

**EVALUACIÓN DE INDICADORES MICROBIOLÓGICOS EN SUELOS DE UN  
ÁREA IMPACTADA POR LA MINERÍA DE ORO, EN EL MUNICIPIO DE SANTA  
ISABEL- TOLIMA.**

**LILY JULIETH VARGAS OSORIO**

**Trabajo de grado como requisito parcial para optar al título de  
Biólogo.**

**Director**

**MARYEIMY VARÓN LÓPEZ**

**Doctor en Ciencias**

**UNIVERSIDAD DEL TOLIMA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**BIOLOGÍA**

**IBAGUÉ-TOLIMA**

**2017**



FACULTAD DE CIENCIAS  
PROGRAMA DE BIOLOGÍA

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TRABAJO DE GRADO

TÍTULO EVALUACIÓN DE INDICADORES MICROBIOLÓGICOS EN SUELOS DE UN  
ÁREA IMPACTADA POR LA MINERÍA DE ORO, EN EL MUNICIPIO DE SANTA ISABEL-  
TOLIMA.

AUTORES LILY JULIETH VARGAS OSORIO 0701 5029 2011

DIRECTOR MARYEIMY VARON LOPEZ

JURADOS ANDRES FELIPE VANEGAS SALIVE  
DANIEL BINI


CALIFICACIÓN 4.9

APROBADO

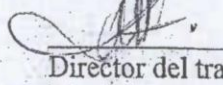
REPROBADO

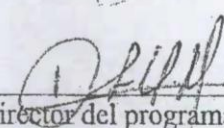
OBSERVACIONES \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

FIRMAS

JURADO 1. \_\_\_\_\_  


JURADO 2. \_\_\_\_\_  


Director del trabajo \_\_\_\_\_  


Director del programa \_\_\_\_\_  


Ciudad y fecha: Ibagué, 23 de junio de 2017

(ad hoc).

## DEDICATORIA

*A Dios, que guía mi camino  
A mis padres, Liliana y Norvey por su amor incesante  
A mi hermana Margarita, mi compañia siempre  
Luis Carlos y mi familia por su apoyo incondicional*

## AGRADECIMIENTOS

A mi directora la Dra. Maryeimy Varón López, por su valiosa orientación, esfuerzo y dedicación, que aportó en mi formación académica y personal.

Al grupo GEBIUT, por su colaboración en el desarrollo de este estudio.

A mis compañeros Yessica Perdomo, Lizeth Ospina y Herik Guzmán, gracias por la ayuda que siempre me brindaron.

A la Universidad del Tolima y la oficina de Investigaciones, quienes permitieron llevar a cabo este trabajo.

Los funcionarios de la mina de Santa Isabel, por facilitar la toma de las muestras.

Mi familia por su respaldo, es un privilegio contar con ustedes.

Mis padres y mi hermana por ser los promotores de mis sueños, de igual forma a mis abuelos en especial a José Vargas por su cariño.

Luis Carlos por su inmenso apoyo y compañía.

A mis amigos por sus consejos y comprensión.

A todos los que de una u otra manera contribuyeron en la ejecución de este trabajo.

## CONTENIDO

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	12
<b>1. OBJETIVOS</b> .....	14
1.1 OBJETIVO GENERAL .....	14
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
<b>2 MARCO TEÓRICO</b> .....	15
2.1 CONTAMINACIÓN DEL SUELO.....	15
2.2 ESTADO ACTUAL DE LA MINERÍA. ....	16
2.3 PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS DEL SUELO .....	19
2.4 METALES PESADOS ASOCIADOS A LOS SUELOS.....	20
2.5 IMPORTANCIA DE LOS MICROORGANISMO EN EL SUELO.....	21
2.6 MÉTODOS BIOLÓGICOS USADOS EN LA EVALUACIÓN DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS DEL SUELO EN AREAS DEGRADAS. ....	23
2.7 MICROORGANISMOS COMO INDICADORES DE LA CALIDAD DEL SUELO, EN AREAS MINERAS.....	27
<b>3 METODOLOGÍA</b> .....	30
3.1 ÁREA DE ESTUDIO. ....	30
3.2 COLECTA DE LAS MUESTRAS.....	31
3.3 ANÁLISIS FISICOQUÍMICOS DE LAS MUESTRAS DEL SUELO DE LAS ÁREAS SI-M Y SI-N .....	31
3.4 PARÁMETROS BIOLÓGICOS.....	33
3.4.1 Densidad microbiana .....	33
3.4.2 Respiración basal e inducida.....	33
3.4.3 Carbono de la biomasa microbiana (CBM).....	34
3.4.4 Cociente metabólico ( $qCO_2$ ). ....	34
3.5 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE MSF. ....	34

