

**UNIVERSIDAD NACIONAL  
SANTIAGO ANTÚNEZ DE MAYOLO**

**FACULTAD DE CIENCIAS DEL AMBIENTE**

**ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AMBIENTAL**



**EFFECTOS DE MICROORGANISMOS ALTOANDINOS  
PROMOTORES DE CRECIMIENTO VEGETAL EN LA TOLERANCIA  
DE *Medicago sativa* Y *Triticum aestivum* EN PRESENCIA DE  
METALES PESADOS**

**TESIS PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE INGENIERO AMBIENTAL**

**Tesista: Br. BRYAN MANUEL SANCHEZ SANTILLAN**

**Asesora: Dra. CARMEN DEL ROSARIO TAMARIZ ANGELES**

**Huaraz-Perú**

**2023**





"Año de la unidad, la paz y el desarrollo"

## ACTA DE SUSTENTACIÓN Y DEFENSA DE TESIS

Los miembros del Jurado Evaluador de Tesis, en pleno que suscriben, reunidos el día veinte de diciembre del dos mil veintitrés, en el Auditorium de la Facultad de Ciencias del Ambiente (FCAM) de la Universidad Nacional Santiago Antúnez de Mayolo (UNASAM), de conformidad a la normatividad vigente condujeron el acto académico público de sustentación y defensa de la tesis "**EFECTOS DE MICROORGANISMOS ALTOANDINOS PROMOTORES DE CRECIMIENTO VEGETAL EN LA TOLERANCIA DE Medicago sativa Y Triticum aestivum EN PRESENCIA DE METALES PESADOS**" que presentó **SANCHEZ SANTILLAN BRYAN MANUEL**, para optar el Título Profesional de Ingeniero Ambiental.

Después de haber atendido la sustentación y defensa oral, y haber escuchado las respuestas a las preguntas y observaciones formuladas, la declaramos:

.....Aprobado.....

Con el calificativo de: Dieciseis (16.)

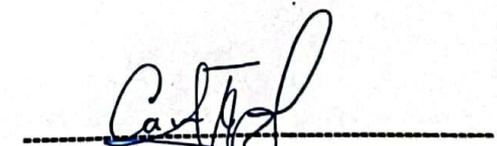
En consecuencia, **SANCHEZ SANTILLAN BRYAN MANUEL**, queda expedito para que el Consejo de Facultad de la Facultad de Ciencias del Ambiente de la Universidad Nacional "Santiago Antúnez de Mayolo" apruebe el otorgamiento de su **Título Profesional de Ingeniero Ambiental** de conformidad al Art. 113 numeral 113.9 del Reglamento General de la UNASAM (Resolución de Consejo Universitario N° 399-2015-UNASAM), el Art. 48° y 4ta. disposición complementaria del Reglamento General de Grados y Títulos de la UNASAM (Resolución de Consejo Universitario - Rector N° 761-2017-UNASAM).

Huaraz, 20 de diciembre 2023

  
-----  
**Dr. HERACLIO FERNANDO CASTILLO PICON**  
Presidente  
Jurado de sustentación

  
-----  
**M.Sc. ROSARIO ADRIANA POLO SALAZAR**  
Primer miembro  
Jurado de sustentación

  
-----  
**Dra. BHENNY JANETT TUYA CERNA**  
Segundo miembro  
Jurado de sustentación

  
-----  
**Dra. CARMEN TAMARIZ ANGELES**  
Asesor de tesista



Anexo de la R.C.U N° 126 -2022 -UNASAM  
**ANEXO 1**  
**INFORME DE SIMILITUD.**

El que suscribe (asesor) del trabajo de investigación titulado:

Presentado por:

con DNI N°:

para optar el Título Profesional de:

Informo que el documento del trabajo anteriormente indicado ha sido sometido a revisión, mediante la plataforma de evaluación de similitud, conforme al Artículo 11 ° del presente reglamento y de la evaluación de originalidad se tiene un porcentaje de : ..... de similitud.

**Evaluación y acciones del reporte de similitud de los trabajos de los estudiantes/ tesis de pre grado (Art. 11, inc. 1).**

Porcentaje		Evaluación y acciones	Seleccione donde corresponda <input checked="" type="radio"/>
Trabajos de estudiantes	Tesis de pregrado		
Del 1 al 30%	Del 1 al 25%	Esta dentro del rango aceptable de similitud y podrá pasar al siguiente paso según sea el caso.	
Del 31 al 50%	Del 26 al 50%	Se debe devolver al estudiante o egresado para las correcciones con las sugerencias que amerita y que se presente nuevamente el trabajo.	
Mayores a 51%	Mayores a 51%	El docente o asesor que es el responsable de la revisión del documento emite un informe y el autor recibe una observación en un primer momento y si persistiese el trabajo es invalidado.	

Por tanto, en mi condición de Asesor/ Jefe de Grados y Títulos de la EPG UNASAM/ Director o Editor responsable, firmo el presente informe en señal de conformidad y adjunto la primera hoja del reporte del software anti-plagio.

Huaraz,



FIRMA

Apellidos y Nombres: \_\_\_\_\_

DNI N°: \_\_\_\_\_

Se adjunta:

1. Reporte completo Generado por la plataforma de evaluación de similitud



## CONSTANCIA 07-2024-UI-FCAM–UNASAM EVALUACIÓN DE SIMILITUD

El que suscribe, Director de la Unidad de Investigación de la Facultad de Ciencias del Ambiente de la Universidad Nacional Santiago Antúnez de Mayolo hace constar que:  
La versión final de la tesis **“EFECTOS DE MICROORGANISMOS ALTOANDINOS PROMOTORES DE CRECIMIENTO VEGETAL EN LA TOLERANCIA DE *Medicago sativa* Y *Triticum aestivum* EN PRESENCIA DE METALES PESADOS”**, del Señor **BRYAN MANUEL SANCHEZ SANTILLAN**, identificado con **DNI N° 70575777**, tras ser sometido a revisión mediante la plataforma de evaluación de similitud por su asesora la Dra. **Carmen del Rosario Tamariz Angeles**, conforme el Artículo 11° del Reglamento de Originalidad y/o Grado de Similitud de la Producción Académica, Científica e Investigativa de la Universidad Nacional Santiago Antúnez de Mayolo, Resolución de Consejo Universitario N° 126-2022-UNASAM, tiene una **similitud del 12%**.

Se expide la presente constancia, a solicitud del interesado para los fines que estime pertinente.

Huaraz, 16 de enero de 2024.



Ph.D Edwin Anibal Loarte Cadenas  
**DIRECTOR**  
UNIDAD DE INVESTIGACION  
FCAM - UNASAM

CC. Archivo  
Adjunto: Informe de similitud antiplagio de su Asesor

## DEDICATORIA

A mis padres: Fanny Santillán Jamanca y Manuel José Sánchez, por todo su trabajo, esfuerzo y enseñanza, de brindarme los recursos necesarios, el apoyo incondicional, inspirarme a ser una mejor persona como también profesional.

A mí tía: Rocío Santillán Jamanca, por ser parte de ese apoyo incondicional, y mi hermana: Alisson Sanchez Santillan, por un ejemplo de perseverancia y de lucha por sus sueños.

A mi abuela: Rosa Jamanca Luciano, por inspirarme a conseguir mis sueños y enorgullecer a mis seres queridos, y mi padrino: Manuel Obregón, que me ayudó en los momentos más difíciles e inspiró a superarlos.

**Bryan Manuel Sánchez Santillán**

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a nuestra casa de estudios, la Universidad Nacional Santiago Antúnez de Mayolo, que, a través de la Dirección de Investigación e Innovación, pude acceder al financiamiento para obtención de título profesional, con Resolución de Consejo Universitario-Rector N° 416-2022-UNASAM, para poder desarrollar mi trabajo de investigación.

A la Dra. Carmen Tamariz Ángeles, por darme la oportunidad de hacer posible la concretización de mi investigación, motivándome a presentar resultados fiables y siempre buscando soluciones que se alinearon a lo planteado, por toda la asesoría y seguimiento, durante toda la ejecución y gabinete de la presente investigación, compartiendo sus conocimientos y experiencias, pude concluir adecuadamente mi investigación, e incluirme en el equipo del CIByRGA, donde junto a otros profesionales, pude recaudar más conocimientos.

Al Dr. Percy Olivera, que me brindo recomendaciones e indicaciones valiosas, al momento de realizar las pruebas en el laboratorio del CIByRGA y mi bioensayo, garantizando que mis datos sean confiables. Al igual que la Ing. Flormila Vicuña, por sus conocimientos brindados.

A mis amigos y compañeros de laboratorio del CIByRGA: Becky Cochachin, Flor Vergara y Alex Silva, por su apoyo incondicional y emocional, en el desarrollo de las técnicas aplicadas en la investigación, por su tiempo valioso y conocimientos compartidos.

A mi familia, por siempre motivarme a mejorar, cumplir mis objetivos y todo el apoyo incondicional que me brindan todos los días.

A la facultad de Ciencias del Ambiente, por haberme formado profesionalmente.

## RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo principal evaluar los efectos de microorganismos altoandinos, promotores de crecimiento vegetal, en la tolerancia de la alfalfa y trigo, cultivados en presencia de metales pesados.

Se tamizaron las cepas reactivadas según su capacidad máxima de tolerancia (CMT) a cadmio (Cd) y plomo (Pb), como segundo tamizaje se evaluó las características promotoras de crecimiento vegetal en presencia y ausencia Cd y Pb. Se escogieron dos cepas bacterianas para ser aplicada en un bioensayo con alfalfa y trigo, bajo estrés con Cd y Pb.

Se reactivaron un total de 59 cepas bacterianas, 7 toleraron Cd y Pb, además se seleccionaron 2 cepas bacterianas de estudios previos que tuvieron similar tolerancia, estas cepas fueron BEP03, BEP32, BEU01, GT10B, GT24B, GT25B, VT19B, BEP17-Dm y BEP18-Dm. Solo 5 cepas produjeron sideróforos con estrés de Pb y 4 con Cd, siendo BEP17 la que presentó mayor índice de sideróforos (IS) bajo estrés con Pb. En cuanto a la producción de ácido indol-3-acético (AIA), solo 7 cepas produjeron AIA en presencia de 0.5 y 1mM de Pb, en presencia de 0.5mM de Cd, solo produjeron AIA 6 cepas, a 1mM de Cd, solo produjeron AIA 7 cepas. Se escogieron las bacterias *Pseudomona japónica* BEP17-Dm y *Rahnella* sp. GT24B, que demostraron solubilización de fosfatos, con presencia de Pb. En el bioensayo, GT24B aumentó la germinación de alfalfa en presencia de Pb, BEP17-Dm aumentó el tamaño y peso húmedo de las raíces en presencia de Pb. GT24B potenció la absorción de Cd y Pb en los tejidos de trigo, mientras que BEP17-Dm disminuyó la concentración de Cd en la parte rizosférica del trigo. Demostrando que *Rahnella* sp. GT24B tiene potencial para ser aplicado a una fitorremediación asistida, al incrementar la concentración de metales en el tejido, sin comprometer la supervivencia del trigo.

**Palabras clave:** Estrés metálico, sideróforos, ácido indol-3-acético, fitorremediación asistida, *Triticum aestivum*.

## ABSTRACT

The main objective of this research was to evaluate the effects of high Andean plant growth-promoting microorganisms on the tolerance of alfalfa and wheat grown in the presence of heavy metals.

The reactivated strains were screened according to their maximum tolerance capacity (MTC) to cadmium (Cd) and lead (Pb), and as a second screening, the plant growth-promoting characteristics were evaluated in the presence and absence of Cd and Pb. Two bacterial strains were chosen to be applied in a bioassay with alfalfa and wheat, under Cd and Pb stress.

A total of 59 bacterial strains were reactivated, 7 tolerated Cd and Pb, in addition, 2 bacterial strains were selected from previous studies that had similar tolerance, these strains were BEP03, BERP32, BEU01, GT10B, GT24B, GT25B, VT19B, BEP17-Dm and BEP18-Dm. Only 5 strains produced siderophores with Pb stress and 4 with Cd, being BEP17-Dm the one that presented the highest siderophore index (SI) under Pb stress. As for indol-3-acetic acid (IAA) production, only 7 strains produced IAA in the presence of 0.5 and 1mM Pb, in the presence of 0.5mM Cd, only 6 strains produced IAA, at 1mM Cd, only 7 strains produced IAA. The bacteria *Pseudomona japonica* BEP17-Dm and *Rahnella* sp. GT24B, which showed phosphate solubilization in the presence of Pb, was chosen. In the bioassay, GT24B increased alfalfa germination in the presence of Pb, BEP17-Dm increased the size and wet weight of roots in the presence of Pb. GT24B enhanced Cd and Pb uptake in wheat tissues, while BEP17-Dm decreased Cd concentration in the rhizospheric part of wheat. Demonstrating that *Rahnella* sp. GT24B has the potential to be applied to assisted phytoremediation by increasing the concentration of metals in the tissue, without compromising wheat survival.

**Keywords:** Metallic stress, siderophores, indol-3-acetic acid, assisted phytoremediation, *Triticum aestivum*.

## INDICE

<b>CONTENIDO</b>	<b>Pág.</b>
<b>DEDICATORIA</b>	<b>ii</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>iii</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>v</b>
<b>LISTA DE TABLAS</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>xvii</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>xx</b>
<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCION .....</b>	<b>1</b>
1.1 Objetivos.....	3
Objetivo General.....	3
Objetivos Específicos .....	3
1.2 Hipótesis .....	4
1.3 Variables.....	4
Variable Independiente .....	4
Variable Dependiente .....	4
<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>6</b>
<b>MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>6</b>
2.1 Antecedentes.....	6
2.2 Bases Teóricas .....	11
Contaminación por metales pesados.....	11
Efectos de la contaminación por metales pesados.....	11
Pasivos ambientales mineros en el Perú .....	12
	vi



Gestión ambiental de lugares afectados por Cd y Pb.....	13
Remediación de suelos contaminados con metales pesados.....	15
Fitorremediación .....	15
Microorganismos y metales pesados.....	17
Interacción Planta–Microorganismo PGP–Metales pesados .....	17
2.3 Definición de términos básicos .....	19
<b>CAPÍTULO III.....</b>	<b>21</b>
<b>MARCO METODOLÓGICO .....</b>	<b>21</b>
3.1 Tipo de Investigación.....	21
3.2 Diseño de Investigación.....	21
3.3 Métodos y técnicas .....	22
Reactivación de cepas bacterianas .....	22
Preparación de inóculos .....	23
Concentración Máxima Tolerable (CMT) .....	23
Producción de sideróforos con estrés metálico .....	23
Producción de Ácido Indol-3-Acético con estrés metálico .....	24
Solubilización de fosfatos con estrés metálico.....	25
Preparación de inóculos para bioensayo.....	25
Prueba de Germinación .....	25
Bioensayo con estrés metálico (Cd y Pb) .....	26
Concentración de metales pesados en el tejido vegetal .....	26
3.4 Población y muestra .....	27
Población .....	27
Muestra.....	27
3.5 Instrumentos validados de recolección de datos .....	27

3.6 Plan de procesamiento y análisis estadístico de la información .....	27
<b>CAPÍTULO IV.....</b>	<b>28</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>28</b>
4.1 Reactivación de cepas bacterianas .....	28
4.2 Concentración Máxima Tolerable (CMT) .....	28
4.3 Producción de sideróforos con estrés metálico .....	29
4.4 . Producción de Ácido Indol-3-Acético con estrés metálico .....	31
4.5 Solubilización de fosfatos con estrés metálico.....	34
4.6 Prueba de Germinación .....	34
4.7 Bioensayo con estrés metálico (Cd y Pb) .....	38
4.8 Concentración de metales pesados en el tejido vegetal .....	42
4.9 Resumen de resultados .....	45
<b>CAPÍTULO V.....</b>	<b>48</b>
<b>DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....</b>	<b>48</b>
5.1 Concentración Máxima Tolerable (CMT) .....	48
5.2 Producción de sideróforos con estrés metálico .....	49
5.3 Producción de Ácido Indol-3-Acético con estrés metálico .....	49
5.4 Solubilización de fosfatos con estrés metálico.....	50
5.5 Prueba de Germinación .....	51
5.6 Bioensayo con estrés metálico (Cd y Pb) .....	52
5.7 Concentración de metales pesados en el tejido vegetal .....	54
5.8 Contrastación de hipótesis.....	55
<b>CAPÍTULO VI.....</b>	<b>56</b>
<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>56</b>
6.1 Conclusiones .....	56

6.2 Recomendaciones .....	58
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>59</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>68</b>



## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1</b>	Operacionalización de Variables.....	5
<b>Tabla 2</b>	Cepas con Tolerancia a Cadmio y Plomo.....	29
<b>Tabla 3</b>	Crecimiento de Trigo con Inóculos y sin Estrés Metálico.....	38
<b>Tabla 4</b>	Crecimiento de Trigo con Inóculos y Estrés Metálico Plomo.....	39
<b>Tabla 5</b>	Crecimiento de Trigo con Inóculos y Estrés Metálico Cadmio.....	39
<b>Tabla 6</b>	Crecimiento de Alfalfa con Inóculos y sin Estrés Metálico.....	40
<b>Tabla 7</b>	Peso Húmedo de Trigo con Inóculos y Estrés Metálico.....	41
<b>Tabla 8</b>	Peso Seco de Trigo con Inóculos y Estrés Metálico.....	41
<b>Tabla 9</b>	Peso Húmedo y Seco de Alfalfa con Inóculos y sin Estrés Metálico.....	42
<b>Tabla 10</b>	Resumen de la Capacidad Promotora de Crecimiento Vegetal, Bajo Estrés Metálico, de las Cepas Seleccionadas.....	46
<b>Tabla 11</b>	Resumen de los Efectos en la Germinación del Trigo y Alfalfa Inoculadas en Presencia o Ausencia de Metales Pesados, en Comparación con sus Controles.....	46
<b>Tabla 12</b>	Resumen de los Efectos en el Tamaño y Peso del Trigo y Alfalfa Inoculadas en Presencia o Ausencia de Metales Pesados, en Comparación con sus Controles.....	47
<b>Tabla 13</b>	Resumen de los Efectos de los Inoculantes en la Concentración de Metales Pesados en el Trigo, en Comparación con sus Controles.....	47

<b>Tabla 14</b>	Resultados CMT de las Cepas, bajo Distintas Concentraciones de Cd y Pb.....	78
<b>Tabla 15</b>	Rótulo de Muestra Plantas de Trigo con Metales e Inóculos.....	80
<b>Tabla 16</b>	Análisis de Varianza del Índice de Sideróforos sin Estrés Metálico.....	82
<b>Tabla 17</b>	Análisis de Varianza del Índice de Sideróforos con Estrés Metálico Pb (0.5mM).....	82
<b>Tabla 18</b>	Análisis de Varianza del Índice de Sideróforos con Estrés Metálico Pb (1mM).....	82
<b>Tabla 19</b>	Análisis de Varianza del Índice de Sideróforos con Estrés Metálico Cd (0.5mM).....	82
<b>Tabla 20</b>	Análisis de Varianza del Índice de Sideróforos con Estrés Metálico Cd (1mM).....	83
<b>Tabla 21</b>	Análisis de Varianza de la Producción de AIA con Estrés Metálico Pb (0.5mM) a 24 Horas de Lectura.....	83
<b>Tabla 22</b>	Análisis de Varianza de la Producción de AIA con Estrés Metálico Pb (0.5mM) a 48 Horas de Lectura.....	83
<b>Tabla 23</b>	Análisis de Varianza de la Producción de AIA con Estrés Metálico Pb (1mM) a 24 Horas de Lectura.....	84
<b>Tabla 24</b>	Análisis de Varianza de la Producción de AIA con Estrés Metálico Pb (1mM) a 48 Horas de Lectura.....	84
<b>Tabla 25</b>	Análisis de Varianza de la Producción de AIA con Estrés Metálico Cd (0.5mM) a 24 Horas de Lectura.....	84

<b>Tabla 26</b>	Análisis de Varianza de la Producción de AIA con Estrés Metálico Cd (0.5mM) a 48 Horas de Lectura.....	85
<b>Tabla 27</b>	Análisis de Varianza de la Producción de AIA con Estrés Metálico Cd (1mM) a 24 Horas de Lectura.....	85
<b>Tabla 28</b>	Análisis de Varianza de la Producción de AIA con Estrés Metálico Cd (1mM) a 48 Horas de Lectura.....	85
<b>Tabla 29</b>	Análisis de Varianza del Índice de Solubilización de Fosfatos con y sin Estrés Metálico Pb.....	86
<b>Tabla 30</b>	Análisis de Varianza del Porcentaje de Germinación de la Alfalfa Inoculada sin Estrés Metálico a 24 Horas de Lectura.....	86
<b>Tabla 31</b>	Análisis de Varianza del Porcentaje de Germinación de la Alfalfa Inoculada sin Estrés Metálico a 48 Horas de Lectura.....	86
<b>Tabla 32</b>	Análisis de Varianza del Porcentaje de Germinación de la Alfalfa Inoculada sin Estrés Metálico a 72 Horas de Lectura.....	87
<b>Tabla 33</b>	Análisis de Varianza del Porcentaje de Germinación de Trigo Inoculado sin Estrés Metálico a 24 Horas de Lectura.....	87
<b>Tabla 34</b>	Análisis de Varianza del Porcentaje de Germinación de Trigo Inoculado sin Estrés Metálico a 48 Horas de Lectura.....	87
<b>Tabla 35</b>	Análisis de Varianza del Porcentaje de Germinación de Trigo Inoculado sin Estrés Metálico a 72 Horas de Lectura.....	88
<b>Tabla 36</b>	Análisis de Varianza del Porcentaje de Germinación de Alfalfa Inoculada con Estrés Metálico Cd a 24 Horas de Lectura.....	88
<b>Tabla 37</b>	Análisis de Varianza del Porcentaje de Germinación de Alfalfa Inoculada con Estrés Metálico Cd a 48 Horas de Lectura.....	88



<b>Tabla 38</b>	Análisis de Varianza del Porcentaje de Germinación de Alfalfa Inoculada con Estrés Metálico Cd a 72 Horas de Lectura.....	89
<b>Tabla 39</b>	Análisis de Varianza del Porcentaje de Germinación de Trigo Inoculado con Estrés Metálico Cd a 24 Horas de Lectura.....	89
<b>Tabla 40</b>	Análisis de Varianza del Porcentaje de Germinación de Trigo Inoculado con Estrés Metálico Cd a 48 Horas de Lectura.....	89
<b>Tabla 41</b>	Análisis de Varianza del Porcentaje de Germinación de Trigo Inoculado con Estrés Metálico Cd a 72 Horas de Lectura.....	90
<b>Tabla 42</b>	Análisis de Varianza del Porcentaje de Germinación de Alfalfa Inoculada con Estrés Metálico Pb a 24 Horas de Lectura.....	90
<b>Tabla 43</b>	Análisis de Varianza del Porcentaje de Germinación de Alfalfa Inoculada con Estrés Metálico Pb a 48 Horas de Lectura.....	90
<b>Tabla 44</b>	Análisis de Varianza del Porcentaje de Germinación de Alfalfa Inoculada con Estrés Metálico Pb a 72 Horas de Lectura.....	91
<b>Tabla 45</b>	Análisis de Varianza del Porcentaje de Germinación de Trigo Inoculado con Estrés Metálico Pb a 24 Horas de Lectura.....	91
<b>Tabla 46</b>	Análisis de Varianza del Porcentaje de Germinación de Trigo Inoculado con Estrés Metálico Pb a 48 Horas de Lectura.....	91
<b>Tabla 47</b>	Análisis de Varianza del Porcentaje de Germinación de Trigo Inoculado con Estrés Metálico Pb a 72 Horas de Lectura.....	92
<b>Tabla 48</b>	Análisis de Varianza del Número de Raíces de Trigo Inoculado y sin Estrés Metálico.....	92
<b>Tabla 49</b>	Análisis de Varianza de la Longitud de Raíces de Trigo Inoculado y sin Estrés Metálico.....	92



<b>Tabla 50</b>	Análisis de Varianza de la Longitud Aérea de Trigo Inoculado y sin Estrés Metálico.....	93
<b>Tabla 51</b>	Análisis de Varianza del Número de Hojas de Trigo Inoculado y sin Estrés Metálico.....	93
<b>Tabla 52</b>	Análisis de Varianza del Número de Raíces de Trigo Inoculado y con Estrés Metálico Cd.....	93
<b>Tabla 53</b>	Análisis de Varianza de la Longitud de Raíces de Trigo Inoculado y con Estrés Metálico Cd.....	94
<b>Tabla 54</b>	Análisis de Varianza de la Longitud Aérea de Trigo Inoculado y con Estrés Metálico Cd.....	94
<b>Tabla 55</b>	Análisis de Varianza del Número de Hojas de Trigo Inoculado y con Estrés Metálico Cd.....	94
<b>Tabla 56</b>	Análisis de Varianza del Número de Raíces de Trigo Inoculado y con Estrés Metálico Pb.....	95
<b>Tabla 57</b>	Análisis de Varianza de la Longitud de Raíces de Trigo Inoculado y con Estrés Metálico Pb.....	95
<b>Tabla 58</b>	Análisis de Varianza de la Longitud Aérea de Trigo Inoculado y con Estrés Metálico Pb.....	95
<b>Tabla 59</b>	Análisis de Varianza del Número de Hojas de Trigo Inoculado y con Estrés Metálico Pb.....	96
<b>Tabla 60</b>	Análisis de Varianza del Número de Raíces de Alfalfa Inoculada y sin Entrés Metálico.....	96
<b>Tabla 61</b>	Análisis de Varianza de la Longitud de Raíces de Alfalfa Inoculada y sin Entrés Metálico.....	96



<b>Tabla 62</b>	Análisis de Varianza de la Longitud Aérea de Alfalfa Inoculada y sin Entrés Metálico.....	97
<b>Tabla 63</b>	Análisis de Varianza del Número de Hojas de Alfalfa Inoculada y sin Entrés Metálico.....	97
<b>Tabla 64</b>	Análisis de Varianza del Peso Húmedo de Raíces de Trigo Inoculado y sin Entrés Metálico.....	97
<b>Tabla 65</b>	Análisis de Varianza del Peso Húmedo Aéreo de Trigo Inoculado y sin Entrés Metálico.....	98
<b>Tabla 66</b>	Análisis de Varianza del Peso Seco de Raíces de Trigo Inoculado y sin Entrés Metálico.....	98
<b>Tabla 67</b>	Análisis de Varianza del Peso Seco Aéreo de Trigo Inoculado y sin Entrés Metálico.....	98
<b>Tabla 68</b>	Análisis de Varianza del Peso Húmedo de Raíces de Trigo Inoculado y con Entrés Metálico Cd.....	99
<b>Tabla 69</b>	Análisis de Varianza del Peso Húmedo Aéreo de Trigo Inoculado y con Entrés Metálico Cd.....	99
<b>Tabla 70</b>	Análisis de Varianza del Peso Seco de Raíces de Trigo Inoculado y con Entrés Metálico Cd.....	99
<b>Tabla 71</b>	Análisis de Varianza del Peso Seco Aéreo de Trigo Inoculado y con Entrés Metálico Cd.....	100
<b>Tabla 72</b>	Análisis de Varianza del Peso Húmedo de Raíces de Trigo Inoculado y con Entrés Metálico Pb.....	100
<b>Tabla 73</b>	Análisis de Varianza del Peso Húmedo Aéreo de Trigo Inoculado y con Entrés Metálico Pb.....	100



<b>Tabla 74</b>	Análisis de Varianza del Peso Seco de Raíces de Trigo Inoculado y con Entrés Metálico Pb.....	101
<b>Tabla 75</b>	Análisis de Varianza del Peso Seco Aéreo de Trigo Inoculado y con Entrés Metálico Pb.....	101
<b>Tabla 76</b>	Análisis de Varianza del Peso Húmedo de Raíces de Alfalfa Inoculada y sin Entrés Metálico.....	101
<b>Tabla 77</b>	Análisis de Varianza del Peso Húmedo Aéreo de Alfalfa Inoculada y sin Entrés Metálico.....	102
<b>Tabla 78</b>	Análisis de Varianza del Peso Seco de Raíces de Alfalfa Inoculada y sin Entrés Metálico.....	102
<b>Tabla 79</b>	Análisis de Varianza del Peso Seco Aéreo de Alfalfa Inoculada y sin Entrés Metálico.....	102
<b>Tabla 80</b>	Análisis de Varianza de la Concentración de Cd en la Parte Aérea de Trigo.....	103
<b>Tabla 81</b>	Análisis de Varianza de la Concentración de Cd en la Parte Rizosférica de Trigo.....	103
<b>Tabla 82</b>	Análisis de Varianza de la Concentración de Pb en la Parte Aérea de Trigo.....	103
<b>Tabla 83</b>	Análisis de Varianza de la Concentración de Pb en la Parte Rizosférica de Trigo.....	103
<b>Tabla 84</b>	Análisis de Varianza de la Concentración del Factor de Translocación del Cd en el Trigo.....	104
<b>Tabla 85</b>	Análisis de Varianza de la Concentración del Factor de Translocación del Pb en el Trigo.....	104



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Asociación entre las Raíces de las Plantas y las Bacterias PGP Tolerantes a los Metales y sus Efectos Posteriores.....	19
<b>Figura 2</b>	Esquema de Trabajo.....	22
<b>Figura 3</b>	Índices de Sideróforos (CAS-Fe) bajo Estrés Metálico Plomo.....	30
<b>Figura 4</b>	Índices de Sideróforos (CAS-Fe) bajo Estrés Metálico Cadmio....	30
<b>Figura 5</b>	Producción de AIA bajo Estrés Metálico Pb 0.5mM.....	31
<b>Figura 6</b>	Producción de AIA bajo Estrés Metálico Pb 1mM.....	32
<b>Figura 7</b>	Producción de AIA bajo Estrés Metálico Cd 0.5mM.....	32
<b>Figura 8</b>	Producción de AIA bajo Estrés Metálico Cd 1mM.....	33
<b>Figura 9</b>	Índice de Solubilización de Fosfato (ISP) bajo Estrés Metálico.....	34
<b>Figura 10</b>	Porcentaje de Germinación del Trigo sin Estrés Metálico.....	35
<b>Figura 11</b>	Porcentaje de Germinación del Trigo con Estrés Metálico Plomo.	35
<b>Figura 12</b>	Porcentaje de Germinación del Trigo con Estrés Metálico Cadmio.....	36
<b>Figura 13</b>	Porcentaje de Germinación de la Alfalfa sin Estrés Metálico.....	36
<b>Figura 14</b>	Porcentaje de Germinación de la Alfalfa con Estrés Metálico Plomo.....	37
<b>Figura 15</b>	Porcentaje de Germinación de la Alfalfa con Estrés Metálico Cadmio.....	38

<b>Figura 16</b>	Concentración de Plomo en la Parte Rizosférica del Trigo con Inóculo.....	42
<b>Figura 17</b>	Concentración de Plomo en la Parte Aérea del Trigo con Inóculo.	43
<b>Figura 18</b>	Concentración de Cadmio en la Parte Rizosférica del Trigo con Inóculo.....	44
<b>Figura 19</b>	Concentración de Cadmio en la Parte Aérea del Trigo con Inóculo.....	44
<b>Figura 20</b>	Factor de Translocación de Pb en los Tratamiento de Trigo e Inóculos.....	45
<b>Figura 21</b>	Factor de Translocación de Cd en los Tratamiento de Trigo e Inóculos.....	45
<b>Figura 22</b>	Reactivación de Cepas Bacterianas Altoandinas del CIByRGA...	106
<b>Figura 23</b>	Preparación de Inóculo Fresco.....	107
<b>Figura 24</b>	Coloración con Tetrazolio (0.1%) para la prueba CMT.....	107
<b>Figura 25</b>	Producción de Sideróforos de Cepas Tolerantes a Cd y Pb.....	108
<b>Figura 26</b>	Producción de Sideróforos de las Cepas BEP17-Dm y GT24B con Estrés Metálico.....	109
<b>Figura 27</b>	Prueba de Producción de Ácido Indol-3-Acético con Estrés Metálico.....	110
<b>Figura 28</b>	Prueba de Solubilización de Fosfatos con Estrés Metálico.....	111
<b>Figura 29</b>	Prueba de Germinación de Trigo y Alfalfa con Estrés Metálico....	112

<b>Figura 30</b>	Bioensayo de Trigo y Alfalfa Inoculados con BEP17-Dm y GT24B, Cultivado en Medio Hidropónico Suplementado con Cd o Pb.....	113
<b>Figura 31</b>	Efecto de los Metales en los Cultivos de Trigo y Alfalfa a 11 Días de aplicar los Metales.....	114
<b>Figura 32</b>	Medición de las Características de Crecimiento de las Plantas de Trigo y Alfalfa.....	115
<b>Figura 33</b>	Plantas Cosechadas de Trigo Cultivadas sin Estrés Metálico.....	116
<b>Figura 34</b>	Plantas Cosechadas de Trigo Cultivadas con Estrés Metálico Cd.	116
<b>Figura 35</b>	Plantas Cosechadas de Trigo Cultivadas con Estrés Metálico Pb.	117
<b>Figura 36</b>	Plantas Cosechadas de Alfalfa Cultivadas sin Estrés Metálico.....	117

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AIA</b>	:	Ácido indol-3-acético
<b>CAS</b>	:	Cromo Azurol S
<b>HMT-PGPB</b>	:	Heavy Metal Tolerant Bacteria Promoting Plant Growth (Bacterias tolerantes a metales pesados que promueven el crecimiento vegetal)
<b>IS</b>	:	índice de Sideróforos
<b>LB</b>	:	Luria-Bertani
<b>MP</b>	:	Metales Pesados
<b>PGPB</b>	:	Plant Growth-Promoting bacteria (Bacterias promotoras de crecimiento vegetal)
<b>SMS</b>	:	Sal Mínima Sacarosa
<b>TSB</b>	:	Tryptic Soy Broth (Caldo Tripticasa de Soya)
<b>TSA</b>	:	Tryptic Soy Agar (Agar Tripticasa de Soya)

## CAPÍTULO I

### INTRODUCCION

El desarrollo de diferentes actividades antropogénicas y la industrialización generan distintos materiales contaminantes que son agregados a los distintos compartimientos ambientales, estos materiales son las principales causantes de daños al ambiente y organismos vivos (Ullah et al., 2015). Los metales pesados son atribuidos como materiales contaminantes que presentan efectos inhibidores sobre los ecosistemas acuático y terrestres que dan como resultado un aumento de riesgo para la salud (Ashraf et al., 2017).

