desviación estándar, n=5.

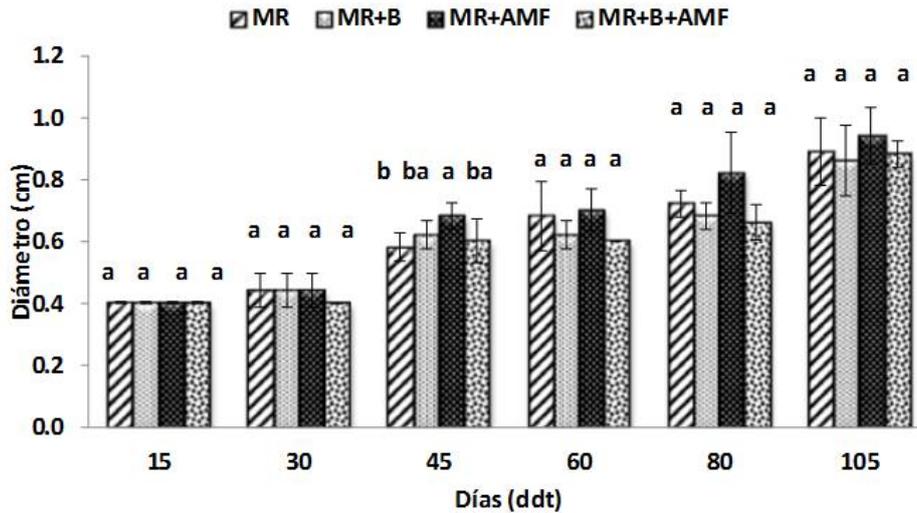


Fig. 17. Diámetro de tallo de *J. curcas* bajo diferentes tratamientos. Las letras distintas muestran diferencias significativas entre tratamientos según Tukey ($\alpha=0.05$). Las barras indican el desviación estándar (n=5).

La biomasa aérea y radical de los tratamientos RM+B y RM+A+B mostraron biomasa estadísticamente mayor con respecto al tratamiento testigo ($\alpha=0.05$) (Cuadro 8). Los resultados sugieren que la aplicación de biochar fue un factor que contribuyó positivamente en el crecimiento de *J. curcas*. Estos resultados están de acuerdo con Santosh et al., (2010) quienes probaron que la aplicación de biolodos fue el principal factor que contribuyó al desarrollo de *J. curcas*. Otro estudio realizado por Houben et al., (2013) demostró que la aplicación de 5% de biochar de *Miscanthus* contribuyó a la producción de biomasa de *Brassica napus* al reducir las concentraciones tóxicas de Cd, Pb y Zn en suelos de refinería. Sin embargo, no se encontró diferencia entre los tratamientos que incluyeron biochar y biochar mas *Acaulospora* sp. Por si sola, la inoculación con *Acaulospora* no incrementó la biomasa de la planta. Posiblemente, el efecto tóxico de los elementos no permitió que el hongo ejerciera efecto benéfico en la planta.

Cuadro 8. Biomasa de *J. curcas* bajo la influencia de la aplicación de *Acaulospora* sp. y biochar de maíz (5%).

ID	Biomasa (g)		DE (estomas/mm ²)	
	Parte aérea	Raíz	Haz	Envés
Residuo de mina (RM)	1.5± 0.2b	0.41 ±0.073b	60±7a	152±23a
RM + Biochar	1.9± 0.1a	0.66 ±0.02a	57±18a	189±27a
RM + <i>Acaulospora</i> sp.	1.5± 0.1ba	0.52± 0.05b	60±13a	188±41a
RM+ biochar+ <i>Acaulospora</i> sp.	2 ±0.1a	0.7 ±0.03a	58±18a	180±34a
Coeficiente de variación	7.2	15.1	19.51	9.9
Pr>F	<0.0001	0.0033	0.0223	0.006
F-valor	23.90	6.96	5.66	8.99
r ²	0.81	0.56	0.68	0.65
Error de grados de libertad	16	16	16	16
Diferencia mínima significativa	0.22	0.15	25.26	77.40

Letras distintas entre columnas letras indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$) ($\alpha=0.05$). DE=densidad estomática. Se muestran promedios y desviaciones estándar, n=5.

Densidad estomática

Los estomas en la lámina foliar en *J. curcas* (Fig. 18) son del tipo anisocítico, es decir, estas estructuras se presentan en mayor número en el envés (Sánchez et al., 1996). En el Cuadro 8 se presenta los resultados de la densidad estomática (DE). La DE en los tratamientos no mostraron diferencias significativas tanto en el haz como el envés.

Los resultados del presente trabajo contrastan con lo reportado por Kasim et al., (2006). Estos autores observaron que la DE en la superficie abaxial de *Shorgum bicolor* disminuyó por estrés inducido por el riego diario con una solución enriquecida con Cu 0.64 mg kg⁻¹ y Cd 0.11 mg kg⁻¹, pero añaden que el Cd indujo la disminución de la absorción de nutrientes, lo cual se reflejó en el número de estomas. Las plantas expuestas a suelos contaminados con Cd presentan mayor alteración en la DE, apertura estomática y transpiración (Sandalo et al., 2001).

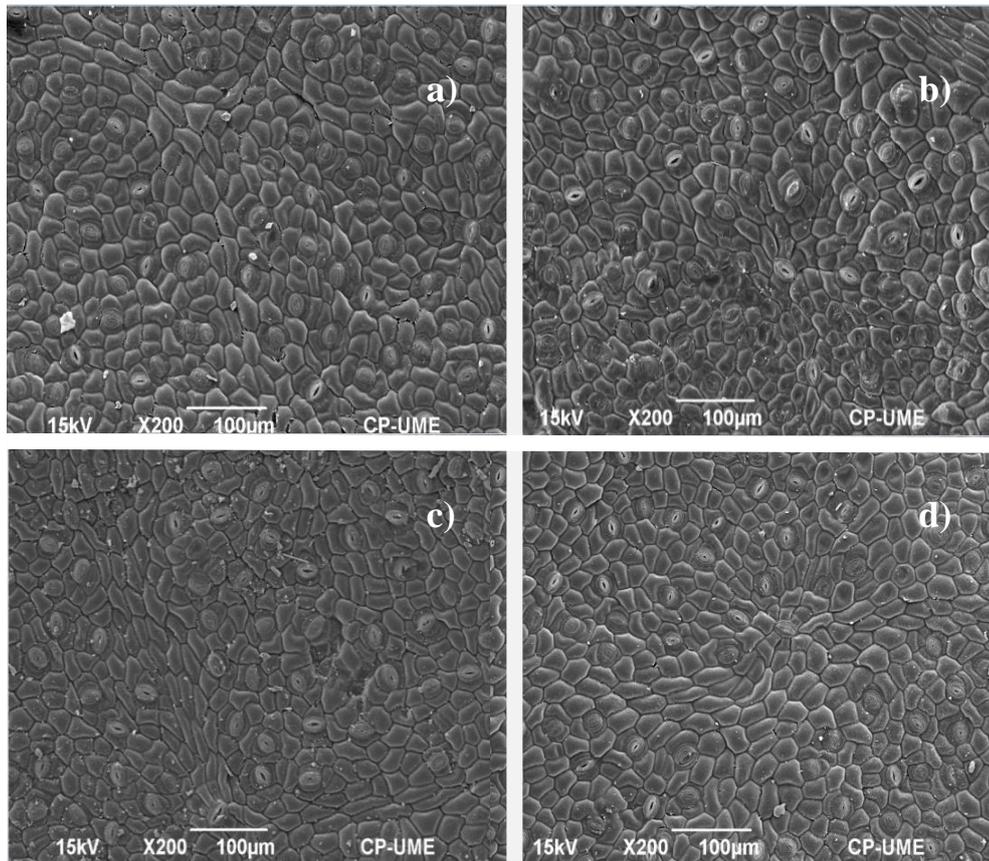


Fig. 18. Se observan estomas en la cara abaxial de hoja de *J. curcas* bajo la influencia de distintos tratamientos (a = residuo de mina; b = residuo + biochar; c = residuo + *Acaulospora* sp.; d=residuo+ *Acaulospora* sp + biochar).

En el Cuadro 9 se presentan los resultados de fósforo total y porcentaje de nitrógeno en la biomasa aérea de *J. curcas*. La concentración de fósforo total en *J. curcas* fue estadísticamente mayor en los tratamientos RM+B, RM+A y RM+B+A en comparación con el tratamiento testigo. Respecto al porcentaje de nitrógeno, el valor más alto se presentó en las plantas inoculadas en RM+B con 3 ± 0.2 . Las plantas que crecieron en RM+A, RM+B, RM+B+A presentaron porcentaje similar de nitrógeno y los valores son significativamente más altos que el nitrógeno de las plantas testigo (RM)

El hecho de que la concentración de fósforo en la planta sea menor en el tratamiento testigo (RM) puede estar relacionada a los efectos metabólicos que provocan los EPT en las plantas. Al respecto, existen varios reportes de que el Cd y el Pb interfieren en la entrada, transporte y utilización de elementos esenciales (Ca, Mg, P y K) y agua. Lo anterior provoca desequilibrios nutricionales e hídricos en la planta (Poschenrieder et al., 1989; Sandalio et al., 2001; Singh y Tewari, 2003). Por otro lado, Gouia et al. (2000) reportó que las concentraciones tóxicas de algunos elementos como el Cd, reducen la absorción de nitratos y el transporte de los mismos a la raíz, además una vez que este elemento se encuentra en la planta produce inhibición de la actividad nitrato reductasa en los tallos. También, puede ser consecuencia de la asociación entre los iones metálicos y los grupos fosfato en la solución del suelo que reduce la disponibilidad real para las plantas de este último.

