



**FACULTAD DE CIENCIAS AMBIENTALES
CARRERA DE INGENIERÍA AMBIENTAL**

**“CAPACIDAD DE REMEDIACION DE SUELOS CONTAMINADOS
CON METALES CON MAIZ VAR. CHINGASINO (*ZEA MAYS L.*)
ASISTIDO POR BACTERIAS PROMOTORAS DEL
CRECIMIENTO VEGETAL (PGPR)”**

Tesis para optar por el grado de:
INGENIERO AMBIENTAL

Presentado por:

Joseph Steven Tapullima Montejo (0000-0003-4879-5263)

Asesora:

Susan Mery Medina Canzio (0000-0003-2574-7728)

Co-Asesora:

Doris Elizabeth Zuñiga Dávila (0000-0002-4564-6775)

Lima – Perú
2021

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Lima, 10 de enero 2022.

Los integrantes del Jurado de tesis:

Presidente: Mg. Ing. Juan Alberto Palomino Vega
Miembro: Mg. Blgo. Armando Jesús Edilberto Vélez Azañero
Miembro: Mg. Ing. Javier Alvarado Llerena

Se reúnen para evaluar la tesis titulada:

“CAPACIDAD DE REMEDIACION DE SUELOS CONTAMINADOS CON METALES CON MAIZ VAR. CHINGASINO (ZEA MAYS L.) ASISTIDO POR BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL (PGPR)”

Presentada por el bachiller:

- **Joseph Steven Tapullima Montejo**

Para optar el Título Profesional de Ingeniero Ambiental

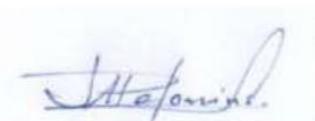
Asesorado por: Dra. Susan Mery Medina Canzio

Co-Asesorado por: Dra. Doris Zuñiga Dávila

Luego de haber evaluado el informe final de tesis y evaluado el desempeño del estudiante de la carrera de Ingeniería Ambiental a en la sustentación, concluyen de manera unánime (X) por mayoría simple () calificar a:

Tesis: Joseph Steven Tapullima Montejo		Nota (en letras): 16 (DIECISESIS)	
Aprobado ()	Aprobado - Muy buena (X)	Aprobado - Sobresaliente ()	Desaprobado ()

Los miembros del jurado firman en señal de conformidad.



Mg. Ing. Juan Alberto Palomino Vega
Presidente



Mg. Armando Jesús Edilberto Vélez Azañero
Miembro 1



Mg. Ing. Javier Alvarado Llerena
Miembro 2



Dra. Susan Mery Medina Canzio
Asesor

AGRADECIMIENTOS

Un agradecimiento especial a mi familia a mis papás Juan y Maritza por su constante apoyo y respaldo a lo largo de toda mi preparación profesional, a Pamela y Alessia por ser mi motivo y a María Claudia y María José por todo su tiempo a lo largo de este aprendizaje.

Agradezco también a mi Asesora, la Dra. Susan Medina por sus enseñanzas, dedicación y confianza, a mi Co-Asesora, la Dra. Doris Zuñiga por su confianza y apoyo con el estudio y a los Proyectos 238-2015 y 009-2017-Fondecyt (Perú) y Senacyt (Ecuador) por sus valiosas investigaciones.

INDICE GENERAL

I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	1
II. MARCO TEORICO.....	3
1. Antecedentes Bibliográficos.....	3
1.1 Acumulación de metales en plantas.....	3
1.2 Interacción de bacterias en la rizosfera de la planta	5
1.3 Capacidad de fitoestabilización.....	6
1.4 Bioadsorción de metales Sinergia entre plantas y bacterias.....	8
2. Bases Teóricas.....	9
2.1. Contaminación de Suelo por Metales.....	9
2.1.1 Contaminación de suelo por fuentes naturales.....	10
2.1.2 Contaminación del suelo por fuentes antropogénica.....	11
a) Contaminación de Hierro (Fe) en el suelo y sus efectos.....	12
b) Contaminación de Cobre (Cu) en el suelo y sus efectos.....	13
c) Contaminación de Manganeseo (Mn) en el suelo y sus efectos.....	14
d) Contaminación de Zinc (Zn) en el suelo y sus efectos.....	15
2.2. Principales procesos de remediación en plantas.....	16
2.2.1 Fitoextracción.....	16
2.2.2 Fitoestabilización.....	17
2.2.3 Fitovolatilización.....	18
2.2.4 Rizodegradación.....	18
2.3. Zea Mays L. Var. Chingasino.....	18
2.4. Bacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal.....	19
2.4.1 Rhizobium.....	20
2.4.2 Azotobacter.....	20
2.4.3 Pseudomonas.....	22
2.4.4 Azospirillum.....	23
2.4.5 Trichoderma.....	24
2.4.6 Bacillus.....	25

III. OBJETIVOS.....	26
3.1 Objetivo General.....	26
3.2 Objetivos Específicos.....	26
IV. METODOLOGIA.....	26
1. Recolección de pasivos Mineros.....	26
2. Material vegetal para la Biorremediación.....	28
3. Cepas PGPR.....	28
4. Experimento de Biorremediación.....	29
5. Análisis de las muestras de suelo.....	32
6. Análisis de bioadsorción de las plantas.....	33
7. Cálculo del Factor de Bioconcentración y Translocación.....	34
8. Análisis Estadístico de los datos.....	36
V. RESULTADOS.....	36
VI. DISCUSION.....	65
VII. CONCLUSION.....	77
VIII. RECOMENDACIONES.....	79
IX REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	80
X. ANEXOS.....	97

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Plano de Ubicación Pasivo Minero “Cata”	27
Figura 2. Diseño de Tratamientos.....	29
Figura 3. Proceso de Experimentación en Línea de Tiempo.....	34
Figura 4. Proceso de Inoculación de PGPR en T1 y T2.....	34
Figura 5. Contenido de Clorofila (SPAD).....	38
Figura 6. Área Foliar (cm ³)	40
Figura 7. Altura (cm)	42
Figura 8. # Hojas	44
Figura 9. Peso Fresco Radicular (g)	46
Figura 10. CIC (meq/100g).....	48

Figura 11. Materia Orgánica Total (%).....	50
Figura 12. Conductividad Eléctrica (mS/cm)	52
Figura 13. Concentración Foliar de Hierro (mg/Kg).....	54
Figura 14. Concentración Radicular de Hierro (mg/Kg)	55
Figura 15. Concentración Foliar de Cobre (mg/Kg).....	56
Figura 16. Concentración Radicular de Cobre (mg/Kg)	57
Figura 17. Concentración Foliar de Zinc (mg/Kg).....	58
Figura 18. Concentración Radicular de Zinc (mg/Kg)	59
Figura 19. Concentración Foliar de Manganeso (mg/Kg)	61
Figura 20. Concentración Radicular de Manganeso (mg/Kg).....	62

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Desarrollo Vegetativo y Reproductivo de la especie Zea Mays L.....	19
Tabla 2. Línea Base de Caracterización Edafológica y de Concentración de Metales...36	
Tabla 3. Factor de Bioconcentración Aéreo.....	63
Tabla 4. Factor de Bioconcentración en Raíz.....	64
Tabla 5. Factor de Bioconcentración en la planta - Biomasa Total.....	64
Tabla 6. Factor de Translocación.....	65
Tabla 1s. Prueba de ANOVA Unifactorial de Parámetros Fisiológicos.....	97
Tabla 2s. Concentraciones de Clorofila.....	97
Tabla 3s. Comparaciones Múltiples por Concentración de Clorofila.....	97
Tabla 4s. Área Foliar.....	98
Tabla 5s. Comparaciones Múltiples por Área Foliar.....	98
Tabla 6s. Altura del Tallo.....	98
Tabla 7s. Comparaciones Múltiples por Altura de Tallo.....	99
Tabla 8s. Número de Hojas.....	99
Tabla 9s. Comparaciones Múltiples por Número de Hojas.....	99
Tabla 10s. Peso Fresco Radicular.....	100
Tabla 11s. Comparaciones Múltiples por Peso Fresco Radicular.....	100
Tabla 12s. Prueba de ANOVA Unifactorial de Parámetros Edafológicos.....	100
Tabla 13s. Capacidad de Intercambio Catiónico.....	101

Tabla 14s. Comparaciones Múltiples por Capacidad de Intercambio Catiónico.....	101
Tabla 15s. Materia Orgánica Total.....	101
Tabla 16s. Comparaciones Múltiples por Materia Orgánica Total.....	101
Tabla 17s. Conductividad Eléctrica.....	102
Tabla 18s. Comparaciones Múltiples por Conductividad Eléctrica.....	102
Tabla 19s. Prueba de ANOVA Unifactorial de Concentración Foliar de Metales.....	102
Tabla 20s. Comparaciones Múltiples por Concentración Foliar de Hierro.....	103
Tabla 21s. Comparaciones Múltiples por Concentración Foliar de Cobre.....	103
Tabla 22s. Comparaciones Múltiples por Concentración Foliar de Zinc.....	103
Tabla 23s. Comparaciones Múltiples por Concentración Foliar de Manganeso.....	104
Tabla 24s. Prueba de ANOVA Unifactorial de Concentración Radicular de Metales....	104
Tabla 25s. Comparaciones Múltiples por Concentración Radicular de Hierro.....	105
Tabla 26s. Comparaciones Múltiples por Concentración Radicular de Cobre.....	105
Tabla 27s. Comparaciones Múltiples por Concentración Radicular de Zinc.....	105
Tabla 28s. Comparaciones Múltiples por Concentración Radicular de Manganeso.....	106

RESUMEN

La sinergia entre la especie *Zea Mays L. var Chingasino* y una diversidad de Bacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (PGPR) para modelar una remediación fitobiana, es puesta a prueba sobre suelo contaminado con Hierro (Fe) Cobre (Cu) Manganeseo (Mn) y Zinc (Zn) proveniente de un pasivo ambiental del C.P Santa Rosa de Cata. Se estructuraron tres tratamientos, cada uno con tres concentraciones de relave (30, 60 y 100%) de los cuales al T₁ no se le asoció ninguna PGPR, al T₂ se le inoculó la PGPR *R. Endophyton 148J* y al T₃ se le inoculó un consorcio de las PGPR *Trichoderma sp.*, *Pseudomonas fluorescens*, *Azotobacter sp.*, *Bacillus subtilis* y *Azospirillum sp* y por último, un Control no contaminado con relaves o inoculantes. Se evaluaron parámetros fisiológicos y edafológicos, así como la concentración de los metales en el suelo y en el área radicular y foliar de la planta, junto con sus respectivos Factores de Bioconcentración y Translocación. Se evidenció la capacidad intrínseca de la especie *Zea Mays L. var Chingasino* para fitoextraer estos metales en el T₁, así como la capacidad de fitoestabilizar e inhibir la fitotoxicidad cuando el sinergismo es entre *R. Endophyton 148J* y la planta en el T₂ y por último, incrementar ampliamente la fitoextracción en el área foliar cuando se convergen los mecanismos del consorcio microbiano del T₃ con la especie *Zea Mays L.*, además de promoverse en los tratamientos inoculados, la equiparación o predominancia de los parámetros fisiológicos y edafológicos en comparación a un cultivo no contaminado con metales.

Palabras Clave: Bacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (PGPR), fitoextracción, fitoestabilización, Factor de Bioconcentración, Factor de Traslocación, remediación fitobiana, *Zea Mays L.*

ABSTRACT

The synergy between the *Zea Mays L. var Chingasino* species and a diversity of Plant Growth Promoting Bacteria (PGPR) to model a phytobial remediation, is tested on soil contaminated with Iron (Fe) Copper (Cu) Manganese (Mn) and Zinc (Zn) from an environmental liability of the Santa Rosa de Cata CP. Three treatments were structured, each with three concentrations of tailings (30, 60 and 100%) where T1 was not associated with any PGPR, T2 was inoculated with PGPR *R. Endophyton 148J* and T3 was inoculated with a consortium of the PGPR *Trichoderma sp.*, *Pseudomonas fluorescens*, *Azotobacter sp.*, *Bacillus subtilis* and *Azospirillum sp* and finally, a Control which was not contaminated with tailings or inoculants. Physiological and edaphological parameters were evaluated, plus the concentration of metals in the soil and in the root-shoot plant areas, also their respective Bioconcentration and Translocation Factors. The results evidenced the intrinsic capacity of the *Zea Mays L. var Chingasino* species to phytoextract these metals in T1, as well as the ability to phytostabilize and inhibit phytotoxicity when the synergism is between *R. Endophyton 148J* and the plant in T2, and finally, increase the phytoextraction in the foliar area when the mechanisms of the microbial consortium of T3 converge with *Zea Mays L.*, a part of promoting in the inoculated treatments, the equalization or predominance of the physiological and edaphological parameters compared to a non-crop contaminated with metals.

Keywords: Plant Growth Promoting Bacteria (PGPR), phytoextraction, phytostabilization, Bioconcentration Factor, Translocation Factor, phytobial remediation, *Zea Mays L.*

I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El Perú es el vigésimo cuarto país más atractivo para la inversión minera en el mundo y el tercero en América Latina, según el Fraser Institute de Canadá (Stedman A. et al., 2020), con inversiones de más de US\$ 6150 millones en el 2019 (MINEM, 2019). Por otro lado, esta industria no le ha traído únicamente ingresos al país, si no también conflictos socio-ambientales, los cuales conforman el 65.5% de los 197 conflictos activos en el país hasta diciembre del 2020, de los cuales el 64.3% están estrictamente relacionados con la actividad minera (Defensoría del Pueblo, 2021). Para el año 2020 se identificaron 7956 pasivos ambientales provenientes de la industria minera, de los cuales menos del 5% cuentan con responsable o estudio ambiental alguno (MINEM, 2020).

Existen diversos compuestos en el suelo conformados por metales dentro de los pasivos ambientales, ya sea asociados con la materia orgánica, como iones libres, óxidos, hidróxidos, carbonatos e incluso incorporados en la estructura de minerales silicatados (Cristaldi et al., 2017), depende de la estructura del compuesto su grado de movilidad en la matriz y la consecuente efectividad entre un tratamiento u otro (Abad-Valle, 2017). La presencia de estos metales en los ecosistemas se convierte en un peligro potencial, especialmente cuando el grado de movilidad es alto, desencadenando una contaminación al ambiente y a los seres vivos, la cual es bioacumulable a través de la cadena trófica hasta llegar al hombre (Da Conceição M. et al., 2016).

En el 2004, el Estado promulgó la Ley N° 28271, con el objetivo de regular los pasivos ambientales mineros, creando Fondo Nacional del Ambiente-FONAM (Ley N°28271, 2004), actualmente, es el Fondo de Promoción de Áreas Naturales Protegidas (PROFONANPE) el encargado de gestionar la financiación y desarrollo de los

proyectos de remediación ambiental en el Perú (Decreto de Urgencia N° 022-2020, 2020), siendo las cuencas de los ríos Pastaza, Corrientes y Tigre en Loreto los sitios con pasivos en proceso de evaluación más reciente (PROFONANPE, 2021). Estas acciones de parte del Estado dan cavidad a las empresas e instituciones públicas y privadas a atender la crisis socio-ambiental en el país mediante Planes de Rehabilitación viables y aplicables así como la promoción de investigación y desarrollo de tecnologías que afronten esta problemática.

En el campo específico de la contaminación del suelo por compuestos polimetálicos, ya se han venido desarrollado en diferentes partes del mundo investigaciones sobre herbáceas capaces de remediar pasivos mineros o sobrevivir a ambientes naturales muy similares. Babu et al. (2013), demostró la funcionabilidad de la remediación del suelo con ejemplares de *Alnus firma* para acumular más de 2000 mgAs/Kg y 800 mgCu/Kg de relaves mineros en raíces y hojas, Hadi y Bano (2010) extrajeron de un suelo contaminado 2162 ugPb/g en raíces, hojas y tallos de *Zea Mays L*, Wu et al. (2006) investigo la capacidad de fitoestabilización de la ampliamente estudiada *B. Juncea* sobre suelos contaminados por relaves, obteniendo concentraciones de hasta 70mgPb/Kg 1250 mgZn/Kg y 100mgCu/Kg en su tejido radicular. Investigaciones como estas forjan el desarrollo de alternativas cuya factibilidad han venido siendo estudiadas y debatidas en los últimos años, en donde los organismos vegetales cumplen principalmente la función de modificar la dinámica de un contaminante, inmovilizándolo en el suelo y evitando su propagación (fitoestabilización) o extrayéndolo de la matriz, bioacumulándolo y remediando el terreno (fitoextracción) o degradando agentes orgánicos contaminantes (fitodegradación) (Doni et al., 2015; Cristaldi et al., 2017).

La presente tesis, plantea desarrollar una solución, que combina las tecnologías de fitorremediación con la interacción de bacterias PGPR sobre los suelos contaminados.

II. MARCO TEORICO

1. Antecedentes Bibliográficos

1.1 Acumulación de metales en plantas

La bioacumulación de metales, es una característica que solo se presenta en ciertas especies y frente a ciertos metales específicos, Bech et al. (2012) estudió dos especies de plantas halladas en estado silvestre sobre un pasivo ambiental de mineras polimetálicas en Cajamarca, la investigación determinó las concentraciones de Pb y Zn tanto en la biomasa de las plantas como en la matriz donde se desarrollaron de forma natural, su estudio determinó el potencial de la *Bidens triplinervia* como especie fitoestabilizadora y de la *Senecio sp.* como planta fitoextractora de dichos metales, a pesar de que a ninguna de las dos plantas se le ha realizado mayor investigación al respecto, se deja en claro la existencia de especies capaces de sobrevivir a estos pasivos mineros y de extraer o mitigar la propagación de los metales presentes en el suelo sin la asistencia del ser humano.

Dueñas (2015) reportó un pasivo ambiental por extracción de oro ubicado en el distrito Inambari en la región de Madre de Dios, evaluando la concentración de metales, principalmente Hg, tanto en el suelo como en una plantación piloto de Guaba (*Inga edulis*) en un proyecto de restauración ambiental a causa de la minería aluvial, donde se registra una precipitación promedio anual de 2000mm (MINAGRI, 2010). Para la realización de estos objetivos se analizó la raíz, hojas y frutos de la *I. edulis* y se tuvo en cuenta la zona en la que creció esta especie, alta media o baja según su tendencia a

inundarse. Su investigación no encontró presencia de Hg en sus resultados, pero si de Cu, Ni, Cr y Zn. La elección de la especie *I. edulis* fue clave para el objetivo de remediación, debido a la capacidad fitoextractiva que posee la especie por encima de la de fitoestabilización, de tal forma que se contrarreste el proceso de lixiviación ocasionado por los grandes volúmenes de lluvia.

La especie *Zea mays L.* también ha sido estudiada con anterioridad sobre otros metales, Vargas (2017) caracterizó a la especie *Z. mays L.* como apta para procesos de fitoextracción de plomo, sin embargo, asistió a sus individuos con enmiendas diferentes, usando compost y humus a base de flores, lo que permitió en sus tratamientos incrementar la capacidad de traslocación de la especie y almacenar el metal en las hojas de la misma, pese a las funciones metabólicas de la planta para impedir el paso de este elemento en particular.

Jara et al. (2014) investigaron la aptitud para fitoextraer o fitoestabilizar de cinco especies alto andinas: *Solanum nitidum*, *Brassica rapa*, *Fuertesimalva echinata*, *Urtica urens* y *Lupinus ballianus*, expuestas a diferentes concentración de suelos ricos en metales pesados provenientes de relaves mineros. El Índice de Tolerancia (IT) y las concentraciones de metales en la biomasa seca de estas especies, reflejaron su capacidad para remediar suelos contaminados con dichos elementos, pero además dan a conocer especies que encajan con la realidad minera de nuestro país, donde muchas de las concesiones mineras existentes se acentúan a miles de metros sobre el nivel mar al igual que los pasivos mineros que dejan a su paso.

1.2 Interacción de bacterias en la rizosfera de la planta

La rizosfera es el medio más diverso y rico en fauna microbiológica de un cultivo, la presencia de ciertas bacterias, protozoos, nematodos y hongos, son claves para determinar el desarrollo o muerte de la planta. Marin (2016) en su investigación sobre descontaminación de suelos con petróleo crudo en Venezuela, propugnó también la eficiencia de tratamientos en base a organismos vivos, específicamente mediante la bioestimulación de la flora bacteriana ya presente en los suelos contaminados mediante extractos de cascaras de naranja (*Citrus Sinensis*), las dosis aplicadas en el suelo contaminado significaron el incremento de la biodegradación del crudo de petróleo y de la eficiencia en el crecimiento de plantas de maíz (*Zea Mays L. Var. Reventón*) la cual fue usada como bioindicador de la efectividad de la bioestimulación, haciéndose seguimiento a los parámetros fisiológicos de la misma. Aunque no se realizó un tratamiento correlativo haciendo uso de las capacidades del maíz, si se evidenció la importancia de una asociación microbiológica con las plantas para promover su desarrollo frente a ambientes contaminados.

Dentro de la rizósfera de un cultivo, también se da lugar a los mecanismos de tolerancia de los cultivos expuestos a altos niveles de metales pesados. Babu et al. (2013) estudiaron la inoculación de semillas de *Alnus firma* con *B. thuringiensis* GDB-1, logrando incrementar significativamente la longitud de las raíces (141%), la altura de las hojas (144%) y la biomasa seca (170%) comparado con individuos sin inoculantes, esto debido a la producción de Ácido Indol-3-Acético y enzimas ACC desaminasa que inhiben la sobreproducción del etileno, responsable de la muerte tisular en las raíces a causa del estrés por metales, mediante la hidrolización del ACC precursor del etileno, a α -

cetobutirato y amonio. Otro mecanismo de protección de esta bacteria endófito hacia su huésped es la compensación de la inhibición de la absorción de P ocasionado por los metales pesados, con la solubilización de este nutriente.

Por otro lado, Ying Ma et al. (2015) estudiaron la capacidad de fitorremediación asociando la especie *Sedum plumbizincicola* con las bacterias *Bacillus pumilus* E2S2 y *Bacillus sp.* E1S2, apoyándose en la producción de Ácido Indol-3-Acético, enzimas ACC desaminasa, sideroforos y solubilizadores de fósforo de estas cepas, logrando promover la absorción de Cd, desde 125mg/Kg en individuos no inoculados, hasta 180mg/Kg y 165mg/Kg respectivamente en hojas y raíces de individuos inoculados. Así mismo, las bacterias promovieron la absorción de Zn, desde 2250 mg/Kg hasta los 2500 mg/Kg y 2700 mg/Kg respectivamente.

1.3 Capacidad de fitoestabilización

Pastor (2012) investigó también la respuesta del maíz como especie fitoestabilizadora, el contaminante analizado fueron metales pesados producto de antiguas exploraciones mineras, específicamente de Al, Mn, As, Zn y Cd, su objeto de estudio se basó principalmente en analizar la capacidad intrínseca del maíz sin asociar su rendimiento con ningún otro tipo de tratamiento microbiológico paralelo, sin embargo, el suelo contaminado, previamente fue la matriz del crecimiento de una comunidad de pastos durante 2 años, escena que retrataba la realidad de muchos cultivos forrajeros en España. Los resultados de Pastor indicaron la alta persistencia de los metales a pesar de la absorción de las gramíneas, obligando al metabolismo del maíz a interactuar con los metales y evidenciando su alta capacidad de estabilizar Al, Zn, Pb y As en suelos ácidos y Cd en suelos básicos, caracterizándola como una especie principalmente

fitoestabilizadora analógica al potencial de hidrogeno presente en el suelo, sin embargo se encontraron también concentraciones altas de Cd, As, Cu, Mn, Pb y Zn en la parte área de la planta, principalmente en las hojas, lo suficiente como para exceder los niveles de referencia para alimentos según la OMS.

Este mismo mecanismo lo estudió también Munive et al. (2018) mediante una investigación en Lima cuyo objeto fue estudiar el comportamiento del Maíz (*Zea Mays* L. Var Cuzqueado-Hualhuas) frente a suelos contaminados por actividades mineras del valle del Mantaro con altas concentración de Pb y Cd, para lo cual se prepararon enmiendas de compost y vermicompost de Stevia. Los resultados de este estudio ponen en evidencia los efectos negativos sobre la especie producto de la contaminación, pero también su capacidad fitoestabilizadora, caracterizándola como una especie excluyente y a las enmiendas usadas aptas para la solubilización y posterior absorción de los metales pesados presentes por parte de la planta, demostrando así la importancia de tratamientos sinérgicos al momento de remediar un suelo.

Oyuela et al. (2017) publicaron toda una recopilación de información sobre las familias, géneros y especies nativas y endémicas de Colombia, que han sido estudiadas con el propósito de remediación de suelos contaminados, proporcionándonos una extensa bibliografía a analizar sobre el tema, la cual contribuyo también al desarrollo de la presente tesis. Además de esto, uno de los aportes más significativos que nos plasmó el autor, es el uso de especies nativas por encima de las exóticas, ya que pueden traer consigo problemas ambientales difíciles de manejar, como la disminución o extinción de las especies locales, lo que desencadenaría en la pérdida de especies de flora y de fauna que se sostenían de la especie desplazada, conllevando a una pérdida de biodiversidad

en el ecosistema. Por otro lado, se recalca el uso de especies herbáceas principalmente, por su rápida adaptación a climas, sitios contaminados, niveles de toxicidad y propiedades del sustrato sobre el que se desarrollan, esto sustentado por su capacidad de producir varios genotipos en un corto tiempo debido al corto ciclo de vida que tienen.

1.4 Bioadsorción de metales Sinergia entre plantas y bacterias

Madhumita et al. (2015) tuvo como uno de sus objetivos exponer las diferentes formas de acción que tienen las plantas para fitorremediar suelos, específicamente aquellos contaminados con Arsénico ya sea volatilizándolo a la atmósfera o movilizándolo o inmovilizándolo en la matriz del suelo, pero más aún expone las ventajas de dichos mecanismos junto a la integración de técnicas de biorremediación por microorganismos en suelos contaminados con As, generándose todo un escenario de sinergismo en la rizósfera del cultivo tras la inoculación de dichos microorganismos, con el propósito de que ambas técnicas se complementen la una a la otra, contrarrestando así, las debilidades de cada técnica por separado y maximizando la remediación. Este nuevo enfoque denominado *phytobial* en inglés, incentiva la investigación de nuevas relaciones entre microorganismos y plantas alineadas al objetivo de descontaminar el suelo de formas más eficientes, y determinar las condiciones que mejor resultados nos ofrezcan.

Ullah (2015) profundizó aún más en la búsqueda de tecnologías que optimicen las técnicas de fitorremediación, exponiendo los resultados de la aplicación de Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR) en las plantas. Estas bacterias en las que se encuentran géneros como *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Azotobacter*, *Rahnella* entre otras, cumplen dos funciones principales, una es la solubilización del metal a través de ácidos orgánicos, sideróforos, biosurfactantes y reduciendo el pH,

transformando el metal a una forma más biodisponible para la planta y la otra función es la nutrición de la planta para un crecimiento superior mediante mecanismos de solubilización de fosfato, fijación de nitrógeno, producción de fitohormonas como el ácido indolacético (IAA), citoquinina, giberelinas entre otros.

2. Bases Teóricas

2.1. Contaminación de Suelo por Metales

El suelo es un cuerpo natural, tridimensional, dinámico y muy complejo, el cual siempre va a estar constituido por una variedad de metales, no metales, iones inorgánicos y sales (Ballesta, 2017), la contaminación de este recurso sucede mediante la introducción o incremento anormal de estas u otras sustancias que puedan ejercer un efecto dañino sobre los organismos de un ecosistema (Bautista, 1999; Munive et al., 2018; Duraes, 2018). Esta degradación, es la responsable de la disminución de la capacidad productiva del suelo, atentando contra su integridad física, química y biológica (Ballestas, 2017). Los metales muchas veces son los responsables de esta degradación (Volke et al., 2005), cuando estos llegan al suelo, ya sea de forma natural o antropogénica, se da lugar a una serie de procesos químicos que pueden alterar su movilidad, uno de estos es la remoción del metal de una fase acuosa a una sólida, controlando su concentración y sus complejos en el suelo, disminuyendo significativamente su potencial ecotoxicológico, estos mecanismos pueden ser el intercambio catiónico, la adsorción específica, la co-precipitación o la formación de complejos orgánicos (Alloway, 1995; de Lucio et al., 2021; Martínez y Marrugo, 2021). De manera contraria, cuando los metales se encuentran libres en la fase líquida del suelo, el efecto ecotoxicológico de estos elementos se materializa, logrando entrar a la célula. Cationes divalentes como el Fe^{+2} , Cu^{+2} , Mn^{+2} , Zn^{+2} tienen una estructura similar al de estos contaminantes, tanto por sus

cargas como por sus diámetros iónicos, lo que facilita que sean reemplazados o que desplacen a otros cationes divalentes que cumplan funciones fisiológicas importantes dentro del ser vivo, provocando desordenes metabólicos severos (Volke et al., 2005).

2.1.1 Contaminación de suelo por fuentes naturales

Existe una gran diferencia entre el nivel de fondo o *background* y la línea base de un suelo contaminado, el primero, hace referencia a la concentración natural geogénica de los elementos evaluados, mientras que el segundo expresa los valores de superficie de cualquier punto dado en un terreno, estos podrían traducirse como la suma de la concentración geogénica más la concentración añadida por cualquier otra fuente (Rodríguez, 2018; Mongue, 2021). Entendiendo esta diferencia, podemos aislar las fuentes naturales de contaminación de suelo, de las fuentes antropogénicas. Algunos tipos de materiales parentales pueden ser fuentes de ciertos metales pesados, como el arsénico, uno de los procesos de su geo-génesis tiene lugar con el desgaste de roca rica en sulfuro, la cual resulta en zonas mineralizadas de arsenopirita, o el talio que puede encontrarse en niveles pedogeoquímicamente elevados de hasta 3.3 mg/Kg (Rodríguez, 2018, Pavlícková et al., 2006). Los suelos de serpentina desarrollados naturalmente sobre roca ultramáfica, tienen un rango de entre 0.1 a 3% de níquel. A pesar de que menos del 1% de la corteza terrestre presenta este tipo de suelos, es muy común en cinturones de asociaciones ofiolíticas a lo largo de los márgenes de las placas tectónicas (He, 2012). Algunos elementos radioactivos también se forman naturalmente en el suelo, la geo-génesis del Radón por ejemplo, se da en las capas más profundas del suelo, comúnmente en rocas ígneas ácidas, principalmente en rocas ricas en feldespatos o illitas, luego se van difuminando hasta la superficie a través de los poros del suelo.

(Rodríguez, 2018). Eventos naturales como incendios forestales o erupciones volcánicas también producen la liberación de compuestos tóxicos como hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) además de altas concentraciones de metales como mercurio, cromo, cobre, níquel y zinc en suelos volcánicos (Rodríguez, 2018).