Las altas concentraciones de metales pesados pueden ser fitotóxicas debido a su probable interferencia con la fotosíntesis y la respiración, la nutrición mineral, las actividades enzimáticas, las funciones de membrana y el equilibrio hormonal en las plantas (Z. Yahaghi et al., 2019) Los metales pesados ocasionan efectos moderados y graves en la biosfera de las plantas, por lo que, existe una gran necesidad de encontrar soluciones para para garantizar la supervivencia de las plantas (Üreyen et al., 2020); Estas condiciones, hacen que las plantas desarrollen varios mecanismos que los protejan contra las toxicidades por metales pesados,

pueden ser, al evitar la absorción de metales y su desintoxicación a través de quelaciones con diferentes metabolitos como compuestos fenólicos, aminoácidos y ácidos orgánicos (Belimov et al., 2019). A pesar de estas adaptaciones, al aumentar las concentraciones de estos metales hasta niveles altos, puede generar mayor bioacumulación de metales, que a su vez puede generar dificultades en sus procesos fisiológicos y funciones bioquímicas, incluido el aparato fotosintético, sistema antioxidante y adquisición de nutrientes (Shahid et al., 2019). Incluso la fitorremediación, que usa plantas tolerantes y bioacumulantes de metales pesados, presenta desventajas como la disminución en la biomasa por estrés metálico, disminuyendo la tasa de crecimiento, e incluso en algunos disminuir la absorción por falta de biodisponibilidad de metales pesados en el medio (Ma et al., 2016), esto puede ser mejorado por asociaciones con microbios que potencia la eficiencia de este enfoque, considerándolo una fitorremediación asistida (Ashraf et al., 2017).

En los últimos años, las bacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPB) se han acuñado por su potencial para regular la tolerancia a los metales pesados en las plantas al aumentar la disponibilidad de nutrientes y la secreción de compuestos que regulan el crecimiento de las plantas, incluido AIA (Khanthom et al., 2021). De manera similar, las PGPB también tienen el potencial de regular el estrés abiótico en condiciones óptimas mediante la síntesis de la enzima ACC desaminasa y la solubilización del fosfato mineral que conduce a la promoción de la biomasa vegetal (Rizvi & Khan, 2017).

En la región de Ancash, existe el reporte de plántulas de *Medicago sativa* inoculadas con PGPB, que mostraron un mayor porcentaje de supervivencia bajo cultivo *in vitro* en presencia de cadmio (Cd), plomo (Pb) o aluminio (Al) (Tamariz-Angeles et al., 2021); sin embargo, hasta la fecha, no existen reportes o investigaciones similares en nuestra región, sobre microorganismos que presenten características PGP bajo estrés metálico, y sus inoculaciones en plantas cultivadas en presencia de metales pesados. Existen datos de microorganismos aislados de zonas con

presencia de metales, ya sea por acción del hombre o de manera natural, y que presentan características PGP, como los aislados de un pasivo ambiental minero (Palacios, 2018) y de suelos con lixiviados naturales de rocas (Huamán, 2018), pero que no profundizaron, en como los metales afectan sus características PGP y el efecto que tienen al ser inoculadas en plantas de *Medicago sativa* y *Triticum aestivum* cultivadas en dichos metales pesados; estas plantas son comunes en nuestra región, y han sido usadas en muchas evaluaciones similares a nivel internacional.

Por lo mencionado, la presente investigación tuvo como objetivo principal evaluar los efectos de microorganismos altoandinos promotores de crecimiento vegetal en la tolerancia de *Medicago sativa* y *Triticum aestivum* cultivados en presencia de metales pesados (Cd y Pb). El esquema de la investigación consigna: La introducción, donde se muestra los objetivos, hipótesis y variables de la investigación; el marco teórico, que presenta los antecedentes, bases teóricas y definición de términos básico; el marco metodológico, que muestra el tipo y diseño de la investigación, los métodos y técnicas usados en las distintas evaluaciones, la población y muestra, instrumentos validados de recolección de datos, y el plan de procesamiento y análisis estadístico de la información obtenida; los resultados; la discusión de resultados; y por último las conclusiones y recomendaciones.

## 1.1 Objetivos

### Objetivo General

Evaluar los efectos de microorganismos altoandinos promotores de crecimiento vegetal en la tolerancia de *Medicago sativa* y *Triticum aestivum* cultivados en presencia de metales pesados.

### Objetivos Específicos

- Evaluar capacidad de tolerancia de las cepas de bacterias a distintas concentraciones de sales de metales pesados.

- Evaluar la capacidad promotora de crecimiento vegetal de las cepas seleccionadas en el objetivo anterior (producción de ácido indol-3-acético, sideróforos y solubilización de fosfato) con y sin estrés metálico de Cd y Pb.
- Determinar la capacidad de germinación de las semillas, crecimiento y concentración de metales en el tejido de *Medicago sativa* y *Triticum aestivum* expuestas a metales pesados (Cd y Pb) he inoculadas con 02 bacterias nativas, altoandinas y promotoras de crecimiento vegetal seleccionadas en el objetivo anterior.
- Relacionar los resultados obtenidos como alternativas de mejora para una gestión ambiental adecuada.

## 1.2 Hipótesis

Al menos uno de los microorganismos altoandinos promotores de crecimiento vegetal inoculados en *Medicago sativa* o *Triticum aestivum* presenta efectos positivos en el crecimiento o absorción de metales pesados.

## 1.3 Variables

### Variable Independiente

Microorganismos altoandinos.

### Variable Dependiente

Resistencia de la planta inoculada con microorganismos altoandinos bajo estrés de metales pesados (MP).

**Tabla 1**

*Operacionalización de Variables*

Variable	Dimensión	Indicador	Método	Instrumento
<b>Variable Independiente:</b> Cepas Microorganismos microbianas altoandinos		Máxima capacidad de tolerancia (MCT)	Coloración	Plantilla Blanca
		Producción AIA	Absorbancia	Espectrofotómetro
		Producción de sideróforos	Coloración - Formación de halo	Regla y plantilla Blanca
<b>Variable Dependiente:</b> Resistencia de la planta inoculada con microorganismos altoandinos bajo estrés de metales pesados (MP)	Germinación de semillas	Solubilización de fosfatos	Formación de halo	Regla y plantilla Oscura
		% de Germinación	Ensayos de germinación	Observación - conteo
	Características de crecimiento	Longitud de tamaño total	Medición manual	Regla
		Longitud de tamaño raíz	Medición manual	Regla
		Peso Húmedo	Pesado	Balanza
		Peso Seco	Pesado	Balanza
Metales pesados en el tejido vegetal	Concentración de Pb	APHA - MS24(Pb)	Espectrofotómetro	
	Concentración de Cd	APHA - MS08 (Cd)	Espectrofotómetro	

**Fuente:** Elaboración propia

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1 Antecedentes

En la investigación "Characterization of siderophore-producing microorganisms associated to plants from high-Andean heavy metal polluted soil from Callejón de Huaylas (Ancash, Perú)", de Tamariz-Angeles et al. (2021), evaluando hongos y bacterias, aislados de medios con estrés metálico. Una primera evaluación fue la producción de sideróforos de hierro y/o aluminio, con esta prueba se tamizaron a 14 cepas de bacterias, las cuales fueron identificadas con análisis ADNr 16s e ITS. Se realizó prueba de tolerancia a metales, dónde los resultados en bacterias fueron de 2-8mM en plomo y 1-6mM de cadmio, y en hongos de 9-70mM de plomo y 3-10mM de cadmio; se realizaron pruebas de solubilización de fosfatos, producción de ácido indol-3-acético (AIA). Luego de todas las pruebas se seleccionaron algunas cepas para un bioensayo en plantas de *Medicago sativa*, donde fueron inoculadas, el crecimiento fue *in vitro* en un medio de cultivo contaminado con metales pesados.

Según Ulloa-Muñoz et al. (2020), en la investigación "Diversity of endophytic plant-growth microorganisms from *Gentianella weberbaueri* and *Valeriana pycnantha*, highland Peruvian medicinal plants", aislaron bacterias y hongos de dos plantas altoandinas de la Cordillera Blanca. Se realizaron pruebas de solubilización de fosfatos, producción de ácido indol-3-acético, producción de sideróforos, antagonismo, actividades celulolíticas y proteolíticas, como parte de encontrar las cepas con mejores características de promoción de crecimiento vegetal. Se realizó un bioensayo con plantas de *Medicago Sativa* y *Triticum aestivum*, donde un mayor crecimiento de raíces se observó con la inoculación de la bacteria GT24B, VT24B, VT28B y VT34B, demostrando la importancia de la diversidad microorganismos endófitos aislados, como promotores de crecimiento vegetal.

Según Üreyen et al. (2020) en su investigación "Determination of bioremediation properties of soil-borne *Bacillus* sp. 5O5Y11 and its effect on the development of *Zea mays* in the presence of copper", una bacteria rizoide *Bacillus* sp. con denominación 5O5Y11, procedente de orquídeas de la meseta Ovit, fue examinada en cuanto a las características que promueven el crecimiento de las plantas: Solubilización de fosfatos, producción de ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC desaminasa), producción de sideróforos, producción de ácido indol acético (AIA), producción de amonio. Se observó fuerte producción de sideróforos y amonio. Además, desarrolló una prueba de tolerancia a metales Hierro (Fe), Cobre (Cu), Plomo (Pb), Plata (Ag), Zinc (Zn), dónde 5O5Y11 demostró alta tolerancia. Se investigó el efecto de esta bacteria en la germinación y crecimiento de la planta de maíz, en condiciones de presencia y ausencia de cobre.

En el estudio de Efe (2020), "Potential Plant Growth-Promoting Bacteria with Heavy Metal Resistance", se colectaron muestras de suelos provenientes de depósitos minerales de plomo y zinc, ubicados en la provincia de Gümüşhane, Turquía. De estas muestras se aislaron nueve bacterias, que toleraron 100mg/ml de zinc y plomo suplementado a su

medio de cultivo. Se evaluaron las características que promueven el crecimiento de la planta: Producción de ácido indol acético y sideróforo, fijación de nitrógeno y solubilización de fosfato. Luego se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) a tres metales pesados (plomo, zinc, cobre). Concluye mencionando que los aislados bacterianos de su estudio poseen características que promueven el crecimiento de las plantas y mejoran un suelo contaminado con metales pesados.

Según Abbas et al. (2020), en la investigación "*Acinetobacter* sp. SG-5 inoculation alleviates cadmium toxicity in differentially Cd tolerant maize cultivars as deciphered by improved physio-biochemical attributes, antioxidants and nutrient physiology" se aisló una bacteria proveniente de suelo contaminado industrialmente, el cual a través del análisis de gen 16S rRNA, se determinó como *Acinetobacter* sp. SG-5, el cual pudo tolerar 1000 mg/L de estrés por Cd y presentar características promotoras de crecimiento de planta, como la producción *in vitro* de ácido indol acético, solubilización de fosfato, así como 1-aminociclopropano-1-carboxílico. actividad desaminasa ácida. Realizaron un experimento en placa para apreciar el efecto del *Acinetobacter* sp. en cultivos de maíz, plantas no inoculadas presentaron drásticos efectos con los tratamientos de Cd, en cuanto a su crecimiento, antioxidantes y adquisición de iones minerales predominantes. La inoculación influyó positivamente en el crecimiento del maíz, potencial antioxidante mejorado, nivel óptimo de nutrientes potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg) y zinc (Zn).

La investigación "Uptake and effects of lead and zinc on alfalfa (*Medicago sativa* L.) seed germination and seedling growth: Role of plant growth promoting bacteria" de Yahaghi et al. (2019), utilizaron cepas aisladas de suelos mineros contaminados con metales pesados que presentan características de promoción del crecimiento de plantas, según Zahra Yahaghi et al. (2018). El estudio se desarrolla orientado a seleccionar la cepa más eficaz en el aumento del crecimiento y acumulación de metales (bajo niveles tóxicos) de plomo (Pb) y zinc (Zn), en plantas de alfalfa. Los resultados datan que la germinación *in vitro* es

menos sensible a niveles elevados de Pb y Zn, requiriendo 4.4 y 7.9 mM respectivamente, para reducirlo al 50%; pero en el caso del crecimiento in vitro de las raíces de las plántulas, se suprimen a 4mM de Pb y 6mM de Zn. Observan que cepas bacterianas capaces de producir ácido indolacético y sideróforos afectaron positivamente al crecimiento de las plantas en medios con metales pesados. Además, hizo pruebas en maceta, usando vermiculita como medio, bajo tratamientos metálicos, dónde los resultados más eficaces fueron producto de la inoculación con *Bacillus filamentosus* YSP110, en tanto al aumento de la acumulación de Pb en tallo y raíces, y *Bacillus cereus* YSP4, en tanto al aumento del crecimiento y acumulación de Zn, en comparación de plantas no inoculadas. Los resultados sugieren que ambas cepas tienen gran potencial de promover el crecimiento de plantas y además de ser candidatos para la fitoextracción asistida por microorganismos de suelos contaminados con metales pesados.

Según Tirry et al. (2018), en el estudio "Screening of plant growth promoting traits in heavy metals resistant bacteria: Prospects in phytoremediation", a partir de muestras de suelos contaminados de las rizosferas de plantas autóctonas de la zona de Sais, Fez (Marruecos), se aislaron veintisiete bacterias resistentes a cromo, estas fueron luego sometidas a resistencia con metales pesados (Cromo, zinc, cobre, plomo y cobalto), reducción de Cr(VI) y características de promoción del crecimiento de las plantas (solubilización de fosfatos, producción de AIA y sideróforos). El aislado NF2 fue seleccionado por su alta resistencia a metales pesados y características de promoción de crecimiento de plantas, fue identificado por el análisis de la secuencia del ADNr 16S, como *Cellulosimicrobium* sp. Realizaron experimentos en maceta, a condiciones de invernadero, donde la cepa demostró propiciar el crecimiento de la alfalfa en suelos control y contaminados con cromo, zinc y cobre, además de aumentar la absorción de metales por parte de las plantas, demostrando un potencial para la biorremediación y promoción del crecimiento de plantas.

Según Rizvi & Khan (2017), en la investigación "Biotoxic impact of heavy metals on growth, oxidative stress and morphological changes in root structure of wheat (*Triticum aestivum* L.) and stress alleviation by *Pseudomonas aeruginosa* strain CPSB1", presenta una bacteria tolerante a metales aislada de rizosfera de Chile, fue identificada mediante la secuencia 16S rDNA. *Pseudomonas aeruginosa* CPSB1 presenta características promotoras de crecimiento vegetal en presencia y ausencia de metales, demostrando solubilización de fosfatos a 400 ppm de Cd, Cr y Cu. Además de ser positivos para ácido indol acético (AIA), sideróforos, cianuro de hidrogeno, amoniaco y 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) deaminasa, en presencia o ausencia de metales. El experimento con estrés metálico (Cu, Cd, Cr) y trigo, demuestra que plantas inoculadas con *P. aeruginosa* CPSB1 tuvieron mejor crecimiento, mayor número de espigas, mejor rendimiento de grano y paja, que las plantas de trigo sin inocular, CPSB1 disminuyó significativamente los niveles de catalasa (CAT), glutatión reductasa (GR) y superóxido dismutasa (SOD), prolina y malondialdehído (MDA) y disminuyó la cantidad de metales en el trigo, demostrando que esta cepa promueve el crecimiento de la planta y tiene la capacidad de contrarrestar efectos negativos de los metales.

Según la tesis "Determinación de la capacidad biofertilizante de actinomicetos en presencia de metales pesados" de Pacheco, (2016), determinó la capacidad biofertilizante de microorganismos actinomicetos en plantas frente a metales pesados. Trabajó con 24 cepas, de las cuales a través de pruebas bioquímicas y de resistencia a metales pesados, seleccionó 5 cepas para ser puestas a pruebas con semillas de *Medicago sativa* y *Lactuca sativa*, que fueron sometidas a cobre (Cu), hierro (Fe), zinc (Zn) y cadmio (Cd) en concentraciones de 10, 50, 100 y 200 ppm, respectivamente, repitió estas pruebas sin los inóculos, para observar el rendimiento de las plantas. Los resultados permitieron inferir que los metales son nocivos para las plantas y que la presencia de estas bacterias disminuye este efecto, pudiendo permitir la restauración de suelos contaminados y promoviendo el crecimiento vegetal.

## 2.2 Bases Teóricas

### Contaminación por metales pesados.

Los metales pesados (MP) en un sentido biológico, es un término que se utiliza para aquellos metales y semimetales de alta densidad, con potencial toxicidad humana o ambiental (Tchounwou et al., 2012). Metales como: Cadmio (Cd), arsénico (As), plomo (Pb), níquel (Ni), zinc (Zn), cobre (Cu), son de principal preocupación en compartimientos ambientales, como cuando se aplican al suelo en cantidades excesivas, pueden disminuir el rendimiento de las plantas o degradar la calidad de los cultivos (Gusain et al., 2017).

La acumulación de metales tóxicos en varios compartimientos del ambiente es peligrosa para la biota, incluidos los humanos, debido a la bioacumulación y biomagnificación de metales pesados en organismos vivos (Ali et al., 2013). Las áreas, donde se realizan actividades mineras generalmente presentan una mayor presencia de metales pesados que contaminan el suelo y el agua y restringen un normal desarrollo de la biota (Ashraf et al., 2017).

La contaminación por metales, no solo amenaza la productividad de los cultivos, sino que también representa diversos problemas ecológicos y ambientales, generando posibles entradas de metales a la cadena trófica, deteriorando la calidad del suelo, suprimiendo el crecimiento vegetal, la alteración de la microbiota y un peligro para las vidas humanas (Abbas et al., 2020; Ashraf et al., 2017).

### Efectos de la contaminación por metales pesados

Entre los metales pesados tóxicos más comunes tenemos: aluminio (Al), zinc (Zn), manganeso (Mn), cromo (Cr), cobre (Cu), cadmio (Cd), plomo (Pb) y mercurio (Hg) (Emamverdian et al., 2015). Los metales pesados presentan importantes efectos inhibidores sobre los ecosistemas acuáticos y terrestres que dan como resultado un aumento de los riesgos

fisiológicos para la salud (Chen et al., 2015). La exposición a algunos metales pesados como Cd, Pb y Cr, puede causar riesgos y efectos nocivos para la salud de los seres humano (Khanthom et al., 2021).

Tanto la parte rizosférica como la aérea de las plantas pueden absorber MP que afectan directa o indirectamente a la salud de las plantas (Mishra et al., 2017). Se ha reportado por varios estudios que la toxicidad del Al podría resultar en la inhibición del crecimiento de las raíces de las plantas que, por estrés oxidativo (Silambarasan et al., 2019). El exceso de cobre en el suelo genera contaminación dando como consecuencia un menor rendimiento y la calidad de muchos productos agrícolas (Üreyen et al., 2020). El Cd es un metal no redox activo, pero induce la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), que pueden provocar la muerte celular de las plantas debido al estrés oxidativo (Gusain et al., 2017). El Pb tiene mayor impacto perjudicial en la salud humana (Zahra Yahaghi et al., 2018).

Plantas expuestas a estreses abióticos como metales pesados, reflejan un crecimiento y supervivencia reducidas, por ejemplo: *Vigna radiata* presentó inhibición del alargamiento de las raíces en presencia de Al (Silambarasan et al., 2019), *Zea mays* disminuyó su crecimiento en presencia de Cu (Üreyen et al., 2020) y Cd (Abbas et al., 2020), de similar manera *Triticum aestivum* L. en presencia de Cd (Gusain et al., 2017), *Sorghum bicolor*, L. cultivado en suelo contaminado con Cd, Pb y Zn (El-Meihy et al., 2019) y *Medicago Sativa* en presencia de Pb y Zn contaminante (Z. Yahaghi et al., 2019).

### **Pasivos ambientales mineros en el Perú**

Son aquellos remanentes, producidos por la actividad minera, pudiendo ser aquellas instalaciones, efluentes o depósitos producidos por sus operaciones, que en la actualidad están abandonadas o inactivas, considerándose un riesgos permanente y potencial sobre la salud de las personas y los ecosistemas circundantes (Ministerio de Energía y Minas, 2004). La contaminación del suelo con metales pesados es uno de los

principales daños potenciales causados por la presencia de pasivos ambientales mineros, que puede comprometer seriamente el uso alternativo de estos suelos afectados (Zhang et al., 2018). Algunos de los metales pesados identificados en algunos estudios de pasivos ambientales mineros, de del tipo relave, fueron plomo (Pb), zinc (Zn), arsénico (As), cobre (Cu), plata (Ag), cadmio (Cd), hierro (Fe) y aluminio (Al) (Cruzado-Tafur et al., 2021; Palacios, 2018).

En el Perú, se han inventariado un total de 6903 pasivos ambientales mineros, de los cuales para la región de Ancash corresponden alrededor de 1241 (Ministerio de Energía y Minas, 2022). Actualmente a través del Cierre de minas, las unidades mineras operativas o en proceso de operar, que generen pasivos ambientales mineros, deben gestionarlos a fin de proteger, preservar y recuperar el medio ambiente afectado, el estado asumirá progresivamente los pasivos ambientales en abandono (no se identificaron titulares mineros), las principales técnicas de remediación usadas son estabilizaciones físicas y químicas y al final la revegetación del área (Ministerio de Energía y Minas, 2023, 2004).

### **Gestión ambiental de lugares afectados por Cd y Pb**

La gestión ambiental es un proceso que esta direccionado a prevenir, preservar y/o mitigar los daños o potenciales daños al ambiente, por las instalaciones y actividades de una empresa en su entorno, con el propósito de mejorar la calidad de vida de sus habitantes y lograr un desarrollo sostenible (Ministerio del Ambiente, 2005). Los ambientes o lugares que demuestran presencia de Cd y Pb, en su mayoría son los que están relacionados o cercanos a actividades mineras, donde hay presencia de residuos mineros como relaves (Cruzado-Tafur et al., 2021), también se demostró que existe presencia de estos metales en los lixiviados generados en infraestructura de disposición final de residuos sólido (Contreras-De la Cruz et al., 2023; Morales, 2007).

En el Perú existe un instrumento de gestión ambiental, llamado Plan de Cierre de Minas, que conforma un conjunto de acciones técnicas y

legales, efectuadas por los titulares mineros, con el fin de establecer medidas que rehabiliten el área utilizada o perturbada antes, durante y después de sus actividades, esta rehabilitación debe alcanzar las características ecosistémicas compatibles con un ambiente saludable, que permita el desarrollo de la vida y preservación paisajística (Ministerio de Energía y Minas, 2003). Para el caso de infraestructuras de disposición final de residuos sólidos, también existe un instrumento de gestión ambiental denominado Plan de cierre de infraestructura de disposición final de residuos sólidos y el Plan de Recuperación de Áreas Degradadas por Residuos Sólidos (Ministerio del Ambiente, 2017a). Otros instrumentos de gestión ambiental que deben ser tomados en cuenta, son los Estándares de Calidad Ambiental (ECA) y los Límites Máximos Permisibles (LMP) que regulan las medidas máximas de contaminantes (físicos, químicos o biológicos) en los espacios naturales o en las emisiones o vertimientos de las actividades antrópicas, respecto a los contaminantes Cd y Pb, para el caso del Suelo impactado, deberá cumplir con el ECA de suelo, en el cual al superar de los valores establecidos, se deberá elaborar un plan de descontaminación de suelos (Ministerio del Ambiente, 2013) cuerpos de agua impactados por Cd y Pb, deberán cumplir con el ECA de agua (Ministerio del Ambiente, 2017b) ; para el caso de vertimiento de efluentes con presencia de Cd y Pb, se cuenta con LMP para descarga de efluentes líquidos de actividades mineras o metalúrgicas (Ministerio del Ambiente, 2010) y LMP de efluentes de infraestructuras de residuos sólidos (Ministerio del Ambiente, 2009).

Los enfoques actuales, evalúan el uso de tecnologías amigables con el ambiente, que tengan un impacto ambiental mínimo, como lo es la biorremediación, la problemática de nuestra gestión actual es solamente usar técnica físicas y químicas, que en su mayoría suponen un riesgo potencial o mayor de contaminación (Garzón et al., 2017). Existen muchos estudios a nivel mundial, que buscan encontrar nuevas soluciones, ya sea para un objetivo de remediación o de protección agronómica, se realizaron pruebas piloto con árboles de la serranía peruana y relave minero, donde

a las 27 semanas se realizó un análisis fisicoquímico que demostró la tolerancia y remoción de metales pesados (As, Cd, Cu, Ag y Pb) (Paredes Mur, 2015); la aplicación de microorganismos mejora y puede dar un enfoque de protección agronómica, como es el caso del uso de bacterias resistentes al As, inoculadas en cultivares de arroz, donde se demuestra que estas inmovilizan al As, promueven el crecimiento y reducen la bioaccesibilidad del As y su acumulación en las plantas de arroz, cultivadas en estrés con As (Etesami et al., 2023).

### **Remediación de suelos contaminados con metales pesados**

La remediación de metales pesados tóxicos es muy importante para prevenir los efectos peligrosos sobre la salud humana y el ambiente, también para preservar el ambiente para las generaciones venideras (Ullah et al., 2015). Se han empleado diversas estrategias para la eliminación de metales pesados tóxicos. Estas estrategias se clasifican en enfoques biológicos, químicos y físicos (Ashraf et al., 2017).

Los métodos físicos y químicos tienen limitaciones, generando alteraciones irreversibles en las propiedades del suelo, trabajo intensivo y alto costo, también generando residuos nuevos. (Zahra Yahaghi et al., 2018). Los enfoques fisicoquímicos no son una solución absoluta a este problema. Estos enfoques solo cambian la forma del problema y no logran remediar los contaminantes por completo (Ashraf et al., 2017).

### **Fitorremediación**

La fitorremediación, que es el uso de plantas con mecanismos constitutivos y adaptativos para tolerar o acumular grandes concentraciones de metales en su rizosfera y tejidos, está emergiendo como una tecnología potencial *in situ* para descontaminar suelos contaminados por compuestos orgánicos y metales pesados (Ren et al., 2013). Esta interacción planta-contaminante, se puede dar de muchas maneras (Kong & Glick, 2017) como, por ejemplo: La fitoextracción, que es la translocación de metales desde los suelos contaminados a la

superficie del suelo a través del sistema radicular de las plantas. La fitoestabilización es el uso de ciertas plantas para reducir la movilidad y biodisponibilidad de los contaminantes del suelo/agua.

La potencialidad de las plantas como fitoextractoras o fitoestabilizadoras, se determina en la capacidad de absorber y translocar metales pesados desde el suelo hacia sus tejidos (Olguín & Sánchez-Galván, 2012). La movilidad de metales pesados desde la raíz a la parte aérea se representa como un factor de translocación (TF), siendo la relación entre las concentraciones de metales pesados presentes en la parte aérea sobre la de la parte rizosférica, un  $TF > 1$  se considera planta fitoextractora y por el contrario  $TF < 1$  fitoestabilizadora. La cantidad absorción de metales pesados en los tejidos de la raíz o parte aérea es otra característica que define a una planta como potencial fitorremediadora, dicha característica es representada como el factor de bioconcentración (BCF), que viene a ser la relación entre la concentración de metal el tejido vegetal (raíz o parte rizoférica) sobre la del suelo o agua contaminada, acorde a este valor se puede clasificar a las plantas como excluyentes ( $BCF < 1$ ) acumuladoras ( $BCF > 1$ ) e hiperacumuladoras ( $BCF > 10$ ) (Sarwar et al., 2017; Yoon et al., 2006).

La eficacia de la fitorremediación no solo está limitada por el lento crecimiento y la baja producción de biomasa de las plantas hiperacumuladoras, sino también por la baja biodisponibilidad de los metales pesados en muchos suelos contaminados (Zahra Yahaghi et al., 2018).

La fitorremediación de metales de suelos contaminados podría mejorarse mediante la inoculación con bacterias promotoras del crecimiento vegetal y tolerante a los metales pesados HMT-PGP (Ashraf et al., 2017). La fitorremediación asistida por microorganismos tolerantes a metales pesados, se ha considerado una medida prometedora para la rehabilitación de suelos contaminados con metales pesados (He et al., 2013).

Existe una consideración muy importante al momento de cosechar o extraer las plantas producto de la fitorremediación, dado que los metales no pueden ser degradados por los organismos vivos, su fitoextracción crea un riesgo ambiental diferente, ya que la biomasa contaminada debe ser tratada adecuadamente, se propusieron posibles opciones de eliminación, siendo estas la eliminación directa, compactación, compostaje, pirólisis, lixiviación e incineración (combustión y gasificación) (Vocciante et al., 2019).

### **Microorganismos y metales pesados**

En los ecosistemas terrestres, los suelos son el principal sumidero de afectación por los metales, de esas concentraciones de metales una parte importante es transformada por la acción geoactiva de los microorganismos del suelo (Ashraf et al., 2017). En el suelo hay muchos microorganismos importantes, especialmente la población rizosférica, realizan un papel crucial en la desintoxicación de los metales pesados en los suelos contaminados, esta acción de la población rizosférica también se denomina rizorremediación, la interacción metal-microbios en la rizósfera es muy estricta y de alguna forma depende de las características físico-química del suelo, el tipo y la concentración de las especies metálicas, la actividad metabólica y la diversidad de los microbios (Kong & Glick, 2017).

### **Interacción Planta–Microorganismo PGP–Metales pesados**

Para mejorar la eficiencia de la fitorremediación, se busca estudiar las interacciones cercanas entre plantas y microorganismos, metales pesados en suelos de rizósfera. Algunos estudios han encontrado que las rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR) (Ma et al., 2016), tienen la capacidad de aliviar la fitotoxicidad inducida por metales y mejorar la producción de biomasa de las plantas (Z. Yahaghi et al., 2019).

