

*Artículo original de Investigación*

## **Fitorremediación de un residuo de mina asistida con enmiendas y bacterias promotoras de crecimiento**

**Perea-Vélez Yazmín Stefani<sup>1</sup>, Carrillo-González Rogelio<sup>1</sup>, Solís-Domínguez Fernando Amílcar<sup>2</sup>, González-Chávez Ma. del Carmen A.<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>Colegio de Postgraduados, Programa de Edafología, Carretera Méxco-Texcoco km 36.5, Texcoco, México. C.P. 56230.

<sup>2</sup>Universidad Autónoma de Baja California Facultad de Ingeniería.

\*Autor de correspondencia: [carmeng@colpos.mx](mailto:carmeng@colpos.mx)

### **Resumen**

El objetivo del presente trabajo fue evaluar estiércol ovino fresco,  $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  y vermicompost para estabilizar elementos potencialmente tóxicos (EPTs) en un residuo de mina, y el efecto de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV) en *R. communis*. Las enmiendas mejoraron las propiedades físicas y químicas del residuo. En adición, las concentraciones de Pb y Zn extractables con DTPA-TEA- $\text{CaCl}_2$  se redujeron 22% y 41%, respectivamente. La biomasa aérea y área foliar de *Ricinus communis* se triplicó, y la altura se duplicó por efecto de las enmiendas y éstas en conjunto con la inoculación de BPCV con respecto al tratamiento testigo. No obstante, las enmiendas tuvieron mayor influencia sobre el crecimiento de *R. communis* que la inoculación con BPCV. Las concentraciones de Pb y Cd en la parte aérea fueron mayores a los umbrales de fitotoxicidad en todos los tratamientos. Sin embargo, los factores de bioacumulación de Cd mostraron que las BPCV disminuyen significativamente la acumulación de este elemento en tejido aéreo en comparación con el tratamiento testigo y las enmiendas. No se observaron síntomas visibles de toxicidad (necrosis, clorosis, marchitez o malformaciones) en las plantas de los tratamientos con enmienda e inoculación de BPCV. Las concentraciones de malondialdehído y  $\text{H}_2\text{O}_2$  fueron significativamente menores en comparación con las plantas del tratamiento testigo. Las plantas que crecieron en el residuo de mina presentaron baja biomasa y la concentración de Zn en el follaje fue 1.5 veces mayor a los umbrales fitotóxicos. El análisis de correlación lineal sugiere que la alta concentración de Zn fue el principal factor en disminuir la tasa de fotosíntesis, biomasa aérea y concentración de clorofila en las plantas testigo. Así mismo, este elemento estimuló la generación de especies reactivas del oxígeno como el  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Finalmente, después de establecer *R. communis* en el residuo de mina la concentración de Pb extractable con DTPA disminuyó 50% aproximadamente en todos los tratamientos, aparentemente la planta ayuda a estabilizarlo.

**Palabras clave:** *estiércol ovino, vermicompost, estrés oxidativo, elemento potencialmente tóxico, fitorremediación.*

## Abstract

The aim of this research was to evaluate the stabilization of potentially toxic elements (PTE) with fresh sheep manure, vermicompost,  $K_2HPO_4$  and lime addition in a tailing heaps and the effect of plant growth promoting bacteria (PGPB) on *Ricinus communis* grown in a mine waste. The amendments improved both physical and chemical properties of the mine tailings. In addition, the concentrations of Pb and Zn (DTPA-TEA- $CaCl_2$  extractables) were reduced 22% and 41%, respectively, after application of the amendments. The biomass and foliar area of *R. communis* was three times higher than the control treatment. Also, the plant height was twice higher as result of the amendments addition and the inoculation of PGPB. The amendments had major influence on the growth of *R. communis* compared to inoculation with PGPR. The concentrations of Pb and Cd in the shoot were higher than the phytotoxicity thresholds in all treatments. However, Cd bioaccumulation factors showed that PGPB significantly decreased the accumulation of this element in aerial tissue compared to the control and the amendments. No visible symptoms of toxicity (necrosis, chlorosis nor malformations) were observed in plants with amendment treatments and inoculation of PGPB. The malondialdehyde and  $H_2O_2$  content in the amendment and PGPB inoculated treatments were lower than the control treatment. On the other hand, low biomass was observed in plants grown in mine waste and the concentration of Zn in the foliage was 1.5 times higher than the phytotoxic thresholds. The linear correlation analysis suggests that Zn was the main factor in reducing the rate of photosynthesis, biomass and chlorophyll concentration in the control plants. Also this element caused reactive oxygen species such as  $H_2O_2$ . Finally, after the establishment of *R. communis* in the mine waste, the Pb concentration extractable with DTPA decreased about 50% in all treatments.

**Keywords:** *sheep manure, vermicompost, oxidative stress, potentially toxic element, phytoremediation*

## 1. Introducción

La fitorremediación surgió como una alternativa amigable con el ambiente y económica que se puede aplicar *in situ*. Se estima que su costo puede ser de 10 a 1000 veces menor que la excavación y confinamiento del suelo (Zhu et al. 1999). Pese a las ventajas que ofrece la fitorremediación, su aplicación en los residuos de mina se limita por la falta de nutrientes esenciales como el N, P y K; carencia de materia orgánica, pH extremos, contenido de humedad relativamente bajo, la estructura compactada que poseen estos residuos y el alto contenido de EPTs (Mendez y Maier, 2008). Los factores anteriores son obstáculos para el desarrollo

de cubiertas vegetales y comunidades microbianas. Razón por la cual se han ideado estrategias para mejorar los procesos de fitorremediación.

La fitorremediación asistida con enmiendas es un procedimiento eficaz para reducir la biodisponibilidad de los EPTs, tanto en suelos contaminados como en residuos de mina. Además de la inmovilización de EPTs en el suelo, las enmiendas pueden mejorar la fertilidad del residuo mediante incremento del pH, contenido de materia orgánica y la actividad biológica, que facilitan el establecimiento de plantas (Branzini y Zubillaga, 2010).

La participación de los microorganismos también puede mejorar la eficiencia de la fitorremediación, debido a que éstos son

capaces de alterar la biodisponibilidad de los EPTs (Kidd *et al.* 2009). Además, la asociación planta-microorganismo mejora tanto la tolerancia de las plantas a los EPTs y la producción de la biomasa, a través de metabolitos como el ácido indolacético (AIA), los sideróforos y algunos ácidos orgánicos; así como enzimas que alteran los niveles de hormonas en las plantas (Rajkumaret *al.* 2012).

En los últimos años, varios autores (Rajkumar y Freitas, 2008; Ruiz-Olivares *et al.* 2013) sugieren cultivar plantas para obtener materia prima para la generación de bioenergía en sustratos contaminados con EPTs. El uso de *Ricinus communis* en procesos de fitorremediación ofrece diversas ventajas. Se induce la formación de suelo o se mejora la calidad del suelo a través de la estabilización de los EPTs, se incrementa el valor económico de los suelos contaminados, se producen diversos bioproductos (biomasa, aceite, torta) y se suman servicios ambientales como secuestro de carbono (Ruiz-Olivares *et al.* 2013 y González-Chávez *et al.* 2014). Por lo antes expuesto, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV) y enmiendas en el crecimiento de *R. communis* en un residuo de mina para la estabilización de EPTs.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1. Origen del residuo de mina, enmiendas, microorganismos y semillas

El residuo de mina se tomó del pasivo ambiental denominado Santa María del distrito minero de Zimapán, Hidalgo, México (20°44'11.78"N, 99°23'55.55'O). Las enmiendas que se usaron fueron estiércol ovino (proveniente de la granja del Campus Montecillo, Colegio de Postgraduados), CaCO<sub>3</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y

vermicompost (producido con desechos de jardín, cocinas y estiércol caballar).