2.1.2 Contaminación del suelo por fuentes antropogénica

Los contaminantes del suelo pueden agruparse en dos grupos principales según sus componentes, los contaminantes orgánicos (OPs) e inorgánicos (IPs) dentro de este último se encuentran los elementos potencialmente tóxicos (PTEs) o también llamados elementos traza potencialmente tóxicos (Duraes, 2018; Yaron, 1996), tanto los OPs como los PTEs pueden generarse de forma natural como antropogénica (Duraes, 2018). Los PTEs originados por el material parental son, en una escala corta de tiempo, liberados en volúmenes casi constantes, contrariamente, los introducidos al suelo por las actividades del hombre están en constante aumento (Yaron, 1996; Vhahangwele y Khathutshelo, 2018) Antes del año 2000 las actividades antropogénicas alrededor de todo el globo ya estaban emitiendo 22 000 toneladas anuales de As, 7000 de Cd, 400 000 de Pb, 56 000 de Cu y 214 000 de Zn, superando en exceso lo producido por el planeta de forma natural (Yaron, 1996). Las fuentes antropogénicas de contaminación se pueden clasificar en contaminación local y difusa, la primera refiere a la liberación del contaminante en la zona de emplazamiento de dicha actividad, un ejemplo claro de contaminación son los relaves que tienen contacto directo con el suelo. Por el contrario, la contaminación difusa se da en el área de emplazamiento pero su alcance va más allá de esta, expandiéndose la contaminación a través del agua, aire o suelo, las aguas residuales, algunas prácticas agrícolas y las emisiones atmosféricas son algunas de las

actividades que generan este tipo de contaminación (Almorox, 2010; Vhahangwele y Khathutshelo, 2018).

a) Contaminación de Hierro (Fe) en el suelo y sus efectos.

El contenido de hierro en el suelo es abundante en la sierra peruana y por lo tanto no existe un nivel de referencia permisible (Rivera y Lázaro, 2017) sin embargo se encuentra principalmente en minerales como la hematita (Fe_2O_3), magnetita (Fe_3O_4), limonita ($FeO \cdot OH \cdot nH_2O$) y la siderita o carbonato de hierro ($FeCO_3$) (Torres, 2014). La explotación minera de hierro a base del método de imantación y densidad “Wet Magnetic Method” empleado a partir de los años 50 en promedio puede llegar hasta una concentración del 1% de Fe en los relaves, además de otros metales como Mg, Ca, Na, Mn y Cu (Wong et al., 1977; Atmadzhidi et al., 2018). En el Perú, la Fundición Minera de La Oroya es una de las más conocidas a nivel internacional por contaminar agua, suelo y aire, la Universidad Nacional del Centro del Perú, registró concentraciones de cerca de 20 000 ppm de Fe en su Estación Experimental el Mantaro en el Departamento de Junín (Rivera y Lázaro, 2017). A pesar de que nuestro país no contempla concentraciones permisibles en su DS. 011-2017-MINAM (ECA-Suelo) ni en ningún otro marco de referencia legal para este elemento existen otros países que si lo contemplan a través de sus Pautas y Normas Ambientales como el EPA RSL 1.0 de Estados Unidos o el WA Assessment levels for Soil & Sediment de Australia. En la agricultura, el exceso de Hierro de la mano con un pH ácido (menos de 6.5) facilita su solubilidad y biodisponibilidad, al estar este elemento relacionado con la síntesis de clorofila, su exceso produce toxicidad en plantas, ocasionando una coloración bronce y manchas oscuras en las hojas, además de

deteriorar la absorción de fósforo (Sierra, 2017) sin menoscabo de las consecuencias de su inserción en la cadena alimentaria.

b) Contaminación de Cobre (Cu) en el suelo y sus efectos

El cobre es esencial para el desarrollo de las plantas y del ser humano, sin embargo este micronutriente, puede encontrarse en concentraciones muy altas sobrepasando el nivel de fondo natural del suelo, a causa de actividades humanas. Se han registrado concentraciones que alcanzan los 1500 mg/Kg en viñedos y en suelos tratados con lodos puede acumularse hasta 1170 mg/Kg, alrededor de fundiciones de Cu-Ni se han observado concentraciones de más de 4500 mg/Kg de Cu y en cultivos de arroz regados con aguas residuales se han encontrado hasta 158 mg/Kg (Xu et al., 2006). La extracción de Cobre, actividad que ocupa el primer lugar en valor de las exportaciones en el Perú (12 742 millones US\$ en 2020), y de la cual somos los segundos mayores productores en el mundo (BCRP, 2020) también es responsable de la contaminación por cobre en el suelo, en el Perú se han reportado altas concentraciones (mayor de 0.1%) de Cu, Zn, Pb, Co, Ni, Cd, As a causa de esta actividad, dichos metales se caracterizan por tener una fuerte selectividad por parte de la vegetación para translocarlos a sus tejidos (Bech et al., 1997; Munive et al., 2018) sin embargo, a excepción del As, Cd y Pb los demás metales no se encuentran contemplados en nuestro ECA-Suelos. La absorción excesiva de cobre por parte de las plantas puede repercutir en la inhibición del crecimiento de las plantas y elongación de las raíces, alterar la mitosis e inhibir las enzimas que participan en el proceso de fotosíntesis, como la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa y el fosfoenolpiruvato carboxilasa, siendo el maíz (*Zea Mays L.*) uno de los cultivos más importantes sensibles al cobre (Jiang, 2001). En humanos, la toxicidad crónica o aguda

por ingesta de cobre por alimentos contaminados, siendo el arroz y el maíz las especies más sensibles y consumidas a nivel mundial (Xu et al., 2006; Jian, 2001) están relacionadas con daños hepáticos severos y fallo renal (Feoktistova y Clark, 2018).

c) Contaminación de Manganeso (Mn) en el suelo y sus efectos

El Manganeso es el 12vo elemento más ampliamente distribuidos en la corteza terrestre (O` Neal y Zheng, 2015), puede encontrarse en un rango de 40 a 900 mg/Kg en el suelo (Pinsino et al., 2012). Sin embargo, la producción masiva de compuestos con contenidos ricos en Mn (acero, fierro, aleaciones, cerámicas, aguas residuales municipales, lodos residuales, productos funguicidas, gasolinas con aditivos de MMT, agentes purificadores de agua, etc.) ha aumentado significativamente el potencial de riesgo de este elemento en el ambiente por causas antrópicas (Pinsino et al., 2012; Neal y Zheng, 2015). Se han reportado concentraciones de Mn extraíble alrededor del mundo de hasta 58.5 mg/Kg en suelos agrícolas no contaminados, por debajo del límite normal de 100 mg/Kg, sin embargo, en zonas contaminadas se ha registrado concentraciones de 226 mg/Kg cerca a zonas de trituración de mineral y hasta 1356 mg/Kg en relaves de minas abandonadas (Rivera et al., 2012).

En plantas, este micronutriente, es fácilmente transportado de las raíces al sistema aéreo, por lo que lo hace menos toxico para las raíces comparado con otros metales. Los principales síntomas son motas marrones oscuras en hojas, seguidos de clorosis, desecamiento y caída, en el caso de las hojas nuevas inhibe su crecimiento y/o las distorsiona. Si las concentraciones de este metal son severamente altas, puede afectar directamente la raíz inhibiendo su crecimiento y dándole una coloración marrón por la acumulación de óxido de manganeso (MnO_2) (Perez, 2017), además de disminuir la

velocidad de fotosíntesis debido a la necesidad del Mn durante la separación del agua en el fotosistema II (Rivera et al., 2012). La toxicidad al ser humano por altas concentraciones de este metal ha sido también evidenciada, principalmente por exposición ocupacional (Neal y Zheng, 2015), como una externalidad impuesta a los habitantes adyacentes a estas industrias (Rodríguez et al., 2005) y en menor medida, a la sociedad en general, a causa de la gran diversidad de productos con contenidos significativos de Mn y/o cuyos usos lo liberan al ambiente, dando lugar a efectos neurotóxicos con síntomas muy similares al Parkinson, toxicidad cardiovascular, disminuyendo la velocidad de bombeo del corazón y la presión sanguínea, hepatotoxicidad severa y aumentando la posibilidad de muerte prematura en niños menores de un año (Neal y Zheng, 2015). Sin embargo, nuestra normativa ambiental vigente tampoco contempla este metal de transición.

d) Contaminación de Zinc (Zn) en el suelo y sus efectos

El zinc es el 23vo elemento más abundante de la corteza terrestre, este metal pesado, considerado también un micronutriente esencial, se encuentra de forma natural en concentraciones altas en minerales como la esfalerita (ZnS), smithsonita ($ZnCO_3$) y hemimorfita ($Zn_4Si_2O_7(OH)_2 \cdot H_2O$) (Sivry et al., 2008; USGS, 2019; Nagajyoti et al., 2010). Industrias como la minería, operaciones de fundición no ferrosas y usos indiscriminados de agroquímicos, además de la disposición inadecuada de aguas y lodos residuales son las principales actividades responsables de la liberación de altas concentraciones de Zn en aire, agua y suelo (Li et al., 2015; Soon y Bates, 1982; Nagajyoti et al., 2010), en este último se han registrado concentraciones que superan los 8000 mg/Kg en fundiciones de Zn y Pb de más de 60 años de antigüedad en China, (Li et al.,

2015) y en plantas, se han registrado hiperacumuladoras de Zn con más de 10 000 mg/Kg o el 1% en peso seco en sus tejidos (Oyuela et al., 2017; Rout y Premanda, 2003) superando extensamente los rangos típicos estudiados de concentraciones de Zn en suelos y cultivos agrícolas no contaminados (10-300 mg/Kg y 15 – 200 mg/Kg respectivamente) (Nagajyoti et al., 2010).

La toxicidad por Zn observada en las plantas, afecta principalmente a las raíces de esta, a nivel celular se presenta citotoxicidad en el núcleo de las células de la punta de las raíces, con una alteración y dilatación de la membrana nuclear, además de la desestructuración del citoplasma y la desintegración de los organelos, el número de nucléolos también aumenta resultando en la síntesis de nuevas proteínas involucradas en la tolerancia de metales pesados (Rout y Premanda, 2003). A nivel fisiológico se observa retraso del crecimiento del brote, rizado y rodadura de hojas jóvenes, muerte de las puntas de las hojas y clorosis además de una disminución en la eficiencia del fotosistema II (Sargadoy et al., 2008). En seres humanos, se ha presentado toxicidad principalmente por ingesta aguda, los síntomas varían dependiendo de la forma del metal, pero pueden incluir dolor y calambre abdominal, náuseas, vómito, diarrea con pérdida de sangre, letargo, aturdimiento, pérdida de estabilidad en la marcha, dificultad para escribir, y deficiencia de Cu (Fosmire, 1989).

2.2. Principales procesos de remediación en plantas

2.2.1 Fitoextracción

La fitoextracción se entiende como la capacidad de una planta para extraer los metales del suelo. Esto va a depender de varios factores, entre estos están la concentración y especiación del metal, la movilidad del metal desde el complejo del suelo hasta la

superficie de la raíz, el transporte del metal desde la superficie de la raíz hasta su interior y su traslocación desde la raíz hasta la parte aérea (Alloway, 1995; Martínez y Marrugo, 2021).

El término “hiperacumulación” o “planta hiperacumuladora”, fue usado por Brooks y Reeves en 1977 y actualmente se utiliza para describir a aquellas plantas que en su biomasa pueden acumular más de 1000 mg/kg de Co, Cu, Ni, Pb, o Se, más de 10000 mg/kg de Zn o Mn o más de 100 mg/kg de Cd (Diez, 2008), cabe resaltar que esta característica solo es propia en tecnologías de fitoextracción. La explicación a estas cualidades tan sorprendentes, son listadas por las siguientes hipótesis, la resistencia a la sequía, la absorción inadvertida, la tolerancia a metales y la resistencia frente a herbívoros/patógenos, siendo esta última la más aceptada (Diez, 2008).

2.2.2 Fitoestabilización

La fitoestabilización por otra parte, se consigue mediante la interacción de la actividad radicular de la planta (secreción de protones, agentes quelantes, cambios de potencial redox, etc) y su microflora asociada, formando complejos metálicos catiónicos insolubles, que son adsorbidos a las paredes celulares de las raíces por una diferencia de cargas o son absorbidos dentro de las vacuolas al interior de la estructura radicular, mermando así su movilidad y biodisponibilidad. El uso de tecnologías como esta, priman en casos en los que el terreno sea muy extenso y los niveles de contaminación muy altos (Diez, 2008; Doni et al., 2015). Esta tecnología se considera como una medida provisional, mas no como una técnica final de remediación, puesto que debe hacerse un seguimiento analítico en el suelo para evitar que el contaminante recupere su movilización y recupere su potencial ecotoxicológico (Castells, 2012).

2.2.3 Fitovolatilización

Es un proceso por el cual se da la desorción del metal absorbido por la planta una vez que este ha pasado por su metabolismo interno y es eliminado por transpiración, lográndose la remoción de los metabolitos más volátiles del contaminante (Castells, 2012; Madhumita et al., 2015).

2.2.4 Rizodegradación

Este método de remediación, ocurre en la rizósfera de la planta, esta zona rica en diversidad microbiana da lugar a un proceso de degradación de los contaminantes orgánicos principalmente, la cual se ve acelerada por la presencia de los exudados de las raíces, como azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos, esteroides, nucleótidos, enzimas, fitohormonas, flavonoides, entre otros (Castells, 2012, Doni et al., 2015; Cristaldi et al., 2017).

2.3. Zea Mays L. Var. Chingasino

El maíz Chingasino, se empezó a desarrollar en el Perú en la década de los sesenta en la Provincia de Urubamba en el Departamento de Cuzco, actualmente esta variedad de maíz es exportada a Norteamérica, Asia y Europa (Urrutia, 2019). Esta clase de maíz, también conocido como Maíz Blanco Gigante del Cuzco, desarrolla un órgano viril morado al igual que su tallo, llegando a medir unos 2900 cm, forma entre 12 y 14 hojas, con una altura de mazorca de entre 160 y 180 cm, 8 hileras por mazorca, entre 28 y 37 granos por hilera. El periodo para la formación de la mazorca dura 180 días y 240 días para su deshidratación, alcanzando una productividad de 20,000 kg/ha (Urrutia, 2019) en condiciones normales.

Las etapas de desarrollo del maíz tienen diversas clasificaciones, pero la más aceptada internacionalmente divide su desarrollo en Vegetativo y Reproductivo, pudiéndose describir de la siguiente manera:

Tabla 1.

Desarrollo Vegetativo y Reproductivo de la especie Zea Mays L.

Etapas Vegetativas		Etapas Reproductivas	
VE	Emergencia	R1	Floración
V1	Primera Hoja	R2	Ampolla
V2	Segunda Hoja	R3	Grano Lechoso
V3	Tercera Hoja	R4	Grano Masoso
V(n)	Enésima Hoja	R5	Grano Dentado
VT	Aparición de Panojas o Espigado	R6	Madurez Fisiológica

Fuente: Ciampitti et al., 2016

2.4. Bacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal

Las bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR), son microorganismos que se interrelacionan con las raíces y el suelo del área radicular de la planta. (Riveros, 2010). Aquí se da lugar a mecanismos de fijación de nitrógeno atmosférico, absorción iónica de hierro, zinc y otros micronutrientes esenciales, solubilización y absorción de fosfatos, producción de fitohormonas como auxinas, giberelinas, citoquininas, modulación del crecimiento vegetal mediante la enzima desaminasa del ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) y compuestos de elicidas (Bakker et al., 2007; Hayat et al., 2010).

Su estudio con fines agrícolas ha ido incrementándose en las últimas dos décadas, uno de los puntos a favor de las PGPR por encima de los fertilizantes químicos, es la inexistencia de impactos ambientales que produce su uso en el campo, a diferencia de los segundos que, si poseen un impacto potencial sobre el ambiente, debido a la liberación de gases de efecto invernadero (N₂O), reducción de la capa de ozono,

calentamiento global y lluvia ácida como consecuentes de su uso extensivo (Maheshwari, 2010; Sivasakthi et al., 2014; Saikia et al., 2012).

Algunos de los géneros de PGPR principalmente estudiados son: *Rhizobium*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Beijerinckii*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Anabena*, *Nostoc*, y *Arthrobacter* (Riveros, 2010).

2.4.1 *Rhizobium*

Son bacterias Gram-negativas capaces de fijar nitrógeno atmosférico. (Sawada et al., 2003) Estos organismos colonizan las rizósferas de las leguminosas e inducen la creación de nódulos. La liberación de exudados flavonoides de parte de la raíz y la síntesis de oligosacáridos y polisacáridos extracelulares que dan paso a la aproximación de las bacterias y la consecuente adhesión bacteriana por medio de moléculas de rihcadhesina, lectina vegetal y microfibrillas de celulosa, completan la infección con colonias de *Rhizobium* capaces de reducir el nitrógeno atmosférico mediante la enzima nitrogenasa a amonio (NH_4^+), siendo este más asimilable por la mayoría de plantas (Saldaña, 2017; Smith et al., 1992).

La fijación bacteriana de nitrógeno atmosférico contribuye con 180×10^6 TM/año a nivel mundial, de las cuales las infecciones simbióticas, relación indispensable u obligada (Romero, 2007), como las del género *Rhizobium* representan el 80% del total (Sivasakthi et al., 2014).

2.4.2 *Azotobacter*

El género *Azotobacter* está caracterizado por bacterias Gram negativas de vida libre que habitan suelos aeróbicos, poseen una morfología oval o esférica con quistes de paredes gruesas, suelen ser de 2-10 μm de largo y 1-2 μm de ancho. Su abundancia en el suelo

está relacionada con el pH, temperatura, materia orgánica y humedad del suelo (Jnawali et al., 2015) y también dependerá de la especie vegetal con la que se relacione, presentándose mayor concentración en la rizosfera que en el suelo alrededor del cultivo (Mrkovacki y Milic, 2001). Al igual que el género *Rhizobium*, especies de *Azotobacter*, como la *A. chroococcum* entre las más estudiadas y primera en ser descubierta, también tienen enzimas capaces de fijar el nitrógeno atmosférico. (Behl et al., 2007; Jnawali et al., 2015; Singh, 2006) Se han registrado reducciones en el requerimiento de nitrógeno de hasta 20 Kg/Ha en arrozales inoculados con bacterias *Azotobacter*, inoculaciones de esas bacterias también han demostrado ser más eficientes que adiciones sintéticas de hasta 50 Kg/Ha en arrozales, otras investigaciones también reportan granos con rendimientos de más del 28% con respecto a un control (Singh, 2006).

Sin embargo, los efectos benéficos que tiene este género sobre las plantas, tiene mayor significancia por las altas concentraciones de fitohormonas que son capaces de biosintetizar que por su capacidad de fijar nitrógeno, entre estas sustancias de crecimiento vegetal se encuentran el ácido indol-3-acético (AIA), las giberelinas, las auxinas y citoquininas, siendo estas moléculas responsables del incremento de la expansión y división celular en tejidos, la dominancia apical, la inducción y activación de enzimas, la simulación de ARN y síntesis de proteínas, el retraso del envejecimiento celular, la interrupción de la dormancia de semillas y brotes, la inducción de flores, la solubilización de fósforo, entre otras funciones (Mrkovacki y Milic, 2001; Kukreja et al., 2004; Behl et al., 2007).

2.4.3 *Pseudomonas*

Bacterias del género *Pseudomonas* asociadas a plantas se encuentran en casi todos los suelos agrícolas (Sivasakthi et al., 2014), son bacterias gram negativas viviendo como saprofitas y como parásitas en la superficie de la planta o dentro de sus tejidos, muchas *Pseudomonas* suprimen microorganismos patógenos, sintetizan fitohormonas, incrementan la resistencia a enfermedades, y aumentan la biodisponibilidad de nutrientes (Weller, 2007; Lugtenberg et al., 2001), sin embargo algunas *Pseudomonas*, incluyendo especies PGPR, también pueden inhibir el crecimiento de las plantas y causar pudrición, necrosis y distrofias. Una interacción planta-*Pseudomonas* puede categorizarse como benéfica si el beneficio sobrepasa el costo (Preston, 2004). Al igual que el género *Rhizobium* y *Azotobacter*, el género *Pseudomonas* también es capaz de fijar nitrógeno, sin embargo, a diferencia de la primera y al igual que la segunda, sus especies son de vida libre no generando una relación simbiótica en la rizosfera de su especie asociada. Este tipo de asociación no simbiótica representa el 20% de la fijación bacteriana mundial de nitrógeno atmosférico (Sivasakthi et al., 2014).

Cepas del género *Pseudomonas* están entre las especies más eficientes en cuanto a la solubilización de fosfato inorgánico, compuestos como el fosfato tricálcico, hidroxilapatita, fosfato dicálcico, y roca fosfórica son solubilizadas por *Pseudomonas* siendo las dos primeras las más fácilmente solubilizadas por este género. Los ácidos orgánicos especialmente el ácido glucónico suele ser el agente solubilizador mayormente biosintetizado por este género (Hayat et al., 2010). Las cepas del grupo *Pseudomonas* Fluorescentes (FLP's), han demostrado incrementos significativos en la masa seca y fresca, además de colonizar rápidamente raíces de cultivos como papa, remolacha y rabano, mostrando un rendimiento de más del 44% en pruebas de campo (Sivasakthi et al., 2014). Algunas especies del género *Pseudomonas* también producen ácido indol-3-

acético (AIA), sideroforos quelantes de Fe y antibióticos como el ácido fenazina-1-carboxílico (PCA) y otros derivados, 2,4-diacetilfloroglucinol (DAPG), pirrolnitrina (Prn) o piroluteorina (Plt) y lipopeptidos cíclicos (Sivasakthi et al., 2014; Weller, 2007; Preston, 2004).

2.4.4 *Azospirillum*

Las cepas del género *Azospirillum* tienen una morfología vibroide ligeramente curvada o recta de aproximadamente 1.0 μm de diámetro y 2.1-3.8 μm de longitud, son bacterias diazótroficas de vida libre (Saikia et al., 2012) su capacidad de promover el crecimiento de las plantas recae principalmente por su capacidad de producir fitohormonas (Bashan et al., 2004). Las investigaciones sobre este género han demostrado la producción de fitohormonas y moléculas como el ácido indol-3-acético (AIA) giberilinas (GA), ácido abscísico (ABA), citoquininas, óxido nítrico, nitrato reductasa y etileno, responsables de disminuir el estrés ambiental, aumentar la biodisponibilidad y absorción de minerales y mejorar la arquitectura de la raíz (Bashan y De-Bashan, 2010).

En México se ha promovido la inoculación de cepas de *Azospirillum* mucho más que en otros países, específicamente en cultivos de maíz, sorgo, cebada y trigo en condiciones climáticas variadas (Caballero, 2002). A diferencia de géneros como las *Pseudomonas* las especies *Azospirillum* no se consideran agentes biocontroladores de patógenos ya que como muchas cepas carecen de productos químicos supresores directos o enzimas hidrolíticas que pueden afectar a los patógenos de las plantas (Saikia et al., 2012).

2.4.5 *Trichoderma*

Trichoderma es un género de hongos oportunistas de rápido crecimiento, simbiotes no virulentos, encontrado en muchos ecosistemas. Son capaces de promover la salud de sus huéspedes mediante el antagonismo y micoparasitismo que desarrollan contra los patógenos del suelo y las raíces. (Hermosa et al., 2012; Vinale et al., 2008). La sociedad planta-PGPR se concreta mediante reconocimiento molecular entre ambas partes tendiendo una red de señalización hormonal (Bashan y De-Bashan, 2010; Hermosa et al., 2012; Preston, 2004) en la asociación planta-*Trichoderma* se ven involucrados el ácido salicílico, ácido jasmónico y el etileno (Hermosa et al., 2012). El etileno y el ácido jasmónico se han descrito como moléculas de transducción de señal para el Sistema de Inducción de Resistencia (WIR) y el ácido salicílico de transducción de señal para el Sistema de Resistencia Adquirida (SAR), siendo las responsables de preparación de la defensa de las plantas frente pruebas de estrés biótico o abiótico (Harman et al., 2004; Hermosa et al., 2012). Las responsables de la producción de estas fitohormonas son proteínas ampliamente estudiadas como Patrones Moleculares Asociados a Microbios (MAMPs en inglés) en el caso del género *Trichoderma* estas MAMPs además de las fitohormonas descritas anteriormente también pueden producir especies reactivas de oxígeno (ROS), óxido nítrico, y compuestos antibióticos e incluso degradar las paredes celulares de huéspedes patógenos (CWDEs: enzimas degradadoras de pared celular) (Hermosa et al., 2012; Vinale et al., 2008).

El género *Trichoderma* también es capaz de generar compuestos involucrados en el crecimiento vegetal como las AIA, GA y citoquininas, además, junto con la síntesis o estimulación de la producción de fitohormonas, la mayoría las cepas de *Trichoderma* acidifican su entorno secretando ácido glucónico, cítrico o fumárico que permiten la

solubilización de fosfatos, micronutrientes y cationes minerales incluyendo hierro, manganeso y magnesio (Benitez et al., 2004).

2.4.6 *Bacillus*

Este género de bacterias puede desarrollarse en ausencia o presencia de oxígeno diatómico, tienen una capa gruesa de peptidoglicano y ausencia de membrana lipídica lo que las clasifica como Gram Positivas, desarrollan endosporas ovoides o cilíndricas que soporten condiciones ambientales adversas, pueden desarrollarse entre los 5.5 - 8.5 de pH, lo que las hace apropiadas para la formulación de productos estables que benefician los cultivos agrícolas (Layton et al., 2011; Constanza et al., 2016). Dentro de las especies del género *Bacillus* con características de antagonismo celular contra fitopatógenos se encuentra *Bacillus brevis* y *Bacillus subtilis* (Layton et al. 2011; Babu et al., 2013), su producción de metabolitos antibióticos actúan contra microorganismos de diversa etiología; cuentan con una antibiosis de péptidos que afectan directamente a algunos fitopatógenos como *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Botrytis*, entre otros (Layton et al., 2011). A pesar de que la antibiosis sea el mecanismo antagónico mayor empleado, no es el único, de hecho, los antagonistas manejan diferentes estrategias de eliminación, como la competencia por nutrientes y espacio o por interacción directa con el patógeno (Layton et al., 2011).

El género *Bacillus*, es conocido por la producción de nitrogenasas y fitasas, además de la liberación de AIA o citoquininas en la rizósfera de las plantas. Su inoculación en cultivos con fines de remediación, reduce potencialmente la fitotoxicidad, la traslocación y remoción de metales pesados y subsecuentemente incrementa la biomasa de la planta en suelos contaminados con estos metales (Babu et al., 2013).

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General:

Analizar la capacidad de la especie *Zea Mays L. var. Chingasino* para biorremediar suelos contaminados por metales extraídos del pasivo ambiental ubicado en Santa Rosa de Cata, al ser inoculado con dos grupos distintos de bacterias promotoras de crecimiento vegetal.

3.2 Objetivos Específicos:

Realizar un análisis de la respuesta de la especie *Zea Mays L. var. Chingasino* a cada variable fisiológica estudiada en cada tratamiento.

Realizar un análisis de las variables edafológicas estudiadas en cada tratamiento.

Realizar un análisis de la capacidad de la especie *Zea Mays L. var. Chingasino* de extraer o estabilizar los contaminantes en cada tratamiento.

Determinar la superioridad estadística de cada tratamiento para todas las variables estudiadas.

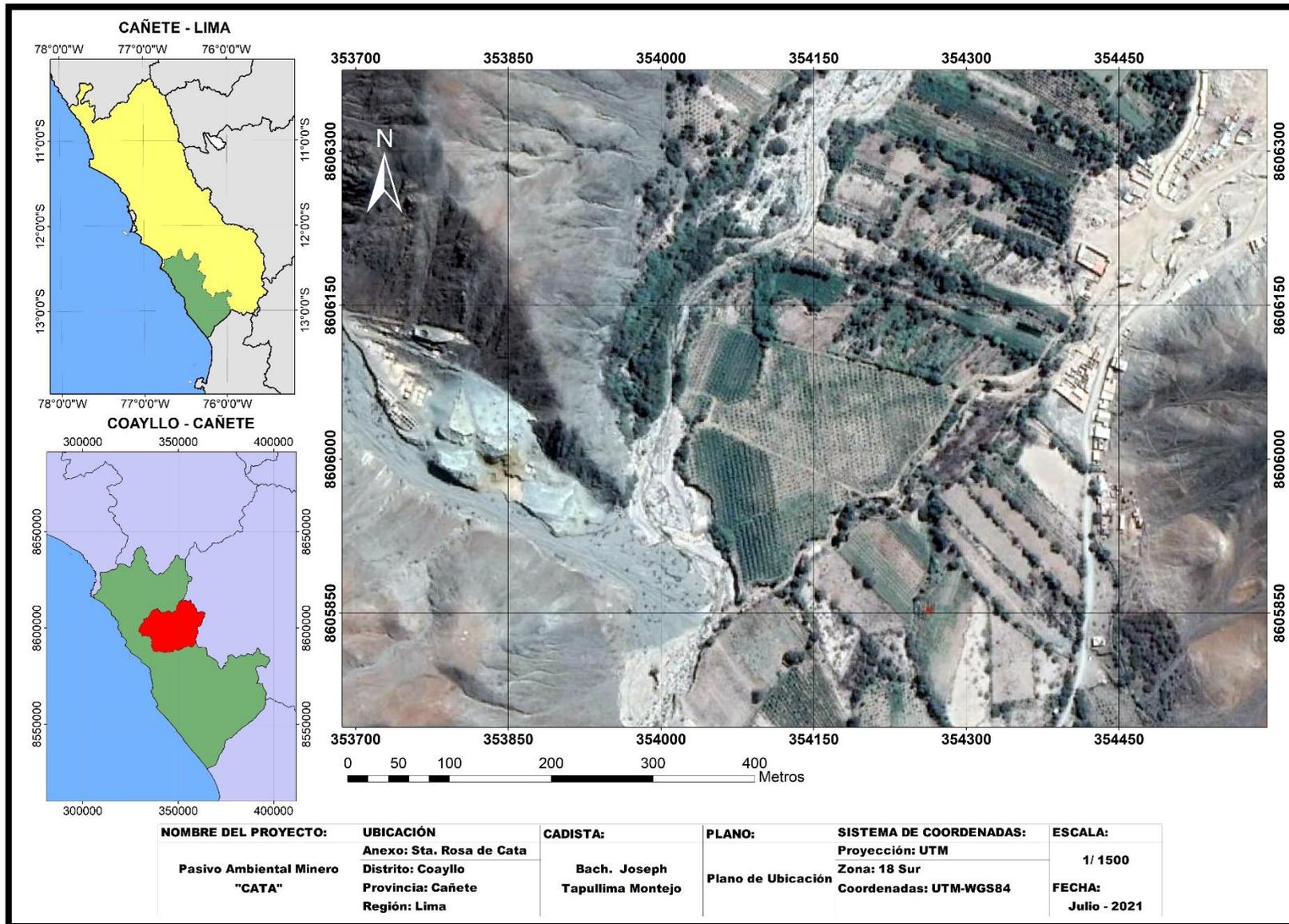
IV. METODOLOGIA

1. Recolección de pasivos Mineros

Se recolectó suelo contaminado proveniente del pasivo ambiental de la minera Cata S.A, ubicada en el centro poblado de Santa Rosa de Cata, distrito de Coayllo, provincia de Cañete, departamento de Lima. La zona de recolección es 353835.39 m E y 8606044.26 m S Zona 18L Sur (*Figura 1*). La cantidad de muestra recolectada fue de aproximadamente 100 Kg, con presencia de una gran variedad de metales, siendo las concentraciones más altas de Hierro (Fe), Manganeso (Mn), Zinc (Zn) y Cobre (Cu).