Concentración de EPT en J. curcas

La acumulación de EPT en la parte aérea de *J. curcas* bajo los distintos tratamientos ocurrió de la siguiente manera Zn>Cu>Pb>Cd. De acuerdo con índices de fitotoxicidad propuestos por Varun et al., (2012) las concentración de Cd, Pb y Zn que se encontraron en la parte aérea no ponen en riesgo a *J. curcas*. La acumulación de Cd en la parte aérea bajo los distintos tratamientos no tuvo diferencias significativas con respecto al testigo. La acumulación de Cd fue menor a 1 mg kg⁻¹ (Fig. 2) en todos los tratamientos. Estos resultados son mayores a los reportados por Ahmadpour et al., (2010), quienes encontraron acumulación 0.12 mg kg⁻¹ tras exponer a *J. curcas* a altas concentraciones de Cd presentes de lodos de depuradora. A pesar de esto *Jatropha* no trasloca concentraciones altas de Cd a la parte aérea.

Cuadro 9. Concentración de fósforo total y porcentaje de nitrógeno en la parte aérea de *J. curcas* bajo diferentes tratamientos.

ID	Fósforo total (mg kg ⁻¹)	Nitrógeno (%)
Residuo de mina (RM)	4504±827b	2.5±0.1b
RM + Biochar	6807±1307a	2.9±0.2a
RM + <i>Acaulospora</i> sp.	6541±693a	2.9±0.1a
RM+ biochar+ <i>Acaulospora</i> sp.	5838±858a	3±0.2a
Coefficiente de variación	16.21	4.57
Pr>F	0.006	<0.0001
F-valor	6.03	16.78
r ²	0.53	0.76
Error de grados de libertad	16	16
Diferencia mínima significativa	75.69	0.235

Letras distintas entre columnas muestran diferencias significativas según Tukey ($\alpha=0.05$). Se muestran promedios y desviaciones estándar, n=5.

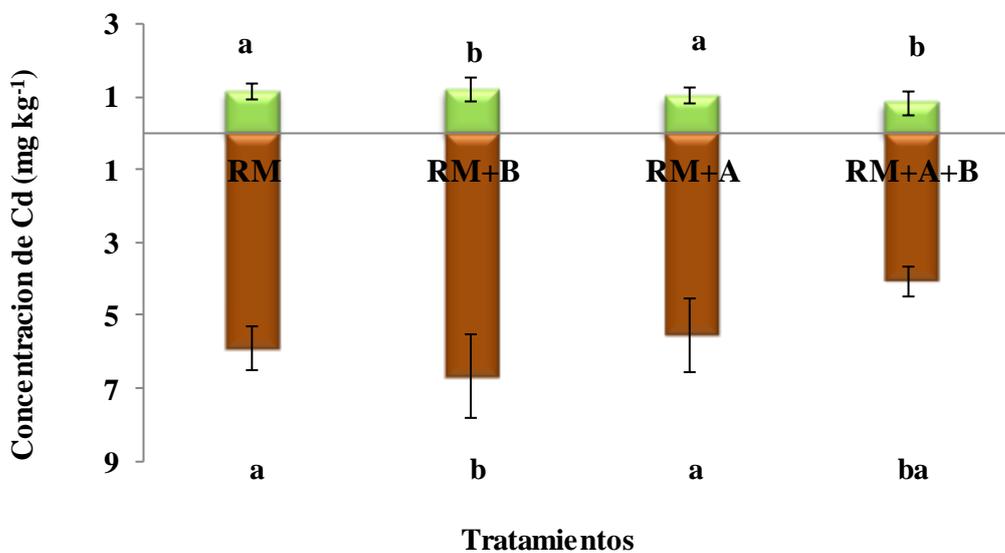


Fig. 19. Concentración de Cd en parte aérea (verde) y raíz (café) de *J. curcas* creciendo en residuo de mina con cuatro tratamientos. Las letras distintas muestran diferencias significativas entre tratamientos según Tukey ($\alpha=0.05$). Las barras indican desviación estándar, n=5.

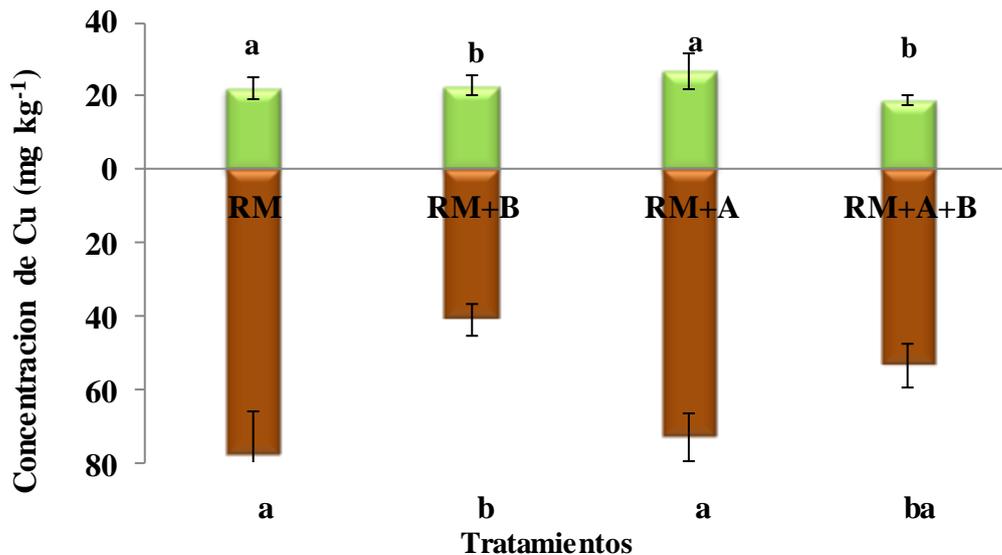


Fig. 20. Concentración de Cu en parte aérea (verde) y raíz (café) de *J. curcas* al ser expuestas a distintos tratamientos con residuo de mina. Las letras distintas muestran diferencias significativas entre tratamientos según la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$). Las barras indican desviación estándar, $n=5$.

En el caso de Cu, la concentración en las plantas creciendo en el tratamiento RM+A rebasaron la concentración reportada como fitotóxica ($>20 \text{ mg kg}^{-1}$) con una concentración de $21.5 \pm 4 \text{ mg kg}^{-1}$. Estos valores son menores a los reportados por Wu et al., (2011), quienes encontraron concentración de 25 mg kg^{-1} de Cu en biomasa aérea de *J. curcas*, tras ser expuesta a residuos de mina.

Las concentraciones de Pb en la parte aérea fueron mayores en los tratamientos RM y RM+A. Estos resultados son similares a los que obtuvieron Majid et al., (2012), quienes reportaron concentración en la parte aérea de 3 mg kg^{-1} , tras exponer de *J. curcas* a concentraciones tóxicas de plomo en lodos. En contraste, los resultados del presente trabajo difieren en los reportados por Moursy et al., (2014), quienes evaluaron el efecto de los lodos de depuradora y la capacidad de fitorremediación de *J. curcas*. Los autores observaron que después de cuatro meses *J. curcas* acumuló altas concentraciones de Pb. Sin embargo, las concentraciones extractables (DTPA) de este elemento fueron mayores

que las del presente trabajo. Esto implica que *J. curcas* tiene capacidad para tolerar concentraciones tóxicas de Pb y evita que el elemento sea translocado a la parte aérea. La mayor concentración de Zn en la parte aérea ocurrió en el tratamiento de RM+A con concentración de $112 \pm 22 \text{ mg kg}^{-1}$. Esta concentración contrasta con lo reportado por Wu et al., (2011), quienes encontraron concentraciones de 50 mg kg^{-1} de Zn en la parte aérea de *J. curcas* en un estudio realizado con residuos de mina.

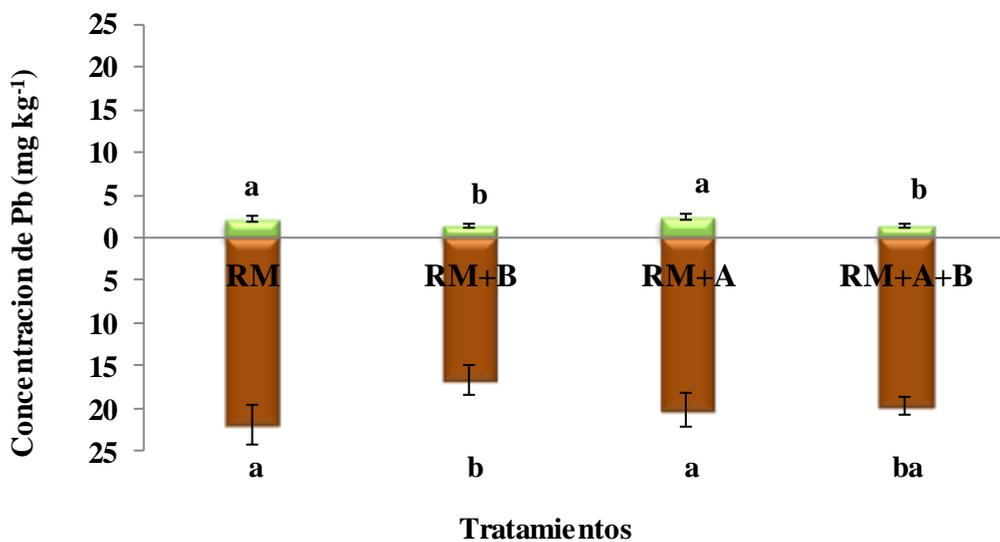


Fig. 21. Concentración de Pb en parte aérea (verde) y raíz (café) de *J. curcas* después de ser expuesta a distintos tratamientos con residuo de mina. Las letras diferentes muestran diferencias significativas entre tratamientos según Tukey ($\alpha=0.05$). Las barras indican desviación estándar, $n=5$.