Las bacterias denominadas N9 y Mc188 se aislaron de la rizósfera y rizoplasma de plantas de *Ricinus communis* y *Prosopis laevigata* establecidas en residuos de mina de Zimapán. La cepa N9 es capaz de producir ácido indolacético (AIA; 11.12±0.04 µg mL<sup>-1</sup>), la enzima ACC desaminasa (1.13±0.30 µM-α-cetobutirato mg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>), sideróforos y solubilizar fósforo inorgánico (2.42±0.41 µg mL<sup>-1</sup>). La cepa Mc188 produce AIA (10.73±0.04 µg mL<sup>-1</sup>), la enzima ACC desaminasa (1.79±0.04 µM-α-cetobutirato mg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) y solubiliza fósforo inorgánico (3.39±0.96 µg mL<sup>-1</sup>).

Se utilizó la accesión SF7 de *R. communis* que se obtuvo de residuos mineros (Ruiz-Olivares *et al.* 2013), aparentemente adaptada a fuerte estrés abiótico. También se eligió porque produce semillas de gran tamaño y tiene características agronómicas relevantes.

### 2.2. Diseño de experimentos

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

### 2.3. Preparación de mezcla residuo de mina con enmiendas

Se agregaron enmiendas con la finalidad de reducir las concentraciones disponibles de EPTs en el residuo de mina y aportar nutrientes para el desarrollo de *R. communis*. En un recipiente de 150x60 cm se colocaron y homogenizaron 30 kg de residuo de mina y 3 kg de estiércol ovino (correspondiente a 10% de enmienda). En invernadero, la mezcla se sometió a periodos (100 días) de humedecimiento y secado para su equilibrio. Para ello se agregó agua correspondiente a

80% de la humedad a capacidad de campo. Posteriormente, 75 g de  $\text{CaCO}_3$ , 2.7 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  y 3 kg de vermicompost se agregaron a la mezcla. El residuo de mina con enmiendas se equilibró durante 20, 7 y 10 días, respectivamente, en las mismas condiciones. El manejo del residuo de mina sin enmiendas fue similar. Después de la incubación del residuo de mina y la mezcla se determinaron las variables: densidad aparente y real, volumen de poros, humedad a capacidad de campo, resistencia a la penetración, pH, conductividad eléctrica (CE), materia orgánica, P disponible, N inorgánico y concentración de EPTs extractables. Los análisis se realizaron por triplicado.

La densidad aparente y real se realizó con los métodos descritos por Ansorena (1994), a partir de los datos obtenidos se calculó el espacio poroso (Ansorena, 1994). La resistencia a la penetración se hizo con un penetrómetro de resorte. La humedad a capacidad de campo se estimó colocando 50 g de residuo o mezcla en embudos Büchner y se les agregó 50 mL de agua destilada. Las muestras se dejaron drenar durante 24 h y transcurrido ese tiempo, se determinó el porcentaje de humedad.

Una suspensión de residuo de mina o mezcla con agua relación 1:2 se usó para medir pH (Jackson, 1964). Después de 24 h de equilibrio en la misma suspensión se midió la CE (Richards, 1973). La concentración extractable de EPTs se determinó por el método de DTPA-TEA- $\text{CaCl}_2$  propuesto por Lyndsay y Norvell (1978). El contenido de P disponible se realizó por el método Olsen (Olsen *et al.*, 1954). Mientras que el porcentaje de materia orgánica se analizó a través del método de incineración (Dean, 1974). La extracción de N inorgánico se hizo con KCl 2N (Bremner, 1965).

#### **2.4. Preparación de inóculo**

Las cepas bacterianas se sembraron en caldo nutritivo durante 48 h a 30 °C y 180

oscilaciones por minuto. Después, los cultivos se centrifugaron a 9 000 g por 10 min. Las pastillas celulares se lavaron dos veces con solución estéril NaCl 0.9%. El inóculo bacteriano se preparó resuspendiendo las pastillas celulares en solución de NaCl 0.9% estéril hasta obtener una densidad óptica de 0.5 a 600 nm, equivalente a  $1 \times 10^9$  bacterias  $\text{mL}^{-1}$ . El inóculo se preparó justo antes de su uso.

#### **2.5. Establecimiento del experimento en invernadero**

Las semillas de *R. communis* se limpiaron superficialmente alcohol 70% (v/v), se enjuagaron con agua destilada estéril y remojaron durante 30 min en agua estéril. En condiciones de esterilidad, las semillas se sembraron en recipientes de plástico con 50 g de sustrato turba:agrolita:vermiculita (relación 3:1:1, pH 5.8). Las semillas se mantuvieron en invernadero durante 8 días. Posteriormente, plántulas de tamaño similar se seleccionaron y se trasplantaron a bolsas de plástico de 15x45 cm que contenían el residuo de mina o la mezcla. 24 h después del trasplante, las plántulas de *R. communis* se inocularon con 10 mL de suspensión bacteriana en concentración de  $1 \times 10^9$  células  $\text{mL}^{-1}$ . En el caso de los tratamientos sin inoculación (RM y RM+E) se adicionaron 10 mL de la solución estéril de NaCl 0.9%. Las plantas de *R. communis* se mantuvieron en invernadero durante 65 días. El sustrato se mantuvo a 80% de la humedad de capacidad de campo. Antes de la cosecha de las plantas, la actividad fotosintética se evaluó con ayuda de un medidor de fotosíntesis portátil (TPS-2 Portable Photosynthesis System).

#### **2.6. Cosecha y evaluación**

Las variables medidas fueron: altura de planta, área foliar, longitud y volumen radical, biomasa seca, concentración de clorofila (a, b y total), malondialdehído (MDA),  $\text{H}_2\text{O}_2$ , y EPTs.

El área foliar se determinó con un integrador electrónico (LI-COR-3100). Mientras que la altura de la planta y la longitud radical total se midió con una regla. Para medir el volumen radical, la raíz se colocó en una probeta con volumen de agua conocido y se registró el volumen de agua que se desplazó por introducción de la raíz.

La extracción de clorofila se realizó con solución de acetona 80% (v/v) y la concentración se calculó con las ecuaciones propuestas por Porra (2005). La concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y de MDA en hojas y raíz se hizo de acuerdo con la metodologías descritas por Sergiev *et al.*

(1968) y Velikova *et al.* (2000), respectivamente.

El material vegetal restante se colocó en bolsas de papel y se secó a 60 °C durante 72 h, para medir posteriormente la biomasa seca de cada planta. Para determinar la concentración de EPTs en raíz y follaje, se hizo una digestión ácida con HNO<sub>3</sub> (método EPA 3052A), posteriormente las muestras se analizaron por el método de flama en un espectrofotómetro de absorción atómica.

Posterior al análisis de EPTs, el factor de bioacumulación (FB) y el factor de translocación (FT) se calcularon como lo indican las siguientes fórmulas (Shi y Cai, 2009):

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

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

### **2.7. Tinción vital y colonización bacteriana en raíces de *R. communis***

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

### **2.8. Caracterización química del residuo de mina y mezcla después del establecimiento de *R. communis***

Al final del experimento, el sustrato rizosférico (residuo de mina y mezcla) se

secó a temperatura ambiente y a la sombra. Posteriormente se tamizó y homogeneizó. Se evaluaron las variables de pH, CE, materia orgánica, P disponible, N inorgánico y concentración de EPTs extractables con DTPA con las metodologías antes descritas.