Figura 1.

Plano de Ubicación del Pasivo Minero “CATA” – Anexo Santa Rosa de Cata, Distrito de Coayllo, Provincia de Cañete, Departamento de Lima



2. Material vegetal para la Biorremediación

Se utilizó la especie *Zea Mays L.* var Chingasino, las semillas fueron adquiridas de la empresa CJ S.A.C con Constancia de Declaración de Comerciantes de Semillas Nro. 004-2013-INIA, producidas en el distrito de Contamana, Provincia de Ucayali, Departamento de Loreto, las cuales germinaron a los diez días de siembra (DAS), los parámetros fisiológicos de cada planta se evaluaron hasta los 136 DAS.

3. Cepas PGPR

La bacteria PGPR *R. Endophyton* 148 J, obtenida de la colección del Laboratorio de Ecología Microbiana del Dpto. Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Agraria La Molina, fue inoculada en el T₂, para su inoculación se preparó una solución con concentración de 10¹¹ UFC/l, para esto se realizaron cinco disoluciones consecutivas en relación 1:10 con cultivos de 48h a 37°C en TSB obteniendo disoluciones desde 10⁻¹ hasta 10⁻⁵, de cada una se extrajo 0.1ml para su siembra en placas de TSA con tres repeticiones por concentración e incubadas nuevamente por 48h a 37°C para permitir el conteo de colonias y la estimación de UFC por litro, una vez hallada la disolución adecuada se repitió el procedimiento preparándose un total de 50 ml de disolución a la concentración de 10¹¹ UFC/l y disolviéndose en agua a una relación de 1:10 obteniéndose un total de 500 ml de inóculo.

El inóculo constituido por un consorcio de cepas PGPR *Trichoderma sp.*, *Pseudomonas fluorescens*, *Azotobacter sp.*, *Bacillus subtilis* y *Azospirillum sp.* obtenidos por la empresa BioAlternativa aplicado al T₃ también mantuvo una concentración de 10¹¹ UFC/l de cada uno de los cinco microorganismos, sin embargo esta disolución fue disuelta en agua a

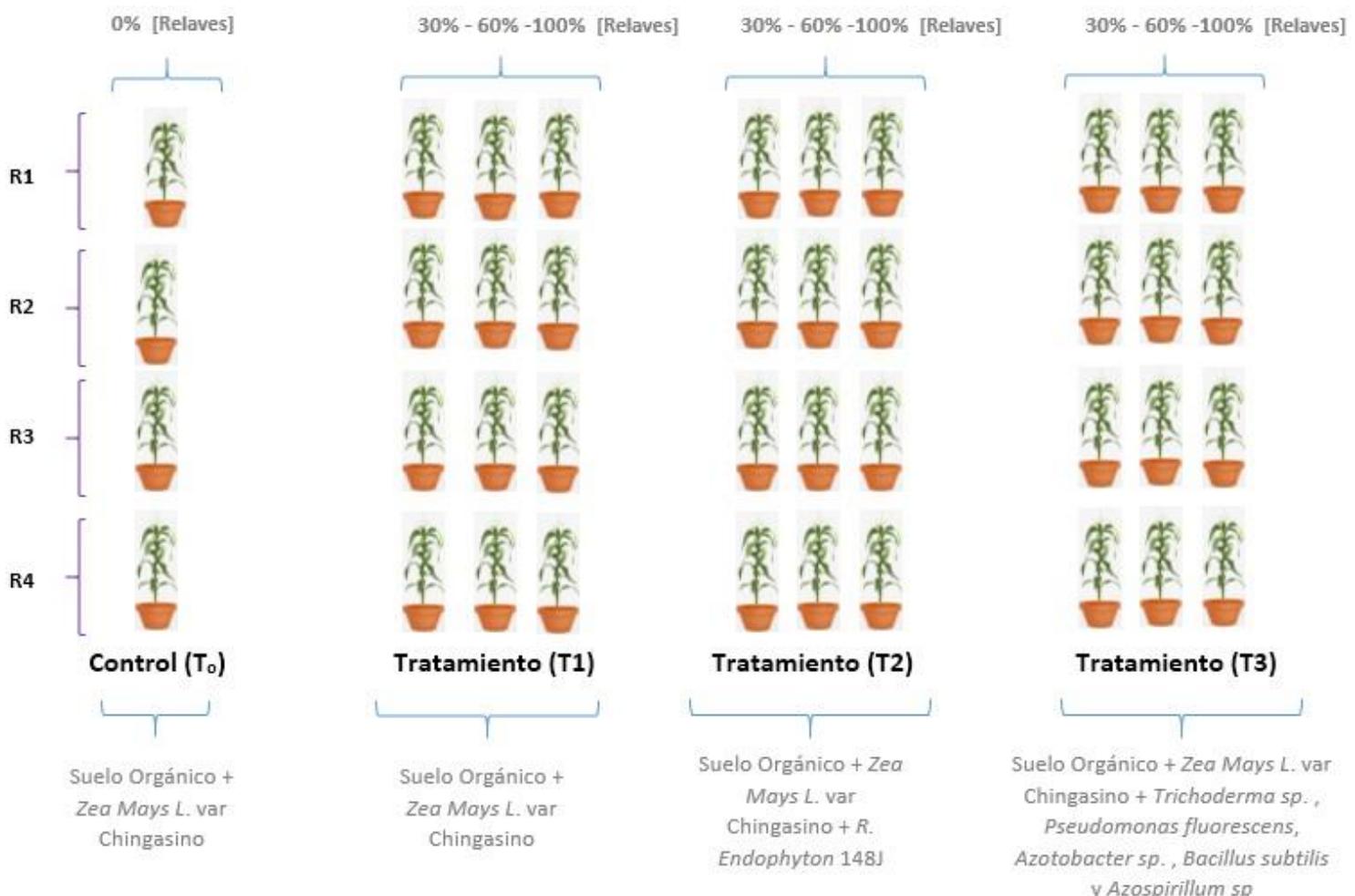
una relación de 1:200 por la mayor concentración de PGPR en comparación del T₂, obteniéndose 500 ml en base a 2.5 ml del inóculo concentrado.

4. Experimento de Biorremediación

El desarrollo del experimento tuvo un diseño de bloques completamente aleatorizado (DBCA) de 3 tratamientos (T₁, T₂ y T₃) de 3 concentraciones de pasivo minero cada tratamiento (T30% - 60% - 100%), más un control (T₀ sin pasivo minero), con 4 réplicas técnicas por cada concentración, haciendo un total de 40 modelos experimentales (Figura 2). Esto se aplicó en macetas de 10.00 Kg de capacidad con 8.00 Kg de sustrato.

Figura 2.

Diseño Experimental con un Control (T₀) sin metales, T₁, T₂ y T₃ con tres concentraciones de 30%, 60% y 100% de relaves con cuatro repeticiones por concentración, para cada tratamiento, e inoculación de PGPR en T₂ y T₃.



El Control T₀, se utilizó para evaluar todos los parámetros del suelo y el crecimiento de la especie *Zea Mays L.* Var. Chingasino en las condiciones del invernadero de la carrera de Ingeniería Ambiental de la Universidad Científica del Sur con un sustrato de suelo orgánico a una concentración del 0% de relaves, cuatro macetas fueron preparadas.

El primer tratamiento T₁ constó de cuatro réplicas por tres concentraciones de 30%, 60% y 100% de relave complementado por suelo orgánico, donde se sembraron las plantas de *Zea Mays L.* var Chingasino, para evaluar la capacidad fitoextractora o fitoestabilizadora de la especie sin la asistencia de un inóculo de bacterias PGPR.

El segundo tratamiento T₂ además de mantener el mismo diseño del T₁ fue inoculado con cepas de la bacteria PGPR *R. Endophyton* 148 J a una concentración de 10¹¹ UFC/l.

El tercer y último tratamiento T₃ a diferencia del T₂ fue inoculado con cepas PGPR de *Trichoderma sp.*, *Pseudomonas fluorescens*, *Azotobacter sp.*, *Bacillus subtilis* y *Azospirillum sp* obtenidos por la empresa BioAlternativa a una concentración de 10¹¹ UFC/l.

Las semillas de *Zea Mays L.* var. Chingasino fueron sembradas en semilleros y germinaron a los 10 DAS, su trasplante se dio a los 25 DAS a cada maceta, colocándose tres ejemplares por maceta, y seleccionándose la mejor a los 35 DAS. Luego las plantas crecieron hasta los 136 DAS y se realizó en ellas un análisis fisiológico de manera mensual a los 45 DAS, 75 DAS, 106 DAS y 136 DAS, (Figura 3) considerando el Número de Hojas, la Altura del Tallo, el Número de Inflorescencias Femeninas e Inflorescencias Masculinas, la Concentración de Clorofila por el Método del Clorofilómetro ($\bar{X}_{\text{hojas}}=5$) y Área Foliar (Largo de hoja x Ancho de hoja x 0.75_{Coef. corrección del maíz}) (Castellanos et al., 2017), el Peso Fresco Radicular se anotó al finalizar el experimento.

La aplicación de inóculos de cepas PGPR se inició cuando las plantas de maíz contaban con entre seis y ocho hojas (45 DAS). La solución del T₂ a base de la PGPR *R. Endophyton* a 10¹¹ UFC/l de concentración, se diluyó en relación 1:10 en agua, se hicieron cinco orificios alrededor de la raíz y se aplicó un volumen de 5 ml por maceta mediante aspersión, esta operación se realizó de manera quincenal a los 45 DAS, 60 DAS, 75 DAS, 100 DAS, 115 DAS y 130 DAS, cada solución al momento de ser aplicada contaba con 48h a 37°C de cultivada en TSB y 48h a 37°C de cultivado en una disolución de 10⁻⁴, para producir una solución fresca de *R. Endophyton* a una concentración de 10¹¹ UFC/l. Por otro lado, la solución del T₃ a base del consorcio de bacterias *Trichoderma sp.*, *Pseudomonas fluorescens*, *Azotobacter sp.*, *Bacillus subtilis* y *Azospirillum sp*, también a la concentración de 10¹¹ UFC/l, fue diluida en relación 1:200 en agua, inoculando sobre cinco orificios alrededor de la raíz un volumen de 5ml por maceta de manera quincenal a los 45 DAS, 60 DAS, 75 DAS, 100 DAS, 115 DAS y 130 DAS (Figura 4) en horas de la mañana.

Durante el periodo de desarrollo de las plantas de maíz se presentó la aparición de afidos pulgones del maíz (*Rhopalosiphum maidis*). Por lo que se aplicó entre 20ml a 30 ml de jabón potásico amínico al 0.1% por maceta, de manera semanal durante un mes, para combatir esta plaga.

Todos los tratamientos se ensayaron bajo las condiciones del Invernadero de la carrera de Ingeniería Ambiental de la Universidad Científica del Sur durante los meses de agosto a Diciembre del año 2019, habiendo contemplado todas las fases de crecimiento vegetativo de las plantas de *Zea Mays L.* var Chingasino, desde la Emergencia (VE) hasta

el Espigado (VT) y parte de su desarrollo reproductivo desde la Floración (R1) hasta el Grano Lechoso (R3) siendo un total de 136 DAS.

5. Análisis de las muestras de suelo

Para la elaboración de la línea base se recolectaron cuatro muestras de 1kg de suelo, de las tres concentraciones 30%, 60% y 100% más el control, estas fueron llevadas al Laboratorio de Agua, Suelo, Medio Ambiente y Fertirriego (LASMAF) del Departamento de Recursos Hídricos de la Universidad Agraria la Molina (UNALM) para el análisis de caracterización de suelos que comprendió del pH por Método del Potenciómetro por relación suelo-agua 1:1, Conductividad Eléctrica (CE) por lectura de extracto de relación suelo-agua 1:1, % Materia Orgánica (MO) por Método de Walkley y Black, Fosforo (P) por Método de Olsen Modificado, extracto de NaHCO_3 0.5M, pH:8.5, Potasio Disponible (K) por extracto de Acetato de Amonio 1N pH:7.0, Porcentaje Calcáreo Total (CaCO_3) por Método vaso-volumétrico, Textura por Método del Hidrómetro y Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC) mediante extracto de Acetato de Amonio 1N pH:7.0 y la concentración total de metales de Hierro (Fe), Cobre (Cu), Zinc (Zn) y Manganeso (Mn) en mg/Kg mediante un equipo de Absorción Atómica.

Cada mes se analizaron muestras de suelo de todas las macetas en el laboratorio de Ingeniería Ambiental y en el Invernadero de la Universidad Científica del Sur, las fechas de toma de muestras de suelo coincidieron con las del análisis fisiológico, siendo estas de manera mensual a los a los 45 DAS, 75 DAS, 106 DAS y 136 DAS, (*Figura 3*) durante los cuatro meses que duro el experimento. Para ello se tomaron muestras de 100mg y se midieron los parámetros edafológicos, análisis de pH por el Método del

Potenciómetro por relación suelo-agua 1:1, CE por lectura de extracto de relación suelo-agua 1:1, CIC mediante extracto de Acetato de Amonio 1N pH:7.0 y MO por calcinación de suelo (Anderson, 1982).

6. Análisis de bioadsorción de las plantas

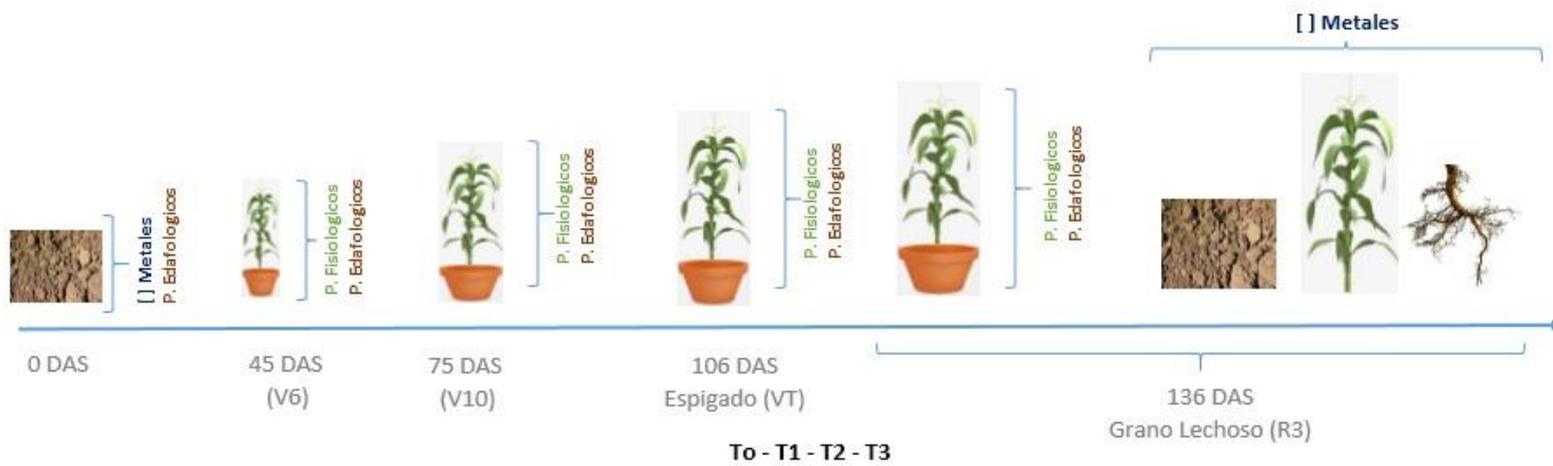
Al concluir el tiempo de experimentación con la cuarta y última toma de muestra edafológica y fisiológica a los 136 DAS, habiendo alcanzado la etapa R3 del crecimiento reproductivo de la especie *Zea Mays L.*, se retiraron los ejemplares y se procedió con los análisis finales de concentración de Hierro (Fe), Cobre (Cu), Zinc (Zn) y Manganese (Mn) en la zona área y radicular de los individuos y del suelo tratado.

El análisis de la parte aérea consintió en la recolección de muestras foliares compuestas de cada ejemplar, incluyendo cinco segmentos de 10 cm del tallo, desde la base del tallo hasta el inicio de la inflorescencia masculina, cinco hojas frescas y la parte central de la mazorca.

El área radicular contemplo toda la raíz de la planta desde las raíces flotantes, adicionalmente se adjuntó al análisis de resultados el peso fresco de las raíces de todos los tratamientos. Posteriormente se extrajo una muestra de 1Kg de suelo de cada maceta para su análisis de concentración de metales al igual que en los tejidos de la planta. Todos los análisis de concentración de metales fueron realizados en el Laboratorio de Agua, Suelo, Medio Ambiente y Fertirriego (LASMAF) del Departamento de Recursos Hídricos de la Universidad Agraria la Molina (UNALM).

Figura 3.

Línea de Tiempo de las cinco fechas de muestreo resaltando el DAS y Fase de Desarrollo en la que se realizó cada una, e indicando los parámetros analizados en cada muestreo.



Parámetros Evaluados:

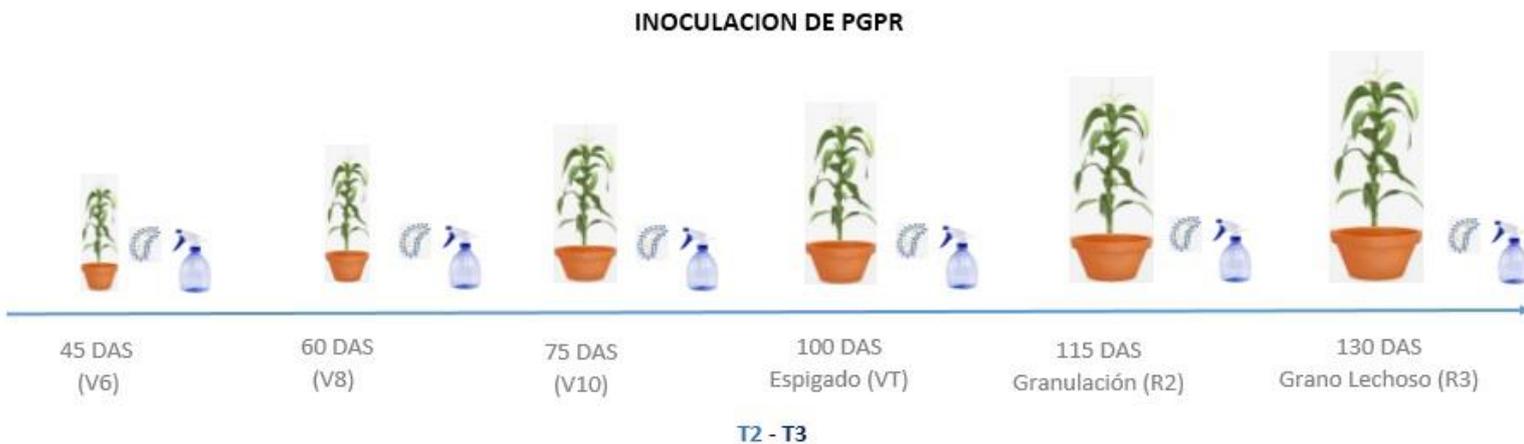
P. Fisiológicos: Clorofila (SPAD), N° Hojas, Área Foliar (cm²), Altura (cm), Inf. Masc., Inf. Fem. .

P. Edafológicos: Capacidad de Intercambio Catiónico (meq/100g), Conductividad Eléctrica (mS/cm), Potencial de Hidrogeno (pH), Materia Orgánica (%).

[] Metales: Concentración de Hierro (Fe), Manganeseo (Mn), Zinc (Zn), Cobre (Cu)

Figura 4.

Línea de Tiempo de las seis fechas de inoculación de PGPR en los T2 y T3 resaltando el DAS y la Fase de Desarrollo en la que se realizó cada una, e indicando las especies, concentraciones y volúmenes aplicados.



Soluciones Inoculadas:

T2: Inoculación de 5mL de *R. Endophyton 148 J* a 10^{11} UFC/L de concentración en relación 1:10 en agua.

T3: Inoculación de 5mL de *Trichoderma sp.*, *Pseudomonas fluorescens*, *Azotobacter sp.*, *Bacillus subtilis* y *Azospirillum sp* a 10^{11} UFC/L de concentración en relación 1:200 en agua.

7. Cálculo del Factor de Bioconcentración y Translocación

Una vez obtenido los resultados de la concentración de metales culminados los tratamientos, se procedió a calcular el Factor de Bioconcentración, este factor determina la concentración de metales que se ha extraído del suelo en raíces ($BCF_{Raíz}$), en la parte aérea de la planta ($BCF_{Aéreo}$) y en la biomasa total de la planta ($BCF_{Biomasa}$), estos factores se calcularon entre la concentración del metal en el tejido aéreo, radicular y en la biomasa total de la planta (mg/kg) con la concentración del elemento en el suelo (mg/kg) respectivamente:

$$BCF_{Raíz} = [metal]_{raíz} / [metal]_{suelo}$$

$$BCF_{Aéreo} = [metal]_{aérea} / [metal]_{suelo}$$

$$BCF_{Biomasa} = ([metal]_{raíz} + [metal]_{aérea}) / [metal]_{suelo}$$

Donde:

$BCF_{Raíz}$ = Factor de bioconcentración en las raices de la planta.

$BCF_{Aéreo}$ = Factor de bioconcentración en la parte aérea de la planta.

$BCF_{Biomasa}$ = Factor de bioconcentración en la parte aérea de la planta.

$[metal]_{raíz}$ = Concentración del metal solo en la raíz de la planta en mg/Kg.

$[metal]_{aérea}$ = Concentración del metal solo en la parte aérea de la planta en mg/Kg.

$[metal]_{suelo}$ = Concentración del metal en el suelo en mg/Kg

Seguidamente se obtuvo el Factor de Translocación, entendiéndose como la proporción entre la concentración de metales en la raíz de la planta con la concentración de metales en la parte aérea de la misma. Un factor mayor de uno explica la capacidad de la planta de transferir el metal de la raíz a la parte aérea (Medina y Montano, 2014).

$$TF = [\text{metal}]_{\text{aérea}} / [\text{metal}]_{\text{raíz}}$$

Donde:

TF = Factor de translocación

$[\text{metal}]_{\text{raíz}}$ = Concentración del metal solo en la raíz de la planta en mg/Kg.

$[\text{metal}]_{\text{aérea}}$ = Concentración del metal solo en la parte aérea de la planta en mg/Kg.

8. Análisis Estadístico de los datos

El procesamiento estadístico de los datos se realizó mediante el software IBM SPSS Statistics 22. Para el análisis entre tratamientos de las variables fisiológicas, edafológicas y de concentración de metales se empleó las pruebas de normalidad de Shapiro-Wilk y homogeneidad de varianza de Levene, para proceder con un análisis ANOVA, adicionalmente se sometió los resultados a la prueba de Comparaciones Múltiples de Tukey para identificar que tratamiento presento mayores diferencias.

V. RESULTADOS

La caracterización edafológica del suelo y la concentración de los metales estudiados en el presente proyecto, tanto del control, como en las tres concentraciones de relave evaluadas, al 30%, 60% y 100% del pasivo ambiental de Santa Rosa de Cata, fueron analizados. Los resultados se observan en la Tabla 2.

Tabla 2.

Línea Base de Caracterización Edafológica y de Concentración de Metales

	<u>Control</u>	<u>30%</u>	<u>60%</u>	<u>100%</u>
CE dS/m	2.80	4.36	7.65	2.27
Textura	Franco Arenoso	Arena Franca	Arena Franca	Arena Franca
pH	7.53	7.39	7.49	7.83
M.O (%)	24.20	9.24	5.53	1.63
P mg/Kg	58.32	21.10	12.04	1.98
K mg/Kg	1774.00	650.00	488.00	47.2
CaCO₃ (%)	0.84	2.60	2.51	3.01
CIC Cmol(+)/Kg	11.80	8.12	7.51	5.82
Hierro (Fe)	11654.80	39421.16	42629.95	46229.68
Cobre (Cu)	70.25	630.96	641.22	976.63
Zinc (Zn)	23.46	298.65	401.81	553.31
Manganeso (Mn)	128.8	413.00	527.69	692.71

Nota: Conductividad Eléctrica (CE); Potencial de Hidrogeno (pH); Porcentaje de Materia Orgánica (MO); Fosforo (P); Potasio Disponible (K); Porcentaje Calcáreo Total (CaCO₃); Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC).

En términos generales, la Línea Base indica un suelo de ligeramente salino (T₀; T_n100%) a moderadamente salino (T_n30%; T_n60%), de textura franco arenosa con un pH ligeramente alcalino, un porcentaje de materia orgánica alto en el T₀ que disminuye a medio y bajo en los T_n30%, T_n60%, T_n100% producto de la combinación con un relave muy bajo en materia orgánica, situación que se repite con la concentración de Fosforo y Potasio disponible, , el porcentaje de carbonatos fue de concentraciones medias en todos los tratamientos y en cuanto a la Capacidad de Intercambio Catiónico se obtuvieron valores bajos para todos los tratamientos y moderados para el T₀.

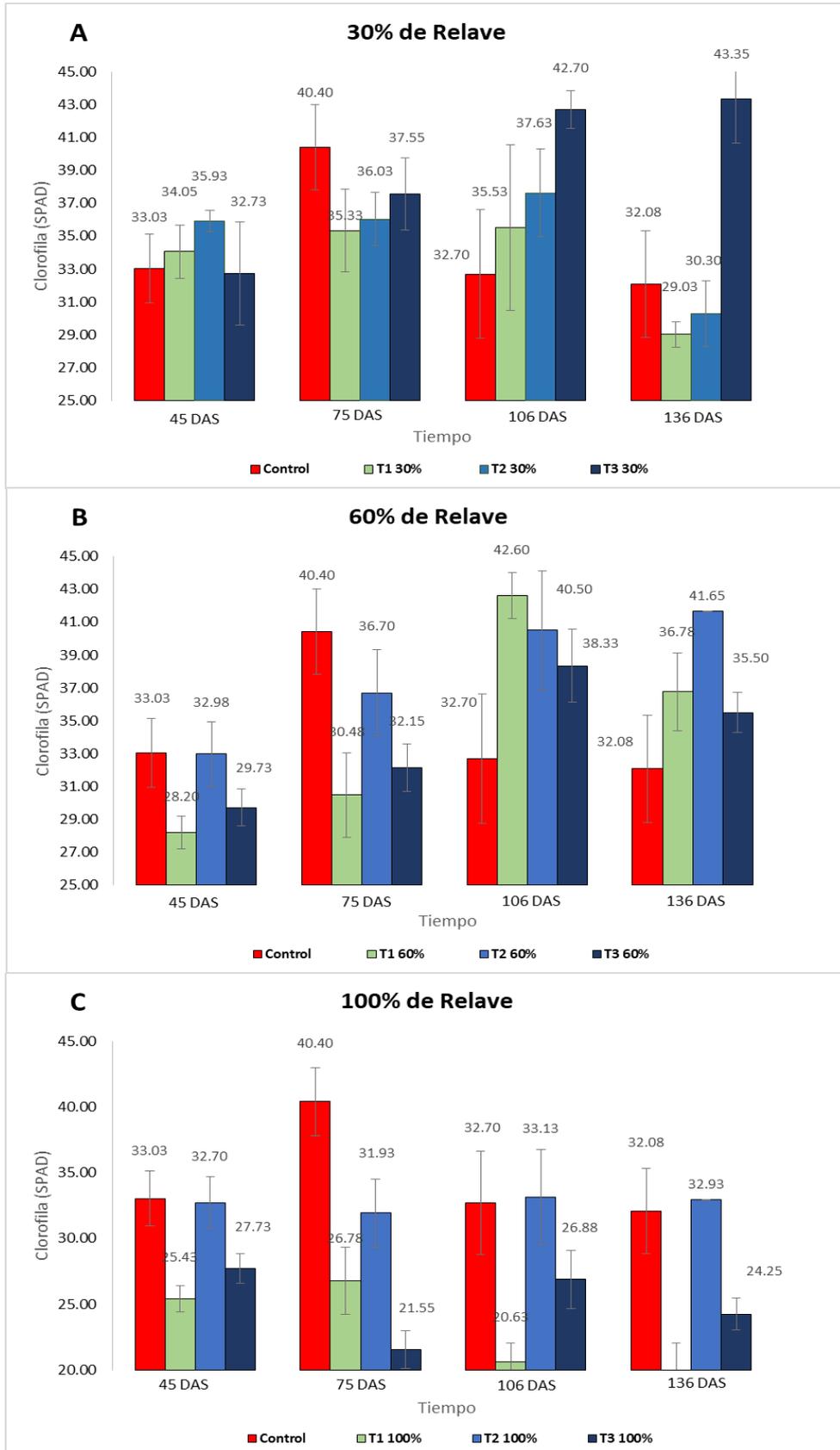
La línea base de concentración de metales expone un relave con concentraciones de hierro de hasta 46229.68 mg/Kg frente a un suelo orgánico con 11654.80 mg/Kg, una concentración de cobre de hasta 976.63 mg/Kg frente a un control con 70.25 mg/Kg, de Zinc de hasta 553.31 mg/Kg frente a un 23.46 mg/Kg y de Manganeso con un máximo

de 692.71 mg/Kg contra unos 128.8 mg/Kg del control. Estos valores observados en las muestras del pasivo ambiental ya superan ampliamente varios umbrales internacionales.

La Prueba ANOVA de un Factor para las variables fisiológicas Concentración de Clorofila, Área Foliar, Número de Hojas y Altura del Tallo (Anexos: Tabla 1s), demostró con una significancia del 0.05% la existencia de diferencias estadísticamente significativas, los resultados de las Comparaciones Múltiples de Tukey (Anexos: Tabla 2s – 13s) también demostraron claras diferencias estadísticas entre tratamientos. Las gráficas de comportamiento por variable para los cuatro meses se muestran a continuación.

Figura 5.

Contenido de Clorofila (SPAD) – Gráfico de barras con error estándar del Control vs T1 (verde) T2 (azul claro) y T3 (azul oscuro) con concentraciones al 30% (Gráfico A), 60% (Gráfico B) y 100% (Gráfico C) para los cuatro muestreos realizados.



