

**UNIVERSIDAD NACIONAL
“SANTIAGO ANTÚNEZ DE MAYOLO”**

FACULTAD DE CIENCIAS DEL AMBIENTE

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AMBIENTAL



**“CARACTERIZACIÓN DE LA COMUNIDAD
MICROBIANA ASOCIADA A LA VEGETACIÓN DEL
PASIVO MINERO AMBIENTAL CHAHUAPAMPA -
UTCUYACU - CÁTAC Y SU POTENCIAL USO EN
LA BIORREMEDIACIÓN - 2016”**

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

AUTOR:

Bach. EDSON DESCOMAR PALACIOS ROBLES

ASESORA:

Dra. CARMEN DEL ROSARIO TAMARIZ ANGELES

**Huaraz, Ancash, Perú
Enero, 2018**

**UNIVERSIDAD NACIONAL
“SANTIAGO ANTÚNEZ DE MAYOLO”**

FACULTAD DE CIENCIAS DEL AMBIENTE

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AMBIENTAL



**“CARACTERIZACIÓN DE LA COMUNIDAD
MICROBIANA ASOCIADA A LA VEGETACIÓN DEL
PASIVO MINERO AMBIENTAL CHAHUAPAMPA -
UTCUYACU - CÁTAC Y SU POTENCIAL USO EN
LA BIORREMEDIACIÓN - 2016”**

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

AUTOR:

Bach. EDSON DESCOMAR PALACIOS ROBLES

ASESORA:

Dra. CARMEN DEL ROSARIO TAMARIZ ANGELES

**Huaraz, Ancash, Perú
Enero, 2018**



ACTA DE SUSTENTACIÓN Y DEFENSA DE TESIS

Los Miembros del Jurado en pleno que suscriben, reunidos en la fecha, en el Auditorium de la FCAM-UNASAM, de conformidad a la normatividad vigente conducen el Acto Académico de Sustentación y Defensa de la Tesis **CARACTERIZACIÓN DE LA COMUNIDAD MICROBIANA ASOCIADA A LA VEGETACIÓN DEL PASIVO MINERO AMBIENTAL CHAHUAPAMPA – UTCUYACU – CÁTAC Y SU POTENCIAL USO EN LA BIORREMEDIACIÓN - 2016**, que presenta el Bachiller **EDSON DESCIDOMAR PALACIOS ROBLES** para optar el **Título Profesional de Ingeniero Ambiental**.

En seguida, después de haber atendido la exposición oral y escuchada las respuestas a las preguntas y observaciones formuladas, lo declaramos:

APROBADO


con el calificativo de: DIECISIETE (17)

En consecuencia, el Bachiller **EDSON DESCIDOMAR PALACIOS ROBLES** 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° del Reglamento General de Grados y Títulos de la UNASAM (Resolución de Consejo Universitario – Rector N° 554-2017-UNASAM) y el Art. 160° del Reglamento de Gestión de la Programación, Ejecución y Control de las Actividades Académicas (Resolución de Consejo Universitario – Rector N° 432-2016-UNASAM).

Huaraz, 26 de Enero de 2018


Dr. HERACLIO FERNANDO CASTILLO PICÓN
Presidente
Jurado de Sustentación


MSc. ELADIO GUILLERMO TUYA CASTILLO
Secretario
Jurado de Sustentación


Ing. FRIDA MÓNICA CABALLERO BEDRIÑANA
Vocal
Jurado de Sustentación


Dra. CARMEN DEL ROSARIO TAMARIZ ANGELES
Asesor de Tesis

DEDICATORIA

Con todo cariño

A todas las personas que me ayudaron en el proceso de formación como profesional, especialmente a mi madre quien siempre me inculcó valores, que me permiten ser una persona que contribuya con el desarrollo de mi tierra, y quien siempre me alienta a seguir adelante y esforzarme para alcanzar mis sueños.

Edson Desciomar Palacios Robles

AGRADECIMIENTOS

A Dios por poner en mi camino personas que me han alentado e inspirado a ser mejor, haciendo posible la culminación de esta investigación.

A mi madre Zoila, mi hermano Deivid, mis hermanas María Mercedes y Anggie Roxana por todo su apoyo y aliento.

A la Dra. Carmen Tamariz por su asesoramiento incondicional en todas las etapas de mi trabajo de Investigación.

Al Dr. Percy Olivera por su co-asesoramiento en el trabajo de campo, laboratorio y gabinete.

A mis compañeros y amigos de laboratorio, Gabriela, Alberto, Fabricio y Alex por todo su apoyo y cooperación en las salidas de campo y trabajos de laboratorio.

A la Universidad Nacional Santiago Antúnez de Mayolo por la subvención otorgada para la elaboración de esta investigación.

Al laboratorio de biología de la Facultad de Ciencias donde se llevó a cabo la investigación.

A los miembros del jurado por el tiempo dedicado en la revisión del presente trabajo de investigación.

RESUMEN

Las actividades humanas y procesos naturales están contaminando cuerpos de agua y suelos con metales pesados, poniendo en riesgo los ecosistemas y la salud humana. En este sentido, los microorganismos asociados a plantas que habitan sitios contaminados, presentan potencialidades en procesos de biorremediación, debido a su gran resistencia a estos contaminantes y su capacidad de producir metabolitos que intervienen en la mejora de la absorción de metales por las plantas. Es por ello, que la presente investigación tuvo como objetivo caracterizar microorganismos rizosféricos y endofíticos, aislados de dos especies de plantas que habitan el pasivo minero ambiental Chahuapampa, con el fin de evaluar sus potencialidades en procesos de biorremediación.

Como prueba de selección, se evaluó la producción de sideróforos. Luego se evaluaron las resistencias a Cd y Pb a través de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y su capacidad de solubilizar CdCO_3 y PbCO_3 . Asimismo, las cepas seleccionadas fueron evaluadas como promotores de crecimiento vegetal para lo cual se realizaron pruebas *in vitro* de producción de Ácido Indol Acético (AIA) y de solubilización de fosfato.

Se aislaron 28 cepas asociadas a *Juncus imbricatus* y 35 cepas asociadas a *Scirpus rigidus*, de las cuales 5 bacterias y 6 hongos produjeron sideróforos, siendo las cepas de hongos HEU11, HRU17 Y HRU11 las que mostraron mejores índices CAS-Fe y CAS-Al. Se observó mayor resistencia a Cd y Pb, por los hongos, en comparación a las bacterias, con CMIs de 7 mM en Cd y 71 mM en Pb. Las cepas BRU16 y HRU17 presentaron los mayores índices de solubilización de CdCO_3 , no obteniendo resultados positivos en PbCO_3 . Sólo las bacterias rizosféricas BRU11, BRU16 y BRU18 mostraron la capacidad de solubilizar fosfatos, siendo la cepa BRU16 la que presentó el mayor índice. 2 bacterias y 5 hongos produjeron AIA, siendo la cepa de bacteria BRU18 y la cepa de hongo HEU17 las que mostraron mayores producciones con 4.2 y 6.08 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. La caracterización morfológica y molecular mostró que las cepas de bacterias pertenecen a las especies *Bacillus subtilis* y género *Hafnia* sp., y las cepas de hongos al género *Penicillium*.

El estudio evidencia la existencia de una comunidad microbiana asociada a la vegetación del pasivo minero Chahuapampa con características metabólicas potenciales para la mejora de procesos de biorremediación.

Palabras clave: Biorremediación, fitorremediación, metales pesados, sideróforos

ABSTRACT

Extractive and industrial activities, agriculture and natural geochemical processes are polluting water bodies and soils with heavy metal, risking ecosystems and human health. In this regard, microorganisms associated with plants that inhabit polluted sites, show several potentialities in bioremediation process, due to their high heavy metal resistance and their ability to produce metabolites involved in improving heavy metal uptake by plants. Therefore, this research studied endophytic and rhizosphere microorganisms, insole from two plans species that lives in Chahuapampa mining tailing in order to evaluate their potential in bioremediation processes.

The preliminary test was siderophores production. Afterward resistance to heavy metal of selected strains was evaluate through Minimal Inhibitory Concentration (MIC). Moreover, it was evaluate the ability to solubilize lead and cadmium carbonate. Furthermore selected strains were evaluate as plant grown promoting, for this purpose, it was carried out *in vitro* test of AIA production and inorganic phosphate solubilización.

It was insolated 28 strains from *Juncus imbricatus* and 35 strains from *Scirpus rigidus* of which, 5 bacteria and 6 fungi showed to ability to produce siderophores, the better CAS-Fe and CAS-Al index were obtained by fungal strains HEU11, HRU17 Y HRU11. The MICs found showed higher Cd and Pb resistance of fungi compared to bacteria strains witch were 7 mM and 71 mM respectively. BRU16 and HRU17 strains showed the greatest cadmium carbonate solubilization index, there was no positive results on lead carbonate solubilization test. Just rhizosphere bacteria BRU11, BRU16 y BRU18 showed to ability to solubilize phosphate, the BRU16 strain reported the highest phosphate solubilization index. 2 bacteria and 5 fungi strains produced AIA, which bacteria strain BRU18 and fungus strain HEU17 reported the highest AIA production with 4.2 and 6.08 µg/mL respectively. The molecular and morphology characterization showed bacteria strains belong to *Bacillus subtilis* and *Scirpus sp.* Moreover fungal strains belong to *Penicillium sp.*

This study evidences the existence of microbial community associate to vegetation of Chahuapampa mining tailing that shows potential metabolic characteristics to improve bioremediation.

Keywords: Bioremediation, phytoremediation, heavy metals, siderophores

ÍNDICE

CONTENIDO	Pág.
ACTA DE SUSTENTACIÓN.....	i
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
RESUMEN.....	iv
ABSTRACT.....	v
ÍNDICE.....	vi
LISTA DE TABLA.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
ABREVIATURA Y SÍMBOLOS.....	x
CAPÍTULO I	
INTRODUCCIÓN	1
1.1. Planteamiento del problema.....	3
1.2. Formulación del problema.....	3
1.3. Hipótesis	3
1.4. Objetivos.....	4
1.4.1. Objetivo general.....	4
1.4.2. Objetivos específicos.....	4
CAPÍTULO II	
MARCO REFERENCIAL	5
2.1. Antecedentes	5
2.1.1. Contaminación con metales pesados de suelos y agua en la región Ancash.....	5
2.1.2. Estudios relacionados con el uso de microorganismos en la mejora de la biorremediación	6
2.2. Marco teórico	9
2.2.1. Contaminación de suelos con metales	9
2.2.2. Biodisponibilidad de metales en el suelo	10
2.2.3. Remediación de suelos contaminados con metales pesados.....	11
2.2.4. Microorganismos tolerantes a metales pesados.....	13

2.2.5. Microorganismos asociados a plantas que habitan suelos contaminados	14
2.3. Definición de términos	20

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA.....	22
3.1. Tipo de investigación	22
3.1.1. Según su propósito o aplicación.....	22
3.1.2. Según su naturaleza profundidad o alcance.....	22
3.2. Zona de estudio	22
3.3. Muestreo de plantas y suelos de rizósfera	23
3.3.1. Características generales de las muestras recolectadas.....	24
3.4. Aislamiento de microorganismos.....	26
3.4.1. Aislamiento de microorganismos endofíticos.....	26
3.4.2. Aislamiento de microorganismos de rizósfera	26
3.5. Prueba de detección de sideróforos para la selección preliminar de microorganismos.....	27
3.5.1. Preparación de inóculo y siembra de bacterias	28
3.6. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de cadmio y plomo.....	28
3.7. Prueba de solubilización de carbonato de cadmio y plomo	29
3.8. Prueba de solubilización de fosfatos	30
3.9. Prueba de producción de Ácido Indol Acético (AIA)	31
3.10. Caracterización morfológica	33
3.11. Caracterización molecular	33
3.12. Diagrama general del trabajo	35

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	36
4.1. Microorganismos endofíticos y de rizósfera aislados.....	36
4.2. Prueba de producción de sideróforos.....	37
4.3. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de cadmio y plomo.....	43
4.4. Prueba de solubilización de carbonato de cadmio y plomo	46
4.5. Prueba de solubilización de fosfatos	49
4.6. Prueba de producción de Ácido Indol Acético (AIA)	51

4.7. Caracterización bioquímica y morfológica	54
4.8. Caracterización molecular	58
4.9. Resumen de resultados y contrastación de hipótesis	59
CAPÍTULO V	
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	61
5.1. Conclusiones.	61
5.2. Recomendaciones.	62
ANEXOS	70

LISTA DE TABLA

Tabla 1: Estudios caso de mejora de la fitorremediación con Bacterias Promotoras de Crecimiento	8
Tabla 2: Efectos dañinos del cadmio y plomo en la salud humana	10
Tabla 3: Especiación química del Pb y Cd en el suelo	11
Tabla 4: Datos generales de muestras de recolectados del pasivo minero ambiental Chahuapampa	24
Tabla 5: Concentración de metales y pH en suelos de rizósfera	24
Tabla 6: Identificación taxonómicas de plantas recolectadas y sus principales características	25
Tabla 7: Número de cepas aisladas por muestra	36
Tabla 8: Índice de producción de sideróforos de hierro y aluminio en bacterias	38
Tabla 9: Índice de producción de sideróforos de hierro y aluminio en hongos	40
Tabla 10: Concentraciones Mínimas Inhibitorias de cadmio y plomo en bacterias	44
Tabla 11: Concentraciones Mínimas Inhibitorias de cadmio y plomo en hongos	45
Tabla 12: Índice de Solubilización de Cadmio en hongos	47
Tabla 13: Índice de Solubilización de Fosfatos en bacterias	50
Tabla 14: Reporte de los resultados de pruebas bioquímicas	54
Tabla 15: Identificación taxonómica de bacterias a través de la amplificación y secuenciamiento del gen 16S.....	58
Tabla 16: Identificación taxonómica de hongos través de la amplificación y secuenciamiento del gen ITS	59

Tabla 17: Resumen de las características encontradas de las cepas bacterianas evaluadas.....	60
Tabla 18: Resumen de las características encontradas de las cepas fúngicas evaluadas.....	60
Tabla 19: Prueba Duncan del índice CAS-Fe en bacterias	83
Tabla 20: Prueba Duncan del índice CAS-Al en bacterias	83
Tabla 21: Prueba Duncan del índice CAS-Fe en hongos	83
Tabla 22: Prueba Duncan del índice CAS-Al en hongos.....	84
Tabla 23: Prueba Duncan del índice de solubilización de cadmio en hongos	84
Tabla 24: Prueba Duncan del Índice de solubilización de fosfatos en bacterias	84
Tabla 25: Prueba Duncan de la producción de ácido indol acético en bacterias	85
Tabla 26: Prueba Duncan de la producción de ácido indol acético en hongos.....	85

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Producción de AIA en cepas bacterianas.....	52
Gráfico 2: Producción de AIA en cepas de hongos	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Comparación entre plantas inoculadas y sin inocular	15
Figura 2: Rol de los microorganismos productores de sideróforos en la fitoextracción de suelos contaminados con metales pesado	17
Figura 3: Diagrama general del trabajo	35

LISTA DE IMÁGENES

Imagen 1: Pasivo minero ambiental Chahuapampa.....	23
Imagen 2: Prueba CAS-Fe en bacterias, A: corresponde a la cepa BRU10, B: corresponde a la cepa BRU11, C: corresponde a la cepa BRU17 la cual no mostró resultados positivos	38
Imagen 3: Prueba CAS-Al en bacteria.....	39
Imagen 4: Prueba CAS-Fe en hongos	41

Imagen 5:	Prueba CAS-AI en hongos	41
Imagen 6:	Prueba de Concentración Mínima Inhibitoria de cadmio	46
Imagen 7:	Prueba de solubilización de carbonato de cadmio en bacterias	47
Imagen 8:	Prueba de solubilización de carbonato de cadmio en hongos.	49
Imagen 9:	Prueba de solubilización de fosfatos en bacteria	50
Imagen 10:	Características morfológicas macroscópicas de la cepa fúngica HEU01, A: fotografía tomada del haz, B: fotografía tomada del envés	55
Imagen 11:	Características morfológicas macroscópicas de la cepa fúngica HEU11, A: fotografía tomada del haz, B: fotografía tomada del envés	55
Imagen 12:	Características morfológicas macroscópicas de la cepa fúngica HEU17, A: fotografía tomada del haz, B: fotografía tomada del envés	56
Imagen 13:	Características morfológicas macroscópicas de la cepa fúngica HRU02, A: fotografía tomada del haz, B: fotografía tomada del envés	56
Imagen 14:	Características morfológicas macroscópicas de la cepa fúngica HRU07, A: fotografía tomada del haz, B: fotografía tomada del envés	57
Imagen 15:	Características morfológicas macroscópicas de la cepa fúngica HRU11, A: fotografía tomada del haz, B: fotografía tomada del envés	57

ABREVIATURA Y SÍMBOLOS

PGPM	Plant Growth Promoting Microorganisms (Microorganismos promotores de crecimientos de plantas)
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
MSF	Microorganismos solubilizadores de fosfatos
ISF	Índice de Solubilización de fosfatos
IS-Cd	Índice de Solubilización de Cadmio
IS-Pb	Índice de Solubilización de Plomo
MPS	Microorganismos productores de sideróforos
AIA	Ácido Indol Acético
CAS	Cromo Azurol S
TSA	Trypticase Soy Agar (Agar Tripticasa de Soya)

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

El desarrollo económico y social de la humanidad ha causado grandes problemas ambientales alrededor del mundo, como es el caso de la contaminación del agua y suelos con metales pesados, cuyo origen principal está relacionado con la minería, uso de fertilizantes, inadecuada disposición de desechos líquidos y sólidos procedentes de actividades industriales y urbanas, entre otros (Kavamura & Esposito, 2010). La contaminación del suelo con metales pesados es un tipo de degradación muy peligrosa debido a que estos pueden pasar a otros ecosistemas a través de procesos de lixiviación y volatilización, consecuentemente, dañar plantas y animales (Dimitriu, 2014). Asimismo, los metales pesados pueden acumularse en los tejidos de los seres vivos y llegar a afectar la salud de los seres humanos a través de la cadena alimenticia (Gal & Baena, 2008).

Considerando los riesgos que ocasiona la contaminación con metales pesados a la población y al ambiente se han buscado soluciones rápidas que puedan disminuir la concentración de metales pesados a niveles aceptables, siendo las técnicas fisicoquímicas las que se han desarrollado y aplicado más en países de Europa y Norteamérica (Dimitriu, 2014; U.S. Environmental Protection Agency, 1997). Sin embargo, estas técnicas tienen un costo de inversión muy elevado y en ocasiones tienen efectos negativos en las propiedades del suelo y la calidad de aguas subterráneas adyacentes al suelo tratado (U.S. Environmental Protection Agency, 1997). Es por ello

que se han venido realizando varias investigaciones y proyectos piloto de tratamiento de suelos contaminados, haciendo uso de plantas con capacidades de extraer o fitoestabilizar metales peligrosos (Diez, 2008; Leon, 2017). Esta técnica denominada fitorremediación, tiene una gran aceptación en el mundo científico debido a que sólo utiliza la energía solar para su funcionamiento, no causa impactos negativos en el suelo y agua, y son menos costosas que las técnicas fisicoquímicas convencionales (Ahmed, 2014). Sin embargo, como toda técnica de remediación, la fitorremediación presenta algunas desventajas que limita su uso a gran escala, entre ellas se encuentra: el largo tiempo requerido para el tratamiento; la mayoría de plantas utilizadas tiene poca productividad de biomasa debido al estrés provocado por los metales pesados; así mismo, en algunos casos, la biodisponibilidad de metales pesados en los suelos es baja, lo que impide que las plantas absorban estos contaminantes (Ullah et al., 2015).

En este sentido, varios trabajos de investigación se han enfocado en estudiar a los microorganismos rizosféricos y endofíticos aislados de sitios contaminados, en los que se han reportado bacterias y hongos capaces de mejorar procesos de biorremediación (Ma et al., 2011), gracias a la producción de sideróforos, los que están involucrados en la detoxificación y movilización de metales pesados en suelos, consecuentemente un aumento en absorción de metales por parte de las plantas (Ahmed & Holmström, 2014). Asimismo, estos microorganismos tienen la capacidad de mejorar la tolerancia y crecimiento de plantas a través del proceso de solubilización de fosfatos y la producción de fitohormonas de crecimiento, los que tienen un efecto importante en la producción de biomasa y resistencia a ambientes extremos (Ma et al., 2011).

En la Región Ancash se han realizado estudios de la capacidad de bioacumulación y translocación de metales pesados de plantas que habitan suelos contaminados por relaves mineros y drenajes ácidos de roca (Aliaga et al., 2007; Medina & Montano, 2014); sin embargo, hasta la fecha no existen registros de investigaciones sobre microorganismos asociados a estas plantas, y sus roles en el crecimiento, tolerancia y la extracción de metales pesados por parte de las plantas. Por lo tanto, la presente investigación tuvo como principal propósito caracterizar microorganismos asociados a plantas que habitan los suelos contaminados por el pasivo minero Chahuapampa-Utcuyacu, uno de los pasivos mineros ambientales abandonados en la región Ancash, en el cual se ha encontrado concentraciones elevadas de metales peligrosos y que están impactando la calidad de las aguas, pastos y suelos en la provincia de Cátac (Moreno & Vizconde, 2006), por consiguiente, es un lugar propicio

para aislar microorganismos potenciales en la mejora de procesos de biorremediación de suelos contaminados por estos metales, en nuestra región.

El presente trabajo de investigación se esquematiza de la siguiente manera: en el capítulo I se muestra la hipótesis del trabajo y los objetivos; en el capítulo II se muestra el marco de referencia, donde se incluyen los antecedentes y el marco teórico del trabajo, el capítulo III describe la metodología seguida para cada una de las pruebas realizadas, el capítulo IV muestra los resultados de cada prueba y la discusión de estos con otros trabajos de investigación, finalmente en el capítulo V se encuentran las conclusiones y recomendaciones.

1.1. Planteamiento del problema

La fitorremediación de suelos contaminados con metales pesados es un método con muchas ventajas, sin embargo, la toxicidad de estos contaminantes limita el crecimiento y desarrollo de las plantas lo que afecta la producción de biomasa, factor clave para una eficiente remoción de metales; asimismo la extracción de metales es afectada por la poca biodisponibilidad de metales en el suelo.

1.2. Formulación del problema

Dado que se ha observado que en suelos afectados por el pasivo minero Chahuapampa-Utcuyacu se ha desarrollado vegetación que resiste condiciones altas de metales pesados, se formuló la siguiente interrogante:

¿Cuáles son las características de la comunidad microbiana asociada a la vegetación del pasivo minero ambiental Chahuapampa y su uso potencial en fitorremediación.?