### **2.9. Capacidad de producción de ácido indolacético de microorganismos nativos del residuo de mina y de la mezcla residuo de mina con enmiendas.**

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

Para inactivar la actividad enzimática se agregaron 2 mL de solución de ácido tricloroacético 5% (m/v) y 1 mL de solución de CaCl<sub>2</sub> 0.5 M. Las muestras se filtraron con papel Whatman No. 2. Finalmente, 3 mL del filtrado se depositaron en un tubo de

ensaye y se agregaron 2 mL de reactivo de Salkowski. La mezcla se incubó durante 30 min a 25 °C en la oscuridad. La absorbancia de la solución se midió a 535 nm y el contenido de AIA se determinó comparando la absorbancia de la muestra contra una curva de calibración estándar (Ingo, 1997).

### **2.10. Análisis estadístico**

Se realizó un análisis de varianza y una comparación de medias usando la prueba de diferencia significativa honesta de Tukey (DSH) con nivel de significancia de  $\alpha=0.05$ . También se realizó un análisis de correlación de Pearson ( $\alpha=0.05$ ). Los datos obtenidos del experimento se analizaron con el programa estadístico R 3.0.2 (R Core Team, 2013)

## **3. Resultados**

### **3.1. Propiedades fisicoquímicas del residuo de mina y mezcla**

Las enmiendas redujeron significativamente la densidad aparente del residuo, de  $1.64\pm 0.03$  g cm<sup>-3</sup> a  $1.28\pm 0.00$  g cm<sup>-3</sup>. Como consecuencia, el volumen de poros aumentó de  $42.55\pm 2.71\%$  a  $49.05\pm 6.11\%$ , sin embargo, este cambio no fue estadísticamente significativo ( $p = 0.16$ ).

Las enmiendas también aumentaron la retención de humedad del residuo significativamente de  $26.12 \pm 0.61\%$  a  $35.30\pm 0.29\%$  de humedad a capacidad de campo. Mientras que la resistencia a la penetración fue  $1.52\pm 0.27$  y  $2.02\pm 0.25$  kg cm<sup>-2</sup> para el residuo de mina y la mezcla residuo con enmiendas, respectivamente, las cuales fueron significativamente diferentes.

El pH del residuo cambió de neutro a medianamente alcalino (NOM-021-SEMARNAT-2000) por efecto de las enmiendas (Tabla 1), y la CE de muy ligeramente salino a fuertemente salino (NOM-021-SEMARNAT-2000). El contenido de materia orgánica, P disponible y N inorgánico también aumentó

significativamente como consecuencia de la aplicación de las enmiendas (Tabla 1).

Además de los cambios fisicoquímicos inducidos por las enmiendas en el residuo, también estabilizaron significativamente Pb y Zn (22% y 41%, respectivamente) y causaron la solubilización de Cu (aproximadamente 46%). No hubo cambios significativos en la concentración de Cd (Tabla 1).

### **3.2. Concentración de EPTs y propiedades químicas del sustrato después del establecimiento de *R. communis***

Después del establecimiento de *R. communis*, el pH disminuyó 0.25 unidades en el tratamiento testigo y 0.47 unidades en los tratamientos con enmienda e inoculación bacteriana (Tabla 1). Así mismo, la CE de la mezcla disminuyó significativamente (22%) en los tratamientos RM+E, RM+E+N9 y RM+E+Mc188 con respecto a la CE al inicio del experimento. No se observaron cambios significativos ( $p=0.80$  y  $p=0.49$ ) en el contenido de materia orgánica, pero si en el contenido de P disponible. En el tratamiento testigo la concentración de P aumentó de bajo a alto (Olsen *et al.* 1954; Tabla 1), y en los tratamientos con enmiendas e inoculación bacteriana se encontró que el P disponible aumentó aproximadamente 2.4 veces.

**Tabla 1.** Propiedades químicas del residuo de mina (RM) y la mezcla residuo de mina con enmienda (RM+E) e inoculación bacteriana (RM+E+N<sub>9</sub>, RM+E+Mc188) antes y después del establecimiento de *R. communis*.

Variable	Tratamiento (inicio experimento)			Tratamiento (final del experimento)		
	RM	RM+E	RM	RM+E	RM+E+N <sub>9</sub>	RM+E+Mc188
pH	7.34±0.01 b A	8.26±0.01 a A	7.09±0.09 b B	7.79±0.03 a B	7.78±0.03 a B	7.79±0.04 a B
CE (ds m <sup>-1</sup> )	2.1±0.02 b A	10.0±0.07 a A	2.12± 0.02 b A	3.88± 0.43 a B	3.67±0.66 a B	4.15±0.53 a B
Materia orgánica (%)	3.68±0.35 b A	8.55±0.83 a A	3.64±0.19 b A	8.71±0.52 a A	9.11±1.74 a A	8.10±.80 a A
P disponible (mg kg <sup>-1</sup> )	5.92±0.60 b B	149.78±29.74 a B	16.2±1.9 b A	359.8±67.1 a A	354.7±29.1 a A	372.7±34.3 a A
N inorgánico (mg kg <sup>-1</sup> )	6.99±3.50 b A	430.04±37.03 a A	11.29±8.38 b A	48.54±17.05 a B	43.70±33.69 a B	68.75±18.95 a B
<b>FPTs extractables con DTPA-TEA-CaCl<sub>2</sub></b>						
Cu (mg kg <sup>-1</sup> )	9.2±0.8 b A	13.4±0.5 a A	7.4±0.3 b B	13.2±0.4 a A	13.7±1.8 a A	13.8±1.1 a A
Zn (mg kg <sup>-1</sup> )	131.4±7.6 a B	77.7±1.6 b B	179.5±6.1 a A	96.5±5.1 b A	101.4±13.6 b A	98.1±10.3 b A
Pb (mg kg <sup>-1</sup> )	104.1±3.1 a A	81.0±3.7 b A	50.8±4.8 b B	68.0±3.9 a B	65.7±4.8 a B	67.2±6.7 a B
Cd (mg kg <sup>-1</sup> )	1.7±0.1 a A	1.8±0.1 a A	1.5±0.1 b A	2.0±0.1 a A	1.9±0.2 a A	2.0±0.2 a A

Los valores son medias y desviación estándar de  $n=6$ ; comparaciones significativas ( $\alpha=0.05$ ). Letras en minúscula representan la comparación entre tratamientos. Letras en mayúsculas designan la comparación antes y después del experimento (RM vs RM; RM+E vs RM+E, RM+E+N<sub>9</sub>, RM+E+Mc188).

El N inorgánico disminuyó significativamente en los tratamientos RM+E, RM+E+N9 y RM+E+Mc188 (Tabla 1). No se encontró diferencia entre el tratamiento con enmienda y la inoculación bacteriana en todas las variables que se evaluaron (pH, CE, MO, P disponible y N inorgánico).

Al comparar las concentraciones de EPTs, antes y después del experimento, no se encontraron cambios significativos en el contenido de Cd (Tabla 1). Aproximadamente 50% de Pb extractable se estabilizó en todos los tratamientos al final del experimento. La menor concentración extractable de Pb se encontró en el tratamiento testigo. La concentración extractable de Zn aumentó entre 24% y 30% en comparación con el contenido de Zn antes del experimento. La mayor concentración de Zn se encontró en el tratamiento testigo y no se detectó diferencia significativa entre la adición de enmiendas y la inoculación bacteriana (Tabla 1).