Las bacterias beneficiosas para las plantas que influyen positivamente en su crecimiento y desarrollo se denominan generalmente

PGPB. Estos microorganismos pueden actuar como agentes de biocontrol y facilitar indirectamente el crecimiento y desarrollo de las plantas a través de su actividad supresora contra los fitopatógenos (Kong & Glick, 2017). Por otro lado, las PGPB pueden mejorar directamente el crecimiento y desarrollo de las plantas aumentando los nutrientes minerales disponibles o moderando los niveles de fitohormonas (Khanthom et al., 2021), como las auxinas, las citoquininas y las giberelinas, que pueden mejorar varias etapas del crecimiento de las plantas; sintetizar quelantes del hierro, denominados sideróforos, mejorando así la nutrición de las plantas con Fe o inhibiendo la actividad de los fitopatógenos; sintetizar la 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminasa, que puede reducir los niveles de etileno de las plantas; y solubilizar minerales como el fósforo, lo que hace más disponible nutrientes. (Abbas et al., 2020; Üreyen et al., 2020).

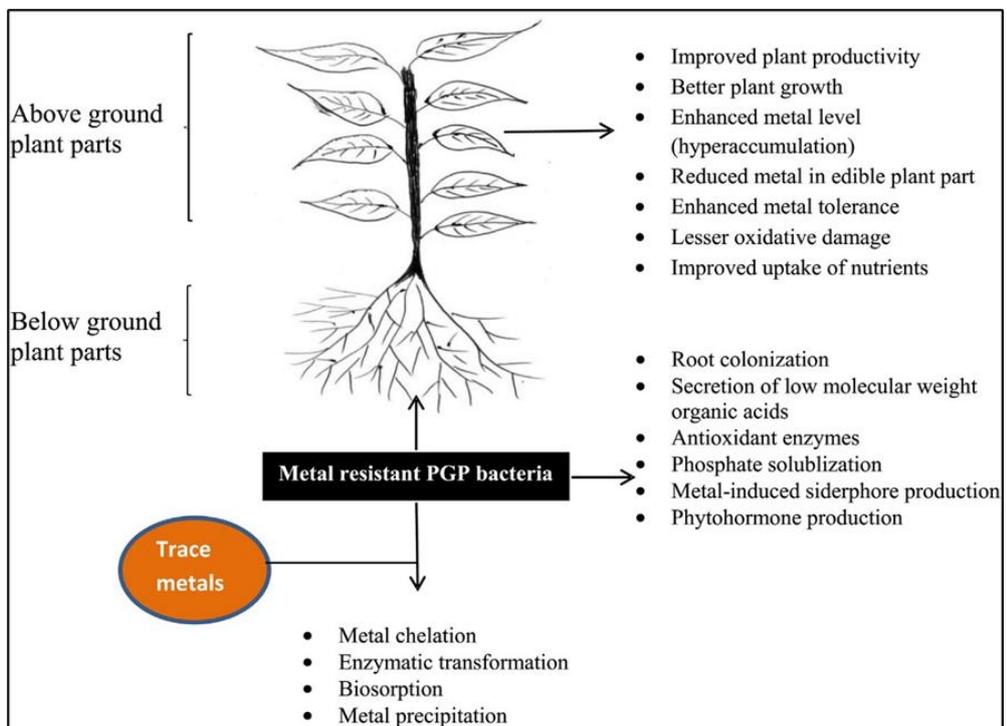
Las PGPB pueden facilitar el crecimiento y el desarrollo de las plantas utilizando uno o varios de estos mecanismos y una PGPB concreta puede utilizar diferentes mecanismos en diferentes condiciones ambientales (Kong & Glick, 2017). Los efectos beneficiosos de PGPB en el crecimiento de las plantas, bajo condiciones subóptimas y/o de estrés como los metales pesados, son más pronunciados que plantas sin inocular. (El-Meihy et al., 2019; Z. Yahaghi et al., 2019; Pacheco, 2016). En la Figura 1 podemos apreciar efectos de microorganismos tolerantes a metales pesados y con características de promoción de crecimiento vegetal (HMT-PGP).

Las bacterias endofíticas pueden ayudar a las plantas hospedadoras a adaptarse a las condiciones desfavorables del suelo y mejorar la eficiencia de la fitorremediación al promover el crecimiento de las plantas, aliviar el estrés de los metales, reducir la fitotoxicidad de los metales, alterar la biodisponibilidad de los metales en el suelo y la translocación de los metales en las plantas (Ma et al., 2016).

Al igual, en las rizobacterias, existen varios mecanismos directos como PGP: fijación de nitrógeno, la solubilización de minerales y la producción de fitohormonas, enzimas específicas y sideróforos; mecanismos indirectos de endófitos PGP disminuyen los efectos del estrés en las plantas al suprimir el daño de los fitopatógenos (Liu et al., 2019).

## Figura 1

*Asociación entre las Raíces de las Plantas y las Bacterias PGP Tolerantes a los Metales y sus Efectos Posteriores*



Fuente: Ashraf et al. (2017)

### 2.3 Definición de términos básicos

- **Ácido indol-3-acético (AIA):** Es uno de los rasgos que promueven el crecimiento de las plantas, como hormona de crecimiento vegetal auxina, puede estimular la germinación de semillas, la división celular y el alargamiento y desarrollo de las raíces, lo que aumenta la proliferación de plantas (Khanthom et al., 2021).

- **Biodisponibilidad:** Cuando un elemento o compuesto de una fuente potencial, presenta un grado de libertad para ser capturado (ingerido o absorbido) por un organismo (Palacios, 2018).
- **Estrés abiótico:** Son aquellos factores o condiciones abióticos, que limitan el desarrollo normal de los organismos (Kong & Glick, 2017).
- **Estrés oxidativo:** Es la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS), que pueden destruir el sistema de defensa inherente de la célula y causar daño celular o la muerte (El-Meihy et al., 2019).
- **Fitorremediación asistida:** Enfoque combinado para el uso de plantas y microorganismos PGP con el fin de mejorar la eficiencia de la fitorremediación de contaminantes (Khanthom et al., 2021).
- **Suelo contaminado:** Aquel suelo cuyas características químicas han sido alteradas negativamente por la presencia de sustancias químicas contaminantes depositados por la actividad humana, en concentraciones tal que en función del uso actual o previsto del sitio y sus alrededores representa un riesgo a la salud humana o el ambiente (Ministerio del Ambiente, 2014).
- **Sideróforos:** Son quelantes de hierro que sirven como portadores de hierro y tienen una alta afinidad por algunos ligandos (Olanrewaju et al., 2017).

## CAPÍTULO III

### MARCO METODOLÓGICO

#### 3.1 Tipo de Investigación

El tipo de investigación fue aplicativo, debido a que se buscó determinar los efectos de microorganismos altoandinos promotores de crecimiento vegetal en la tolerancia de *Medicago sativa* (alfalfa) y *Triticum aestivum* (trigo) en presencia de metales pesados Cd y Pb

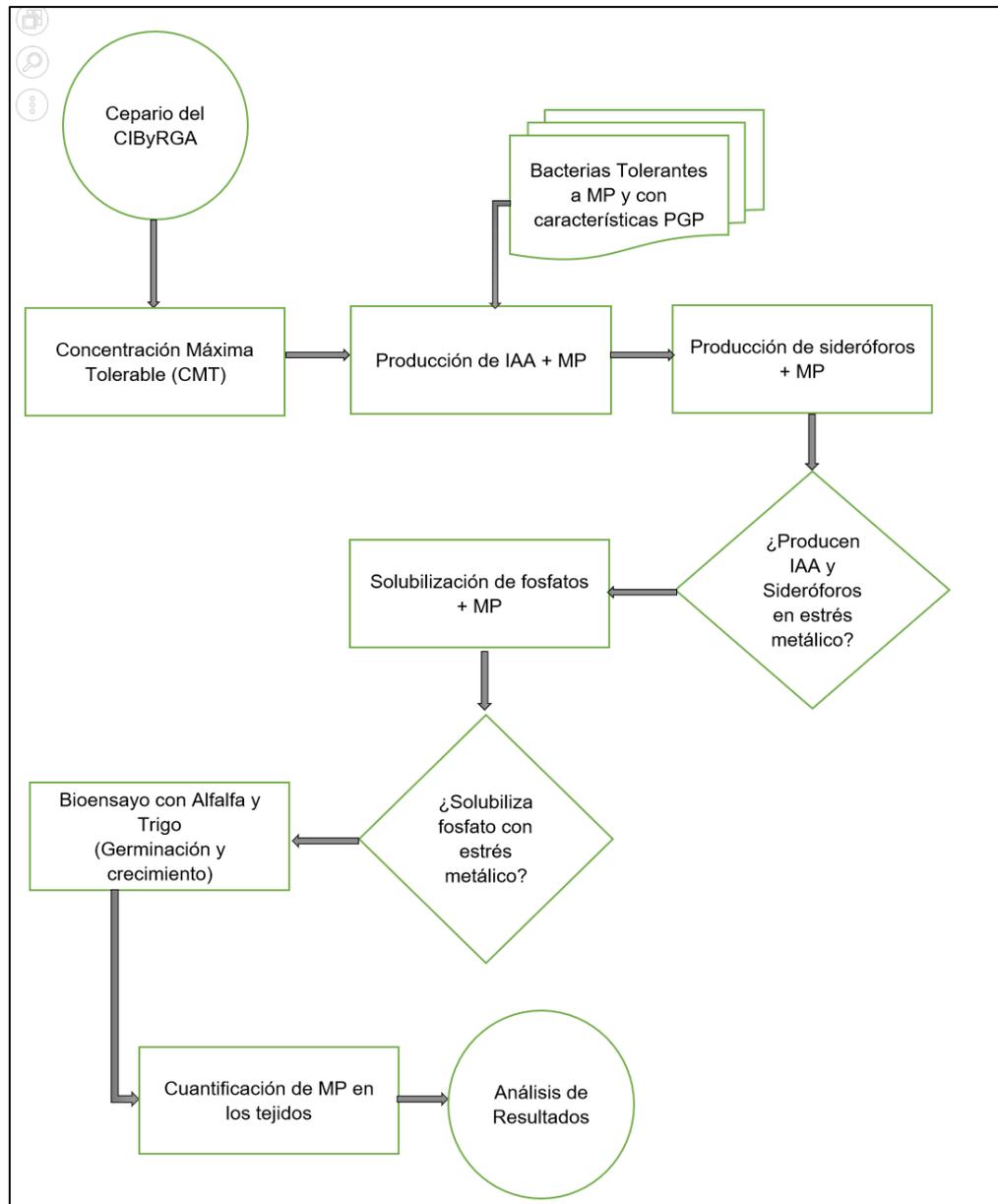
De enfoque cualitativo y cuantitativo.

#### 3.2 Diseño de Investigación

El diseño fue experimental, puesto que se evaluaron las potencialidades de 2 cepas bacterias altoandinas, en la tolerancia de las plantas, cultivadas bajo estrés con metales pesados (Cd y Pb).

**Figura 2**

*Esquema de Trabajo*



Fuente: Elaboración propia

### 3.3 Métodos y técnicas

#### Reactivación de cepas bacterianas

Se reactivaron los microorganismos existentes en el banco de cepas del CIByRGA, para tener muestras más óptimas en las diferentes

pruebas. Se utilizó el caldo de cultivo Tryptic Soy Broth (TSB) en tubos y se incubaron a 24°C durante 24 horas.

### **Preparación de inóculos**

Se utilizó la metodología de Ulloa-Muñoz et al. (2020), preparándose los cultivos bacterianos frescos en tubos de TSA (16-24 horas de cultivo), que luego fueron suspendidos en tubos de ensayo con agua destilada estéril y se diluyó hasta obtener una densidad óptica entre 0.08-0.1 a 620nm de longitud de onda.

### **Concentración Máxima Tolerable (CMT)**

Se realizó según la metodología de Tamariz-Angeles et al. (2021) con modificaciones. Se utilizó microdilución en microplaca, usando caldo Luria-Bertani (LB, 1% triptona, 0.5% extracto de levadura, 1% NaCl) y LB suplementado con metal pesado, siendo las concentraciones finales en el caso del LB-Cd: 1, 5, 10mM y LB-Pb: 2, 5, 10, 20mM. Se agregó en cada posillo de la microplaca 100 uL de LB-MP y se inoculó con 10uL de suspensión bacteriana previamente preparada. Se usaron como controles de crecimiento: LB sin MP y de contaminación: LB y LB-MP sin inocular. Se incubó a 24°C durante 72 horas y se evaluó el crecimiento bacteriano agregando 10uL de Tetrazolio (0.1%) observándose la coloración como respuesta de respiración de bacterias resistentes, todo se realizó con tres repeticiones (Tamariz-Angeles et al., 2021).

### **Producción de sideróforos con estrés metálico**

Luego de seleccionar las cepas con mejor tolerancia al Cd<sup>2+</sup> y Pb<sup>2+</sup>, se procedió a evaluar la producción de sideróforos, según Ulloa-Muñoz et al. (2020) con algunas modificaciones, se realizaron tres repeticiones. Se empleó el medio Cromo Azurol S (CAS) suplementado con Fe<sup>3+</sup>. En placas con medio TSA, se procede a cortar la mitad y reemplazarla con el medio CAS-Fe<sup>3+</sup>. Se colocaron discos de papel filtro entre los dos medios, y se

empaparon con 2uL de inóculo bacteriano y como blanco agua destilada estéril. Se incubaron durante tres días a 24°C.

Luego de verificar la producción de sideróforos (cambio de color), se realizó la misma prueba, pero con estrés metálico, donde se suplementaron los medios TSA con  $Cd^{2+}$  y  $Pb^{2+}$ , estableciendo concentraciones de 0.5 y 1mM de ambos metales. Se calcularon los índices de sideróforos (IS), que viene a ser la división del diámetro de cambio de color con el diámetro de la colonia, un  $IS > 1$  se consideró positivo.

### **Producción de Ácido Indol-3-Acético con estrés metálico**

Se realizó en tanto a lo aplicado por Tamariz-Angeles et al. (2021), con algunas modificaciones. Al igual que la prueba anterior, se trabajaron con las cepas de mejor tolerancia, y se hizo un preliminar cualitativo sin metales. Se utilizó el caldo de cultivo sal mínima sacarosa (SMS, 1% de Sacarosa, 0.2% de  $(NH_4)_2SO_4$ , 0.05% de  $K_2HPO_4$ , 0.01% de  $MgSO_4$ , 0.05% de NaCl, 0.05% de Extracto de levadura, 0.05% de  $CaCO_3$ ) al que se le suplementó Triptófano a una concentración de 2mg/mL, ajustado a 7.2 de pH. Todo ello distribuido en microtubos (1mL c/u) a los que se les añadió 50uL de inóculo bacteriano. Para la prueba con estrés de metales pesados, se añadió  $Cd^{2+}$  y  $Pb^{2+}$ , hasta tener concentraciones de 0.5 y 1mM. Se hicieron tres repeticiones y se incubaron durante 48 horas a 24°C.

Para el proceso de cuantificación de AIA, se utilizaron microplacas de 96 pocillos, como describe Ulloa-Muñoz et al. (2020). Las muestras extraídas (500uL), durante 24 y 48 horas, fueron centrifugadas durante 2 minutos a 12000 giros por minuto, se separaron los sobrenadantes, para ser aplicados en las microplacas. Se preparó una curva estándar de AIA a 20, 40, 60 y 80ug/mL. Se aplicó el reactivo de Salkowsky (Loper & Schroth, 1986) y se midió a 530 nm, luego de ser aisladas de la luz durante 30 minutos. La producción de AIA por parte de las cepas, se calculó interpolando con la curva estándar de AIA.

## Solubilización de fosfatos con estrés metálico

Las cepas seleccionadas de las dos pruebas anteriores fueron evaluadas siguiendo la metodología descrita por Ulloa-Muñoz et al. (2020). Se utilizó el medio NBRIP-Agar suplementado con  $\text{Ca}_3(\text{PO})_4$  (1% Glucosa, 0.5%  $\text{Ca}_3(\text{PO})_4$ , 0.5%  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.025%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.02% KCl, 0.01%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , pH 7, 1.5% A-A) en placas petri, donde discos de papel filtro fueron colocados y aplicados con 2uL de inóculos bacterianos. Para el caso de estrés por metales, se agregó  $\text{Cd}^{+2}$  y  $\text{Pb}^{+2}$  a una concentración de 1mM. Como control se utilizó disco de papel filtro, con 2uL de agua destilada estéril. Se realizaron tres repeticiones que fueron incubadas por tres días a 24°C.

Se calculó el índice de solubilización de fosfatos (ISP) según Montañez et al. (2012), donde ISP es la división de los diámetros del halo formado y del tamaño de la colonia.

## Preparación de inóculos para bioensayo

Se realizó en base a Tamariz-Angeles et al. (2021) y Ulloa-Muñoz et al. (2020). Los inóculos fueron preparados en matraces con TSB, puestos en la incubadora orbital durante 24 horas a 150 rpm y 24°C. Estos cultivos se diluyeron a una densidad óptica (620nm) de 0.1. Para los distintos tratamientos en *Medicago sativa* (alfalfa) y *Triticum aestivum* (trigo).

## Prueba de Germinación

Las semillas se desinfectaron según Ulloa-Muñoz et al. (2020) con etanol de 96° por un minuto, luego con hipoclorito de sodio (4%) durante cuatro minutos, luego se lavaron con agua destilada estéril durante tres minutos con un total de seis lavados. Las semillas de sumergieron en los inóculos bacterianos durante dos horas, luego veinte fueron colocadas en placas Petri con Agar Agua, suplementadas con  $\text{Pb}^{+2}$  y  $\text{Cd}^{+2}$  con concentraciones finales de 400 y 20ppm respectivamente. Se hicieron tres

repeticiones. Se contabilizaron las semillas germinadas en el periodo de 24, 48 y 72 horas. Para obtener un porcentaje respecto al número total de semillas por prueba.

### **Bioensayo con estrés metálico (Cd y Pb)**

Se siguieron los procedimientos realizados por Tamariz-Angeles et al. (2021) y Ulloa-Muñoz et al. (2020), pero con modificaciones.

Al igual que la germinación, se desinfectaron las semillas, estas fueron colocadas en placas con Agar-Agua (AA), y puestas a germinar en la incubadora a 24°C durante dos días, luego fueron sumergidas durante 2 horas en los inóculos bacterianos, y colocadas en nuevas placas con agar agua, durante un día. Se colocaron un total de 40 plántulas son colocadas en recipientes adaptados para esta prueba, estos recipientes contenían 800mL de solución hidropónica a una cuarta parte de su concentración normal de aplicación. Luego de cuatro días, se añadieron los metales Cd<sup>2+</sup> y Pb<sup>2+</sup> hasta alrededor de una concentración de 20 y 400ppm respectivamente, a cada tratamiento respectivo, y se cubrió la parte superficial con una capa de vermiculita. A los siete días se agregaron 200mL de agua y a los quince días, 200mL de solución hidropónica de misma concentración. Luego de treinta días se procedió a la cosecha de 8 plantas por envase, se midió la longitud de la raíz y la parte aérea, se contó el número de hojas y raíces. Se pesó la biomasa húmeda de la parte aérea y raíz, para el peso seco se colocaron las muestras en la estufa por cinco días a 45°C

### **Concentración de metales pesados en el tejido vegetal**

Se realizó en el laboratorio de calidad ambiental – UNASAM para la cuantificación de cadmio y plomo en los tejidos vegetales (parte aérea y raíz). La cuantificación se realizó mediante la metodología normalizada APHA MS08 (Cd), y MS24(Pb). Se determinó la concentración unitaria de cada tratamiento(ppm/Planta).

### **3.4 Población y muestra**

#### **Población**

Todos los microorganismos aislados de plantas de zonas altoandinas, existentes en el banco de cepas del CIByRGA de la Facultad de Ciencias – UNASAM, del periodo 2021.

#### **Muestra**

Dos microorganismos resultantes de la etapa de tamizado del estudio.

### **3.5 Instrumentos validados de recolección de datos**

La información fue recopilada en cuadros en Excel y fotografías, además de usar métodos (equipos, softwares, etc) respaldados por otras investigaciones.

### **3.6 Plan de procesamiento y análisis estadístico de la información**

Se elaboraron diseños completamente al azar (DCA) para cada experimento. Los resultados obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza ANOVA, y de comparación de medias Tukey, con un nivel de significancia  $\alpha = 0.05$ .

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS

#### 4.1 Reactivación de cepas bacterianas

Se lograron reactivar un total de cincuenta y nueve cepas bacterianas, de las cuales nueve son bacterias endófitas aisladas de dos plantas altoandinas de la Cordillera Blanca por Ulloa-Muñoz et al. (2020), quince endofíticas y diecisiete rizosféricas provenientes de la Punta Olímpica aisladas por Huamán (2018), siete endofíticas y once rizosféricas provenientes suelo contaminado con relave aisladas por Palacios (2018).

#### 4.2 Concentración Máxima Tolerable (CMT)

Del total de cepas bacterianas reactivadas, solo cinco cepas toleraron 2mM de plomo, treinta y nueve cepas toleraron 5mM de plomo, dos cepas toleraron 10mM de plomo, seis cepas toleraron 1mM de cadmio y 5mM de plomo, y una cepa toleró 1mM de cadmio y 10mM de plomo (Anexo 2).

Se escogieron siete cepas bacterianas que toleraron ambos metales, como detalla la tabla 2.

**Tabla 2***Cepas con Tolerancia a Cadmio y Plomo*

Cepa	CMT (mM)	
	Cd (2+)	Pb (2+)
BEP03	1	10
BEP32	1	5
BEU01	1	5
GT10B	1	5
GT24B	1	5
GT25B	1	5
VT19B	1	5

Adicionalmente, para la continuidad de las pruebas se seleccionaron teóricamente dos cepas bacterianas de la investigación de Tamariz-Angeles et al. (2021) que mostraron tolerancia a Cd y Pb, estas fueron las cepa BEP17-Dm y BEP18-Dm.

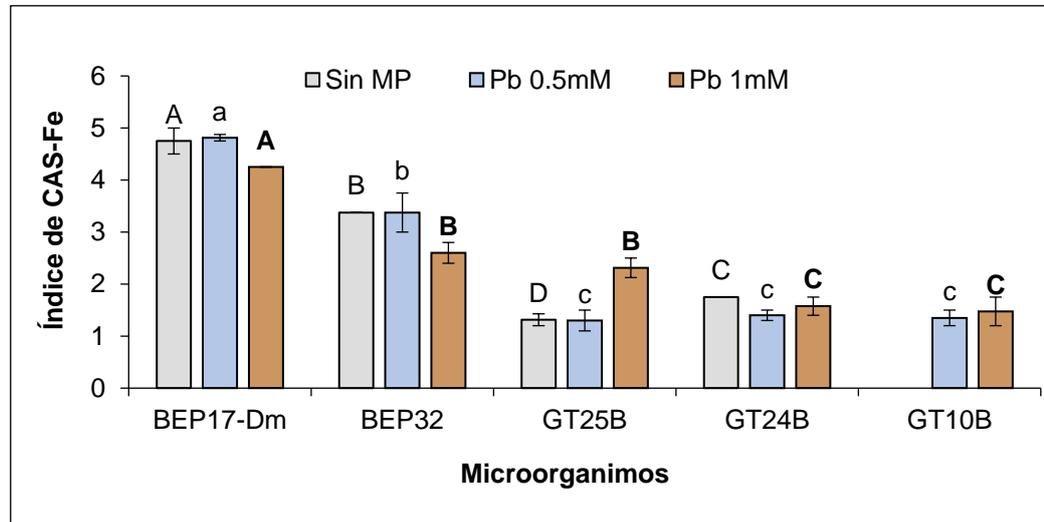
#### 4.3 Producción de sideróforos con estrés metálico

En la evaluación sin estrés metálico, las cepas BEP17-Dm, BEP32, GT25B, GT24B produjeron sideróforo, donde el mayor índice de producción fue  $4.75 \pm 0.25$  y el menor  $1.31 \pm 0.11$ , para BEP17-Dm y GT25B respectivamente ( $p < 0.05$ ). Como se muestra en la Figura 3 y Figura 4.

En la evaluación con estrés metálico, en presencia de 0.5mM de Pb las cepas BEP17-Dm, BEP32, GT25B, GT24B y GT10B produjeron sideróforos, donde el mejor resultado fue de BEP17-Dm ( $4.81 \pm 0.06$ ) y a una concentración de 1mM de Pb el mayor resultado también se reportó en BEP17-Dm ( $4.25 \pm 0$ ) con un  $p < 0.05$  en el análisis de ANOVA con comparación Tukey. Los resultados se muestran en la Figura 3.

**Figura 3**

*Índices de Sideróforos (CAS-Fe) bajo Estrés Metálico Plomo*

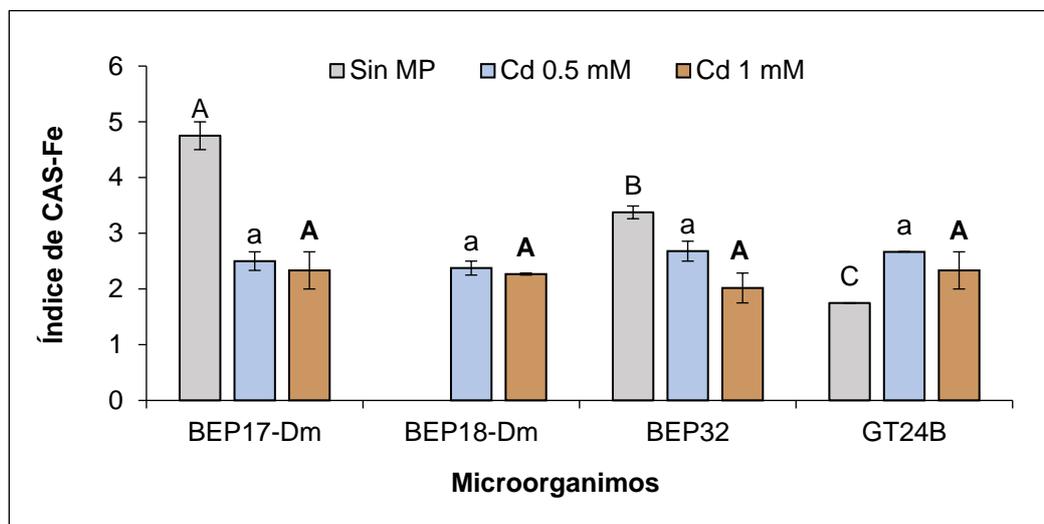


*Nota:* El análisis ANOVA con comparación Tukey, fue en función de cada tratamiento metálico (Sin metal, 0.5mM de Pb, 1mM de Pb).

Para el caso del estrés por Cd (0.5mM y 1mM), produjeron sideróforo la cepa BEP17-Dm, BEP18-Dm, BEP32 y GT24B, como se observa en la Figura 4. No hubo diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) entre las comparaciones de las cepas por cada tratamiento con Cd.

**Figura 4**

*Índices de Sideróforos (CAS-Fe) bajo Estrés Metálico Cadmio*



*Nota:* El análisis ANOVA con comparación Tukey, fue en función de cada tratamiento metálico (Sin metal, 0.5mM de Cd, 1mM de Cd).

#### 4.4 . Producción de Ácido Indol-3-Acético con estrés metálico

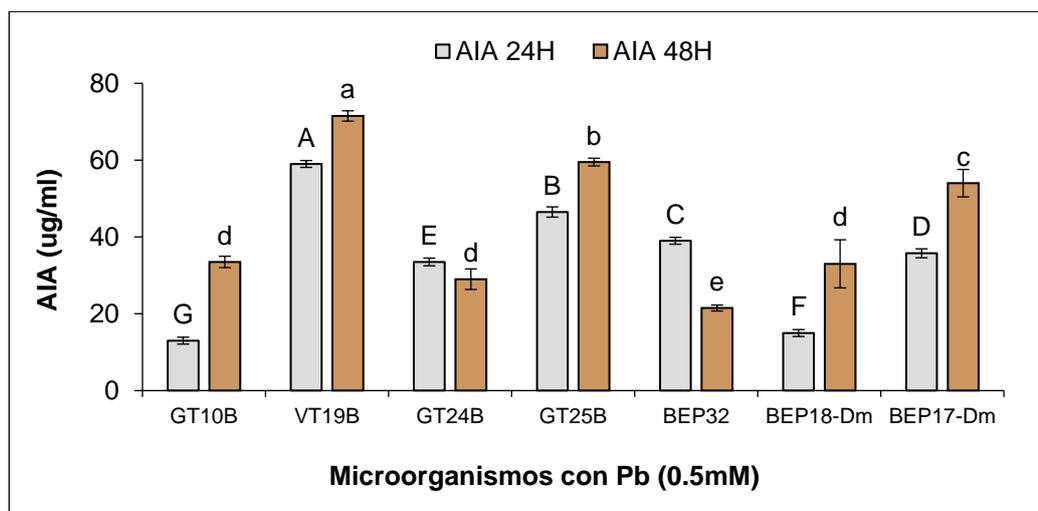
En la prueba preliminar de coloración las cepas BEP03 y BEU01, dieron negativo, por lo tanto, para la evaluación de producción de AIA bajo estrés metálico solo se evaluaron 07 las cepas positivas en la prueba preliminar como se observan en la Figura 5, Figura 6, Figura 7 y Figura 8.

Todas las cepas produjeron AIA bajo estrés con Pb, en ambos tiempos de lectura, como se aprecia en la Figura 5 y Figura 6.

La producción de AIA con estrés a 0.5mM de Pb, presenta diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en cuanto a cada tiempo de muestreo, donde para veinticuatro y cuarenta y ocho horas, el mayor valor fue de la cepa VT19B ( $59 \pm 0.89 \mu\text{g/mL}$  y  $71.5 \pm 1.34 \mu\text{g/mL}$ ). Bajo estrés de 1mM de Pb, existe diferencia significativa respecto a cada tiempo de muestreo, a veinticuatro y cuarenta y ocho horas, la mayor producción fue de la cepa GT25B ( $35.5 \pm 0.78 \mu\text{g/mL}$  y  $71.5 \pm 2.65 \mu\text{g/mL}$ ).

**Figura 5**

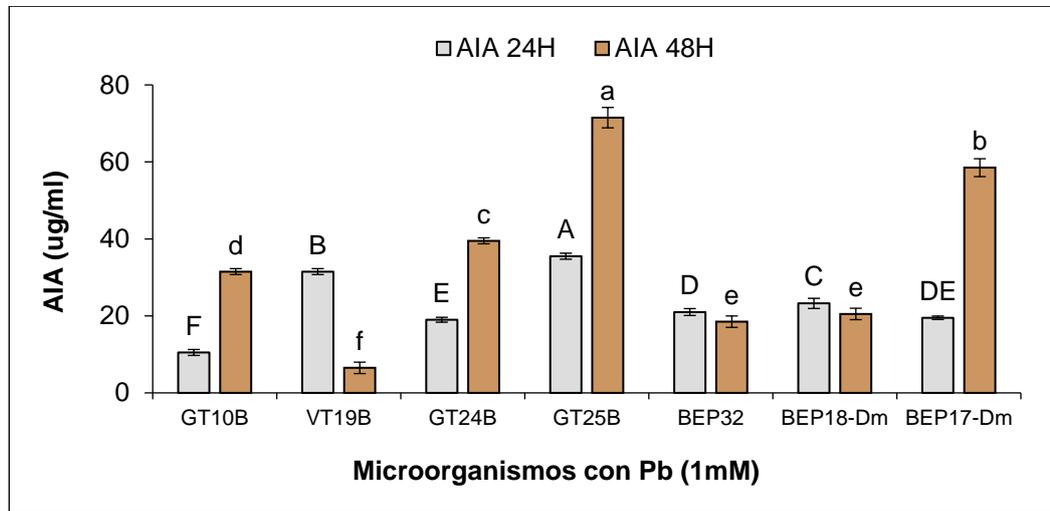
*Producción de AIA bajo Estrés Metálico Pb 0.5mM*



*Nota:* El análisis ANOVA con comparación Tukey, fue en función de cada tiempo de muestreo (24 y 48 horas) a un estrés metálico de Pb (0.5mM).