1.3. Hipótesis.

La comunidad microbiana del pasivo minero ambiental Chahuapampa presenta propiedades metabólicas potenciales para la mejora de procesos de biorremediación

1.4. Objetivos.

1.4.1. Objetivo general.

Caracterizar la comunidad microbiana asociada a la vegetación del pasivo minero ambiental Chahuapampa y su uso potencial en biorremediación.

1.4.2. Objetivos específicos.

- a. Aislar microorganismos endófitos y rizosféricos asociados a la vegetación del pasivo minero ambiental Chahuapampa-Utcuyacu.
- b. Seleccionar cepas de microorganismos endofíticos y rizosféricos a través de la prueba de producción de sideróforos.
- c. Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria de plomo y cadmio en las cepas seleccionadas.
- d. Evaluar la capacidad de solubilizar carbonato de plomo y cadmio de las cepas seleccionadas.
- e. Evaluar la capacidad de solubilizar fosfatos de las cepas seleccionadas.
- f. Evaluar la capacidad de producir Ácido Indol Acético de las cepas seleccionadas.
- g. Identificar las cepas con mejores resultados a través de técnicas moleculares y caracterización morfológica.

CAPÍTULO II

MARCO REFERENCIAL

2.1. Antecedentes

2.1.1. Contaminación con metales pesados de suelos y agua en la región Ancash

En el año 2016 el Ministerio de Energía y Minas actualizó el inventario de pasivos ambientales, en el que reportó un total de 8616 pasivos, siendo el departamento de Ancash el de mayor número de pasivos con un total de 1284, lo que representa un 14.5% del total nacional, en los que se encuentran depósitos de relaves, provenientes en su mayoría de procesos de flotación diferencial; donde se obtenían concentrados de plomo – zinc; cuya disposición final, en la mayoría de los casos, están ubicados en la rivera de los ríos de la zona (Rodríguez et al., 2007). Estos pasivos ambientales son un gran riesgo a la salud humana y los ecosistemas, debido a que pueden contaminar los cuerpos de agua y suelos con metales tóxicos a través del proceso de lixiviación y producción de Drenajes Ácidos de Mina (DAM), que se generan por la oxidación de minerales sulfúricos en presencia del agua y oxígeno, formando ácido sulfúrico que baja el pH de las aguas superficiales, condición donde son solubles metales tales como el hierro, el cobre el aluminio y el plomo (Chávez, 2015).

Un problema similar está ocasionando el retroceso de la masa glaciar en la cordillera blanca, que está dejando a la intemperie rocas sulfuradas compuestas básicamente de pirita que están produciendo una incontrolable oxidación de los minerales de sulfuro, originando los llamados Drenajes Ácidos de Roca (DAR) (González-toril et al., 2015). Estos drenajes impactan a las corrientes del agua de igual manera que los DAM, disminuyendo su pH, y aumentando los niveles de sulfatos y metales pesados peligrosos en los cuerpos de agua (Graaf & Hall, 2012).

2.1.2. Estudios relacionados con el uso de microorganismos en la mejora de la biorremediación

Un número significantes de plantas han sido estudiadas por su habilidad de acumular metales pesados; sin embargo, muchas plantas asociadas con la fitorremediación, no producen suficiente biomasa para que este proceso pueda ser aplicado en campo, es por eso, que el uso de microorganismos para la fitorremediación es ideal (Glick, 2003). Se han realizado varios estudios de bacterias rizosféricas y endofíticas, asociados a plantas, capaces de producir sideróforos, AIA y solubilizar fosfatos, que han mostrados resultados importantes en la mejora de la fitorremediación de Cd y Pb (Tabla 1). Por ejemplo, Jimg et al (2014) aisló bacterias resistente a metales pesados y capaces de promover el crecimiento de plantas, las cuales fueron identificados como *Enterobacter* sp. y *Klebsiella* sp., y que fueron inoculadas en *Brassica napus*, para observar el efecto que tenía en la fitoextracción de metales, mostrando una mejora el crecimiento de las plantas y la acumulación de Cd, Pb y Zn.

Asimismo, los hongos asociados a plantas que habitan suelos contaminados, también han reportado tener propiedades metabólicas que pueden tener efectos positivos en la resistencia a metales pesados (Lebeau, Braud, & Je, 2008). Es el caso del estudio realizado por Yamaji et al. (2016) en el cual aisló tres cepas de hongos endofíticos identificados como: *Phialocephala fortinii*, *Rhizodermea veluwensis* y *Rhizoscyphus* sp, que fueron inoculadas a semillas de *Clethra barbinervis*, mostrando una mejora en su crecimiento y resistencia a metales pesados, comparado con plantas control, los cuales presentaron bajo crecimiento, clorosis y síntomas de

toxicidad por metales. Las cepas de hongos estudiados en esta investigación también produjeron sideróforos siendo esta probablemente la causa de la capacidad de detoxificación de la planta al estrés provocado por los metales (Ahmed & Holmström, 2014).

En otro estudio Kumla & Suwannarach (2014) aislaron cuatro ectomicorrizas aislados de suelos contaminados en Tailandia, las cuales mostraron la capacidad de biosintetizar la fitohormona AIA y solubilizar metales tóxicos en forma de carbonatos (Co, Cd, Cu, Pb, Zn), además los hongos al ser inoculados a semillas de *Bruguiera parviflora* y *Zea mays* encontraron una mejor germinación de las semillas y crecimiento de las raíces.

Con los que respecta a hongos endofíticos resistentes a metales pesados, Deng et al. (2011) realizó un estudio donde aisló un hongo endofítico resistente a metales pesados, específicamente de la raíz de *Brassica chinensis* que habita los suelos contaminados con metales pesados de China. El estudio encontró una alta resistencia de la cepa a diferentes concentraciones de metales pesados; asimismo, se evaluó la capacidad de biosorción y bioacumulación de Cd y Pb, concluyendo que el micelio activo del hongo *Mucor* sp. pudo acumular Cd y Pb de soluciones y mejorar la cantidad de metal disuelto en la solución del suelo.

Tabla 1: Estudios caso de mejora de la fitorremediación con Bacterias Promotoras de Crecimiento

Microorganismos	Planta asociada	Metal pesado	Características beneficiosas	Mejoras en la fitorremediación	Fuente
<i>Pseudomonas fluorescens</i> G10 y <i>Microbacterium</i> sp. G16	<i>Brassica napus</i>	Pb	AIA, ACC deaminasa Sideróforos	Aumento en la acumulación de plomo en raíces y brotes	(Sheng, Xia, Jiang, He, & Qian, 2008)
<i>Azotobacter chroococum</i> <i>Rhizobium leguminosarum</i>	<i>Zea mays L.</i>	Pb	AIA, disminución del pH del suelo	Aumento en la acumulación de plomo en raíces tallo y hojas	(Hadi & Bano, 2010)
<i>Bacillus pumilus</i> E2S2 y <i>Bacillus</i> sp. E1S2	<i>Sedum plumbizincicola</i>	Cd	AIA, ACC deaminasa, Sideróforos, solubilización de fosfatos	Aumento en la acumulación de cadmio en raíces y brotes	(Ma et al., 2015)
<i>Pseudomonas</i> sp. LK9	<i>Solanum nigrum</i>	Cd	Sideróforos y Ácidos orgánicos	Aumento en la acumulación de cadmio en raíces tallo y hojas	(Chen et al., 2014)
<i>Rahnella</i> sp. JN6	<i>Brassica napus</i>	Pb, Cd	AIA, ACC deaminasa, Sideróforos, solubilización de fosfatos	Aumento en la acumulación de plomo y cadmio en raíces y brotes	(He et al., 2013)
<i>Burkholderia</i> sp. J62	<i>Lycopersicum esculentum,</i>	Pb, Cd	AIA, ACC deaminasa, Sideróforos, solubilización de fosfatos	Aumento en la acumulación de plomo y cadmio en raíces y brotes	(Jiang, Sheng, Qian, & Wang, 2008)

Fuente: Ullah et al. (2015), traducido.

2.2. Marco teórico

2.2.1. Contaminación de suelos con metales

La contaminación del suelo puede tener origen natural o antropogénico, siendo la segunda, producto de la inadecuada deposición de residuos peligrosos generados por actividades industriales, agrícolas, mineras y urbanas (Ma et al., 2011). Entre los diferentes tipos de contaminación del suelo, la generada por metales pesados es una de las que mayor impacto genera, debido a que los metales pesados disueltos, presentes en el suelo, pueden pasar a otros ecosistemas más frágiles, a través de mecanismos como la lixiviación y volatilización, pudiendo bioacumularse en los organismos y pasar de esa manera a la cadena alimenticia (Gal & Baena, 2008). La acumulación de metales pesados en el suelo y agua, genera un riesgo al ambiente y a la salud humana ya que estos elementos se acumulan en los tejidos de los organismos vivos, y su concentración incrementa a medida que pasa de niveles tróficos inferiores a niveles tróficos superiores, fenómeno conocido como biomagnificación (Ali, Khan, & Sajad, 2013). Los metales pesados pueden causar efectos severos a los organismos incluso a muy baja concentración (Ali et al., 2013), por ejemplo, los iones de Hg y Cd muestran toxicidad incluso a concentraciones de 0.001-0.1 mg/L (Ahemad, 2014).

Los metales que mayor problema causan son el Hg, Cd, Pb, As, Cu, Zn, Sn, y Cr, fuera de estos, Hg, Cd, Pb, y As son metales no esenciales para los organismos vivos, mientras que, Cu and Zn son metales esenciales (elementos traza) (Bitton et al., 1994). Los metales pesados tóxicos pueden causar diferentes problemas de salud, dependiendo del tipo de metal, su concentración, su estado de oxidación, etc. (Ahemad, 2014). En la Tabla 2 se muestra los efectos dañinos del Cd y Pb en la salud humana.

Tabla 2: Efectos dañinos del cadmio y plomo en la salud humana

Metal	Efectos dañinos
Cadmio	Es cancerígeno, mutagénico, teratogénico; genera alteraciones endocrinas, interfiere con la regulación de calcio en sistemas biológicos, produce insuficiencia renal y, anemia crónica.
Plomo	Está relacionado con problemas en los niños tal como alteración en su desarrollo, reducción de la inteligencia, pérdida de memoria a corto plazo, pérdida de habilidades de aprendizaje y problemas de coordinación; insuficiencia renal, incremento del riesgo de desarrollo de enfermedades cardiovasculares.

Fuente: Ahemad (2014), traducido

2.2.2. Biodisponibilidad de metales en el suelo

La contaminación de un suelo suele valorarse comparando la concentración total de metales pesados con estándares de calidad definidos por la legislación de cada país (Gal & Baena, 2008), sin embargo, la concentración total de un metal pesado no muestra su toxicidad real, debido a que esta depende de la especiación química en que se encuentre este en el suelo (Ashraf et al., 2012), el cual nos proporciona información sobre la repartición del metal pesado entre las diferentes formas químicas y fases (sólida y líquida), y por ende su biodisponibilidad y peligrosidad en los seres vivos (Ashraf et al., 2012 ; Ahemad, 2014). En la Tabla 3 se muestra la especiación química del plomo y cadmio en el suelo.

La especiación química está influenciada por varios factores tales como las propiedades del suelo; en las que se puede mencionar al pH, capacidad de intercambio catiónico; contenido de materia orgánica, minerales de arcilla, óxidos metálicos, capacidad búfer y potencial redox (Gal & Baena, 2008). Generalmente, la biodisponibilidad de los metales pesados incrementa bajo condiciones oxidantes, aeróbicas y bajo pH, debido a su presencia en forma iónica, por el contrario, bajo condiciones reducibles, anaeróbicas y alto pH, su disponibilidad decrece por la existencia de especies metálicas insolubles como especies de sulfuros, fosfatos o carbonatos (Ahemad, 2014). Asimismo, los exudados orgánicos secretados por las raíces de las plantas y los microorganismos

también cumplen un papel importante en la movilidad de metales (Glick, 2003).

Tabla 3: Especiación química del Pb y Cd en el suelo

Metal	Especiación y química
Plomo	Pb se presenta con estados de oxidación de 0 y +2, siendo Pb (II) la forma más común y reactiva de Pb. Los compuestos de baja solubilidad son formados por la complejación con ligandos inorgánicos (Cl^- , CO_3^{2-} , SO_4^{2-} , PO_4^{3-}) y ligandos orgánicos (ácidos húmicos y fúlvicos, EDTA, amino ácidos). Los procesos primarios que influyen en el destino del Pb en el suelo incluyen la adsorción, el intercambio iónico, la precipitación y la complejación con materia orgánica.
Cadmio	Cd se presenta con estados de oxidación de 0 y +2. Los hidróxidos $[\text{Cd}(\text{OH})_2]$ y carbonatos (CdCO_3) son las formas dominantes a pH alto mientras que las especies de Cd^{+2} y sulfato acuoso predominan a pH bajo (<8). Este precipita en presencia de fosfatos, arsenatos, cromátos, sulfuros, etc. Muestra movilidad a pH de 4.5 a 5.5.

Fuente: Hashim et al. (2011) traducido

2.2.3. Remediación de suelos contaminados con metales pesados

La remediación de suelos contaminados con metales pesados es de vital importancia para la conservación del ambiente, es por ello, que se han desarrollado técnicas fisicoquímicas y biológicas para tratar suelos contaminados con metales pesados, siendo este un trabajo desafiante con respecto al costo y la complejidad de las técnicas (Ullah et al., 2015).

2.2.3.1. Enfoques fisicoquímicos

Los enfoques fisicoquímicos incluyen la excavación, entierro en rellenos sanitarios especiales; tratamientos térmicos, lavado de suelos, vitrificación y tratamientos electroestáticos; estas técnicas son rápidas pero inadecuadas, ya que son costosas, causan efectos negativos e irreversibles en las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo; asimismo, provocan problemas de contaminación secundaria (Ali et al., 2013). El enfoque fisicoquímico solo cambia el problema de una forma a otra, y no remueve completamente los contaminantes (Ullah et al., 2015).

2.2.3.2. Enfoques biológicos

La remediación biológica es considerada como uno de los métodos de remoción de metales tóxicos más efectivo, debido a que incluyen métodos pasivos con efectos mínimos en el ambiente y tienen un costo de inversión menor a las técnicas fisicoquímicas (Ullah et al., 2015). En este enfoque, la biorremediación y la fitorremediación son las técnicas más utilizadas en el tratamiento de agua, suelos y sedimentos afectados con metales, donde el propósito principal es dar las condiciones necesarias para que los microorganismos (bacterias, hongos, microalgas) y plantas, remuevan o estabilicen estos contaminantes (González, 2006; Miransari, 2011).

En la biorremediación se hace uso de microorganismos para el tratamiento del suelos y aunque estos no pueden degradar o destruir los metales pesados, cumplen un rol fundamental en la migración y transformación de metales, a través mecanismos que incluyen la complejación extracelular, precipitación, reacciones de óxido reducción y acumulación intracelular (Yao et al., 2012).

Por otro lado, los metales pesados también pueden ser tratados a través de la fitorremediación, la cual está referida al uso efectivo de plantas y sus microorganismos asociados, con el fin de absorber, estabilizar o volatilizar metales peligrosos (Ali et al., 2013; Glick, 2003; Ullah et al., 2015). A diferencia de los métodos convencionales de remediación, la fitorremediación posee algunas ventajas importantes como son: protege las propiedades fisicoquímicas del suelo, el tratamiento puede realizarse *in situ*, no genera contaminantes secundarios (efluentes gaseosos y líquidos), su costo es 80 a 90% menos, entre otros (Jakovljevic et al., 2016). Sin embargo, como toda técnica de remediación su aplicación tiene algunas restricciones como son: el largo tiempo requerido para el tratamiento, factible solo para niveles de contaminación baja a moderada y en ocasiones, el metal pesado no se encuentra biodisponible para la planta. Por otro lado, la toxicidad de los metales inhibe el crecimiento y producción de biomasa

de la planta, la cual es un factor crítico en la fitoextracción efectiva de los metales (Ullah et al., 2015 ; Jakovljevic et al., 2016).

2.2.4. Microorganismos tolerantes a metales pesados

Los metales pesados, en concentraciones bajas, son necesarias para algunas reacciones bioquímicas en microorganismos y plantas, permitiendo su crecimiento y desarrollo. Sin embargo, en concentraciones altas, estos causan efectos citotóxicos (Kavamura & Esposito, 2010). Las concentraciones altas de metales pesados pueden afectar la microbiota directamente a través de la modificación en el tamaño de su población, diversidad y actividad (Yu et al., 2014). No obstante, los hongos y las bacterias son afectados de diferente manera por los metales pesados, estudios han demostrado que existen bacterias resistentes a metales pesados, posiblemente a causa de mecanismos de tolerancia y detoxificación, los cuales pueden ser, por ejemplo, la producción de agentes quelantes que se unen al metal y reduce su toxicidad (Kavamura & Esposito, 2010), otros mecanismos incluyen la expulsión de especies de metales fuera de la superficie de la célula microbiana, bioacumulación de iones de metales dentro de la célula activamente o pasivamente, biotransformación de metales tóxicos a menos tóxicos y adsorción del metal en la pared celular (Ahemad, 2014).

Según Anahid et al. (2010), son dos los mecanismos que permiten a los hongos tolerar altas concentraciones de metales pesados: los mecanismos extracelulares; donde moléculas orgánicas, que no pertenecen a la matriz de la pared celular, son excretadas por las células del hongo para quelar iones de metal y así evitar que el metal pesado ingrese a la célula, y los mecanismos intracelulares, donde las proteínas u otros ligandos se unen al metal evitando que dañen las partes sensibles de la célula o permitiendo el secuestro del metal dentro de compartimientos de vacuolas.

La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), es una metodología muy utilizada para diagnosticar la resistencia de microorganismos a metales pesados, siendo definida como la concentración más baja de un

metal que inhibe el crecimiento de un microorganismo completamente después de su incubación (Deng et al., 2011).

2.2.5. Microorganismos asociados a plantas que habitan suelos contaminados

2.2.5.1. Microorganismos de suelo de rizósfera

Glick (2012), menciona que los microorganismos de rizósfera son los que se encuentran en contacto con las raíces de las plantas y generalmente promueven el crecimiento de la planta de dos maneras: directamente, facilitando la adquisición de recursos (nitrógeno, fósforo y otros nutrientes esenciales) y modulando los niveles de hormonas, o indirectamente, a través de la disminución de los efectos inhibitorios de varios patógenos en crecimiento de plantas y desarrollándose como agentes de biocontrol (Glick, 2012; Rashid et al., 2012; Ullah et al., 2015). Algunas Bacterias promotoras de crecimiento de plantas (PGPB) pueden bajar los niveles de etileno por la síntesis de la enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) deaminasa, lo separa del compuesto ACC, el inmediato precursor de etileno en todas las plantas mayores, evitando su muerte en condiciones altas de metales pesados (Glick, 2005).

2.2.5.2. Microorganismos endofíticos

Los microorganismos endofíticos han sido definidos como bacterias u hongos que colonizan los tejidos de las plantas sin causar efectos negativos a su hospedador, estos microorganismos pueden residir dentro de las células, en los espacios intercelulares o en el sistema vascular (Mani, 2009), a pesar de que las bacterias endofíticas existen en las plantas en forma variable y transitoria, ellos son capaces de provocar diferentes cambios fisiológicos para promover el crecimiento y desarrollo de plantas (Li, Wei, Shen, & Zhou, 2012). Diversos estudios han reportado casos donde los microorganismos endofíticos han conferido a la planta, grandes niveles de tolerancia al estrés provocado por metales pesados y han estimulado su crecimiento a través de mecanismos como el control biológico,

resistencia a patógenos, fijación de nitrógeno, regulación de crecimiento y mejoramiento en la absorción de nutrientes (Rajkumar et al., 2009).

2.2.5.3. Rol de los microorganismos resistentes a metales en la mejora de procesos de fitorremediación de suelos contaminados

Los microorganismos endofíticos y rizosféricos pueden facilitar la fitorremediación directamente, mejorando la acumulación de metales en los tejidos de las plantas o indirectamente, promoviendo el crecimiento y aumento de biomasa en las plantas a través de la producción de fitohormonas y la provisión de nutrientes esenciales (Rajkumar et al., 2009; Rajkumar et al., 2012; Ullah et al., 2015). En la figura 1 se muestra una comparación entre la fitorremediación asistida por microorganismos y el mismo proceso sin inoculación de estos.

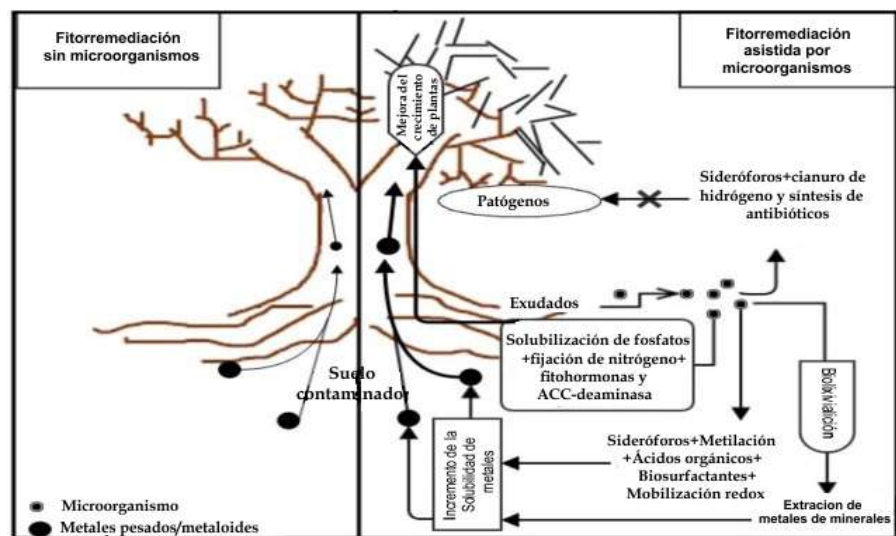


Figura 1: Comparación entre plantas inoculadas y sin inocular

Fuente: Ullah et al. (2015), traducido

2.2.5.4. Producción de sideróforos y absorción de metales

El hierro es un nutriente esencial para todas las formas de vida, debido a que participa en diferentes actividades metabólicas, actúa como cofactor para las enzimas e interviene en la síntesis de clorofila (Seneviratne et al., 2015). Sin embargo, aunque el hierro es uno de los

elementos más abundantes en la naturaleza, en ambientes aeróbicos, el hierro existe principalmente en la forma de Fe^{+3} y tiende a formar hidróxidos y oxihidróxidos insolubles, que son en gran parte, no disponibles para los microorganismos y plantas (Hussein & Joo, 2012).

La producción de sideróforos, es un de las estrategias más comunes que poseen los microorganismos para adquirir suficiente hierro en condiciones donde este se encuentra en cantidades limitadas (Ahmed & Holmström, 2014), por lo que la inoculación de plantas con microorganismos productores de sideróforos puede mejorar la producción de su biomasa y resistencia de estas a condiciones de estrés (Rajkumar et al., 2010).