3.5.1	Aislamiento de cepas.....	34
3.5.2	Extracción de ADN .....	35
3.5.3	Identificación molecular. ....	36
3.5.4	Secuenciación. ....	36
3.6	ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	37
<b>4</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>38</b>
4.1	ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS Y METALES PESADOS DE LAS ÁREAS DE ESTUDIO. ....	38
4.1.1	Propiedades fisicoquímicas de las zonas de muestreo .....	38
4.1.2	Metales pesados en las áreas de estudio.....	40
4.2	PARÁMETROS BIOLÓGICOS.....	42
4.2.1	Densidad Microbiana. ....	42
4.2.2	Respiración microbiana .....	45
4.2.3	Carbono de la Biomasa Microbiana (CBM) .....	47
4.2.4	El cociente metabólico ( $qCO_2$ ).....	47
4.3	RELACIÓN ENTRE LAS PROPIEDADES BIOLÓGICAS Y LOS PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS/ METALES PESADOS DEL SUELO. ....	48
4.3.1	Análisis de componentes principales (ACP) entre los parámetros biológicos y fisicoquímicos .....	48
4.3.2	El análisis de componentes principales (ACP) de los parámetros biológicos y los metales pesados.....	50
4.4	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE MSF. ....	52
4.4.1	Aislamiento de MSF. ....	52
4.4.2	Identificación y análisis de secuencias .....	53
<b>5</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>62</b>
	<b>RECOMENDACIONES .....</b>	<b>63</b>
	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>64</b>

**ANEXOS** ..... 81

## LISTA DE TABLAS.

<b>Tabla 1.</b> Niveles críticos generales para el diagnóstico de la fertilidad fisicoquímica del suelo.....	19
<b>Tabla 2.</b> Niveles de referencia para metales pesados en suelos. CN y VR son normales o de referencia, CA, anormales, VP de prevención y VI de intervención. 21	
<b>Tabla 3.</b> Propiedades fisicoquímicas del suelo en (SI-M) que corresponde al área de depósitos mineros y (SI-N) a la zona con vegetación nativa ( $\pm$ desviación estándar). .....	39
<b>Tabla 4.</b> Metales pesados del suelo en (SI-M) que corresponde al área de depósitos mineros y (SI-N) a la zona con vegetación nativa ( $\pm$ desviación estándar). .....	41
<b>Tabla 5.</b> Índice de solubilización de fosfato de cepas de bacterias y hongos aislados del área de relave minero ( $\pm$ desviación estándar). .....	53
<b>Tabla 6.</b> Resultados de identidad en GenBank de secuencias 16S de BSF aislados del área SI-M.....	54
<b>Tabla 7.</b> Resultados de identidad en GenBank de secuencias ITS del ADNr de hongos solubilizadores de fosfato aislados del área SI-M. ....	58



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Títulos mineros concedidos (rojo) y solicitados (azul) en Colombia. ....	17
<b>Figura 2.</b> Títulos mineros concedidos (rojo) y solicitados (azul) en el departamento del Tolima.....	18
<b>Figura 3.</b> Títulos mineros concedidos (rojo) y solicitados (azul) en zonas aledañas al área de estudio. ....	30
<b>Figura 4.</b> Área de estudio donde se observan, las zonas de muestreo de depósitos mineros (SI-M) y con vegetación nativa (SI-N) y el mapa del área de estudio donde se indican las zonas y puntos muestreados.....	32
<b>Figura 5.</b> Densidad microbiana del suelo, en las zonas de depósitos mineros (SI-M) y de vegetación nativa (SI-N). ....	43
<b>Figura 6.</b> Actividad microbiana del suelo en las zonas SI-M y SI-N. ....	46
<b>Figura 7.</b> Análisis de componentes principales de los parámetros biológicos y fisicoquímicos del suelo en SI-M y SI-N. ....	49
<b>Figura 8.</b> Análisis de componentes principales de los parámetros biológicos y los metales pesados del suelo en SI-M y SI-N. ....	51
<b>Figura 9.</b> Análisis filogenético de bacterias basado en el método de unión de vecinos, modelo Jukes-Cantor. ....	55
<b>Figura 10.</b> Análisis filogenético de hongos basado en el método de unión de vecinos, modelo Kimura 2. ....	59