**Figura 6**

*Producción de AIA bajo Estrés Metálico Pb 1mM*

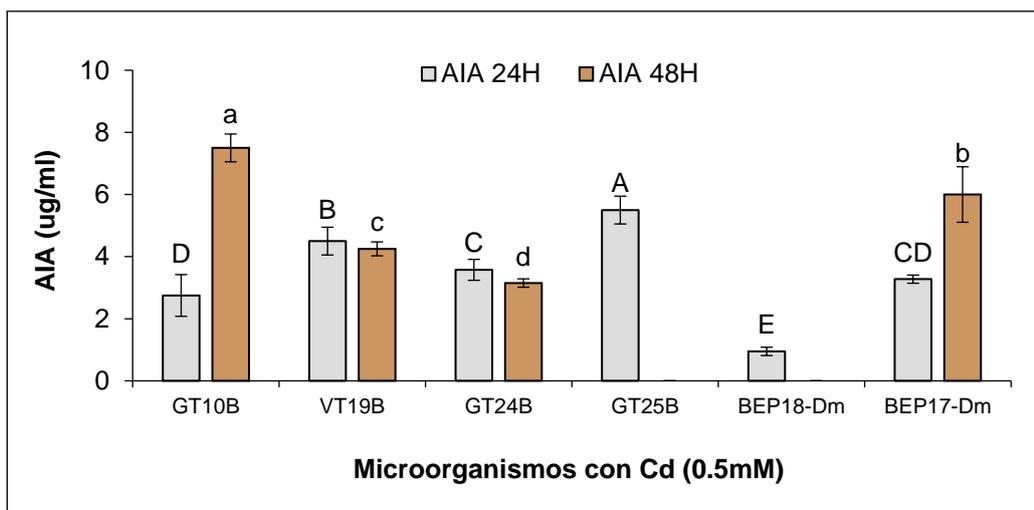


*Nota:* El análisis ANOVA con comparación Tukey, fue en función de cada tiempo de muestreo (24 y 48 horas) a un estrés metálico de Pb (1mM).

Bajo estrés a 0.5mM de Cd, existe diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en cuanto a la producción de AIA respecto del tiempo de muestreo, a veinticuatro horas de lectura el mayor resultado fue de GT25B ( $5.5 \pm 0.45 \text{ug/mL}$ ), mientras que a una lectura de cuarenta y ocho horas el mayor resultado fue de GT10B ( $7.5 \pm 0.45 \text{ug/mL}$ ), BEP18-Dm y GT25B a la lectura de cuarenta y ocho horas no produjeron AIA, BEP32 no produjo AIA a este nivel de estrés en ninguno de los dos tiempos, como se muestra en la figura 7.

**Figura 7**

*Producción de AIA bajo Estrés Metálico Cd 0.5mM*

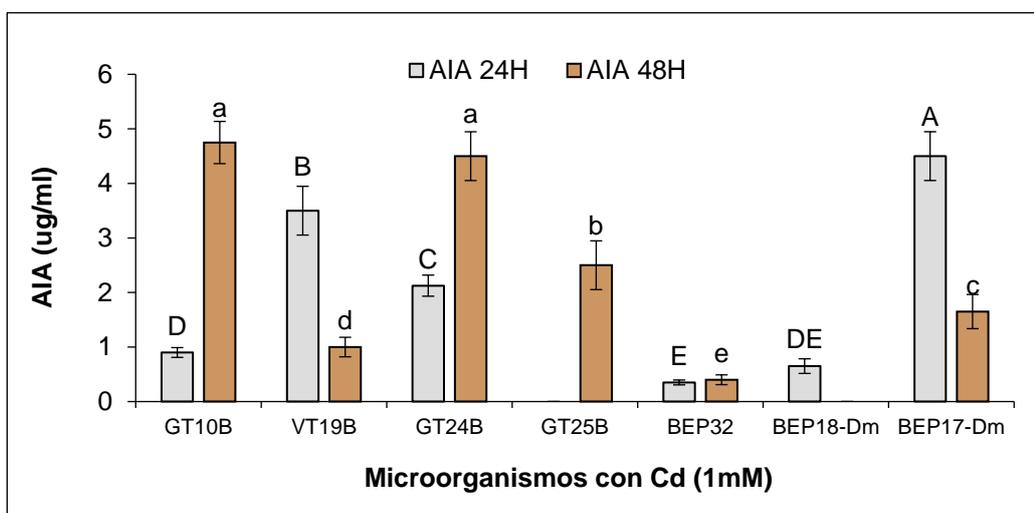


Nota: El análisis ANOVA con comparación Tukey, fue en función de cada tiempo de muestreo (24 y 48 horas) a un estrés metálico de Cd (0.5mM).

A una concentración de 1mM de Cd, existe diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en cuanto a la producción de AIA respecto del tiempo de muestreo, a veinticuatro horas de lectura, se obtuvo como mayor valor a BEP17-Dm ( $4.5 \pm 0.45 \text{ug/mL}$ ) y a una lectura de cuarenta y ocho horas los de mayor producción fueron GT10B ( $4.75 \pm 0.39 \text{ug/mL}$ ) y GT24B ( $4.5 \pm 0.45 \text{ug/mL}$ ). GT25B no produjo AIA a veinticuatro horas, al igual que BEP18-Dm, pero a cuarenta y ocho horas, como se aprecia en la Figura 8.

**Figura 8**

*Producción de AIA bajo Estrés Metálico Cd 1mM*



Nota: El análisis ANOVA con comparación Tukey, fue en función de cada tiempo de muestreo (24 y 48 horas) a un estrés metálico de Cd (1mM).

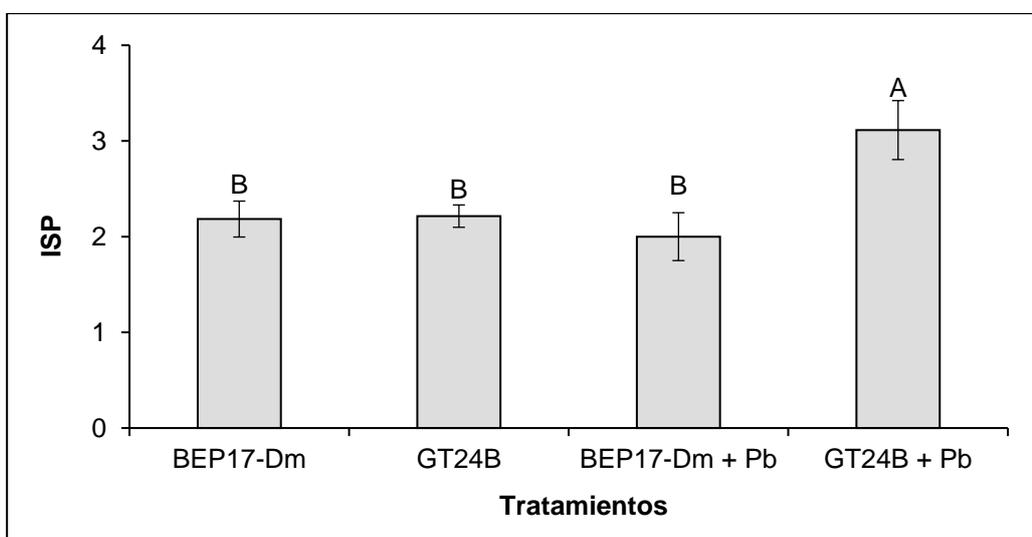
#### 4.5 Solubilización de fosfatos con estrés metálico

De las pruebas anteriores, se procedió a escoger las cepas BEP17-Dm y GT24B, ambos con capacidades de producir Sideróforos y AIA (con y sin estrés metálico).

Ambas cepas presentaron halos de solubilización, sin estrés metálico y con estrés de Pb, existiendo diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre estos, donde el mayor índice lo obtuvo GT24B con estrés Pb, teniendo un valor de  $3.11 \pm 0.31$  como se observa en la Figura 9. Bajo estrés con Cd, no hubo formación de halo.

**Figura 9**

*Índice de Solubilización de Fosfato (ISP) bajo Estrés Metálico*



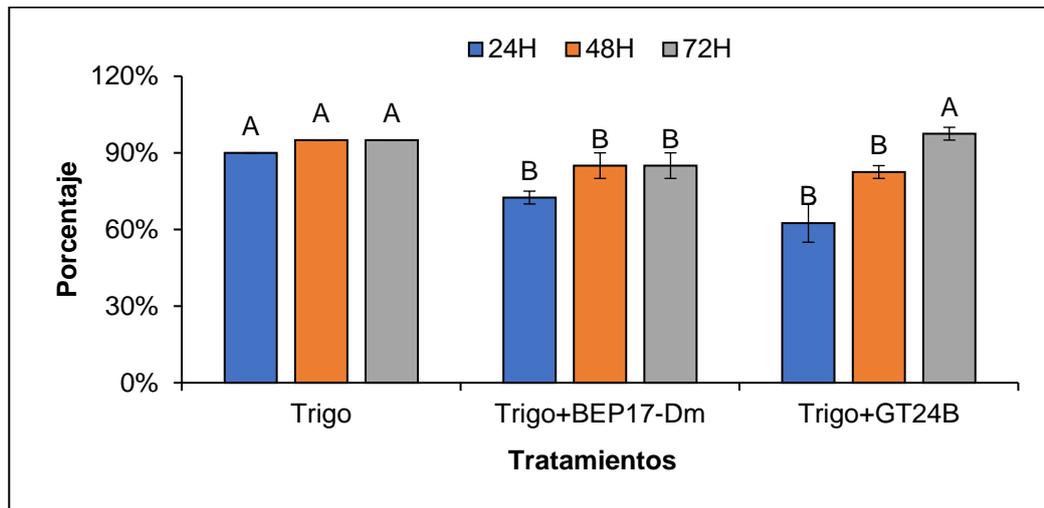
#### 4.6 Prueba de Germinación

Los resultados sin estrés metálico, demostraron que la germinación (%) de trigo, presentaron diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en cada tiempo de lectura, en cuanto al trigo inoculado, con BEP17-Dm (15, 85, 85%) fue menor al control (90, 95, 95%) en los tres tiempos de lectura, y con GT24B

fue menor, solo a veinticuatro (63%) y cuarenta y ocho horas (83%), como se aprecia en la Figura 10.

**Figura 10**

*Porcentaje de Germinación del Trigo sin Estrés Metálico*

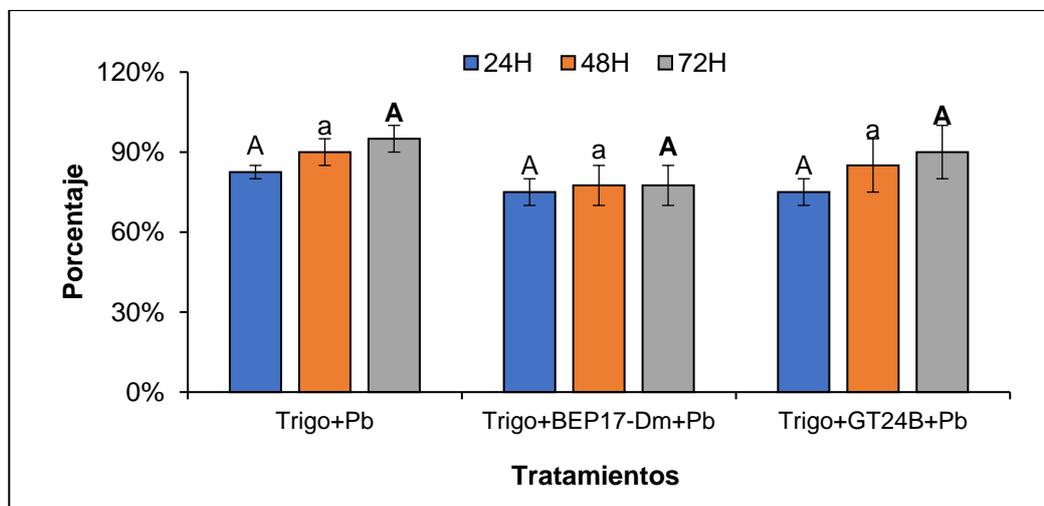


*Nota:* El análisis ANOVA con comparación Tukey, fue en función de cada tiempo de lectura (24, 48 y 72 horas) sin estrés metálico.

Bajo estrés metálico Pb, los resultados de la germinación (%) de trigo y sus tratamientos, no mostraron diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) por cada tiempo de lectura, como se observa en la Figura 11.

**Figura 11**

*Porcentaje de Germinación del Trigo con Estrés Metálico Plomo*

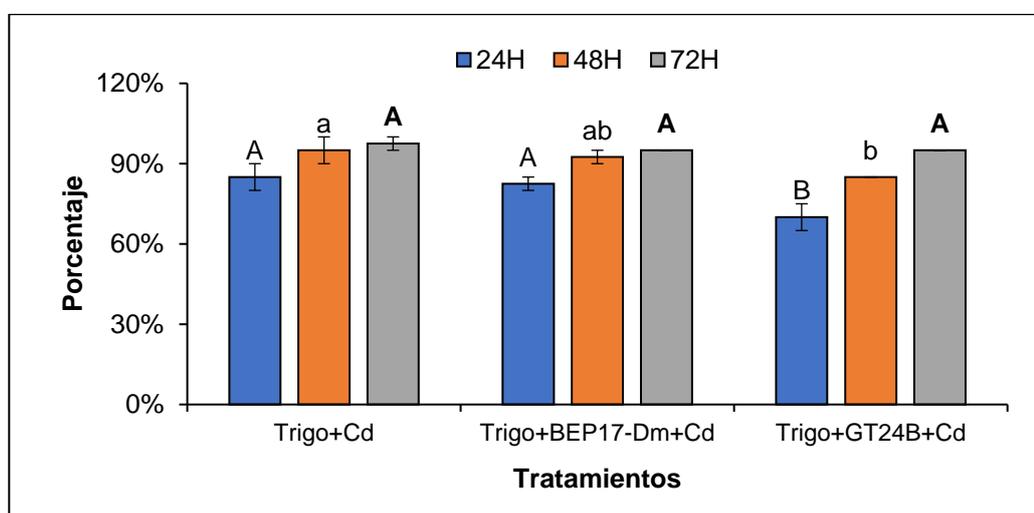


*Nota:* El análisis ANOVA con comparación Tukey, fue en función de cada tiempo de lectura (24, 48 y 72 horas) a un estrés metálico de Pb (400ppm).

En presencia de Cd, existe diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en la germinación (%) de trigo en cuanto a los tiempos de lectura, se obtuvieron valores menores al control, en el inoculado con GT24B (70, 85%) a veinticuatro y cuarenta y ocho horas de lectura, como se visualiza en la Figura 12.

**Figura 12**

*Porcentaje de Germinación del Trigo con Estrés Metálico Cadmio*

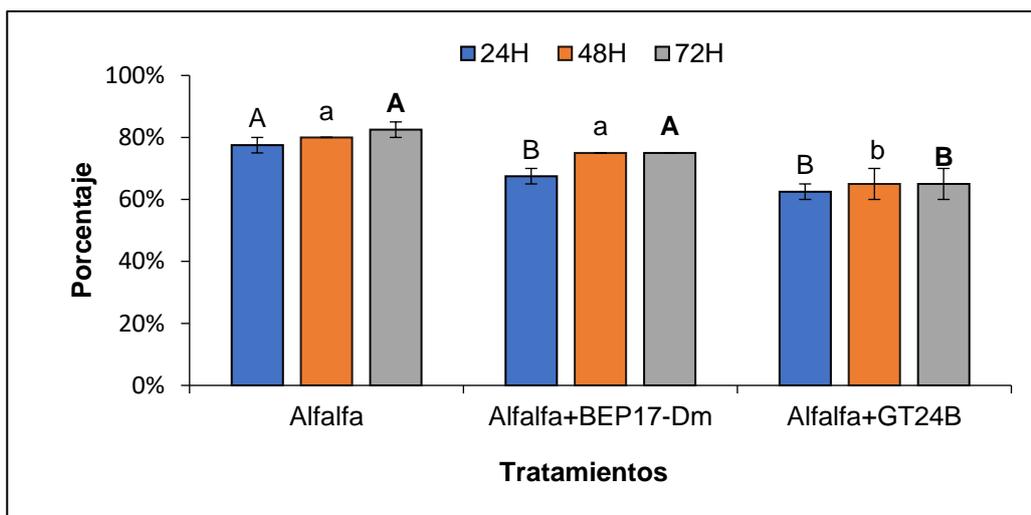


*Nota:* El análisis ANOVA con comparación Tukey, fue en función de cada tiempo de lectura (24, 48 y 72 horas) a un estrés metálico de Pb (20ppm).

En el tratamiento sin estrés metálico, la germinación (%) de alfalfa presenta diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en los tres tiempos de lectura, encontrando resultados menores al control sin inóculo, a veinticuatro horas, BEP17-Dm (68%) y GT24B (63%) fueron los resultados menores, a cuarenta y ocho y setenta y dos horas se observaron valores menores en inoculado con GT24B manteniendo un 65% de germinación, como se observa en la Figura 13.

**Figura 13**

*Porcentaje de Germinación de la Alfalfa sin Estrés Metálico*

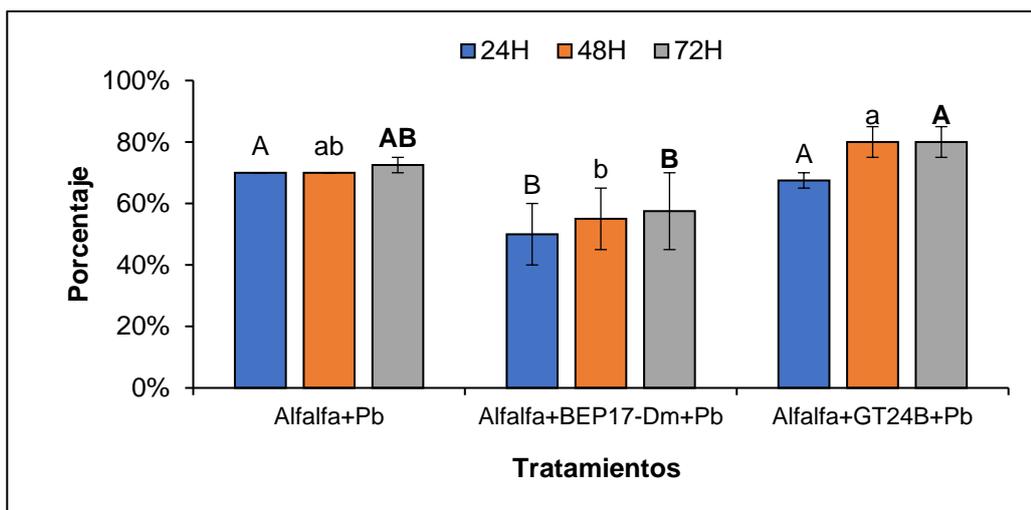


Nota: El análisis ANOVA con comparación Tukey, fue en función de cada tiempo de lectura (24, 48 y 72 horas) sin estrés metálico.

Bajo estrés con Pb, existe diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre la germinación (%) de la alfalfa, donde el inoculado con BEP17-Dm, resulta con valores menores (50, 55, 58%) a los tres tiempos de lectura, en comparación del control (70, 70, 73%), el inoculado con GT24B obtuvo un 80% de germinación, mayor al control. Como se aprecia en la Figura 14.

**Figura 14**

*Porcentaje de Germinación de la Alfalfa con Estrés Metálico Plomo*

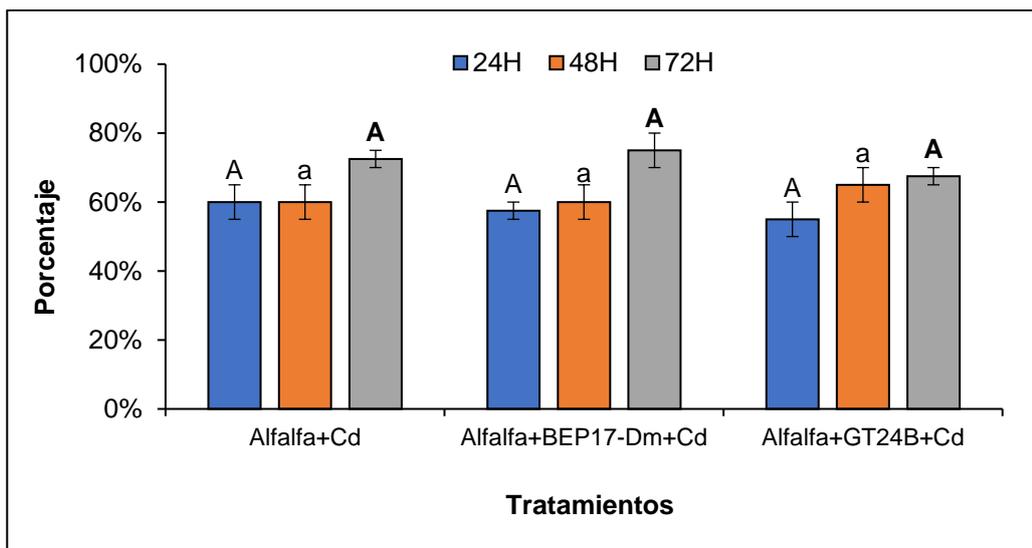


Nota: El análisis ANOVA con comparación Tukey, fue en función de cada tiempo de lectura (24, 48 y 72 horas) a un estrés metálico de Pb (400ppm).

Bajo estrés con Cd, los resultados de germinación (%) de la alfalfa no presentaron diferencia significativa ( $p>0.05$ ) en cada tiempo de muestreo, como se observa en la Figura 15.

**Figura 15**

*Porcentaje de Germinación de la Alfalfa con Estrés Metálico Cadmio*



*Nota:* El análisis ANOVA con comparación Tukey, fue en función de cada tiempo de lectura (24, 48 y 72 horas) a un estrés metálico de Cd (20ppm).

#### 4.7 Bioensayo con estrés metálico (Cd y Pb)

Las comparaciones de los resultados se hicieron por cada estrés metálico (sin metal, Pb y Cd).

Se obtuvo crecimiento del trigo en todos los tratamientos con y sin presencia de metales (S/M); en el caso de la alfalfa, solo hubo crecimiento sin presencia de metales pesados.

En cuanto al crecimiento del trigo sin metal, hubo diferencia significativa ( $p<0.05$ ) en cuanto a la longitud aérea, donde el inoculado con BEP17-Dm ( $27.67 \pm 0.84$ cm) fue menor que el control en 6.6%, como se observa en la Tabla 3.

**Tabla 3**

*Crecimiento de Trigo con Inóculos y sin Estrés Metálico*

Tratamiento (S/M)	N°de Raíces	Long.de Raíces (cm)	Long.Aérea (cm)	N°de Hojas
Trigo	9 ± 0.72 <sup>a</sup>	43.35 ± 5.19 <sup>a</sup>	29.63 ± 0.35 <sup>a</sup>	5 ± 0.33 <sup>a</sup>
T + BEP17-Dm	7 ± 0.76 <sup>a</sup>	41.77 ± 1.17 <sup>a</sup>	27.67 ± 0.84 <sup>b</sup>	5 ± 0.26 <sup>a</sup>
T + GT24B	8 ± 1.15 <sup>a</sup>	38.38 ± 1.85 <sup>a</sup>	30.52 ± 0.52 <sup>a</sup>	5 ± 0.19 <sup>a</sup>

Bajo estrés con plomo, los datos de crecimiento de trigo, no tuvieron diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) en las características de crecimiento medidas.

**Tabla 4**

*Crecimiento de Trigo con Inóculos y Estrés Metálico Plomo*

Tratamiento (Pb)	N°de Raíces	Long.de Raíces (cm)	Long.Aérea (cm)	N°de Hojas
Trigo	7 ± 1.15 <sup>a</sup>	7.23 ± 1.14 <sup>a</sup>	22.75 ± 2.11 <sup>a</sup>	4 ± 0.38 <sup>a</sup>
T + BEP17-Dm	8 ± 0.76 <sup>a</sup>	8.63 ± 0.38 <sup>a</sup>	21.13 ± 1.02 <sup>a</sup>	4 ± 0.4 <sup>a</sup>
T + GT24B	7 ± 1.05 <sup>a</sup>	6.54 ± 0.97 <sup>a</sup>	19.88 ± 3.37 <sup>a</sup>	5 ± 0.19 <sup>a</sup>

En el crecimiento de trigo, bajo estrés con cadmio, solo presentaron diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) los datos de longitud de raíces, donde el mayor resultado fue con el inóculo BEP17-Dm ( $10.96 \pm 1.34$ cm) y el resultado menor con GT24B ( $6.98 \pm 0.95$ cm), como se aprecia en la Tabla 5.

**Tabla 5**

*Crecimiento de Trigo con Inóculos y Estrés Metálico Cadmio*

Tratamiento (Cd)	N°de Raíces	Long.de Raíces (cm)	Long.Aérea (cm)	N°de Hojas
Trigo	7 ± 0.26 <sup>a</sup>	8.29 ± 1.03 <sup>ab</sup>	14.48 ± 3.57 <sup>a</sup>	4 ± 0.19 <sup>a</sup>
T + BEP17- Dm	7 ± 0.83 <sup>a</sup>	10.96 ± 1.34 <sup>a</sup>	17.54 ± 1.86 <sup>a</sup>	5 ± 0.25 <sup>a</sup>
T + GT24B	7 ± 0.07 <sup>a</sup>	6.98 ± 0.95 <sup>b</sup>	15.27 ± 0.73 <sup>a</sup>	4 ± 0.31 <sup>a</sup>

En el caso de la alfalfa, no hubo diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) en los datos de crecimiento de los tratamientos.

**Tabla 6**

*Crecimiento de Alfalfa con Inóculos y sin Estrés Metálico*

Tratamiento (S/M)	N°de Raíces	Long.de Raíces (cm)	Long.Aérea (cm)	N°de Hojas
Alfalfa	5 ± 0.82 <sup>a</sup>	20.9 ± 1.3 <sup>a</sup>	14.38 ± 0.65 <sup>a</sup>	19 ± 1.04 <sup>a</sup>
A + BEP17- Dm	5 ± 0.25 <sup>a</sup>	20.21 ± 2.94 <sup>a</sup>	13.02 ± 0.99 <sup>a</sup>	18 ± 0.98 <sup>a</sup>
A + GT24B	5 ± 0 <sup>a</sup>	17.77 ± 1.72 <sup>a</sup>	15.02 ± 1.72 <sup>a</sup>	19 ± 0.51 <sup>a</sup>

En cuanto al peso húmedo o fresco de las partes aérea y rizosférica de las plantas de trigo, existe diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en los pesos de los tratamientos en la parte aérea y sin presencia de estrés metálico, donde el inoculado con GT24B presenta el mayor valor ( $4.32 \pm 0.19g$ ); también existe diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en la parte rizoférica bajo estrés con cadmio, donde el inoculado con BEP17-Dm presenta el mayor valor ( $1.04 \pm 0.11g$ ), como se aprecia en la Tabla 7.

**Tabla 7***Peso Húmedo de Trigo con Inóculos y Estrés Metálico*

Tratamiento	Peso Húmedo (g)					
	S/M		Pb		Cd	
	Raíz	Aérea	Raíz	Aérea	Raíz	Aérea
Trigo	2.01 ±	3.4 ±	0.9 ±	1.59 ±	0.83 ±	1.73 ±
	0.39 <sup>a</sup>	0.09 <sup>b</sup>	0.14 <sup>a</sup>	0.28 <sup>a</sup>	0.1 <sup>ab</sup>	0.13 <sup>a</sup>
T + BEP17-Dm	1.53 ±	3.59 ±	1.29 ±	2.19 ±	1.04 ±	2.18 ±
	0.24 <sup>a</sup>	0.19 <sup>b</sup>	0.25 <sup>a</sup>	0.48 <sup>a</sup>	0.11 <sup>a</sup>	0.28 <sup>a</sup>
T + GT24B	1.72 ±	4.32 ±	1.27 ±	2.25 ±	0.7 ±	1.84 ±
	0.26 <sup>a</sup>	0.19 <sup>a</sup>	0.25 <sup>a</sup>	0.2 <sup>a</sup>	0.14 <sup>b</sup>	0.21 <sup>a</sup>

Los pesos secos de la parte rizoférica y aérea del trigo, respecto a cada estrés metálico (S/M, Pb y Cd) no presentaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ), como se observa en la Tabla 8.

**Tabla 8***Peso Seco de Trigo con Inóculos y Estrés Metálico*

Tratamiento	Peso Seco (g)					
	S/M		Pb		Cd	
	Raíz	Aérea	Raíz	Aérea	Raíz	Aérea
Trigo	0.2 ±	0.37 ±	0.1 ±	0.23 ±	0.1 ± 0 <sup>a</sup>	0.23 ±
	0.02 <sup>a</sup>	0.02 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0.02 <sup>a</sup>		0.02 <sup>a</sup>
T + BEP17-Dm	0.19 ±	0.37 ±	0.1 ±	0.27 ±	0.1 ±	0.27 ±
	0.02 <sup>a</sup>	0.03 <sup>a</sup>	0.02 <sup>a</sup>	0.03 <sup>a</sup>	0.02 <sup>a</sup>	0.03 <sup>a</sup>
T + GT24B	0.2 ± 0 <sup>a</sup>	0.42 ±	0.08 ±	0.22 ±	0.08 ±	0.22 ±
		0.01 <sup>a</sup>	0.01 <sup>a</sup>	0.01 <sup>a</sup>	0.01 <sup>a</sup>	0.01 <sup>a</sup>

En la Tabla 9, se observa que solo existió diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en el peso seco de la parte rizoférica de la alfalfa, sin estrés

metálico, donde el mayor resultado lo tiene el inoculado con GT24B ( $0.03 \pm 0g$ ).

**Tabla 9**

*Peso Húmedo y Seco de Alfalfa con Inóculos y sin Estrés Metálico*

Tratamiento	Peso Húmedo (g)		Peso Seco (g)	
	Raíz	Aérea	Raíz	Aérea
Alfalfa	0.42 ±	1.79 ±	0.03 ± 0b	0.17 ±
	0.05a	0.12a		0.02a
A + BEP17-Dm	0.48 ±	1.76 ±	0.02 ± 0b	0.16 ± 0a
	0.06a	0.09a		
A + GT24B	0.47 ±	2.04 ±	0.03 ± 0a	0.2 ± 0.04a
	0.09a	0.28a		

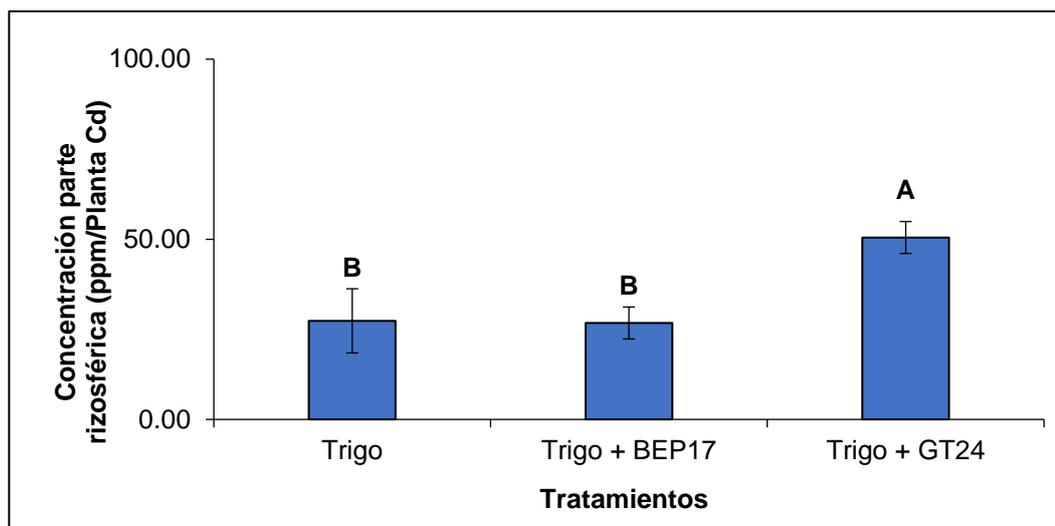
#### 4.8 Concentración de metales pesados en el tejido vegetal

Solo se obtuvieron resultados de las pruebas con trigo, ya que la alfalfa no generó biomasa bajo estrés con cadmio y plomo.