Pero además de cumplir la función de proveedor de hierro, lo sideróforos, han reportado ser los responsables de mejorar la biodisponibilidad de metales pesados en los suelos rizosféricos, esto debido a que además de quelar iones de Fe, también forman complejos estables con otros metales, tales como el Al, Cd, Cu, Ga, In, Pb y Zn (Rajkumar et al., 2012), que pueden ser absorbidos por las plantas a través de los de los siguientes procesos: degradación, absorción directa e intercambio de ligando (Rajkumar et al., 2010). En la figura 2 se muestra el rol de los microorganismos productores de sideróforos en la solubilización y fitoextracción de metales pesados del suelo.

La capacidad de un microorganismos de producir sideróforos puede ser evaluada a través del ensayo de detección de sideróforos propuesto por Schwyn & Neilands (1987), el que está basado en una competición por hierro, entre el complejo de un colorante indicador (CAS) y un quelante o sideróforo producido por un microorganismo, el hierro es removido del CAS por el sideróforo, el cual aparentemente tiene mayor afinidad por el Fe^{+3} (Milagres et al., 1999), además esta prueba puede ser modificada utilizando Al, para comprobar la quelación de Al por parte de los sideróforos producidos. El resultado positivo de ambas pruebas se revela por un cambio de color del CAS (comúnmente de azul a anaranjado), sin embargo, el color puede

variar de acuerdo al tipo de sideróforo producido por el microorganismo (Hussein & Joo, 2012; Milagres et al., 1999).

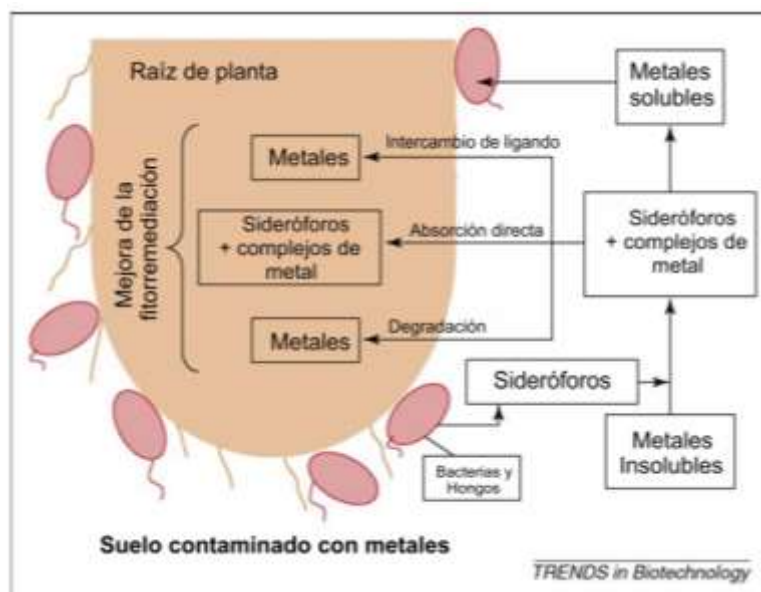


Figura 2: Rol de los microorganismos productores de sideróforos en la fitoextracción de suelos contaminados con metales pesados

Fuente: Rajkumar et al. (2010), traducido

2.2.5.5. Movilización de metales pesados

En suelos contaminados, una gran proporción de metales pesados están generalmente unidos a varios compuestos orgánicos e inorgánico o en forma de precipitados, lo que disminuye la concentración de metales biodisponibles para la plantas (Ying Ma et al., 2016). Los microorganismos asociados a plantas pueden potencialmente mejorar la fitoextracción por la alteración de la solubilidad, disponibilidad y transporte de metales pesados a través de procesos como la reducción del pH del suelo, protonación liberación de quelatos o cambios rédox (Fomina et al., 2005; Ying Ma et al., 2016). Entre los varios metabolitos producidos por los microorganismos, los sideróforos juegan un rol importante en la movilización y acumulación de metales, debido a que, como mencionó anteriormente, pueden formar complejos con iones de metales pesados divalentes y así ser asimilados por las raíces de la plantas (Seneviratne et al., 2015). Además, ciertos microorganismos han

mostrado incrementar la movilización de metales pesados por la secreción de ácidos orgánicos con baja masa molecular tales como gluconato, 2-ketogluconato, oxalato, citrato, acetato, malato, succinato, entre otros (Ma et al., 2011).

2.2.5.6. Producción de fitohormonas

Glick (2012) menciona que cuando las plantas se encuentran condiciones ambientales que limitan su crecimiento, como el caso de concentraciones altas de metales pesados, frecuentemente intentan ajustar los nivel de sus fitohormonas a fin de disminuir los efectos negativos de los causantes de estrés, sin embargo, las plantas no son las únicas que pueden producir fitohormonas, los microorganismos de rizosfera y endofíticos (hongos y bacterias) también son capaces de producir o modular fitohormonas, teniendo así un papel fundamental en el crecimiento y tolerancia de plantas en condiciones de estrés.

Las fitohormonas más estudiadas son las Auxinas, que están presentes en la mayoría de plantas, siendo el AIA la auxina más activa, la que es responsable de la regulación de la elongación celular, división celular, diferenciación celular e iniciación del desarrollo de las raíces en las plantas (Kumla & Suwannarach, 2014).

Para la determinación de la cantidad producida de Ácido Indol Acético por parte de microorganismos se ha desarrollado varios métodos, siendo una de los más usados el método colorimétrico, que se basa en la reacción del AIA con iones de hierro, la cual forma un quelato a pH ácido, el cambio de color a rosado indica la formación de un compuesto oxidado de AIA en presencia de cloruro de hierro, y la intensidad del color rosado supone mayor presencia de AIA producida por el microorganismo (Mayer, 1958).

2.2.5.7. Solubilización de fosfatos

El fósforo es un elemento clave y crítico en la nutrición de las plantas, tiene un papel importante en prácticamente todos sus procesos metabólicos, incluido la fotosíntesis, la transferencia de energía, biosíntesis de macromoléculas y respiración (Sharma et al., 2013). En

la mayoría de los suelos el fósforo tiene una concentración y movilidad baja comparada con los otros nutrientes, lo que limita su absorción por las raíces de las plantas (Beltrán, 2014). El fósforo inorgánico existe en suelos, principalmente, en forma complejos de mineral insoluble, encontrándose principalmente en forma de fosfatos de calcio, hierro y aluminio (Beltrán, 2014; Sharma et al., 2013). En estas condiciones, existen microorganismos que ayudan a las plantas a obtener suficiente fósforo a través del proceso de solubilización de fosfatos inorgánico, a estos microorganismos se les denomina Microorganismos Solubilizadores de Fosfatos (MSF), y se encuentran en la mayoría de los suelos, específicamente en la rizósfera, los cuales son proveídos de sustratos energéticos por parte de la planta (Beltrán, 2014), sin embargo, estudios han demostrado que los microorganismos endofíticos también pueden solubilizar estos compuestos (Glick, 2012).

El principal mecanismo microbiológico por el cual los compuestos fosfatados son solubilizados, es la disminución del pH del medio extracelular hasta valores aproximados a 2, que son necesarios para que se pueda llevar a cabo la solubilización (Beltrán, 2014; Nautiyal, 1999). Este fenómeno se origina debido a la liberación de ácidos orgánicos de bajo peso molecular por parte de los microorganismos, cuyas propiedades quelantes favorecen la formación de complejos insolubles con metales, con la consecuente liberación del fósforo (Laral et al., 2011).

Para la detección de MSF, el Instituto Nacional de Investigación en Botánica ha desarrollado el medio NBRIP el cual usa como fuente de fósforo al Fosfato tricálcico (Nautiyal, 1999). La capacidad de solubilización de fósforo por parte de cepas de bacterias y hongos, es detectada por la formación de un halo claro (un signo de solubilización) alrededor de las colonias (Sharma et al., 2013).

2.3. Definición de términos

- **Comunidad microbiana:** Una comunidad microbiana es una unión integrada de poblaciones microbianas establecidas e interactuando con una localización dada llamada hábitat (Atlas & Bartha, 1998).
- **Pasivo minero ambiental:** Es una instalación, efluente, emisión, resto o depósito de residuos producidos por operaciones mineras abandonadas o inactivas que a la fecha de vigencia de la Ley constituyen un riesgo permanente y potencial para la salud de la población, el ecosistema circundante y la propiedad (D.S. N° 059-2005-EM del 09-Dic-2005, 2006).
- **Suelo contaminado:** Es aquel suelo cuyas características químicas han sido alteradas negativamente por la presencia de sustancias químicas contaminantes depositadas 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 (MINAM, 2014).
- **Metales pesados:** Es un elemento metálico el cual es tóxico y tiene una alta densidad, gravedad específica o peso atómico, sin embargo, en el campo de la biología es referido a algún metal capaz de causar problemas a la salud o daños al ambiente (Paredes, 2013).
- **Sideróforos:** Son quelatos de hierro con baja masa molecular que actúan como agentes solubilizantes de hierro orgánico o inorgánico, bajo condiciones limitadas de este (Mani Rajkumar et al., 2010).
- **Ácido Indol acético (AIA):** Conocida también como auxina, esta induce la deformación y aumento de pelos radiculares, logrando con esto una mayor captación de nutrientes y promoviendo en consecuencia el crecimiento y rendimiento de los cultivos (Lara et al, 2011).
- **Biodisponibilidad:** Es el grado de libertad en que se encuentra un elemento o compuesto de una fuente potencial para ser capturado por un organismo (ingerido o adsorbido) (Gal & Baena, 2008).

- **Biorremediación:** Es un proceso de remediación en el cual se altera las condiciones ambientales para estimular el crecimiento de microorganismos y así remediar medios contaminados (Sánchez & Rodríguez, 2010).
- **Fitorremediación:** Es una técnica que tiene como objetivo degradar, asimilar, metabolizar o desintoxicar metales pesados, compuestos orgánicos y compuestos radioactivos por medio de la acción combinada de plantas y microorganismos para absorber, retener, degradar o transformar sustancias contaminantes a formas menos tóxicas (López et al., 2005).

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

3.1. Tipo de investigación

3.1.1. Según su propósito o aplicación

Aplicada

3.1.2. Según su naturaleza profundidad o alcance

Descriptiva

3.2. Zona de estudio

El pasivo minero Chahuapampa se encuentra ubicado al margen derecho del río Santa, en el kilómetro 41 de la carretera Huaraz-Pativilca en la comunidad campesina de Utcuyacu, distrito de Cátac, provincia de Recuay, a una altura de 3600 m.s.n.m., ver el mapa en el anexo 1.

La planta concentradora de Chahuapampa trabajó 200 toneladas diarias de minerales polimetálicos, depositando desde el año 1991, alrededor de 260 000 m³ de material tóxico (Moreno & Vizconde, 2006). De acuerdo al estudio elaborado por Rodríguez et al. (2007) los lixiviados de este pasivo minero, están clasificados como residuos muy peligrosos, ya que sobrepasan los valores permitidos por la norma alemana DIN 38414-S4, encontrándose nivel elevados de Cd, Pb, As, Cu, Fe y Zn.



Imagen 1: Pasivo minero ambiental Chahuapampa

3.3. Muestreo de plantas y suelos de rizósfera

Se colectaron muestras de dos especies de plantas con su respectivo suelo de rizósfera de zonas contaminadas por el pasivo minero ambiental Chahuapampa (tabla 4). El método de muestreo fue el no probabilístico intencional, donde se tuvo como criterio para la recolección de plantas, aquellas que presentaron buen estado de salud y presencia de flores. Las plantas fueron colocadas en bolsas herméticas estériles y se hizo el etiquetado correspondiente para su posterior transporte al laboratorio, donde se realizó el aislamiento de microorganismos endofíticos, y herborización.

Las muestras de suelos de rizósfera fueron tomados de acuerdo a la profundidad de las raíces de las plantas, y luego fueron colocadas en bolsas herméticas estériles para su posterior análisis de concentración de metales totales y aislamiento de microorganismos de suelos de rizósfera. Para la selección de muestra destinada al análisis de concentración de metales pesados, se utilizó el método del cuarteo, haciendo una mezcla entre las muestras de suelo recolectadas por cada especie, las muestras seleccionadas fueron llevadas al laboratorio de calidad ambiental de la Facultad de Ciencias del Ambiente donde se realizó el análisis respectivo.

Tabla 4: Datos generales de muestras de recolectados del pasivo minero ambiental Chahuapampa

Tipo de muestra	Código	Coordenadas (UTM)	Altitud (m.s.n.m)	Fecha y hora
Planta 1	Rel01-P	233785.32 m E	3586	08/06/2016
Suelo 1	Rel01-S	8913872.53 m S		11:00 am
Planta 2	Rel02-P	233776.00 m E	3585	08/06/2016
Suelo 2	Rel02-S	8913898.00 m S		11:15 am

3.3.1. Características generales de las muestras recolectadas

a. Suelos de rizósfera

La tabla 5 muestra las concentraciones de metales y pH de suelos rizosféricos asociados a plantas recolectadas del pasivo minero Chahuapampa. Los resultados originales se muestran en el anexo 3.

Tabla 5: Concentración de metales y pH en suelos de rizósfera



Parámetro	Unidad	Código	
		Rel01-S	Rel02-S
pH (en laboratorio)	Unidad de pH	4.04	3.03
Aluminio total	mg/kg	261.60	7848.57
Arsénico total	mg/kg	<0.50	<0.50
Cadmio total	mg/kg	452.83	1.67
Cobre total	mg/kg	40.79	192.58
Hierro total	mg/kg	934.63	2550.46
Mercurio total	mg/kg	<25	<25
Níquel total	mg/kg	8.85	6.83
Plomo total	mg/kg	132.10	151.58
Zinc total	mg/kg	747.66	48.61

El pH de las muestras de suelo recolectadas muestra valores bajos, siendo una condición donde los metales presentes están en forma soluble, por consiguiente con mayor grado de peligrosidad para las plantas y microorganismos. Asimismo, se observa que la concentraciones de Al, Fe, Cd y Pb son elevadas, sobrepasando, en el caso de Cd (muestra Rel01-S), en 20 veces el valor permitido por el Estándar de calidad Ambiental para suelos industriales (Decreto Supremo N°002-2013-MINAM, 2013).

b. Plantas

La tabla 6 muestra las características taxonómicas de plantas recolectadas del pasivo minero Chahuapampa-Utcuyacu. Esta identificación fue realizada en el herbario David Smith de la Facultad de Ciencias – UNASAM por el Dr. Percy Olivera Gonzales.

Tabla 6: Identificación taxonómicas de plantas recolectadas y sus principales características

Nombre científico	Código	Características	Fotografía
<i>Juncus imbricatus</i>	Rel01-P	Perteneciente al grupo Juncaceae, habita suelos ácidos entre los 3000 a 4500 m.s.n.m.	
<i>Scirpus rigidus</i>	Rel02-P	Perteneciente al grupo Cyperaceae, habita humedales altoandinos entre los 3500 a 4200 m.s.n.m.	

3.4. Aislamiento de microorganismos

3.4.1. Aislamiento de microorganismos endofíticos

Se utilizó la metodología propuesta por Tamariz et al. (2016). Las muestras de plantas colectas fueron lavadas con agua potable, jabón líquido y cepillo, con el fin de eliminar restos de suelo e impurezas, posteriormente se realizó cortes del tallo y de raíces de 1 a 2 cm de largo, obteniendo 10 fragmentos de tallo y 10 fragmentos de raíz por cada planta, los cuales fueron desinfectados por inmersión en agitación manual de 10 minutos en solución de HgCl₂ al 0.1 % seguido por 3 lavados por 5 minutos con agua estéril.

Para descartar falsos positivos de endofíticos, los fragmentos de tallos y raíces fueron sumergieron en 3 ml de Caldo Sabouraud (CS) por 60 segundos, luego se procedió a realizar un corte diagonal de los fragmentos para exponer la parte interna de las muestras, una parte se utilizó para aislar hongos y otra para aislar bacterias. Para el aislamiento de hongos, las muestras fueron sembradas en medio de cultivo Agar Sabouraud (AS) suplementado con los antibióticos estreptomina a 50 µl/ml y tetraciclina a 50 µl/ml, y para el caso de bacterias se utilizó el medio Agar Tripticasa de Soya Agar (TSA) suplementado con Fluconazol a 100 µl/ml. Culminada la siembra, las muestras fueron puestas a incubar por 7 días a 28°C.

La selección de las cepas se realizó por observación directa, tomando en consideración: la morfología, el color y el aspecto. Las cepas seleccionadas fueron sembradas en medio TSA para el caso de bacterias y AS para el caso de hongos, este procedimiento se repitió hasta que consiguió cepas puras, las que fueron puestas a 4°C para su preservación y a -70°C con 30% de glicerol para su crio preservación.

3.4.2. Aislamiento de microorganismos de rizósfera

Para el aislamiento de microorganismos de suelos de rizosfera se utilizó la metodología propuesta por Tamariz et al. (2014) con modificaciones. Se tomó 1 g de cada muestra y se suspendió con 9 ml de

agua salina estéril al 0.85%, en tubos de 160 x 60 mm, luego se hizo la agitación manual de los tubos por 5 minutos. A partir de las suspensiones se realizaron diluciones seriadas desde 10^{-1} hasta 10^{-5} . Posteriormente, se tomaron 200 μ L de las soluciones 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} para ser inoculados por triplicado en 2 medios de cultivo para el aislamiento de bacterias y hongos. El medio de cultivo para el aislamiento de bacterias fue el TSA suplementado con Fluconazol 100 μ l/ml, y para el aislamiento de hongos se utilizó el medio AS suplementado con los antibióticos estreptomina 50 μ l/ml y tetraciclina 50 μ l/ml. Los medios sembrados fueron puestos a incubación por 7 días a 28 °C.

El aislamiento de las cepas se realizó por observación directa, tomando en consideración: la morfología, el color y el aspecto. Luego de diferenciar las cepas, estas fueron sembradas en medio TSA para el caso de bacterias y el medio AS para el caso de hongos, este procedimiento se repitió hasta conseguir cepas puras, las que fueron puestas a 4°C para su preservación y a -70°C con 30% de glicerol para su crio preservación.

3.4.3. Prueba de detección de sideróforos para la selección preliminar de microorganismos

La selección preliminar de microorganismos potenciales para la biorremediación se realizó a través de la prueba de sideróforos, teniendo en cuenta que la producción de estas sustancias orgánicas está relacionada con la mejora de la biodisponibilidad, fitoextracción y tolerancia a metales pesados. Se utilizó la metodología modificada propuesto por Milagres et al. (1999). Fue utilizado el FeCl_3 para el ensayo agar CAS- Fe y AlCl_3 para el ensayo agar CAS-Al, en esta prueba se usaron placas Petri pequeñas (5 cm de diámetro) las que fueron preparadas con 10 ml de TSA (en caso de bacterias) y AS (en caso de hongos). Después de solidificado los medios, estos fueron cortados en mitades, y una de las partes fue reemplazado por con 5 ml de agar CAS.

3.4.4. Preparación de inóculo y siembra de bacterias

Las bacterias endofíticas y de rizósfera fueron cultivadas en medio TSA por 24 horas a 28 °C. Para la siembra se midió una densidad óptica entre 0.08-0.10 a 620 nm de longitud de onda en espectrofotómetro y se sembraron utilizando discos de papel filtro estéril, como control se usó discos de papel filtro con agua estéril (Tamariz, 2014). Se hicieron 2 repeticiones por bacteria en los medios CAS, los medios sembrados fueron puestos a incubar por 3 días a 28 °C.

3.4.5. Preparación de inóculo y siembra de Hongos

Los hongos endofíticos y de rizósfera fueron cultivadas en medio AS por 5 días a 28 °C. La siembra se hizo con discos de micelio de 5 mm de diámetro, como control se usaron discos de agar AS. Los medios sembrados fueron puestos a incubar por 7 días a 28 °C.

En ambos casos la formación de un halo amarillo o rosado alrededor de las colonias, indicó la producción de sideróforos. Se midió el diámetro del halo formado y el diámetro de las colonias y se calculó el Índice CAS-Fe y CAS-Al, dividiendo el diámetro del halo con el diámetro de la colonia. Los valores mayores a 1 fueron considerados como significativos.

3.4.6. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de cadmio y plomo

En la siguiente prueba, las cepas microbianas capaces de producir sideróforos seleccionadas en la prueba anterior, fueron evaluadas por su capacidad de resistencia a diferentes concentraciones de sales de Cd y Pb a través de la Concentración Mínima Inhibitoria.

3.4.7. Bacterias

La Concentración Mínima Inhibitoria de cadmio y plomo en bacterias fue determinada a través de la metodología modificada de Bitton et al. (1994). En primera instancia se preparó soluciones stock de sales de Cd (II) y Pb (II) ($\text{CdCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) a 1M las cuales fueron

esterilizada por filtración, seguidamente se añadió, al medio líquido esterilizado Luria-Bertani (LB), una cantidad requerida de solución para obtener una concentración deseada de metal (1mM a 15mM). El medio con metal fue colocado en microplacas donde se sembró 10 µl de inóculos frescos de bacterias seleccionadas (24 horas, 0.08-0.1 de densidad óptica), todas las pruebas se hicieron por triplicado. Se sembró en medio sin metal, el cual sirvió como blanco de prueba. Las microplacas fueron puestas a incubar por 3 días a 28°C selladas con parafilm. La evaluación se realizó de manera visual, corroborando con la prueba de tetrazolium, teniendo en consideración la concentración de metal donde fue inhibido totalmente el crecimiento de las bacterias.

3.4.8. Hongos

La Concentración Mínima Inhibitoria de cadmio y plomo en hongos, fue determinada a través de la metodología propuesta por Ezzouhri et al. (2009). Como en caso de las bacterias primero se preparó una solución stock de sales de Cd (II) y Pb (II), enseguida se añadió, al medio esterilizado Agar Dextrosa Papa (PDA), una cantidad requerida de solución para obtener una concentración deseada (10 mM- 90 mM). El medio con metal fue colocado en placas donde se sembró inóculos de 2 µl de solución de esporas de los hongos seleccionados. Todas las pruebas se hicieron por duplicado, Las placas fueron puestas a incubar por 7 días a 28°C selladas con parafilm. La evaluación se realizó de manera visual, teniendo en consideración la concentración de metal donde fue inhibido totalmente el crecimiento de los hongos.