## RESUMEN

La minería provoca fuertes alteraciones en el medio ambiente, puesto que ocasiona residuos tóxicos que afectan la calidad del suelo. Los microorganismos son uno de los bioindicadores más eficientes para estimar el impacto de estas actividades, ya que responden de manera rápida a los cambios originados además de ser fundamentales para mantener la estabilidad del ecosistema. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del relave de la minería de oro sobre la comunidad microbiana del suelo en Santa Isabel-Tolima. Se valoraron dos zonas: una de relave y sin vegetación (SI-M) y la otra adyacente, con vegetación nativa y sin ningún tipo de depósito minero (SI-N). En cada una de estas áreas se determinó la abundancia de grupos microbianos por el método de dilución seriada, se estimó la respiración, la biomasa microbiana y se calculó el cociente metabólico. A los aislados de la zona (SI-M) que presentaron la mayor actividad solubilizadora, se les realizó la identificación molecular. Los resultados mostraron el efecto deletéreo de los relaves sobre los microorganismos en el área SI-M, donde los parámetros microbiológicos disminuyeron drásticamente. La identificación molecular, permitió determinar cuatro bacterias del género *Pseudomonas* y cinco hongos identificados como: *Penicillium chrysogenum*, *Fusarium verticillioides*, *Beauveria bassiana*, *Pseudeurotium ovale* y *Cadophora malorum* siendo estos dos últimos nuevos reportes para la actividad de solubilización de fosfato. Este estudio muestra como estos procesos extractivos afectan los microorganismos del suelo, estableciendo un punto de partida para trabajos posteriores que permitan la recuperación de estas áreas.

**Palabras claves:** Suelo, Indicadores, Relave, Grupos microbianos, Alteraciones.

## ABSTRACT

Mining causes strong alterations in the environment, as it causes toxic waste in concentrations that affect the quality of the soil. Microorganisms are one of the most efficient indicators to estimate the impact of these activities, since they respond quickly to the changes originating besides to being fundamental to maintain the stability of the ecosystem. The objective of this study was to evaluate the effect of gold mining residues on the microbial community of the soil, in Santa Isabel-Tolima. For this, two areas were evaluated: one of tailings and without vegetation (SI-M) and the other one adjacent, with native vegetation and without any deposit of miners (SI-N). In each of these areas, the abundance of microbial groups was determined by the serial dilution method. Also, soil respiration, microbial biomass was estimated and the metabolic quotient was calculated. Isolates from the (SI-M) zone that presented the highest solubilizing activity were molecularly identified. The results showed the deleterious effect of tailings on the microbial community in the area SI-M, where the microbiological parameters decreased drastically. The molecular identification, allowed determining four bacteria the genus *Pseudomonas* and five fungi identified as: *Penicillium chrysogenum*, *Fusarium verticillioides*, *Pseudeurotium ovale*, *Beauveria bassiana* and *Cadophora malorum* the two latters new reports for phosphate solubilization activity. This study shows how these extractive processes affect soil microorganisms, establishing a starting point for later works that allow the recovery of these areas.

**Keywords:** Soil, Indicators, Tailings, Microbial groups, Alterations.

## INTRODUCCIÓN

Las actividades desarrolladas por el hombre como la agricultura, industria y minería, provocan un fuerte impacto en el medio ambiente, debido a que los desechos generados (compuestos órganoclorados, xenobióticos y metales pesados) modifican las propiedades del entorno, lo que origina cambios en la estabilidad de los ecosistemas (Coelho, Teixeira & Gonçalves, 2011; Moreira & Siqueira, 2006; Zhang & Moffat, 2015).

De estas actividades, la extracción de recursos minerales es una de las principales causas de la contaminación del suelo, ya que genera variación en la estructura edáfica, remoción de la cubierta vegetal, incremento del riesgo de erosión y modificación del relieve, lo que provoca problemas paisajísticos. Además, las altas concentraciones de elementos tóxicos se dispersan en el suelo, donde se acumulan por tiempo indefinido y modifican la abundancia, diversidad y actividad de los organismos, inhibición en la descomposición de la materia orgánica, variación en los parámetros fisicoquímicos (Cantero, Rhenals & Moreno, 2015; Palma, 2011; Pérez et al., 2012).

El deterioro del suelo está relacionado con la alteración de numerosas funciones realizadas por los microorganismos (Vallejo-Quintero, 2013). Estos juegan un papel importante en la descomposición de la materia orgánica, la estructura del suelo, la fijación de nitrógeno, reducción de patógenos de las plantas, además de ser muy sensibles a los cambios ambientales (Schimann et al., 2012; Vallejo-Quintero, 2013). Por lo tanto, la comunidad microbiana es considerada un bioindicador eficiente para evaluar el impacto originado por las actividades antrópicas, adicionalmente se resalta la capacidad que tienen de responder en escalas de tiempo mucho más cortas que los parámetros físicos o químicos (Cébron et al., 2011; Di Ciocco, Sandler, Falco & Coviella, 2014; Liao & Xiao, 2007).