Los datos de la concentración de Pb (ppm/Planta Pb) en el tejido de las raíces, presentan diferencia significativa ( $p < 0.05$ ), donde el trigo inoculado con GT24B presenta el mayor valor ( $50.51 \pm 4.44$  ppm/Planta) que el control ( $27.37 \pm 8.91$  ppm/Planta), como se observa en la Figura 16. En el caso de la parte aérea, existe diferencia significativa entre los resultados ( $p < 0.05$ ), donde el inoculado GT24B presenta el mayor valor ( $25.21 \pm 4.4$  ppm/Planta) que el sin inóculo ( $7.43 \pm 0.14$  ppm/Planta), como se observa en la Figura 17.

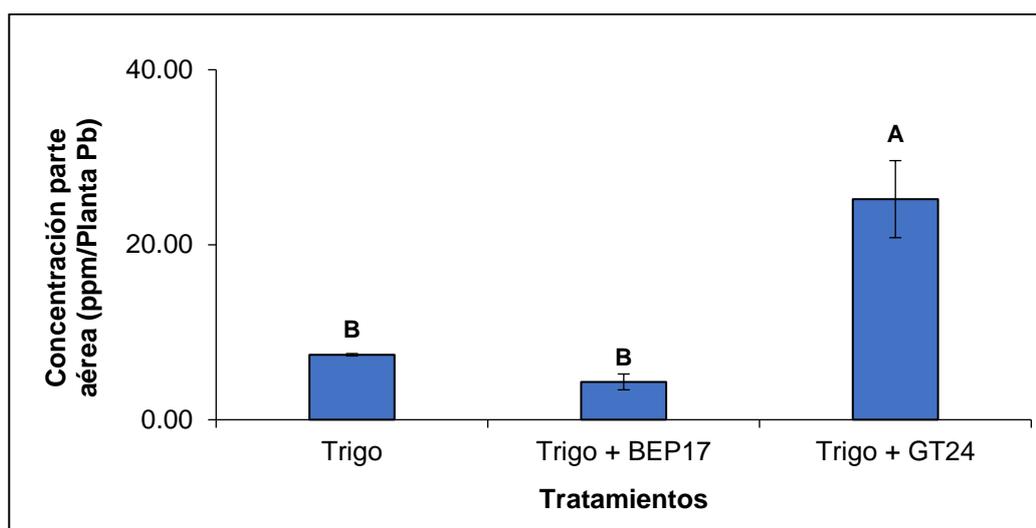
#### Figura 16

*Concentración de Plomo en la Parte Rizosférica del Trigo con Inóculo*



**Figura 17**

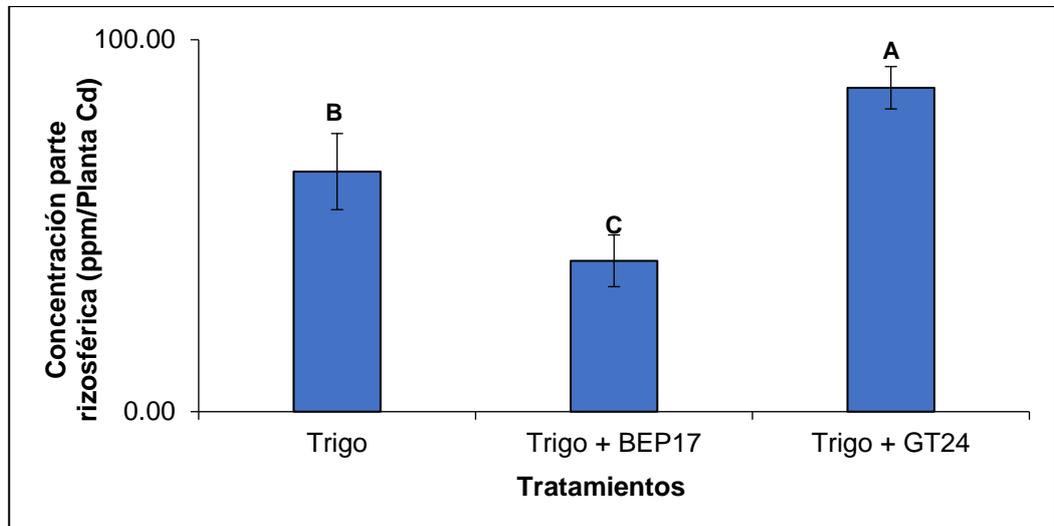
*Concentración de Plomo en la Parte Aérea del Trigo con Inóculo*



En el caso de la concentración de Cd (ppm/Planta) en los tejidos de la parte rizoférica del trigo, existe diferencia significativa ( $p < 0.05$ ), donde el mayor resultado lo presentó el inoculado con GT24B ( $87.09 \pm 5.7$  ppm/Planta) y el resultado menor fue el inoculado con BEP17-Dm ( $40.56 \pm 6.95$  ppm/Planta), en comparación con el control ( $64.55 \pm 10.23$  ppm/Planta), como se aprecia en la Figura 18. La concentración en el tejido de la parte aérea, presenta diferencia significativa ( $p < 0.05$ ), siendo el inoculado con GT24B el mayor resultado ( $23.37 \pm 2.35$  ppm/Planta) que el sin inóculo ( $12.73 \pm 3.62$  ppm/Planta), como se aprecia en la Figura 19.

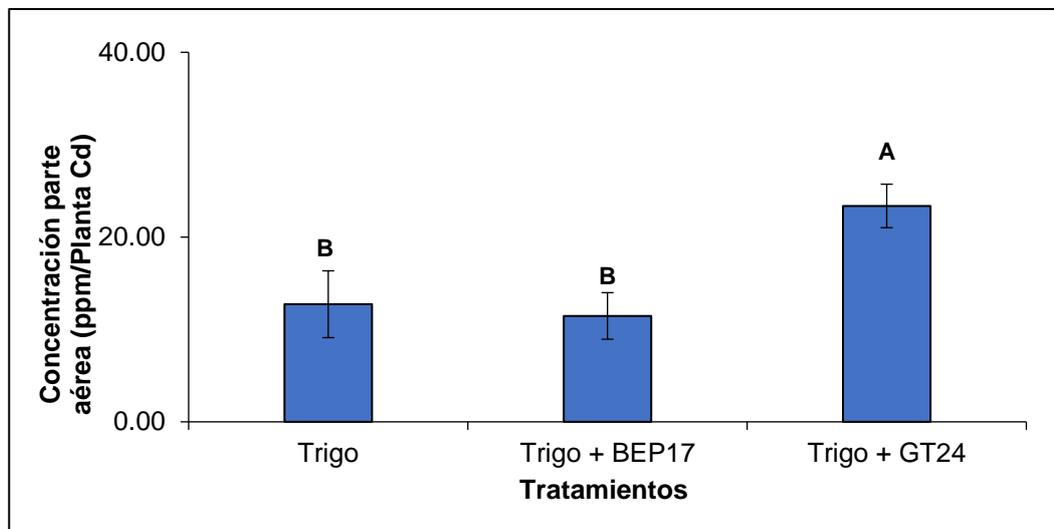
**Figura 18**

*Concentración de Cadmio en la Parte Rizosférica del Trigo con Inóculo*



**Figura 19**

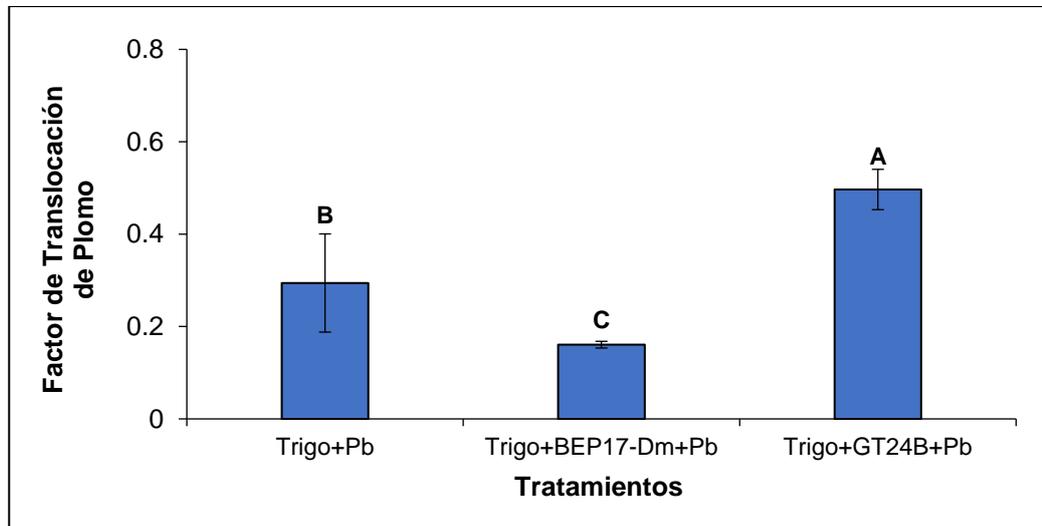
*Concentración de Cadmio en la Parte Aérea del Trigo con Inóculo*



De los resultados obtenidos de las concentraciones de Pb y Cd, se obtuvieron los factores de translocación respectivos, representados en las figuras 20 y 21. Donde todos los resultados muestran valores menores a 1. No se evidenció diferencia significativa en la comparación del tratamiento con Cd, pero sí en el tratamiento con Pb ( $p < 0.05$ ), donde el inoculado con GT24B obtuvo el mayor valor (0.5).

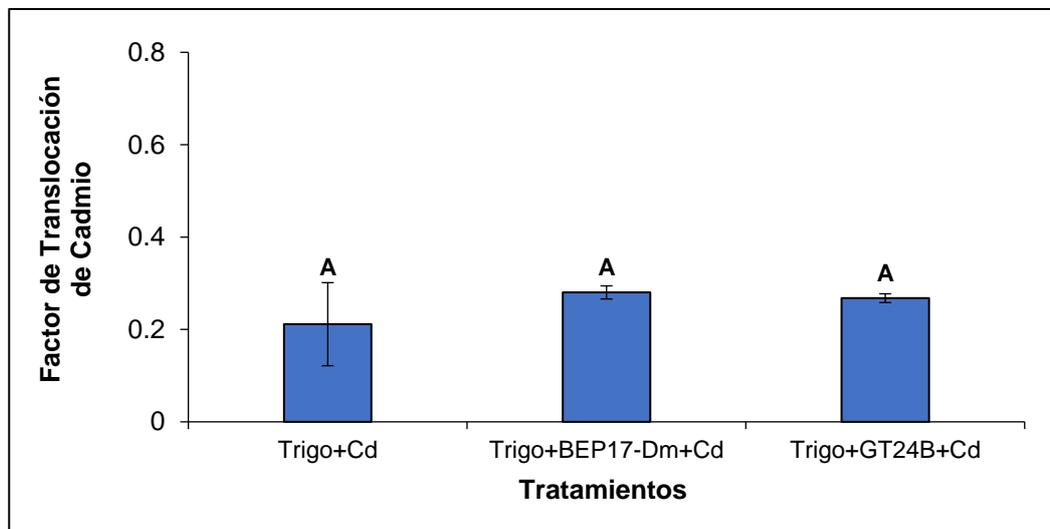
**Figura 20**

*Factor de Translocación de Pb en los Tratamiento de Trigo e Inóculos*



**Figura 21**

*Factor de Translocación de Cd en los Tratamiento de Trigo e Inóculos*



#### 4.9 Resumen de resultados

La Tabla 12 muestra el resumen de la primera etapa *Screening* del estudio, mostrando la capacidad promotora de crecimiento vegetal (PGP) en condiciones de estrés. La cepa BEP17-Dm fue identificada como *Pseudomonas japonica* (Tamariz-Angeles et al., 2021) y GT24B como *Rahnella* sp. (Ulloa-Muñoz et al., 2020).

**Tabla 10**

*Resumen de la Capacidad Promotora de Crecimiento Vegetal, Bajo Estrés Metálico, de las Cepas Seleccionadas*

Cepa	CMT (mM)	IS	AIA (ug/mL)	ISP
BEP17-Dm		Pb(0.5mM), 4.81 ±	Pb(0.5mM), 54.0 ±	
	Pb, 2	0.06	3.58	
		Pb(1mM), 4.25 ± 0	Pb(1mM), 58.5 ± 2.32	Pb,
		Cd(0.5mM), 2.5 ±		2.0 ±
	Cd, 5	0.17	Cd(0.5mM), 6.0 ± 0.89	0.25
		Cd(1mM), 2.33 ±	Cd(1mM), 4.5 ± 0.45	
GT24B		0.33		
		Pb(0.5mM), 1.4 ±		
	Pb, 1	0.1	Pb(0.5mM), 1.4 ± 0.1	
		Pb(1mM), 1.58 ±	Pb(1mM), 1.58 ± 0.18	Pb,
		0.18		3.11 ±
	Cd, 5	Cd(0.5mM), 2.67 ± 0	Cd(0.5mM), 33.5 ± 1.0	0.31
	Cd(1mM), 2.33 ±	Cd(1mM), 39.5 ± 0.78		
	0.33			

En la Tabla 13, 15 y 15 se muestra el resumen de los efectos de los microorganismos en las semillas y plantas de trigo y alfalfa, respecto a su control con o sin metal respectivamente.

**Tabla 11**

*Resumen de los Efectos en la Germinación del Trigo y Alfalfa Inoculadas en Presencia o Ausencia de Metales Pesados, en Comparación con sus Controles*

Tratamiento	Germinación (S/MP)	Germinación (Pb)
A + BEP17-Dm	-	-15%
A + GT24B	-18%	+7%
T + BEP17-Dm	-10%	-

**Tabla 12**

*Resumen de los Efectos en el Tamaño y Peso del Trigo y Alfalfa Inoculadas en Presencia o Ausencia de Metales Pesados, en Comparación con sus Controles*

Tratamiento	Long. Aérea (S/MP)	Peso húmedo Aéreo (S/MP)	Long. Raíces (Cd)	Peso Húmedo Raíz (Cd)
T + BEP17-Dm	-6.6%	-	+32.2%	+25.3%
T + GT24B	-	+27.1%	-15.8%	-15.7%

**Tabla 13**

*Resumen de los Efectos de los Inoculantes en la Concentración de Metales Pesados en el Trigo, en Comparación con sus Controles*

Tratamiento	Parte Rizosférica (Pb)	Parte Aérea (Pb)	Parte Rizosférica (Cd)	Parte Aérea (Cd)
T + BEP17-Dm	-	-	-37.2%	-
T + GT24B	+84.6%	+239.3%	+34.9%	+83.6%

## CAPÍTULO V

### DISCUSIÓN DE RESULTADOS

#### 5.1 Concentración Máxima Tolerable (CMT)

La mayor concentración de metal pesado, donde no se inhibe el crecimiento de las bacterias, es a lo que llamamos CMT. Se escogió el Cd y Pb, por su presencia en las muestras de dónde fueron extraídas (Huamán, 2018; Palacios, 2018). Las concentraciones a las que se sometieron las cepas, fueron un valor mínimo, medio y alto, respecto a los aplicados en Tamariz-Angeles et al. (2021) . La mayoría de cepas presentaron tolerancia al Cd (1mM) y Pb (2mM, 5mM y 10mM), como reportan Üreyen et al. (2020) donde *Bacillus* sp. Cepa 5O5Y11 toleró hasta 10mM de Pb. Otros estudios como el de Tirry et al. (2018) muestran resultados de tolerancia de 100 a 2000 mg.L<sup>-1</sup> de Plomo, siendo más tolerante la cepa NF18. Se han reportado bacterias con mayor tolerancia al Cd, como el *Alcaligenes faecalis* KP717561 mostraron una tolerancia de 7.5mM (Ndeddy Aka & Babalola, 2016). La cepa BEP18-Dm presentó tolerancia hasta valores de 8mM (Pb) y 2mM (Cd), BEP17-Dm valores de 5mM (Pb) y 2mM (Cd) en el estudio de Tamariz-Angeles et al. (2021).

Las cepas que no dieron positivo, significan que sus valores CMT están por debajo del valor de tratamiento Cd (<1mM o <5mM) y en el Pb (<20mM).

Cabe resaltar que la tolerancia de las cepas bacterianas a Cd y Pb, están asociadas a su lugar de extracción, donde existe presencia de estos elementos contaminantes.

## 5.2 Producción de sideróforos con estrés metálico

Los resultados verifican que BEP17-Dm es buen productor de sideróforos (IS  $4.81 \pm 0.06$ ); Huamán (2018) obtuvo resultados similares con un IS  $4.20 \pm 0.33$  sin condiciones de estrés metálico. Palacios (2018) reporta las cepas BRU10 (IS  $1.78 \pm 0.20$ ) y BRU11 (IS  $1.87 \pm 0.17$ ) como sus mayores productores de sideróforos. Dichas pruebas fueron a tres días de muestreo. Otros estudios como el de Üreyen et al. (2020) verificaron hasta 16mm de diámetro de halo en su aislado 5O5Y11.

El estrés metálico interviene negativamente en la formación del diámetro del halo, como Rizvi & Khan (2017) que verificaron una menor presencia de halo anaranjado de la cepa CPSB1 en cuanto al aumento de la concentración de Cu, Cd y Cr. Thiem et al., (2018) verificó cambio en la producción de sideróforos de la cepa KM411501, donde la síntesis de sideróforo disminuyó 1.9 veces en el medio que contenía 1mM de Cd.

GT25B y GT10B a un estrés de Cd, inhibieron su producción de sideróforos, al igual que el Pb inhibió la producción de BEP18-Dm, similar a lo reporta Rizvi & Khan (2017) quienes encontraron que el Cu a una concentración de 400ug/mL inhibió la formación de halo de la cepa CPSB1.

## 5.3 Producción de Ácido Indol-3-Acético con estrés metálico

Existen reportes de cepas que produjeron gran cantidad de AIA, como Ulloa-Muñoz et al. (2020) que a cuarenta y ocho horas demuestran que cepas como VT25B produjeron gran cantidad de AIA ( $61,5 \pm 1,9\text{ug/mL}$ ) a 24°C, al igual que VT19B ( $62,3 \pm 1,3\text{ug/mL}$ ) a una temperatura de 10°C;

Liu et al. (2019) evaluaron la producción de AIA a veinticuatro horas y 30°C, dando como resultado 8 cepas productoras, siendo la cepa RE05 la de mayor concentración ( $62.12 \pm 0.74\text{ug/mL}$ ) y RE06 la de menor valor ( $6.88 \pm 0.06\text{ug/mL}$ ).

En la presente investigación, a un estrés menor de Pb (0.5mM), la cepa VT19 produjo  $59 \pm 0.89\text{ug/mL}$  (veinticuatro horas) y  $71.5 \pm 1.34\text{ug/mL}$  (cuarenta y ocho horas); incluso a un estrés mayor de Pb (1mM) se produjeron altas concentraciones, como la cepa GT25B ( $71.5 \pm 2.65\text{ug/mL}$ ) a cuarenta y ocho horas; Khiangte & Lalfakzuala (2021) evaluaron ocho cepas bacterianas a un estrés por Cu, demostrando que a ciertas concentraciones de Cu (0.5 y 2.5mM), la producción de AIA es mayor que el control (0mM), pero a un concentración mayor (10mM), disminuye la producción de AIA respecto al control.

La cantidad de AIA disminuyó en el caso de estrés por Cd, a concentración menor (0.5mM) el mayor resultado lo obtuvieron GT25B ( $5.5 \pm 0.45\text{ug/mL}$ ) a veinticuatro horas y GT10B ( $7.5 \pm 0.45\text{ug/mL}$ ) a cuarenta y ocho horas; al aumentar el estrés de Cd (1mM), los mayores resultados fueron BEP17-Dm ( $4.5 \pm 0.45\text{ug/mL}$ ) y GT24B ( $4.5 \pm 0.45\text{ug/mL}$ ); Rizvi & Khan (2017) evaluaron la producción de AIA bajo estrés metálico por Cd, Cu y Cr a cuarenta y ocho horas y 28°C, encontró que la cepa CPSB1 tolerante a metales produjo AIA tanto en presencia como en ausencia de metales que, sin embargo, disminuyó con el aumento de las concentraciones de Cu, Cd y Cr, siendo el Cd el más toxico disminuyendo hasta en un 60% la producción de AIA; caso similar reporta Pramanik et al. (2018), que observaron la reducción de AIA producido por MCC3092 en presencia de Cd.

#### 5.4 Solubilización de fosfatos con estrés metálico

Tanto BEP17-Dm (ISP  $2.18 \pm 0.19$ ) Y GT24B (ISP  $2.21 \pm 0.12$ ) solubilizan fosfatos sin estrés metálico, corroborando lo observado por Ulloa-Muñoz et al. (2020) donde evaluaron ISP de GT24B ( $11.3 \pm 1.0$  y  $4.3 \pm 1.3$ ) a dos temperaturas (24 y 10°C) a un periodo de cinco días, en

presencia de Pb (1mM) ambas cepas aun presentan dicha característica, observándose que GT24B aumenta su ISP hasta 1.4 veces.

La presencia de Cd (1mM) inhibió la capacidad de solubilizar fosfatos de ambas cepas (BEP17-Dm y GT24B), un resultado similar resultado obtuvieron Rizvi & Khan (2017), cuando evaluaron la influencia del Cd en la solubilización de fosfatos de CPSB1, en el cual 200ug/mL de Cd redujeron hasta un 89% la solubilización de fosfatos, teniendo efectos inhibitorios; también Pramanik et al. (2018) demostraron que la capacidad de solubilizar fosfatos por parte del aislado K6 decreció en relación con el aumento de concentraciones de Cd.

## 5.5 Prueba de Germinación

Sin estrés metálico, la germinación de trigo con las cepas BEP17-Dm (73, 85%) y GT24B (63, 83%) en las dos primeras lecturas, fueron menores a las del control, en la tercera lectura BEP17-Dm (85%) se mantuvo como el menor resultado, pero GT24B aumento su germinación hasta 98%; en los resultados de germinación (%) de la alfalfa, sin estrés metálico, el inoculado con GT24B mantuvo con un resultado de 65%, menor al del control (83%). Ulloa-Muñoz et al. (2020) obtuvieron resultados mayores que el control, en la germinación de semillas de alfalfa a 24°C, hasta un 42% con el inóculo GT25B, pero en el caso de la germinación de semillas de trigo, disminuyó con respecto al control, hasta 21% con el inóculo GT10B.

En presencia de Pb, no hubo diferencias entre los resultados de la germinación de trigo, en el caso de la alfalfa el inoculado con BEP17-Dm mostró disminución significativa de 15% y GT24B evidenció un aumento significativo de 7%, respecto al control. En presencia de Cd, la germinación de trigo se vio reducida en los primeros días, respecto al inoculado con GT24B, en comparación con el control, pero al tercer día llego a 80%, similar al control; en el caso de la alfalfa, no hubo diferencias significativas. Üreyen et al. (2020) determinaron que la germinación de semillas de maíz a 26°C, en los tres primeros días de lectura, disminuye con la presencia de

la cepa 505Y11 en 12% y mejora en 9.7% en presencia de cobre (1.5mM), pero con la combinación de ambos aumenta el éxito de la germinación obteniendo un valor del 100%; Pramanik et al. (2018) evaluaron la germinación del arroz, bajo estrés con Cd (100-400ug/mL), verificando que a la concentración de 400ug/mL se inhibe la germinación, y a 200ug/mL la germinación del arroz disminuye hasta 50%, la aplicación de la cepa K6 y con estrés de Cd (200ug/mL) aumentó significativamente la germinación hasta 100%.

## 5.6 Bioensayo con estrés metálico (Cd y Pb)

Sin presencia de metales pesados, las plantas de trigo con el inoculado BEP17-Dm presentaron una disminución significativa en la longitud aérea, respecto al control en un 6.6%; sobre la biomasa fresca, hubo diferencia significativa en los pesos de la parte aérea, presentando mayor resultado el inoculado con GT24B con un aumento del 27.1% respecto del control; el peso de la biomasa seca de trigo no presentó diferencia significativa en los tratamientos con inóculos. Ulloa-Muñoz et al. (2020) también investigaron con alfalfa y trigo, teniendo como resultados que las cepas inoculadas no influyen en todas las características medidas; en cuanto a la alfalfa las cepas VT28B, VT20B y VT24B obtuvieron mejor efecto en la longitud de raíz, con 72, 69 y 61 % más que el control, las cepas VT28B, GT24B y VT24B mostraron un mayor aumento (111 a 88%) del peso seco de la raíz en comparación con el control; respecto al trigo las todas cepas mostraron un número de raíces alrededor de 25% mayor que el control, las cepas VT34B y VT24B lograron un aumento (115-83%) del peso seco.

Bajo estrés con Pb, no existió diferencia significativa entre los tratamientos con inóculos BEP17-Dm y GT24B; en estrés con Cd, las plantas de trigo presentaron diferencias significativas en longitud de raíces, presentando un aumento de 32.2% con el inoculado BEP17-Dm y disminución de 15.8% con GT24B respecto al control con Cd; los pesos de la biomasa fresca del trigo, bajo estrés con Cd, tuvieron diferencia

significativa en la parte rizosférica, donde el inoculado con BEP17-Dm aumentó en 25.3% y con GT24B disminuyó en 15.7%, respecto al control con Cd. El-Meihy et al. (2019) hicieron un estudio similar en cuanto al crecimiento de sorgo en presencia de metales pesados (Cu, Cd, Pb, Zn) y una mezcla de tres bacterias tolerantes a metales pesado y con capacidad promotora de crecimiento vegetal (HMT-PGPB). Concentraciones crecientes de Cd (10, 20 y 40mg/Kg) en sorgo sin inóculo dieron valores entre 76.5 a 50 cm, mientras que con inóculo HMT-PGPB los resultados fueron de 87 a 68cm, mostrando mejores valores; en el caso de estrés con Pb (200, 400 y 800mg/Kg) e inóculo. se registró el mayor crecimiento (98cm) a 200mg/kg de Pb, incluso que el control sin metal; las plantas inoculadas dieron registros más altos de todos los parámetros estimados que las no inoculadas. Z. Yahaghi et al. (2019) evaluaron los efectos de inoculantes bacterianos sobre el crecimiento de alfalfa con Pb en medio agar Murashige–Skoog (MS), donde encontró que la inoculación del medio de crecimiento con cepas bacterianas tenía efectos significativos y positivos (aumentos de 58-114%) sobre la longitud de la raíz de las plántulas tratadas con Pb en comparación con la del control no inoculado; hizo pruebas en vermiculita, donde la inoculación con la cepa YSP110 alivió los efectos tóxicos del Pb (1mM), los peso frescos y secos de la parte aérea de la alfalfa aumentaron un 34.8 y 38.2% respectivamente, y de las raíces un 34 y 30.4% respectivamente. Pramanik et al. (2018), verificaron que la cepa K6 mejoró significativamente varios parámetros de crecimiento (longitud y peso) en condiciones bajo estrés por Cd (200 µg/mL).

Bajo estrés metálico con Pb (400ppm) y Cd (20ppm), las plántulas de alfalfa perecieron durante los primeros once días, posteriores a la aplicación de estos metales. Wang et al. (2011) realizó pruebas con 36 accesiones de alfalfa y Cd (25ppm), que fueron cultivadas en medio hidropónico, donde 17 accesiones de alfalfa sobrevivieron y 19 murieron luego del tratamiento con Cd, durante dos meses; Z. Yahaghi et al. (2019) evaluaron los efectos tóxicos de Pb y Zn sobre plántulas de alfalfa en

medio de agar (MS), donde el aumento de concentración de Pb hasta 4mM hicieron que las plántulas murieran.

## 5.7 Concentración de metales pesados en el tejido vegetal

La concentración de Pb en el trigo, demostró un aumento significativamente en la parte aérea y rizofórea de 239.3% y 84.6% respectivamente, respecto al control con Pb; en cuanto a la concentración de Cd, en la parte rizosférica el inoculado con GT24B fue mayor en 34.9% y con BEP17-Dm menor en 37.2%, respecto al control con Cd, en la parte aérea el inoculado con GT24B aumento en 83.6%.

Estudios como el de Rizvi & Khan (2017) evaluaron la cantidad de metal pesado (Cd, Cu, Cr) en cada tratamiento de trigo, sin inóculo, los tejidos foliares mostraron una acumulación relativamente menor, mientras que las raíces, en general, presentaron una mayor concentración de Cu, Cd y Cr. La inoculación con la cepa CPSB1 redujo la concentración de MP en los tejidos, en especial los de la parte rizosférica, disminuyendo 65% el Cu, 38% el Cd y 35% el Cr; concluyendo que el bioinoculante disminuye la absorción y acumulación de metales pesados dentro de los tejidos del trigo (raíces, hojas y granos).

Ndeddy Aka & Babalola (2016) evaluaron el efecto de cepas bacterianas, sobre la biodisponibilidad de metales en el suelo, en comparación con el tratamiento de control, la inoculación del suelo con cepas bacterianas KP717554, KP717561 y KP717559, aumentó significativamente la cantidad de metales pesados (Ni, Cd y Cr) solubles en el suelo en un 51%, 50% y 44% respectivamente, atribuyendo a la generación de ácidos orgánicos por las cepas. También evaluó la acumulación de metales pesado (Ni, Cd y Cr) por la mostaza, donde las cepas mencionadas anteriormente, al ser inoculadas aumentaron significativamente la acumulación de metales pesados en los tejidos de raíz y brote, KP717561 aumentó la concentración de Cd en los tejidos de raíz y brote en un 73% y 14% respectivamente.

La concentración de Cd y Pb en cada tratamiento es mayor en la parte rizosférica, que la parte aérea, por lo tanto, los factores de translocación de Cd y Pb en el trigo y los tratamientos con inóculos (BEP17-Dm y GT24B), fueron menores a 1, lo que indica que se da fitoestabilización (Sarwar et al., 2017). Ndeddy Aka & Babalola (2016) obtuvieron resultados similares, mostraron que *B. juncea* contenía altas cantidades de metales pesados (Cd, Cr y Ni) en sus raíces en comparación con los brotes, según lo revelado por el TF de cada metal que era menor a uno, esta translocación a la raíz, se puede atribuir a las proteínas de unión a metales fuertes en las raíces que pueden ser una respuesta de toxicidad natural de la planta (Garbisu & Alkorta, 2001).

## 5.8 Contrastación de hipótesis

Se verificó que GT24B aumento la germinación de la alfalfa en presencia de plomo, BEP17-Dm aumento la longitud y peso de raíces de trigo en presencia de cadmio; en tanto a la cantidad de metales, GT24B potencio la cantidad de plomo y cadmio en el tejido de trigo y BEP 17-Dm alivió la concentración de Cd en la raíz del trigo.

## CAPÍTULO VI

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 6.1 Conclusiones

Se evaluaron y seleccionaron dos cepas bacterianas *Pseudomona japónica* BEP17-Dm y *Rahnella* sp. GT24B, que presentaron tolerancia y capacidad promotora de crecimiento vegetal en presencia de cadmio y plomo, BEP17-Dm impactó de manera positiva en la elongación y peso de la raíz de trigo en presencia de cadmio, GT24B aumentó la germinación de semillas de alfalfa en presencia de plomo. GT24B potenció la concentración de cadmio y plomo en los tejidos de trigo, y BEP17-Dm alivió la concentración de cadmio en la parte rizosférica del trigo.

Se evaluaron un total de 59 cepas bacterianas, 31 endofíticas y 28 rizosféricas, de las cuales se seleccionaron las cepas BEP03, BERP32, BEU01, GT10B, GT24B, GT25B, VT19B y también se seleccionaron las cepas BEP17-Dm y BEP18-Dm de estudios previos, que toleraron valores iguales o mayores a 1mM de Cd y 5mM de Pb.