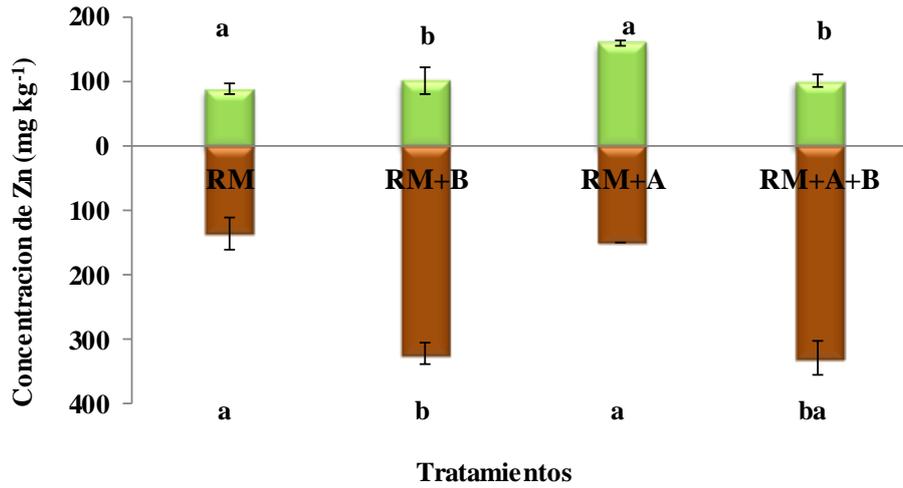


Fig. 22. Concentración de Zn en parte aérea (verde) y raíz (café) de *J. curcas* después de ser expuesta a distintos tratamientos con residuo de mina. Las letras distintas muestran diferencias significativas entre tratamientos según la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$). Las barras representan la desviación estándar=5.

Los resultados del factor de bioacumulación (FB) en parte aérea de *J. curcas* se observan en la Fig. 23. En todos los tratamientos el FB de Pb y Zn en la parte aérea de *J. curcas* fue <1. No obstante, el FB de Cd en los tratamientos RM+B y RM+A+B fue >1. Por otra parte, el FB de Cu en todos los tratamientos fue >1.

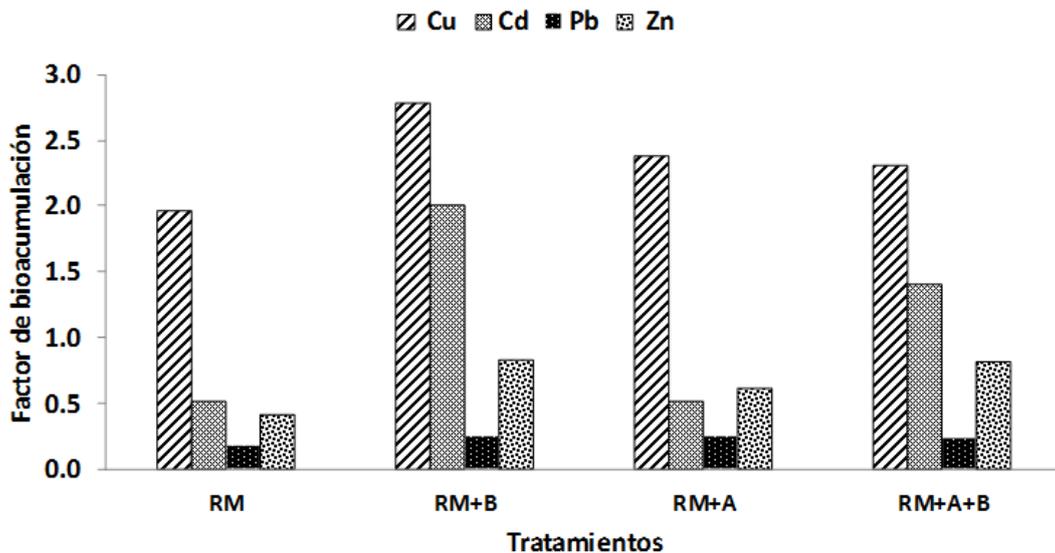


Fig. 23 Factor de bioacumulación en parte aérea de *J. curcas* expuesta a diferentes tratamientos.

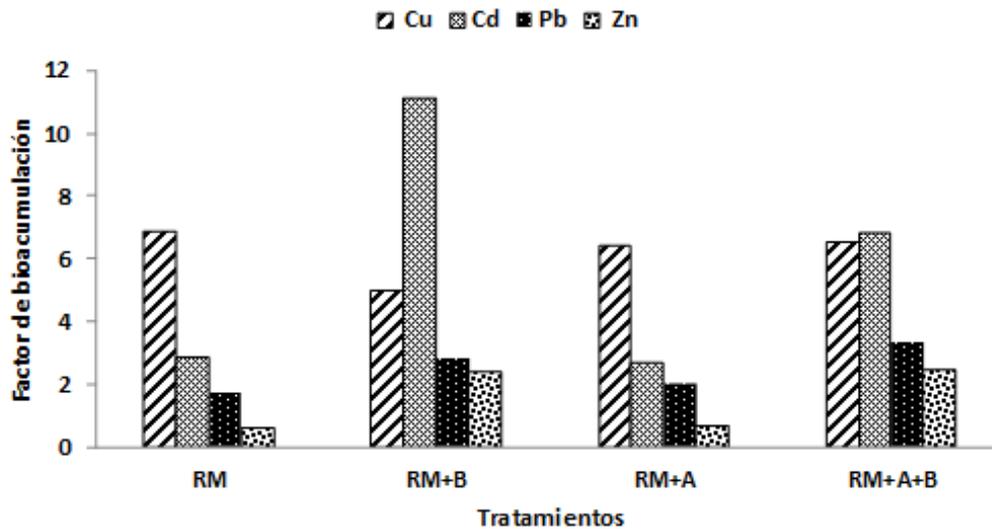


Fig. 24 Factor de bioacumulación en la raíz de *J. curcas* expuesta a diferentes tratamientos.

Los resultados mostraron que *J. curcas* tiene la capacidad de retener EPT principalmente en la raíz, ya que en todos los tratamientos el factor de translocación de Cu, Cd, Pb y Zn fue <1 (Fig. 25). Al respecto, diferentes autores sugieren que las plantas que son útiles para la fitoestabilización son aquellas que son tolerantes a altas concentraciones de EPT, tienen la capacidad de acumularlos preferentemente en la raíz y que tienen $FB < 1$ (Obemah et al., 2014; Fellet et al., 2011; Yadav et al., 2010). De acuerdo con Pulfordny Wattson (2003) las plantas estabilizadoras de EPT reducen la disponibilidad y dispersión de estos contaminantes en el suelo. Por lo tanto, *J. curcas* puede considerarse una planta fitoestabilizadora.

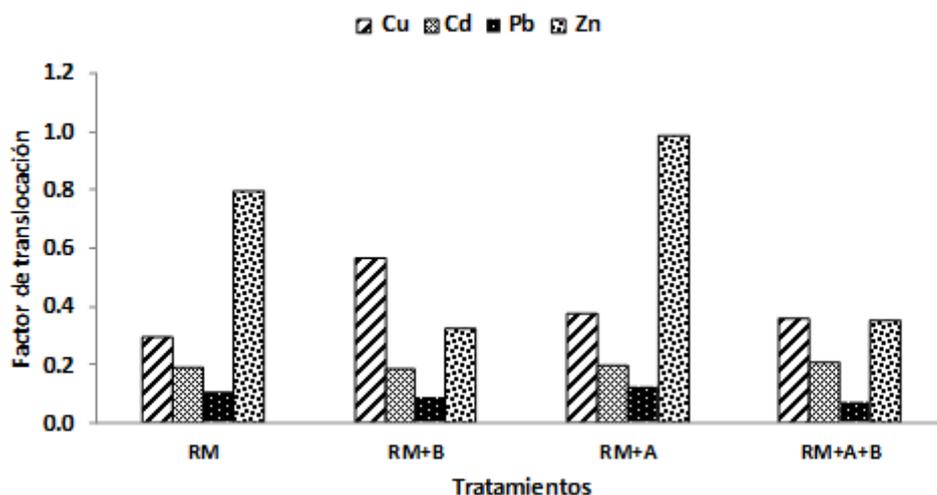


Fig. 25 Factor de translocación en parte aérea de *J. curcas* expuesta a diferentes tratamientos.

Lo cual está de acuerdo con Moursy et al., (2014) quienes estudiaron la capacidad de esta planta para remediar lodos de depuradora con altas concentraciones de Cu, Cd, Pb y Zn. Estos autores reportaron que *J. curcas* tiene la capacidad de reducir la concentración de estos elementos en los lodos, concentrándolos preferentemente en la raíz. Otro trabajo realizado por Yadav et al. (2009) registró que la acumulación de Zn se da preferentemente en la raíz. Majid et al. (2011) observaron resultados similares con Cu en un experimento con *Acacia mangium* bajo condiciones de estrés abiótico por EPT.

Colonización micorrízica

El porcentaje de colonización micorrízica en raíces en RM+B fue de 39%, mientras que el de las plantas que crecieron en RM, la colonización fue de 32%. Cui et al. (2013) observaron que la aplicación del biochar (10 ton ha⁻¹) contribuyó no solo a la reducción de las fracciones tóxicas disponibles de EPT, sino que aumentaron 39% la colonización,

con respecto al tratamiento sin biochar; el cual solo presentó 19% de colonización. Del mismo modo, en un estudio realizado en un oxisol reportaron que la biomasa y la colonización micorrízica en plantas de frijol aumentaron con la aplicación de biochar (26 ton ha⁻¹) (Hunt *et al.*, 2010).

Conclusiones Generales

Los resultados muestran que el biochar de maíz puede ser útil en la remediación de suelos con problemas de contaminación por EPT. Esto se debe a que el elevado pH del biochar puede aumentar el pH en el residuo de mina. Además, proporciona grupos funcionales como carboxilo, hidroxilo y fosfina que son útiles para la adsorción de EPT en la superficie del biochar. La incorporación del carbono al residuo de mina incrementó algunas de las propiedades fisicoquímicas del residuo de mina (CIC, materia orgánica, fósforo disponible, porcentaje de nitrógeno, aumentó de grupos hidroxilo, carboxilo y fosfato, densidad aparente, retención de humedad) cuando se aplicó 5% de biochar de maíz, lo que mejoró las condiciones de crecimiento de las plantas.