### **3.3. Capacidad de producción de ácido indolacético de microorganismos nativos del residuo de mina, mezcla residuo de**

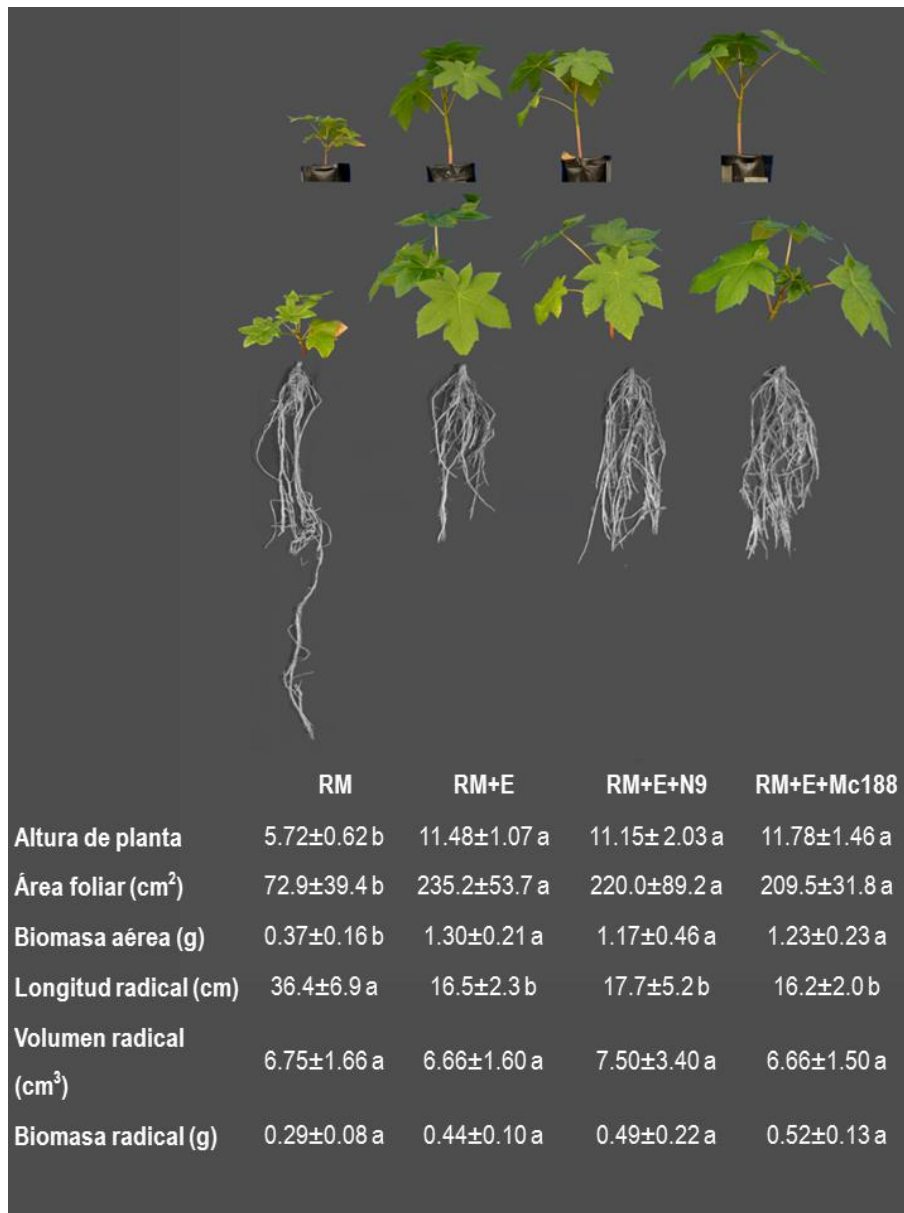
### **mina con enmiendas e inoculación bacteriana.**

La concentración de AIA fue  $0.34 \pm 0.01$ ,  $0.31 \pm 0.02$ ,  $0.29 \pm 0.03$  y  $0.27 \pm 0.01$  mg g<sup>-1</sup> en los tratamientos RM+Mc188, RM+E+N9, RM y RM+E, respectivamente. No se encontró diferencia significativa entre el tratamiento testigo, la adición de enmiendas y la inoculación de la bacteria N9.

### **3.4. Efecto de enmiendas e inoculación bacteriana sobre el crecimiento de *R. communis***

La biomasa aérea y área foliar fue tres veces mayor en las plantas de los tratamientos con enmienda e inoculación de BPCV en comparación con las plantas testigo (Figura 1). La altura de *R. communis* se duplicó por efecto de las enmiendas y la inoculación bacteriana (Figura 1). No se observaron diferencias significativas en volumen y biomasa radical entre los tratamientos ( $p=0.88$ ,  $p=0.07$ , respectivamente). Sin embargo, la mayor longitud radical total se encontró en plantas que crecieron solo en residuo de mina (Figura 1).





**Figura 1.** *R. communis* y variables de crecimiento de plantas establecidas en residuo de mina (RM) y residuo de mina con enmienda (RM+E) e inoculación bacteriana (RM+E+N9, RM+E+Mc188).

### 3.5. Concentración de EPTs en *R. communis*

La tendencia de acumulación de EPTs en la parte aérea de *R. communis* para los tratamientos RM+E, RM+E+N9 y RM+E+Mc188 fue la siguiente  $Pb > Zn > Cd \geq Cu$  y para el tratamiento testigo (RM) fue  $Zn > Pb > Cu > Cd$ . La concentración de Cu en tejido aéreo (Tabla 2) se encontró dentro de las concentraciones normales en todos los tratamientos, según los valores propuestos

por Kabata-Pendias (2001). En el tratamiento testigo se hallaron concentraciones de Zn por arriba de las concentraciones fitotóxicas propuestas por Varun *et al.* (2012). En todos los tratamientos las concentraciones de Pb estuvieron por arriba de los umbrales de toxicidad, mientras que las concentraciones de Cd estuvieron dentro de los umbrales de fitotoxicidad propuestos por Varun *et al.* (2012; Tabla 2).