Se evaluó la capacidad promotora de crecimiento vegetal, en condiciones de estrés por metales, de las 9 cepas tolerantes a Cd y Pb. Solo 7 cepas produjeron AIA, siendo los mayores resultados, la cepa VT19B con un valor de  $71.5 \pm 2.65 \mu\text{g/mL}$  bajo estrés con Pb(0.5mM), GT25B con un valor de  $71.5 \pm 1.34 \mu\text{g/mL}$  bajo estrés con Pb(1mM), GT10B con un valor  $7.5 \pm 0.45 \mu\text{g/mL}$  de bajo estrés con Cd(0.5mM); bajo Cd(1mM) se obtuvieron como mayores resultados  $4.75 \pm 0.39 \mu\text{g/mL}$  (GT10B),  $4.5 \pm 0.45 \mu\text{g/mL}$  (GT24B) y  $4.5 \pm 0.45 \mu\text{g/mL}$  (BEP17-Dm). Solo 5 cepas produjeron sideróforos, en concentración de 0.5 y 1mM de Pb la cepa BEP17-Dm produjo el mayor IS con un valor de  $4.81 \pm 0.06$  y  $4.25 \pm 0$  respectivamente, a concentración de 0.5 Y 1mM de Cd, solo produjeron sideróforos las cepas BEP17-Dm, BEP18-Dm, BEP32 y GT24B. Respecto a la solubilización de fosfatos, se trabajaron con las cepas BEP17-Dm y GT24B, donde bajo condiciones de estrés con Pb(1mM), GT24B obtuvo el mayor resultado con un ISF de  $3.11 \pm 0.31$ .

Se determinó que GT24B al ser inoculado en semillas de alfalfa, mejoró la germinación en un 7% en condiciones de estrés por Pb, las plantas de trigo con inóculo BEP17-Dm demostró un aumento de 32.2% en la longitud de raíces y 25.3% en el peso húmedo de la raíz bajo estrés con Cd. La concentración de metales fue potenciada en el caso de trigo inoculado con GT24B, bajo estrés con Pb, la parte rizoférica y aérea presentaron aumentos de 84.6% y 239.3% respectivamente, bajo estrés con Cd la parte rizoférica y aérea presentaron aumentos de 34.9% y 83.6% respectivamente; la inoculación del trigo con BEP17-Dm alivió la concentración de Cd en la raíz, disminuyendo esta concentración en 37.2%.

Los resultados obtenidos, verifican una aplicación de biorremediación de espacios contaminados con cadmio y plomo a concentraciones de 20 y 400 ppm respectivamente, valores que exceden los ECAs de suelo (uso agrícola y residencial) y agua (todas las categoría), también de los LMPs para vertimientos líquidos de actividades mineras y efluentes de infraestructuras de residuos sólidos. Presentando una

alternativa de manejo ambiental, aplicable a los Planes de Cierre de Minas o de infraestructura de disposición final de residuos sólidos, y Planes de Recuperación de Áreas Degradadas por Residuos Sólido o de descontaminación de suelos, con el fin de garantizar el cumplimiento del ECA y LMP respectivo.

## 6.2 Recomendaciones

- Evaluar cuantitativamente las producciones de sideróforos y solubilización de fosfatos, bajo estrés metálico.
- Evaluar los efectos de las bacterias sobre la movilidad de metales en la solución hidropónica.
- Evaluar y determinar a nivel *in vitro*, la mitad de la concentración efectiva máxima (EC50) de los metales pesados, de la germinación y crecimiento de las plantas de *Medicago sativa* y *Triticum aestivum*.
- Evaluar las actividades antioxidantes de las plantas inoculadas y en presencia de metales pesados.
- Determinar la concentración de metales en el sustrato hidropónico a fin de poder determinar el factor de bioconcentración.
- Evaluar la asociación de dos o más microorganismos promotores de crecimiento vegetal bajo estrés metálico (Pb y Cd), en el bioensayo con trigo y alfalfa.
- Realizar estudios posteriores a nivel de campo acorde a los resultados obtenidos de la presente investigación.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, S., Javed, M. T., Shahid, M., Hussain, I., Haider, M. Z., Chaudhary, H. J., Tanwir, K., & Maqsood, A. (2020). *Acinetobacter* sp. SG-5 inoculation alleviates cadmium toxicity in differentially Cd tolerant maize cultivars as deciphered by improved physio-biochemical attributes, antioxidants and nutrient physiology. *Plant Physiology and Biochemistry*, 155, 815–827. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.08.024>
- Ali, H., Khan, E., & Sajad, M. A. (2013). Phytoremediation of heavy metals-Concepts and applications. *Chemosphere*, 91(7), 869–881. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.075>
- Ashraf, M. A., Hussain, I., Rasheed, R., Iqbal, M., Riaz, M., & Arif, M. S. (2017). Advances in microbe-assisted reclamation of heavy metal contaminated soils over the last decade: A review. *Journal of Environmental Management*, 198, 132–143. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.04.060>
- Belimov, A. A., Zinovkina, N. Y., Safronova, V. I., Litvinsky, V. A., Nosikov, V. V., Zavalin, A. A., & Tikhonovich, I. A. (2019). Rhizobial ACC deaminase contributes to efficient symbiosis with pea (*Pisum sativum* L.) under single and combined cadmium and water deficit stress. *Environmental and Experimental Botany*, 167(August), 103859. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2019.103859>
- Chen, H., Teng, Y., Lu, S., Wang, Y., & Wang, J. (2015). Contamination features and health risk of soil heavy metals in China. *Science of the Total Environment*, 512–513, 143–153. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.01.025>
- Contreras-De la Cruz, E. E., Saez-Huaman, W., Sumarriva-Bustinza, L. A., Chávez-Sumarriva, N. L., & Yaulilahua-Huacho, R. (2023). Concentración de metales pesados plomo y arsénico en el botadero de Mollebamba , Huancavelica. *Revista Alfa*, 7(19), 64–71. <https://doi.org/10.33996/revistaalfa.v7i19.198>
- Cruzado-Tafur, E., Torró, L., Bierla, K., Szpunar, J., & Tauler, E. (2021). Heavy metal contents in soils and native flora inventory at mining environmental

- liabilities in the Peruvian Andes. *Journal of South American Earth Sciences*, 106(September 2020). <https://doi.org/10.1016/j.jsames.2020.103107>
- Efe, D. (2020). Potential Plant Growth-Promoting Bacteria with Heavy Metal Resistance. *Current Microbiology*, 77(12), 3861–3868. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02208-8>
- El-Meihy, R. M., Abou-Aly, H. E., Youssef, A. M., Tewfike, T. A., & El-Alkshar, E. A. (2019). Efficiency of heavy metals-tolerant plant growth promoting bacteria for alleviating heavy metals toxicity on sorghum. *Environmental and Experimental Botany*, 162, 295–301. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2019.03.005>
- Emamverdian, A., Ding, Y., Mokhberdoran, F., & Xie, Y. (2015). Heavy Metal Stress and Some Mechanisms of Plant Defense Response. *Tropical Agriculture Research*, 25(4), 27–54. <http://link.springer.com/10.1007/978-94-007-4441-7%0Ahttp://www.hindawi.com/journals/aess/2014/752708/%0Ahttp://omicsgroup.org/journals/adaptation-strategies-of-plants-against-heavy-metal-toxicity-2167-0501.1000161.php?aid=40892%0Ahttp://link.springer.com>
- Etesami, H., Jeong, B. R., & Raheb, A. (2023). Arsenic (As) resistant bacteria with multiple plant growth-promoting traits: Potential to alleviate As toxicity and accumulation in rice. *Microbiological Research*, 272(April), 127391. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2023.127391>
- Garbisu, C., & Alkorta, I. (2001). Phytoextraction: A cost-effective plant-based technology for the removal of metals from the environment. *Bioresource Technology*, 77(3), 229–236. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(00\)00108-5](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00108-5)
- Garzón, J. M., Rodríguez Miranda, J. P., & Hernández Gómez, C. (2017). Aporte de la biorremediación para solucionar problemas de contaminación y su relación con el desarrollo sostenible. *Universidad y Salud*, 19(2), 309. <https://doi.org/10.22267/rus.171902.93>
- Gusain, P., Paliwal, R., & Singh, V. (2017). Rhizoremediation of cadmium-contaminated soil associated with hydroxamate siderophores isolated from Cd-resistant plant growth-promoting *Dietzia maris* and *Lysinibacillus* strains.

- International Journal of Phytoremediation*, 19(3), 290–299.  
<https://doi.org/10.1080/15226514.2016.1225281>
- He, H., Ye, Z., Yang, D., Yan, J., Xiao, L., Zhong, T., Yuan, M., Cai, X., Fang, Z., & Jing, Y. (2013). Characterization of endophytic *Rahnella* sp. JN6 from *Polygonum pubescens* and its potential in promoting growth and Cd, Pb, Zn uptake by *Brassica napus*. *Chemosphere*, 90(6), 1960–1965.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.10.057>
- Huamán, G. D. (2018). “Evaluación de las potencialidades de los microorganismos asociados a plantas altoandinas para procesos de biorremediación, Punta Olímpica - Parque nacional Huascarán – 2016.” Universidad Nacional Santiago Antúnez de Mayolo.
- Khanthom, S., Stewart, T. N., & Prapagdee, B. (2021). Potential of a rhizobacterium on removal of heavy metals from aqueous solution and promoting plant root elongation under heavy metal toxic conditions. *Environmental Technology and Innovation*, 22, 101419. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.101419>
- Khiangte, L., & Lalfakzuala, R. (2021). Effects of Heavy Metals on Phosphatase Enzyme Activity and Indole-3-Acetic Acid (IAA) Production of Phosphate Solubilizing Bacteria. *Geomicrobiology Journal*, 38(6), 494–503.  
<https://doi.org/10.1080/01490451.2021.1894271>
- Kong, Z., & Glick, B. R. (2017). The Role of Plant Growth-Promoting Bacteria in Metal Phytoremediation. In *Advances in Microbial Physiology* (1st ed., Vol. 71). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2017.04.001>
- Liu, C., Lin, H., Dong, Y., Li, B., & Wang, L. (2019). Identification and characterization of plant growth-promoting endophyte RE02 from *Trifolium repens* L. in mining smelter. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(17), 17236–17247. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04904-w>
- Loper, J. E., & Schroth, M. N. (1986). Influence of Bacterial Sources of Indole-3-acetic Acid on Root Elongation of Sugar Beet. *Physiology and Biochemistry*, 76, 386–389. <https://doi.org/10.1094/phyto-76-386>

- Ma, Y., Rajkumar, M., Zhang, C., & Freitas, H. (2016). Beneficial role of bacterial endophytes in heavy metal phytoremediation. *Journal of Environmental Management*, 174, 14–25. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.02.047>
- Ministerio de Energía y Minas. (2003). *Ley y Reglamento que regula el Cierre de Minas* (Ley N° 28090; pp. 1–96). [http://www.energiayminasmoquegua.gob.pe/web/phocadownload/Estudios\\_Ambientales/PC/PC\\_Las\\_Congas.pdf](http://www.energiayminasmoquegua.gob.pe/web/phocadownload/Estudios_Ambientales/PC/PC_Las_Congas.pdf)
- Ministerio de Energía y Minas. (2004). *Ley que regula los pasivos ambientales de la actividad minera*. (Ley 28271; pp. 1–7). <https://www.minam.gob.pe/wp-content/uploads/2017/04/Ley-N°-28271.pdf>
- Ministerio de Energía y Minas. (2022). Aprueban la actualización del inventario de pasivos ambientales mineros aprobado mediante R.M. N° 290-2006-MEM/DM y sus actualizaciones. In *Resolución Ministerial N° 335-2022*. [https://www.minem.gob.pe/minem/archivos/2103488-1\(1\).pdf](https://www.minem.gob.pe/minem/archivos/2103488-1(1).pdf)
- Ministerio del Ambiente. (2005). *Ley General del Ambiente* (Ley N° 28611; pp. 1–45). <https://www.minam.gob.pe/wp-content/uploads/2017/04/Ley-N°-28611.pdf>
- Ministerio del Ambiente. (2009). *Decreto Supremo N° -2009: Aprueba Los Límites Máximos Permisibles (LMP) de Efluentes de Infraestructuras de Residuos Sólidos* (pp. 1–9). [http://www.minam.gob.pe/consultaspublicas/wp-content/uploads/sites/52/2014/02/lmp\\_de\\_efluentes\\_de\\_residuos.pdf](http://www.minam.gob.pe/consultaspublicas/wp-content/uploads/sites/52/2014/02/lmp_de_efluentes_de_residuos.pdf)
- Ministerio del Ambiente. (2010). *Decreto Supremo N° 010-2010: Aprueban Límites Máximos Permisibles para la descarga de efluentes líquidos de Actividades Minero-Metalúrgicas* (pp. 1–4). [https://www.minam.gob.pe/wp-content/uploads/2013/09/ds\\_010-2010-minam.pdf](https://www.minam.gob.pe/wp-content/uploads/2013/09/ds_010-2010-minam.pdf)
- Ministerio del Ambiente. (2013). *Decreto Supremo N° 002-2013: Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para Suelo*. (pp. 1–5). <https://www.minam.gob.pe/calidadambiental/wp-content/uploads/sites/22/2013/10/D-S-N-002-2013-MINAM.pdf>

- Ministerio del Ambiente. (2014). *GUÍA PARA MUESTREO DE SUELOS* (pp. 1–39). [http://www.minam.gob.pe/wp-content/uploads/2014/04/GUIA-MUESTREO-SUELO\\_MINAM1.pdf](http://www.minam.gob.pe/wp-content/uploads/2014/04/GUIA-MUESTREO-SUELO_MINAM1.pdf)
- Ministerio del Ambiente. (2017a). *Decreto Supremo N° 014-2017: Reglamento de la Ley de Gestión Integral de Residuos Sólidos* (pp. 1–32). <http://www.minam.gob.pe/gestion-de-residuos-solidos/nueva-ley-de-residuos-solidos/>
- Ministerio del Ambiente. (2017b). *Decreto Supremo N° 004-2017: Aprueban Estandares de Calidad Ambiental (ECA) para Agua y establecen disposiciones complementarias* (pp. 1–10). <http://www.minam.gob.pe/wp-content/uploads/2017/06/DS-004-2017-MINAM.pdf>
- Mishra, J., Singh, R., & Arora, N. K. (2017). Alleviation of heavy Metal Stress in Plants and Remediation of soil by Rhizosphere Microorganisms. *Frontiers in Microbiology*, 8(1706), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01706>
- Montañez, A., Blanco, A. R., Barlocco, C., Beracochea, M., & Sicardi, M. (2012). Characterization of cultivable putative endophytic plant growth promoting bacteria associated with maize cultivars (*Zea mays* L.) and their inoculation effects in vitro. *Applied Soil Ecology*, 58, 21–28. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.02.009>
- Morales, C. J. (2007). *Estudio para la remoción de metales pesados en los lixiviados de rellenos sanitarios* [Universidad Nacional de Colombia]. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/2704>
- Ndeddy Aka, R. J., & Babalola, O. O. (2016). Effect of bacterial inoculation of strains of pseudomonas aeruginosa, alcaligenes feacalis and bacillus subtilis on germination, growth and heavy metal (cd, cr, and ni) uptake of brassica juncea. *International Journal of Phytoremediation*, 18(2), 200–209. <https://doi.org/10.1080/15226514.2015.1073671>
- Olanrewaju, O. S., Glick, B. R., & Babalola, O. O. (2017). Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World Journal of Microbiology and*

*Biotechnology*, 33(11), 0. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2364-9>

Olguín, E. J., & Sánchez-Galván, G. (2012). Heavy metal removal in phytofiltration and phycoremediation: The need to differentiate between bioadsorption and bioaccumulation. *New Biotechnology*, 30(1), 3–8. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2012.05.020>

Pacheco, S. L. (2016). *Determinación de la capacidad biofertilizante de actinomicetos en presencia de metales pesados* [Universidad Peruana Cayetano Heredia]. <http://repositorio.upch.edu.pe/bitstream/handle/upch/467/Determinación.de.la.capacidad.biofertilizante.de.actinomicetos.en.presencia.de.metales.pesados.pdf?sequence=3&isAllowed=y>

Palacios, E. D. (2018). “*Caracterización de la comunidad microbiana asociada a la vegetación del pasivo minero ambiental Chahuapampa - Utcuyacu - Cátac y su potencial uso en la biorremediación - 2016*” [Universidad Nacional Santiago Antúnez de Mayolo]. <http://repositorio.unasam.edu.pe/handle/UNASAM/2111>

Paredes Mur, J. (2015). Evaluación de la aplicabilidad de especies forestales de la serranía peruana en fitorremediación de relaves mineros. *Revista ECIPeru*, 11, 83–87. <https://doi.org/10.33017/reveciperu2014.0013/>

Pramanik, K., Mitra, S., Sarkar, A., & Maiti, T. K. (2018). Alleviation of phytotoxic effects of cadmium on rice seedlings by cadmium resistant PGPR strain *Enterobacter aerogenes* MCC 3092. *Journal of Hazardous Materials*, 351, 317–329. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.03.009>

Ren, Y. X., Zhu, X. L., Fan, D. D., Ma, P., & Liang, L. H. (2013). Inoculation of phosphate solubilizing bacteria for the improvement of lead accumulation by *Brassica juncea*. *Environmental Technology (United Kingdom)*, 34(4), 463–469. <https://doi.org/10.1080/09593330.2012.701234>

Rizvi, A., & Khan, M. S. (2017). Biotoxic impact of heavy metals on growth, oxidative stress and morphological changes in root structure of wheat (*Triticum aestivum* L.) and stress alleviation by *Pseudomonas aeruginosa* strain CPSB1.

*Chemosphere*, 185, 942–952.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.088>

Sarwar, N., Imran, M., Shaheen, M. R., Ishaque, W., Kamran, M. A., Matloob, A., Rehim, A., & Hussain, S. (2017). Phytoremediation strategies for soils contaminated with heavy metals: Modifications and future perspectives. *Chemosphere*, 171, 710–721.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.116>

Shahid, M., Javed, M. T., Masood, S., Akram, M. S., Azeem, M., Ali, Q., Gilani, R., Basit, F., Abid, A., & Lindberg, S. (2019). *Serratia* sp. CP-13 augments the growth of cadmium (Cd)-stressed *Linum usitatissimum* L. by limited Cd uptake, enhanced nutrient acquisition and antioxidative potential. *Journal of Applied Microbiology*, 126(6), 1708–1721. <https://doi.org/10.1111/jam.14252>

Silambarasan, S., Logeswari, P., Cornejo, P., & Kannan, V. R. (2019). Role of plant growth–promoting rhizobacterial consortium in improving the *Vigna radiata* growth and alleviation of aluminum and drought stresses. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(27), 27647–27659.  
<https://doi.org/10.1007/s11356-019-05939-9>

Tamariz-Angeles, C., Huamán, G. D., Palacios-Robles, E., Olivera-Gonzales, P., & Castañeda-Barreto, A. (2021). Characterization of siderophore-producing microorganisms associated to plants from high-Andean heavy metal polluted soil from Callejón de Huaylas (Ancash, Perú). *Microbiological Research*, 250(July). <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126811>

Tchounwou, P. B., Yedjou, C. G., Patlolla, A. K., & Sutton, D. J. (2012). Molecular, clinical and environmental toxicology Volume 3: Environmental Toxicology. In *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology* (Vol. 101). <https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8340-4>

Thiem, D., Złoch, M., Gadzała-Kopciuch, R., Szymańska, S., Baum, C., & Hryniewicz, K. (2018). Cadmium-induced changes in the production of siderophores by a plant growth promoting strain of *Pseudomonas fulva*. *Journal*

of *Basic Microbiology*, 58(7), 623–632.  
<https://doi.org/10.1002/jobm.201800034>

Tirry, N., Tahri Joutey, N., Sayel, H., Kouchou, A., Bahafid, W., Asri, M., & El Ghachtouli, N. (2018). Screening of plant growth promoting traits in heavy metals resistant bacteria: Prospects in phytoremediation. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16(2), 613–619.  
<https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.06.004>

Ullah, A., Heng, S., Munis, M. F. H., Fahad, S., & Yang, X. (2015). Phytoremediation of heavy metals assisted by plant growth promoting (PGP) bacteria: A review. *Environmental and Experimental Botany*, 117, 28–40.  
<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2015.05.001>

Ulloa-Muñoz, R., Olivera-Gonzales, P., Castañeda-Barreto, A., Villena, G. K., & Tamariz-Angeles, C. (2020). Diversity of endophytic plant-growth microorganisms from *Gentianella weberbaueri* and *Valeriana pycnantha*, highland Peruvian medicinal plants. *Microbiological Research*, 233(126413), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126413>

Üreyen, Ü. Z., Uzunalioglu, E., Güzel, Ş., Bozdeveci, A., & Alpay, Ş. (2020). Determination of bioremediation properties of soil-borne *Bacillus* sp. 5O5Y11 and its effect on the development of *Zea mays* in the presence of copper. *Archives of Microbiology*, 202(7), 1817–1829. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-01900-4>

Vocciante, M., Caretta, A., Bua, L., Bagatin, R., Franchi, E., Petruzzelli, G., & Ferro, S. (2019). Enhancements in phytoremediation technology: Environmental assessment including different options of biomass disposal and comparison with a consolidated approach. *Journal of Environmental Management*, 237(February), 560–568. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.02.104>

Wang, X., Song, Y., Ma, Y., Zhuo, R., & Jin, L. (2011). Screening of Cd tolerant genotypes and isolation of metallothionein genes in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Environmental Pollution*, 159(12), 3627–3633.

<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.08.001>

Yahaghi, Z., Shirvani, M., Nourbakhsh, F., & Pueyo, J. J. (2019). Uptake and effects of lead and zinc on alfalfa (*Medicago sativa* L.) seed germination and seedling growth: Role of plant growth promoting bacteria. *South African Journal of Botany*, 124, 573–582. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.01.006>

Yahaghi, Zahra, Shirvani, M., Nourbakhsh, F., de la Peña, T. C., Pueyo, J. J., & Talebi, M. (2018). Isolation and characterization of Pb-solubilizing bacteria and their effects on Pb uptake by *Brassica juncea*: Implications for microbe-assisted phytoremediation. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(7), 1156–1167. <https://doi.org/10.4014/jmb.1712.12038>

Yoon, J., Cao, X., Zhou, Q., & Ma, L. Q. (2006). Accumulation of Pb, Cu, and Zn in native plants growing on a contaminated Florida site. *Science of the Total Environment*, 368(2–3), 456–464. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2006.01.016>

Zhang, P., Qin, C., Hong, X., Kang, G., Qin, M., Yang, D., Pang, B., Li, Y., He, J., & Dick, R. P. (2018). Risk assessment and source analysis of soil heavy metal pollution from lower reaches of Yellow River irrigation in China. *Science of the Total Environment*, 633, 1136–1147. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.228>



# ANEXOS



# ANEXO 1

Informes de ensayo de laboratorio





### INFORME DE ENSAYO OT230014

**CLIENTE**  
 Razón Social : "EFECTOS DE MICROORGANISMOS ALTOANDINOS PROMOTORES DE CRECIMIENTO VEGETAL EN LA TOLERANCIA DE MEDICAGO SATIVA Y TRITICUM AESTIVUM EN PRESENCIA DE METALES PESADOS - 2021"  
 Dirección : Shancayan  
 Atención : Bryan Manuel Sanchez Santillán

**MUESTRA**  
 Producto declarado : Muestra de plantas<sup>1</sup>  
 Matriz : Otros  
 Procedencia : Laboratorio CIBYRGA<sup>1</sup>  
 Ref./Condición : Cadena de Custodia CC230007

**MUESTREO**  
 Responsable : Muestra proporcionada por el cliente  
 Referencia: : No indica

**LABORATORIO**  
 Fecha de recepción : 03/Marzo/2023  
 Fecha de análisis : 03 de Marzo - 23 de Marzo/2023  
 Cotización N° : CO220629

CÓD.	PARÁMETRO	UNIDAD DE MEDIDA	MÉTODO	LÍMITE DE DETECCIÓN	MUESTRA						
					Código del cliente	RTP 1	TTP 1	RTBP 1	TTBP 1	RTGP 2	TTGP 2
					Fecha de muestreo <sup>1</sup>	02/03/2023	02/03/2023	02/03/2023	02/03/2023	02/03/2023	02/03/2023
					Hora de muestreo <sup>1</sup>	11:00	11:00	11:00	11:00	11:00	11:00
					Código del Laboratorio	OT230014	OT230015	OT230016	OT230017	OT230018	OT230019
<b>MT</b>	<b>METALES TOTALES</b>										
MT25	Plomo total	mg/kg Pb	PAR	0.010	682.820	279.960	1186.230	198.720	1208.760	651.520	

<sup>1</sup>Datos proporcionados por el cliente

"Fin del Informe de Ensayo"

Huaraz, 23 de Marzo de 2023



*Dr. Mario Leyva Collas*  
 Administrador del Laboratorio de Calidad Ambiental  
 FCAM - UNASAM  
 CQP N° 604





### INFORME DE ENSAYO OT230015

**CLIENTE** Razón Social : EFECTOS DE MICROORGANISMOS ALTOANDINOS PROMOTORES DE CRECIMIENTO VEGETAL EN LA TOLERANCIA DE MEDICAGO SATIVA Y TRITICUM AESTIVUM EN PRESENCIA DE METALES PESADOS - 2021\*

Dirección : Shancayan  
Atención : Bryan Manuel Sanchez Santillán

**MUESTRA** Producto declarado : Muestra de plantas<sup>1</sup>  
Matriz : Otros  
Procedencia : Laboratorio CIBYRGA<sup>1</sup>  
Ref./Condición : Cadena de Custodia CC230008

**MUESTREO** Responsable : Muestra proporcionada por el cliente  
Referencia : No indica

**LABORATORIO** Fecha de recepción : 03/Marzo/2023  
Fecha de análisis : 03 de Marzo - 23 de Marzo/2023  
Cotización N° : CO220629

CÓD.	PARÁMETRO	UNIDAD DE MEDIDA	MÉTODO	LÍMITE DE DETECCIÓN	MUESTRA						
					Código del cliente	RTGP 1	TTGP 1	RTBP 2	TTBP 2	RTP 2	TTP 2
					Fecha de muestreo <sup>1</sup>	02/03/2023	02/03/2023	02/03/2023	02/03/2023	02/03/2023	02/03/2023
					Hora de muestreo <sup>1</sup>	11:00	11:00	11:00	11:00	11:00	11:00
					Código del Laboratorio	OT230020	OT230021	OT230022	OT230023	OT230024	OT230025
<b>MT</b>	<b>METALES TOTALES</b>										
MT25	Plomo total	mg/kg Pb	PAR	0.010	1059.580	478.660	871.330	133.400	1306.060	262.660	

<sup>1</sup> Datos proporcionados por el cliente

Huaraz, 23 de Marzo de 2023

"Fin del Informe de Ensayo"



*Dr. Mario Leyva Collas*  
Administrador del Laboratorio de Calidad Ambiental  
FCAM - UNASAM  
CQP N° 604





## INFORME DE ENSAYO OT230016

**CLIENTE**  
 Razón Social : "EFECTOS DE MICROORGANISMOS ALTOANDINOS PROMOTORES DE CRECIMIENTO VEGETAL EN LA TOLERANCIA DE MEDICAGO SATIVA Y TRITICUM AESTIVUM EN PRESENCIA DE METALES PESADOS - 2021"  
 Dirección : Shancayan  
 Atención : Bryan Manuel Sanchez Santillán

**MUESTRA**  
 Producto declarado : Muestra de planta<sup>1</sup>  
 Matriz : Otros  
 Procedencia : Laboratorio CIBYRGA<sup>1</sup>  
 Ref./Condición : Cadena de Custodia CC230009

**MUESTREO**  
 Responsable : Muestra proporcionada por el cliente  
 Referencia : No indica

**LABORATORIO**  
 Fecha de recepción : 03/Marzo/2023  
 Fecha de análisis : 03 de Marzo - 23 de Marzo/2023  
 Cotización N° : CO220629

CÓD.	PARÁMETRO	UNIDAD DE MEDIDA	MÉTODO	LÍMITE DE DETECCIÓN	MUESTRA						
					Código del cliente	RTGC2	TTGC2	RTGC1	TTGC1	RTBC2	TTBC2
					Fecha de muestreo <sup>1</sup>	02/03/2023	02/03/2023	02/03/2023	02/03/2023	02/03/2023	02/03/2023
					Hora de muestreo <sup>1</sup>	11:00	11:00	11:00	11:00	11:00	11:00
					Código del Laboratorio	OT230026	OT230027	OT230028	OT230029	OT230030	OT230031
<b>MTP</b>	<b>METALES EN PLANTA</b>										
MTP03	Cadmio total	mg/Kg Cd	Derivé de cadion	0.02	2041.39	565.99	1872.04	483.39	1310.68	348.73	

<sup>1</sup> Datos proporcionados por el cliente

Huaraz, 23 de Marzo de 2023

"Fin del Informe de Ensayo"



*Dr. Mario Leyva Collas*  
 Dr. Mario Leyva Collas  
 Administrador del Laboratorio de Calidad Ambiental  
 FCAM - UNASAM  
 CQP N° 604





### INFORME DE ENSAYO OT230017

**CLIENTE** Razón Social : "EFECTOS DE MICROORGANISMOS ALTOANDINOS PROMOTORES DE CRECIMIENTO VEGETAL EN LA TOLERANCIA DE MEDICAGO SATIVA Y TRITICUM AESTIVUM EN PRESENCIA DE METALES PESADOS - 2021"

Dirección : Shancayan  
Atención : Bryan Manuel Sanchez Santillán

**MUESTRA** Producto declarado : Muestra de planta<sup>1</sup>  
Matriz : Otros  
Procedencia : Laboratorio CIBYRGA<sup>1</sup>  
Ref./Condición : Cadena de Custodia CC230010

**MUESTREO** Responsable : Muestra proporcionada por el cliente  
Referencia : No indica

**LABORATORIO** Fecha de recepción : 03/Marzo/2023  
Fecha de análisis : 03 de Marzo - 23 de Marzo/2023  
Cotización N° : CO220629

CÓD.	PARÁMETRO	UNIDAD DE MEDIDA	MÉTODO	LÍMITE DE DETECCIÓN	MUESTRA						
					Código del cliente	RTC2	TTC2	RTC1	TTC1	RTBC1	TTBC1
					Fecha de muestreo <sup>1</sup>	02/03/2023	02/03/2023	02/03/2023	02/03/2023	02/03/2023	02/03/2023
					Hora de muestreo <sup>1</sup>	11:00	11:00	11:00	11:00	11:00	11:00
					Código del Laboratorio	OT230032	OT230033	OT230034	OT230035	OT230036	OT230037
<b>MTP</b>	<b>METALES EN PLANTA</b>										
MTP03	Cadmio total	mg/Kg Cd	Derivé de cadion	0.02	1955.45	588.52	2767.13	337.19	1805.49	531.39	

<sup>1</sup>Datos proporcionados por el cliente

Huaraz, 23 de Marzo de 2023

"Fin del Informe de Ensayo"



*Mario Leyva Collas*  
Dr. Mario Leyva Collas  
Administrador del Laboratorio de Calidad Ambiental  
FCAM - UNASAM  
CQP N° 604



# ANEXO 2

## Tablas de resultados



**Tabla 14**

*Resultados CMT de las Cepas, bajo Distintas Concentraciones de Cd y Pb.*

CEPA	CMT (mM)	
	Cd	Pb
BEP03	1	10
BEP07	0	5
BEP08	0	5
BEP09	0	5
BEP11	0	5
BEP14	0	5
BEP16	0	5
BEP23	0	5
BEP31	0	5
BEP32	1	5
BEU01	1	5
BEU01	0	5
BEU11	0	5
BEU12	0	5
BEU14	0	10
BRP01	0	5
BRP01	0	2
BRP02	0	2
BRP03	0	5
BRP04	0	5
BRP05	0	2
BRP06	0	5
BRP07	0	5
BRP08	0	2
BRP10	0	5
BRP14	0	5

CEPA	CMT (mM)	
	Cd	Pb
BRP14	0	5
BRP15	0	5
BRP16	0	5
BRP17	0	5
BRP19	0	5
BRP22	0	5
BRP24	0	5
BRP28	0	5
BRP29	0	5
BRU01	0	5
BRU02	0	10
BRU03	0	5
BRU04	0	5
BRU05	0	5
BRU06	0	2
BRU08	0	5
BRU09	0	5
BRU12	0	5
BRU13	0	5
BRU15	0	5
GT10B	1	5
GT24B	1	5
GT25B	1	5
VT19B	1	5
VT24B	0	5
VT25B	0	5
VT28B	0	5