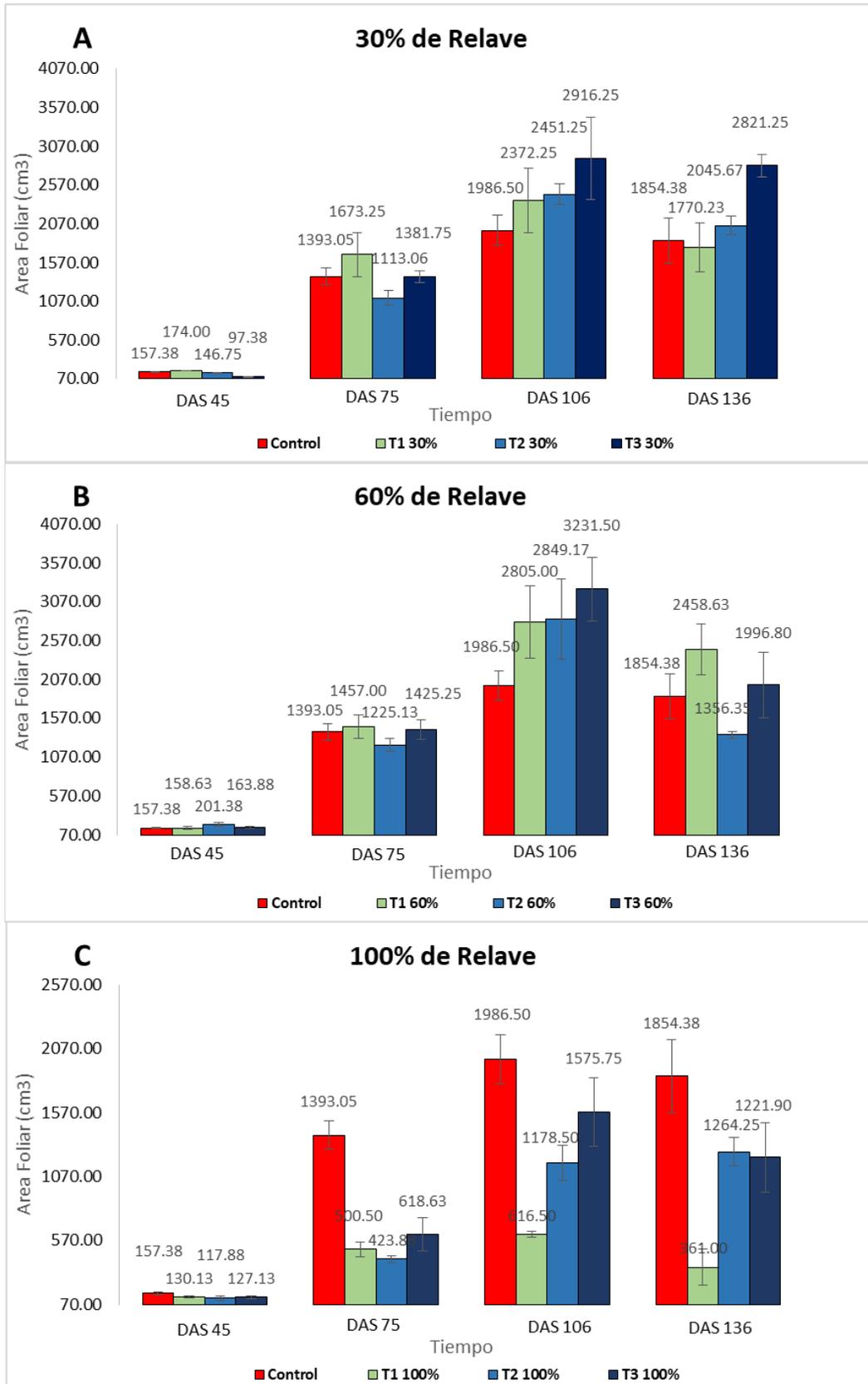
El T3 30% presentó un incremento constante de clorofila a lo largo de las etapas del cultivo superior al Control, el T2 30% expuesto también a bacterias PGPR en menor diversidad, expone una concentración de clorofila muy similar al control, viéndose los resultados más bajos en el T1 30% que no fue inoculado.

Por otro lado, todos los T_n60% evidencian un incremento por encima del control, la alta concentración de micronutrientes esenciales en comparación al control da indicio de su biodisponibilidad y aprovechamiento por parte de la especie sin llegar a afectar la inhibición del proceso de fotosíntesis, a pesar de que las concentraciones de estos tratamientos ya superan varios estándares internacionales respecto a los cuatro micronutrientes estudiados.

Por último, los T_n100% indican una productividad de clorofila por debajo del control, mostrándose la menor productividad en el T1 que no tuvo ninguna inoculación, seguido del T3, en cambio, el T2 100% que a pesar de haber recibido una inoculación únicamente de la PGPR *R. Endophyton*, igualo a la del tratamiento control al finalizar el periodo de tratamiento.

Figura 6.

Área Foliar (cm²) – Gráfico de barras con error estándar del Control vs T1 (verde) T2 (azul claro) y T3 (azul oscuro) con concentraciones al 30% (Gráfico A), 60% (Gráfico B) y 100% (Gráfico C) para los cuatro muestreos realizados.

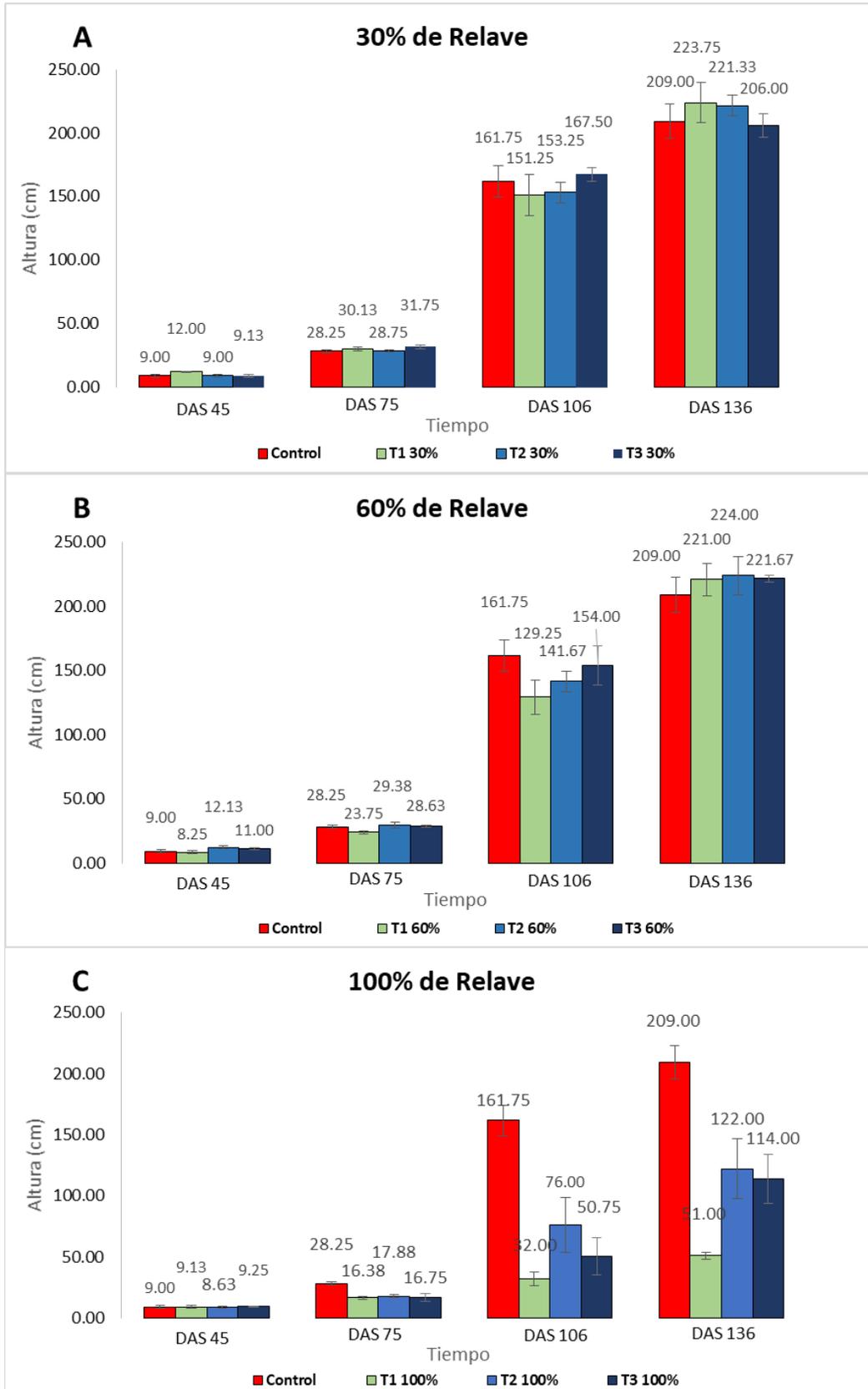


La inhibición del desarrollo foliar se presentó fuertemente en los tratamientos con un 100% de concentración según Figura 6-C, primando la alteración en el T1 que no tuvo ninguna aplicación de PGPR, por otro lado el T2 y T3 obtuvieron resultados muy similares en el último mes, sin embargo el T3 presentó una menor inhibición a lo largo de su desarrollo. Estos resultados evidencian como la concentración de clorofila se relaciona con el rendimiento y el área foliar (Castellano et al., 2017).

Se observa también un incremento en la producción foliar de los tratamientos T_n30% y T_n60% con respecto al control, incremento que toma el pico más alto a los 90 días de germinación, siendo el T3 30% y T3 60% los que presentaron los promedios de área foliar más elevados. La prueba de Tukey en la Tabla 5s indica al T3 inoculado con un consorcio de seis PGPR como el tratamiento con la significancia estadística más productiva de biomasa área a concentraciones entre el 30 y 60% con respecto a tratamientos con 100% de concentración inoculados o no, e incluso con tratamientos con 60% de concentración inoculados con *R. Endophyton*.

Figura 7.

Altura (cm) – Gráfico de barras con error estándar del Control vs T1 (verde) T2 (azul claro) y T3 (azul oscuro) con concentraciones al 30% (Gráfico A), 60% (Gráfico B) y 100% (Gráfico C) para los cuatro muestreos realizados.



La altura de las plantas de *Zea Mays L.* var Chingasino, mostraron un comportamiento bastante similar a lo largo de todo el periodo de investigación en los T_n30% y T_n60%, a pesar de las concentraciones altas de Cu, llegando a superar los 200 cm, lo cual las posiciona por encima de los promedios registrados por otros autores para la misma especie y sin sustratos contaminados.

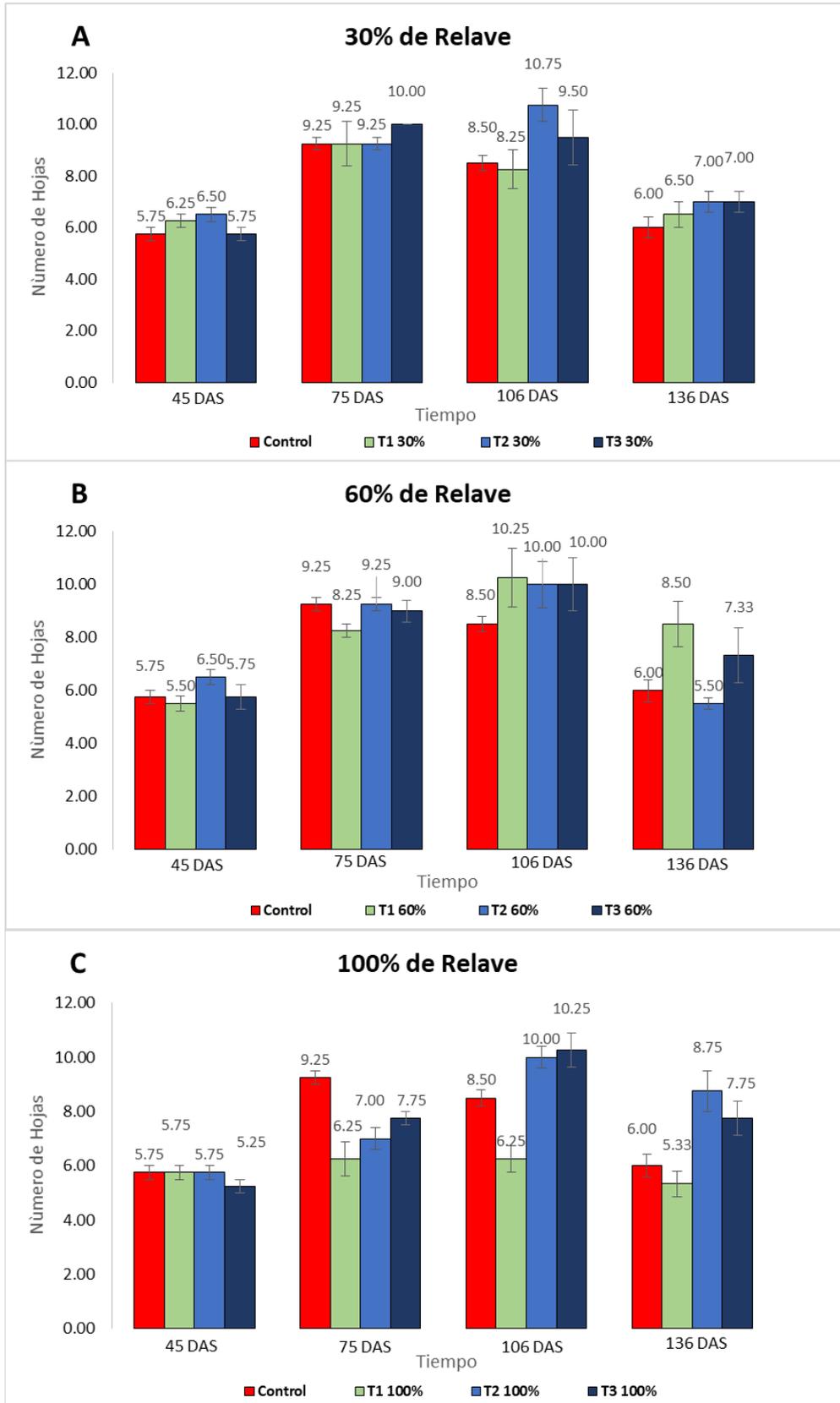
Caso contrario, en los T_n100% se hacen más evidentes las alteraciones producidas por el Cu en el suelo, siendo los valores de altura más bajos en el T1 100%, como se ha repetido en las variables antes analizadas, por otro lado el T2 100% y T3 100% alcanzan valores promedios 2 veces mayores al tratamiento no inoculado.

Según la prueba de comparaciones múltiples de Tukey no existió una diferencia estadísticamente significativa en todos los tratamientos desde el control hasta los T_n60%, lo que indica que a dichas concentraciones de micronutrientes no genera un impacto diferenciado en la altura, pero sí existió una superioridad estadística con respecto a los T_n100%, sin embargo, el T2 100% mostró superioridad estadística con respecto al T1 y T3 a la misma concentración, lo que indica una alta capacidad de producción de fitohormonas como las auxinas y giberelinas por parte de la PGPR *R. Endophyton*.

La variable Número de Hojas representó un punto máximo en el tercer mes de todos los tratamientos, a partir de allí se visualiza un decrecimiento que se puede atribuir en parte a la aparición de la plaga de pulgones del maíz (*Rhopalosiphum maidis*) que a pesar de ser combatida llegó a ocasionar mortalidad en las hojas debido a la absorción de la clorofila por parte de estos áfidos, cabe mencionar que los resultados obtenidos de los monitoreos mensuales consideran para esta variable únicamente las hojas vivas.

Figura 8.

Número de Hojas – Gráfico de barras con error estándar del Control vs T1 (verde) T2 (azul claro) y T3 (azul oscuro) con concentraciones al 30% (Gráfico A), 60% (Gráfico B) y 100% (Gráfico C) para los cuatro muestreos realizados.



Para el tercer mes previo a la aparición de la plaga se observó un leve incremento en el número de hojas pertenecientes a los tratamientos inoculados expuestos al 30%, 60% y 100% de concentración de relave, únicamente el tratamiento T₁100% presento promedios moderadamente bajos en comparación al control durante todo el periodo de experimentación.

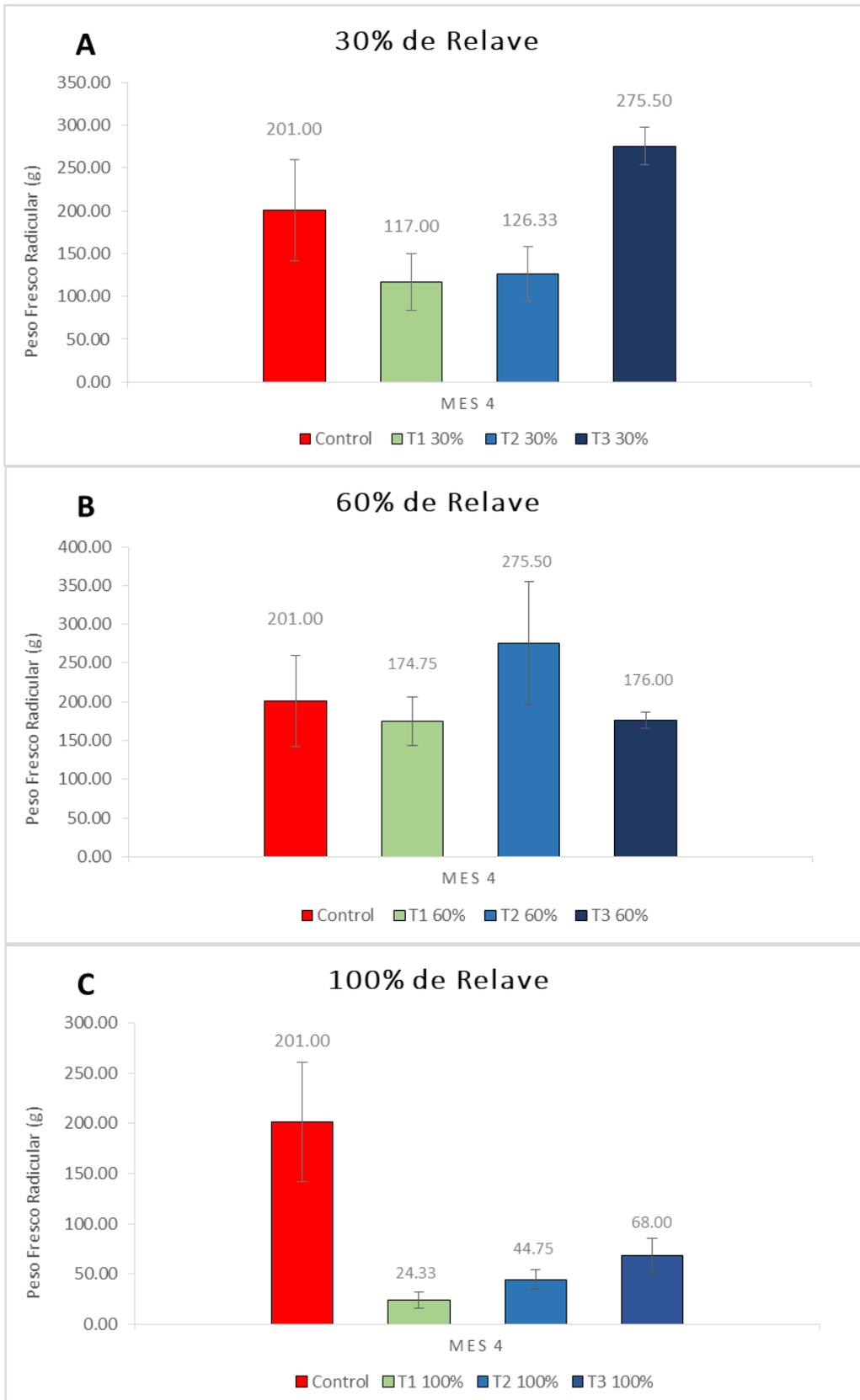
La Tabla 9s indica una igualdad estadística en casi todos los resultados de esta variable, el T₂ 100% inoculado con *R. Endophyton* es el único tratamiento inoculado que representa una superioridad estadística con respecto al T₁ 100%.

La aparición de inflorescencias masculinas en el Control y los T_n30% se dió en el segundo mes, estando ya completamente formadas y habiendo polinizado a los 106 DAS, reflejando una conducta más prematura a la de un cultivo en condiciones normales, sin embargo en todos los tratamientos expuestos a concentraciones de relaves por encima de esta, se observa un comportamiento más cercano a los descritos por otros autores, lográndose la formación de inflorescencias masculinas y polinización de las femeninas para los 105 DAS en promedio, a excepción de los individuos del T₁100% que no logro el desarrollo de inflorescencias en todo su ciclo.

El peso fresco radicular observado por los tratamientos expuestos a un 30% de concentración de relave, evidencian claramente un aumento en los promedio conforme se aumenta la diversidad microbiana inoculada en los tratamientos, viéndose un incremento del 135.47% por encima del T₁30%, del 118.08% por encima del T₂30% e incluso un incremento del 37.06% por encima del T₀ con respecto al T₃30%.

Figura 9.

Peso Fresco Radicular (g) – Gráfico de barras con error estándar del Control vs T1 (verde) T2 (azul claro) y T3 (azul oscuro) con concentraciones al 30% (Gráfico A), 60% (Gráfico B) y 100% (Gráfico C) para los cuatro muestreos realizados.



Por otro lado a una exposición del 60% de concentraciones de relave, se observa un claro aumento en los pesos radiculares de todos los tratamientos, la mayor concentración de micronutrientes, incluso ya por encima de estándares internacionales, da indicio del aumento de la biodisponibilidad de los mismos a una escala aun no toxica para esta variable fisiológica como también se observó en los resultados de concentración de clorofila y área foliar, dando el resultado más alto para el tratamiento inoculado con *R. Endophyton*, posicionándolo a un 56.53% por encima de su par inoculado con cinco géneros distintos de PGPR.

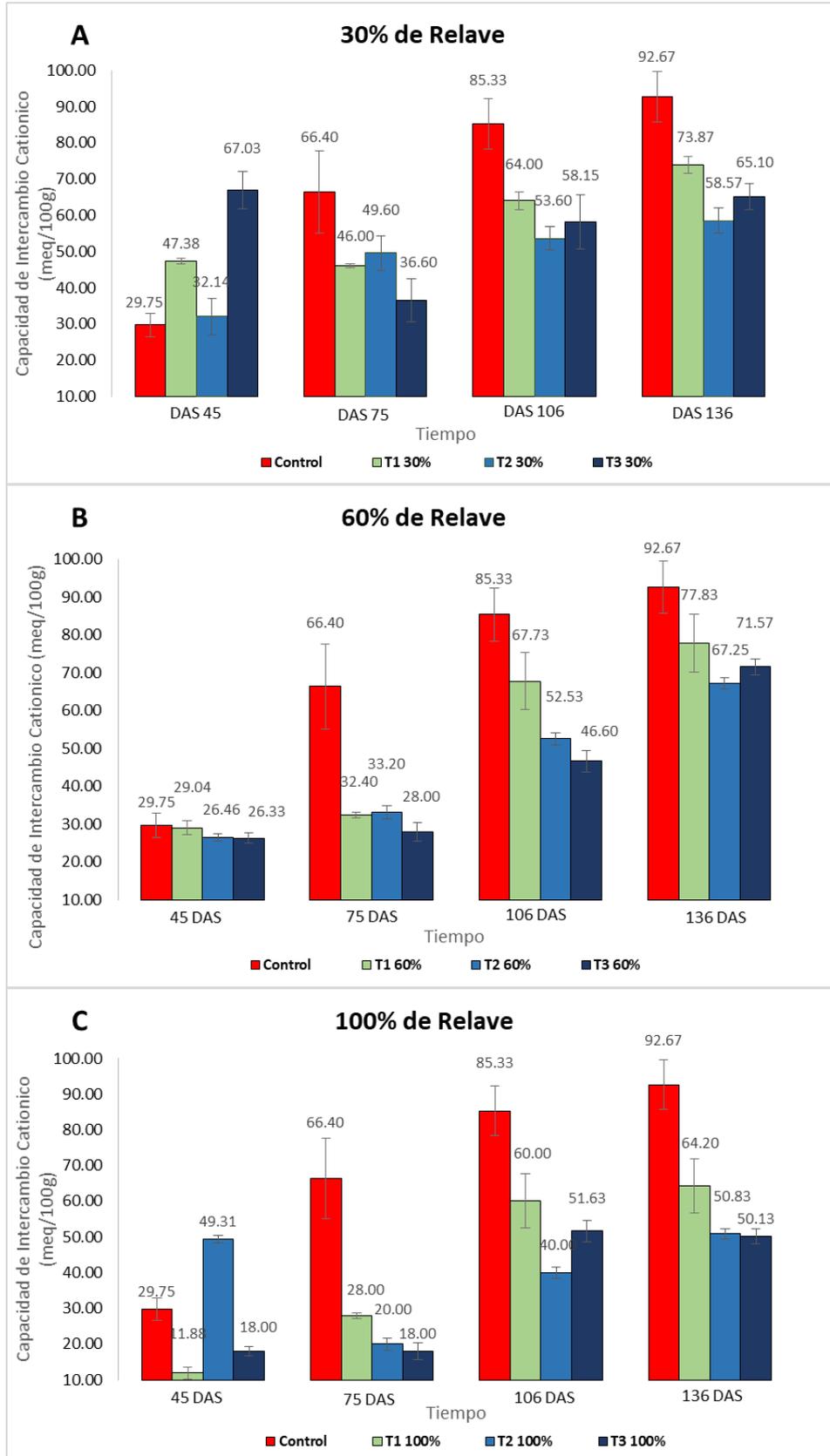
Por último, el escenario expuesto a un 100% de concentración posiciona al T₃100% un 179.49% por encima del tratamiento no inoculado y un 51.96% por encima del tratamiento inoculado con *R. Endophyton*, sin embargo, quedando aún muy por debajo de los promedios del T₀, siendo superado en un 195.59%.

La Tabla 13s demuestra la superioridad estadística del T3 a concentraciones < 30% de relave, sin embargo, el T2 demuestra superioridad estadística a concentraciones de hasta el 60% de relave, posicionando al *R. Endophyton* como la opción más viable para el desarrollo de biomasa radicular frente a altas concentraciones de metales.

Las variables edafológicas, Capacidad de Intercambio Catiónico, Materia Orgánica Total, y Conductividad Eléctrica, analizadas de manera mensual durante todo el periodo de experimentación, se plasman en una comparación de medias unifactorial ANOVA y en la Prueba de Comparaciones Múltiples de Tukey. (Anexos: Tabla 14s – 22s), mostrándose diferencias estadísticas notables entre los tratamientos. Las gráficas de comportamiento por variable para los cuatro meses, se presentan líneas abajo.

Figura 10.

CIC (meq/100g) – Gráfico de barras con error estándar del Control vs T1 (verde) T2 (azul claro) y T3 (azul oscuro) con concentraciones al 30% (Gráfico A), 60% (Gráfico B) y 100% (Gráfico C) para los cuatro muestreos realizados.



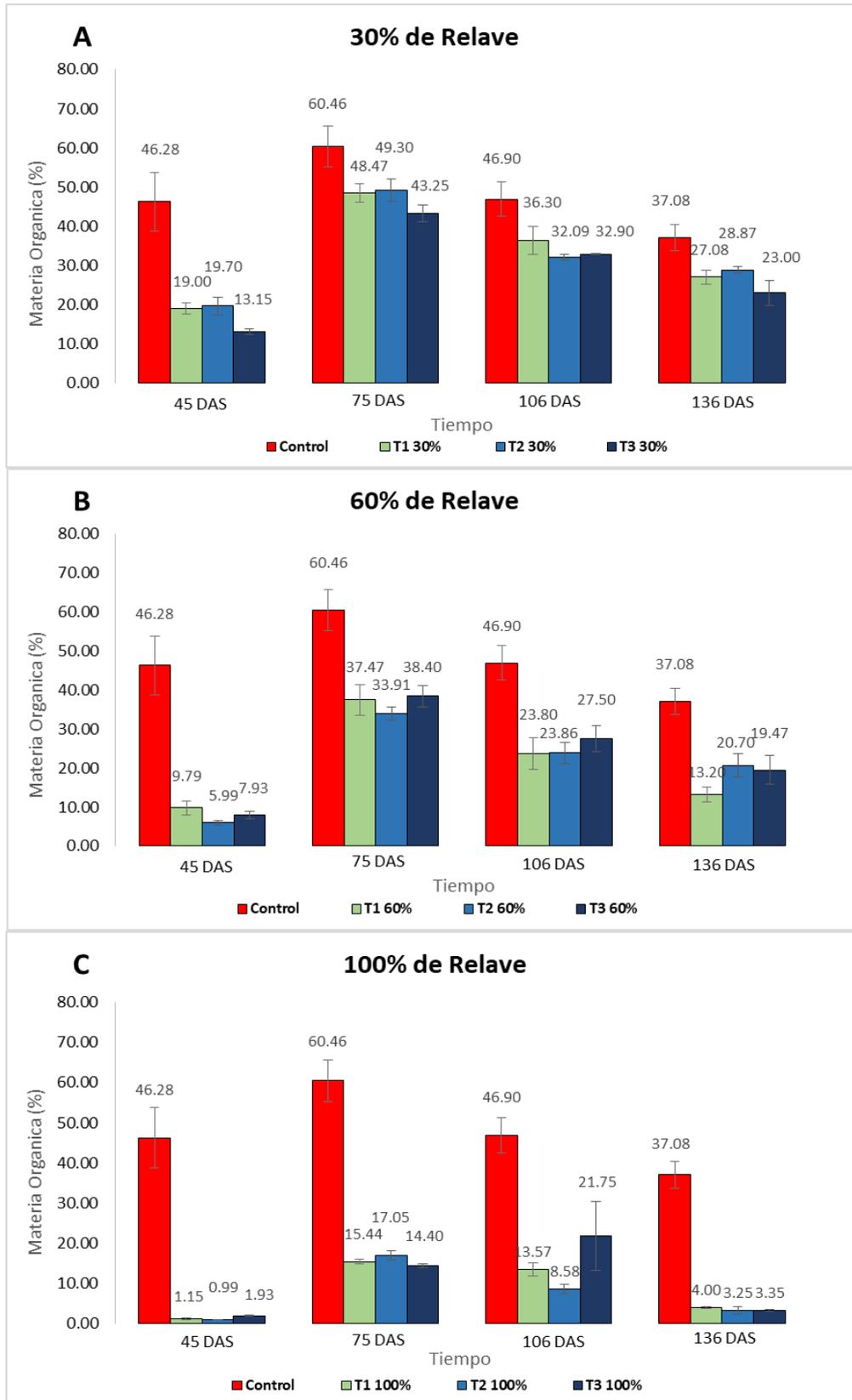
La Capacidad de Intercambio Catiónico en todos los tratamientos tuvo un incremento constante, empezando desde una Línea Base con resultados de 11.8, 8.12, 7.51 y 5.82 cmol/100g desde el control hasta el T3 en concentraciones de relaves ascendentes, evidenciando un CIC bastante bajo, característico de un suelo Franco Arenoso con rangos típicos entre 5-10 cmol/100g.

Los valores de la CIC para el Control son claramente superiores en comparación a todos los tratamientos, la alta biomasa radicular producida libre de contaminantes contribuye al aumento de porcentaje de materia orgánica cargada negativamente, dando paso a una diferencia estadística con tratamientos con un 100% de concentración, con una biomasa radicular bastante baja en comparación.

Los resultados de CIC terminan siendo considerados altos en todos los tratamientos, lo que da lugar a considerarse una matriz ideal para la aplicación de fertilizantes por su capacidad de retención y aprovechamiento por parte del cultivo, sin embargo, este no fue el caso dado que no se aplicó fertilizantes, aun así es un punto a tomar en cuenta para futuras investigaciones. Los relaves provenientes del pasivo ambiental de Santa Rosa de Cata no llegarían a afectar la CIC en un suelo cultivado, y solo al 100% de concentración podrían diferenciarse estadísticamente de un suelo orgánico sin contaminantes, pero sin dejar de considerárselo como un valor aun alto.