**Tabla 2.** Concentraciones de EPTs ( $mg\ kg^{-1}$ ) en parte aérea y radical de *R. communis*

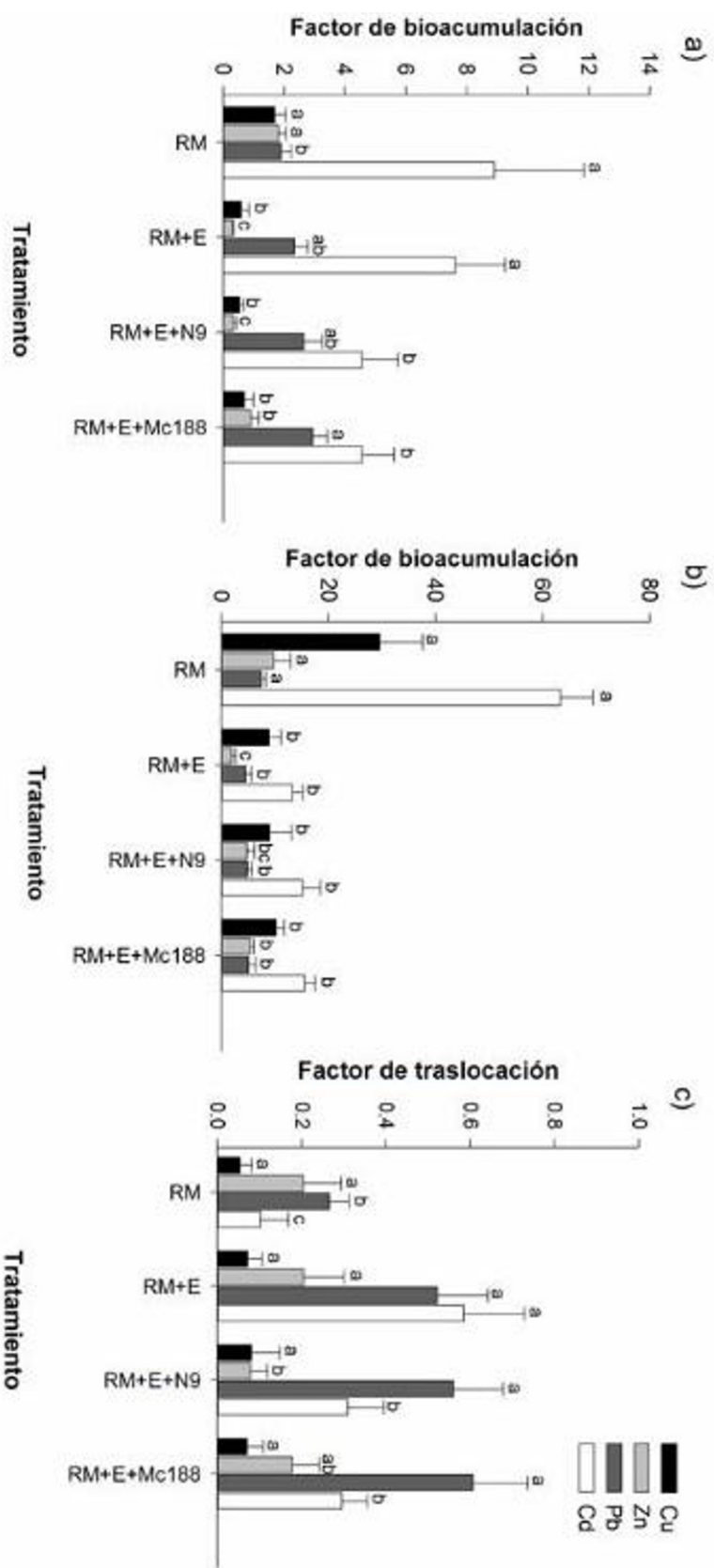
Tratamiento	Cu	Zn	Pb	Cd
<b>Parte aérea</b>				
RM	10.64±4.06 a	314.62±42.10 a	98.52±12.38 b	11.82±3.19 ab
RM+E	7.80±3.07 a	30.74±1.74 c	158.18±24.43 a	15.19±2.87 a
RM+E+N9	7.43±1.92 a	34.30±9.83 c	172.32±35.20 a	8.56±2.00 b
RM+E+Mc188	9.29±3.55 a	87.91±17.54 b	195.00±24.02 a	9.29±2.50 b
<b>Límite de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

Los valores son medias y desviación estándar de  $n=6$ ; Comparaciones significativas ( $\alpha=0.05$ )

\* De acuerdo con Varun *et al.* (2012)

La mayor acumulación de Cd en la parte aérea de las plantas se encontró en el tratamiento con enmiendas (RM+E; 28% más con respecto al testigo). No se detectaron diferencias significativas entre el tratamiento testigo y la inoculación bacteriana. De manera general, las concentraciones de EPTs en la raíz de *R. communis* fueron más altas que en la parte aérea (Tabla 2). No se encontró diferencia en el contenido de EPTs entre el tratamiento con enmienda o en combinación con BPCV. En los tratamientos con enmienda e inoculación de BPCV se encontró  $FB < 1$  para Cu y Zn en parte aérea, y  $FB > 1$  en el

tratamiento testigo. En todos los tratamientos se encontró  $FB > 1$  para Pb y Cd en parte aérea y raíz (Figura 2a y 2b). Se observaron factores de translocación (FT) menor a uno en todos los tratamientos y en todos los elementos (Figura 2c). Es decir, que *R. communis* no mueve a la parte aérea EPTs y estos se acumulan en la raíz principalmente.

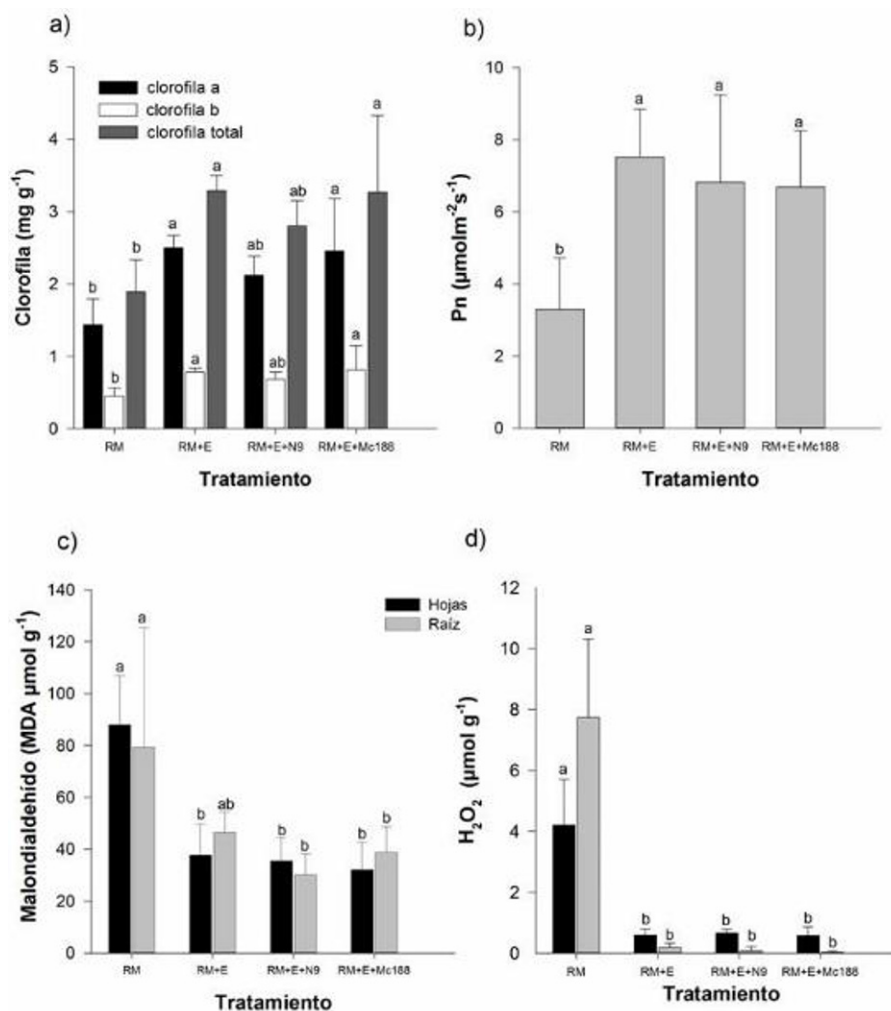


**Figura 2.** a) Factor bioacumulación en parte aérea, b) factor de bioacumulación en raíz y c) factor de traslocación de *R. communis* en función de los tratamientos: residuo de mina (RM), aplicación de enmiendas (RM+E) e inoculación bacteriana (RM+E+N9 y RM+E+Mc188).