3.5. Prueba de solubilización de carbonato de cadmio y plomo

3.5.1. Bacterias

La capacidad solubilizar carbonato de cadmio y plomo por parte de las bacterias seleccionadas, se realizó a través de la metodología modificada propuesta por Jiang et al. (2008). Las bacterias fueron cultivadas en medio TSA por 24 horas a 28 °C y se preparó un inóculo con una densidad óptica de 0.08-0.1 a 620 nm. El inóculo se sembró en medio sales mínimas de sacarosa bajas en fosfato (SLP) (1% sacarosa,

0.1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.05% K_2HPO_4 , 0.05% MgSO_4 , 0.01% NaCl , 0.05% extracto de levadura, pH 7.2) suplementado con CdCO_3 al 0.1% o PbCO_3 al 0.3%, utilizando discos de papel filtro estéril. Como control se usaron discos de papel filtro con agua estéril. Se hicieron 2 repeticiones por bacteria, los medios sembrados fueron puestos a incubar por 72 horas a 28 °C.

3.5.2. Hongos

La capacidad solubilizar carbonato de cadmio y plomo por parte de los hongos seleccionados, se realizó a través de la metodología propuesta por Kumla & Suwannarach (2014). Se preparó una solución de esporas utilizando agar semisólido compuesto por 0,05% de agar, 30% de glicerol y 0,05% de Tween80 de cada hongo y se sembró 2 μl de esta solución en medio MMN (0.005% CaCl_2 , 0.0025% NaCl , 0.015% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.0012% $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.0001% tiamina, 1% extracto de malta, 0.05% KH_2PO_4 , 0.25% glucosa, 1.5% agar, pH 7.0), suplementado con CdCO_3 al 0.1% o PbCO_3 al 0.3%, se hicieron 2 repeticiones por Hongo, los medios sembrados fueron puestos a incubar por 5 días a 28 °C.

En ambos casos la formación de un halo transparente alrededor de las colonias, indicó la capacidad de solubilizar carbonado de Pb o Cd. Se midió el diámetro del halo formado y el diámetro de las colonias y se calculó el índice de solubilización de carbonato, dividiendo el diámetro del halo con el diámetro de la colonia.

3.5.3. Prueba de solubilización de fosfatos

Para la prueba semicualitativa de solubilización de fosfato de los microorganismos seleccionados, se realizó siguiendo la metodología propuesta por Nautiyal (1999), el cual se utilizó el medio NBRIP (1% glucosa, 0.5% $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, 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 y 0.01 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) a pH 7, como medio revelador

3.5.4. Preparación de inóculo y siembra de bacterias

Las bacterias endofíticas y de rizósfera fueron cultivadas en medio TSA por 24 horas a 28 °C. Para la siembra se midió una densidad óptica entre 0.08-0.1 a 620 nm de longitud de onda en espectrofotómetro y se sembró utilizando discos de papel filtro estéril, como control se usaron discos de papel filtro con agua estéril. Se hicieron 2 repeticiones por bacteria, los medios sembrados fueron puestos a incubar por 72 horas a 28 °C.

3.5.5. Preparación de inóculo y siembra de Hongos

Para cada hongo, se preparó una solución de esporas, luego se inoculó 2 µl de la suspensión en las placas con NBRIP. Se hicieron 2 repeticiones por cada hongo, los medios inoculados fueron puestos a incubar por 7 días a 28°C.

En ambos casos la formación de un halo transparente alrededor de las colonias indicó que el microorganismo tiene capacidad de solubilizar fosfatos. Se midió el diámetro del halo formado y el diámetro de las colonias y se calculó el Índice de Solubilización de Fosfatos (ISP), dividiendo el diámetro del halo con el diámetro de la colonia.

3.6. Prueba de producción de Ácido Indol Acético (AIA)

3.6.1. Bacterias

La prueba de producción de AIA de las bacterias seleccionadas se realizó a través de metodología modificada propuesta por Jiang et al. (2008). Las bacterias fueron sembradas en microtubos de 1.5 ml con 1 ml de medio Sacarosa mínimas en sal (SMS) (1% sacarosa, 0.1% (NH₄)₂SO₄, 0.2% K₂HPO₄ 0.05% MgSO₄, 0.01% NaCl, 0.05% extracto de levadura, 0.05% CaCO₃, pH 7.2) suplementado con L-Tryptophan a una concentración final de 2 mg/ml, y fueron incubadas por 20 horas a 24°C. Después de la incubación las células bacterianas fueron separadas del sobrenadante por centrifugación a 1300 rpm durante 2 minutos, luego 100 µl de la suspensión fue colocada en una microplaca donde fue

mezclado con 100 μ l de reactivo de Salkowsky (10ml de HClO al 35%+ 200 μ l FeCl₃ al 0.5 M). La microplaca se puso a incubar en oscuridad durante 20 minutos.

3.6.2. Hongos

La prueba de producción de AIA en Hongos seleccionados se realizó a través de la metodología propuesta por Kumla & Suwannarach (2014). Se preparó solución esporas de hongos diluido en agua estéril a una densidad óptica entre 0.08-0.1 a 620 nm en espectrofotómetro, luego se añadió 100 μ l de la solución a matraces con 10 ml de medio Melin-Norkans (MMN) (0.005% CaCl₂, 0.0025% NaCl, 0.015% MgSO₄.7H₂O, 0.0012% FeCl₃.6H₂O, 0.0001% tiamina, 1% extracto de malta, 0.05% KH₂PO₄, 0.25% glucosa, 1.5% agar, pH 6.0) suplementado con L-Tryptophan a una concentración final de 2 mg/ml, y fueron incubadas con rotación de 150 rpm por 5 días a 24°C. Después de la incubación las células de hongos fueron separadas del sobrenadante por centrifugación a 1300 rpm durante 2 minutos, inmediatamente 100 μ l de la suspensión fue colocada en una microplaca donde fue mezclado con 100 μ l de reactivo de Salkowsky. La microplaca se puso a incubar en oscuridad durante 20 minutos.

3.6.3. Determinación de producción de AIA

Después de terminado el tiempo de incubación, se midieron las absorbancia a una longitud de onda de 530 nm en espectrofotómetro. La concentración de AIA en cada muestra se determinó a partir de la ecuación obtenida de la curva de calibración estándar de AIA (Anexo 2), la cual fue elaborada a partir de datos de absorbancias a 530nm obtenidos por reacciones de 100 μ l reactivo de Salkowsky y 100 μ l de soluciones con concentraciones conocidas de AIA comercial. Las concentraciones con las que se elaboró la curva de calibración fueron 20, 40, 60 y 80 μ g/ml, las que se obtuvieron a partir de la dilución de una solución stock de AIA de 2 mg/ml y medio de cultivo utilizado para la incubación de los microorganismos.

3.7. Caracterización morfológica

3.7.1. Bacterias

Las bacterias se cultivaron en caldo Tripticasa soya (TSB) a 28°C por 20 horas y se hicieron pruebas bioquímicas.

3.7.2. Hongos

Se prepararon suspensiones de esporas y se inoculó 2 µl de la suspensión en placas Petri de 100 mm con Agar Czapek autolisado de levadura (CYA), Agar extracto de malta (MEA) y Agar extracto de levadura sacarosa (YES). Las placas de YES y MEA, fueron conservadas a 24°C y CYA a 30°C durante 7 días. Se utilizaron otros medios alternativos como: Agar Sabouraud(AS) y Agar papa dextrosa (PDA), incubadas a 24°C por 7 días.

3.8. Caracterización molecular

3.8.1. Extracción de ADN, amplificación y secuenciamiento del 16S del ADNr de bacterias

Para la extracción de ADN se utilizó 1 ml de cultivo fresco en medio TSB incubadas a 28 °C durante 24 horas, se centrifugó en microtubos de 1,5 ml a 1300 rpm por 2 minutos. El ADN genómico contenido en el pellet se extrajo con el Kit AxyPrep Bacterial Genomic Miniprep (Axigen) de acuerdo al protocolo del fabricante.

La amplificación mediante PCR se realizó mediante la metodología descrita por Tamariz et al. (2014). Se utilizaron los primers 27f y 1492r. La amplificación fue confirmada mediante electroforesis de ADN. El secuenciamiento se realizó en la empresa MacroGen Korea Inc. utilizando los primers 518F y 800R.

3.8.2. Análisis de las secuencias e identificación taxonómica

La limpieza y ensamblaje del secuenciamiento se realizó mediante el programa CodonCode Aligner 7.1.2, Las secuencias consenso

obtenidas, fueron utilizadas para la determinación taxonómica mediante BLASTN del NCBI (The National Center for Biotechnology Information U. S). El análisis filogenético usando secuencias obtenidas del Genbank y las obtenidas en el trabajo se realizó en el software MEGA 6 utilizando los métodos de Neighbor-Joinnig con 1000 y Kimura 2 parámetros.

3.8.3. Extracción de ADN, amplificación y secuenciamiento del ITS del ADNr de hongos

Los hongos se cultivaron en placas con medio AS por 5 días a 28°C, luego se recuperó el micelio en microtubos de 2 ml. El pellet conteniendo el micelio fue utilizado para la extracción del ADN total a través del Kit AxyPrep Multisource Genomic Miniprep (Axigen) de acuerdo al protocolo del fabricante.

La amplificación mediante PCR y el secuenciamiento se realizó en el Canadian Center DNA Barcoding (CCBD), donde se amplificó la región ITS del ADN ribosomal. Se utilizó los primers ITS5-ITS4 o ITS1-ITS4 y el protocolo descrito por CCBD. La amplificación se verificó mediante electroforesis de ADN.

3.8.4. Análisis de las secuencias e identificación taxonómica

Se realizó utilizando el mismo protocolo descrito para bacterias, teniendo en consideración el gen ITS ADNr.

3.9. Diagrama general del trabajo

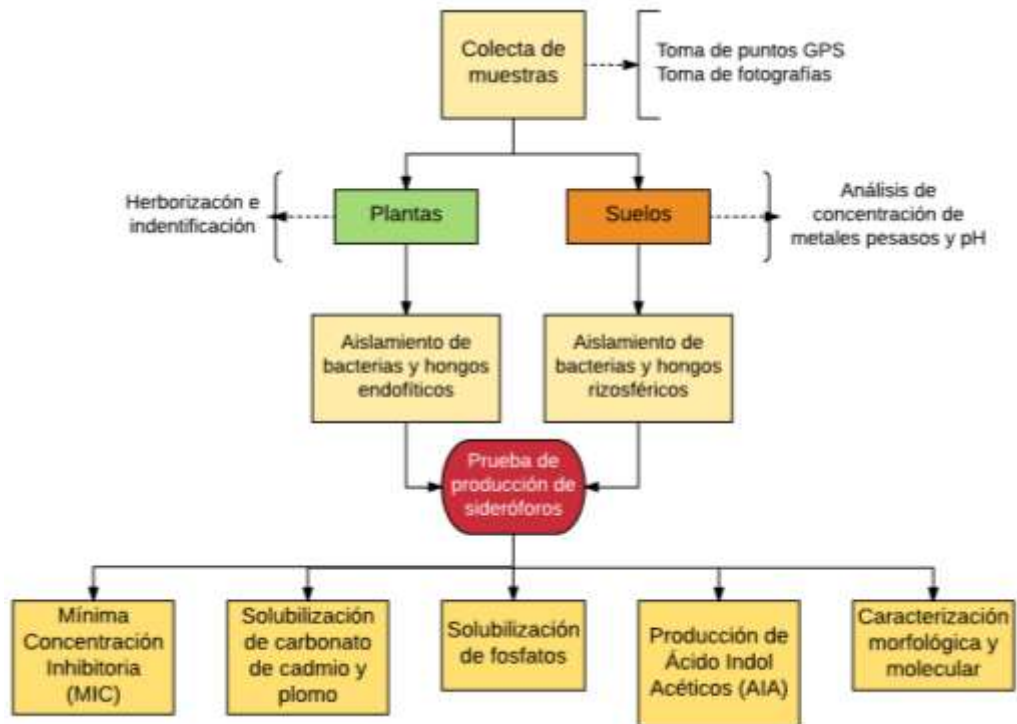


Figura 3: Diagrama general del trabajo

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. Microorganismos endofíticos y de rizósfera aislados

Se aisló en total 63 cepas de microorganismos entre hongos y bacterias, endofíticas y rizosféricas, de las cuales 28 cepas estuvieron asociadas a *Juncus imbricatus* y 35 a *Scirpus rigidus*. La tabla 7 presenta el resumen de los microorganismos aislados por cada muestra de plantas y suelos. Cabe mencionar, que solo se logró aislar microorganismos endofíticos de la parte radicular de las plantas estudiadas.

Tabla 7: Número de cepas aisladas por muestra

Microorganismos	Número de cepas aisladas			
	<i>Juncus imbricatus</i>		<i>Scirpus rigidus</i>	
	Endofíticos	Rizosféricos	Endofíticos	Rizosféricos
Bacterias	5	7	9	11
Hongos	11	5	9	6
Total	16	12	18	17

Los resultados de aislamiento muestran la existencia de una comunidad de microorganismos conformados por bacterias y hongos, dentro y fuera de los tejidos de las plantas, que habitan los suelos contaminados por el relave minero Chahupampa, que podrían tener roles importantes en el proceso de resistencia, adquisición de nutrientes y absorción de metales pesados en las plantas asociadas (Li et al., 2012).

4.2. Prueba de producción de sideróforos

4.2.1. Bacterias

Del total de bacterias aisladas, 5 cepas rizosféricas presentaron la capacidad de producir quelatos de Fe y Al, ninguna cepa de bacteria endofítica mostró resultados positivos en esta prueba. En la tabla 8 se muestran los resultados de los índices CAS-Fe y CAS-Al de las cepas bacterianas positivas. Los resultados de índices CAS-Fe, indican que las mejores cepas fueron: BRU10 (1.78 ± 0.20) y BRU11 (1.87 ± 0.17), las que no muestran diferencias significativas entre ellas. En caso de CAS-Al, las cepas con mayores índices fueron: BRU18 (1.92 ± 0.16) y BRU16 (1.98 ± 0.21).

Yamaji, Nagata, et al., (2016), evaluó la capacidad de producción de sideróforos en bacterias aisladas de suelos forestales contaminados con metales pesados en Japón, en el que obtuvo como índices CAS-Fe y CAS-Al máximos de 4.3 y 3.8 respectivamente, los cuales fueron considerados como indicadores de producción alta de sideróforos, en un tiempo de evaluación de 7 días. Lo anterior pueden sugerir que las cepas de bacterias evaluadas en el presente estudio, presentaron una alta producción de quelantes, ya que sus índices de CAS-Fe CAS-Al fueron significativos evaluados a solo 3 días.

Por otro lado se puede observar que las cepas BRU10 y BRU11 presentaron índices similares en la prueba CAS Fe y Al, lo que podría inducir que se los sideróforos producidos por estas cepas, también son capaces de quelar Al, sin embargo, las cepas BR14, BRU16 Y BRU18 solo presentaron resultados significativos en la prueba CAS-Al, pudiendo indicar, que estas cepas producen quelatos específicos de Al, diferente a los sideróforos (Auger et al., 2013) o una mayor afinidad del sideróforo al Al (Ahmed & Holmström, 2014).

Tabla 8: Índice de producción de sideróforos de hierro y aluminio en bacterias

Cepa	Tipo	CAS-Fe	CAS-Al
BRU10	Rizosférica	1.78 ± 0.20 ^a	1.83 ± 0.17 ^{ab}
BRU11	Rizosférica	1.87 ± 0.17 ^a	1.69 ± 0.13 ^b
BRU14	Rizosférica	1.03 ± 0.00 ^b	1.32 ± 0.08 ^c
BRU16	Rizosférica	1.02 ± 0.00 ^b	1.98 ± 0.21 ^a
BRU18	Rizosférica	1.03 ± 0.00 ^b	1.92 ± 0.16 ^a

Nota: Los valores son promedio de 10 repeticiones de la división entre la medida del diámetro del halo de quelación y la medida del diámetro de la bacteria, ± desviación estándar. Promedios con diferente letra son significativamente diferentes (Prueba Duncan, $p < 0.05$).

En las imágenes 3 y 4 se muestran algunos resultados de la prueba en placa CAS-Fe y CAS-Al en bacterias, el cambio de color de azul a amarillo en el medio CAS indicó la quelación de Fe o Al.

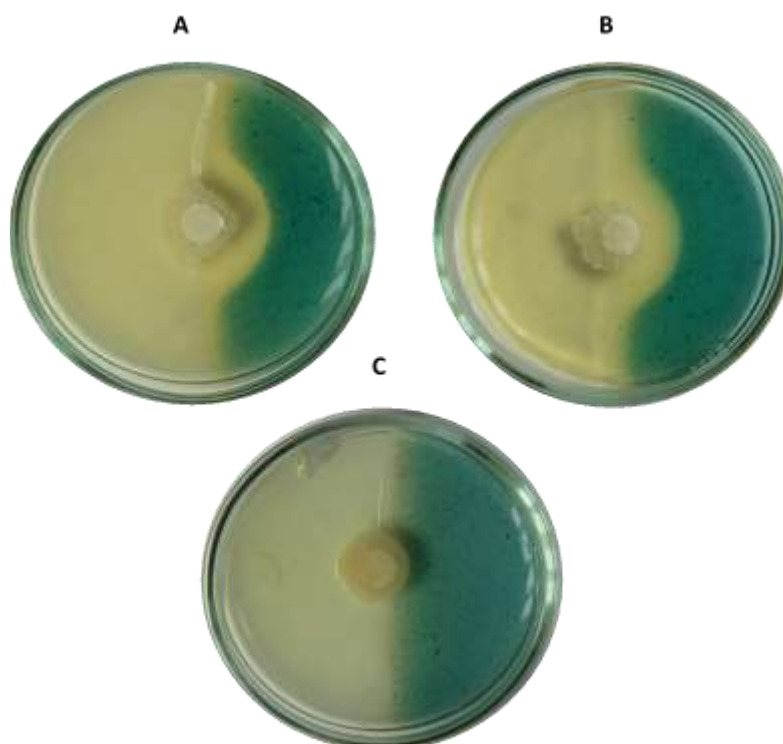


Imagen 2: Prueba CAS-Fe en bacterias, A: corresponde a la cepa BRU10, B: corresponde a la cepa BRU11, C: corresponde a la cepa BRU17 la cual no mostró resultados positivos

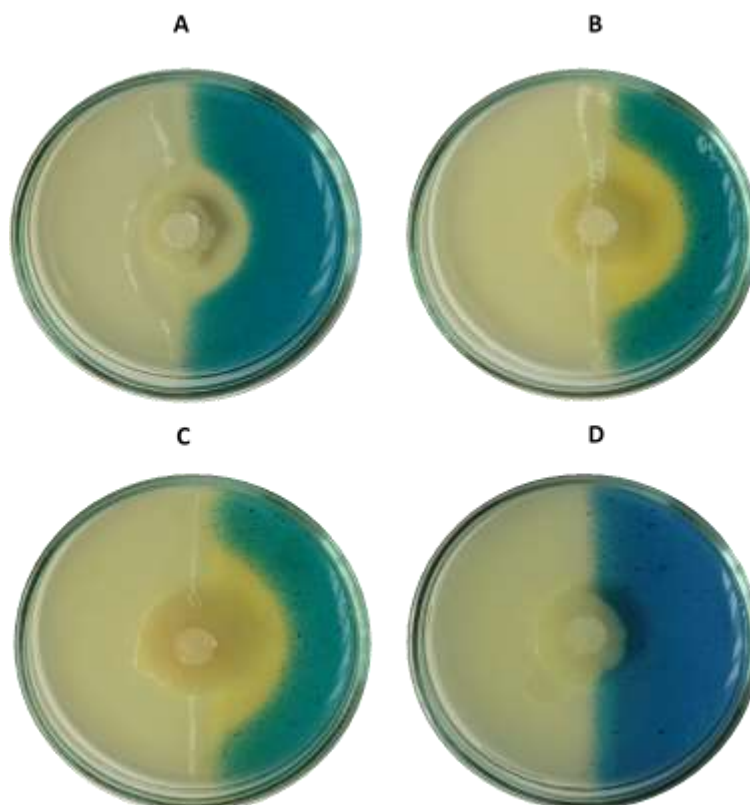


Imagen 3: Prueba CAS-Al en bacterias, A: corresponde a la cepa BRU11, B: corresponde la cepa BRU16, C: corresponde a la cepa BRU18, D: corresponde a la cepa BRU01 la cual no mostró resultados positivos

4.2.2.Hongos

Del total de hongos aislados, 3 cepas rizosféricas y 3 endofíticas presentaron la capacidad de producir quelatos de Fe y Al. En la tabla 9 se presentan los resultados de los índices CAS-Fe y CAS-Al de las cepas de hongos positivas. Los resultados de índices CAS-Fe, indican que las mejores cepas fueron: HEU11 (2.23 ± 0.08), HEU17 (2.23 ± 0.08) y HRU11 (2.17 ± 0.08), las que no muestran diferencias significativas entre ellas. En caso de CAS-Al, las cepas con mayores índices fueron: HEU11 (2.17 ± 0.08), HEU17 (2.32 ± 0.14). Los resultados muestran mayores valores de índices CAS-Fe y CAS-Al en cepas de hongos comparado con los resultados con las cepas bacterianas, lo que concuerda con los resultados obtenidos por Hussein & Joo (2012), quien evaluó la capacidad de producir sideróforos en cepas de bacterias y hongos aislados de suelos contaminados y no contaminados con

metales pesados en Corea de Sur, en el que obtuvo mayores producciones de sideróforos en las cepas fúngicas rizosféricas *Penicillium sp.*, *Trichoderma sp.* y *Beauveria bassiana*.

Como en caso de las cepas bacterianas BR14, BRU16 Y BRU18 , la cepa HRU02 solo presento resultados significativos en la prueba CAS-Al, lo que puede significar la producción de quelantes específicos de aluminio por parte de esta cepa.

Tabla 9: índice de producción de sideróforos de hierro y aluminio en hongos

Cepa	Tipo	CAS-Fe	CAS-Al
HEU01	Endofítica	1.22 ± 0.06 ^c	1.23 ± 0.06 ^e
HEU11	Endofítica	2.23 ± 0.08 ^a	2.17 ± 0.08 ^b
HEU17	Endofítica	2.23 ± 0.08 ^a	2.32 ± 0.14 ^a
HRU02	Rizosférica	1.02 ± 0.08 ^d	1.65 ± 0.11 ^d
HRU07	Rizosférica	1.58 ± 0.32 ^b	1.99 ± 0.09 ^c
HRU11	Rizosférica	2.17 ± 0.08 ^a	2.23 ± 0.08 ^{ab}

Nota: Los valores son promedio de 10 repeticiones de la división entre la medida del diámetro del halo de quelación y la medida del diámetro del hongo, ± desviación estándar. Promedios con diferente letra son significativamente diferentes (Prueba Duncan, p<0.05).