A partir de los datos generados en la tercera etapa, se concluye que *J. curcas* es una planta fitoestabilizadora. Pues reúne las características más importantes como crecer en altas concentraciones de EPT y acumular estos elementos principalmente en la raíz. De acuerdo con los resultados de factor de translocación, *J. curcas* tiende a evitar el transporte de EPT de la raíz a la parte aérea, aun sin la inoculación de *Acaulospora* sp. y/o aplicación de biochar. De acuerdo con los datos de cinética de crecimiento de *J. curcas*, la inoculación micorrízica y la aplicación de biochar tienen un efecto significativo en la altura de las plantas. Otras características como el contenido de clorofila *a* y *a+b* fueron mayores en las plantas con la inoculación micorrízica, con respecto al testigo.

La adición de biochar contribuyó al aumento de la biomasa de la planta, al menos en corto plazo, no solo por disminuir las concentraciones biodisponibles de EPT, sino que también se encontró mayor contenido de fósforo en las plantas que crecieron en los tratamientos que incluyeron biochar.

Se comprobó la capacidad de fitoestabilización de los EPT analizados, la cual varió según el tratamiento que se aplicó. Esto se debe a que aún sin la inoculación micorrízica y la incorporación de biochar, *Jatropha* fue capaz de tolerar altas concentraciones de EPT concentrándolos preferentemente en la raíz, disminuyendo así su acumulación en la parte aérea. *Acaulospora* sp. y biochar afectan la disponibilidad de EPT presentes en el residuo de mina.

El biochar es una enmienda útil ya que en conjunto con *Acaulospora* sp. contribuyó al aumento de nutrientes en *J. curcas*, lo cual se reflejó en mayor concentración de clorofila *a* y *b*, esto tuvo un impacto positivo en el aumento de la biomasa. Los resultados son relevantes ya que confirman la capacidad de *J. curcas* de establecerse en condiciones extremas como las que caracterizan al residuo de mina. Lo anterior, contribuye a un proceso seguro de remediación y recuperación de estos sitios, al promover el establecimiento de una cubierta vegetal. Así mismo, se puede reducir la dispersión de EPT. Se debe resaltar que el uso de enmiendas con propiedades benéficas como el biochar en combinación con *Acaulospora* sp. promueve la colonización por otros organismos benéficos del suelo. Esto es relevante, ya que el principal objetivo es reincorporar los nutrientes y comunidades que son importantes en los procesos fisicoquímicos que hacen posible la formación del suelo.

Es posible que el empleo de plantas de interés bioenergético como *J. curcas* llame la atención, pues se sabe que el uso de combustibles fósiles y los problemas de contaminación por emisión de gases de efecto invernadero se están acrecentando. Al mismo tiempo, es posible que los residuos de mina puedan ser aprovechados si se promueve el cultivo de *J. curcas*.

Contraste de hipótesis

La hipótesis general de esta tesis fue: *J. curcas*, *Acaulospora* sp. y el biochar actúan sinérgicamente en disminuir la absorción de EPT por la raíz de las planta.. Esta hipótesis se rechaza, ya que los resultados mostraron que sólo se observó reducción en la absorción de Cu y Cd en forma sinérgica con la inoculación de *Acaulospora* sp. y la aplicación de biochar. En el caso de Zn y Pb no se observó disminución en su absorción por la raíz.

La primera hipótesis específica fue: El biochar con mayor pH es el que estabiliza más los EPT del residuo minero bajo estudio. Esta hipótesis se acepta, ya que el biochar de maíz con mayor pH (de 9.5) al aplicarlo al residuo de mina Santa María contribuyó a la estabilización de Cd, Cu, Pb y Zn (estabilización del 40%, 58%, 51% y 41%, respectivamente). Con la aplicación de los otros biochar, los cambios no fueron consistentes en la estabilización de todos los EPT.

La segunda hipótesis específica fue: *J. curcas* transloca bajas concentraciones de EPT a la parte aérea. Esta hipótesis se acepta ya que la concentración de EPT en la parte aérea de *J. curcas* siempre fue menor a la concentración en la raíz. Las concentraciones en follaje no sobrepasaron las consideradas como fitotóxicas.

La tercera hipótesis específica fue: El biochar aporta nutrientes al residuo minero la cual se refleja en el desarrollo de *J. curcas*. Esta hipótesis se acepta; ya que los tratamientos que incluyeron biochar contribuyeron al aumento de nutrientes como fósforo y nitrógeno en la planta. Esto se vio reflejado en el aumento de la biomasa (hasta 2 g de peso seco) en los tratamientos con respecto a los tratamientos que no incluyeron biochar (1.5 g en los tratamientos RM y RM+A).

La cuarta hipótesis específica fue: *Acaulospora* sp. contribuye a la nutrición de *J. curcas*. Esta hipótesis se acepta ya que las concentraciones de P y N en las plantas inoculadas fueron mayores en relación a éstas de las plantas testigo.

Recomendaciones finales y trabajo futuro

De manera general los resultados de la presente investigación indican que la aplicación de biochar de maíz puede contribuir exitosamente a la estabilización de EPT presentes en residuo de mina. Sin embargo, la estabilización sólo se puede garantizar por periodos relativamente cortos. Pues los procesos de envejecimiento del biochar pueden actuar de manera desconocida hasta ahora en la retención de EPT por el biochar a largo plazo. En consecuencia, se sugiere realizar experimentos a mediano y largo plazo en los que se estudie el comportamiento de los EPT bajo la influencia de biochar. Estos estudios deberían estar dirigidos a explicar cada proceso de estabilización y sus implicaciones, por ejemplo, el proceso de difusión; el cual puede interrumpirse gradualmente por el bloqueo de los poros, o bien, la adsorción por grupos funcionales los cuales pueden sufrir cambios bioquímicos que tienen implicaciones sumamente importantes en el ciclo biogeoquímico de los EPT.

También es importante realizar otros análisis relevantes como la medición del carbono orgánico disuelto, el cual tiene fuerte influencia en el comportamiento de EPT. Este análisis debe emplearse sobre todo cuando se realizan los trabajos de invernadero. Esto se sugiere porque que la secreción de compuestos metabólicos de la planta en conjunto con los microorganismos crean condiciones químicas que no se han abordado de manera profunda y más aún, estos cambios influyen en los mecanismos de adsorción del biochar.

Literatura citada

- Agamuthu, P., Abioye, O.P. y Abdul Aziz, A. 2010. Phytoremediation of soil contaminated with used lubricating oil using *Jatropha curcas*. Journal of Hazardous Materials. 179:891-894.
- Agbogidi, O. M., Ilondu, E. M. y Ohwo, A. 2012 .Effects of crude oil as a soil contaminant on seedling growth of *Jatropha curcas* Lin. International Journal of Science and Nature. 34:758-762.
- Ainsworth, C.C., Gassman, P.L., Pilon, J.L. y Van Der Sluys, W.G.1994. Cobalt, cadmium, and lead sorption to hydrous iron oxide: Residence time effect. Soil Science Society. 58:1615-1623.
- Alkorta, I., Hernández-Allica, J., Becerril, J.M., Amezaga, I., Albizu, I. y Garbisu C. 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 BioTechnology. 3:71-90.
- Alloway, B. 1995. Heavy Metals in Soils. Blackie Academic and Professional, London, U.K. pp. 368.
- Alvarenga, P., Gonçalves, A.P., Fernandes, R.M., de Varennes, A., Vallini, G., Duarte, E. y Cunha-Queda, A.C. 2008. Evaluation of composts and liming materials in the phytostabilization of a mine soil using perennial ryegrass. Science Total Environmental. 406:43-56.
- Anju, M. y Banerjee, D. K. 2010. Comparison of two sequential extraction procedures for heavy metal partitioning in mine tailings. Chemosphere. 78:1393-1402.

- Armienta, A., Rodriguez, R., Morton, O., Cruz, O., Cenicerros, N. y Aguayo A. 2000. Health risk and sources of arsenic in the potable water of a mining area. *International Association of Hydrological Sciences*. 260:9-16.
- Arshad, M. y Frankenberger, W. T. 1991. Plant growth-regulating substances in the rhizosphere: Microbial production and functions. *Advances in Agronomy*. 62:45-151.
- Bagchi, S. S. 2013. Study of *Jatropha Curcas* Growth in Fly Ash Amended Soil. *Universal Journal of Environmental Research and Technology* 3:364-374.
- Baing, J. G., Blowes, D. W., Robertson, W. D. y Frind, E. O. 2000. Modelling of sulfide oxidation with reactive transport at a mine drainage site. *Journal Containantal Hydrology*. 41:23-47.
- Balota, E. L., Machineski, O., Truber, P. V., Scherer, A. y Souza, F. S. 2011. Physic nut plants present high mycorrhizal dependency under conditions of low phosphate availability. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 23:33-44.
- Batista, G. A. y Ayixon, S. R. 2009. Fitorremediación de metales pesados y microorganismos. *Ambiente y Desarrollo. Revista Electrónica de la Agencia del Medio Ambiente*. 22: 10-18.
- Beesley, L., Inneh, O., Norton, G.J., Moreno-Jimenez, T.P., Clemente, R. y Dawson, J. 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.
- Beesley, L. y Marmiroli, M. 2011. The immobilization and retention of soluble arsenic, cadmium and zinc by biochar. *Environmental Pollution*. 159:474-480.