Figura 11.

Materia Orgánica (%) – Gráfico de barras con error estándar del Control vs T1 (verde) T2 (azul claro) y T3 (azul oscuro) con concentraciones al 30% (Gráfico A), 60% (Gráfico B) y 100% (Gráfico C) para los cuatro muestreos realizados.



El porcentaje de Materia Orgánica como lo indica la literatura, es uno de los factores más influyentes en la Capacidad de Intercambio Catiónico del suelo, lo que se ve reflejado al comparar los resultados de ambos parámetros, en donde el tratamiento Control tiene un Porcentaje de Materia Orgánica estadísticamente superior a comparación de casi todos los tratamientos restantes a excepción de T₂30% el cual demostró ser el tratamiento con mayor producción de materia orgánica después del Control y mostrando una diferencia estadística con casi todos los tratamientos al 60% y todos al 100% de concentración.

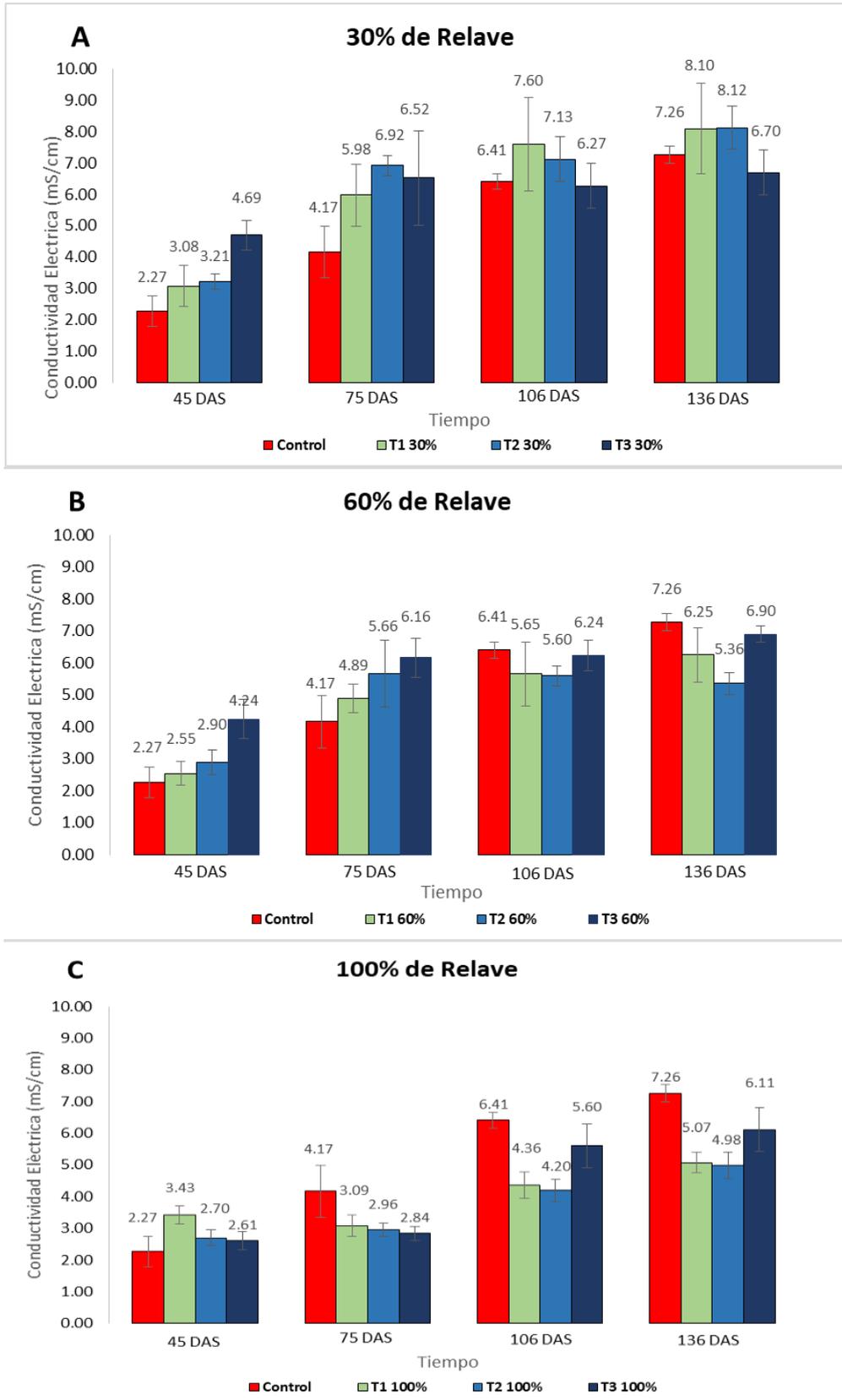
Por otro lado, el T₂60% también demostró ser el tratamiento con mayor producción de materia orgánica de los tratamientos a su misma concentración, pero sin demostrar una diferencia estadística con estos, sin embargo, si se observó una clara diferenciación estadística entre todos los tratamientos al 60% con los expuestos a un 100%.

Estos resultados exponen a la bacteria *R. Endophyton* como una PGPR con la capacidad de igualar una condición expuesta a relaves con una sin exposición a contaminantes respecto a la producción de Materia Orgánica, situación que ya ha sido evidenciada también con otros parámetros antes descritos.

Los resultados de Potencial de Hidrogeno de la línea base así como los post experimentales se encuentran en un rango de neutro (6.6-7.3) a ligeramente alcalino (7.4-7.8) según la clasificación de “*Natural Resources Conservation Service*” de Estados Unidos para el pH del suelo. El pH del suelo influye directamente en la movilidad de los metales, por lo que el relave minero de San Rosa de Cata, mantendría a sus metales en un estado de inmovilidad, no facilitando su biodisponibilidad para las especies vegetales que allí se asienten.

Figura 12.

Conductividad Eléctrica (mS/cm) – Gráfico de barras con error estándar del Control vs T1 (verde) T2 (azul claro) y T3 (azul oscuro) con concentraciones al 30% (Gráfico A), 60% (Gráfico B) y 100% (Gráfico C) para los cuatro muestreos realizados.

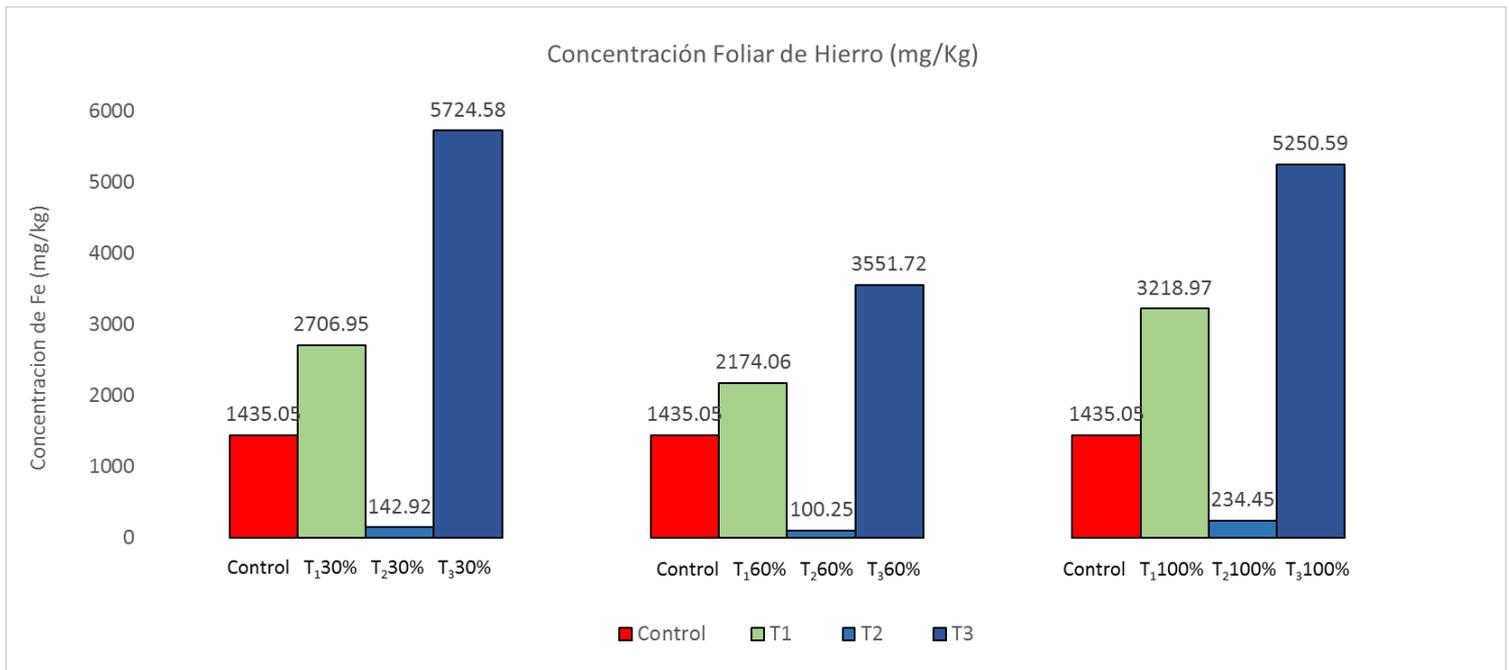


La Conductividad Eléctrica en el suelo es el parámetro indirecto para la medición de la salinidad en el suelo, condición que dependiendo de su severidad puede o no afectar el desarrollo normal del cultivo. La línea base mostró resultados que iban desde suelos ligeramente salinos (2-4 dS/m) hasta moderadamente salinos (4-8 dS/m), sin embargo, con el paso de los meses la salinidad en todos los tratamientos ascendió de manera constante, posicionando a los resultados post experimentación desde moderadamente salinos (4-8 dS/m) hasta fuertemente salinos (8-16 dS/m) según la clasificación de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación (FAO).

Los resultados de concentración de metales observados al cabo de los cuatro meses de experimentación en el tejido foliar y radicular de los tratamientos, también fue sometido a un Análisis de Varianza Unifactorial ANOVA. Los resultados de la prueba señalaron que existe diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos para las cuatro concentraciones de metales estudiadas, con una significancia del 5%. La Prueba de Tukey determinó que grupos fueron los que presentaron las mayores diferencias entre sí para cada metal (Anexos: Tabla 23s – 27s). Las gráficas de comportamiento mensual se observan a continuación.

Figura 13.

Concentración Foliar de Hierro (mg/Kg) – Gráfico de barras del Control vs T1 (verde), T2 (azul claro) y T3 (azul oscuro) con concentraciones al 30%, 60% y 100% de relave.



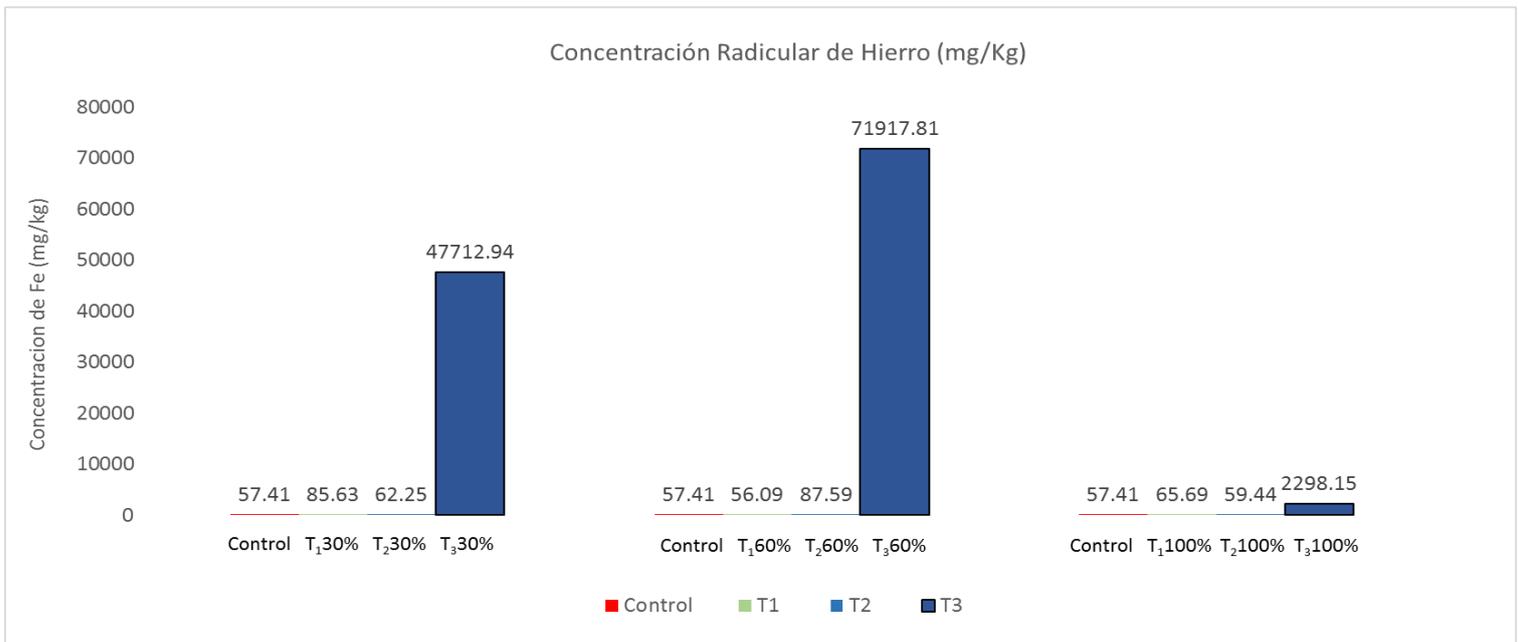
La concentración Foliar del Hierro en los ejemplares de *Zea Mays L. var. Chingasino* mostraron un comportamiento ampliamente diferenciado estadísticamente, el T2 obtuvo concentraciones bastante bajas de Fe en la zona aérea de la planta, incluso estadísticamente menor que el tratamiento Control, a pesar de la abundancia de este metal en su sustrato, la acción microbiana en la rizófora, inoculada con *R. Endophyton*, demuestra la capacidad de inhibir la traslocación del Fe, de tal manera que protege al individuo de la fitotoxicidad que esta pueda causar en la especie, más específicamente en la producción de clorofila.

Por otro lado, el T1 obtuvo concentraciones por encima del Control, lo cual se entiende por la mayor cantidad de Fe en su sustrato y la falta de una asistencia microbiana que promueva la fitoestabilización o fitoextracción del metal, dando como resultado un proceso de traslocación del Fe propio del metabolismo de la especie en condiciones

normales, pero estadísticamente superior al tratamiento Control. El T3 en cambio, demostró una alta capacidad de traslocación, siendo esta estadísticamente superior a los resultados del T2, Control y T1.

Figura 14.

Concentración Radicular de Hierro (mg/Kg) – Gráfico de barras del Control vs T1 (verde), T2 (azul claro) y T3 (azul oscuro) con concentraciones al 30%, 60% y 100% de relave.



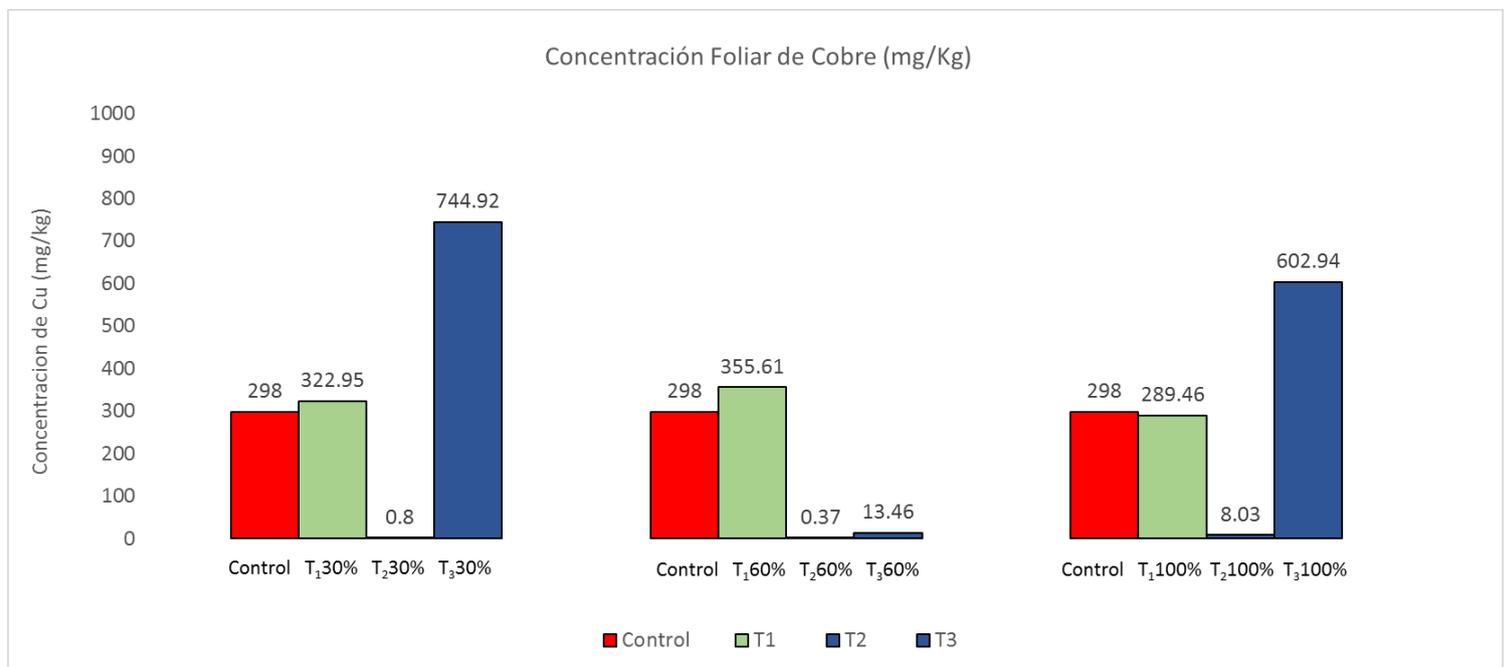
Los resultados obtenidos en la concentración de Fe en la zona radicular de los ejemplares del Control y T1 son concluyentes en cuanto al metabolismo intrínseco de la especie en translocar con mayor facilidad este metal a la parte aérea de la planta, obteniéndose valores muy bajos y estadísticamente iguales de concentración radicular de hierro para ambos tratamientos.

Por otro lado el T2 inoculado únicamente con *R. Endophyton* demostró una gran capacidad de inhibir de manera estadísticamente significativa todo mecanismo de fitoestabilización o fitoextracción del Fe evitando consecuencias fitotóxicas para la especie, incluso a una concentración del 100% de relave.

El T3 por otro lado, volvió a demostrar la capacidad de cambiar completamente el comportamiento de la planta con respecto al T2, logrando una absorción del Fe tanto a nivel foliar como radicular, obteniéndose los valores de concentración más altos en toda su biomasa a un 30% y 60% siendo estadísticamente superiores a todos los demás tratamientos y focalizándose en la raíz.

Figura 15.

Concentración Foliar de Cobre (mg/Kg) - Gráfico de barras del Control vs T1 (verde), T2 (azul claro) y T3 (azul oscuro) con concentraciones al 30%, 60% y 100% de relave.



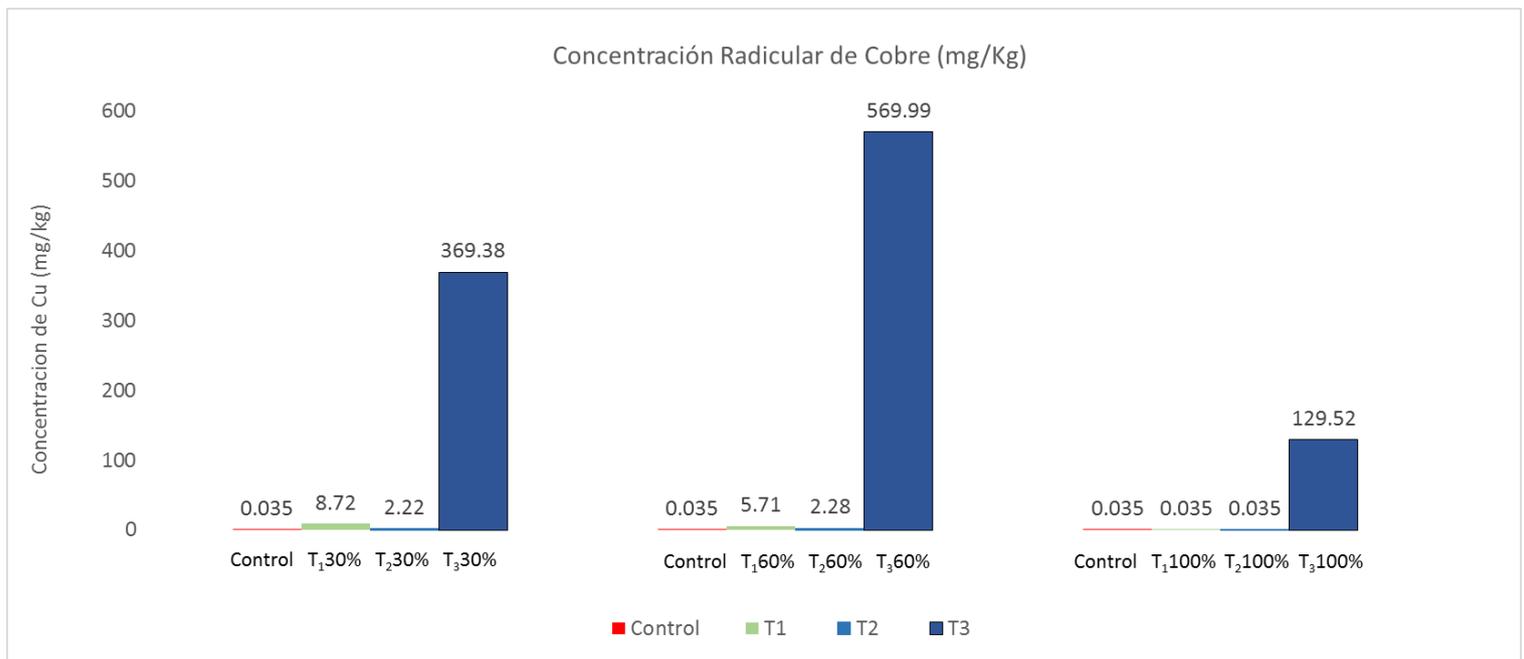
Las concentraciones de Cu en la parte aérea de los ejemplares del T2 siguieron un comportamiento similar al observado en los resultados de concentración de Fe, obteniéndose concentraciones menores que las del mismo tratamiento control. El comportamiento del Control y el T1 en cuanto la absorción de Cu en tallos, hojas y frutos, responde al comportamiento habitual de la especie, siendo este estadísticamente superior al T2 y nuevamente inferior estadísticamente al T3. La asistencia recibida por las variedades de PGPR inoculada en el T3, logra una superioridad estadística en la

traslocación del Cu de 209.46% más de concentración respecto al tratamiento sin asistencia con mayor capacidad fitoextractora, (T1 60%) y el tratamiento con asistencia con mayor capacidad del mismo tipo (T3 30%).

La fitoextracción de Cobre en la biomasa aérea del T3 30% alcanzo valores superiores a los 700 mg/Kg y supero los 1000 mg/Kg considerado la biomasa total, estando muy cerca de ser considerado un tratamiento capaz de hiperacumular el Cobre en su tejido aéreo.

Figura 16.

Concentración Radicular de Cobre (mg/Kg) – Gráfico de barras del Control vs T1 (verde), T2 (azul claro) y T3 (azul oscuro) con concentraciones al 30%, 60% y 100% de relave..



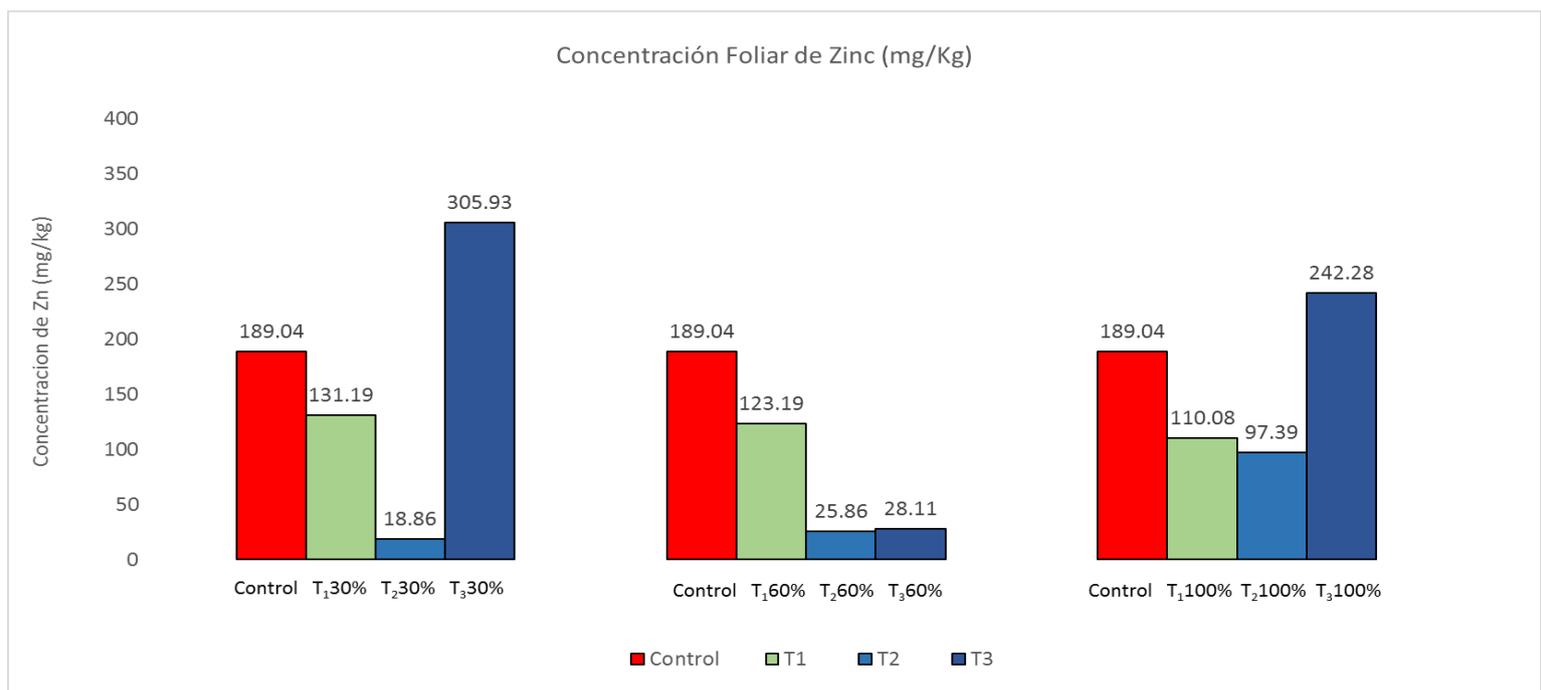
El comportamiento en las raíces expuestas al Cu en los ejemplares de *Zea Mays L.* sigue un patrón muy similar al observado con el Fe, los resultados del T2 demuestran una inhibición casi completa de la absorción del metal en el tejido aéreo y radicular. El Control y T1, también reflejan lo observado frente al Fe, las concentraciones en el tejido radicular son muy bajas y estadísticamente iguales entre sí, posicionando a la especie

Zea Mays L. como una especie con un metabolismo que tiende a facilitar la traslocación del Cu y Fe de manera natural.

El T3 por otro lado, promovió de manera significativamente diferenciada la absorción del Cu en el tejido radicular de la planta, siendo el T3 30% el tratamiento con la mayor concentración de Cu en toda su biomasa, siendo su valor promedio de más de 1000 mg/Kg en toda la planta. Sin embargo a una concentración del 60% la acumulación de Cu en el tejido radicular es estadísticamente superior al T3 30%, pero casi nulo en el tejido foliar por lo que el comportamiento de la planta a esta concentración tiende a estabilizar el metal en la raíz y a una concentración del 100% el comportamiento es totalmente opuesto, traslocando el metal a la parte aérea, la bioacumulación del Cu a dichas concentraciones sigue siendo mayor al obtenido por los ejemplares no inoculados expuestos a la misma concentración.

Figura 17.

Concentración Foliar de Zinc (mg/Kg) – Gráfico de barras del Control vs T1 (verde), T2 (azul claro) y T3 (azul oscuro) con concentraciones al 30%, 60% y 100% de relave.

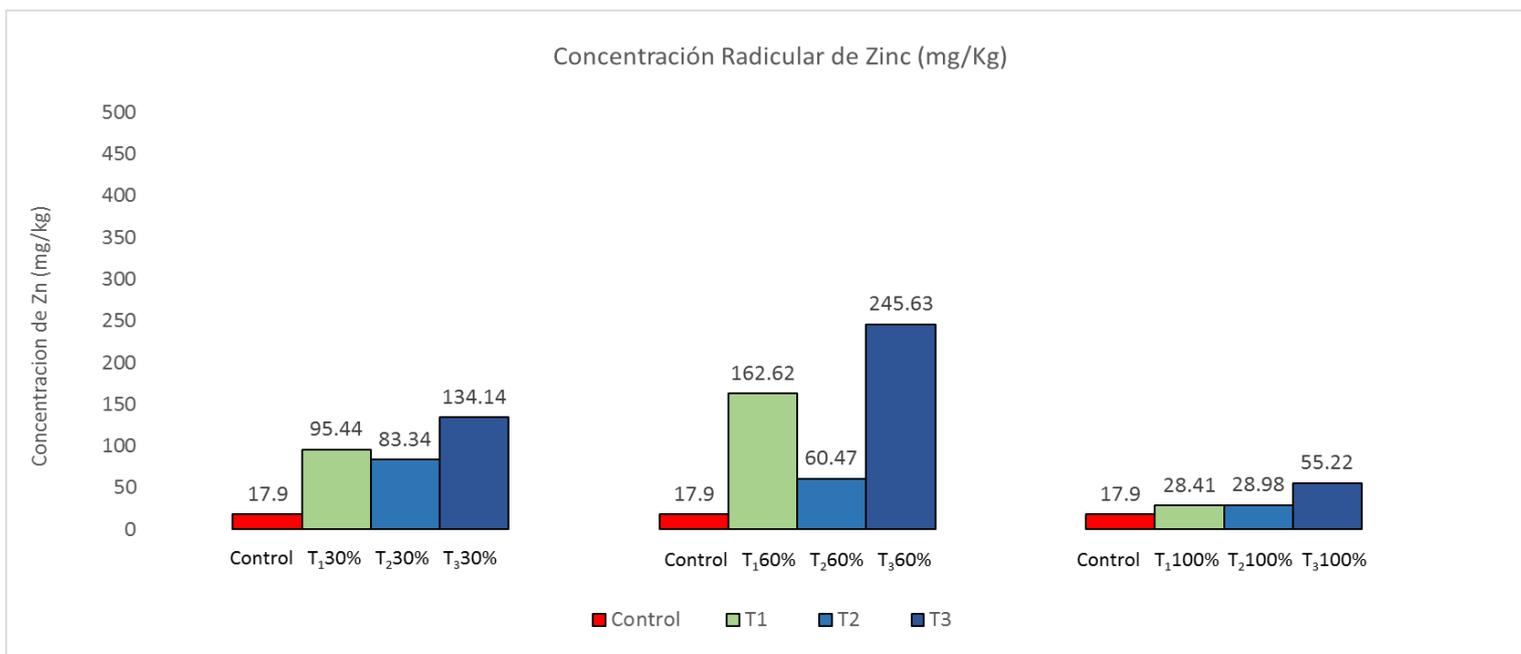


La concentración de Zn en la zona aérea tuvo un comportamiento similar al del Fe y Cu, la bacteria *R. Endophyton* inhibió la traslocación del metal desde la rizosfera en todas las concentraciones a las que se expuso, obteniéndose concentraciones aéreas hasta 7 veces más bajas que en los ejemplares expuestos a relaves sin asistencia microbiana. El T1 por otro lado demostró nuevamente lo sustentado por Rivera y Lázaro (2017) sobre la capacidad fitoextractora del Maíz para el Zn, obteniendo valores por encima de los 100 mg/Kg en la biomasa aérea.