En las imágenes 4 y 5 se muestran algunos resultados de la prueba en placa CAS-Fe y CAS-Al en hongos, en los que se observa un cambio de color de azul a rosado o púrpura en el medio CAS, que según Hussein & Joo (2012) indica la quelación de Fe o Al. La variación del cambio de color (Amarillo en bacterias, rosado o púrpura en hongos) puede deberse a las diferentes estructuras y tipos de sideróforos secretados por los microorganismos (Milagres et al., 1999).

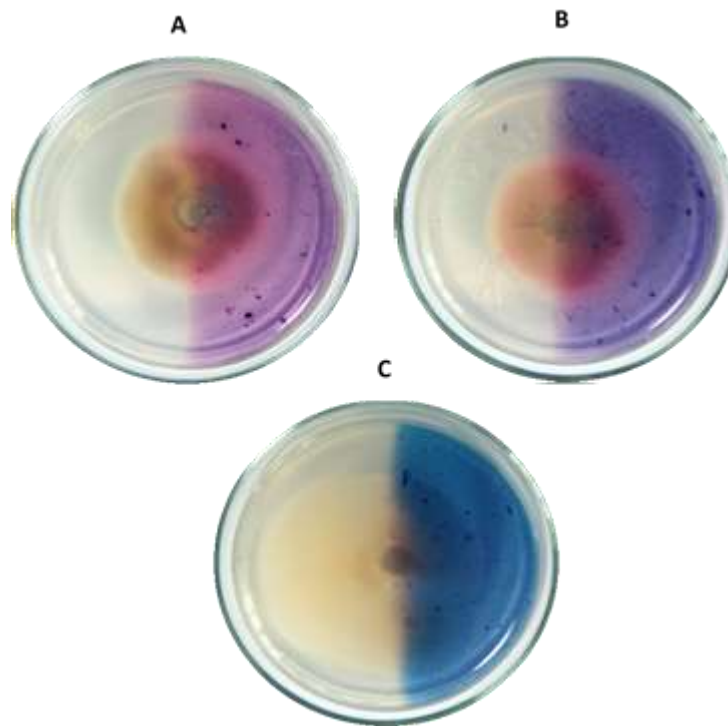


Imagen 4: Prueba CAS-Fe en hongos, A: corresponde a la cepa HEU11, B: corresponde a la cepa HEU17, C: corresponde a la cepa HEU02 la cual no mostró resultados positivos

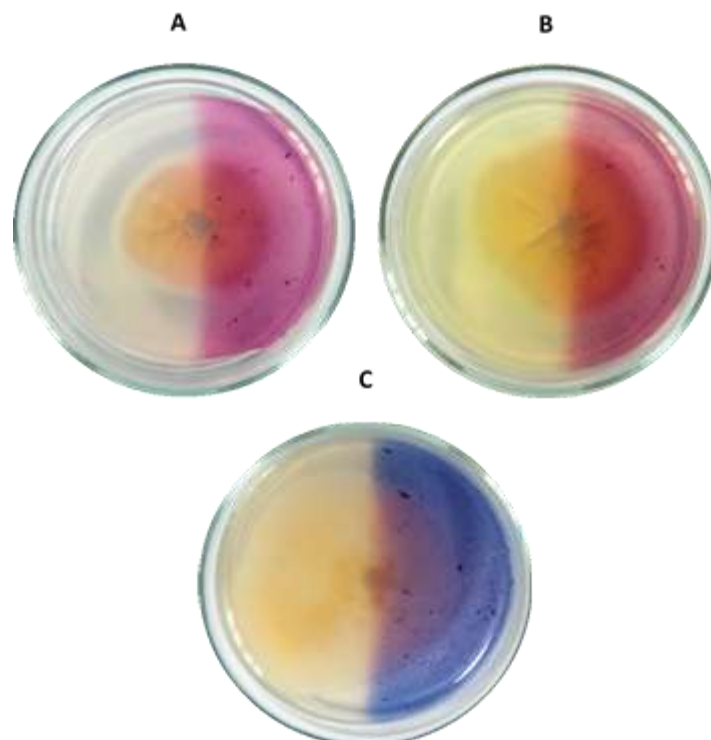


Imagen 5: Prueba CAS-Al en hongos, A: corresponde a la cepa HEU11, B: corresponde a la cepa HRU07, C: corresponde a la cepa HEU02 la cual no mostró resultados positivos

Los resultados muestran la existencia de bacterias y hongos, que habitan suelos contaminados con metales asociados a plantas, capaces de producir sideróforos y quelantes de Al. En este sentido varias investigaciones han resaltado la importancia de la producción de sideróforos microbianos en procesos de tolerancias a metales pesados, suministro de nutrientes y mejora de la biodisponibilidad de metales.

Rajkumar et al. (2012) señala que la síntesis de sideróforos disminuye los efectos tóxicos de metales en bacterias, tal es el caso de *Pseudomonas aeruginosa* que produce los sideróforos pyoverdine y pyochelin los que disminuyen la toxicidad de Al, Co, Cu, Ni, Pb y Zn. Asimismo, Seneviratnen (2015) señala que los sideróforos participan en la reducción del estrés oxidativo provocado por metales en las plantas, atenuando los efectos de la peroxidación lipídica (reducción de clorofila y carotenoides) y mejorando la resistencia y crecimiento de plantas en medios contaminados con metales pesados.

A condiciones con niveles altos de metales pesados, las plantas sufren la destrucción de la enzima reductasa férrica responsable de la absorción de hierro, la que genera una temprana clorosis en las hojas. La inoculación de plantas con bacterias productoras de sideróforos ha mostrado prevenir la deficiencia de hierro incluso bajo condiciones de contaminación con metales pesados. Por ejemplo, la inoculación de *Pseudomonas sp.*, productoras de sideróforos, en *Vigna radiate* evidenció una reducción de síntomas de clorosis y un incremento de niveles de clorofila (Seneviratne et al., 2015).

Los sideróforos microbianos también han sido reportados como responsables de la regulación y generación de hormonas de crecimiento de plantas bajo estrés de metales, ya que a través del proceso de quelación, se unen a metales tóxicos, evitando que los metales inhiban la síntesis de fitohormonas (Ying Ma et al., 2016). Por otro lado, los sideróforos producidos por PGPB también protegen a la planta de patógenos microbianos a través de la quelación de Fe en la rizósfera, consecuentemente provocando la disminución su disponibilidad para los patógenos (Ma et al., 2011).

De igual manera uno de las funciones más estudiadas de los sideróforos, es la de aumentar la biodisponibilidad de metales en el suelo y

así mejorar su absorción por las plantas. Sin embargo, existen algunos estudios que contradicen lo anterior, mencionando que la presencia de sideróforos, producido por microorganismos, reduce la absorción de metales por parte de las plantas, tal es el caso del estudio de Tank & Saraf (2009) quienes observaron que la inoculación con *Pseudomonas* productoras de sideróforos, resistentes a níquel, redujo la absorción de Ni y aumentó el crecimiento de plantas de Garbanzo. Otros estudios también han mostrado que las bacterias productoras de sideróforos no siempre conducen a un incremento en la captura de metal en las plantas, lo que puede ser explicado por las diferencias en la habilidad de plantas de absorber metales pesados, el cual a su vez depende de la biodisponibilidad del metal, tipo de plantas y su habilidad de transportar metales de las raíces a los brotes (M. Rajkumar et al., 2012).

Teniendo en cuenta los beneficios que tienen los sideróforos microbianos en proceso de tolerancia y acumulación de metales en plantas. Se evidencia que las cepas rizosféricas y endofíticas de bacterias y hongos productoras de sideróforos, aisladas de suelos y plantas del pasivo minero ambiental Utcuyacu, tienen un rol importante en el crecimiento y resistencia de las especies *Juncus imbricatus* y *Scirpus rigidus*, Por lo tanto, estas cepas son candidatas a futuros proyectos de investigación más específicas de cuantificación de producción de sideróforos y prueba de influencia de estos microorganismo en el crecimiento y acumulación de metales pesados en plantas para la mejora de procesos de fitorremediación de suelos y aguas.

4.3. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de cadmio y plomo

4.3.1. Bacterias

El CMI es la menor concentración de un metal que inhibe el crecimiento de un microorganismo por completo. Los valores de CMIs de cadmio y plomo en las 5 bacterias seleccionadas en la prueba de sideróforos, se muestran en la tabla 10. El *patrón* de crecimiento de las cepas estudiadas sugiere el desarrollo de una alta tolerancia y adaptación a concentraciones altas de metales pesados. Los resultados muestran que

las cepas bacterianas tuvieron una mayor tolerancia a plomo comparado con el cadmio.

Tabla 10: Concentraciones Mínimas Inhibitorias de cadmio y plomo en bacterias

Cepa	CMI (mM)	
	Cd	Pb
BRU10	-	7
BRU11	2	7
BRU14	-	7
BRU16	3	7
BRU18	-	8

Las cepas con mayor CMI de cadmio fueron BRU16 (3 mM) y BRU18 (2 mM). En este sentido Ying Ma et al. (2015) reportó valores cercanos (1.4 y 2 mM) en cepas de *Bacillus sp.* aislados de plantas que habitan suelos afectados por la explotación minera de Zn/Pb, en la ciudad de Chunan, China. Sin embargo, se han encontradas bacterias con mayor resistencia a Cd, por ejemplo He et al. (2013) reportó un valor de CMI de 7mM en *Rahnella sp.* aislada de *Polygonum pubescens* que habita suelos contaminados cerca de una fábrica de galvanoplastia en China, asimismo, Jiang et al. (2008) estudió la resistencia de *Burkholderia sp* aislada de un campo contaminado en Zhejiang, China, encontrando una máximo de tolerancia a Cd de 9.12 mM.

Las cepas BRU10, BRU14 y BRU18 no mostraron crecimiento a ninguna concentración evaluada, lo que significa que el CMI de cadmio en estas cepas está por debajo de 1 mM.

Con respecto a plomo, la cepa con mayor resistencia fue BRU18 (8 mM), seguida por las cepas BRU10, BRU11, BRU14 Y BRU16 que presentaron un mismo grado de resistencia (7 mM), Los resultados de CMIs son mayores a los obtenidos por los estudios de He et al. (2013) y Jiang et al. (2008) citados anteriormente, donde encontraron CMIs de 5.7 y 4.6 mM respectivamente, lo que sugiere una alta resistencia a Pb por parte de las cepas bacterianas estudiadas.

4.3.2. Hongos

En la tabla 11 se muestran los valores de CMI de cadmio y plomo en los 6 hongos seleccionados en la prueba de sideróforos. Los resultados muestran CMI muchos mayores a los obtenidos por las cepas bacterianas, lo que puede ser explicado a su mayor capacidad de producir sideróforos y el desarrollo de otras estrategias de adaptación y tolerancia. Por otro lado, se observa que los hongos estudiados son mucho más resistentes a Pb que a Cd.

Tabla 11: Concentraciones Mínimas Inhibitorias de cadmio y plomo en hongos

Cepa	CMI (mM)	
	Cd	Pb
HEU01	7	61
HEU11	11	71
HEU17	11	71
HRU02	7	70
HRU07	7	15
HRU11	11	71

El Cd es muy tóxico incluso a muy bajas concentraciones (Ahemad, 2014), las cepas de hongos con mayores valores de MIC en Cd fueron: HEU11, HEU17 y HRU11, todas con un valor de 11 mM. Los valores encontrados son cercanos a los obtenidos en estudios similares, por ejemplo las cepas *Paecilomyces sp.9* y *Paecilomyces sp.G* aisladas en una refinería de Pb, fueron capaces de crecer a una concentración de 12 mM; asimismo, las cepas de hongos procedentes de una refinería de Zn tuvieron un valor de CMI de 9.12 y 4.6 mM de Cd (Mohammadian et al., 2015). En la imagen 6 se muestra a la cepa HRU11 expuesta a varias concentraciones de Cd, donde se observa la variación de su tamaño, color y esporulación.

El Pb resultó menos tóxico para los hongos comparado con el Cd. Se observa en la tabla 11 que las cepas con mayor CMI de Pb fueron: HEU11, HEU17 y HRU11 siendo también las que mostraron mayor resistencia a Cd. Las cepas más resistentes mostraron un CMI de 71 mM de Pb, siendo

valores muchos más altos que los registrados por otros autores que utilizaron la misma metodología. Por ejemplo Ezzouhri et al. (2009) aisló hongos tolerantes a metales pesados de agua y sedimentos de sitios contaminados del río Moghoga, Marruecos, donde las cepas *Penicillium sp.* (S4W) y *Aspergillus niger* (S5S) mostraron CMI de Pb en un rango de 20 a 30 mM.

La alta resistencia mostrada por las cepas HEU11, HEU17 y HRU11 puede deberse a la capacidad de producir sideróforos, ya que estas cepas fueron las que mostraron un índice mayor comparadas con las demás cepas (tabla 9).

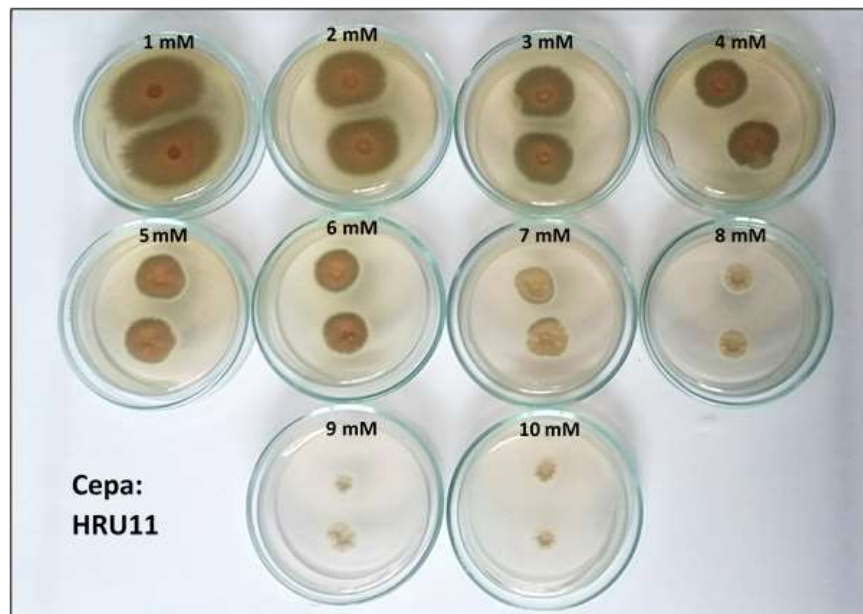


Imagen 6: Prueba de Concentración Mínima Inhibitoria de cadmio corresponde a la cepa HRU11

4.4. Prueba de solubilización de carbonato de cadmio y plomo

4.4.1. Bacterias

La prueba en placa para la evaluación de la capacidad de bacterias seleccionadas para solubilizar CdCO_3 y PbCO_3 solo mostró resultados positivos en la cepa BRU16, la cual solubilizó CdCO_3 (0.3 % w/v) con un Índice de Solubilización de Cadmio (IS-Cd) de 1.24 ± 0.07 . Cabe resaltar que la cepa BRU16 fue la reportó mayor resistencia a Cd con un CMI de 3 mM.

En la imagen 7 se muestra algunos resultados de la prueba en placa de solubilización de CdCO_3 , el resultado positivo se evidenció a través de la formación de un halo transparente alrededor de la cepa bacteriana.

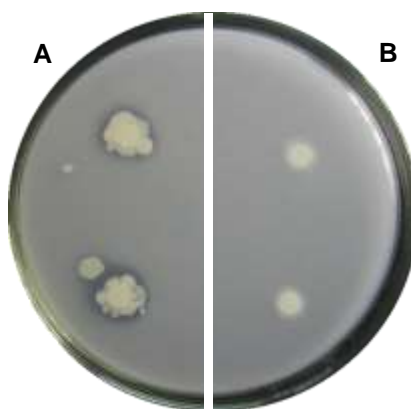


Imagen 7: Prueba de solubilización de carbonato de cadmio en bacterias, A: corresponde a la cepa BRU16, B: corresponde a la cepa BRU18 la cual no mostró resultados positivos

4.4.2. Hongos

Al igual que los resultados de la prueba en placa de solubilización de CdCO_3 y PbCO_3 en bacterias, solo se obtuvo resultados positivos en CdCO_3 (0.3 % w/v o 5.8 mM). En la tabla 12 se presentan los resultados de los Índices de Solubilización de Cadmio de las cepas de hongos positivas. La cepa con mayor IS-Cd fue el hongo rizosférico HRU07 (1.92 ± 0.02), seguido por las cepas HRU11 (1.09 ± 0.05), HEU01 (1.08 ± 0.01) y HRU11 (1.08 ± 0.00).

Tabla 12: Índice de Solubilización de Cadmio en hongos

Cepa	Tipo	IS-Cd
HEU01	Endofítica	1.08 ± 0.02^b
HEU11	Endofítica	1.08 ± 0.00^b
HRU07	Rizosférica	1.92 ± 0.02^a
HRU11	Rizosférica	1.09 ± 0.05^b

Nota: Los valores son promedio de la división entre la medida del diámetro del halo de solubilización y la medida del diámetro del hongo, que corresponden a diez repeticiones \pm desviación estándar. Promedios con diferente letra son significativamente diferentes (Prueba Duncan, $p < 0.05$).

Kumla & Suwannarach (2014) evaluó la capacidad de solubilizar carbonato de cadmio de 4 cepas de hongos asociados a plantas aislados en Tailandia, en el que obtuvo los mejores resultados en la cepa de hongo *Phlebopus portentosus*, con valores de IS-Cd entre 1 a 2 evaluados en diferentes concentraciones CdCO_3 (1-5 mM), lo que sugiere un índice de solubilización significativo por parte de la cepa HRU07 (IS-Cd, 1.92). Asimismo, en el mismo trabajo, se observa en los resultados, una tendencia disminuir el IS-Cd al aumentar la concentración de carbonato. Lo anterior nos señala que las cepas que mostraron bajos IS-Cd, podrían tener mejores resultados al disminuir la concentración de carbonato de cadmio (<0.1% w/v).

Los resultados evidencian que las cepas de hongos aisladas de suelos impactados por metales, poseen propiedades metabólicas importantes en la movilización de formas insolubles de metales, como es el caso de CdCO_3 , lo cual puede deberse a mecanismos complejación con metabolitos microbianos como los sideróforos, sin embargo, algunos autores señalan que también intervienen procesos de protonación o acidificación (Fomina, 2005). En la imagen 8 se muestran los resultados de la prueba en placa de solubilización de CdCO_3 en hongos, el resultado positivo se evidenció a través de la formación de un halo transparente alrededor de la cepa de hongo.

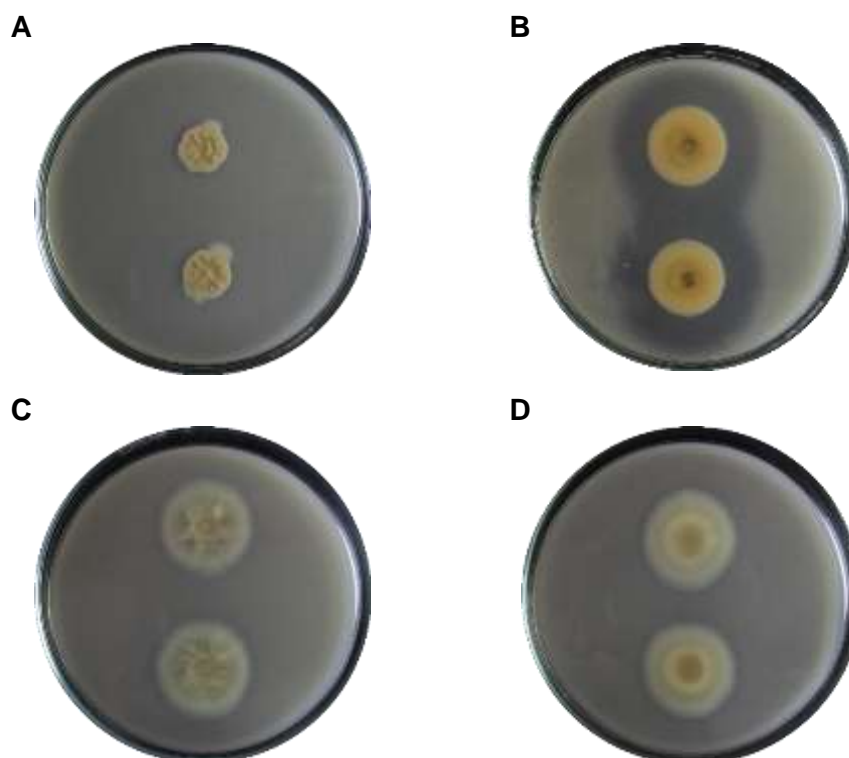


Imagen 8: Prueba de solubilización de carbonato de cadmio en hongos, A: corresponde a la cepa HEU01, B: corresponde a la cepa HEU07, C: corresponde a la cepa HEU11, D: corresponde a la cepa HRU11.

4.5. Prueba de solubilización de fosfatos

En la evaluación en placa de solubilización de fosfatos solo obtuvo resultados positivos en tres cepas bacterianas. Ningún hongo evaluado mostró resultados positivos en esta prueba. En la tabla 12 se muestran los resultados de los Índices de Solubilización de Fosfatos (ISP) de las cepas positivas. La imagen 9 muestra algunos resultados de la prueba de solubilización de fosfatos en bacterias, la prueba positiva se evidenció a través de la formación de un halo transparente alrededor de la colonia.

Los resultados muestran que las cepas con mayor ISP fueron las bacterias rizosféricas BRU16 (5.08 ± 0.39) y BRU18 (1.90 ± 0.23), los cuales mostraron valores significativos comparados con otros estudios. Por ejemplo, las cepas nativas aisladas de suelos de la zona rural del departamento de Córdoba, Colombia, fueron evaluados en medio NBRIP a 3 días de incubación, registrando valores de ISP en un rango de 1.5 a 3, las bacterias con mayores ISP de este estudio fueron

identificadas como: *Burkholderia cepacia*, *Pantpea sp*, *Pseudomona putitda*, *Pseudomona luteola* y *Aeromona Hydrophilia* (Laral, 2011). Asimismo, Ulloa (2016) evaluó la capacidad de solubilizar fosfato tricálcico de bacterianas endofíticas aisladas de las especies vegetales *Valeriana sp.* y *Gentianella weberbaueri* que habitan el Parque Nacional Huascarán, Ancash, Perú, encontrando valores máximos en *Rahnella sp* de 3.04.

Tabla 13: Índice de Solubilización de Fosfatos en bacterias

Código	ISP
BRU11	1.19 ± 0.34 ^c
BRU16	5.08 ± 0.39 ^a
BRU18	1.90 ± 0.23 ^c

Nota: Los valores son promedio de la división entre la medida del diámetro del halo de solubilización y la medida del diámetro de la bacteria, que corresponden a diez repeticiones ± desviación estándar. Promedios con diferente letra son significativamente diferentes (Prueba Duncan, $p < 0.05$).