- Beesley, L., Moreno-Jiménez, E. y Gomez-Eyles, J.L. 2010. Effects of biochar and greenwaste compost amendments on mobility, bioavailability and toxicity of inorganic and organic contaminants in a multi-element polluted soil. *Environmental Pollution*. 158: 2282-2287.
- Bernal, M. P., Clemente, R., Vazquez, S. y Walker, D. J. 2007. Aplicación de la fitorremediación a suelos contaminados por metales pesados en Aznalcollar. *Ecosistemas*. 2:68-82.
- Berti, W.R. y Cunningham, S.D. 1997. In-place inactivation of Pb in Pb contaminated soils. *Environmental Science Technology*. 31:1359-1364.
- Bolan, N.S., Park, J.H., Robinson, B., Naidu, R. y Huh, K.Y. 2011. Phytostabilization: A green approach to contaminant containment. in: Donald, L.S. (Ed.). *Advances Agronomic Academic Press*. pp. 145-204.
- Boularbah A., Schwartz C., Bitton G., Abouddrar W., Ouhammou A. y Louis Morel J. 2006. Heavy metal contamination from mining sites in South Morocco; Assessment of metal accumulation and toxicity in plants. *Chemosphere*. 63:811-817.
- Bradl, H.B. 2004. Adsorption of heavy metal ions on soils and soils constituents. *Journal Colloid Interface Science*. 277:1-18.
- Bridgwater, A.V. 2012. Review of fast pyrolysis of biomass and product upgrading. *Biomass Bioenergy*. 38:68-94.
- Bruemmer, G.W., Gerth, J. y Tiller, K.G. 1988. Reaction kinetics of the adsorption and desorption of nickel, zinc and cadmium by goethite. I. Adsorption and diffusion of metals. *Journal Soil Science*. 39, 37-52.

- Burgos, P., Madejón, P., Cabrera, F. y Madejón, E. 2010. By-products as amendment to improve biochemical properties of trace element contaminated soils: Effects in time. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 64:481-488.
- Cantrell, K. B., Hunt, G. P., Uchimiya, M., Novak, M. J. y Ro, K. 2012. Impact of pyrolysis temperature and manure source on physicochemical characteristics of biochar. *Bioresource Technology* 107:419-428.
- Cao, X. D. y Harris, W. G. 2010. Properties of dairy manure-derived biochar pertinent to its potential use in remediation. *Bioresource Technology* 101:5222-5228.
- Castellanos, J. Z.; Uvalle-Bueno, J. X. y Aguilar-Santelises, A. 2000. Manual de Interpretación de Análisis de Suelos y Aguas. 2ª. Edición. Instituto de Capacitación para la Productividad Agrícola. San Miguel de Allende, Gto. 226 p.
- Chaffei, C., Pageau, K., Suzuki, A., Gouia, H., Ghorbel, M.H. y Masclaux-Daubresse, C. 2004. Cadmium toxicity induced changes in nitrogen management in *Lycopersicon esculentum* leading to a metabolic safeguard through an amino acid storage strategy. *Plant Cell Physiology*. 45:1681-1693.
- Chatuvedi P. K., Seth, C. S. y Misra, V. 2006. Sorption kinetics and leachability of heavy metal from the contaminated soil amended with immobilizing agent (humus soil and hydroxyapatite). *Chemosphere*. 64:1109-1114.
- Chefetz, B., Tarchitzky, J., Deshmukh, A. P., Hatcher, P. G. y Chen, Y. 2002. Structural characterization of soil organic matter and humic acids in particle-size fractions of an agricultural soil. *Soil Science Society of America Journal*. 66:129-141.
- Cheng, C.-H., Lehmann, J., Thies, J.E., Burton, S.D. y Engelhard, M.H. 2006. Oxidation of black carbon by biotic and abiotic processes. *Journal Organic Geochemistry*. 37:1477-1488.

- Cheng, C-H., Lehmann, J. y Engelhard, M.H. 2008. Natural oxidation of black carbon in soils: changes in molecular form and surface charge along a climosequence. *Geochimica Cosmochimica Acta*. 72:1598-610.
- Chun, Y., Sheng, G.Y., Chiou, C.T. y Xing, B.S. 2004. Compositions and sorptive properties of crop residue-derived chars. *Environmental Science and Technology*. 38:4649-4655.
- Ciccu, R., Ghiani, M., Serci, A., Fadda, S., Peretti, R. y Zucca, A. 2003. Heavy metal immobilization in the mining-contaminated soils using various industrial wastes. *Mineral Enginner*.16:187-192.
- Cornelissen, G., Breedveld, G.D., Naes, K., Oen, A.M.P. y Ruus, A. 2006. Bioaccumulation of native polycyclic aromatic hydrocarbons from sediment by a polychaete and a gastropod: freely dissolved concentrations and activated carbon amendment. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 25:2349-2355.
- Cottenie A., Camerlynck, R., Verloo, M., y Dhaese, A. 1979. Fractionation and determination of trace elements in plants, soil and sediments. *Pure and Applied Chemistry*. 52:45-53.
- Crowley, D. E., Wang, Y. C., Reid, C. P. P. y Szanislo, P. J. 1991. Mechanisms of iron acquisition from siderophores by microorganisms and plants. *Plant Soil*. 130:179-198.
- Cui, Y.J., Zhu, Y.G., Zhai, R.H., Huang, Y.Z., Qiu, Y. y Liang, J.Z. 2005. Exposure to metal mixtures and human health impacts in a contaminated area in Nanning, China. *Environment International*. 31:784-790.
- Davidson, C.M., Urquhart, G.J., Ajmone-Marsan, F., Biasioli, M., da Costa Duarte, A., Díaz-Barrientos, E., Grčman, H., Hossack, I., Hursthouse, A.S., Madrid, L.,

- Rodrigues, S. y Zupan, M. 2006. Fractionation of potentially toxic elements in urban soils from five European cities by means of a harmonised sequential extraction procedure. *Analytica Chimica Acta*. 565:63-72.
- Das, D.D., Schnitzer, M.I., Monreal, C.M. y Mayer, P. 2009. Chemical composition of acid-base fractions separated from biooil derived by fast pyrolysis of chicken manure. *Bioresource Technology*. 100:6524-6532.
- Delgadillo, L. A. 2011. Fitorremediación: una alternativa para eliminar la contaminación. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 14:597-612.
- Denton, B. 2007. Advances in phytoremediation of heavy metals using plant growth promoting bacteria and fungi. *MMG 445 Basic Biotechnology*. 3:1-5.
- Denaix, L. 2007. Transfert sol- eau - plant of elements traces dans les contamines ecosystemes cultivate, Memoire of Habilitation to Diriger de Recherches. Université de Pau et des Pays d' Adour.123 p.
- Diaz, G., Azcón-Aguilar, C. y Honrubia, M. 1996. Influence of arbuscular mycorrhiza on heavy metal (Zn and Pb) uptake and growth of *Lygaeum spartum* and *Anthyllis cytisoides*. *Plant Soil*. 180:241-249.
- Díaz-Hernández, B. G., Aguirre-Medina, J. F. y Díaz-Fuentes, V.H. 2013. Rendimiento de *Jatropha curcas* L. inoculada con micorríza y aplicación de composta de caña. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 4:599-610.
- Fellet, G., Marchiol, L., Delle Vedove G. y Peressotti, A. 2011. Application of biochar on mine tailings: Effects and perspectives for land reclamation. *Chemosphere*. 83: 1262-1267.

- Fischer, L., Brümmer, G.W. y Barrow, N.J. 2007. Observations and modelling of the reactions of 10 metals with goethite: adsorption and diffusion processes. *European Journal of Soil Science*. 58:1304-1315.
- Fischerová, Z., Tlustos, P., Száková, J. y Sichirová, K. 2006. A comparison of phytoremediation capability of selected plant species for given trace elements. *Environmental Pollution*. 144:93-100.
- Freitas, H., Prasad, M. N. y Pratas, J. 2004. Plant communities tolerant to trace elements growing on the degraded soils of Sao Domingos mine in the south east of Portugal. *Environment International* Mar. 30:65-72.
- Gao, Y. y Marschner, H. 1995. Uptake, distribution, and binding of cadmium and nickel in different plant species. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*. 18: 2691-2706.
- Garófalo-Chaves, L. H., Franklin de Mesquita, E., Lima de Araujo, D. y Pereira de Franca, C. 2010. Growth, distribution and content of copper and zinc in *Jatropha curcas* L. plants. *Ciencia Agronomica*. 41:167-176.
- Giridhar, B. y Sudhakara, R. M. 2011. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi associated with plants growing in fly ash pond and their potential role in ecological restoration. *Curr Microbiology Journal*. 63:273-280.
- Gode, F. y Pehlivan, E. 2006. Removal of chromium (III) from aqueous solutions using lewatis S 100: the effect of pH, time, metal concentration and temperature. *Journal Hazardous Materials*. 36:330-337.
- González-Chávez, MC. 2005. Recuperación de suelos contaminados con metales pesados utilizando plantas y microorganismos rizosféricos. *Terra Latinoamericana*. 23:29-37.

- González-Chávez, MC., Carrillo-González, R., Wright, S.F. y Nichols, K. A. 2004. The role of glomalin, a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi, in sequestering potentially toxic elements. *Environmental Pollution*. 130:317-323.
- González-Chávez, MC., Aitkenhead-Peterson, J. A., Gentry, T. J., Zuberer, D., Hons, F. y Loeppert, R. 2010. Soil microbial community, C, N, and P responses to long-term tillage and crop rotation. *Soil Tillage Research*. 106: 285-293.
- Gouia, H., Ghorbal, M.H. y Meyer, C. 2000. Effects of cadmium on activity of nitrate reductase and on other enzymes of nitrate assimilation pathway in bean. *Plant Physiology and Biochemistry*. 38:629-638.
- Glaser B, Lehmann J. y Zech, W. 2002. Ameliorating physical and chemical properties of highly weathered soils in the tropics with charcoal a review. *Biology and Fertility of Soils*. 35:219-230.
- Glick, B. R. 2010. Using soil bacteria to facilitate phytoremediation. *Biotechnology Advances*. 28: 367-374.
- Gomez-Eyles, J.L., Sizmur, T., Collins, C.D. y Hodson, M.E. 2011. Effects of biochar and the earthworm *Eisenia fetida* on the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons and potentially toxic elements. *Environmental Pollution*. 159:616-622.
- González-Chávez, MC., J. A. Aitkenhead-Peterson, T. J. Gentry, D. Zuberer, F. y Hons, R. Loeppert. 2010. Soil microbial community, C, N, and P responses to long-term tillage and crop rotation. *Soil Tillage Research*. 106: 285-293.
- Hart, M.M. y Forsythe, J. A. 2012. Using arbuscular mycorrhizal fungi to improve the nutrient quality of crops; nutritional benefits in addition to phosphorus. *Scientia Horticulturae*. 148:206-214.