El T3 a su vez logró aumentar de manera significativa estadísticamente la capacidad fitoextractora de la especie *Zea Mayz L.* var Chingasino, en 133.19% a una exposición del 30% de concentración y en 120.1% a una exposición del 100% de relave con respecto al T1.

Figura 18.

Concentración Radicular de Zinc (mg/Kg) – Gráfico de barras del Control vs T1 (verde), T2 (azul claro) y T3 (azul oscuro) con concentraciones al 30%, 60% y 100% de relave.



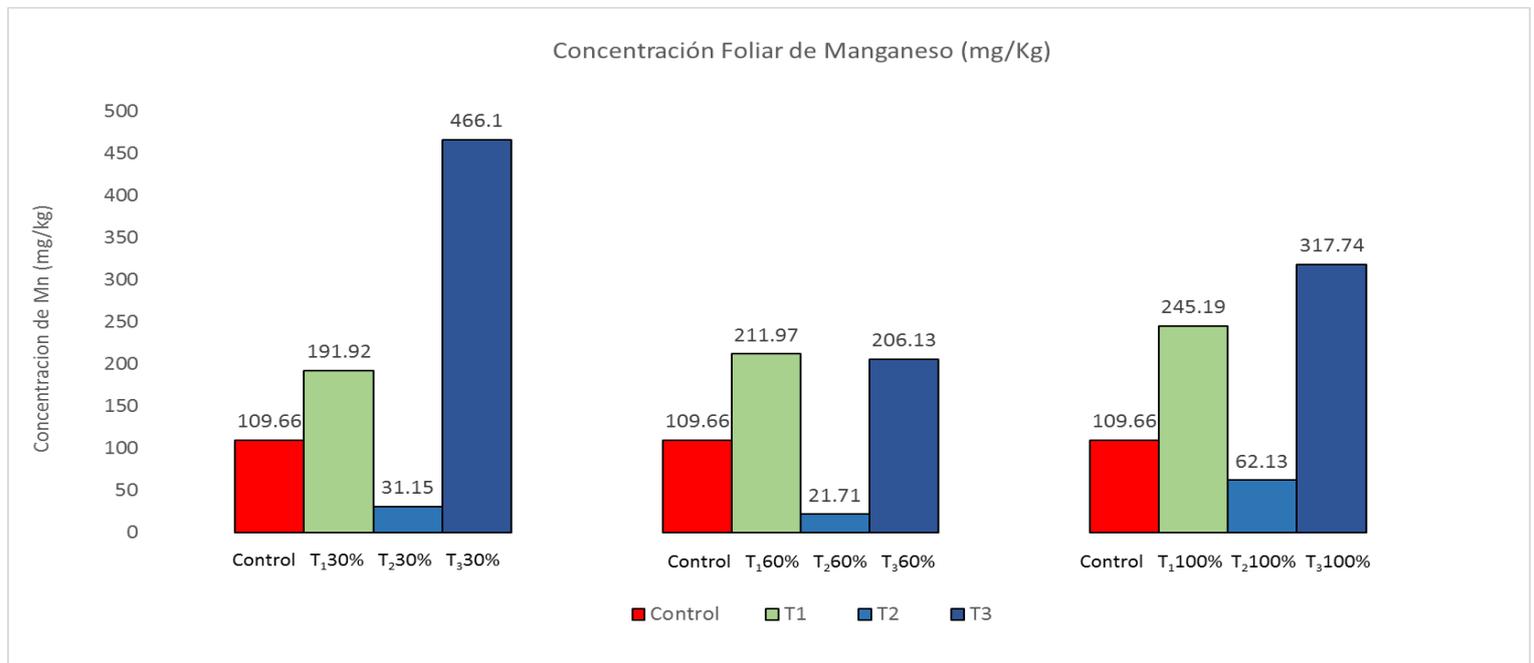
La interacción de la especie *Zea Mays L.* con el Zn, obedece a un comportamiento fitoextractor en el Control, con una concentración de Zn en la raíz bastante bajo, al igual que con el Fe y Cu, sin embargo en el T1 este comportamiento varía levemente, ya que los ejemplares no inoculados expuestos a un 30% y 60% de concentración de relave, presentaron concentraciones moderadamente altas y bastante similares entre sí en la raíz y la zona aérea de los ejemplares, únicamente el T1 100% presentó un comportamiento claramente fitoextractor al igual que el Control.

El T2, nuevamente demostró el potencial inhibitorio en la absorción de metales en los tejidos de la planta, presentando valores de concentración radicular estadísticamente inferiores a los observados en el T1, pero superiores al Control, a diferencia de los resultados de la concentración foliar, en los que sí fueron incluso menores al Control.

El T3, al igual que con el Cu, promovió de manera significativamente diferenciada la absorción del Zn en el tejido de la planta, siendo nuevamente el T3 30% el tratamiento con la mayor bioacumulación de metal en toda su biomasa, sin embargo, los valores obtenidos no fueron tan elevados como con el Cu. A una concentración del 60% la acumulación de Zn en el tejido radicular es estadísticamente superior al T3 30%, pero casi nulo en el tejido foliar por lo que el comportamiento de la planta a esta concentración tiende a estabilizar el metal en la raíz y a una concentración del 100% la absorción radicular vuelve a disminuir, translocando el metal a la parte aérea, aun así, la bioacumulación del Zn a dichas concentraciones sigue siendo mayor al obtenido por los ejemplares no inoculados expuestos a la misma concentración, este mismo escenario observado en el T3 se repitió frente al Cu.

Figura 19.

Concentración Foliar de Manganeso (mg/Kg) – Gráfico de barras del Control vs T1 (verde), T2 (azul claro) y T3 (azul oscuro) con concentraciones al 30%, 60% y 100% de relave.

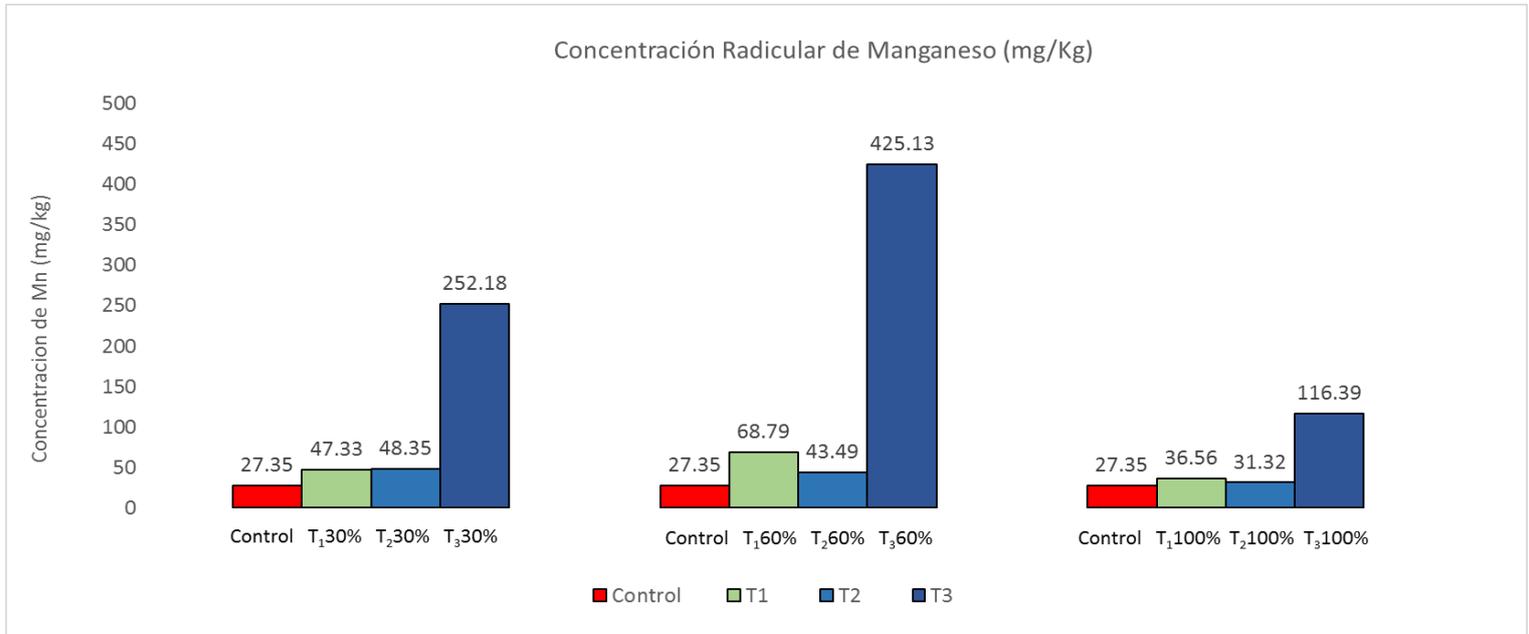


A diferencia del Zn y el Cu, el Mn no es un metal de fácil fitoextracción por parte de la especie *Zea Mays L.*, sin embargo, a un 30% de concentración de relave el T3 alcanzó una acumulación de 142.86% por encima del T1, pero a mayores concentraciones esta diferencia decreció considerablemente, siendo estas de menos 2.75% al 60% de relave y de más 29.58% al 100% de relave entre el T1 y T3. Este comportamiento deja ver la selectividad que tiene la especie para inhibir la translocación del Mn a la parte aérea incluso al ser inoculada, por lo que las concentraciones que puede llegar a almacenar en su biomasa están lejos de ser significativas para este metal.

Por último el T2, nuevamente inhibió la absorción de metales en el tejido foliar de la planta de manera estadísticamente significativa, incluso en comparación al Control, situación que se ha repetido con todos los metales estudiados.

Figura 20.

Concentración Radicular de Manganeso (mg/Kg) – Gráfico de barras del Control vs T1 (verde), T2 (azul claro) y T3 (azul oscuro) con concentraciones al 30%, 60% y 100% de relave.



El Control y el T1 al igual que con los demás metales, demostró un comportamiento que tiende a la fitoextracción del Mn, obteniendo concentraciones radiculares más bajas que las de las foliares, siendo las del control las más bajas estadísticamente. El T2, sin embargo, igualo estadísticamente la concentración de Mn en las raíces del Control y el T1, esto, sumado a la baja concentración que permitió translocar el Mn a la parte aérea evidenció como el *R. Endophyton* supone una protección a nivel radicular y foliar del maíz frente a concentraciones fitotóxicas de micronutrientes.

El T3 obtuvo las concentraciones más elevadas de Mn en las raíces, y al igual que con el Fe, Cu y Zn, a un 60% de relaves el T3 tiende a fitoestabilizar los metales, mientras que

a un 30% y 100% tiende a translocar los metales, pero siempre manteniendo una mayor absorción a nivel de biomasa total en comparación al T1.

Además del análisis estadístico al que fueron sometidos todos los parámetros analizados, se calculó el Factor de Bio-Concentración en la parte aérea, en la raíz y en toda la biomasa de los individuos, obtenido por el promedio de las 4 repeticiones por tratamiento, obteniéndose los siguientes resultados:

Tabla 1.

Factor de Bioconcentración Aéreo
BCF promedio de cuatro repeticiones

	Control	T1 30%	T1 60%	T1 100%	T2 30%	T2 60%	T2 100%	T3 30%	T3 60%	T3 100%
Fe	0.0392	0.0388	0.0199	0.0315	0.0016	0.0009	0.0019	0.0670	0.0364	0.0438
Cu	0.2213	0.3082	0.1444	0.0733	0.0007	0.0001	0.0024	0.5436	0.0075	0.2066
Zn	3.2951	0.2380	0.0922	0.0628	0.02203	0.0206	0.0602	0.3396	0.0244	0.1896
Mn	0.2467	0.1793	0.1129	0.0982	0.0284	0.0124	0.0198	0.3412	0.1223	0.1236

La relación entre la concentración en el tejido vegetal aéreo, representado en flores, hojas, tallo y frutos, respecto a la concentración del suelo, indica un valor inferior a 1 en todos los tratamientos, lo cual clasifica a la especie *Zea Mays L.* como una especie excluyente de los metales analizados en la parte aérea, incluso en los tratamientos donde hubo inoculaciones bacterianas.

Sin embargo, la concentración de Cu obtenida en los T3 30% y T3 100% alcanzaron los 744.92 mg/ Kg y 602.94 mg/Kg respectivamente, siendo estos valores bastante cercanos a los 1000 mg/kg por encima de los cuales, se puede considerar a una especie como hiperacumuladora de Cu (Medina K. & Montano Y.,2014).

Tabla 4.

Factor de Bioconcentración en Raíz

BCF promedio de cuatro repeticiones

	<u>Control</u>	<u>T1 30%</u>	<u>T1 60%</u>	<u>T1 100%</u>	<u>T2 30%</u>	<u>T2 60%</u>	<u>T2 100%</u>	<u>T3 30%</u>	<u>T3 60%</u>	<u>T3 100%</u>
Fe	0.0016	0.0012	0.0005	0.0006	0.0007	0.0008	0.0005	0.5588	0.7369	0.0192
Cu	0.0000	0.0083	0.0023	0.0000	0.0019	0.0010	0.0000	0.2696	0.3183	0.0444
Zn	0.3120	0.1732	0.1217	0.0162	0.0974	0.0483	0.0179	0.1489	0.2133	0.0432
Mn	0.0615	0.0442	0.0367	0.0146	0.0441	0.0248	0.0100	0.1846	0.2521	0.0453

El Factor de Bioconcentración en el tejido radicular, tampoco obtuvo valores mayores a uno en ninguno de los tratamientos, clasificándola también como excluyente en este órgano, sin embargo, obtuvo valores cercanos en el T3 60% para el caso del Fe.

Tabla 5.

Factor de Bioconcentración en la planta - Biomasa Total

BCF promedio de cuatro repeticiones

	<u>Control</u>	<u>T1 30%</u>	<u>T1 60%</u>	<u>T1 100%</u>	<u>T2 30%</u>	<u>T2 60%</u>	<u>T2 100%</u>	<u>T3 30%</u>	<u>T3 60%</u>	<u>T3 100%</u>
Fe	0.0408	0.0401	0.0205	0.0321	0.0024	0.0016	0.0024	0.6258	0.7734	0.0629
Cu	0.2213	0.3165	0.1467	0.0733	0.0027	0.0012	0.0024	0.8131	0.3258	0.2510
Zn	3.6071	0.4112	0.2139	0.0790	0.1194	0.0689	0.0780	0.4885	0.2377	0.2328
Mn	0.3082	0.2236	0.1496	0.1129	0.0726	0.0372	0.0297	0.5258	0.3744	0.1688

Por otro lado, el Factor de Bioconcentración en la Biomasa Total, presenta valores moderadamente más altos, siendo los valores más llamativos los del T3 30% para Fe y Cu y del T3 60% para el Fe los cuales están por encima de los 0.6, sin embargo no son valores suficientes para clasificar a la especie como acumuladora, incluso bajo las asistencias microbianas estudiadas, sin perjuicio de esto, si es claro el impacto en el incremento de la capacidad de extracción para el caso del T3.

Tabla 6.

Factor de Translocación

FC promedio de cuatro repeticiones

	<u>Control</u>	<u>T1 30%</u>	<u>T1 60%</u>	<u>T1 100%</u>	<u>T2 30%</u>	<u>T2 60%</u>	<u>T2 100%</u>	<u>T3 30%</u>	<u>T3 60%</u>	<u>T3 100%</u>
Fe	24.9965	31.6122	38.7602	49.0024	2.2959	1.1445	3.9443	0.1199	0.0494	2.2847
Cu	8514.2857	37.0355	62.2784	8270.2857	0.3603	0.1623	229.43	2.0167	0.0236	4.655
Zn	10.5609	1.3746	0.7575	3.8747	0.2263	0.4276	3.3606	2.2807	0.1144	4.3875
Mn	4.0095	4.0549	3.0814	6.7065	0.6443	0.4992	1.9837	1.8483	0.4848	2.7299

El Factor de Translocación evidencia una capacidad intrínseca de la especie *Zea Mays L.* para translocar todos los metales analizados, desde la parte radicular hasta la zona aérea de la planta, la misma que se observa en casi todos los tratamientos, a excepción del T2 donde la bacteria *R. Endophyton* inhibe claramente esta acción por parte de los individuos a los que son inoculados y también en el T3 solo cuando es expuesto al 60% de relave.

VI. DISCUSION

Los parámetros fisiológicos analizados, demostraron niveles bajos de clorofila, Castellanos et al. (2017) y Sánchez et al. (2015) exponen valores de entre 50 y 58 unidades SPAD para ejemplares de *Zea Mays L.* tratados con fertilizantes a base de N,P y K, es de entender la disminución en la producción de clorofila frente a una ausencia de aplicaciones fertilizantes. La baja concentración de clorofila en los T_n100% refleja la actividad inhibidora del Cu y Mn en las enzimas participes del proceso de fotosíntesis, ocasionando clorosis en las hojas. Jiang (2001) identificó a las enzimas ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa y el fosfoenolpiruvato carboxilasa como las principales enzimas en ser inhibidas a causa de la saturación del Cu, Rivera et al. (2012) indicaron la disminución

en la velocidad de fotosíntesis, debido a las alteraciones del Mn en el fotosistema II. Sin embargo, la fijación de nitrógeno atmosférico por parte de géneros como el *Rizhobium* y *Azotobacter* inoculados en el T3, directamente relacionados a la concentración de clorofila, lograron promover su síntesis, Saldaña (2017) y Smith et al. (1992) registraron la biosíntesis de la enzima nitrogenasa en el género *Rizhobium* y *Azotobacter*, responsables de la reducción del N_2 al NH_4^+ asimilable por la planta. Singh (2006) investigo la inoculación de *Azotobacter* en arrozales, y obtuvo resultados que superaron el equivalente a la aplicación de $50 \text{ KgCO}(\text{NH}_2)_2/\text{Ha}$. Por otro lado, la bacteria *R. Endophyton* inoculada en el T2 también aumento la concentración de clorofila, siendo posible la aptitud de esta PGPR de producir enzimas capaces de realizar la misma función. La Tabla 3s demuestra que el T2 inoculado con *R. Endophyton* promueve la producción de clorofila incluso a concentraciones > 60%, y el T3 únicamente a concentraciones bajas < 30%, haciendo a ambos tratamientos estadísticamente más productivos en comparación de tratamientos expuestos a un 100% de concentración sin inoculantes PGPR.

El crecimiento y mantenimiento de la planta, así como su productividad, están directamente relacionados con la disponibilidad de carbohidratos y el área foliar (Urrutia, 2019). Sin embargo, en concentraciones altas de Mn y Zn se inhibe el crecimiento de hojas nuevas y/o las distorsiona, además de retrasar el crecimiento de brotes de hojas jóvenes y secar las puntas de las adultas (R. Sargadoy et al., 2008; Perez, 2017). La inhibición del desarrollo foliar se presentó fuertemente en los tratamientos con un 100% de concentración, primando la alteración en el T1 que no tuvo ninguna aplicación de PGPR. López et al. (2016) señala que la clorofila está estrechamente relacionada con la concentración de N y P en las hojas, lo que influye directamente en

el índice de fotosíntesis de la planta, esta dependencia entre la salud foliar y la producción de clorofila es avalada por Castellanos et al. (2017), quien subraya que la concentración de clorofila, el rendimiento y el área foliar van de la mano. Por otro lado, el T2 y T3 obtuvieron resultados muy similares en el último mes, y muy por encima de lo obtenido por el Control a los 90 días de germinación, edad en la que los individuos alcanzan la adultez. El T3 30% y T3 60% presentaron los promedios de área foliar más elevados, ubicando al T3 como el tratamiento con la significancia estadística más productiva de biomasa área. Behl et al. (2007) y Bashan y De-Bashan (2010) observaron que los géneros *Azotobacter* y *Azospirillum*, inoculados en el T3, son responsables de la producción de fitohormonas como las citoquininas, según Urrutia (2019) estas enzimas promueven el alargamiento de células en los discos de la hoja y en hojas ya desarrolladas, además del favorecimiento del ensanchamiento de las células y la formación de ramas y de follaje.

Las alturas alcanzadas por las plantas de *Zea Mays L.* var Chingasino, han demostrado la capacidad de respuesta de las PGPR frente a la inhibición del crecimiento producido por las altas concentraciones de Cu. Los resultados de altura a los 30% y 60% de relaves superaron extensamente los promedios de 187 cm y 187.5 cm observados por Urrutia (2019) e Hidalgo (2011) para ejemplares de *Zea Mays L.* var Chingasino e Híbrido XB 8010 respectivamente, los cuales crecieron bajo condiciones de ausencia de fertilizantes y bioestimulantes, pero sin contaminantes. Por tanto, existió una clara superioridad estadística entre los T_n30% y T_n60% con respecto a los T_n100%, sin embargo, el T2 100% mostro superioridad estadística con respecto al T1 y T3 a la misma concentración. Mrkovacki y Milic (2001), Bashan y De-Bashan (2010) y muchos otros autores han clasificado a los géneros *Azotobacter*, *Azospirillum* y *Trichoderma* como responsables,

de entre otras funciones, de la producción de fitohormonas como las auxinas, proteínas que influyen en el alargamiento de los tallos, sin embargo, la bacteria *R. Endophyton* parece sustentar la inhibición de la fitotoxicidad del Cu, mediante el bloqueo de su absorción, Villegas et al. (2015) señala que la absorción de los iones divalentes y monovalentes comienza en la epidermis de la raíz, ingresando a la endodermis por difusión apoplástica, es ahí donde los resultados indican que *R. Endophyton* realiza el primer bloqueo, sin embargo, se ha observado que si el Cu llega al xilema para su traslocación, como en el caso del T₂100%, la familia de proteínas transportadoras de Cu (COPT) es inhibida nuevamente por algún mecanismo promovido por la PGPR, obteniéndose en la zona aérea de la planta una concentración muy cercana al valor que se obtendría por un individuo en condiciones normales, siendo este el indicado por Perez (2017) de 6mg/Kg para plantas superiores.

La producción promedio de hojas fue claramente superior en los tratamientos inoculados con respecto a los no inoculados. El valor promedio máximo alcanzado según Soplín et al. (1993), es de 15 hojas para la especie *Zea Mays L.* bajo condiciones normales, sin embargo, a pesar de no alcanzarse este valor en ningún tratamiento, el T3 fue el más próximo, posicionándose de la siguiente manera a un 100% de relave T₃ > T₂ > T₀ > T₁ a los 106 DAS, fecha del pico del desarrollo vegetativo de la especie. Los sideroforos quelantes de Fe, sintetizados por algunas PGPR como el género *Pseudomona*, (Sivasakthi et al., 2014; Weller, 2007) que promueven la disolución de iones Fe⁺³ a Fe⁺² asimilable por las plantas, magnifican la biosíntesis de proteínas hemo, las cuales al transformarse a protoporfirina, comparten la misma vía de biosíntesis que la clorofila, involucrando al Fe en tres periodos de la producción de clorofila (Kirkby y

Römheld, 2007), de esta manera el T3 pudo haber mantenido la concentración de clorofila en las hojas, evitando clorosis y pérdida foliar.

Una clara comparación del desempeño de la inoculación sobre el número de hojas, se observa en los estudios de Urrutia (2019) e Hidalgo (2011) quienes obtuvieron individuos de *Zea Mays L.* var Chingasino y *Zea Mays L.* var Híbrido XB 8010, con un promedio de 10.6 y 12.87 hojas por especie en suelos sin contaminantes, bioestimulantes o fertilizantes, sin embargo, al aplicárseles bioestimulantes se alcanzaron promedios máximos de 12.7 y 13.87 hojas respectivamente, a los 90 DAS. Frente a este antecedente, se observa que el desarrollo de número de hojas registrado entre los tratamientos no bioestimulados y bioestimulados expuestos a un 30% y 100% de relaves, son mayores a los descritos en los resultados de los autores citados anteriormente para el mismo periodo. Se podría tener resultados inclusive mayores en suelos sanos y ricos en fertilizantes que fuesen inoculados con estas bacterias PGPR.

La floración también se vio afectada en los tratamientos expuestos a contaminantes, principalmente en el T₁100%. La inexistencia de inóculos microbianos capaces sintetizar giberilinas, auxinas y aminoácidos responsables de inducir a la floración (Mrkovacki y Milic, 2001; Kukreja et al., 2004; Behl et al., 2007; Hidalgo, 2011) en el T₁100% junto con la alta concentración de metales inhibidores de crecimiento vegetal como el Cu (Jiang, 2001), favorecen el retraso e incluso la supresión de la floración en este tratamiento.

El peso fresco radicular también se vio afectado por los metales a los que fue expuesto el órgano, Rout y Premanda (2003) y Jiang (2001) sugieren que la presencia de Cu y Zn significan una retracción en el crecimiento radicular además de daños severos a nivel intracelular en su tejido, escenario claramente observado en el T1. Contrariamente,

Urrutia (2019) e Hidalgo (2011) señalan como las PGPR capaces de sintetizar auxinas son responsables del crecimiento radicular a través de la expansión celular, así como la formación de raíces adventicias o aéreas y catalogan a las citoquininas, autoras del crecimiento inicial de las raíces. Los resultados analizados en los T2 y T3 indican que las PGPR inoculadas, son capaces de revertir la retracción señalada por Jiang W. e incluso superar los promedios del control mediante la síntesis de estas fitohormonas, géneros como *Azotobacter* son conocidos por la producción de ambas fitohormonas (Mrkovacki y Milic, 2001; Kukreja et al., 2004; Behl et al, 2007) y *R. Endophyton* evidencia también una posible síntesis de las mismas.

Los parámetros edafológicos obtuvieron valores altos de CIC en todos los tratamientos, lo que da lugar a considerarse una matriz ideal para la aplicación de fertilizantes por su capacidad de retención y aprovechamiento por parte del cultivo, solo al 100% de concentración de relaves se podría diferenciar estadísticamente de un suelo orgánico sin contaminantes, pero sin dejar de ser un valor aun alto. Castellanos et al. (2017) describe parámetros ligeramente alcalinos y con concentraciones altas de hidróxidos de hierro como los catalizadores del aumento del CIC en el suelo, escenario que se ha evidenciado en los resultados de todos los tratamientos, además de la presencia de materia orgánica. Los micronutrientes Cu^+ y Cu^{+2} , el Mn^{+2} ampliamente disponible y sus demás estados, el Mn^{+3} y Mn^{+4} , el Fe^{+3} y Fe^{+2} , siendo el ultimo el más biodisponible y el Zn^{+2} (Diez, 2008) al ser iones con formas oxidativas positivas, son fácilmente retenidos por el alto valor de la CIC de todos los tratamientos.

Los resultados de Materia Orgánica exponen a la bacteria *R. Endophyton* como una PGPR con la capacidad de igualar una condición de hasta 60% de concentración de relaves con

una sin exposición a contaminantes respecto a la producción de Materia Orgánica, pudiendo asignarle a esta bacteria las propiedades descritas por Urrutia (2019) e Hidalgo (2011) sobre la capacidad de sintetizar auxinas responsables del crecimiento radicular y formación de raíces adventicias o aéreas y citoquininas, responsables del crecimiento inicial de las raíces, lo cual se traduce en un incremento en el porcentaje de Materia Orgánica del suelo.

Por otro lado, respecto al Potencial de Hidrogeno, según los resultados expuestos, la inoculación de las bacterias *R. Endophyton*, *Trichoderma sp.*, *Pseudomonas fluorescens*, *Azotobacter sp.*, *Bacillus subtilis* y *Azospirillum sp.*, en los tratamientos T2 y T3, tendió a alcalinizar el suelo, resultado que se vió a través de una diferencia estadísticamente significativa entre todos los tratamientos inoculados, sin perjuicio de la concentración de relave, y todos los tratamientos no inoculados. Sierra (2017) indica que la alcalinidad del suelo es determinante en la estabilidad y por ende menor biodisponibilidad de los metales en la matriz del suelo, siendo el pH una relación inversamente proporcional a este fin. Sin embargo, Moreno et al. (2018), señala que algunos géneros de PGPR, entre las que se incluyen los grupos de bacterias solubilizadoras de fosforo (BSF) y de potasio (BSP) como *Azotobacter* y *Bacillus*, sintetizan ácidos orgánicos no aromáticos, que tienden a acidificar el pH, lo cual contradice los resultados de pH obtenidos en el presente estudio, no obstante, esto podría explicarse por la acumulación de sales provenientes del agua de riego, cuya conductividad ascendía los 4 mS/cm. Girón (2019) indica que cuando el agua de riego es rica en sales como cloruros, sulfatos y carbonatos de sodio, calcio y magnesio, se da paso a un proceso de alcalinización del suelo, especialmente en concentración de sales sódicas; la explicación del aumento de pH en

tratamientos inoculados, puede radicar en la interacción y retención de las PGPR con estas sales.

El rendimiento relativo de los cultivos se traduce como una línea aproximadamente constante conforme la salinidad del suelo se incrementa, sin embargo, al alcanzar cierto umbral de concentración de sales, el rendimiento relativo baja como una pendiente negativa lineal con la salinidad, estimándose el % de Producción Relativa con la siguiente ecuación:

$$\text{Produc. relativa (\%)} = 100 - b (\text{CE}_{\text{es}} - a)$$

Dónde:

a: es la conductividad eléctrica umbral del cultivo.

b: es la pendiente de la recta, que indica el porcentaje de pérdida de producción del cultivo en función del aumento de la salinidad del suelo.

CE_{es} : es la conductividad eléctrica real del suelo.