### 3.6. Concentración de clorofila, actividad fotosintética y estrés oxidativo

La concentración de clorofila a, b y total fue significativamente menor en el tratamiento testigo (RM) en comparación con los tratamientos donde se adicionó enmienda (RM+E) y enmienda en conjunto con inoculación de la bacteria Mc188 (Figura 3a). La tasa de fotosíntesis en las plantas osciló entre  $3.3 \pm 1.4$  y  $6.8 \pm 2.4 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ,

la menor tasa correspondió al tratamiento testigo y no se encontraron diferencias significativas entre el tratamiento con enmiendas y la inoculación de BPCV. De manera general, la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y MDA, tanto en hojas como en raíz, fue significativamente mayor en el tratamiento testigo en comparación con los tratamientos con enmiendas e inoculación bacteriana (Figura 2).



**Figura 3.** a) Concentración de clorofilas, b) fotosíntesis neta (Pn), c) concentración de malondialdehído (MDA) y d)  $\text{H}_2\text{O}_2$  en plantas de *R. communis* en función de los tratamientos: residuo de mina (RM), aplicación de enmiendas (RM+E) y aplicación de enmiendas en conjunto con BPCV (RM+E+N9 y RM+E+Mc188).

### 3.7. Tinción vital

Los resultados de tinción vital mostraron la presencia de diferentes organismos (bacterias y hongos) adheridos a la raíz de *R. communis*. El porcentaje de colonización de bacterias fue 60%, 46%, 41% y 49% en los tratamientos RM, RM+E, RM+E+N9 y RM+E+Mc188, respectivamente.

## 4. Discusión

Diversos estudios han mostrado que las enmiendas son efectivas para la revegetación de residuos de mina, debido al aporte de macronutrientes (N, P y K) y los cambios benéficos en las propiedades físicas del suelo (Tordoff *et al.* 2000). Sin embargo, también se puede atribuir el éxito de las enmiendas a la inmovilización de EPTs, y como consecuencia se pueden minimizar los efectos tóxicos de los EPTs en las plantas, y ayudar a éstas a establecerse (Solís-Domínguez *et al.*, 2012).

Los resultados del presente trabajo mostraron que las enmiendas estabilizaron significativamente Pb y Zn. La estabilización de Pb se puede explicar a la fuerte afinidad de este elemento por los ligandos orgánicos (Vereresh *et al.*, 2003). Mientras que el nulo efecto de las enmiendas sobre la estabilización de Cd se puede atribuir al hecho de que el Cd se une débilmente a la materia orgánica (McBride, 1994), y que puede unirse al suelo a través de intercambio catiónico (Borůvka y Drábek, 2004). En el caso del Cu, la solubilidad de este elemento puede asociarse a la formación de complejos orgánicos solubles, los cuales se forman como consecuencia de la reacción con la materia orgánica a  $\text{pH} > 7$ . Además, algunos autores sugieren que la materia orgánica puede afectar las cargas de las partículas del suelo. Cuando se incrementa el pH, las cargas negativas aumentan y repelan a otras

cargas negativas, como el Cu acomplejado por ligandos orgánicos cargados negativamente (Ashworth y Alloway, 2008).

Además del efecto inmovilizador de las enmiendas sobre Pb y Zn, éstas también aumentaron significativamente el contenido de materia orgánica y macronutrientes (N y P). Mejoraron las propiedades físicas, específicamente la retención de humedad y la densidad aparente del residuo de mina. Los resultados sugieren que estos cambios tuvieron efecto positivo sobre el crecimiento de *R. communis* en comparación con las plantas que crecieron en el tratamiento testigo (RM). Además, la aplicación de enmiendas fue el principal factor que promovió el crecimiento de las plantas, ya que no se encontró diferencia significativa en las variables altura, área foliar y biomasa aérea, entre la adición de enmiendas solas o con la aplicación de BPCV. Resultados similares se han reportado por Juwarkar *et al.* (2008), donde la aplicación de biosólidos fue el principal factor que influyó en el rendimiento de *Jatropha curcas*, en comparación con la aplicación en conjunto de biosólidos y biofertilizantes.

Los microorganismos nativos del residuo de mina, así como de la mezcla fueron capaces de sintetizar AIA. La presencia de esta fitohormona en el residuo ofrece la ventaja de promover la elongación radical y así aumentar la capacidad de las plantas a anclarse mejor al residuo de mina, de obtener nutrientes y por tanto mejorar la posibilidad de supervivencia (Patten y Glick, 2002).

Por otra parte, la escasa producción de biomasa aérea del tratamiento testigo y los signos visibles de toxicidad (como la clorosis y marchitez) pueden estar relacionados con el efecto tóxico del Zn (Chen *et al.* 2009; Millaleo *et al.* 2010). Se obtuvo correlación negativa entre las

variables biomasa aérea ( $r=-0.80$ ,  $p<0.0001$ ) y altura ( $r=-0.85$ ,  $p<0.0001$ ) con el contenido de Zn en tejido aéreo vegetal. Kawachi *et al.* (2011) mencionaron que el exceso de Zn ( $>400$  mg  $\text{kg}^{-1}$  biomasa seca) en plantas puede causar clorosis y desordenes de crecimiento.

Otro síntoma de toxicidad de Zn es la baja concentración de clorofila y tasa fotosintética (Balsberg Pålsson, 1989), debido al antagonismo con Fe. Se observó correlación negativa entre la tasa de fotosíntesis y la concentración de Zn en tejido aéreo ( $r=-0.71$ ,  $p<0.0001$ ) y MDA ( $r=-0.70$ ,  $p=0.0002$ ). Mientras que la clorofila a se correlacionó negativamente con el contenido de Zn ( $r=-0.68$ ,  $p=0.0002$ ) y  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $r=-0.65$ ,  $p=0.0005$ ). En este caso, el Zn puede estar sustituyendo al Mg, suprimir la afinidad de la Rubisco por el  $\text{CO}_2$  y la actividad de la clorofila. El exceso de Zn también puede interferir con la cadena respiratoria. Debido a que los EPTs forman uniones irreversibles con los componentes fotosintéticos de la cadena de transporte de electrones (Ventrella *et al.* 2009), y desencadenan la formación de especies reactivas del oxígeno (como el  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) en las mitocondrias (Kawachi *et al.* 2011; Pospíšil y Prasad, 2014). La peroxidación de lípidos (expresada a través del contenido de MDA) denota daño en membranas celulares ocasionado por los EPTs (Dazy *et al.* 2009). En este trabajo, la mayor concentración de MDA se encontró en las plantas del tratamiento testigo (RM) tanto en hojas como raíz (Figura 4c). La concentración de Zn en la parte aérea se correlacionó positivamente con el contenido de MDA ( $r=0.82$ ,  $p<0.0001$ ) y  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $r=0.90$ ,  $p<0.0001$ ), estos resultados sugieren que el Zn desencadena perturbaciones en el metabolismo de las plantas testigo, puesto en evidencia a través de las altas concentraciones de MDA, y posiblemente las plantas estuvieron bajo estrés oxidativo.

©The Author(s) 2015. This article is published with open access by Sociedad Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal.