La capacidad de las cepas BRU11, BRU16 y BRU18 de solubilizar fosfatos puede deberse a diferentes mecanismos, los cuales incluyen la emisión de quelantes o compuestos disolventes de minerales como ácidos orgánicos, sideróforos, protones, CO₂; asimismo puede deberse a liberación de enzimas denominadas fosfatasas (Sharma et al., 2013).

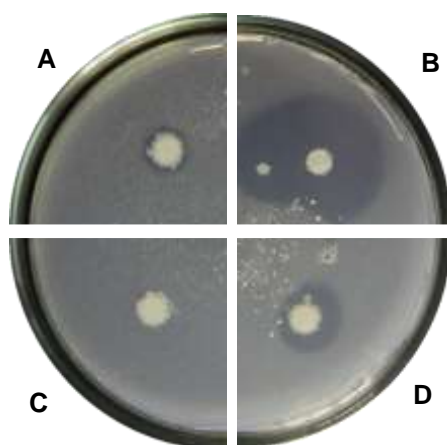


Imagen 9: Prueba de solubilización de fosfatos en bacterias, A: corresponde a la BRU11, B: corresponde a la cepa BRU16, C: prueba negativa, D: corresponde a la cepa: BRU18

Aunque el fósforo es abundante en suelos en forma inorgánica u orgánica, es el principal factor limitante para el crecimiento de plantas, debido a que se encuentran principalmente en formas insolubles; por tanto, no disponibles para la absorción a través de las raíces (Sharma et al., 2013). En este sentido, las cepas bacterianas aisladas de suelos rizosféricos del pasivo minero ambiental Chahuapampa, que tuvieron la capacidad de solubilizar fosfatos, tienen un alto potencial para futuras investigaciones en temas de mejora de crecimiento y aumento de biomasa de plantas fitorremediadoras, teniendo en cuenta, además, que estas cepas son muy resistentes a metales pesados. Por otro lado, estos microorganismos podrían ser utilizados en sistemas de producción ecológica, evitando así el uso de fertilizantes artificiales perjudiciales para el suelo y el ambiente.

4.6. Prueba de producción de Ácido Indol Acético (AIA)

Para la detección y cuantificación de AIA producido por cada una de las cepas de bacterias y hongos evaluadas, se utilizó la curva de calibración correspondiente. Ver anexo 2.

4.6.1. Bacterias

De las cepas bacterianas evaluadas, solo dos mostraron la capacidad de producir ácido indol acético. En el gráfico 1 se muestra la concentración producida de AIA por cada cepa bacteriana, evaluada a 20 horas, en la que se observa que la cepa BRU18 fue la que presentó el mejor resultado con 4.2 µg/mL.

La producción de AIA de estas cepas, mostró resultados similares a los obtenidos en otros estudios de bacterias promotoras de crecimiento resistentes a metales pesados. Es el caso del estudio realizado por Jiang et al. (2008) en el que evaluó la capacidad de producir AIA de la cepa *Burkholderia sp* J62 aislada de un campo contaminado con metales pesados en Zhejiang, China, encontrando un valor de 3.8 µg/mL. Sin embargo, se han reportado bacterias con mayor producción de AIA, es el caso de Yu et al. (2014) quien aisló 91 bacterias de relaves mineros ubicados en la provincia Sichuan, China, las cuales, en su mayoría tuvieron la capacidad de producir AIA en un rango de 2.2 a 83.05 µg/mL.

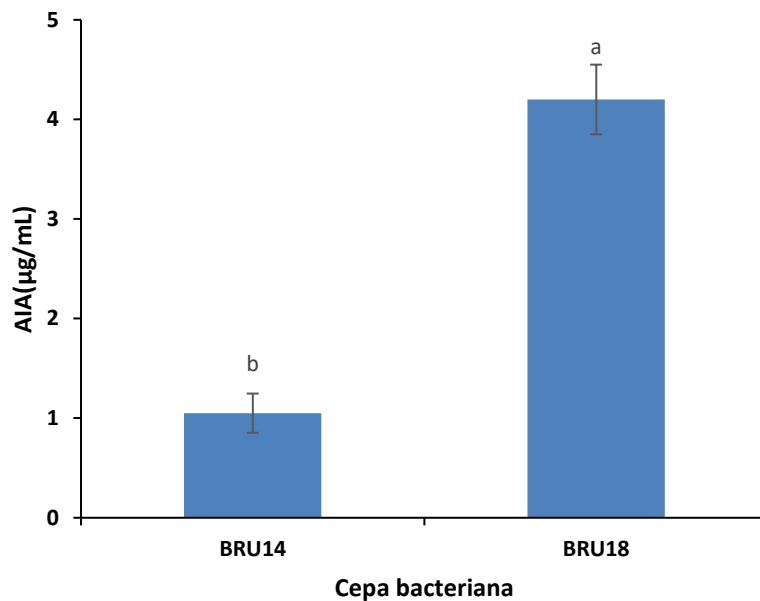


Gráfico 1: Producción de AIA en cepas bacterianas

Nota: Los resultados son promedios de cuatro repeticiones \pm desviación estándar. Promedios con letra diferente son significativamente diferentes (Prueba Duncan, $p < 0.05$).

4.6.2. Hongos

De los seis hongos evaluados, cinco mostraron la capacidad de producir AIA (tres endofíticos y dos rizosféricos). En el gráfico 2 se muestra la concentración producida de AIA por cada cepa de hongo evaluados a 5 días. Se puede observar que en la cepa endofítica HEU17 fue la que presentó el mejor resultado con 6.08 $\mu\text{g/mL}$, seguida por las cepas HEU11, HRU02 y HEU11 con producciones de 2.97, 3.08, 3.35 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, las cuales no tuvieron diferencias significativas estadísticamente.

Con respecto a la discusión de resultados, son escasos estudios realizados en temas de producción de AIA en hongos cuantificados con el reactivo de Salkowsky, uno de ellos es el que se realizó en hongos endofíticos aislados de plantas de arroz en China, encontrando concentraciones de AIA en un rango de 0.005 – 3.719 $\mu\text{g/mL}$ (7 días de evaluación) (Kuswinanti et al., 2015), los cuales son cercanos a los valores obtenidos en este estudio; no obstante Kumla & Suwannarach (2014) obtuvieron mayores valores de producción en ectomicorrizas resistentes a

metales pesados, con un valor máximo de 33.68 $\mu\text{g/mL}$ a 15 días de evaluación, lo que sugiere que la producción de AIA en los hongos evaluados podría tener mejores resultados con un tiempo mayor de incubación.

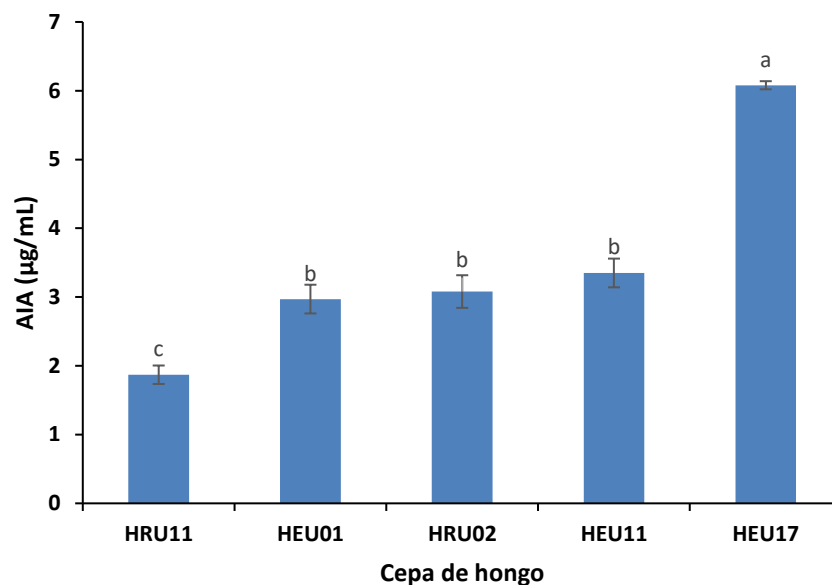


Gráfico 2: Producción de AIA en cepas de hongos

Nota: Los resultados son promedios de cuatro repeticiones \pm desviación estándar. Promedios con letra diferente son significativamente diferentes (Prueba Duncan, $p < 0.05$).

Por otro lado, el sobrenadante de la cepa rizosférica HEU07 no presentó coloración rosa al reaccionar con el reactivo de Salkowsky, sin embargo, la reacción formó una coloración anaranjada que indica la producción de Ácido Indol 3 Butírico (AIB) que también es una fitohormona perteneciente al grupo de las auxinas, la cual también es sintetizada por microorganismos. Para la cuantificación de AIB se siguió la misma metodología utilizada para el AIA, elaborando primeramente una curva de calibración (anexo 2), seguidamente se calculó la producción AIB por el método espectrofotométrico. La cuantificación mostró un valor de 29.57 ± 0.39 , valor que supera los encontrados en la prueba de AIA.

Teniendo en cuenta los resultados de producción de fitohormonas, podemos mencionar que las cepas de los hongos y bacterias, asociados a plantas del pasivo ambiental Chahuapampa, tienen enorme potencial en futuras investigaciones en busca de la mejora de los procesos de

fitorremediación, debido a que producen AIA, una fitohormona muy importante para el desarrollo y crecimiento de plantas en ambientes con niveles altos de metales pesados. De igual manera, estas cepas podrían ser utilizadas en sistemas de producción ecológica, evitando así el uso de fertilizantes perjudiciales para el suelo y el ambiente.

4.7. Caracterización bioquímica y morfológica

4.7.1. Pruebas bioquímicas en bacterias

Se realizó las pruebas bioquímicas solo a las cepas que no mostraron ser de forma bacilar en la visualización en microscopio.

Tabla 14: Reporte de los resultados de pruebas bioquímicas

Cepa	Catalasa	Rojo de metilo			Indol	Citrato	TSI	LIA	Urea	Gases
		Gluc.	Sac.	Lact.						
BRU14	++++	-	+	-	-	+	K/A	V/V	-	+
BRU18	++++	+	+	-	-	+	A/A	V/V	-	-

4.7.2. Caracterización morfológica de hongos

Se hizo la caracterización morfológica a nivel macro, de las cepas de hongos seleccionadas, para la cual se evaluó el crecimiento de las cepas en tres medios de cultivo (CYA, MEA, YES), teniendo en cuenta la forma, el color, textura y grado de crecimiento. Estos resultados permitirán que futuras cepas aisladas, puedan ser identificadas de manera más rápida a través de una comparación.

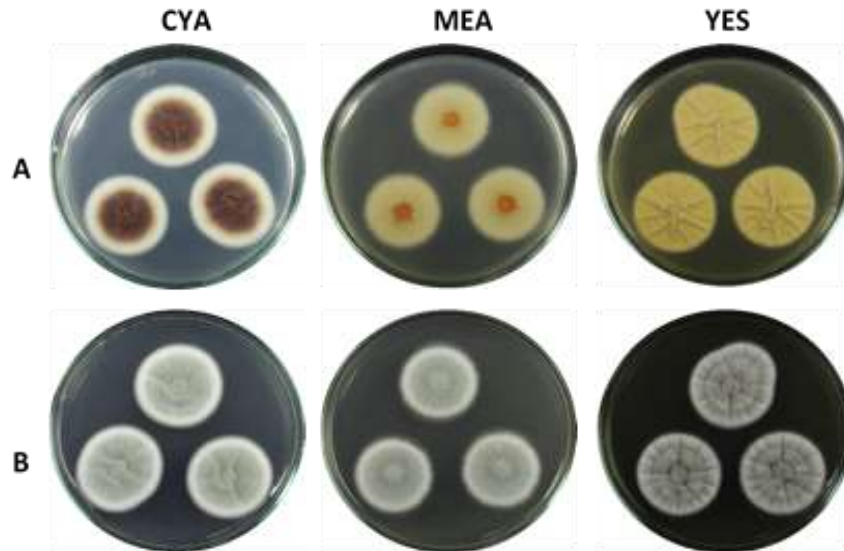


Imagen 10: Características morfológicas macroscópicas de la cepa fúngica HEU01, A: fotografía tomada del haz, B: fotografía tomada del envés

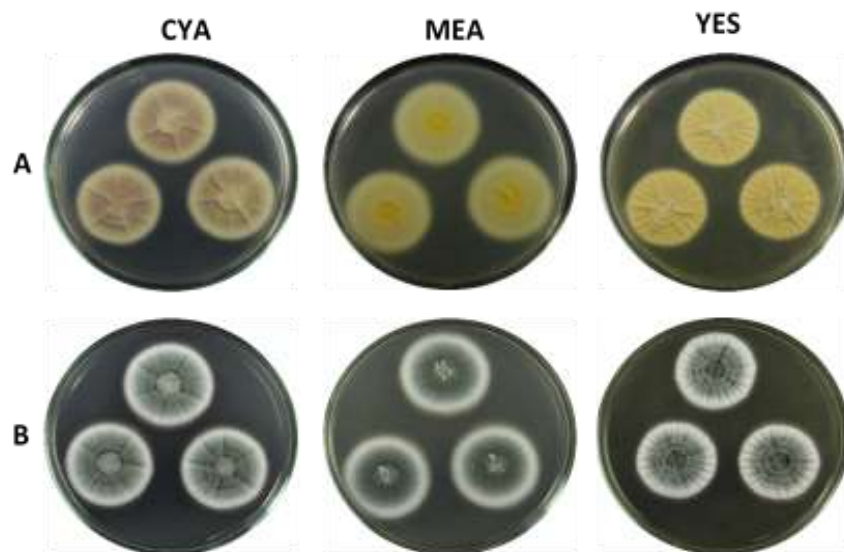


Imagen 11: Características morfológicas macroscópicas de la cepa fúngica HEU11, A: fotografía tomada del haz, B: fotografía tomada del envés

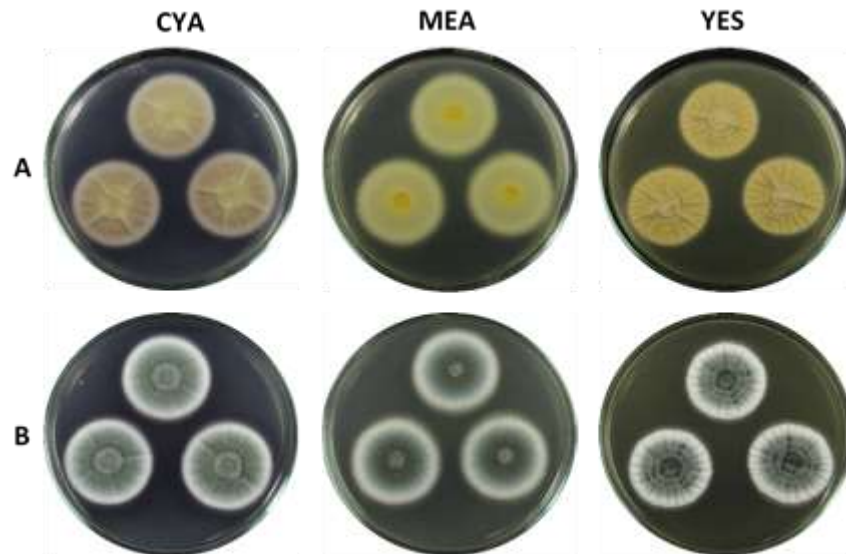


Imagen 12: Características morfológicas macroscópicas de la cepa fúngica HEU17, A: fotografía tomada del haz, B: fotografía tomada del envés

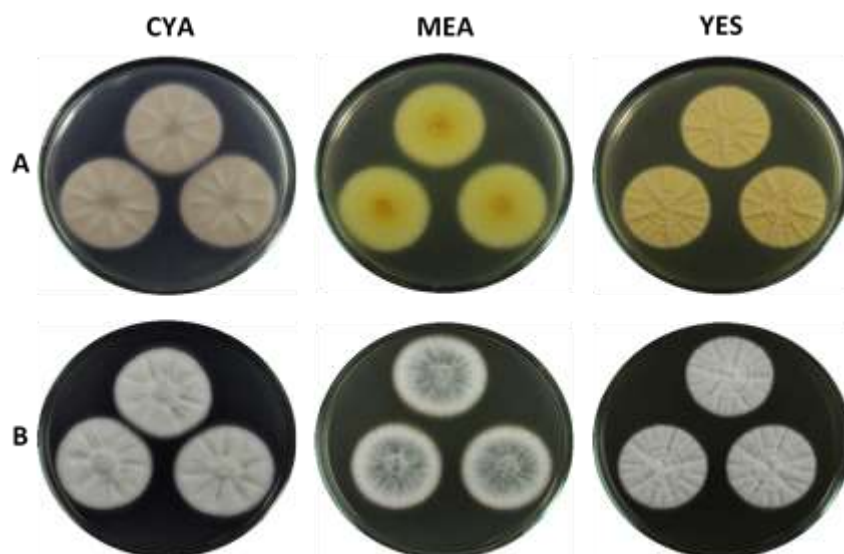


Imagen 13: Características morfológicas macroscópicas de la cepa fúngica HRU02, A: fotografía tomada del haz, B: fotografía tomada del envés

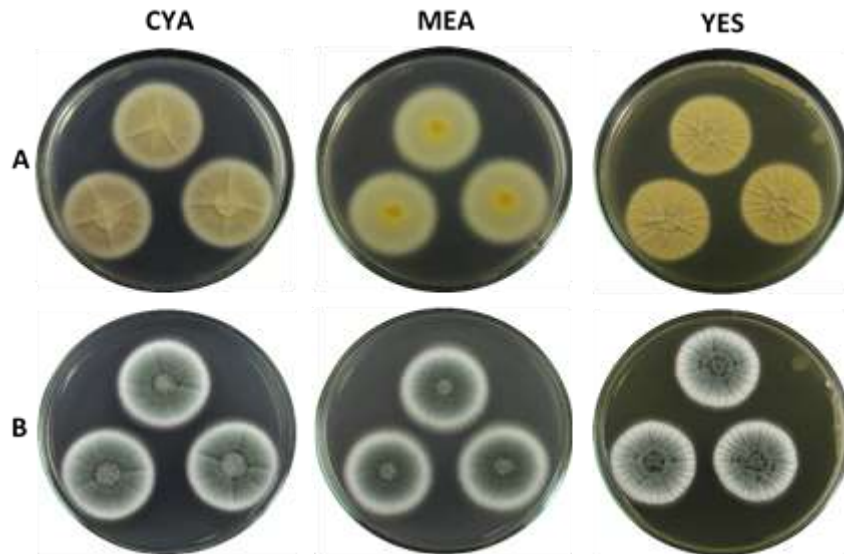


Imagen 14: Características morfológicas macroscópicas de la cepa fúngica HRU07, A: fotografía tomada del haz, B: fotografía tomada del envés

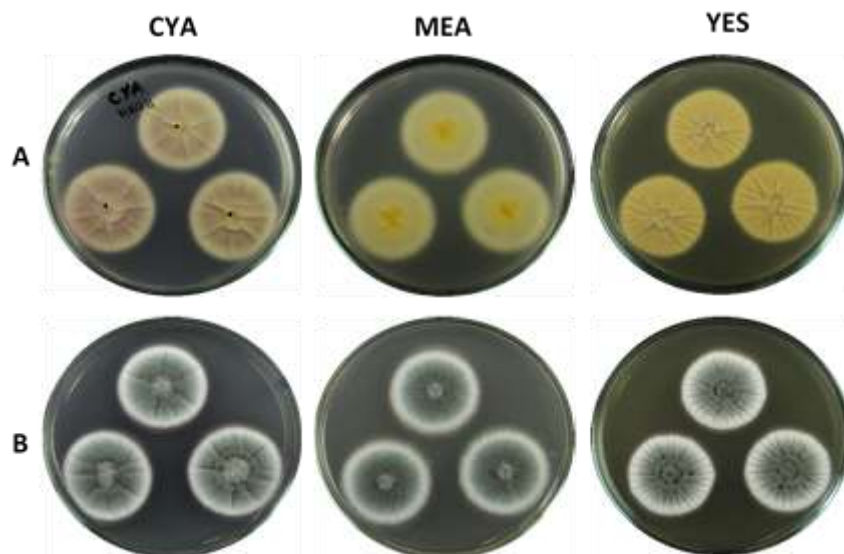


Imagen 15: Características morfológicas macroscópicas de la cepa fúngica HRU11, A: fotografía tomada del haz, B: fotografía tomada del envés

4.8. Caracterización molecular

4.8.1. Bacterias

El análisis de alineamiento múltiple y filogenético de cepas bacterianas mostró la presencia de especies como *Bacillus subtilis* con 3 cepas y *Hafnia alvei* con 2 cepas, con porcentajes de identidad entre 98 a 100% con cepas tipo del Gen bank, evaluadas con el BLAstN (<https://-www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (tabla 15).

Tabla 15: Identificación taxonómica de bacterias a través de la amplificación y secuenciamiento del gen 16S

Código de cepa	Identificación taxonómica	Porcentaje de identidad
BRU10	<i>Bacillus subtilis</i>	99%
BRU11	<i>Bacillus subtilis</i>	100%
BRU14	<i>Hafnia sp.</i>	99%
BRU16	<i>Bacillus subtilis</i>	100%
BRU18	<i>Hafnia sp.</i>	98%

Alzahrani & Ahamed (2015) menciona que varios estudios han destacado la gran resistencia a metales pesados por parte de *Bacillus subtilis*, especialmente a iones de Pb, el cual acumula en su pared celular. Asimismo, *B. subtilis* ha sido reportado como tolerante a Cu y Ag. De igual manera, Gayathamma et al. (2013) reportó a *B. subtilis* como gran acumulador iones de Pb, Cd y Mn por procesos de biosorción.

Bacillus subtilis también ha sido estudiado por su capacidad de promover el crecimiento vegetal y como *biocontrolador* de hongos patógenos, debido a su capacidad de producir sideróforos del tipo hydroxamate. Estudios mencionan que la bioaumentación con *B. subtilis* aumentó la producción de biomasa en condiciones de estrés por metales (Pb y Cu) (Khan et al., 2017; Patil et al., 2014).

Con respecto a *Hafnia alvei*, estudios de determinación de mínimas concentraciones inhibitorias, la han reportado como resistente a Pb y Cr, sin embargo es muy sensible a concentraciones de Cd (Marzan et al., 2017), lo que concuerda con los resultados obtenidos en esta investigación.

4.8.2. Hongos

El análisis de alineamiento múltiple y filogenético de cepas fúngicas mostró la presencia del género *Penicillium sp.* en 5 cepas, con un porcentaje de identidad entre 99 y 100% con cepas tipo del Gen bank, evaluadas con el BLASTN (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (tabla 16).