**Tabla 15**

*Rótulo de Muestra Plantas de Trigo con Metales e Inóculos.*

<b>Muestra de Planta de Trigo</b>	<b>Rótulo</b>
Parte aérea con Cd	TTC
Parte raíz con Cd	RTC
Parte aérea con BEP17-Dm y Cd	TTBC
Parte raíz con BEP17-Dm y Cd	RTBC
Parte aérea con GT24B y Cd	TTGC
Parte raíz con GT24B y Cd	RTGC
Parte aérea con Pb	TTP
Parte raíz con Pb	RTP
Parte aérea con BEP17-Dm y Pb	TTBP
Parte raíz con BEP17-Dm y Pb	RTBP
Parte aérea con GT24B y Pb	TTGP
Parte raíz con GT24B y Pb	RTGP

# **ANEXO 3**

## Análisis estadístico



**Tabla 16***Análisis de Varianza del Índice de Sideróforos sin Estrés Metálico*

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Sideróforo S/MP	3	22.3288	7.44294	394.01	0
Error	8	0.1511	0.01889		
Total	11	22.48			

**Tabla 17***Análisis de Varianza del Índice de Sideróforos con Estrés Metálico Pb (0.5mM)*

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Sideróforo + Pb(0.5mM)	4	30.216	7.554	174.03	0
Error	10	0.4341	0.04341		
Total	14	30.6501			

**Tabla 18***Análisis de Varianza del Índice de Sideróforos con Estrés Metálico Pb (1mM)*

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Sideróforo + Pb(1mM)	4	14.9921	3.74803	103.3	0
Error	10	0.3628	0.03628		
Total	14	15.3549			

**Tabla 19***Análisis de Varianza del Índice de Sideróforos con Estrés Metálico Cd (0.5mM)*

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Sideróforo + Cd(0.5mM)	3	0.1895	0.06316	3.36	0.076

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Error	8	0.1506	0.01882		
Total	11	0.3401			

**Tabla 20**

*Análisis de Varianza del Índice de Sideróforos con Estrés Metálico Cd (1mM)*

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Sideróforo + Cd(1mM)	3	0.2026	0.06753	0.92	0.475
Error	8	0.5886	0.07357		
Total	11	0.7912			

**Tabla 21**

*Análisis de Varianza de la Producción de AIA con Estrés Metálico Pb (0.5mM)*

*a 24 Horas de Lectura*

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
AIA + Pb(0.5mM) 24H	6	9657.32	1609.55	1532.91	0
Error	35	36.75	1.05		
Total	41	9694.07			

**Tabla 22**

*Análisis de Varianza de la Producción de AIA con Estrés Metálico Pb (0.5mM)*

*a 48 Horas de Lectura*

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
AIA + Pb(0.5mM) 48H	6	12323.1	2053.86	221.87	0
Error	35	324	9.26		
Total	41	12647.1			

**Tabla 23**

*Análisis de Varianza de la Producción de AIA con Estrés Metálico Pb (1mM)  
a 24 Horas de Lectura*

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
AIA + Pb(1mM) 24H	6	2501.89	416.982	589.67	0
Error	35	24.75	0.707		
Total	41	2526.64			

**Tabla 24**

*Análisis de Varianza de la Producción de AIA con Estrés Metálico Pb (1mM)  
a 48 Horas de Lectura*

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
AIA + Pb(1mM) 48H	6	19268.6	3211.43	1112.87	0
Error	35	101	2.89		
Total	41	19369.6			

**Tabla 25**

*Análisis de Varianza de la Producción de AIA con Estrés Metálico Cd (0.5mM)  
a 24 Horas de Lectura*

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
AIA + Cd(0.5mM) 24H	5	72.525	14.505	87.12	0
Error	30	4.995	0.1665		
Total	35	77.52			

**Tabla 26**

*Análisis de Varianza de la Producción de AIA con Estrés Metálico Cd (0.5mM)  
a 48 Horas de Lectura*

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
AIA + Cd(0.5mM) 48H	3	66.195	22.065	82.64	0
Error	20	5.34	0.267		
Total	23	71.535			

**Tabla 27**

*Análisis de Varianza de la Producción de AIA con Estrés Metálico Cd (1mM)  
a 24 Horas de Lectura*

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
AIA + Cd(1mM) 24H	5	85.623	17.1246	220.73	0
Error	30	2.327	0.0776		
Total	35	87.951			

**Tabla 28**

*Análisis de Varianza de la Producción de AIA con Estrés Metálico Cd (1mM)  
a 48 Horas de Lectura*

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
AIA + Cd(1mM) 48H	5	98.63	19.726	172.03	0
Error	30	3.44	0.1147		
Total	35	102.07			

**Tabla 29**

*Análisis de Varianza del Índice de Solubilización de Fosfatos con y sin Estrés Metálico Pb*

Fuente	GL	SC	Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
ISF + MP	3		2.2456	0.74852	14.51	0.001
Error	8		0.4127	0.05159		
Total	11		2.6583			

**Tabla 30**

*Análisis de Varianza del Porcentaje de Germinación de la Alfalfa Inoculada sin Estrés Metálico a 24 Horas de Lectura*

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Alfalfa S/MP 24H	2	0.035	0.0175	28	0.001
Error	6	0.00375	0.000625		
Total	8	0.03875			

**Tabla 31**

*Análisis de Varianza del Porcentaje de Germinación de la Alfalfa Inoculada sin Estrés Metálico a 48 Horas de Lectura*

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Alfalfa S/MP 48H	2	0.035	0.0175	21	0.002
Error	6	0.005	0.000833		
Total	8	0.04			

**Tabla 32**

*Análisis de Varianza del Porcentaje de Germinación de la Alfalfa Inoculada sin Estrés Metálico a 72 Horas de Lectura*

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Alfalfa S/MP 72H	2	0.04625	0.023125	22.2	0.002
Error	6	0.00625	0.001042		
Total	8	0.0525			

**Tabla 33**

*Análisis de Varianza del Porcentaje de Germinación de Trigo Inoculado sin Estrés Metálico a 24 Horas de Lectura*

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Trigo S/MP 24H	2	0.11625	0.058125	27.9	0.001
Error	6	0.0125	0.002083		
Total	8	0.12875			

**Tabla 34**

*Análisis de Varianza del Porcentaje de Germinación de Trigo Inoculado sin Estrés Metálico a 48 Horas de Lectura*

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Trigo S/MP 48H	2	0.02625	0.013125	12.6	0.007
Error	6	0.00625	0.001042		
Total	8	0.0325			

**Tabla 35**

*Análisis de Varianza del Porcentaje de Germinación de Trigo Inoculado sin Estrés Metálico a 72 Horas de Lectura*

<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SC Ajust.</b>	<b>MC Ajust.</b>	<b>Valor F</b>	<b>Valor p</b>
Trigo S/MP 72H	2	0.02625	0.013125	12.6	0.007
Error	6	0.00625	0.001042		
<b>Total</b>	<b>8</b>	<b>0.0325</b>			

**Tabla 36**

*Análisis de Varianza del Porcentaje de Germinación de Alfalfa Inoculada con Estrés Metálico Cd a 24 Horas de Lectura*

<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SC Ajust.</b>	<b>MC Ajust.</b>	<b>Valor F</b>	<b>Valor p</b>
Alfalfa + Cd 24H	2	0.00375	0.001875	1	0.422
Error	6	0.01125	0.001875		
<b>Total</b>	<b>8</b>	<b>0.015</b>			

**Tabla 37**

*Análisis de Varianza del Porcentaje de Germinación de Alfalfa Inoculada con Estrés Metálico Cd a 48 Horas de Lectura*

<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SC Ajust.</b>	<b>MC Ajust.</b>	<b>Valor F</b>	<b>Valor p</b>
Alfalfa + Cd 48H	2	0.005	0.0025	1	0.422
Error	6	0.015	0.0025		
<b>Total</b>	<b>8</b>	<b>0.02</b>			

**Tabla 38**

*Análisis de Varianza del Porcentaje de Germinación de Alfalfa Inoculada con Estrés Metálico Cd a 72 Horas de Lectura*

<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SC Ajust.</b>	<b>MC Ajust.</b>	<b>Valor F</b>	<b>Valor p</b>
Alfalfa + Cd 72H	2	0.00875	0.004375	3.5	0.098
Error	6	0.0075	0.00125		
<b>Total</b>	<b>8</b>	<b>0.01625</b>			

**Tabla 39**

*Análisis de Varianza del Porcentaje de Germinación de Trigo Inoculado con Estrés Metálico Cd a 24 Horas de Lectura*

<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SC Ajust.</b>	<b>MC Ajust.</b>	<b>Valor F</b>	<b>Valor p</b>
Trigo + Cd 24H	2	0.03875	0.019375	10.33	0.011
Error	6	0.01125	0.001875		
<b>Total</b>	<b>8</b>	<b>0.05</b>			

**Tabla 40**

*Análisis de Varianza del Porcentaje de Germinación de Trigo Inoculado con Estrés Metálico Cd a 48 Horas de Lectura*

<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SC Ajust.</b>	<b>MC Ajust.</b>	<b>Valor F</b>	<b>Valor p</b>
Trigo + Cd 48H	2	0.01625	0.008125	7.8	0.021
Error	6	0.00625	0.001042		
<b>Total</b>	<b>8</b>	<b>0.0225</b>			

**Tabla 41**

*Análisis de Varianza del Porcentaje de Germinación de Trigo Inoculado con Estrés Metálico Cd a 72 Horas de Lectura*

<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SC Ajust.</b>	<b>MC Ajust.</b>	<b>Valor F</b>	<b>Valor p</b>
Trigo + Cd 72H	2	0.00125	0.000625	3	0.125
Error	6	0.00125	0.000208		
<b>Total</b>	<b>8</b>	<b>0.0025</b>			

**Tabla 42**

*Análisis de Varianza del Porcentaje de Germinación de Alfalfa Inoculada con Estrés Metálico Pb a 24 Horas de Lectura*

<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SC Ajust.</b>	<b>MC Ajust.</b>	<b>Valor F</b>	<b>Valor p</b>
Alfalfa + Pb 24H	2	0.07125	0.035625	10.06	0.012
Error	6	0.02125	0.003542		
<b>Total</b>	<b>8</b>	<b>0.0925</b>			

**Tabla 43**

*Análisis de Varianza del Porcentaje de Germinación de Alfalfa Inoculada con Estrés Metálico Pb a 48 Horas de Lectura*

<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SC Ajust.</b>	<b>MC Ajust.</b>	<b>Valor F</b>	<b>Valor p</b>
Alfalfa + Pb 48H	2	0.095	0.0475	11.4	0.009
Error	6	0.025	0.004167		
<b>Total</b>	<b>8</b>	<b>0.12</b>			

**Tabla 44**

*Análisis de Varianza del Porcentaje de Germinación de Alfalfa Inoculada con Estrés Metálico Pb a 72 Horas de Lectura*

<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SC Ajust.</b>	<b>MC Ajust.</b>	<b>Valor F</b>	<b>Valor p</b>
Alfalfa + Pb 72H	2	0.07875	0.039375	6.3	0.034
Error	6	0.0375	0.00625		
<b>Total</b>	<b>8</b>	<b>0.11625</b>			

**Tabla 45**

*Análisis de Varianza del Porcentaje de Germinación de Trigo Inoculado con Estrés Metálico Pb a 24 Horas de Lectura*

<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SC Ajust.</b>	<b>MC Ajust.</b>	<b>Valor F</b>	<b>Valor p</b>
Trigo + Pb 24H	2	0.01125	0.005625	3	0.125
Error	6	0.01125	0.001875		
<b>Total</b>	<b>8</b>	<b>0.0225</b>			

**Tabla 46**

*Análisis de Varianza del Porcentaje de Germinación de Trigo Inoculado con Estrés Metálico Pb a 48 Horas de Lectura*

<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SC Ajust.</b>	<b>MC Ajust.</b>	<b>Valor F</b>	<b>Valor p</b>
Trigo + Pb 48H	2	0.02375	0.011875	1.97	0.221
Error	6	0.03625	0.006042		
<b>Total</b>	<b>8</b>	<b>0.06</b>			

**Tabla 47**

*Análisis de Varianza del Porcentaje de Germinación de Trigo Inoculado con Estrés Metálico Pb a 72 Horas de Lectura*

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Trigo + Pb 72H	2	0.04875	0.024375	4.03	0.078
Error	6	0.03625	0.006042		
Total	8	0.085			

**Tabla 48**

*Análisis de Varianza del Número de Raíces de Trigo Inoculado y sin Estrés Metálico*

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
N° de Raíces S/MP	2	5.358	2.6788	3.3	0.108
Error	6	4.865	0.8108		
Total	8	10.222			

**Tabla 49**

*Análisis de Varianza de la Longitud de Raíces de Trigo Inoculado y sin Estrés Metálico*

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Long. Raíces S/MP	2	38.83	19.42	1.83	0.239
Error	6	63.54	10.59		
Total	8	102.37			

**Tabla 50**

*Análisis de Varianza de la Longitud Aérea de Trigo Inoculado y sin Estrés Metálico*

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Long. Aérea S/MP	2	12.784	6.3919	17.43	0.003
Error	6	2.201	0.3668		
Total	8	14.984			

**Tabla 51**

*Análisis de Varianza del Número de Hojas de Trigo Inoculado y sin Estrés Metálico*

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Nº de Hojas S/MP	2	0.6354	0.31771	4.46	0.065
Error	6	0.4271	0.07118		
Total	8	1.0625			

**Tabla 52**

*Análisis de Varianza del Número de Raíces de Trigo Inoculado y con Estrés Metálico Cd*

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Nº de Raíces + Cd	2	0.875	0.4375	1.71	0.258
Error	6	1.5312	0.2552		
Total	8	2.4062			

**Tabla 53**

*Análisis de Varianza de la Longitud de Raíces de Trigo Inoculado y con Estrés Metálico Cd*

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Long. Raíces + Cd	2	24.668	12.334	9.87	0.013
Error	6	7.5	1.25		
Total	8	32.168			

**Tabla 54**

*Análisis de Varianza de la Longitud Aérea de Trigo Inoculado y con Estrés Metálico Cd*

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Long. Aérea + Cd	2	15.16	7.581	1.36	0.325
Error	6	33.4	5.566		
Total	8	48.56			

**Tabla 55**

*Análisis de Varianza del Número de Hojas de Trigo Inoculado y con Estrés Metálico Cd*

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Nº de Hojas + Cd	2	0.6354	0.31771	4.82	0.057
Error	6	0.3958	0.06597		
Total	8	1.0312			

**Tabla 56**

*Análisis de Varianza del Número de Raíces de Trigo Inoculado y con Estrés Metálico Pb*

<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SC Ajust.</b>	<b>MC Ajust.</b>	<b>Valor F</b>	<b>Valor p</b>
N° de Raíces + Pb	2	1.264	0.6319	0.63	0.563
Error	6	5.979	0.9965		
<b>Total</b>	<b>8</b>	<b>7.243</b>			

**Tabla 57**

*Análisis de Varianza de la Longitud de Raíces de Trigo Inoculado y con Estrés Metálico Pb*

<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SC Ajust.</b>	<b>MC Ajust.</b>	<b>Valor F</b>	<b>Valor p</b>
Long. Raíces + Pb	2	6.761	3.3806	4.27	0.07
Error	6	4.747	0.7912		
<b>Total</b>	<b>8</b>	<b>11.509</b>			

**Tabla 58**

*Análisis de Varianza de la Longitud Aérea de Trigo Inoculado y con Estrés Metálico Pb*

<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SC Ajust.</b>	<b>MC Ajust.</b>	<b>Valor F</b>	<b>Valor p</b>
Long. Aérea + Pb	2	12.47	6.234	1.11	0.388
Error	6	33.62	5.604		
<b>Total</b>	<b>8</b>	<b>46.09</b>			

**Tabla 59**

*Análisis de Varianza del Número de Hojas de Trigo Inoculado y con Estrés Metálico Pb*

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
N° de Hojas + Pb	2	0.4826	0.2413	2.11	0.203
Error	6	0.6875	0.1146		
Total	8	1.1701			

**Tabla 60**

*Análisis de Varianza del Número de Raíces de Alfalfa Inoculada y sin Entrés Metálico*

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
N° de Raíces S/MP	2	0.4063	0.2031	0.83	0.481
Error	6	1.4688	0.2448		
Total	8	1.875			

**Tabla 61**

*Análisis de Varianza de la Longitud de Raíces de Alfalfa Inoculada y sin Entrés Metálico*

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Long. Raíces S/MP	2	16.18	8.09	1.82	0.241
Error	6	26.63	4.439		
Total	8	42.81			

**Tabla 62**

*Análisis de Varianza de la Longitud Aérea de Alfalfa Inoculada y sin Entrés Metálico*

<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SC Ajust.</b>	<b>MC Ajust.</b>	<b>Valor F</b>	<b>Valor p</b>
Long. Aérea S/MP	2	6.251	3.125	2.15	0.198
Error	6	8.732	1.455		
<b>Total</b>	<b>8</b>	<b>14.983</b>			

**Tabla 63**

*Análisis de Varianza del Número de Hojas de Alfalfa Inoculada y sin Entrés Metálico*

<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SC Ajust.</b>	<b>MC Ajust.</b>	<b>Valor F</b>	<b>Valor p</b>
N° de Hojas S/MP	2	2.681	1.3403	1.75	0.251
Error	6	4.583	0.7639		
<b>Total</b>	<b>8</b>	<b>7.264</b>			

**Tabla 64**

*Análisis de Varianza del Peso Húmedo de Raíces de Trigo Inoculado y sin Entrés Metálico*

<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SC Ajust.</b>	<b>MC Ajust.</b>	<b>Valor F</b>	<b>Valor p</b>
Raíz Húmedo S/MP	2	0.3453	0.17267	1.87	0.234
Error	6	0.5537	0.09228		
<b>Total</b>	<b>8</b>	<b>0.899</b>			

**Tabla 65***Análisis de Varianza del Peso Húmedo Aéreo de Trigo Inoculado y sin Entrés**Metálico*

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Aéreo Húmedo S/MP	2	1.4237	0.71186	26.16	0.001
Error	6	0.1633	0.02721		
Total	8	1.587			

**Tabla 66***Análisis de Varianza del Peso Seco de Raíces de Trigo Inoculado y sin Entrés**Metálico*

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Raíz Seco S/MP	2	0.000106	0.000053	0.26	0.778
Error	6	0.001216	0.000203		
Total	8	0.001322			

**Tabla 67***Análisis de Varianza del Peso Seco Aéreo de Trigo Inoculado y sin Entrés**Metálico*

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Aéreo Seco S/MP	2	0.004172	0.002086	5.37	0.046
Error	6	0.002332	0.000389		
Total	8	0.006505			

**Tabla 68**

*Análisis de Varianza del Peso Húmedo de Raíces de Trigo Inoculado y con Entrés Metálico Cd*

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Raíz Húmedo + Cd	2	0.18065	0.09032	6.76	0.029
Error	6	0.08015	0.01336		
Total	8	0.2608			

**Tabla 69**

*Análisis de Varianza del Peso Húmedo Aéreo de Trigo Inoculado y con Entrés Metálico Cd*

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Aéreo Húmedo + Cd	2	0.3194	0.15968	3.56	0.096
Error	6	0.2694	0.0449		
Total	8	0.5888			

**Tabla 70**

*Análisis de Varianza del Peso Seco de Raíces de Trigo Inoculado y con Entrés Metálico Cd*

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Raíz Seco + Cd	2	0.001069	0.000534	4.76	0.058
Error	6	0.000674	0.000112		
Total	8	0.001743			

**Tabla 71**

*Análisis de Varianza del Peso Seco Aéreo de Trigo Inoculado y con Entrés Metálico Cd*

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Aéreo Seco + Cd	2	0.003924	0.001962	4.38	0.067
Error	6	0.00269	0.000448		
Total	8	0.006613			

**Tabla 72**

*Análisis de Varianza del Peso Húmedo de Raíces de Trigo Inoculado y con Entrés Metálico Pb*

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Raíz Húmedo + Pb	2	0.291	0.14552	3.03	0.123
Error	6	0.2885	0.04808		
Total	8	0.5795			

**Tabla 73**

*Análisis de Varianza del Peso Húmedo Aéreo de Trigo Inoculado y con Entrés Metálico Pb*

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Aéreo Húmedo + Pb	2	0.7899	0.395	3.43	0.101
Error	6	0.6901	0.115		
Total	8	1.48			

**Tabla 74**

*Análisis de Varianza del Peso Seco de Raíces de Trigo Inoculado y con Entrés Metálico Pb*

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Raíz Seco + Pb	2	0.000043	0.000022	0.05	0.951
Error	6	0.002555	0.000426		
Total	8	0.002598			

**Tabla 75**

*Análisis de Varianza del Peso Seco Aéreo de Trigo Inoculado y con Entrés Metálico Pb*

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Aéreo Seco + Pb	2	0.006168	0.003084	3.08	0.12
Error	6	0.006002	0.001		
Total	8	0.01217			

**Tabla 76**

*Análisis de Varianza del Peso Húmedo de Raíces de Alfalfa Inoculada y sin Entrés Metálico*

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Raíz Húmedo S/MP	2	0.006938	0.003469	0.75	0.51
Error	6	0.027569	0.004595		
Total	8	0.034507			

**Tabla 77***Análisis de Varianza del Peso Húmedo Aéreo de Alfalfa Inoculada y sin Entrés**Metálico*

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Aéreo Húmedo S/MP	2	0.1439	0.07193	2.17	0.195
Error	6	0.1984	0.03307		
Total	8	0.3423			

**Tabla 78***Análisis de Varianza del Peso Seco de Raíces de Alfalfa Inoculada y sin Entrés**Metálico*

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Raíz Seco S/MP	2	0.000078	0.000039	15.36	0.004
Error	6	0.000015	0.000003		
Total	8	0.000093			

**Tabla 79***Análisis de Varianza del Peso Seco Aéreo de Alfalfa Inoculada y sin Entrés**Metálico*

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Aéreo Seco S/MP	2	0.00214	0.00107	1.88	0.233
Error	6	0.003419	0.00057		
Total	8	0.005559			

**Tabla 80***Análisis de Varianza de la Concentración de Cd en la Parte Aérea de Trigo*

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Conc.Cd P.Aérea	2	2111.7	1055.83	37.43	0
Error	6	169.2	28.21		
Total	8	2280.9			

**Tabla 81***Análisis de Varianza de la Concentración de Cd en la Parte Rizosférica de Trigo*

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Conc.Cd P.Raiz	2	26099	13049.4	64.11	0
Error	6	1221	203.6		
Total	8	27320			

**Tabla 82***Análisis de Varianza de la Concentración de Pb en la Parte Aérea de Trigo*

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Conc.Pb P.Aérea	2	4202.4	2101.21	53.02	0
Error	6	237.8	39.63		
Total	8	4440.2			

**Tabla 83***Análisis de Varianza de la Concentración de Pb en la Parte Rizosférica de Trigo*

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Conc.Pb P.Raiz	2	9443.2	4721.6	37.38	0
Error	6	757.9	126.3		
Total	8	10201.1			

**Tabla 84**

*Análisis de Varianza de la Concentración del Factor de Translocación del Cd en el Trigo*

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
FT de Cadmio	2	0.008	0.004	1.45	0.305
Error	6	0.017	0.003		
Total	8	0.025			

**Tabla 85**

*Análisis de Varianza de la Concentración del Factor de Translocación del Pb en el Trigo*

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
FT de Plomo	2	0.169	0.085	19.75	0.002
Error	6	0.026	0.004		
Total	8	0.195			

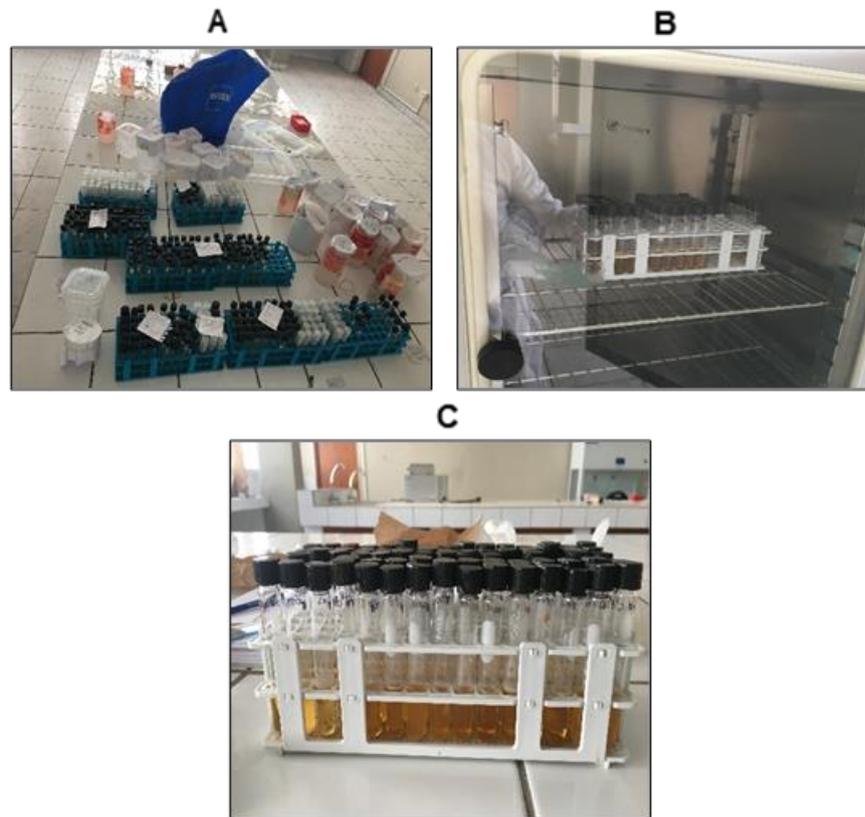
# ANEXO 4

## Panel fotográfico



## Figura 22

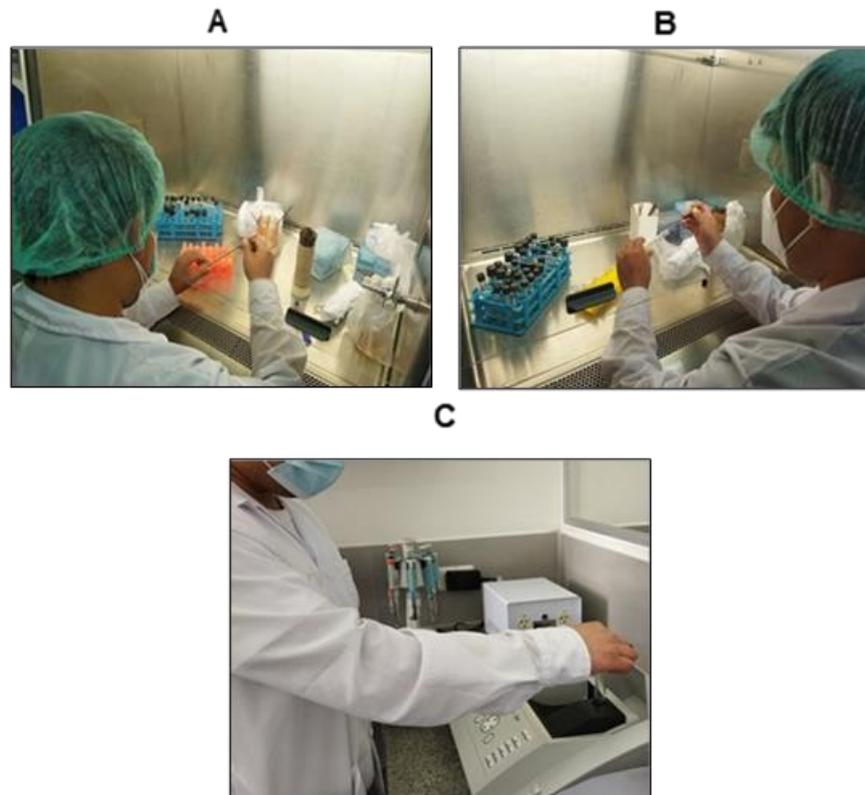
### *Reactivación de Cepas Bacterianas Altoandinas del CIByRGA*



*Nota:* A. Cepas por reactivar, B. Incubación, C. Cepas reactivadas

## Figura 23

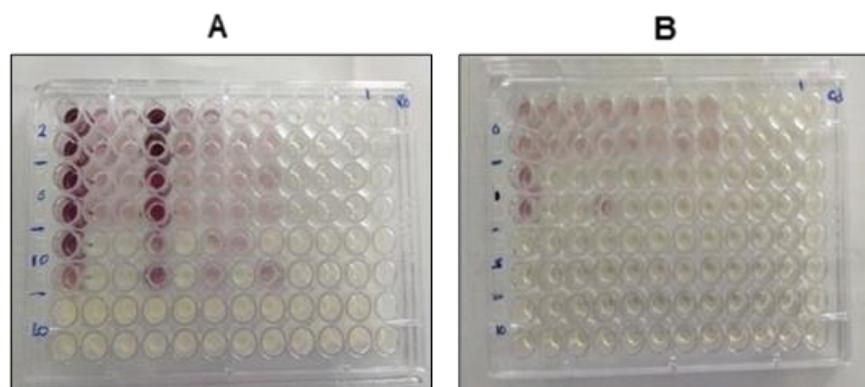
### *Preparación de Inóculo Fresco*



*Nota:* A. Siembra en TSA, B. Dilución, C. Medición de densidad óptica

## Figura 24

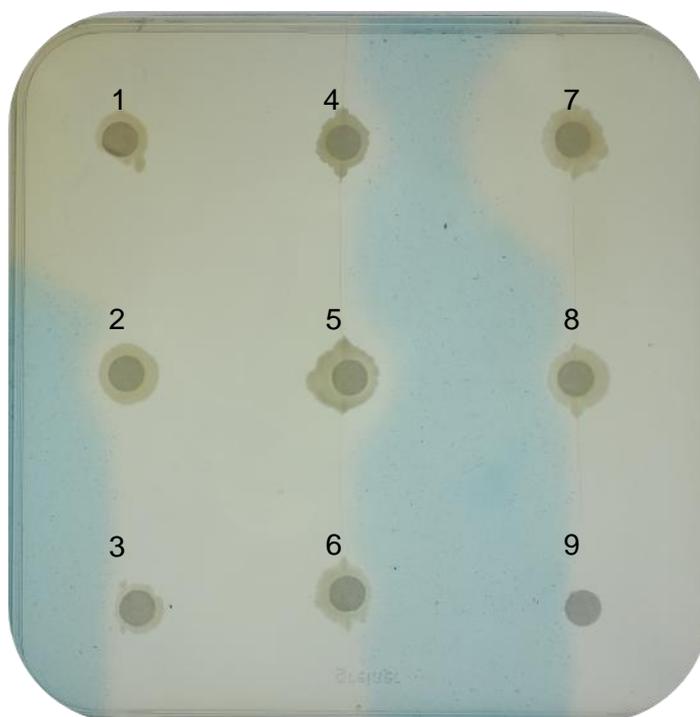
### *Coloración con Tetrazolio (0.1%) para la prueba CMT*



*Nota:* A. Cepas por sometidas a Pb, B. Incubación, C. Cepas sometidas a Cd

## Figura 25

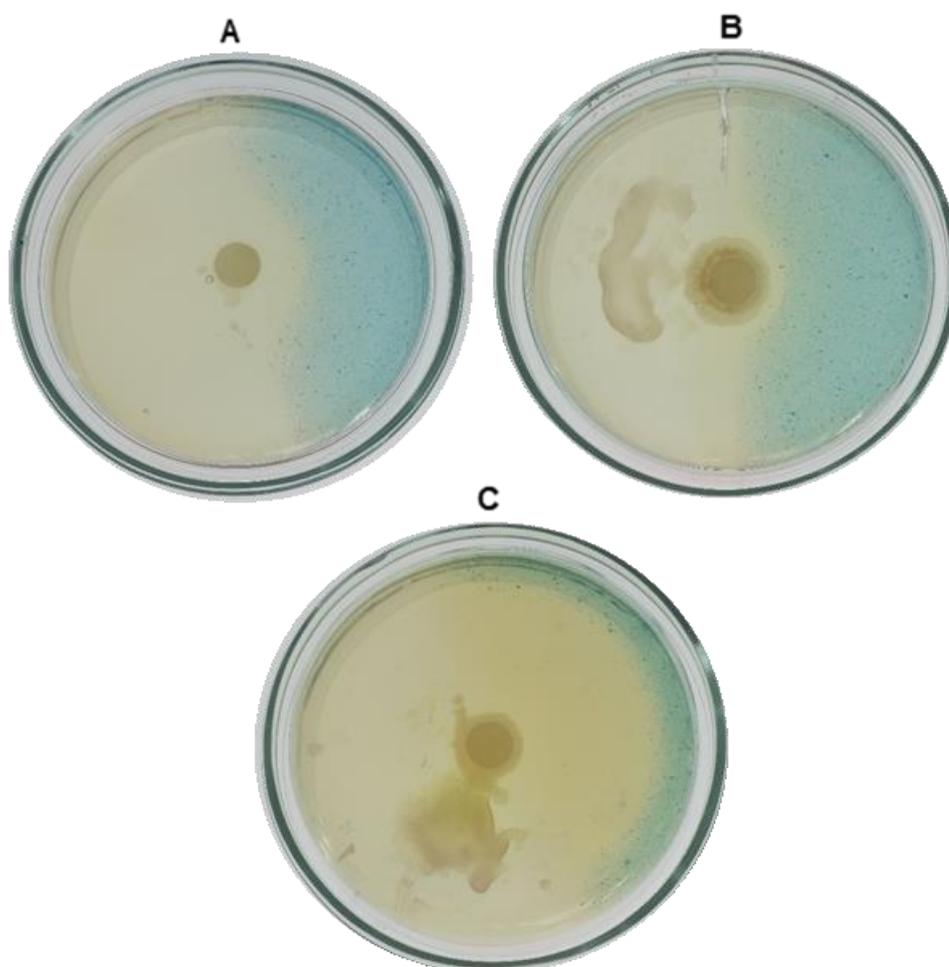
*Producción de Sideróforos de Cepas Tolerantes a Cd y Pb*



*Nota:* 1. BEP17-Dm, 2. GT10B, 3. VT19B, 4. GT25B, 5. GT24B, 6. BEP03, 7. BEP32, 8. BEP18-Dm, 9. Blanco.