- Hartley, W., Dickinson, N.M., Riby, P. y Lepp, N.W. 2009. Arsenic mobility in brownfield soils amended with green waste compost or biochar and planted with *Miscanthus*. *Environmental Pollution*. 157:2654-2662.
- Hamzah, A., Kusuma, Z., Utomo, W.H. y Guritno, B. 2012. Siam weed (*Chromolaena odorata* L.) for phytoremediation of artisanal gold mine tailings. *Journal of tropical Agriculture*. 50:88-91.
- Hazelton P. and B. Murphy. 2007. Interpretating soil test results. What do all these numbers mean. CSIRO. Aus. Pp. 152.
- He, B. J., Zhang, Y., Funk, T. L., Riskowski, G. L. y Yin, Y. 2000. Thermochemical conversion of swine manure: an alternative process for waste treatment and renewable energy production. *American Society of Agricultural Engineers*. 43:1827-1833.
- He, Z.L.L., Yang, X.E. y Stoffella, P.J. 2005. Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 19:125-140.
- Heller, J. 1996. Physic nut. *Jatropha curcas* L. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. Institute of Plant Genetics and Crop Plant research, Gatersleben/international Plant genetic Resources Institute, Rome. pp. 66.
- Hildebrandt, U., Regvar, M. y Bothe, H. 2007. Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance. *Phytochemistry*. 68:139-46.
- Hinsinger, P.1998. How do plant roots acquire mineral nutrients? Chemical processes involved in the rhizosphere. *Advances in Agronomy*. 64:225-265.

- Houben, D., Laurent, E. y Sonnet, P. 2013. Beneficial effects of biochar application to contaminated soils on the bioavailability of Cd, Pb and Zn and the biomass production of rapeseed (*Brassica napus* L.). *Biomass and Bioenergy* 57:196-204.
- Hunt, J., DuPont, M., Sato, D. y Kawabata A. 2010. The basics of biochar: a natural soil amendment. Hawaii, US. (En línea). Consultado 11 de agosto de 2013. Disponible en <http://www.ctahr.hawaii.edu/oc/freepubs/pdf/SCM-30.pdf>.
- INE (Instituto Nacional de Ecología). Industria minera [en línea]http://www.ine.gob.mx/ueajei/publicaciones/libros/16/parte_3_12.html[consultado el 20 de mayo 2013].
- Inyang, M., Gao, B., Yao, Y., Xue, Y., Zimmerman, A.R., Pullammanappallil, P. y Cao, X. 2012. Removal of heavy metals from aqueous solution by biochars derived from anaerobically digested biomass. *Bioresource Technology*. 110:50-56.
- Iqbal, M. y Saeed, A. 2006. Entrapment of fungal hyphae in structural fibrous network of papaya wood to produce a unique biosorbent for the removal of heavy metals. *Enzyme and Microbial Technology*. 39:996-1001.
- Jia, M., Wang, F., Bian, Y., Jin, X., Song, Y., Kengara, F. O., Xu, R. y Jiang, X. 2013. Effects of pH and metal ions on oxytetracycline sorption to maize-straw-derived biochar. *Bioresource Technology*. 136: 87-93.
- Jiang, J., Ren, K. X., Tian-yu, J. y Zhuo, L. 2012. Immobilization of Cu(II), Pb(II) and Cd(II) by the addition of rice straw derived biochar to a simulated polluted Ultisol. *Journal of Hazardous Materials*. 229:145-150.
- Joner, E.J. y Leyval, C. 2001. Time-course of heavy metal uptake in maize and clover as affected by root density and different mycorrhizal inoculation regimes. *Biology and Fertility of Soils*. 33:351-357.

- Kabata, P. A. y Pendias, H., 1994. En: Trace elements in soil and plants . Press Boca Raton Florida, USA: C.R.C, pp. 215.
- Kaschl , A., Romheld, V. y Chen, Y. 2002. The influence of soluble organic matter from municipal solid waste compost on trace metal leaching in calcareous soils. Science of the Total Environment. 291:45-57.
- Kasim, A. W. 2006. Changes Induced by copper and cadmium stress in the anatomy and grain yield of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. International Journal of Agriculture and Biology. 1560:123-128.
- Kiekens, L., 1990. Zinc. In: Alloway BJ. (Ed.), Heavy metals in soils. Jhon Wiley & Sons, New York, pp. 261-279.
- Kookana, R.S., Sarmah, A.K. Zwieter, L. V., Krull, E. y Singh, B. 2011. Biochar application to soil: agronomic and environmental benefits and unintended consequences. advances in agronomy. 112:103-143.
- Kürschner, W., Stulen, L., Wagner, F. y Kuiper, P. 1998. Comparison of palaeobotanical observations with experimental data on the leaf anatomy of durmast oak [*Quercus petraea* (Fagaceae)] in response to environmental change. Annals of Botany. 81:657-664.
- Lagriffoul, A., Mocquot, B., Mench, M. y Vangronsveld, J. 1998. Cadmium toxicity effects on growth, mineral and chlorophyll contents, and activities of stress related enzymes in young maize plants (*Zea mays* L.). Plant and Soil. 200:241-250.
- Laird, D.A., Fleming, P., Davis, D.D., Horton, R., Wang, B.m y Karlen, D.L. 2010. Impact of biochar amendments on the quality of a typical Midwestern agricultural soil. Geoderma. 158:443-449.

- Lee, S., Lee, M., Chung, J., Park, J., Young, H. y Jun, G. 2013. Immobilization of lead from Pb-contaminated soil amended with peat moss. *Journal of Chemistry*. 13:6.
- Lehmann, J. 2007. Bio-energy in the black. *Frontiers in Ecology and the Environmental*. 5:381-387.
- Lehmann, J., Gaunt, J. y Rondon, M. 2006. Biochar sequestration in terrestrial ecosystems – A review. *Mitig Adapt Strat Glob Change*.11:395-419.
- Lehmann, J., Rillig, M. C., Thies, J., Masiello, C. A., Hockaday, W. C. y Crowley D. 2011. Biochar effects on soil biota: A review. *Soil Biology and Biochemistry*. 43:1812-1836.
- Liang, B., Lehmann, J., Solomon, D., Kinyangi, J., Grossman, J. y O'Neill, B. 2006. Black carbon increases cation exchange capacity in soils. *Soil Science Society America Journal*.70:1719-1730.
- Lombi, E., Hamon, R.E., Wieshammer, G., McLaughlin, M.J. y McGrath, S.P. 2004. Assessment of the use of industrial by products to remediate copper and arsenic-contaminated soil. *Journal Environmental Quality*. 33:902-910.
- Ma, L. Q., Komar, K. M., Tu, C., Zhang, W. H., Cai, Y. y Kennelley, E. D. 2001. A fern that hyperaccumulates arsenic. *Nature*. 409:579.
- Mahimairaja, S. Bolan, N.S. Adriano, D. y Robinson, B. 2005. Arsenic contamination and its risk management in complex environmental settings. *Advances in Agronomy*. 86:1-82.
- Majid, N. M. Islam, M. M. y Riasmi, Y. 2012. Heavy metal uptake and translocation by *Jatropha curcas* L. in sawdust sludge contaminated soils. *Australian Journal of Crop Science*. 5:891-898.

- Majid, N. M. Islam, M. M., Justin, V., Abdu, A. y Ahmadpour, P. 2011. Evaluation of heavy metal uptake and translocation by *Acacia mangium* as a phytoremediator of copper contaminated soil. *African Journal Biotechnology*. 10:8373-8379.
- Makkar, H. P. y Becker, K. 2009. *Jatropha curcas*, a promising crop for the generation of biodiesel and value-added coproducts. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 111:773-787.
- Manurung, R., Wever, D.A.Z., Wildschut, J., Venderbosch, R. H., Hidayat, H., van Dam, J. E. G., Leijenhurst, E. J., Broekhuis, A. A. y Heeres, H. J. 2009. Valorisation of *Jatropha curcas* L. plant parts: Nut shell conversion to fast pyrolysis oil. *Food and Bioproducts Processing*. 87:187-196.
- Marques, M. C. y Nascimento, C.W. 2013. Analysis of chlorophyll fluorescence spectra for the monitoring of Cd toxicity in a bioenergy crop (*Jatropha curcas*). *Journal of Photochemistry and Photobiology*. 127: 88-93.
- Maurya, R. Prasad, S.M. y Gopal, R. 2008. LIF technique offers the potential for the detection of cadmium-induced alteration in photosynthetic activities of *Zea Mays* L. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*. 9:29-35.
- Martin, R. F. y Gutiérrez, R. M. 2010. Estudio comparativo de la peligrosidad de jales en dos zonas mineras localizadas en el sur y centro de México. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana*. 62:43-53.
- Martin, S.M., Kookana, R.S., Van Zwieten, L. y Krull, E. 2012. Marked changes in herbicide sorption-desorption upon ageing of biochars in soil. *Journal Hazard Mater*. 232:70-78.
- McBride, M., Sauve, S. y Hendershot, W. 1997. Solubility control of Cu, Zn, Cd and Pb in contaminated soils. *European Journal of Soil Science*. 48:337-346.