Tabla 16: Identificación taxonómica de hongos través de la amplificación y secuenciamiento del gen ITS

Código de cepa	Identificación taxonómica	Porcentaje de identidad
HEU11	<i>Penicillium sp.</i>	100%
HEU17	<i>Penicillium sp.</i>	99%
HRU02	<i>Penicillium sp.</i>	100%
HRU07	<i>Penicillium sp.</i>	100%
HRU11	<i>Penicillium sp.</i>	100%

Varios estudios se han enfocado en el estudio de *Penicillium* en procesos de biorremediación de aguas y suelos contaminados con metales pesados, debido a la gran adaptación que han desarrollado a niveles altos de metales y medios ácidos. Por ejemplo Lú (2009) cita a varias especies de *Penicillium* con capacidad de bioadsorción de metales tóxicos, de los que se puede mencionar a *P. simplicissimum* (Cd), *P. chrysogenum* (Cd), *P. canescens* (Pb, As), *P. simplicissimum* (Pb), *P. chrysogenum* (Pb). Asimismo, se han reportado especies de *Penicillium* productores de sideróforos, tales como *P. spinulosum*, *P. indofítico*, *P. notatum*, *P. verrucosum*, *P. funiculosum*, *P. glabrum* (Hussein & Joo, 2012; Milagres et al., 1999). Por otro lado *Penicillium sp* también han sido estudiados por su capacidad de solubilizar metales como el caso de *P. simplicissimum* (Sayer et al., 1995).

4.9. Resumen de resultados y contrastación de hipótesis

Las tablas 17 y 18 muestran que las cepas de bacterias y hongos las cuales se encuentran asociadas a *Scirpus rigidus* y *Juncus imbricatus*, que habitan el pasivo minero ambiental Chahuapampa, presentan características metabólicas potenciales para la mejora de procesos de biorremediación de suelos y aguas contaminadas, por lo cual se acepta las hipótesis plante

Tabla 17: Resumen de las características encontradas de las cepas bacterianas evaluadas

Cepa	Identificación taxonómica	Tipo	Planta asociada	Características beneficiosas	CMI
BRU10	<i>Bacillus subtilis</i>	Rizosférica	<i>Scirpus rigidus</i>	Sideróforos	Pb, 7 mM
BRU11	<i>Bacillus subtilis</i>	Rizosférica	<i>Scirpus rigidus</i>	Sideróforos, solubilización de fosfatos.	Cd, 2 mM Pb, 7 mM
BRU14	<i>Hafnia sp.</i>	Rizosférica	<i>Scirpus rigidus</i>	Sideróforos, AIA.	Pb, 7 mM
BRU16	<i>Bacillus subtilis</i>	Rizosférica	<i>Juncus imbricatus</i>	Sideróforos, solubilización de Cd, solubilización de fosfatos	Cd, 3 mM Pb, 7 mM
BRU18	<i>Hafnia sp.</i>	Rizosférica	<i>Juncus imbricatus</i>	Sideróforos, solubilización de fosfatos, AIA.	Pb, 8 mM

Tabla 18: Resumen de las características encontradas de las cepas fúngicas evaluadas

Cepa	Identificación taxonómica	Tipo	Planta asociada	Características beneficiosas	CMI
HEU01	No identificado	Hongo endofítico	<i>Scirpus rigidus</i>	Sideróforos, solubilización de CdCO ₃ .	Cd, 7 mM Pb, 61 mM
HEU11	<i>Penicillium sp.</i>	Hongo endofítico	<i>Juncus imbricatus</i>	Sideróforos, solubilización de CdCO ₃ , AIA.	Cd, 11 mM Pb, 71 mM
HEU17	<i>Penicillium sp.</i>	Hongo endofítico	<i>Juncus imbricatus</i>	Sideróforos, AIA.	Cd, 11 mM Pb, 71 mM
HRU02	<i>Penicillium sp.</i>	Hongo rizosférico	<i>Juncus imbricatus</i>	Sideróforos, solubilización de CdCO ₃ , AIA.	Cd, 7 mM Pb, 70 mM
HRU07	<i>Penicillium sp.</i>	Hongo rizosférico	<i>Scirpus rigidus</i>	Sideróforos, solubilización de CdCO ₃ , IBA.	Cd, 7 mM Pb, 15 mM
HRU11	<i>Penicillium sp.</i>	Hongo rizosférico	<i>Scirpus rigidus</i>	Sideróforos, solubilización de CdCO ₃ , AIA.	Cd, 11 mM Pb, 71 mM

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones.

- Se evidenció la existencia de una comunidad microbiana, que habita en el pasivo minero ambiental Chahuapampa, asociada a *Juncus imbricatus* y *Scirpus rigidus*, con características metabólicas potenciales para la mejora de procesos de biorremediación-fitorremediación de suelos contaminados con metales pesados.
- Se encontró 5 cepas de bacterias y 6 cepas de hongos con capacidad de producir sideróforos, donde la cepa bacteriana rizosférica BRU11 y las cepas fúngicas endofíticas HEU11 y HEU17, mostraron los mejores índices de producción.
- Las cepas fúngicas registraron mayor resistencia a cadmio y plomo comparada con las cepas bacterianas, donde las cepas HEU11, HEU17 y HRU11 mostraron CMLs máximos de 11 mM en Cd y 71 mM en Pb.
- Se encontró mejores resultados de índice de solubilización de COCd_3 en las cepas rizosféricas BRU16 y HEU11 con valores de 1.24 ± 0.07 y 1.92 ± 0.02 respectivamente.

- Tres bacterias rizosféricas, BRU11, BRU16 y BRU18, fueron capaces de solubilizar fosfato tricálcico, con un índice de solubilización de 1.19 ± 0.34 , 5.08 ± 0.39 y 1.90 ± 0.23 respectivamente., sin embargo las cepas fúngicas seleccionadas no mostraron tener la esta propiedad.
- Las cepas bacterianas BRU14 y BRU18 mostraron tener capacidad de producir AIA, asimismo, 5 de los 6 hongos evaluados mostraron tener esta propiedad metabólica, siendo el hongo endofítico HEU17 el que mostró el mejor valor con $6.08 \pm 0.06 \mu\text{g/mL}$. Además, la cepa de hongo HRU07 mostró la capacidad de producir ácido indol butírico con un valor de 29.57 ± 0.39 .
- Las cepas bacterianas evaluadas pertenecen a las especies *Bacillus subtilis* y el género *Hafnia* sp., mientras que las cepas fúngicas pertenecen al género *Penicillium*.

5.2. Recomendaciones.

- Realizar estudios para la evaluación cuantitativa y tipificación de sideróforos producidos por las cepas evaluadas.
- Realizar estudios para la evaluación cuantitativa de fosfato de calcio y carbonato de cadmio solubilizados por las cepas evaluadas.
- Evaluar la resistencia a otros metales pesados de las cepas aisladas en el presente estudio.
- Realizar estudios in vitro más específicos en temas de bioaumentación con microorganismos estudiados en el presente trabajo, con el fin de evaluar sus efectos en el crecimiento de plantas y extracción de metales.
- Aislar y evaluar las potencialidades metabólicas de microorganismos asociados a plantas que habitan en otros pasivos ambientales, para seguir ampliando el conocimiento básico de estos sistemas biológicos, y así contribuir a la mejora de procesos de biorremediación-fitorremediación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahemad, M. (2014). Remediation of metalliferous soils through the heavy metal resistant plant growth promoting bacteria : Paradigms and prospects. *ARABIAN JOURNAL OF CHEMISTRY*. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.11.020>
- Ahmed, E., & Holmström, S. J. M. (2014). Siderophores in environmental research: Roles and applications. *Microbial Biotechnology*, 7(3), 196–208. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12117>
- 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>
- Aliaga, E., Palomino, J., Yupanqui, E., & Salvador, M. (2007). Capacidad de las plantas nativas en ambientes con drenaje ácido para la bioacumulación de metales pesados. *Aporte Santiaguino*, 9–20.
- Alzahrani, O. M., & Ahamed, N. T. (2015). Isolation and Characterization of Heavy Metal Resistant *Bacillus subtilis* spp . Collected from Water Sources of Taif Province of Saudi Arabia. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4(6), 350–357.
- Anahid, S., Soheila, Y., & Ghobadinejad, Z. (2010). Heavy metal tolerance of fungi. *Scientia Iranica*, 502–508.
- Ashraf, M. A., Maah, M. J., & Yusoff, I. (2012). Chemical Speciation and Potential Mobility of Heavy Metals in the Soil of Former Tin Mining Catchment. *The Scientific World Journal*, 2012, 1–11. <https://doi.org/10.1100/2012/125608>
- Atlas, R. ., & Bartha, R. (1998). *Microbial Ecology, Fundamentals and Applications*. (Addison Wesley Longman, Ed.).
- Auger, C., Han, S., Appanna, V. P., Thomas, S. C., Ulibarri, G., & Appanna, V. D. (2013). Metabolic reengineering invoked by microbial systems to decontaminate aluminum: Implications for bioremediation technologies. *Biotechnology Advances*, 31(2), 266–273. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.11.008>
- Beltrán, M. (2014). La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal. *Corpoica Cienc. Tecnol. Agropecu*, 15(1), 101–113.

- Bitton, G., Jung, K., & Koopman, B. (1994). Evaluation of a microplate assay specific for heavy metal toxicity. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 27(1), 25–28. <https://doi.org/10.1007/BF00203883>
- Bobadilla, M., Aliaga, E., Yupanqui, E., & Palomino, E. (2013). A phytoremediation approach using *Calamagrostis ligulata* and *Juncus imbricatus* in Andean wetlands of Peru. *Environmental Monitoring and Assessment*, 185(1), 323–334. <https://doi.org/10.1007/s10661-012-2552-x>
- Chávez, M. (2015). Los Pasivos Ambientales Mineros: Diagnóstico Y Propuestas. *Minería, Ambiente Y Comunidades*.
- Chen, L., Luo, S., Li, X., Wan, Y., Chen, J., & Liu, C. (2014). Interaction of Cd-hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. and functional endophyte *Pseudomonas* sp. Lk9 on soil heavy metals uptake. *Soil Biology and Biochemistry*, 68, 300–308. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.10.021>
- D.S. N° 059-2005-EM del 09-Dic-2005. (2006). Reglamento de Ley que regula los pasivos ambientales de la actividad minera.
- Decreto Supremo N°002-2013-MINAM. Aprueban Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para Suelo (2013).
- Deng, Z., Cao, L., Huang, H., Jiang, X., Wang, W., Shi, Y., & Zhang, R. (2011). Characterization of Cd- and Pb-resistant fungal endophyte *Mucor* sp . CBRF59 isolated from rapes (*Brassica chinensis*) in a metal-contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*, 185, 717–724. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.09.078>
- Diez, J. (2008). *Fitocorrección de suelos contaminados con metales pesados: Evaluación de plantas tolerantes y optimización del proceso mediante prácticas agronómicas*.
- Dimitriu, D. (2014). Restoration of heavy metals polluted soils case study - Camelina. *AgroLife Scientific Journal*, 3(2).
- Ezzouhri, L., Castro, E., Moya, M., Espinola, F., & Lairini, K. (2009). Heavy metal tolerance of filamentous fungi isolated from polluted sites in Tangier, Morocco. *African Journal of Microbiology Research*, 3(2), 35–48. Recuperado de <http://www.academicjournals.org/journal/AJMR/article-abstract/FA6E69A12237>
- Fomina, M. A., Alexander, I. J., Colpaert, J. V., & Gadd, G. M. (2005). Solubilization of toxic metal minerals and metal tolerance of mycorrhizal fungi. *Soil Biology and*

- Biochemistry*, 37(5), 851–866. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.10.013>
- Gal, E., & Baena, A. R. (2008). Contaminación de Suelos por metales pesados. *Universidad de Sevilla*, 10, 48–60.
- Gayathamma, K., Pavani, K. V, Singh, A. R., & Deepti, S. (2013). ROLE OF BACILLUS SUBTILIS IN BIOREMEDIATION OF, 6(1), 6–11.
- Glick, B. R. (2003). Phytoremediation : synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment, 21, 383–393. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(03\)00055-7](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(03)00055-7)
- Glick, B. R. (2005). Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase, 251, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.07.030>
- Glick, B. R. (2012). Plant Growth-Promoting Bacteria : Mechanisms and Applications. *Hindawi Publishing Corporation*, 2012, 15.
- González-toril, E., Santofimia, E., Blanco, Y., López-pamo, E., Gómez, M. J., Bobadilla, M., ... Aguilera, Á. (2015). Pyrosequencing-Based Assessment of the Microbial Community Structure of Pastoruri Glacier Area (Huascarán National Park , Perú), a Natural Extreme Acidic Environment. <https://doi.org/10.1007/s00248-015-0634-3>
- González, M. (2006). Aplicación e importancia de las microalgas en el tratamiento de aguas residuales. *ContactoS*, 59, 64–70.
- Graaf, L. De, & Hall, R. L. Van. (2012). The use of soils as a natural buffer for the contaminated waters in the Río Negro. Recuperado de University Amsterdam
- Hadi, F., & Bano, A. (2010). Effect of diazotrophs (Rhizobium and azatebactor) on growth of maize (*Zea mays* L.) and accumulation of lead (Pb) in different plant parts. *Pakistan Journal of Botany*, 42(6), 4363–4370.
- Hashim, M. A., Mukhopadhyay, S., Sahu, J. N., & Sengupta, B. (2011). Remediation technologies for heavy metal contaminated groundwater. *Journal of Environmental Management*, 92(10), 2355–2388. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2011.06.009>
- He, H., Ye, Z., Yang, D., Yan, J., Xiao, L., Zhong, T., ... 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>
- Hussein, K. a., & Joo, J. H. (2012). Comparison between Siderophores Production by Fungi Isolated from Heavy Metals Polluted and Rhizosphere Soils. *Korean Journal*

of Soil Science and Fertilizer, 45(5), 798–804.
<https://doi.org/10.7745/KJSSF.2012.45.5.798>

- Jakovljevic, T., Redovnikovic, I. R., & Laslo, A. (2016). Phytoremediation of Heavy Metals: Applications and Experiences in Croatia. *Zastita Materijala*, 57, 496–501. <https://doi.org/10.5937/ZasMat1603496J>
- Jiang, C., Sheng, X., Qian, M., & Wang, Q. (2008). Isolation and characterization of a heavy metal-resistant Burkholderia sp. from heavy metal-contaminated paddy field soil and its potential in promoting plant growth and heavy metal accumulation in metal-polluted soil. *Chemosphere*, 72, 157–164. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.02.006>
- Kavamura, V. N., & Esposito, E. (2010). Biotechnological strategies applied to the decontamination of soils polluted with heavy metals. *Biotechnology Advances*, 28(1), 61–69. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.09.002>
- Khan, W. U., Ahmad, S. R., Yasin, N. A. A., & Aamir Ahmad, A. (2017). Effect of Pseudomonas fluorescens RB4 and Bacillus subtilis 189 on the phytoremediation potential of Catharanthus roseus (L.) in Cu and Pb-contaminated soils, 19(Journal International Journal of Phytoremediation).
- Kumla, J., & Suwannarach, N. (2014). Indole-3-acetic acid production, solubilization of insoluble metal minerals and metal tolerance of some sclerodermatoid fungi collected from northern Thailand, 707–720. <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0706-x>
- Kuswinanti, T., Syam'un, E., & Masniawati, A. (2015). The Potency of Endophytic Fungal Isolates Collected from Local Aromatic Rice as Indole Acetic Acid (IAA) Producer. *Procedia Food Science*, 3, 96–103. <https://doi.org/10.1016/j.profoo.2015.01.009>
- Lara, C., Oviedo, L. E., & Betancur, C. A. (2011). Bacterias nativas con potencial en la producción de ácido indolacético para mejorar los pastos. *Zootecnia Tropical*, 29(2), 187–194.
- Laral, C., Esquivel Avila, L. M., & Negrete Peñata, J. L. (2011). Bacterias nativas solubilizadoras de fosfatos para incrementar los cultivos en el departamento de Córdoba-Colombia. *Biotecnología En El Sector Agropecuario Y Agroindustrial*, 9(2), 114–120. Recuperado de <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=fua&AN=73998932&lang=es&site=ehost-live>

- Lebeau, T., Braud, A., & Je, K. (2008). Performance of bioaugmentation-assisted phytoextraction applied to metal contaminated soils: A review, 153. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.09.015>
- Leon, V. (2017). *Capacidad fitorremediadora de especies altoandinas para suelos contaminados por metales pesados procedentes de la compañía minera Lincuna SAC, en condiciones de invernadero, 2015-2016*. Universidad Nacional Santiago Antunez de Mayolo.
- Li, H. Y., Wei, D. Q., Shen, M., & Zhou, Z. P. (2012). Endophytes and their role in phytoremediation. *Fungal Diversity*, 54, 11–18. <https://doi.org/10.1007/s13225-012-0165-x>
- López, S., Gallegos, M. E., Pérez, L. J., & Rojas, M. G. (2005). Mecanismos de fitorremediación de suelos contaminados con moléculas orgánicas xenobióticas. *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental*, 21(2), 91–100.
- Lú, A. (2009). Potential of Penicillium Species in the Bioremediation Field, 1393–1417. <https://doi.org/10.3390/ijerph6041393>
- Ma, Y., Oliveira, R. S., Freitas, H., & Zhang, C. (2016). Biochemical and Molecular Mechanisms of Plant-Microbe-Metal Interactions: Relevance for Phytoremediation. *Frontiers in Plant Science*, 7(June), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00918>
- Ma, Y., Oliveira, R. S., Nai, F., Rajkumar, M., Luo, Y., Rocha, I., & Freitas, H. (2015). The hyperaccumulator *Sedum plumbizincicola* harbors metal-resistant endophytic bacteria that improve its phytoextraction capacity in multi-metal contaminated soil. *Journal of Environmental Management*, 156, 62–69. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.03.024>
- Ma, Prasad, M. N. V, Rajkumar, M., & Freitas, H. (2011). Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils. *Phytoremediation Bioremediation Rhizoremediation*, 29, 248–258. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.12.001>
- Marzan, L. W., Hossain, M., Mina, S. A., Akter, Y., & Chowdhury, A. M. M. A. (2017). Isolation and biochemical characterization of heavy-metal resistant bacteria from tannery effluent in Chittagong city, Bangladesh: Bioremediation viewpoint. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 43(1), 65–74. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2016.11.002>

- Mayer, A. (1958). Determination of Indol Acetic Acid by the Salkowsky Reaction. *Nature*, 182, 1638–1640.
- Medina, K., & Montano, Y. (2014). *Determinación del factor de bioconcentración y traslocación de metales pesados en el Juncus arcticus Willd . y Cortaderia rudiusscula Stapf , de áreas contaminadas con el pasivo ambiental minero Alianza - Ancash 2013*. Universidad Nacional Santiago Antunez de Mayolo.
- Milagres, A., Machuca, A., & Napleao, D. (1999). Detection of siderophore production from several fungi and bacteria by a modification of chrome Azurol S (CAS) agar plate assay. *Journal of Microbiological Methods*, 1–6. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(99\)00028-7](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(99)00028-7)
- MINAM, (Ministerio del Ambiente). (2014). Guía para el Muestreo de Suelos, 64. Recuperado de <http://www.minam.gob.pe/calidadambiental/wp-content/uploads/sites/22/2013/10/GUIA-PARA-EL-MUESTREO-DE-SUELOS-final.pdf>
- Miransari, M. (2011). Hyperaccumulators, arbuscular mycorrhizal fungi and stress of heavy metals. *Biotechnology Advances*, 29(6), 645–653. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.04.006>
- Mohammadian, M., Soleimani, N., Mehrasbi, M., Darabian, S., Mohammadi, J., & Ramazani, A. (2015). Highly cadmium tolerant fungi: their tolerance and removal potential. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 13(1), 19. <https://doi.org/10.1186/s40201-015-0176-0>
- Moreno, Y., & Vizconde, J. (2006). *Bioacumulación de metales pesados en la leche de ganado vacuno en el área de influencia del pasivo ambiental Chahuapampa-Utucuyacu-Cátac*.
- Nautiyal, C. S. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 170, 265–270.
- Paredes, H. (2013). La geodisponibilidad y biodisponibilidad de metales pesados en la actividad minera.
- Patil, S., Bheemaraddi, M. C., & Shivannavar, C. T. (2014). Biocontrol activity of siderophore producing *Bacillus subtilis* CTS-G24 against wilt and dry root rot causing fungi in chickpea ., 7(9), 63–68.
- Rajkumar, M., Ae, N., & Freitas, H. (2009). Endophytic bacteria and their potential to