## Figura 26

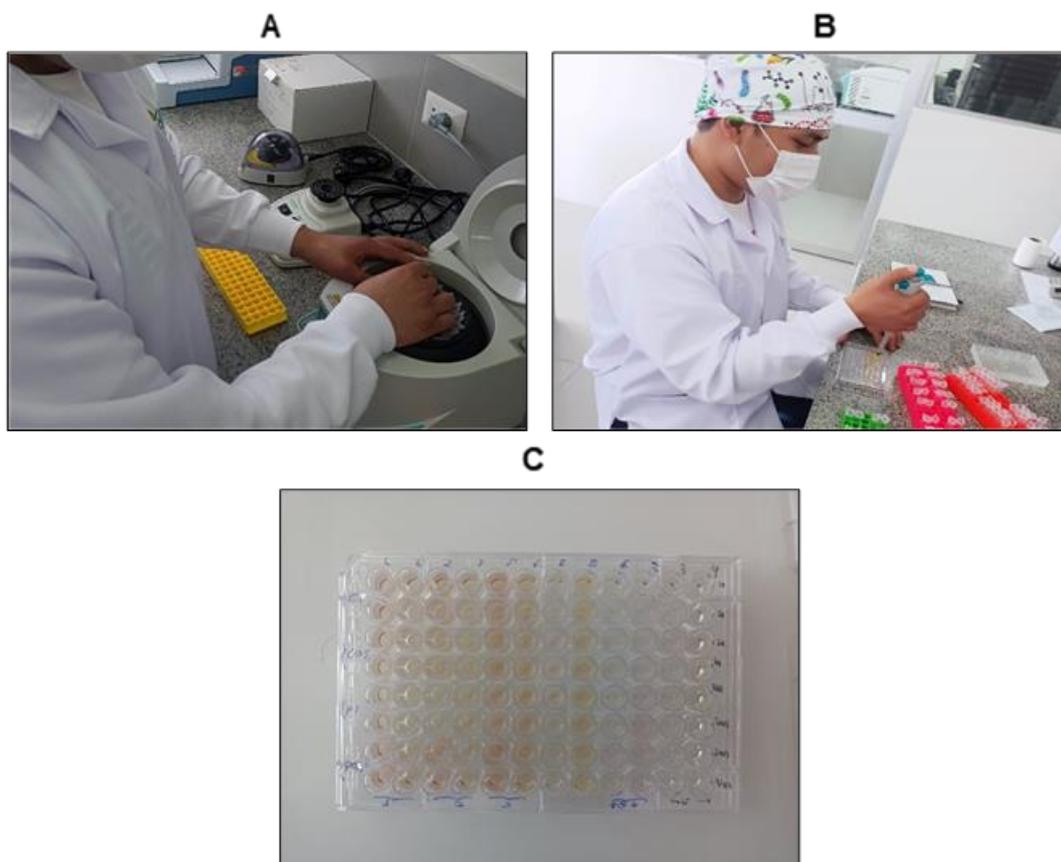
*Producción de Sideróforos de las Cepas BEP17-Dm y GT24B con Estrés Metálico*



*Nota:* A. GT4B con estrés Cd (1mM), B. GT24B con estrés Pb (1mM), C. BEP17-Dm con estrés Pb (1mM).

**Figura 27**

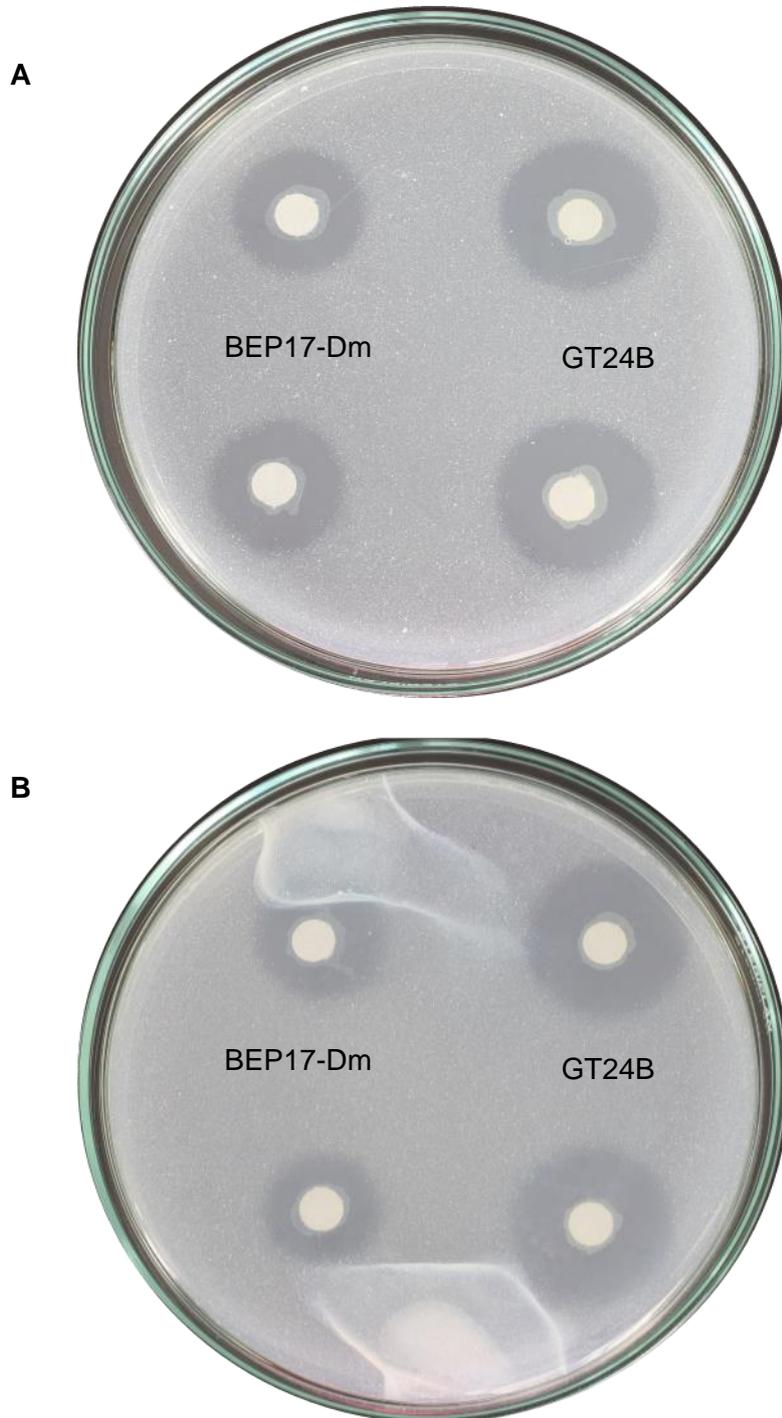
*Prueba de Producción de Ácido Indol-3-Acético con Estrés Metálico*



*Nota:* A. Centrifugación de muestras incubadas y suplementadas con MP (Cd o Pb), B. Adición de reactivo Salkowsky a los sobrenadantes, Coloración de la prueba para ser medida en el espectrofotómetro de microplacas.

## Figura 28

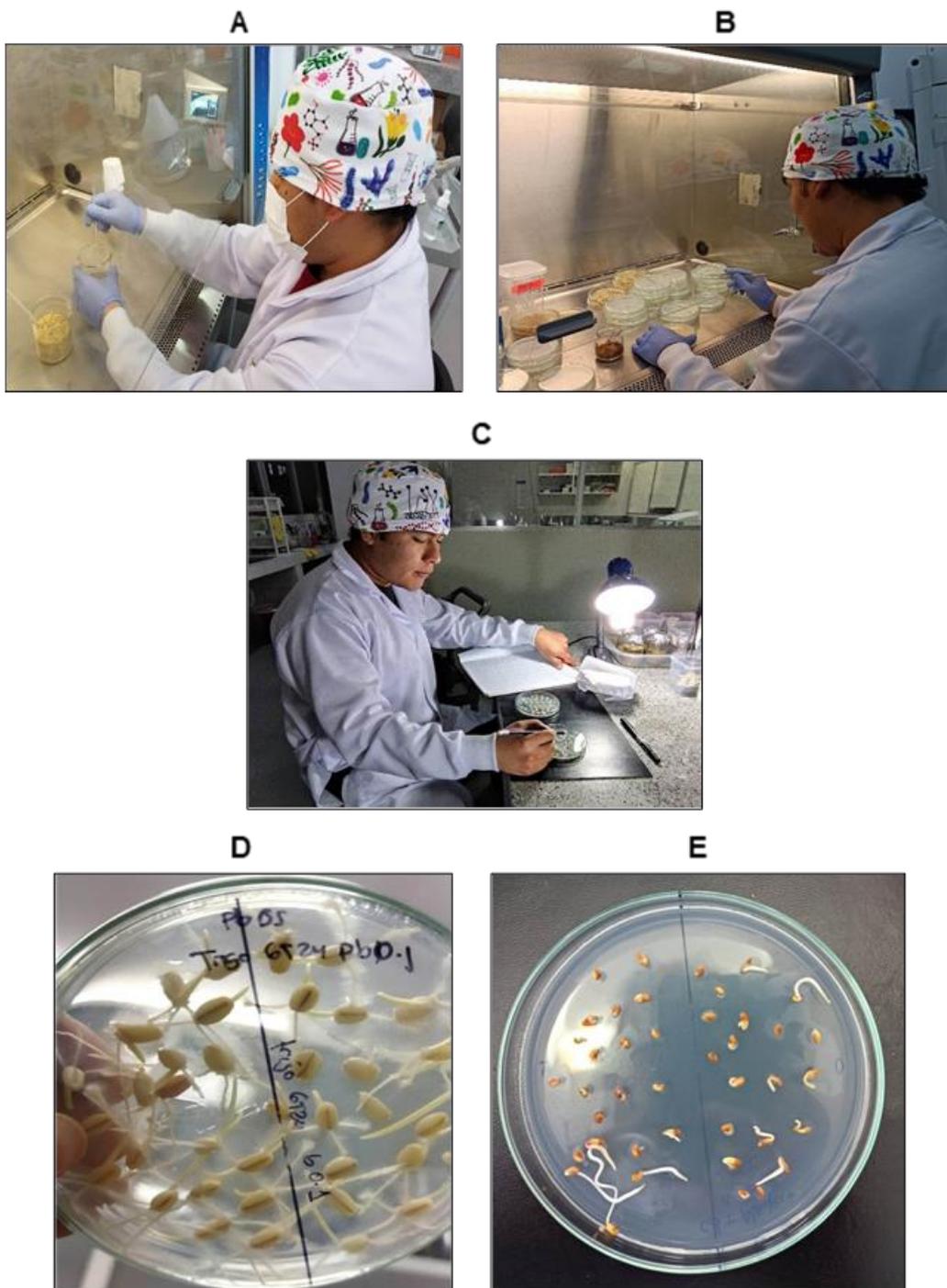
### *Prueba de Solubilización de Fosfatos con Estrés Metálico*



*Nota:* A. Halo de solubilización sin MP (Cd o Pb), B. Halo de solubilización con MP (Pb)

**Figura 29**

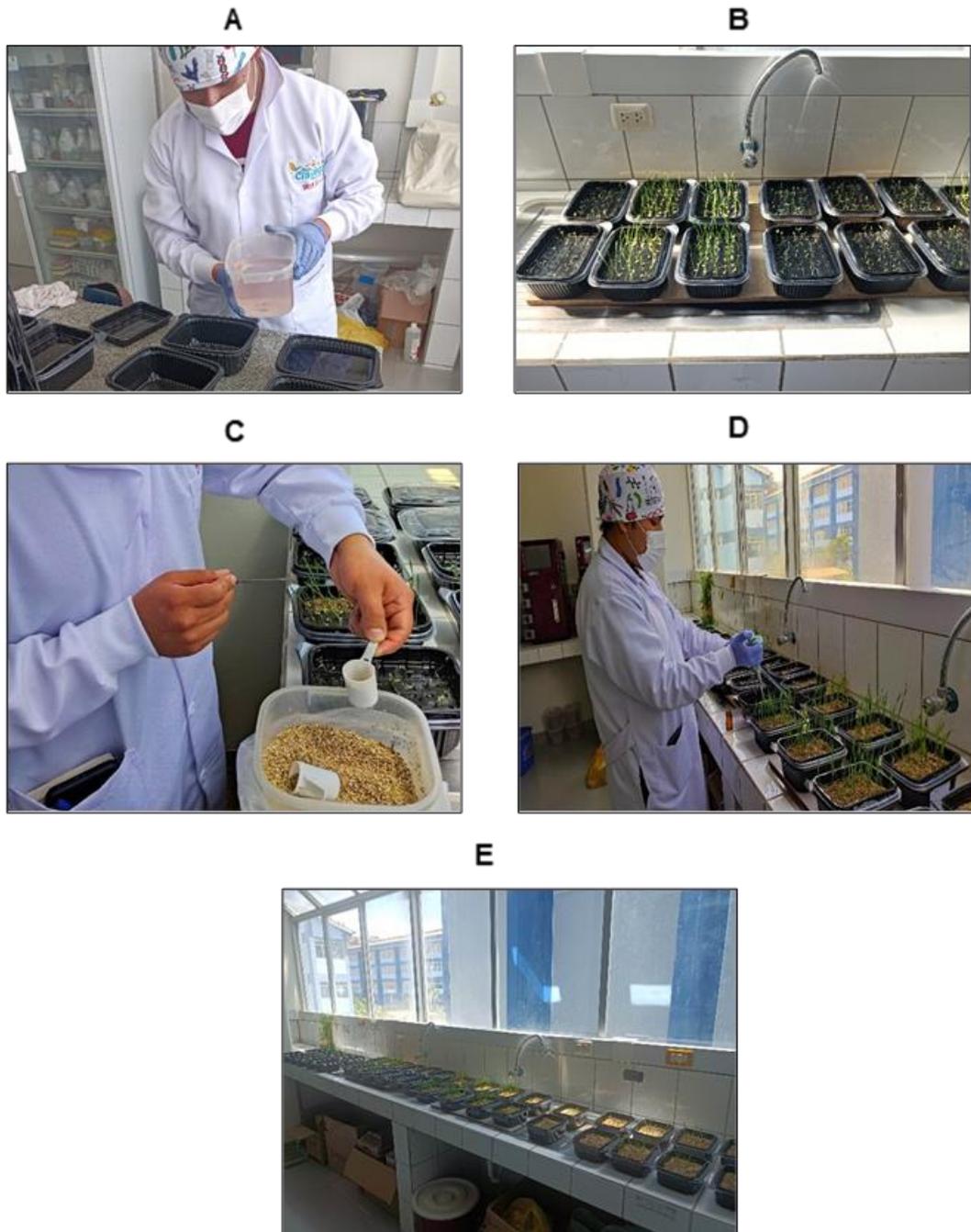
*Prueba de Germinación de Trigo y Alfalfa con Estrés Metálico*



*Nota:* A. Desinfección de semillas e inoculación, B. Colocación de semillas en placas con A-A suplementadas con Cd o Pb, C. Lectura de germinación (%), D. Germinación de trigo, E. Germinación de alfalfa.

### Figura 30

*Bioensayo de Trigo y Alfalfa Inoculados con BEP17-Dm y GT24B, Cultivado en Medio Hidropónico Suplementado con Cd o Pb*

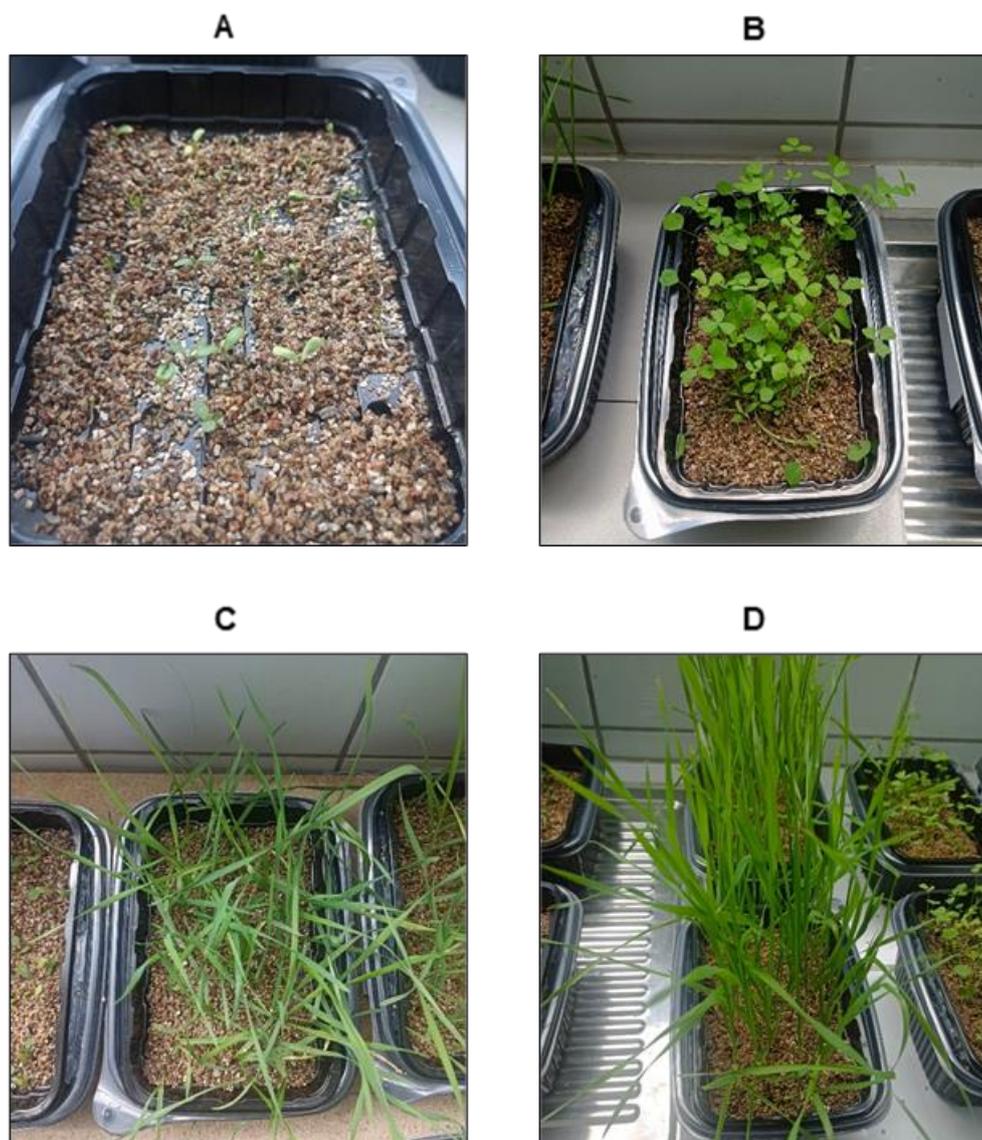


*Nota:* A. Aforo de 800mL de solución hidropónica por envase, B. Colocación

de plántulas de trigo y alfalfa inoculada, C. Adición superficial de vermiculita estéril, D. Adición de Cd y Pb, E. Todos los tratamientos de trigo y alfalfa.

### Figura 31

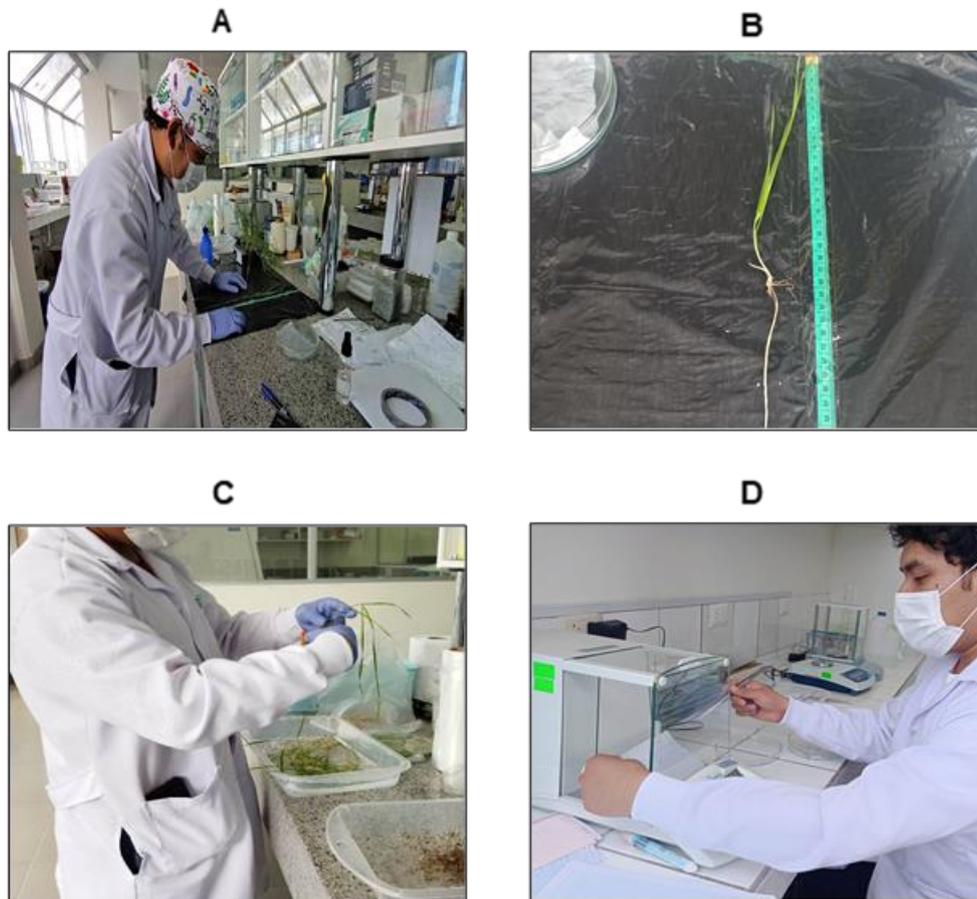
*Efecto de los Metales en los Cultivos de Trigo y Alfalfa a 11 Días de aplicar los Metales*



*Nota:* A. Cultivo de alfalfa inhibido totalmente por los metales (Cd, Pb), B. Alfalfa sin estrés por Cd o Pb de trigo y alfalfa inoculada, C. Trigo bajo estrés con Cd o Pb, D. Trigo sin estrés por Cd o Pb.

## Figura 32

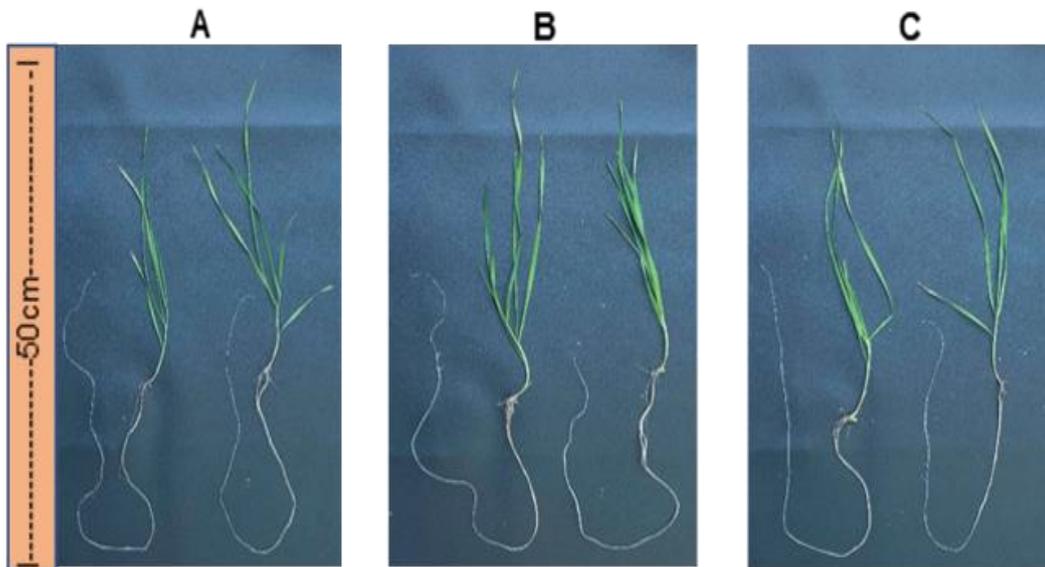
*Medición de las Características de Crecimiento de las Plantas de Trigo y Alfalfa*



*Nota:* A. Contabilización de hojas y raíces, B. Medición de longitud aérea y rizosférica, C. Separación de parte aérea y rizosféricas de las plantas, para el pesado o análisis de metales, D. Peso de biomasa húmeda o seca.

### Figura 33

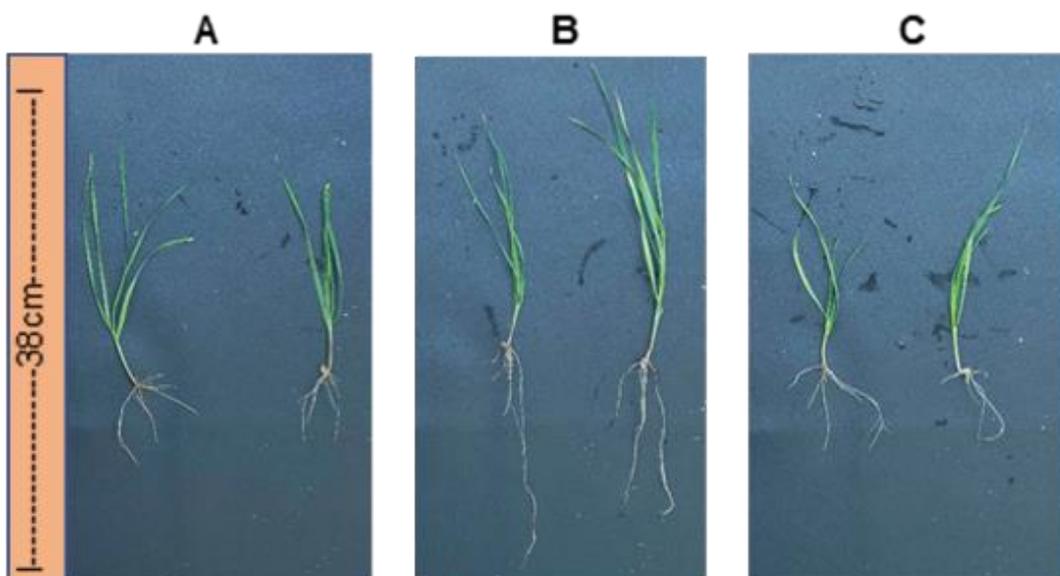
*Plantas Cosechadas de Trigo Cultivadas sin Estrés Metálico*



*Nota:* A. Trigo sin inóculo, B. Trigo inoculado con BEP17-Dm, C. Trigo inoculado con GT24B.

### Figura 34

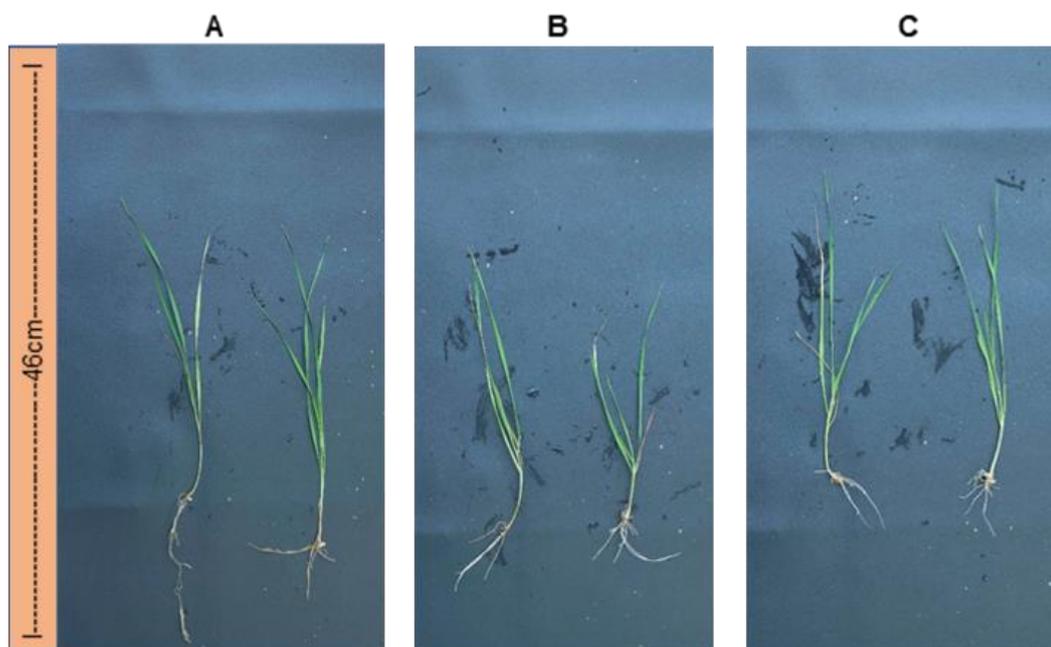
*Plantas Cosechadas de Trigo Cultivadas con Estrés Metálico Cd*



Nota: A. Trigo sin inóculo, B. Trigo inoculado con BEP17-Dm, C. Trigo inoculado con GT24B.

### Figura 35

*Plantas Cosechadas de Trigo Cultivadas con Estrés Metálico Pb*



Nota: A. Trigo sin inóculo, B. Trigo inoculado con BEP17-Dm, C. Trigo inoculado con GT24B.

### Figura 36

*Plantas Cosechadas de Alfalfa Cultivadas sin Estrés Metálico*



*Nota:* A. Alfalfa sin inóculo, B. Alfalfa inoculado con BEP17-Dm, C Alfalfa inoculado con GT24B.