- Mediavilla, S., H. Santiago y A. Escudero. 2002. Stomatal and mesophyll limitations to photosynthesis in one ever-green and one deciduous Mediterranean oak species. *Photosynthetica*. 40:553-9.
- Moursy, A. A., Aziz, H. A. y Mosfata, A. Z. 2014. The effect of irradiated and non irradiated sewage sludge application on uptake of heavy metals by *Jatropha curcas* L plants. *International Journal of Advanced Research*. 2:1072-1080.
- Naidu, R., Kookana, R. S., Summer, M. E., Harter, R. D. y Tiller, K. G. 1997. Cadmium sorption and transport in variable charge soils: a review. *Journal of Environmental Quality*. 26:602-617.
- Nardi, S., Concheri, G., Pizzeghello, D., Sturaro, A., Rella, R. y Parvoli, G. 2000. Soil organic matter mobilization by root exudates. *Chemosphere*. 41:653-658.
- Openshaw, K. 2000. A review of *Jatropha curcas*: an oil plant of unfulfilled promise. *Biomass Bioenergy*. 19:1-15.
- Ortega-Larrocea, M., Xoconostle-Cázares, B., Maldonado-Mendoza, I., Carrillo-González, R., Hernández-Hernández, J., Díaz Garduño, M., López-Meyer, M., Gómez-Flores, L. y González-Chávez, MC. 2010. Plant and fungal biodiversity from metal mine wastes under remediation at Zimapán, Hidalgo, Mexico. *Environmental Pollution*. 158:1922-1931.
- Pagnanelli, F., Moscardini, V., Giuliano, V. y Toro, L. 2004. Sequential extraction of heavy metals in river sediments of an abandoned pyrite mining area: pollution detection and affinity series *Environmental Pollution*. 133:189-281.
- Pál, M., Horváth, E., Janda, T., Páldi, E. y Szalai, G. 2006. Physiological changes and defense mechanisms induced by cadmium stress in maize. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*. 239-246.

- Pandey, A., Soccol, C.R., Nigan, P., Brand, D., Mohan, R. y Roussos, S. 2000. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. *Biochemical Engineering Journal*. 6:153-162.
- Parés, J., Arizaleta, M., Sanabria, M. E. y Garda, G. 2008. Efecto de los niveles de salinidad sobre la densidad estomática, índice estomático y el grosor de la lámina foliar en plantas de Canea papaya L. *Acta Botanica. Venezolana*. 31:27-34.
- Park, J., Choppala, G., Bolan, N., Chung, J. y Chuasavathi, T. 2011. Biochar reduces the bioavailability and phytotoxicity of heavy metals. *Plant Soil*. 348:439-451.
- Park, J., H, Lamb, D., Paneerselvam, P., Choppala, G., Bolan, N. y Chung, J. 2011. Role of organic amendments on enhanced bioremediation of heavy metalloid contaminated soils. *Journal of Hazardous Materials*. 185:549-574.
- Pehlivan, E., Yanik, B. H., Ahmetli, G. y Pehlivan, M. 2008. Equilibrium isotherm studies for uptake of cadmium and lead ions onto sugar beet pulp. *Bioresource Technology*. 99:3520-3627.
- Pietrini, F., Iannelli, M.A., Pasqualini, S. y Massacci, A. 2003. Interaction of cadmium with glutathione and photosynthesis in developing leaves and chloroplasts of *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steudel. *Plant Physiology*. 133:829-837.
- Poschenrieder, C., Gunsé, B. y Barceló, J. 1989. Influence of cadmium on water relations, stomatal resistance, and abscisic acid content in expanding bean leaves. *Plant Physiology*. 90:1365-1371.
- Puga, S., Sosa, M., Lebgue, T., Quintana, C. y Campos, A. 2006. Contaminación por metales pesados en suelos provocada por la industria minera. *Ecología Aplicada*. 5:149-155.

- Pulford, I. D., y Watson, C. 2003. Phytoremediation of heavy metal-contaminated land by trees. *Environmental International*. 29:529-540.
- Qihang, W. 2011. Phytostabilization potential of *Jatropha curcas* L. In polymetallic acid mine tailings. *International Journal of Phytoremediation*. 13:788-804.
- Rajkumar, M., y Freitas, H. 2008. Influence of metal resistant-plant growth promoting bacteria on the growth of *Ricinus communis* in soil contaminated with heavy metals. *Chemosphere* 71:834-842.
- Rajkumar, M., Sandhya, S., Prasad, M. N. V. y Freitas, H. 2012. Perspectives of plant-associated microbes in heavy metal phytoremediation. *Biotechnology Advances*. 30:1562-1574.
- Rodríguez, L., Ruiz, E., Alonso-Azcárate, J., Rincón, J. 2009. Heavy metal distribution and chemical speciation in tailings and soils around a Pb–Zn mine in Spain. *Journal of Environmental Management*. 90:1106-1116.
- Ruiz-Olivares, A. Carrillo-González, MC. y Soto-Hernández, R.M. 2013. Potential of castor bean (*Ricinus communis* L.) for phytoremediation of mine tailings and oil production. *Journal of Environmental Management*. 114:316-323.
- Rulkens, W. H., Grotenhuis, J. T. y Tichy, R. 1995. Methods for cleaning contaminated soils and sediments. In: *Heavy Metals*. W. Salomons, U. Förstner & P. Mader, eds Springer-Verlag Berlin. pp.165-191.
- Ruttens, A., Mench, M. Colpaert, J. V., Boisson, J., Carleer, R. y Vangronsveld, R. 2006. Phytostabilization of a metal contaminated sandy soil: influence of compost and/or organic metal immobilizing soil amendments on phytotoxicity and plant availability of metals. *Environmental Pollution*. 144:524-532.

- Salomons, W. 1995. Environmental impact of metals derived from mining activities: processes, predictions, prevention. *Journal Geochemistry*. 52:5-23.
- Sánchez, M.E., Lindao, E, Margaleff, D., Martínez, O. y Morán, A. 2009. Pyrolysis of agricultural residues from rape and sunflowers: production and characterization of bio-fuels and biochar soil management. *Journal Analytical and Applied Pyrolysis*. 85:142-144.
- Sandalio, L.M., Dalurzo, H.C., Gomez, M., Romero-Puertas, M.C. y del Río, L.A. 2001. Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *Journal of Experimental Botany*. 52:2115-2126.
- Shenbagavalli, S. y Mahimairaja, S. Production and characterization of biochar from different biological wastes. *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences*. 2: 197-201.
- Shi, J., Li, L. Q. y Pan, G. X. 2009. Variation of grain Cd and Zn concentrations of 110 hybrid rice cultivars grown in a low Cd paddy soil. *Journal Environmental Sciences*. 21: 168-172.
- Shrivastava, S. K. y Banerjee, D. K. 2004. Speciation of metals in sewage sludge and sludge-amended soils. *Water, Air, and Soil Pollution* 152:219-232.
- Shuman, L. M. 1999. Effect of organic waste amendments on Zinc adsorption by two soils. *Soils Science*. 164:197-205.
- Shun, G., Chao, O., Lin, T. y Jin-qiu, Z., 2010. Growth and antioxidant responses in *Jatropha curcas* seedling exposed to mercury toxicity. *Journal of Hazardous Materials*. 182:591-597.

- Silva, A.J., Nascimento, C.W.A., Gouveia-Neto, A.S. y Silva-Jr, E.A. 2012 LED-induced chlorophyll fluorescence spectral analysis for the early detection and monitoring of cadmium toxicity in maize plants. *Water, Air and Soil Pollution*. 223: 3527–3533.
- Solomon, D., Fritzsche, F., Tekalign, M., Lehmann, J. y Zech, W. 2002. Soil organic matter composition in the subhumid Ethiopian high lands as influenced by deforestation and agricultural management. *Soil Science Society of America Journal*. 66:68-82.
- Soon, Y. K. 1981. Solubility and sorption of cadmium in soils amended with sewage sludge. *Journal of Soil Science*. 32:85-95.
- Souza J.F. y Rauser W. 2003. Maize and radish sequester excess cadmium and zinc in different ways. *Plant Science*. 165:1009-1022.
- Sparks, D.L. 2001. Elucidating the fundamental chemistry of soils: past and recent achievements and future frontiers. *Geoderma*. 100:303-319.
- Stenglein S. A., Arambarri, A. M., Colares, M. N., Novoa, M. C. y Vizcaíno, C. E. 2003. Leaf epidermal characteristics of *Lotus* subgenus *Acmispon* (Fabaceae: Loteae) and a numerical taxonomic evaluation. *Canadian Journal Botany*. 81:933-944.
- Sujana, P., Lanya, I., Subadiyasa, I. N. N. y Suarna, I. W. 2014. The effect of dose biochar and organic matters on soil characteristic and corn plants growth on the land degraded by garment liquid waste. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*. 4:77-88.

- Suppadit, T., Kitikoon, V., Phubphol, A. y Neumnoi, P. 2012. Effect of quail litter biochar on productivity of four new physic nut varieties planted in cadmium-contaminated soil. *Chilean Journal of Agricultural Research*. 72:125-132.
- Thies, J. E. y Rillig, M. C. 2009. Characteristics of biochar: biological properties. *Biochar for Environmental Management: Science and Technology*. Earthscan, London, pp. 85–105.
- Tordoff, G.M., Baker, A. J. M. y Willis, A. J. 2000. Current approaches to the revegetation and reclamation of metalliferous mine wastes. *Chemosphere*. 4:219-228.
- Uchimiya, M., Bannon, D.I. y Wartelle, L.H. 2012. Retention of heavy metals by carboxyl functional groups of biochars in small arms range soil. *Journal Agricultural Food Chemistry*. 60:1798-1809.
- Uchimiya, M., Lima, I. M., Klasson, T., Chang, S., Wartelle, L.H. y Rodgers J.E. 2010. Immobilization of heavy metal ions (CuII, CdII, NiII, and PbII) by broiler litter-derived biochars in water and soil. *Journal Agricultural Food Chemistry*. 58:5538-5544.
- Uchimiya, M., Klasson, T. K., Wartelle, L.H. y Lima, I. M. 2011. Influence of soil properties on heavy metal sequestration by biochar amendment: 1. Copper sorption isotherms and the release of cations. *Chemosphere*. 82:1431-1437.
- Uzoma, K.C., Inoue, M., Andry, H. Fujimaki. H., Zahoor, A.. y Nishihara, E. 2011. Effect of cow manure biochar on maize productivity under sandy soil condition. *Soil Use Manage*. 27:205-212.