La Conductividad Eléctrica en todos los tratamientos del experimento, significaron un impacto negativo en la producción relativa de la especie *Zea Mays L.*, Maas y Hoffman (1977) advierten una CE límite del 1.7 dS/m y una pendiente del 12% para esta especie, bajo esta premisa, la productividad relativa promedio de todos los tratamientos descendió a un 58.96%. Estos autores indican que la producción de biomasa fresca y seca así como el desarrollo radicular son parámetros sensibles a la salinidad del suelo, el efecto osmótico producido se traduce en un déficit hídrico, una toxicidad iónica y una deficiencia nutricional. La especie *Zea Mays L.* en general es moderadamente sensible a la salinidad, por tanto es de esperarse que los resultados de todos los tratamientos hayan sufrido una disminución en su productividad como lo indica la ecuación de Maas y Hoffman.

La aplicación de PGPR, han demostrado la capacidad de estas de no solo generar cambios a nivel fisiológico y edafológico de manera estadísticamente significativa, sino también de alterar los mecanismos de absorción y adsorción de micronutrientes, incluso cuando estos se encuentran a niveles considerados fitotóxicos, siendo esta la principal razón de los cambios en el ciclo vegetativo de la especie.

El tratamiento inoculado con la bacteria *R. Endophyton* obtuvo concentraciones bastante bajas de Fe en la zona aérea de la planta, incluso estadísticamente menor que el tratamiento Control, a pesar de la abundancia de este metal en su sustrato, la acción microbiana en la rizófora, inoculada con *R. Endophyton*, demuestra la capacidad de inhibir la traslocación del Fe así como su absorción a su tejido radicular, promoviendo un mecanismo de inmunidad bastante eficaz frente a la sobresaturación de este metal y permitiendo una producción normal de clorofila. Contrariamente a lo señalado por Munive et al. (2018), quienes calificaron a la especie *Zea Mays L.* con un metabolismo que tiende a translocar fácilmente el hierro a su área foliar en condiciones normales. Ortiz (2013) describe los mecanismos de inhibición de la absorción de metales, mediante la exclusión del ion por barreras permeables de proteínas de transporte específicas o por transporte activo del metal desde el interior de la célula hacia afuera, estos mecanismos tendrían lugar en las raíces colonizadas por *R. Endophyton*, una vez que las necesidades nutricionales de la planta ya han sido cubiertos, ahora bien, es muy posible que *R. Endophyton* sintetice moléculas de transducción de señal para el Sistema de Inducción de Resistencia (ISR) como el etileno y el ácido jasmónico y de transducción de señal para el Sistema de Resistencia Adquirida (SAR) como el ácido salicílico para interactuar con la planta, como lo precisan Harman et al. (2004) y Hermosa et al. (2012)

para el caso del genero *Trichoderma*, pudiendo mantener el rango optimo entre el déficit de Fe y la fitotoxicidad que este le pueda ocasionar a la planta.

De manera opuesta, el consorcio de bacterias PGPR inoculadas en el T3, demostró una alta capacidad de translocación, siendo esta estadísticamente superior a los resultados del T2, Control y T1. Estos resultados coinciden con lo estudiado por Sivasakthi et al. (2014) y Weller (2007) sobre la síntesis de compuestos sideróforos quelantes de Fe por parte de la especie *Pseudomona Fluorescens*, las cuales promueven la adsorción y traslocación del Fe a la parte aérea de la planta, incluso a un pH neutro cuando el hierro férrico (Fe^{+3}) insoluble es el más abundante. Cabe resaltar que las concentraciones de hierro presentadas en el relave superaban el limite Canadiense de 30 000 mgFe/Kg establecido en su *Protocol 4 for Contaminated Sites – Establishing Background Concentrations in Soil* y estaban muy cerca de clasificarse como un *Preliminary Remediation Goal (PRGs)* por la EPA de los Estados Unidos.

Continuando ahora con el Cu, el Control y T1 constato lo expuesto por Rivera y Lázaro (2017), respecto a la capacidad intrínseca del maíz para translocar cantidades considerables de Cu (>289.42 mg/Kg) a la parte aérea sin necesidad de una asistencia microbiana de por medio, sin embargo el T3 logra una superioridad estadística en la translocación del Cu de 209.46% más de concentración, respecto al tratamiento sin asistencia con mayor concentración de Cu, siendo el T3 30% el tratamiento con la mayor concentración de Cu en toda su biomasa, con un valor promedio mayor a 1000 mg/Kg. Babu et al. (2013) refirió que la inoculación del género *Bacillus*, además de promover del crecimiento vegetal, también reduce potencialmente la fitotoxicidad de metales pesados y su traslocación, sin embargo, la capacidad de limitar la traslocación de estos

metales no se ha evidenciado en los tratamientos expuestos, si no, todo lo contrario. Sobre esto, Ortiz (2013), subraya como mecanismo de resistencia por parte de las PGPR, la absorción intracelular del metal mediante vacuolas dentro del citoplasma celular, el secuestro extracelular por sustancias poliméricas extracelulares, la detoxificación enzimática del metal a través de la reducción, oxidación, metilación o demetilación y la tolerancia a los metales por la célula objetivo, de esta manera, los contaminantes presentes en el sustrato del T3 son igualmente extraídos de la matriz y absorbidos a en la zona aérea y radicular de la planta, pero sin alterar severamente el desarrollo de la especie.

Por otro lado, el comportamiento del Cu en los ejemplares de *Zea Mays L.* inoculados con *R. Endophyton* siguió un patrón muy similar al observado con el Fe, los resultados del T2 demuestran una inhibición casi completa de la absorción del metal en el tejido aéreo y radicular. Respecto a la concentración del cobre presentada en el pasivo, este superó ampliamente, el *Soil, Ground Water and Sediment Standards for Use Under Part XV.1 of the Environmental Protection Act 2009* de Canadá que fija un límite de hasta 62 mgCu/Kg y 92 mgCu/Kg, para suelo de uso agrícola y suelo de uso Comercial, Residencial o Industrial, respectivamente, así mismo sobrepaso los valores del *Assessment levels for Soil, Sediment and Water* de Australia, donde se establece un *Ecological Investigation Level* de 100 mgCu/Kg el cual basa sus valores en fitotoxicidad y niveles inaceptables de residuos en la biota

La PGPR *R. Endophyton* también inhibió la traslocación de Zn desde la rizosfera en todas las concentraciones a las que se expuso, con concentraciones siete veces menor a los ejemplares expuestos a relaves sin asistencia microbiana, la concentración radicular de

este tratamiento fue estadísticamente inferiores a los observados en el T1 y la concentración foliar estadísticamente menor al Control. Diez (2008) y Castells (2012) exponen como los microorganismos de la rizosfera, forman complejos metálicos catiónicos insolubles, que son adsorbidos a las paredes celulares de las raíces por una diferencia de cargas o son absorbidos dentro de vacuolas al interior de la estructura radicular, mermando así su movilidad y biodisponibilidad, mecanismos que claramente pueden ser empleados por *R. Endophyton*. La interacción de la planta con el Zn, obedece a un comportamiento fitoextractor en el Control, coincidiendo con Rivera y Lázaro (2017) para este y otros metales.

Nuevamente y de manera opuesta al T1, la diversidad microbiana inoculada en el T3 promovió significativamente la extracción de Zn en 133.19% a una exposición del 30% de concentración y en 120.1% a una exposición del 100% de relave con respecto al T1. Pastor (2012), sustenta estos resultados delimitando que la especie *Zea Mays L.* tiende a fitoestabilizar el Zn en matrices acidas, condición que no se ha dado, lo que ha permitido su translocación. Es de resaltar también, que la concentración de Zinc del relave al igual que con el Cobre, excedió el *Soil, Ground Water and Sediment Standards for Use Under Part XV.1 of the Environmental Protection Act 2009* de Canadá, el cual propone una concentración máxima de 290 mg Zn/kg para suelo agrícola y a la *Assessment levels for Soil, Sediment and Water* de Australia, que establece un *Ecological Investigation Level* de 200 mgZn/Kg.

A diferencia del Zn y el Cu, el Mn no registró una fácil fitoextracción por parte de la especie *Zea Mays L* incluso con una asistencia microbiana que promueve la fitoextracción metales, sin embargo la concentración aérea prima sobre la radicular en

tratamientos sin inoculantes, Perez (2017) establece que el Mn es fácilmente translocado en las plantas, pero los resultados indican que si bien se logró la translocación, esta no es significativa en comparación a los otros metales estudiados. Este resultado puede explicarse también por el hecho de que la concentración de Zinc observada en el pasivo no superó los 1800 mgZn/Kg fijados en los *RSLs-Resident Soil* de la US EPA RSL 2019 THQ 1.0, ni el límite de 850 mgZn/Kg del *Protocol 4 for Contaminated Sites – Establishing Background Concentrations in Soil* de Canadá o los 1500 mgZn/Kg del *Assessment levels for Soil, Sediment and Water* de Australia.

El T2 demostró que puede inhibir la fitotoxicidad de los metales esenciales analizados en el tejido foliar del maíz de manera estadísticamente significativa, incluso en comparación al Control. Así mismo el T3 mantuvo constante la traslocación de todos los micronutrientes a concentraciones del 100% de relaves, caso contrario se observa a un 60% de concentración, donde la especie tendió a estabilizar los metales, pero aun así obtuvo concentraciones totales de biomasa estadísticamente superiores a los demás tratamientos frente a todos los metales y concentraciones de relave a las que se expuso.

VII. CONCLUSION

El consorcio de PGPR inoculadas en el T3 y T2 demostrarán poder equiparar estadísticamente casi todos los Parámetros Fisiológicos analizados con respecto a la de individuos cultivados en suelos orgánicos sin contaminantes, independientemente de la concentración de relave expuesta, a excepción del Peso Fresco Radicular y la Altura del Tallo que fueron los únicos parámetro que las PGPR solo lograron igualar o superar al Control a una concentración baja de relave.

Por otro lado, las alteraciones edafológicas presentadas en los tratamientos expuestos a relaves, no lograron ser revertidos por la PGPR en cuanto a su CIC, % M.O. y C.E. sin embargo los inoculantes si promovieron la alcalinidad del suelo de manera estadísticamente significativa, parámetro que es determinante en la inhibición de la biodisponibilidad del contaminante.

La especie *Zea Mays L. var Chingasino*, cuenta con una capacidad intrínseca de extraer y translocar todos los micronutrientes analizados, sin necesidad de una asistencia microbiana inoculada en su rizosfera. Por otro lado, la interacción de la bacteria *R. Endophyton 148 J* frente a los contaminantes analizados, es claramente antagónica con respecto al comportamiento del consorcio de bacterias conformado por *Trichoderma sp.*, *Pseudomonas fluorescens*, *Azotobacter sp.*, *Bacillus Subtilis* y *Azospirillum sp.*

R. Endophyton 148 J presentó una capacidad estadísticamente significativa muy notable para inhibir la absorción y traslocación de micronutrientes en concentraciones consideradas fitotóxicas, en la biomasa radicular y aérea de la especie *Zea Mays L. var Chingasino*, llegando a concentraciones incluso menores a las del Control.

Los Factores de Bioacumulación analizados en todos los tratamientos, clasifican a la especie *Zea Mays L. var Chingasino* como excluyentes, sin embargo esta clasificación se debe a la gran concentración de micronutrientes aún remanente en el suelo, a pesar del destacado ascenso en la capacidad de absorción obtenida por el consorcio de PGPR *Trichoderma sp.*, *Pseudomonas fluorescens*, *Azotobacter sp.*, *Bacillus Subtilis* y *Azospirillum sp.* inoculadas en el T3.

VIII. RECOMENDACIONES

La introducción de enmiendas capaces de lograr una bioaumentación y fertilización del suelo expuesto a relaves podría generar resultados más significativos en cuanto a la fitoextracción de metales en tratamientos inoculados con el consorcio bacteriano del T3, con especial atención en pasivos ricos en cobre.

La calidad del agua de riego es determinante en los resultados de un proceso de biorremediación, la investigación del comportamiento de estos organismos tratados con aguas que garanticen una salinidad menor a 1.7 mS/cm en el sustrato podría promover aún más el desarrollo fisiológico del maíz y con esto la remediación del suelo.

El manejo de plagas también es un punto que se debe considerar de manera muy oportuna al realizar un experimento de fitorremediación, el conocer las plagas y enfermedades habituales del cultivo a trabajar es fundamental. En el caso del maíz, las metodologías para el control de áfidos, deben de aplicarse tempranamente.

La investigación de inoculantes de *R. Endophyton* 148 J en cultivos para consumo humano directo o con potencial de biocumularse a través de la cadena trófica de un ecosistema, es muy relevante, debido no solo a su potencial como PGPR, sino por su capacidad de inhibir la absorción a nivel radicular y foliar de metales a concentraciones fitotóxicas, debiéndose profundizar en que otros metales es capaz de responder de manera similar a la de estos micronutrientes.

La investigación y desarrollo de nuevos sinergismos entre especies de PGPR y herbáceas con una amplitud geográfica importante en regiones con presencia de pasivos ambientales, es un campo que debe seguir siendo promovido, no solo por su bajo coste

y efectividad, si no por su sostenibilidad a comparación de otras tecnologías de remediación.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Abad-Valle, P., Iglesias-Jiménez, E. y Álvarez-Ayuso, E. (2017). A comparative study on the influence of different organic amendments on trace element mobility and microbial functionality of a polluted mine soil. *Journal of Environmental Management*, 188, 287–296. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.12.017>.

Abid Ullah, Sun Heng, Muhammad Farooq Hussain Munis, Shah Fahad, Xiyan Yang. (2015). Phytoremediation of heavy metals assisted by plant growth promoting (PGP) bacteria: A review. *Environmental and Experimental Botany*, 117, 28-40. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2015.05.001>

A. Giridhar Babu, Jong-Dae Kim, Byung-Taek Oh. (2013). Enhancement of heavy metal phytoremediation by *Alnus firma* with endophytic *Bacillus thuringiensis* GDB-1, *Journal of Hazardous Materials*, 250–251, 477-483, ISSN 0304-3894, <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.02.014>.

Alloway J. (1996). *Heavy Metals in Soils*. Universidad de Reading.

Almorox J, Lopez F, Rafaelli F. (2010). *La degradación de suelos por erosión hídrica, métodos de estimación*. Universidad de Murcia.

Anderson J.P.E. (1982). Soil respiration. En Page AL., Miller RH., Keeney DR. (Eds). *Methods of soil analysis, Part 2: Chemical and Microbiological Properties*. (pp 831-871) Madison, Winconsin, Am Soc Agron, Soil Sci Soc Am.

- Annalisa Pinsino, Valeria Matranga and Maria Carmela Roccheri (2012). Manganese: A New Emerging Contaminant in the Environment. En Dr. Jatin Srivastava (Ed.) *Environmental Contamination*, ISBN: 978-953-510120-8, (pp 17-36) InTech, [https://cdn.intechopen.com/pdfs/29309/InTech-Manganese a new emerging contaminant in the environment.pdf](https://cdn.intechopen.com/pdfs/29309/InTech-Manganese_a_new_emerging_contaminant_in_the_environment.pdf)
- Atmadzhidi A., Goncharov K., Olyunina T. y Sadykhov, G. (2018). Benefication of the crude titanomagnetite concentrate by the wet magnetic separation method. *Tsvetnye Metally*. 19-24. 10.17580/tsm.2018.09.02.
- Babu, A.G., Kim, J.D. y Oh, B.T. (2013). Enhancement of heavy metal phytoremediation by *Alnus firma* with endophytic *Bacillus thuringiensis* GDB-1. *J. Hazard. Mater.* 250, 477–483. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.02.014>
- Bakker, P. A. H. M., Raaijmakers, J. M., Bloemberg, G., Höfte, M., Lemanceau, P., y Cooke, B. M. (Eds.). (2007). *New Perspectives and Approaches in Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Research*. 10.1007/978-1-4020-6776-1
- Ballesta J. (2017). *Introducción a la contaminación de suelos*. Madrid, España. Mundi Prensa.
- Banco Central de Reserva del Peru. (2020). *BCRData Series Mensuales 2020*. Lima, Perú. <https://estadisticas.bcrp.gob.pe/estadisticas/series/mensuales/resultados/PN01516B-M-PN01519BM-PN01522BM-PN01525BM-PN01528BM-PN01531BM-PN01534BM-PN01537BM-PN01540BM/html/2020-1/2020-12/>

- Bashan, Y., y de-Bashan, L. E. (2010). How the Plant Growth-Promoting Bacterium *Azospirillum* Promotes Plant Growth—A Critical Assessment. *Advances in Agronomy*. 77–136. 10.1016/s0065-2113(10)08002-8
- Bashan, Yoav & Holguin, Genny & de-Bashan, L. (2004). *Azospirillum*-plant relationships: Physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Canadian journal of microbiology*. <https://doi.org/10.1139/w04-035>
- Bastian M. E., Diaz M. M., Pacheco C. P., Bustos P. R. y Hurtado C. E. (2011). Caracterización del maíz “Lluteño” (*Zea mays* L. tipo amylacea) proveniente del norte de Chile, tolerante a NaCl y exceso de boro, como una alternativa para la producción de bioenergía. *Idesia*. 29(3), 7-16. 10.4067/S0718-34292011000300002.
- Bautista F. (1999). *Introducción al Estudio de la Contaminación de Suelos por Metales Pesados*. Universidad Autónoma de Yucatán. [https://www.researchgate.net/publication/236954595 Introduccion al estudio o de la contaminacion del suelo por metales pesados](https://www.researchgate.net/publication/236954595_Introduccion_al_estudio_o_de_la_contaminacion_del_suelo_por_metales_pesados)
- Bech, J., Duran, P., Roca, N., Poma, W., Sánchez, I., Roca Pérez, L., Boluda, R., Barceló, J. y Poschenrieder, C. (2012). Accumulation of Pb and Zn in *Bidens triplinervia* and *Senecio* sp. spontaneous species from mine spoils in Peru and their potential use in phytoremediation. *Journal of Geochemical Exploration*. (123) 109–113. 10.1016/j.gexplo.2012.06.021
- Bech, J., Poschenrieder, C., Llugany, M., Barceló, J., Tume, P., Tobias, F. J. y Vásquez, E. R. (1997). Arsenic and heavy metal contamination of soil and vegetation around

a copper mine in Northern Peru. *Science of The Total Environment*, 203(1), 83–91. 10.1016/s0048-9697(97)00136-8

Behl Rishi, Ruppel Silke, Kothe Erika y Narula, Neeru. (2007). Wheat x Azotobacter x VA Mycorrhiza interactions towards plant nutrition and growth - A review. *Journal of Applied Botany and Food Quality*. 81(2), 95-109.

Benítez, T., Rincón, A., Limón, M. C., y Codón, A. (2005). Biocontrol mechanism of Trichoderma strains. *International microbiology: the official journal of the Spanish Society for Microbiology*. 7(4), 249-60.

Caballero-Mellado, J. (2002). El Género Azospirillum. En Dra. Esperanza Martínez Romero y Julio César Martínez Romero (Eds). *Microbios en Linea*. ISBN 968-36-8879-9. <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/index.html>.

Castellanos Reyes M. A., Valdés Carmenate R., López Gómez A., y Guridi Izquierdo F. (2017). Mediciones de índices de verdor relacionadas con área foliar y productividad de híbrido de maíz. *Cultivos Tropicales*. 38(3), 112-116. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362017000300016

Castells X. E. (2012). *Tratamientos y Reciclaje de Residuos Diversos*. Madrid, España. Diaz de Santos.

Ciampitti, I. A., Elmore, R. W. y Lauer, J. (2016). *Corn Growth and Development*. Kansas State University Agricultural Experiment Station and Cooperative Extension Service. [http://lacs.ipni.net/ipniweb/region/lacs.nsf/0/F8402FFA808151620325816000706EF9/\\$FILE/Poster%20-%20CyD%20MAIZ%20-%20KSU.pdf](http://lacs.ipni.net/ipniweb/region/lacs.nsf/0/F8402FFA808151620325816000706EF9/$FILE/Poster%20-%20CyD%20MAIZ%20-%20KSU.pdf)

- Constanza L., Caycedo L., Gómez M., Ramos S. y Rodríguez J. (2017). *Bacillus spp*: una alternativa para la promoción vegetal por dos caminos enzimáticos. *Nova*. 15. 45. 10.22490/24629448.1958.
- Cristaldi, A., Conti, G. O., Jho, E. H., Zuccarello, P., Grasso, A., Copat, C. y Ferrante, M. (2017). Phytoremediation of contaminated soils by heavy metals and PAHs. A brief review. *Environmental Technology & Innovation*, 8, 309–326. 10.1016/j.eti.2017.08.002
- Da Conceição, M., Hauser-Davis, R., Nunes, A. y Pierre, A. (2016). Metal phytoremediation: General strategies, genetically modified plants and applications in metal nanoparticle contamination. *Ecotoxicology and Environment Safety*. 134, 133-147. 10.1016/j.ecoenv.2016.08.024
- Decreto de Urgencia N°022 2020. (2020). Decreto de urgencia para el fortalecimiento de la identificación y gestión de pasivos ambientales. Poder Ejecutivo de la República del Perú.
- Defensoría del Pueblo, Adjuntía para la Prevención de Conflictos Sociales y la Gobernabilidad. (2021). *Reporte de Conflictos Sociales N° 202*. <https://www.defensoria.gob.pe/wp-content/uploads/2021/01/Reporte-Mensual-de-Conflictos-Sociales-N%C2%B0-202-diciembre-2020.pdf>
- De Lucio Flores S., Otazo-Sánchez E., Romero-Bautista L. y Gaytán-Oyarzún J. (2021). Hongos macroscópicos como bioacumuladores de metales pesados. *Pädi Boletín Científico de Ciencias Básicas e Ingenierías del ICBI*. 8. 60-65. 10.29057/icbi.v8i16.5823.

- Diez Lazaro J. (2008). *Fitocorrección de suelos contaminados con metales pesados: Evaluación de plantas tolerantes y optimización del proceso mediante prácticas agronómicas*. [Tesis de Doctorado, Universidad de Santiago de Compostela]. Minerva, Repositorio Institucional de USC.
- Dueñas J. (2015). *Evaluación de la capacidad fitorremediadora de Inga Edulis mart., en una área degradada por minería aurífera en el distrito Inambari, provincia Tambopata, región de Madre de Dios*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Amazónica de Madre de Dios]. Repositorio Institucional UNAMAD.
- Duraes N., Novo L., Candeias C. y Ferreira E. (2018). Distribution, Transport and Fate of Pollutant. En C. Duarte A., Cachada A., Rocha-Santos T. (Eds). *Soil Pollution: From Monitoring to Remediation*. (pp.29-52). United Kingdom. Academic Press.
- Feoktistova Victorava, L. y Clark Feoktistova, Y. (2018). El metabolismo del cobre. Sus consecuencias para la salud humana. *Medisur*, 16 (4), 579-587.
<http://www.medisur.sld.cu/index.php/medisur/article/view/3918/2644>
- Figuro R. (2003). *Biology and management of common groundsel (senecio vulgaris l.) in strawberry*. [Dissertation, The Ohio State University] Ohio Link.
- Fosmire, G. J. (1990). Zinc toxicity. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 51(2), 225–227. 10.1093/ajcn/51.2.225
- Girón Pinto, J. D. (2019). *Evaluación documental de los métodos de restauración de suelos salinos, con influencia en el distrito de riego Usochicamocha, departamento de Boyacá*. [Tesis de Pregrado Universidad de la Salle]. Ciencia Unisalle.

- Hadi, F. y Bano, A. (2010). Effect of diazotrophs (Rhizobium and Azobactor) on growth of maize (*Zea mays* L.) and accumulation of Lead (Pb) in different plant parts. *Pakistan Journal Botany*. 42(6), 4363–4370.
- Harman, G., Howell C., Viterbo Ada., Chet I., y Lorito, M. (2004). Trichoderma species - Opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature reviews. Microbiology*. 2. 43-56. 10.1038/nrmicro797.
- Hayat, R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R., y Ahmed, I. (2010). Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Annals of Microbiology*, 60(4), 579–598. 10.1007/s13213-010-0117-1
- He S, He Z, Yang X, Baligar V. (2012). *Mechanisms of Nickel Uptake and Hyperaccumulation by Plants and Implication in Soil Remediation*. En *Advances in Agronomy* (117-165). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394278-4.00003-9>
- Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I. y Monte, E. (2012). Plant-beneficial effects of Trichoderma and of its genes. *Microbiology (Reading, England)*. 158, 17-25. 10.1099/mic.0.052274-0.
- Hidalgo Noel A. O. (2011). *Comportamiento de tres bioestimulantes en la producción de maíz (Zea Mays L.), híbrido XB 8010, en Tingo María*. [Tesis de Pregrado, Universidad Nacional Agraria de la Selva]. Repositorio Institucional - UNAS.
- Jara-Peña, E., Gómez, J., Montoya, H., Chanco, M., Mariano, M., y Cano, N. (2014). Capacidad fitorremediadora de cinco especies altoandinas de suelos contaminados con metales pesados. *Revista Peruana de Biología* 21(2), 145-154. <http://dx.doi.org/10.15381/rpb.v21i2.9817>

- Jiang, W., Liu, D., y Liu, X. (2001). Effects of Copper on Root Growth, Cell Division, and Nucleolus of Zea Mays. *Biologia Plantarum*, 44(1), 105–109. 10.1023/a:1017982607493
- Jnawali A. D., Ojha R. B. y Marahatta M. (2015) Role of Azotobacter in Soil Fertility and Sustainability—A Review. *Advances in Plants & Agriculture Research*. 2(6), 250-253. 10.15406/apar.2015.02.00069
- Kukreja Kamlesh, Suneja Sunita, Goyal Sneh y Narula, Neeni. (2004). Phytohormone production by Azotobacter - A Review. *Agricultural Reviews*. 25(1), 70-75. <https://arccjournals.com/journal/agricultural-reviews/ARCC4242>
- Kirkby, E.A. y Römheld, V. (2007). Micronutrients in plant physiology: Functions, uptake and mobility. *Proceedings*. 543. 1-51.
- Layton, C., Maldonado, E., Monroy, L., Corrales Ramirez, L. y Sanchez, L. (2011). *Bacillus* spp.; perspectiva de su efecto biocontrolador mediante antibiosis en cultivos afectados por fitopatógenos. *Nova*. 9(15), 177-187. 10.22490/24629448.501.
- LEY Nº 28271 de 2004. Ley que regula los pasivos ambientales de la actividad minera. 02 de Julio del 2004. Congreso de la República del Perú.
- Li, P., Lin, C., Cheng, H., Duan, X., y Lei, K. (2015). Contamination and health risks of soil heavy metals around a lead/zinc smelter in southwestern China. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 113, 391–399. 10.1016/j.ecoenv.2014.12.025
- Lugtenberg, B. y Dekkers, L. (2001). What makes *Pseudomonas* bacteria competent?. *Environmental Microbiology*. 1, 9 - 13. 10.1046/j.1462-2920.1999.00005.x.

- Maas EV y Hoffman G.J. (1977). Crop salt tolerance: Current assessment. *Journal of the Irrigation and Drainage Division*. 103(2).
<https://doi.org/10.1061/JRCEA4.0001137>
- Madhumita R., Ashok K. G., Sourav Dutta y Pritam Mukherjee. (2015). Integrated phytobial remediation for sustainable management of arsenic in soil and water. *Environment International*. (75), 180–198.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2014.11.010>
- Maheshwari, D. K. (2011). Plant Growth and Health Promoting Bacteria. *Microbiology Monographs*. 10.1007/978-3-642-13612-2
- Marín Velásquez T. D. (2016). Crecimiento de plantas de maíz (Zea mays) en un suelo contaminado con petróleo y remediado con extracto de cáscaras de naranja (Citrus Sinensis). *Enfoque UTE*. 7(3), 1 - 13.
<http://scielo.senescyt.gob.ec/pdf/enfoqueute/v7n3/1390-6542-enfoqueute-7-03-00001.pdf>
- Martínez Madrid D. y Marrugo-Negrete J. (2021). Efecto de la adición de enmiendas en la inmovilización de metales pesados en suelos mineros del sur de Bolívar, Colombia. *Ciencia & Tecnología Agropecuaria*. 22.
 10.21930/rcta.vol22_num2_art:2272.
- 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*. [Tesis de Pregrado - Universidad Nacional Santiago Atúnez de Mayolo]. Repositorio Institucional UNASAM.

Ministerio de Agricultura y Riego, Autoridad Nacional del Agua, Dirección de Conservación y Planeamiento de Recursos Hídricos, Administración Local de Agua Maldonado (2010). *Estudio Diagnostico Hidrológico de la Cuenca Madre de Dios*. http://www.ana.gob.pe/sites/default/files/publication/files/diagnostico_hidrologico_-madre_de_dios_0.pdf

Ministerio de Energía y Minas (2019) *Boletín Estadístico Minero Edición N° 12-2019*. <http://www.minem.gob.pe/minem/archivos/file/Mineria/PUBLICACIONES/VARIABLES/2019/BEMDIC2019.pdf>

Ministerio de Energía y Minas (2020) *Anexo RM N° 238-2020-MINEM/DM*. <http://www.minem.gob.pe/minem/archivos/file/Mineria/REGISTROS/PASIVOS/RM%20238-2020-MNEM-DM.pdf>

Moreno Reséndez A., García Mendoza V., Reyes Carrillo J. L., Vásquez Arroyo J. y Cano Ríos P. (2018). Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal: una alternativa de biofertilización para la agricultura sustentable. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 20 (1) 68 – 83. 10.15446/rev.colomb.biote.v20n1.73707

Mrkovacki, N. y Milic, V. (2001). Use of *Azotobacter chroococcum* as potentially useful in agricultural application. *Annals of Microbiology*. 51(2), 145-158.

M. S. Singh (2006). Cereal crops response to *Azotobacter* – A review. *Agricultural Reviews*. 27 (3), 229 – 231. <https://arccjournals.com/uploads/articles/ar273009.pdf>

- Nagajyoti, P. C., Lee, K. D. y Sreekanth, T. V. M. (2010). Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environmental Chemistry Letters*. 8(3), 199–216. 10.1007/s10311-010-0297-8
- O’Neal, S. L., y Zheng, W. (2015). Manganese Toxicity Upon Overexposure: a Decade in Review. *Current Environmental Health Reports*, 2(3), 315–328. 10.1007/s40572-015-0056-x
- Ortiz Ojeda, C. P. (2013). *Estudio de bacterias psicrótrofas aisladas de la zona de Junín con capacidad PGPR y su uso como potenciales biorremediadoras de metales pesados en una planta forrajera*. [Tesis de Pregrado – Universidad Nacional Agraria La Molina] Repositorio Institucional UNALM.
- Oyuela Leguizamo M. A., Fernandez Gomez W. D. y Gutierrez Sarmiento, M. C. (2017). Native herbaceous plant species with potential use in phytoremediation of heavy metals, spotlight on wetlands – A review. *Chemosphere*. 168, 1230-1247
<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.10.075>
- Pastor Piñeiro, J., Gutierrez-Gines, M. J. y Hernandez A. J. (2012). Respuesta del maíz (*Zea mays*) en suelos contaminados por metales pesados después de crecer una comunidad de pasto. *Nuevos retos de la ganadería extensiva: un agente de conservación en peligro de extinción*. 176-184.
- Pavličková Jana, Zbírál Jirí, Smatanova Michaela, Habarta Petr, Houserová Pavlína y Kubáň Vlastimil. (2006). Uptake of thallium from naturally-contaminated soils into vegetables. *Food additives and contaminants*. 23. 484-91. 10.1080/02652030500512052.