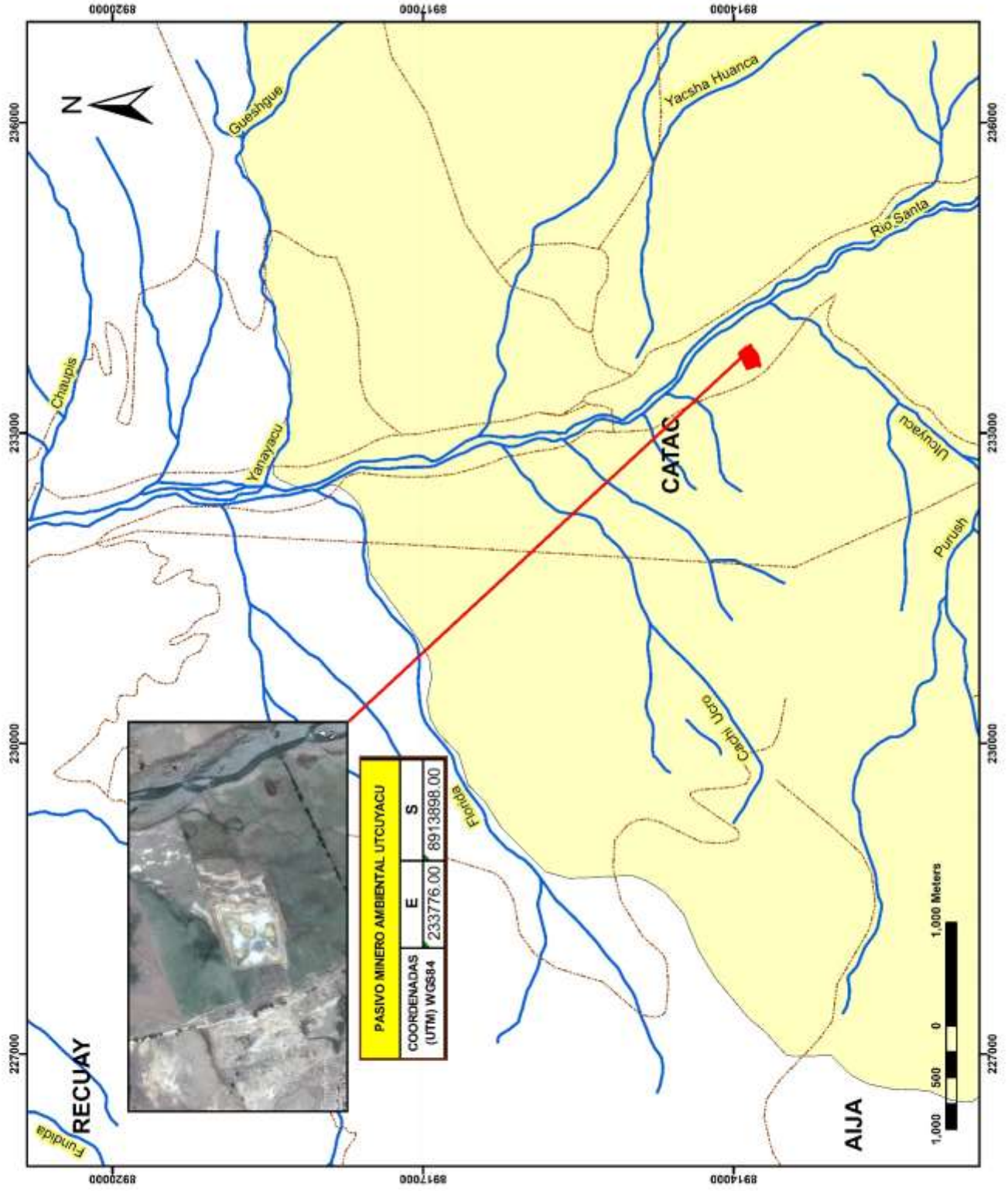
- enhance heavy metal phytoextraction. *Chemosphere*, 77(2), 153–160.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.06.047>
- Rajkumar, M., Ae, N., Narasimha, M., Prasad, V., & Freitas, H. (2010). Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction, (January), 8. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.12.002>
- Rajkumar, M., Sandhya, S., Prasad, M. N. V., & Freitas, H. (2012). Perspectives of plant-associated microbes in heavy metal phytoremediation. *Biotechnology Advances*, 30(6), 1562–1574. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.04.011>
- Rashid, S., Charles, T. C., & Glick, B. R. (2012). Isolation and characterization of new plant growth-promoting bacterial endophytes. *Applied Soil Ecology*, 61, 217–224. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.09.011>
- Rodríguez, R., Estupiñán, M. D. R., Iglesias, M., & Castillo, E. (2007). Evaluación del riesgo ambiental de los pasivos ambientales de la cuenca alta del río Santa en el departamento de Ancash, Perú. In *V congreso internacional de medio ambiente en minería y metalurgia, At Lima, Perú* (p. 9).
- Sánchez, J., & Rodríguez, J. (2010). Fundamentos y Aspectos Microbiológicos: Biorremediación. *Universidad de Oviedo*, 1, 12–16.
- Sayer, J. A., Raggett, S. L., & Gadd, G. M. (1995). Solubilization of insoluble metal compounds by soil fungi : development of a screening method for solubilizing ability and metal tolerance. *Mycological Research*, 99(8), 987–993. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80762-4](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80762-4)
- Schwyn, B., & Neilands, J. . (1987). Universal Chemical Assay for the Detection Determination of Siderophores'. *Analytical Biochemistry*, 56, 47–56.
- Seneviratne, M., Vithanage, M., & Lanka, S. (2015). The Role of Siderophores on Plants under Heavy Meal Stress : A View from the Rhizosphere. *Journal of Botanical Sciences*, 4(3), 23–29.
- Sharma, S. B., Sayyed, R. Z., Trivedi, M. H., & Gobi, T. A. (2013). Phosphate solubilizing microbes : sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils, (Richardson 1994), 1–14.
- Sheng, X. F., Xia, J. J., Jiang, C. Y., He, L. Y., & Qian, M. (2008). Characterization of heavy metal-resistant endophytic bacteria from rape (*Brassica napus*) roots and their potential in promoting the growth and lead accumulation of rape.

- Tamariz, C. (2014). *Diversidad de bacterias termotolerantes celulolíticas y xilanolíticas aisladas de fuentes termales del Callejon de Huaylas. Mirage*. Universidad Nacional Mayor De San Marcos. Recuperado de http://cybertesis.unmsm.edu.pe/xmlui/bitstream/handle/cybertesis/3777/Tamariz_a_c.pdf?sequence=1
- Tamariz, C., Olivera, P., Villena, G., & Gutiérrez, M. (2014). Isolation and identification of cellulolytic and xylanolytic bacteria from Huancarhuaz hot spring. *Annual Research & Review in Biology*, 4(19), 2920–2930. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/262414424_Isolation_and_Identification_of_Cellulolytic_and_Xylanolytic_Bacteria_from_Huancarhuaz_Hot_Spring_Peru
- Tamariz, C., Ulloa, R. del P., Olivera, P., Vega, E., Villena, G., & Gutiérrez, M. (2016). *Evaluación de microorganismos endofíticos de plantas altoandinas*.
- Tank, N., & Saraf, M. (2009). Enhancement of plant growth and decontamination of nickel-spiked soil using PGPR. *Journal of Basic Microbiology*, 49(2), 195–204. <https://doi.org/10.1002/jobm.200800090>
- U.S. Environmental Protection Agency. (1997). *Recent Developments for In Situ Treatment of Metal Contaminated Soils*. [https://doi.org/10.1016/S0304-3894\(97\)00085-X](https://doi.org/10.1016/S0304-3894(97)00085-X)
- Ullah, A., Heng, S., Farooq, M., Munis, 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, R. del P. (2016). *Aislamiento y caracterización molecular de microorganismos endofíticos, asociados a Valeriana sp. y Gentianella weberbaueri y su uso como promotores de crecimiento vegetal*. Universidad Santiago Antonez de Mayolo.
- Yamaji, K., Nagata, S., Haruma, T., Ohnuki, T., Kozaki, T., Watanabe, N., & Nanba, K. (2016). Root endophytic bacteria of a ¹³⁷Cs and Mn accumulator plant, *Eleutherococcus sciadophylloides*, increase ¹³⁷Cs and Mn desorption in the soil. *Journal of Environmental Radioactivity*, 153, 112–119. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2015.12.015>

- Yamaji, K., Watanabe, Y., Masuya, H., Shigeto, A., Yui, H., & Haruma, T. (2016). Root fungal endophytes enhance heavy-metal stress tolerance of *Clethra barbinervis* growing naturally at mining sites via growth enhancement, promotion of nutrient uptake and decrease of heavy-metal concentration. *PLOS One*, *11*(12), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169089>
- Yao, Z., Li, J., Xie, H., & Yu, C. (2012). Review on remediation technologies of soil contaminated by heavy metals, *16*, 722–729. <https://doi.org/10.1016/j.proenv.2012.10.099>
- Yu, X., Li, Y., Zhang, C., Liu, H., Liu, J., Zheng, W., ... Chen, Q. (2014). Culturable heavy metal-resistant and plant growth promoting bacteria in V-Ti magnetite mine tailing soil from Panzhihua, China. *PLoS ONE*, *9*(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106618>

ANEXOS

ANEXO1: MAPA DE UBICACIÓN DEL PASIVO MINERO AMBIENTAL CHAHUAPAMPA



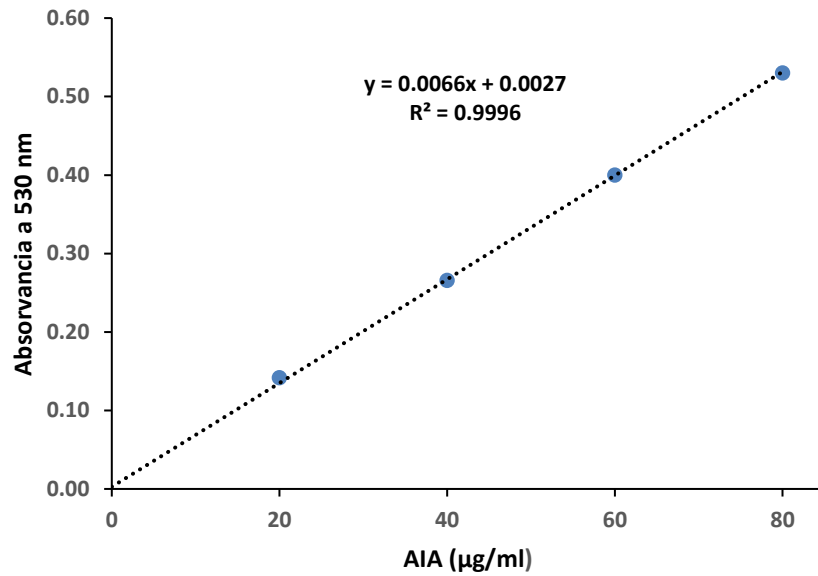
Ubicación departamental



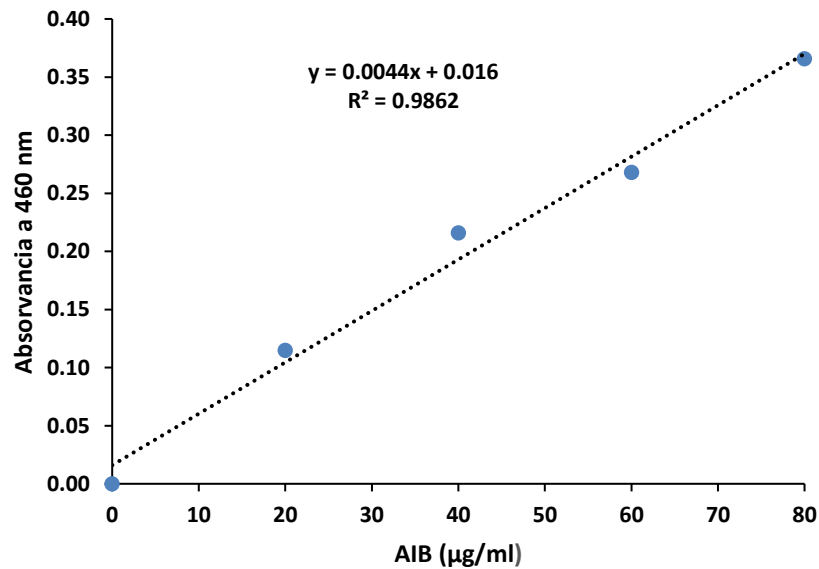
Ubicación distrital



ANEXO 2: CURVA DE CALIBRACIÓN DE ÁCIDO INDOL ACÉTICO (AIA) Y ÁCIDO INDOL BUTÍRICO (AIB)



A: Curva de calibración de ácido Indol acético elaborada con el reactivo de Salkowsky



B: Curva de calibración de ácido Indol butírico elaborada con el reactivo de Salkowsky

ANEXO 3:
REPORTE DE RESULTADOS DE
ANÁLISIS DE SUELOS



INFORME DE ENSAYO CS160034

CLIENTE Razón Social : EDSON PALACIOS ROBLES
 Dirección : Jr. Daniel Villaizán N° 169 - Independencia
 Atención : Edson Palacios Robles

MUESTRA Producto declarado : Suelo de Relave
 Matriz : Suelo
 Procedencia : Centro Poblado de Utcuyacu - Catac
 Ref./Condición : Cadena de Custodia CC160032

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

LABORATORIO Fecha de recepción : 20/Octubre/2016
 Fecha de análisis : 20 de Octubre - 04 de Noviembre/2016
 Cotización N° : CO160798

CÓD.	PARÁMETRO	UNIDAD DE MEDIDA	MÉTODO	LÍMITE DE DETECCIÓN	MUESTRA	
					Código del cliente	Ref 01
					Fecha de muestreo	08/10/2016
					Hora muestreo	11:00
					Código del Laboratorio	CS160034
FQS	ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS EN SUELOS					
FQS10	pH (en laboratorio)	Unid. pH	NOM21-AS-Q2 (*)			3.03
MS	METALES EN SUELOS					
MS01	Aluminio total	mg/Kg Al	Cromozurrol S (*)	0.200		7848.569
MS03	Arsénico total	mg/ Kg As	Plata - DDTC (*)	0.500		< 0.500
MS08	Cadmio total	mg/Kg Cd	Derivé de cadion (*)	0.02		1.67
MS11	Cobre total	mg/l Cu	Cuprizona (*)	0.02		192.58
MS16	Hierro total	mg/Kg Fe	Triazina (*)	0.05		2550.46
MS20	Mercurio total	mg/Kg Hg	Cetona de Michler (*)	25		< 25
MT22	Niquel total	mg/l Ni	Dimetilgloxina (*)	0.02		6.83
MS24	Plomo total	mg/Kg Pb	PAR (*)	0.100		151.579
MT32	Zinc total	mg/l Zn	Cl-PAN (*)	0.05		48.61

(*) Los métodos indicados han sido acreditados por el INACAL - DA

* Datos proporcionados por el cliente



Guim. Mario Leyva Coñas
 Jefe del Laboratorio de Calidad Ambiental
 FCAM - UNASAM
 CCP N° 604

Huaraz, 04 de Octubre de 2016

Está prohibida la reproducción de este informe salvo autorización del Laboratorio de Calidad Ambiental. Los resultados son válidos sólo para las muestras analizadas en el mismo. Las contramuestras o muestras dicientes se conservarán de acuerdo a su tiempo de perecibilidad.



INFORME DE ENSAYO CS160035

CLIENTE Razón Social : EDSON PALACIOS ROBLES
 Dirección : Jr. Daniel Villaizan N° 169 - Independencia
 Atención : Edson Palacios Robles

MUESTRA Producto declarado : Suelo de Relave
 Matriz : Suelo
 Procedencia : Centro Poblado de Utcuyacu - Catac
 Ref./Condición : Cadena de Custodia CC160032

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

LABORATORIO Fecha de recepción : 20/Octubre/2016
 Fecha de análisis : 20 de Octubre - 04 de Noviembre/2016
 Cotización N° : CO160796

CÓD.	PARÁMETRO	UNIDAD DE MEDIDA	MÉTODO	LÍMITE DE DETECCIÓN	MUESTRA	
					Código del cliente	Riel 02
					Fecha de muestreo	08/10/2016
					Hora muestreo	11:15
					Código del Laboratorio	CS160035
FQS ANALISIS FISICOQUIMICOS EN SUELOS						
FQS10	pH (en laboratorio)	Unid. pH	NOM21 -AS- 02 (*)			4.04
MS METALES EN SUELOS						
MS01	Aluminio total	mg/Kg Al	Cromoazuro S (*)	0.200		261.598
MS03	Arsénico total	mg/Kg As	Plata - DDTG (*)	0.500		< 0.500
MS08	Cadmio total	mg/Kg Cd	Deriv. de cadion (*)	0.02		452.83
MS11	Cobre total	mg/Kg Cu	Cuprizona (*)	0.02		40.79
MS16	Hierro total	mg/Kg Fe	Triaxina (*)	0.05		934.63
MS20	Mercurio total	mg/Kg Hg	Cétones de Michler (*)	25		< 25
MT22	Níquel total	mg/Kg Ni	Dimetilgioxina (*)	0.02		8.85
MS24	Plomo total	mg/Kg Pb	PAR (*)	0.100		132.098
MT32	Zinc total	mg/Kg Zn	C-PAN (*)	0.05		747.66

(*) Los métodos indicados No han sido acreditados por el INACAL - DA

† Datos proporcionados por el cliente



Quím. Mario Leyva Colias
 Jefe del Laboratorio de Calidad Ambiental
 FCAM - UNASAM
 CQP N° 604

Huaraz, 04 de Noviembre de 2016

Está prohibida la reproducción de este informe salvo autorización del Laboratorio de Calidad Ambiental.
 Los resultados son válidos sólo para las muestras analizadas en el mismo. Los contramuestras o muestras dicientes se conservarán de acuerdo a su tiempo de perecibilidad.

ANEXO 4:
PANEL FOTOGRAFICO



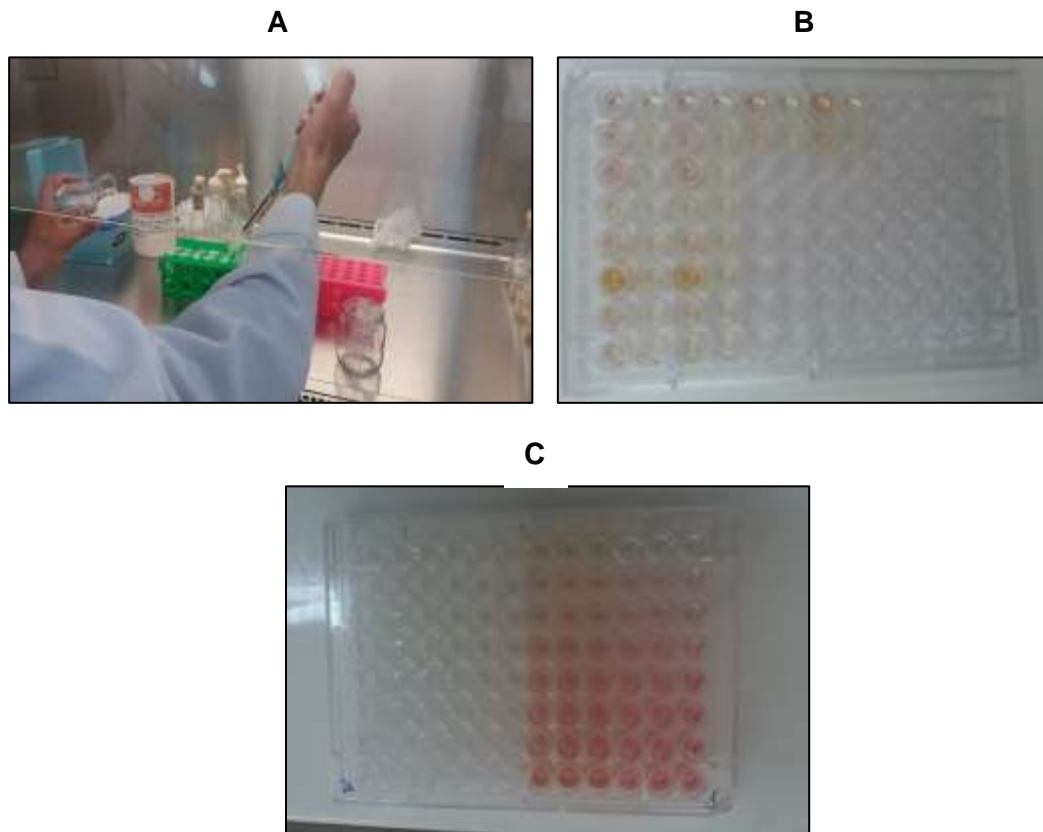
Fotografía 1: A: Recolección de la especie *Scirpus rigidus* de suelo contaminando, B: Colocación de *Scirpus rigidus* en bolsa estéril ziploc, C: Recolección de suelo de rizosfera en bolsa ziploc, D: Muestras colectadas.



Fotografía 2: Aislamiento de microorganismos endofíticos. A: Muestras de raíces y tallos desinfectados, listos para la siembra, B: Microorganismos endofíticos aislados



Fotografía 3: Prueba de producción de sideróforos. A: Siembra de inoculo de bacterias en las placas con Agar CAS, B: Resultados positivos de la prueba en bacterias después de tres días.



Fotografía 4: Prueba de producción de **Ácido Indol Acético**. A: Dispensación del triptófano en microtubos, B: Resultado final de la prueba, donde la coloración rosa indicó la producción de AIA. B: Reacción de AIA comercial y reactivo de Salkowsky a diferentes concentraciones para la elaboración de la curva de calibración.

A



B



C



D



Fotografía 5: Amplificación y secuenciación de muestras de ADN. A: Colocación de muestras en el termociclador para la amplificación de ADN, B: Electroforesis de las muestras amplificadas, C y D toma de fotografías del gel de electroforesis.

ANEXO 5:
COMPARACIÓN MÚLTIPLE DE MEDIAS
MEDIANTE LA PRUEBA DUNCAN DE LAS
DIFERENTES PRUEBAS

Cuadro 1: Prueba Duncan del índice CAS-Fe en bacterias

Código de cepa	Medias	N	E.E.	Subconjuntos para alfa = 0.05		
BRU10	1.03	10	0.04	b		
BRU11	1.02	10	0.04	b		
BRU14	1.03	10	0.04	b		
BRU16	1.78	10	0.04			a
BRU18	1.87	10	0.04			a

Cuadro 2: Prueba Duncan del índice CAS-AI en bacterias

Código de cepa	Medias	N	E.E.	Subconjuntos para alfa = 0.05		
BRU14	1.32	10	0.05	c		
BRU11	1.69	10	0.05		b	
BRU10	1.83	10	0.05		b	a
BRU18	1.92	10	0.05			a
BRU16	1.98	10	0.05			a

Cuadro 3: Prueba Duncan del índice CAS-Fe en hongos

Código de cepa	Medias	N	E.E.	Subconjuntos para alfa = 0.05		
HRU02	1.02	10	0.05	d		
HEU01	1.22	10	0.05		c	
HRU07	1.58	10	0.05			b
HRU11	2.17	10	0.05			a
HEU17	2.23	10	0.05			a
HEU11	2.23	10	0.05			a

Cuadro 4: Prueba Duncan del índice CAS-AI en hongos

Código de cepa	Medias	N	E.E.	Subconjuntos para alfa = 0.05			
HEU01	1.23	10	0.03	e			
HRU02	1.65	10	0.03		d		
HRU07	1.99	10	0.03			c	
HEU11	2.17	10	0.03				b
HRU11	2.23	10	0.03				b a
HEU17	2.32	10	0.03				a

Cuadro 5: Prueba Duncan del índice de solubilización de cadmio en hongos

Código de cepa	Medias	N	E.E.	Subconjuntos para alfa = 0.05	
HEU01	1.08	10	0.01	b	
HEU11	1.08	10	0.01	b	
HRU11	1.09	10	0.01	b	
HRU07	1.92	10	0.01		a

Cuadro 6: Prueba Duncan del Índice de solubilización de fosfatos en bacterias

Código de cepa	Medias	N	E.E.	Subconjuntos para alfa = 0.05			
BRU10	0	10	0.07	d			
BRU14	0	10	0.07	d			
BRU11	1.19	10	0.07		c		
BRU18	1.9	10	0.07			b	
BRU16	5.08	10	0.07				a

Cuadro 7: Prueba Duncan de la producción de ácido indol acético en bacterias

Código de cepa	Medias ($\mu\text{g/mL}$)	N	E.E.	Subconjuntos para alfa = 0.05		
BRU14	1.05	4	0.15	b		
BRU18	4.2	4	0.15			a

Cuadro 8: Prueba Duncan de la producción de ácido indol acético en hongos

Código de cepa	Medias ($\mu\text{g/mL}$)	N	E.E.	Subconjuntos para alfa = 0.05		
HRU11	1.87	4	0.16	c		
HEU01	2.97	4	0.16		b	
HRU02	3.08	4	0.16		b	
HEU11	3.35	4	0.16		b	
HEU17	6.08	4	0.16			a