Las enmiendas y las BPCV disminuyeron la acumulación de Zn en tejido aéreo de *R. communis*. Así mismo, la inoculación bacteriana parece reducir la acumulación de Cd en la parte aérea de *R. communis*, ya que los FB fueron diferentes al tratamiento testigo y el tratamiento con enmiendas. Además, a pesar de que se encontraron concentraciones de Pb y Cd por arriba de los umbrales de fitotoxicidad propuestos por Varun *et al.* (2012), no se encontraron signos visibles de toxicidad en las plantas de los tratamientos con enmiendas e inoculación de BPCV. Las enmiendas y la inoculación bacteriana también disminuyeron la concentración de MDA y  $\text{H}_2\text{O}_2$  tanto en hojas como en raíces, esto indica que las enmiendas y las BPCV protegen a *R. communis* del estrés oxidativo y el daño celular que causan los EPTs. Resultados similares han reportado Bauddh y Singh (2014) donde la adición de vermicompost y fertilizantes (urea y difosfato de amonio) disminuyó la concentración de MDA en plantas de *R. communis* en suelos contaminados artificialmente con Cd.

Después de la introducción de *R. communis* uno de los cambios notables en las propiedades de la mezcla fue en pH y CE. Cambios similares en la CE observaron Perez-Esteban *et al.* (2014), quienes agregaron compost de estiércol caballar y ovino a un residuo de mina. Después de plantar *Brassica juncea* L. y dejarla crecer durante 110 días, la CE disminuyó entre 27% y 32% en comparación con la CE antes del experimento. La disminución en el pH en la mezcla pudo ser consecuencia de la respiración radical y la excreción o reabsorción de  $\text{H}^+$  o  $\text{HCO}_3^-$  para equilibrar la absorción de nutrientes (Ahmad *et al.* 2012; Hashimoto *et al.* 2010). Así mismo estos cambios en pH se correlacionaron negativamente con la concentración de Zn extractable ( $r=-0.95$ ,  $p<0.0001$ ). Banks *et*

al. (1994) demostraron el efecto de las plantas en la lixiviación de Zn en residuos de minas. Los resultados mostraron que altas concentraciones de Zn se lixivian cuando las plantas están presentes. Además analizaron la función de los microorganismos (hongos micorrízicos) y observaron que las plantas inoculadas lixivian menos Zn en comparación con las no inoculadas. En nuestro caso, las enmiendas y la inoculación bacteriana parecen reducir la solubilización de Zn entre 43% y 46% en comparación con el tratamiento testigo.

Mientras que la estabilización de Pb después del crecimiento de *R. communis*, puede deberse a la adsorción de este elemento en los compuestos orgánicos del residuo. Martínez-Alcalá *et al.* (2009) sugieren que los exudados radicales promueven la adsorción en la fase sólida del suelo de compuestos de EPTs solubles en agua o quelatos organometálicos. Además, los ligandos orgánicos que exudan las plantas se consideran una de las estrategias más importantes para excluir la absorción de EPTs (Kidd *et al.* 2009). Aparentemente, *R. communis* promueve la estabilización de Pb. El nulo efecto de la inoculación bacteriana sobre las variables de crecimiento en el presente estudio puede deberse a la baja competitividad de las bacterias N9 y Mc188 y al alto contenido de nutrientes aportados por las enmiendas. Strigul y Kravchenko (2006) evaluaron la supervivencia de BPCV en la rizósfera, a través de modelos matemáticos y simulaciones. Los autores concluyeron que suelos ricos en materia orgánica pueden afectar negativamente la supervivencia de las BPCV. Debido a que la descomposición de la materia orgánica favorece la actividad biológica y el crecimiento de los microorganismos nativos del suelo, generando así un ambiente competitivo. Björklöf *et al.* (2003) citado por Strigul y Kravchenko (2006), mostraron

que la BPCV *Pseudomonas fluorescens* 31K3 fue incapaz de establecerse en la rizósfera de suelos con alto contenido de materia orgánica, debido a la alta competencia que ejerció la microflora nativa. No obstante, el análisis de tinción vital mostró que las raíces de *R. communis* pueden asociarse con los microorganismos tanto del residuo de mina, como de la mezcla de residuo con enmiendas.

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

## 5. Conclusiones

*R. communis* mostró ser una planta que puede utilizarse en la fitoestabilización de residuos de mina, ya que la concentración de EPTs y los FB en raíces fueron mayores que en el tejido aéreo. Además, los FT indican que *R. communis* tiende a evitar el transporte de EPTs desde la raíz a la parte aérea. A pesar que *R. communis* fue capaz de crecer en el residuo sin la adición de enmiendas y bioinoculantes, los efectos tóxicos de los EPTs, en especial el Zn, afectaron negativamente la producción de biomasa. Las enmiendas mostraron tener

efecto positivo en el crecimiento de *R. communis*, ya que éstas mejoraron propiedades físicas del residuo y aportaron nutrientes. Las enmiendas también protegieron a la planta del posible estrés oxidativo que causan los EPTs y estabilizaron significativamente al Pb y Zn. Con base a los resultados obtenidos se recomienda la aplicación de enmiendas para promover la biomasa de *R. communis* y estabilizar Pb. Por otra parte las BPCV mostraron disminuir la acumulación de Cd, sin embargo, es necesario seguir realizando investigaciones que aborden el uso de enmiendas en conjunto con inoculación bacteriana, para recomendar las dosis de enmiendas e inoculantes microbianos.

## 6. Reconocimientos

Y.S.P.V. agradece al CONACYT por la beca de maestría otorgada para sus estudios, así como al M.C. Jaime Cruz Díaz por el apoyo brindado en los análisis químicos y al Dr. José Carlos Mendoza Hernández por proporcionar las cepas bacterianas.

Open Access: This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC-BY 4.0) which permits any use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and the source are credited.

## 7. Referencias

- Ahmad, M., Lee, S. S., Yang, J. E., Ro, H. M., Lee, Y. H., Ok, Y. S. 2012. Effects of soil dilution and amendments (musselshell, cowbone, and biochar) on Pb availability and phytotoxicity in military shooting range soil. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 79: 225-231.
- Ansorena, M. J. 1994. *Sustratos, Propiedades y Caracterización*. Mundi Prensa, Madrid. 172p.
- Ashworth, D. and B. Alloway. 2008. Influence of dissolved organic matter on the solubility of heavy metals in sewage-sludge-amended soil. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 39: 538-550.
- Balsberg Pålsson, A. M. 1989. Toxicity of heavy metals (Zn, Cu, Cd, Pb) to vascular plants. *Water Air Soil Pollut.* 47: 287-319.
- Banks, M. K., Schwab, A. P., Fleming, G. R., Hetrick, B. A. 1994. Effects of plants and rhizosphere microflora on leaching of zinc from mine tailing. *Chemosphere* 21: 1691-1699.
- Baudh, K. and Singh, R. P. 2014. Effects of organic and inorganic amendments on bio-accumulation and partitioning of Cd in *Brassica juncea* and *Ricinus communis*. *Ecol. Eng.* 74: 93-100.
- Borůvka, L and Drábek, O. 2004. Heavy metal distribution between fractions of humic substances in heavily polluted soils. *Plant Soil Environ.* 50: 339-345.
- Branzini, A. and Zubillaga, M. S. 2010. Assessing phytotoxicity of heavy metals in remediated soil. *Int. J. Phytorem.* 12: 335-342.
- Bremner, J. M. 1965. Determination and isotope-ratio analysis of different forms of nitrogen in soils: I. Apparatus and procedure for distillation and determination of ammonium. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 29:504-507.
- Chen, C, Huang, D., Liu, J. 2009. Functions and toxicity of nickel in plants: recent advances and future prospects. *Clean* 37: 304-313.
- Dazy, M., Masfaraud, J. F., Féraud, J. F. 2009. Induction of oxidative stress biomarkers associated with heavy