- Velasco, V. J., Ferrera-Cerrato, R. y Almaraz-Suárez, J. J. 2001. Vermicomposta, micorriza arbuscular y *Azospirillum brasilense* en tomate de cáscara Terra. 19: 241-248.
- Vamerali, T., Bandiera, M. y Mosca G. 2010. Field crops for phytoremediation of metal-contaminated land: A review. *Environmental Chemistry Letters*. 8:1-17.
- Varun, M., D'Souza, R., Pratas, J. y Manoj, S. 2012. Metal contamination of soils and plants associated with the glass industry in north central India: prospects of phytoremediation. *Environ Science and Pollution Research*. 19: 269-281.
- Wang, F., Wang, L, Shi Z, Li. y Song , Z. 2012. Effects of AM inoculation and organic amendment, alone or in combination, on growth, P nutrition, and heavy-metal uptake of tobacco in Pb–Cd-contaminated soil. *Journal of Plant Growth Regulation*. 31:549–59.
- Wang, G., He, C. y Bai, I. 2000. Physiological responses to oxidative and heavy metal stresses in seedlings of rice paddy, *Oryza sativa* L. *Bulletin of Environmental, Contamination and Toxicology*. 65:514-521.
- Wang, H., Zhao, S.C., Liu, R.L. Zhou, W. y Jin, J.Y. 2009. Changes of photosynthetic activities of maize (*Zea mays* L.) seedlings in response to cadmium stress. *Photosynthetica*. 47:277–283.
- Wang, Y., Wang, L., Fang, G., Herath, H. M. S. K., Wang, Y., Cang., L., Xie, Z. y Zhou D. 2013. Enhanced PCBs sorption on biochars as affected by environmental factors. Humic acid and metal cations. *Environmental Pollution*. 172: 86-93.
- Webster, G. L. 1994. Synopsis of the genera and suprageneric taxa of Euphorbiaceae. *Annals Missouri Botanical Garden*.

- Weissenhorn, I., Leyval, C., Belgy, G. y Berthelin, J. 1995. Arbuscular mycorrhizal contribution to heavy metal uptake by maize (*Zea mays* L.) in pot culture with contaminated soil. *Mycorrhiza*. 5:245–251.
- Windauer, L., Martínez, J., Rapoport, D., Wassner, D. y Benech-Arnold, R. 2012. Germination responses to temperature and water potential in *Jatropha curcas* seeds: a hydrotime model explains the difference between dormancy expression and dormancy induction at different incubation temperatures. *Annals of Botany*. 109: 265-273.
- Wong, M. H. 2003. Ecological restoration of mine degraded soils with emphasis on metal contaminated soils. *Chemosphere*. 6:775-780.
- Yadav, K. S., Juwarkar, A. A. Kumar, G. P, Thawale, P. R., Singh, S. K. y Chakrabarti, T. 2009. Bioaccumulation and phyto-translocation of arsenic, chromium and zinc by *J. curcas* L: Impact of dairy sludge and biofertilizer. *Bioresource Technology*. 100:4616-4622.
- Yang, X-E., Jin, X-F., Feng, Y. y Islam, E. 2005. Molecular mechanisms and genetic basis of heavy metal tolerance/hyperaccumulation in plants. *Journal of International Plant Biology*. 47:1025-1035.
- Yu, X.Y., Ying, G.G. y Kookana, R.S. 2009. Reduced plant uptake of pesticides with biochar additions to soil. *Chemosphere*. 76:665-671.
- Zaragoza, D.V., Carrillo, R. y Gutiérrez, C. M. 2011. Lead sorption–desorption from organic residues. *Environmental Technology*. 32:353-361.
- Zhang, S.Y., Hong, R.Y., Cao, J.P. y Takarada, T. 2009. Influence of manure types and pyrolysis conditions on the oxidation behavior of manure char. *Bioresource Technology*. 100:4278-4283.

Zheng, R., Chen, Z., Cai, C., Wang, X., Huang, Y., Xiao, B. y Sun, G. 2013. Effect of biochars from rice husk, bran and straw on heavy metal uptake by pot grow wheat seedling in a historically contaminated soil. *BioResources*. 8:5965-5982.

Zimmerman, A.R. 2010. Abiotic and microbial oxidation of laboratory-produced black carbon (biochar). *Environmental Science Technology*. 44:1295-1301.

Difusión de resultados en reuniones científicas

Los principales resultados esta investigación de tesis se han difundido en cuatro congresos que se citan a continuación:

González- Chávez, C., Carrillo- González, R. y Hernández-Godínez, I. Estabilización de metales en suelos contaminados con biochar y microorganismos para rehabilitación. IV Simposio Internacional de Carbono en México. Mayo, 21-24 de 2013. Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, Texcoco, Edo. de México.

Hernández-Godínez, I., González- Chávez, C. y Carrillo- González, R. Biochar y *Jatropha curcas* para la estabilización de elementos potencialmente tóxicos presentes en residuos mineros. Reunión anual Unión Geofísica Mexicana, A.C. Noviembre 3-8 de 2013. Puerto Vallarta, Jalisco.

González-Chávez, C., Carrillo- González, R., Perea-Veléz, S., Noguez-Iniesta, J., Hernández-Godínez, I. Interactions plants-soil microorganisms for remediation of metal mine residues. 11th International Phytotechnologies Conference, Heraklion, Crete, from 30 September to 3 October of 2014.

González-Chávez, C., Carrillo- González, R., Perea-Veléz, S., Noguez-Iniesta, J., Hernández-Godínez, I. 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.

Estabilización de metales en suelos contaminados con biochar y microorganismos para rehabilitación

González-Chávez Ma. del Carmen, Carrillo González Rogelio, Hernández Godínez

Isabel

Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. km 36.5 Carr Mexico-Texcoco, C.P. 56230, Texcoco, Estado de México, México.

Resumen

La contaminación por metales pesados es un tema ambiental global muy serio, debido a que éstos constituyen un riesgo intrínseco porque, al no degradarse son de los contaminantes más difíciles de tratar. Por tanto, numerosas alternativas de remediación se han planteado para mitigar el riesgo de exposición a estos contaminantes en el suelo. Nuestro grupo de investigación se centra en el uso de plantas nativas y la asistencia de microorganismos simbióticos (micorriza arbuscular) y benéficos del suelo (bacterias promotoras del crecimiento de plantas) para fitorremediar sitios contaminados. Plantea también, el uso de enmiendas orgánicas que favorezcan la estabilización de estos contaminantes. Ahora sugiere que materiales estabilizados, como es el biochar, pueden ser útiles como una nueva alternativa para mejorar la calidad el suelo. El biochar artificial resulta del proceso de pirolisis de material orgánico. Al ser un componente estable tiene fuerte implicación en la mitigación de cambio climático y contribución al uso sostenible de la tierra. Se está probando como fertilizante y se sugiere que puede representar una alternativa prometedora de remediación *in situ* para estabilizar metales pesados en el suelo. El biochar puede reducir la biodisponibilidad y lixiviación de estos elementos a través de adsorción y otras reacciones físico-químicas. Se plantean recomendaciones para el uso del biochar, plantas y microorganismos benéficos para la remediación asistida de suelos contaminados con residuos de mina y asegurar un uso sostenible y seguro.

Palabras clave: remediación asistida, contaminación del suelo, minería.

Biochar y *Jatropha curcas* para la estabilización de elementos potencialmente tóxicos presentes en residuos mineros

Hernández Godínez Isabel, González-Chávez Ma. del Carmen, Carrillo González Rogelio*

Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. km 36.5 Carr Mexico-Texcoco, Texcoco, estado de México, México. C.P. 56230. *crogelio@colpos.mx

La contaminación de los suelos por elementos potencialmente tóxicos (EPT) representa un problema ambiental muy importante. Los EPT al no degradarse persisten en el suelo por periodos muy largos, al acumularse hacen del suelo un sistema poco apto para soportar la vida y pueden causar la pérdida gradual de los ecosistemas. La magnitud de esta problemática ha sido la pauta para el desarrollo de diferentes alternativas que contribuyen a la reducción de la disponibilidad de los EPT y sus efectos tóxicos. Entre las técnicas que destacan están la fitorremediación y el uso de enmiendas. El presente trabajo plantea la combinación de estas técnicas (*Jatropha curcas* y biochar) para la estabilización de EPT presentes en residuos de minas; las cuales pueden asistir el efecto de remediación física y química. La fitorremediación involucra el uso de ciertas especies vegetales para absorber, metabolizar o transformar contaminantes del ambiente. Dentro de la fitorremediación se considera la fitoestabilización, la cual es una alternativa biológica que emplea plantas con la finalidad de inmovilizar los EPT presentes en la interface de la raíz y el suelo. Otros alcances de esta técnica son la mejora visual del paisaje y el aumento de la diversidad y actividad de los microorganismos benéficos de la rizósfera (ambiente influenciado por las raíces de las plantas). Los microorganismos actúan sinérgicamente con la planta para inmovilizar los EPT, mediante la alteración de su movilidad y biodisponibilidad. *Jatropha curcas* es una planta que ofrece múltiples beneficios en suelos contaminados. La abundancia de sus raíces puede contribuir a la generación de agregados en el suelo, disminuir paulatinamente el deterioro de la erosión del suelo y el lavado de nutrientes, además proveer una superficie en donde se puede llevar a cabo el restablecimiento de los microorganismos benéficos. Se ha visto que esta planta tiene la capacidad de estabilizar EPT por medio de exudados que alteran el pH, las reacciones de óxido-reducción y el secuestro de EPT en la raíz. El uso de enmiendas favorece el balance del pH, proporciona material orgánico, mejora la textura, porosidad, entre otros efectos benéficos, lo cual contribuye al restablecimiento de la comunidad microbiana de un suelo contaminado. El biochar o biocarbón es un material posiblemente útil para mejorar suelos contaminados. Éste resulta del proceso de pirolisis de materiales orgánicos. Se ha demostrado que este material incrementa el secuestro de carbono y nitrógeno, reduce la biodisponibilidad y lixiviación de los EPT a través de adsorción y otras reacciones físico-químicas.

Este trabajo forma parte del proyecto FORDECyT 191357.

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 Noguez 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.



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 1

Colegio 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 precondicionamiento 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. Cusco, Perú. 9 al 15 de noviembre de 2014.