- Perez Leal, F. (2017) Fisiología Vegetal Volumen III. Universidad Nacional de Ucayali. Facultad de Ciencias Agropecuarias y Agroindustriales. <http://repositorio.unu.edu.pe/handle/UNU/3201>
- Preston, G. (2004). Plant perceptions of plant growth-promoting Pseudomonas. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences. 359 (1446), 907-18. 10.1098/rstb.2003.1384.
- Profonanpe. (2021) Acta de la trigésima tercera sesión de la junta de administración del fondo de contingencia para remediación ambiental (Acta-Sesión-33-JA-FC). Fondo de Promoción de Áreas Naturales Protegidas
- Romero Cabello R. (2007) Microbiología y parasitología humana 1.Generalidades sobre ecología. 3a ed. Editorial Medica Panamericana.
- Rivera, F. y Lázaro, E. (2017). Aplicación de la fitorremediación en suelos contaminados por metales pesados utilizando Helianthus annuus L. en la Estación Experimental El Mantaro. *Prospectiva Universitaria*. 10.26490/uncp.1990-7044.2012.1.291
- Rivera-Becerril, F., Juárez-Vázquez, L. V., Hernández-Cervantes, S. C., Acevedo-Sandoval, O. A., Vela-Correa, G., Cruz-Chávez, E., de León-González, F. (2012). Impacts of Manganese Mining Activity on the Environment: Interactions Among Soil, Plants, and Arbuscular Mycorrhiza. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 64(2), 219–227. 10.1007/s00244-012-9827-7
- Riveros Angarita A. (2010). *Inducción de resistencia en plantas, Interacción Planta-Patógeno*. Instituto Interamericano de Investigación para la Agricultura (IICA). ISBN 978-92-9248-185-8

- Rodrigues N, McLaughlin M y Pennock D. (2018). *Soil Pollution a Hidden Reality*. Roma. FAO.
- Rodríguez, A., Villaseñor-Cabral, G., Canet, C., Prol Ledesma, R. M., Camprubí, A., Rodríguez-Díaz, A. (2005). Clasificación de los yacimientos de manganeso y ejemplos de depósitos mexicanos e internacionales. *Boletín de Mineralogía*. 16. 33-43.
- Rout, G. R., y Das, P. (2003). Effect of Metal Toxicity on Plant Growth and Metabolism: I. Zinc. *Agronomie*. 23(1), 3–11. 10.1051/agro:2002073
- Monge-Pérez, José Eladio. (2021). Suelos: conceptos básicos. 10.13140/RG.2.2.22660.45443.
- Munive Cerrón, R., Loli Figueroa O., Azabache Leyton A. y Gamarra Sánchez G., (2018) Fitorremediación con Maíz (*Zea mays* L.) y compost de Stevia en suelos degradados por contaminación con metales pesados. *Scientia Agropecuaria* 9(4), 551 – 560. <http://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2018.04.11>
- Sagardoy, R., Morales, F., López-Millán, A.F., Abadía, A., y Abadía, J. (2009). Effects of zinc toxicity on sugar beet (*Beta vulgaris*L.) plants grown in hydroponics. *Plant Biology*, 11(3), 339–350. 10.1111/j.1438-8677.2008.00153.x
- Saikia Siddhartha, Bora Debashish, Goswami Adrita, Dutta Mudoi y Gogoi Animesh. (2012). A review on the role of Azospirillum in the yield improvement of non leguminous crops. *African Journal of Microbiology Research*. 6(6), 1085-1102. 10.5897/AJMR11.019.

- Saldaña Acosta J. M. (2017) Aislamiento e Identificación de Cepas nativas de *Rhizobium phaseoli* de Suelo de la Presa de la Juventud de Marín, Nuevo León. *Revista Iberoamericana de Producción Académica y Gestión Educativa*. 4(7) <https://www.pag.org.mx/index.php/PAG/article/view/659>
- Sánchez, A., Rodolfo, D., Lorbes, J., Vianel R., Figueredo, L., y Gómez, C. (2015). Diagnóstico e índice para fertilización nitrogenada en etapa vegetativa del cultivo maíz (*Zea mays L*). *Revista Unelles de Ciencia y Tecnología*. 33, 75-82.
- Santillana, N., Arellano, C. y Zúñiga, D. (2005). Capacidad del *rhizobium* de promover el crecimiento en plantas de tomate (*lycopersicon esculentum miller*). *Ecología Aplicada*. 4(1,2) 47-51. 10.21704/rea.v4i1-2.297
- Sawada H., Kuykendall L.D. y Young J.M. (2003). Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. *The Journal of General and Applied Microbiology*. 49 (3), 155-79. 10.2323/jgam.49.155
- Doni S., Macci C., Peruzzi E., Iannelli R. y Masciandaro G., (2015) ,*Heavy metal distribution in a sediment phytoremediation system at pilot scale*, *Ecological Engineering*, Volume 81, 2015, Pages 146-157, ISSN 0925-8574, <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2015.04.049>.
- Sierra C. (2017) Una relación intensa: El hierro, el suelo y las plantas. *El Mercurio*. <https://www.elmercurio.com/Campo/Noticias/Analisis/2016/02/02/Una-relacion-intensa-El-hierro-el-suelo-y-las-plantas.aspx>
- Sivasakthi, S., Usharani, G., y Saranraj, P. (2014). Biocontrol potentiality of plant growth promoting bacteria (PGPR) - *pseudomonas fluorescens* and *bacillus subtilis*: A

review. *African Journal of Agricultural Research*. 9(16), 1265-1277.

<https://doi.org/10.5897/AJAR2013.7914>

Sivry, Y., Riotte, J., Sonke, J. E., Audry, S., Schäfer, J., Viers, J. y Dupré, B. (2008). Zn isotopes as tracers of anthropogenic pollution from Zn-ore smelters The Riou Mort–Lot River system. *Chemical Geology*, 255(3-4), 295–304. 10.1016/j.chemgeo.2008.06.038

Smit, G., Swart, S., Lugtenberg, B. J. J., y Kijne, J. W. (1992). Molecular mechanisms of attachment of Rhizobium bacteria to plant roots. *Molecular Microbiology*, 6(20), 2897–2903. 10.1111/j.1365-2958.1992.tb01748.x

Soon, Y. y Bates, T. (2006). Chemical pools of cadmium, nickel and zinc in polluted soils and some preliminary indications of their availability to plants. *Journal of Soil Science*. 33. 477 - 488. 10.1111/j.1365-2389.1982.tb01782.x.

Soplín, J., Rengifo, A. y Chumbe, J. (1993). Análisis de crecimiento en *Zea mays L.* y *Arachis hypogaea L.* *Folia Amazónica*. 5 (1-2) 171-189. 10.24841/fa.v5i1-2.240.

Stedman, A., Yunis, J. y Aliakbari, E. (2020) *Fraser Institute Annual Survey of Mining Companies 2019*. Fraser Institute

Torres Bua M. (2014) *Materiales de uso Técnico*. Xunta de Galicia, Consellería de Cultura Educación e Ordenación Universitaria.
<https://www.edu.xunta.es/espazoAbalar/sites/espazoAbalar/files/datos/1464947174/contido/index.html>

Urrutia Castro E. S. (2019) *Aplicación de bioestimulantes trihormonales en el cultivo de maíz (Zea mays L.) variedad chingasino para rendimiento de choclo*. [Tesis de

Pregrado, Universidad Nacional del Centro del Perú] Repositorio Institucional UNCP.

United States Geological Survey (2019) *National Minerals Information Center. Zinc Statistics and Information.* <https://www.usgs.gov/centers/nmic/zinc-statistics-and-information>

Vargas Julca K. (2017) *Eficiencia del maíz (Zea mays) cultivado con abonos orgánicos (compost y humus hechos a partir de restos de flores) en la disminución de las concentraciones de plomo de suelos contaminados por el pasivo ambiental minero Catac–Recuay, Ancash 2017.* [Tesis de Pregrado, Universidad Cesar Vallejo] Repositorio Institucional UCV.

Vhahangwele Masindi y Khathutshelo L. Muedi (2018). Environmental Contamination by Heavy Metals, Heavy Metals, Hosam El-Din M. Saleh and Refaat F. Aglan, IntechOpen, DOI: 10.5772/intechopen.76082.

Vinale Francesco, Sivasithamparam Krishnapillai, Ghisalberti Emilio, Marra Roberta, Woo Sheridan y Lorito Matteo. (2008). Trichoderma–plant–pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry.* 40, 1–10. 10.1016/j.soilbio.2007.07.002.

Volke, T., Velasco, A. y de la Rosa, A. (2005) *Suelos contaminados por metales y metaloides: muestreos y alternativas para su remediación.* Instituto Nacional de Ecología (INE-Sermanat)

- Weller, D. (2007). Pseudomonas Biocontrol Agents of Soilborne Pathogens: Looking Back Over 30 Years. *Phytopathology*. 97(2) 250-256.
<http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-97-2-0250>
- W. J. Horts (1988) Chapter 12. The Physiology of Manganese Toxicity. En Graham R. D., Hannam, R. J. y Uren, N. C. (Eds.). *Manganese in Soils and Plants*. (pp. 175-188). Australia. Springer, Dordrecht.
- Wong, M. H., & Tam, F. Y. (1977). Soil and vegetation contamination by iron-ore tailings. *Environmental Pollution*. 14(4), 241–254. 10.1016/0013-9327(77)90136-7
- Wu, S., Cheung, K., Luo, Y. y Wong, M. (2006). Effects of inoculation of plant growth-promoting rhizobacteria on metal uptake by *Brassica juncea*. *Environmental Pollution*. 140, 124–135. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.06.023>
- Xu, J., Yang, L., Wang, Z., Dong, G., Huang, J., y Wang, Y. (2006). Toxicity of copper on rice growth and accumulation of copper in rice grain in copper contaminated soil. *Chemosphere*. 62(4), 602–607. 10.1016/j.chemosphere.2005.05.050
- Yaron B, Calvet R, Prost R. (1996). *Soil Pollution Processes and Dynamics*. Heidelberg, Alemania. Spring.
- Ying Ma, Rui S. Oliveira, Fengjiao Nai, Mani Rajkumar, Yongming Luo, Inês Rocha y Helena Freitas. (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>.

X. ANEXOS

Tabla 1s.

Prueba de ANOVA Unifactorial de Parámetros Fisiológicos

		<u>Suma de cuadrados</u>	<u>gl</u>	<u>Media cuadrática</u>	<u>F</u>	<u>Sig.</u>
Concentración de Clorofila (SPAD)	Entre grupos	1911.479	9	212.387	4.831	.000
	Dentro de grupos	1319.010	30	43.967		
	Total	3230.489	39			
Área Foliar (cm³)	Entre grupos	17585054.421	9	1953894.936	8.035	.000
	Dentro de grupos	7295406.129	30	243180.204		
	Total	24880460.551	39			
Altura (cm)	Entre grupos	139338.849	9	15482.094	19.593	.000
	Dentro de grupos	23706.083	30	790.203		
	Total	163044.933	39			
Numero de Hojas	Entre grupos	49.020	9	5.447	3.604	.004
	Dentro de grupos	45.333	30	1.511		
	Total	94.353	39			
Peso Fresco Radicular	Entre grupos	282419.018	9	31379.891	5.635	.000
	Dentro de grupos	167049.833	30	5568.328		
	Total	449468.851	39			

Tabla 2s.

Concentraciones de Clorofila

Concentración promedio de cuatro repeticiones por T_n en unidades SPAD.

MES	TRATAMIENTOS									
	<u>Control</u>	<u>T1 30%</u>	<u>T1 60%</u>	<u>T1 100%</u>	<u>T2 30%</u>	<u>T2 60%</u>	<u>T2 100%</u>	<u>T3 30%</u>	<u>T3 60%</u>	<u>T3 100%</u>
MES 1	33.01	34.05	28.20	25.43	35.93	32.98	32.70	32.73	29.73	27.73
MES 2	40.40	35.33	30.48	26.78	36.03	36.70	31.93	37.55	32.15	21.55
MES 3	32.70	35.53	42.60	20.63	37.63	40.50	33.13	42.70	38.33	26.88
MES 4	32.08	29.03	36.78	19.70	30.30	41.65	32.93	43.35	35.50	24.25

Nota: T1= Zea Mays + Relave; T2= Zea Mays + R.E. + Relave; T3= Zea Mays + (B.S; P.F; A; A; T) + Relave

Tabla 3s.

Tabla de Comparaciones Múltiples por Concentración de Clorofila

Prueba HSD Tukey, datos en unidades SPAD

<u>Tratamientos</u>	<u>N</u>	<u>Subconjunto para alfa = 0.05</u>		
		<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>
T1 100%	4	19.7000		
T3 100%	4	24.2500	24.2500	
T1 30%	4	29.0250	29.0250	29.0250
T2 30%	4	30.3000	30.3000	30.3000
Control	4	32.0750	32.0750	32.0750
T2 100%	4	32.9250	32.9250	32.9250
T3 60%	4	35.5000	35.5000	35.5000
T1 60%	4		36.7750	36.7750
T2 60%	4			41.6500
T3 30%	4			43.3500
Sig.		.055	.230	.109

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.
a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 4.000.

Tabla 4s.

Área Foliar

Áreas promedio de cuatro repeticiones por T_n en cm³

MES	TRATAMIENTOS									
	Control	T1 30%	T1 60%	T1 100%	T2 30%	T2 60%	T2 100%	T3 30%	T3 60%	T3 100%
MES 1	157.38	174.00	158.63	130.13	146.75	201.38	117.88	97.38	163.88	127.13
MES 2	1393.05	1673.25	1457.00	500.50	1113.06	1225.13	423.88	1381.75	1425.25	618.63
MES 3	1986.50	2372.25	2805.00	616.50	2451.25	2849.17	1178.50	2916.25	3231.50	1575.75
MES 4	1854.38	1770.23	2458.63	361.00	2045.67	1356.35	1264.25	2821.25	1996.80	1221.90

Nota: T1= Zea Mays + Relave; T2= Zea Mays + R.E. + Relave; T3= Zea Mays + (B.S; P.F; A; A; T) + Relave

Tabla 5s.

Tabla de Comparaciones Múltiples por Área Foliar

Prueba HSD Tukey, datos en cm³

Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>
T1 100%	4	361.0000			
T3 100%	4	1221.9000	1221.9000		
T2 100%	4	1264.2500	1264.2500		
T2 60%	4	1356.3500	1356.3500	1356.3500	
T1 30%	4		1770.2250	1770.2250	1770.2250
Control	4		1854.3750	1854.3750	1854.3750
T3 60%	4		1996.8000	1996.8000	1996.8000
T2 30%	4		2045.6675	2045.6675	2045.6675
T1 60%	4			2458.6250	2458.6250
T3 30%	4				2821.2500
Sig.		.164	.382	.087	.119

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 4.000.

Tabla 6s.

Altura del Tallo

Alturas promedio de cuatro repeticiones por T_n en cm

MES	TRATAMIENTOS									
	Control	T1 30%	T1 60%	T1 100%	T2 30%	T2 60%	T2 100%	T3 30%	T3 60%	T3 100%
MES 1	9.00	12.00	8.25	9.13	9.00	12.13	8.63	9.13	11.00	9.25
MES 2	28.25	30.13	23.75	16.38	28.75	29.38	17.88	31.75	28.63	16.75
MES 3	161.75	151.25	129.25	32.00	153.25	141.67	76.00	167.50	154.00	50.75
MES 4	209.00	223.75	221.00	51.00	221.33	224.00	122.00	206.00	221.67	114.00

Nota: T1= Zea Mays + Relave; T2= Zea Mays + R.E. + Relave; T3= Zea Mays + (B.S; P.F; A; A; T) + Relave

Tabla 7s.

Tabla de Comparaciones Múltiples por Altura de Tallo

Prueba HSD Tukey, datos en cm

<u>Tratamientos</u>	<u>N</u>	<u>Subconjunto para alfa = 0.05</u>		
		<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>
T1 100%	4	51.0000		
T3 100%	4	114.0000	114.0000	
T2 100%	4		122.0000	
T3 30%	4			206.0000
Control	4			209.0000
T1 60%	4			221.0000
T2 30%	4			221.3325
T3 60%	4			221.6675
T1 30%	4			223.7500
T2 60%	4			224.0000
Sig.		.086	1.000	.995

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 4.000.

Tabla 8s.

Numero de Hojas

Numero de hojas promedio de cuatro repeticiones por T_n

MES	<u>TRATAMIENTOS</u>									
	<u>Control</u>	<u>T1 30%</u>	<u>T1 60%</u>	<u>T1 100%</u>	<u>T2 30%</u>	<u>T2 60%</u>	<u>T2 100%</u>	<u>T3 30%</u>	<u>T3 60%</u>	<u>T3 100%</u>
MES 1	5.75	6.25	5.50	5.75	6.50	6.50	5.75	5.75	5.75	5.25
MES 2	9.25	9.25	8.25	6.25	9.25	9.25	7.00	10.00	9.00	7.75
MES 3	8.50	8.25	10.25	6.25	10.75	10.00	10.00	9.50	10.00	10.25
MES 4	6.00	6.50	8.50	5.33	7.00	5.50	8.75	7.00	7.33	7.75

Nota: T1= Zea Mays + Relave; T2= Zea Mays + R.E. + Relave; T3= Zea Mays + (B.S; P.F; A; A; T) + Relave

Tabla 9s.

Tabla de Comparaciones Múltiples por Número de Hojas

Prueba HSD Tukey

<u>Tratamientos</u>	<u>N</u>	<u>Subconjunto para alfa = 0.05</u>	
		<u>1</u>	<u>2</u>
T1 100%	4	5.3325	
T2 60%	4	5.5000	
Control	4	6.0000	6.0000
T1 30%	4	6.5000	6.5000
T2 30%	4	7.0000	7.0000
T3 30%	4	7.0000	7.0000
T3 60%	4	7.3325	7.3325
T3 100%	4	7.7500	7.7500
T1 60%	4		8.5000
T2 100%	4		8.7500
Sig.		.188	.087

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 4.000.

Tabla 10s.

Peso Fresco Radicular (g)

Peso Fresco Radicular promedio de cuatro repeticiones por T_n en gramos, culminado el experimento

MES	TRATAMIENTOS									
	<u>Control</u>	<u>T1 30%</u>	<u>T1 60%</u>	<u>T1 100%</u>	<u>T2 30%</u>	<u>T2 60%</u>	<u>T2 100%</u>	<u>T3 30%</u>	<u>T3 60%</u>	<u>T3 100%</u>
MES 4	201.00	117.00	174.75	24.33	126.33	275.50	44.75	275.50	176.00	68.00

Nota: T1= Zea Mays + Relave; T2= Zea Mays + R.E. + Relave; T3= Zea Mays + (B.S; P.F; A; A; T) + Relave

Tabla 11s.

Tabla de Comparaciones Múltiples por Peso Fresco Radicular

Prueba HSD Tukey, datos en gramos

<u>Tratamientos</u>	<u>N</u>	<u>Subconjunto para alfa = 0.05</u>	
		<u>1</u>	<u>2</u>
T1 100%	4	24.3325	
T2 100%	4	44.7500	
T3 100%	4	68.0000	
T1 30%	4	117.0000	117.0000
T2 30%	4	126.3325	126.3325
T1 60%	4	174.7500	174.7500
T3 60%	4	176.0000	176.0000
Control	4	201.0000	201.0000
T2 60%	4		275.5000
T3 30%	4		275.5000
Sig.		.058	.122

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 4.000.

Tabla 12s.

Prueba de ANOVA Unifactorial de Parámetros Edafológicos

		<u>Suma de cuadrados</u>	<u>Gl</u>	<u>Media cuadrática</u>	<u>F</u>	<u>Sig.</u>
Capacidad de Intercambio Catiónico	Entre grupos	5891.212	9	654.579	9.530	.000
	Dentro de grupos	2060.673	30	68.689		
	Total	7951.885	39			
Materia Orgánica Total	Entre grupos	4999.929	9	555.548	39.508	.000
	Dentro de grupos	421.848	30	14.062		
	Total	5421.778	39			
Potencial de Hidrogeno	Entre grupos	1.122	9	.125	66.960	.000
	Dentro de grupos	.056	30	.002		
	Total	1.178	39			
Conductividad Eléctrica	Entre grupos	47.299	9	5.255	3.180	.008
	Dentro de grupos	49.585	30	1.653		
	Total	96.884	39			

Tabla 13s.

Capacidad de Intercambio Catiónico

CIC Promedio de cuatro repeticiones por T_n en unidades meq/100g

MES	TRATAMIENTOS									
	Control	T1 30%	T1 60%	T1 100%	T2 30%	T2 60%	T2 100%	T3 30%	T3 60%	T3 100%
MES 1	29.75	47.38	29.04	11.88	32.14	26.46	49.31	67.03	26.33	18.00
MES 2	66.40	46.00	32.40	28.00	49.60	33.20	20.00	36.60	28.00	18.00
MES 3	85.33	64.00	67.73	60.00	53.60	52.53	40.00	58.15	46.60	51.63
MES 4	92.67	73.87	77.83	64.20	58.57	67.25	50.83	65.10	71.57	50.13

Nota: T1= Zea Mays + Relave; T2= Zea Mays + R.E. + Relave; T3= Zea Mays + (B.S; P.F; A; A; T) + Relave

Tabla 14s.

Tabla de Comparaciones Múltiples por Capacidad de Intercambio Catiónico

Prueba HSD Tukey, datos en unidades meq/100g

Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>
T3 100%	4	50.1250		
T2 100%	4	50.8250		
T2 30%	4	58.5675	58.5675	
T1 100%	4	64.2000	64.2000	
T3 30%	4	65.1000	65.1000	
T2 60%	4	67.2500	67.2500	
T3 60%	4		71.5675	
T1 30%	4		73.8675	73.8675
T1 60%	4		77.8325	77.8325
Control	4			92.6675
Sig.		.143	.066	.079

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 4,000.

Tabla 15s.

Materia Orgánica Total

Materia Orgánica Total promedio de cuatro repeticiones por T_n en porcentaje

MES	TRATAMIENTOS									
	Control	T1 30%	T1 60%	T1 100%	T2 30%	T2 60%	T2 100%	T3 30%	T3 60%	T3 100%
MES 1	46.28	19.00	9.79	1.15	19.70	5.99	0.99	13.15	7.93	1.93
MES 2	60.46	48.47	37.47	15.44	49.30	33.91	17.05	43.25	38.40	14.40
MES 3	46.90	36.30	23.80	13.57	32.09	23.86	8.58	32.90	27.50	21.75
MES 4	37.08	27.08	13.20	4.00	28.87	20.70	3.25	23.00	19.47	3.35

Nota: T1= Zea Mays + Relave; T2= Zea Mays + R.E. + Relave; T3= Zea Mays + (B.S; P.F; A; A; T) + Relave

Tabla 16s.

Tabla de Comparaciones Múltiples por Materia Orgánica Total

Prueba HSD Tukey, datos en porcentaje

Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>
T2 100%	4	3.2500				
T3 100%	4	3.3500				
T1 100%	4	4.0000				
T1 60%	4		13.2000			

T3 60%	4	19.4675	19.4675		
T2 60%	4	20.7000	20.7000	20.7000	
T3 30%	4		23.0000	23.0000	
T1 30%	4		27.0750	27.0750	
T2 30%	4			28.8675	28.8675
Control	4				37.0750
Sig.		1.000	.172	.159	.104

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 4,000.

Tabla 17s.

Conductividad Eléctrica

Conductividad Eléctrica de cuatro repeticiones por T_n en unidades mS/cm

	TRATAMIENTOS									
	Control	T1 30%	T1 60%	T1 100%	T2 30%	T2 60%	T2 100%	T3 30%	T3 60%	T3 100%
MES 1	2.27	3.08	2.55	3.43	3.21	2.90	2.70	4.69	4.24	2.61
MES 2	4.17	5.98	4.89	3.09	6.92	5.66	2.96	6.52	6.16	2.84
MES 3	6.41	7.60	5.65	4.36	7.13	5.60	4.20	6.27	6.24	5.60
MES 4	7.26	8.10	6.25	5.07	8.12	5.36	4.98	6.70	6.90	6.11

Nota: T1= Zea Mays + Relave; T2= Zea Mays + R.E. + Relave; T3= Zea Mays + (B.S; P.F; A; A; T) + Relave

Tabla 18s.2

Tabla de Comparaciones Múltiples por Conductividad Eléctrica

Prueba HSD Tukey, datos en mS/cm

Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
T2 100%	4	4.9825	
T1 100%	4	5.0725	5.0725
T2 60%	4	5.3600	5.3600
T3 100%	4	6.1125	6.1125
T1 60%	4	6.2500	6.2500
T3 30%	4	6.7000	6.7000
T3 60%	4	6.9000	6.9000
Control	4	7.2625	7.2625
T1 30%	4		8.1000
T2 30%	4		8.1225
Sig.		.304	.057

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 4,000.

Tabla 19s.

Prueba de ANOVA Unifactorial de Concentración Foliar de Metales

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Concentración Foliar de Hierro	Entre grupos	111680968.629	9	12408996.514	3092.352	.000
	Dentro de grupos	80256.039	20	4012.802		
	Total	111761224.668	29			
Concentración Foliar de Cobre	Entre grupos	1880204.266	9	208911.585	3878.928	.000
	Dentro de grupos	1077.161	20	53.858		

Concentración Foliar de Zinc	Total	1881281.427	29			
	Entre grupos	246087.253	9	27343.028	2748.345	.000
Concentración Foliar de Manganeseo	Dentro de grupos	198.978	20	9.949		
	Total	246286.231	29			
Concentración Foliar de Hierro	Entre grupos	517575.755	9	57508.417	2711.433	.000
	Dentro de grupos	424.192	20	21.210		
Concentración Foliar de Zinc	Total	517999.947	29			

Tabla 20s.3

Tabla de Comparaciones Múltiples por Concentración Foliar de Hierro

Prueba HSD Tukey, datos en mg/Kg

Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05							
		1	2	3	4	5	6	7	8
T2 60%	3	100.2333							
T2 30%	3	142.8967							
T2 100%	3	247.7533							
Control	3		1434.8567						
T1 60%	3			2173.7700					
T1 30%	3				2706.5900				
T1 100%	3					3218.5400			
T3 60%	3						3551.2100		
T3 100%	3							5249.8867	
T3 30%	3								5723.8167
Sig.		.184	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3.000.

Tabla 21s.

Tabla de Comparaciones Múltiples por Concentración Foliar de Cobre

Prueba HSD Tukey, datos en mg/Kg

Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
T2 60%	3	.3700					
T2 30%	3	.8000					
T2 100%	3	8.0300					
T3 60%	3	13.4533					
T1 100%	3		289.4200				
Control	3		297.9600				
T1 30%	3			322.9033			
T1 60%	3				355.5933		
T3 100%	3					602.8567	
T3 30%	3						744.8167
Sig.		.497	.905	1.000	1.000	1.000	1.000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3.000.

Tabla 22s.

Tabla de Comparaciones Múltiples por Concentración Foliar de Zinc

Prueba HSD Tukey, datos en mg/Kg

Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
T2 30%	3	18.8533					
T2 60%	3	25.8533	25.8533				
T3 60%	3		28.1067				
T2 100%	3			97.3767			
T1 100%	3				110.0633		
T1 60%	3					123.1700	

T1 30%	3				131.1700				
Control	3					189.0133			
T3 100%	3						242.2467		
T3 30%	3							305.8833	
Sig.		.231	.996	1.000	1.000	.117	1.000	1.000	1.000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3.000.

Tabla 23s4.

Tabla de Comparaciones Múltiples por Concentración Foliar de Manganeso

Prueba HSD Tukey, datos en mg/Kg

Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05							
		1	2	3	4	5	6	7	8
T2 60%	3	21.7033							
T2 30%	3	31.1433							
T2 100%	3		62.1200						
Control	3			109.6433					
T1 30%	3				191.8933				
T3 60%	3					206.1000			
T1 60%	3					211.9433			
T1 100%	3						245.1567		
T3 100%	3							317.6967	
T3 30%	3								466.0367
Sig.		.320	1.000	1.000	1.000	.854	1.000	1.000	1.000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3.000.

Tabla 24s.

Prueba de ANOVA Unifactorial de Concentración Radicular de Metales

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Concentración Radicular de Fe	Entre grupos	17862518321.724	9	1984724257.969	6525.174	.000
	Dentro de grupos	6083283.724	20	304164.186		
	Total	17868601605.449	29			
Concentración Radicular de Cu	Entre grupos	1079307.110	9	119923.012	6144.652	.000
	Dentro de grupos	390.333	20	19.517		
	Total	1079697.443	29			
Concentración Radicular de Zn	Entre grupos	138858.600	9	15428.733	2920.525	.000
	Dentro de grupos	105.657	20	5.283		
	Total	138964.257	29			
Concentración Foliar de Mn	Entre grupos	455363.016	9	50595.891	4558.472	.000
	Dentro de grupos	221.986	20	11.099		
	Total	455585.002	29			

Tabla 25s.5

Tabla de Comparaciones Múltiples por Concentración Radicular de Hierro
Prueba HSD Tukey, datos en mg/Kg

Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
T1 60%	3	56.0800			
Control	3	57.4033			
T2 100%	3	59.4333			
T2 30%	3	62.2400			
T1 100%	3	65.6800			
T1 30%	3	85.6167			
T2 60%	3	87.5767			
T3 100%	3		2297.8400		
T3 30%	3			47706.5767	
T3 60%	3				71908.2167
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000

Tabla 26s.6

Tabla de Comparaciones Múltiples por Concentración Radicular de Cobre
Prueba HSD Tukey, datos en mg/Kg

Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
Control	3	.0350			
T1 100%	3	.0350			
T2 100%	3	.0350			
T2 30%	3	2.2167			
T2 60%	3	2.2800			
T1 60%	3	5.7067			
T1 30%	3	8.7167			
T3 100%	3		129.5000		
T3 30%	3			369.3267	
T3 60%	3				569.9133
Sig.		.372	1.000	1.000	1.000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

Tabla 27s.

Tabla de Comparaciones Múltiples por Concentración Radicular de Zinc
Prueba HSD Tukey, datos en mg/Kg

Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Control	3	17.8967							
T1 100%	3		28.4067						
T2 100%	3		28.9767						
T3 100%	3			55.2100					
T2 60%	3			60.4600					
T2 30%	3				83.3233				
T1 30%	3					95.4267			
T3 30%	3						134.1200		
T1 60%	3							162.5967	

T3 60%	3								245.5967
Sig.		1.000	1.000	.202	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

Tabla 28s.

Tabla de Comparaciones Múltiples por Concentración Radicular de Manganeso
Prueba HSD Tukey, datos en mg/Kg

Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
Control	3	27.3433						
T2 100%	3	31.3167						
T1 100%	3	36.5533	36.5533					
T2 60%	3		43.4800	43.4800				
T1 30%	3			47.3233				
T2 30%	3			48.3433				
T1 60%	3				68.7833			
T3 100%	3					116.3733		
T3 30%	3						252.1467	
T3 60%	3							425.0733
Sig.		.068	.303	.735	1.000	1.000	1.000	1.000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.