- metals stress in *Fontinalis antipyretica* Hedw. *Chemosphere* 75: 297-302.
- Dean, W. E. 1974. Determination of carbonate and organic matter in calcareous sediments and sedimentary rocks by loss on ignition: comparison with other methods. *J. Sed. Petrol.* 44:242-248.
- EPA (Environmental Protection Agency). 1998. Method 3051A: Microwave assisted acid digestion of sediments, sludges, soils, and oils; test methods for evaluating solid waste, physical/chemical methods. Office of Solid Waste, U.S. Environmental Protection Agency: Washington, DC, 1-20.
- González-Chávez, M. C. A., Alarcón A., Ferrera-Cerrato R. 2007. Manual de métodos para la investigación y aplicación de hongos micorrízicos arbusculares en laboratorio y campo. In: Fuentes-Dávila, G y R. Ferrera-Cerrato (eds.). Ecología de la raíz. Sociedad Mexicana de Fitopatología A. C. Colegio de Postgraduados. Texcoco, estado de México. pp.144.
- González-Chávez, M. C. A., Ruíz Olivares, A., Carrillo-González, R., Ríos Leal, E. 2014. Crude oil and bioproducts of castor bean (*Ricinus communis* L.) plants established naturally on metal mine tailings. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* DOI 10.1007/s13762-014-0622-z
- Hashimoto, Y., Takaoka, M., Shiota, K. 2010. Enhanced transformation of lead speciation in rhizosphere soils using phosphorous amendments and phytostabilization: an X-ray absorption fine structure spectroscopy investigation. *J. Environ. Qual.* 40: 696-703.
- Ingo, W. 1997. Auxin-indole derivatives in soils determined by a colorimetric method and by high performance liquid chromatography. *Microbiol. Res.* 152: 399-405.
- Jackson, M. L. 1976. Análisis Químico de Suelos. 3ra edición. Ediciones Omega, Barcelona. 662p.
- Juwarkar, A. A., Yadav, S. K., Kumar, P., Singh, S. K. 2008. Effect of biosludge and biofertilizer amendment on growth of *Jatropha curcas* in heavy metal contaminated soils. *Environ. Monit. Assess.* 145: 7-15.
- Kabata-Pendias, A. 2011. Trace Elements in Soils and Plants (4th ed.), CRC Press, Boca Raton. 548 p.
- Kawachi, M., Kobae, Y., Tomioka, R., Maeshima, M. 2011. The role of membrane transport in the detoxification and accumulation of Zn in plants. In: Sherameti, I. and Varma, A. (eds.), Detoxification of heavy metals. Soil Biology 30. Springer, Berlin. pp.129-142.
- Kidd, P., Barcelo, J., Bernal, P., Navari-Izzo, F., Poschenreder, C., Shilev, S., Clemente, R., Monterroso, C. 2009. Trace element behavior at the root-soil interface: implications in phytoremediation. *Environ. Exp. Bot.* 67: 243-259.
- Lindsay W.L. and Norvell W.A. 1978. Development of a DTPA test from soil zinc, iron, manganese and copper. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 42: 421-428.
- Martínez-Alcalá, I., Clemente, R., Bernal, M. P. 2009. Metal availability and chemical properties in the rhizosphere of *Lupinus albus* L. growing in a high-metal calcareous soil. *Water Air Soil Pollut.* 201: 283-293.
- McBride B.M. 1994. Environmental Chemistry of Soils. Oxford University Press, New York. 397p.
- Mendez, M. O. and Maier, R. M. 2008. Phytostabilization of mine tailings in

- arid and semiarid environments an emerging remediation technology. *Environ. Health Perspect.* 116: 278-283.
- Millaleo, R., Reyes-Díaz, M., Ivanov, A. G., Mora, M. L., Alberdi, M. 2010. Manganese as essential and toxic element for plants: transport, accumulation and resistance mechanisms. *J. Soil. Sci. Plant. Nutr.* 10: 476-494.
- Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000, Diario Oficial.
- Olsen, S.R., Cole, C. V., Watanabe, F. S., Dean, L. A. 1954. Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate. Circular No. 939. U.S. Department of Agriculture, Banderis, 19 p.
- Patten, C. L. and Glick, B. R. 2002. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3795–3801.
- Porra, R. J. 2005. The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b. *Photosynth. Res.* 73: 633-640.
- Pospíšil, P. and Prasad, A. 2014. Formation of singlet oxygen and protection against its oxidative damage in Photosystem II under abiotic stress. *J. Photoch. Photobio. B* 137: 39-48.
- R Core Team. 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- Rajkumar, M. and Freitas, H. 2008. Influence of metal resistant-plant growth-promoting bacteria on the growth of *Ricinus communis* in soil contaminated with heavy metals. *Chemosphere* 71: 834–42.
- Rajkumar, M., Sandhya, S., Prasad, M., Freitas, H. 2012. Perspectives of plant-associated microbes in heavy metal phytoremediation. *Biotech. Adv.* 30: 1562-1574.
- Richards L. A. 1973. Diagnóstico y Rehabilitación de Suelos salinos y Sódicos. Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América. Limusa, México, D.F. 172p.
- Ruiz Olivares, A., Carrillo-González, R., González-Chávez, M. C. A., Soto-Hernández, R. M. 2013. Potential of castor bean (*Ricinus communis* L.) for phytoremediation of mine tailings and oil production. *J. Environ. Managet.* 114: 316–323.
- Sergiev, I., Alexieva, V., Karanov, E. 1997. Effect of spermine, atrazine and combination between them on some endogenous protective systems and stress markers in plants. *C. R. Acad. Bulg. Sci.* 51: 121–124.
- Shi, G. and Cai, Q. 2009. Cadmium tolerance and accumulation in eight potential energy crops. *Biotech. Adv.* 27: 555–561.
- Solís-Dominguez, F. A., White, S. A., Hutter, T. B., Amistadi, M. K., Root, R. A., Chorover, J. Maier, M. R. 2012. Response of key soil parameters during compost-assisted phytostabilization in extremely acidic tailings: effect of plant species. *Environ. Sci. Technol.* 46: 1019–1027
- Strigul, N. S and Kravchenko, L. V. 2006. Mathematical modeling of PGPR inoculation into the rhizosphere. *Environ. Model Softw.* 21: 1158-1171.
- Tordoff, G. M., Baker, A. J. M, Willis, A. J. 2000. Current approaches to the revegetation and reclamation of metalliferous mine wastes. *Chemosphere* 41: 219–228.
- Varun M, D'Souza, R., Pratas, J., Manoj, S. 2012. Metal contamination of soils

- and plants associated with the glass industry in north central India: prospects of phytoremediation. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 19: 269-281.
- Velikova, V., Yordanov, I., Edreva, A. 2000. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants. Protective role of exogenous polyamines. *Plant Sci.* 151: 59-66.
- Ventrella, A., Catucci, L., Piletska, E., Piletsky, S., Agostiano, A. 2009. Interactions between heavy metals and photosynthetic materials studied by optical techniques. *Bioelectroch.* 77: 19-25.
- Zhu, Y. L., Pilon-Smits, E. A.H., Jouanin, L., Terry, N. 1999. Overexpression of glutathione synthetase in indian mustard enhances cadmium accumulation and tolerance. *Plant Physiol.* 119:73-80.