Las propiedades biológicas del suelo han sido empleadas para caracterizar áreas degradadas y evaluar el efecto de las estrategias de revegetación en diferentes ambientes (Liu, Yang, Zhou & Liang, 2016; Santos et al., 2013, Varón, 2010; Zhang et al., 2010). Uno de los grupos funcionales más evaluados en estas zonas son los microorganismos solubilizadores de fosfato (MSF), ya que son sensibles al estrés ambiental (Useche et al., 2004). De igual forma, los atributos de biomasa microbiana, la respiración basal e inducida y la estructura de la comunidad edáfica son analizados en programas de monitoreo debido a sus bajos costos y su fácil medición en el laboratorio (Vallejo-Quintero, 2013; Dos Santos et al., 2015).

Estudios a nivel mundial en áreas de minería de oro, han evaluado la diversidad, la biomasa y la actividad microbiana, observan una notoria disminución en la microbiota edáfica, debido al aumento de las concentraciones de los metales pesados (Schimann et al., 2012; Tomczyk-Żak et al, 2013; Díaz, Arranz & Peñuela, 2013). Se ha reportado que estos tienen efectos tóxicos sobre las células, como resultado de su capacidad para alterar o desnaturalizar las proteínas (Narendrula-Kotha & Nkongolo, 2017). Aún es poco lo que se conoce sobre la diversidad del suelo, las relaciones simbióticas, la composición y el papel de la comunidad microbiana en el funcionamiento de áreas afectadas por estas actividades (Bajsa, 2008; de la Cruz, Zamudio, Corona, González, & Rojas, 2015). En Colombia son escasas las investigaciones sobre el efecto de los residuos de la industria minera, y nulos en el departamento del Tolima, información que es la base para conocer el estado real de estos ambientes, para monitorearlos y con ello crear estrategias adecuadas para la recuperación de estos suelos.

## **1. OBJETIVOS**

### **1.1 OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto del relave de la minería de oro, sobre la comunidad microbiana del suelo, en el municipio de Santa Isabel, Tolima.

### **1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Determinar la abundancia de bacterias, hongos y microorganismos solubilizadores de fosfato, en las zonas de depósitos mineros y de vegetación nativa.

Estimar la actividad y la biomasa microbiana, en un área de relave minero y un área nativa.

Determinar los cambios que la minería ejerce sobre los parámetros biológicos y fisicoquímicos del suelo.

Identificar mediante secuenciación, los microorganismos solubilizadores de fosfato, potenciales en la recuperación de suelos afectados por la minería de oro.

## 2 MARCO TEÓRICO

### 2.1 CONTAMINACIÓN DEL SUELO.

La contaminación del suelo se define como la alteración negativa de las características físicas, químicas o biológicas originales, con pérdida o disminución de su fertilidad, que provoca la reducción de la capacidad actual o futura del suelo, para generar en términos de calidad y cantidad, bienes o servicios (García, 2013; Silva & Correa, 2009).

El impacto de la contaminación sobre la biodiversidad del suelo depende del tipo de contaminante y de la forma en que éste actúa sobre los organismos edáficos (Orgiazzi et al., 2016). Entre las sustancias tóxicas que provocan mayores efectos se encuentran: derrames de petróleo, crean una película que bloquea los intercambios de gases, de tal manera que provoca falta de aire y sofoca la biota del suelo de una manera no selectiva (Orgiazzi et al., 2016); los plaguicidas, que son persistentes, además de eliminar a grupos benéficos de microorganismos (Badii, & Landeros, 2015; Orgiazzi et al., 2016), y la alteración por metales pesados que es la más letal, ya que tienen la capacidad de bioacumularse, lo que genera grandes riesgos para la salud del ecosistema (Ngole-Jeme & Fantke, 2017). Este tipo de contaminación se absorbe fácilmente a través de las membranas biológicas por su elevada afinidad química a las proteínas, es de difícil degradación y por lo tanto dificulta su eliminación (Soto, Gutiérrez, Rey-León & González-Rojas, 2010), así mismo provoca disminución del número y la actividad de los microorganismos (Gholizadeh et al., 2015). Genera modificación directa en la actividad enzimática, ya que éstas se inactivan por la interacción de los metales con el centro activo (Martín, 2013).

La minería es una de las principales causas de acumulación de metales pesados en el suelo (Puga, Sosa, Lebgue, Quintana, & Campos, 2006). Se basa en la extracción de los recursos minerales de la corteza terrestre para ponerlos a disposición de la

industria de la transformación (Pardo & Salazar, 2013; Castilla & Herrera, 2014). En este proceso se generan relaves, que consisten en una mezcla de tierra, minerales, agua y roca que contienen altas concentraciones de químicos y metales pesados (Astete et al., 2009). Estos lodos contaminados son posteriormente colocados en forma de depósitos, en donde el material sólido se decanta. En estas áreas de relaves, se presentan graves problemas para el desarrollo de la cubierta vegetal, cambios en las propiedades físicas y químicas del suelo, ruptura de los ciclos biogeoquímicos, dificultad de enraizamiento para las plantas, baja capacidad de cambio, baja retención de agua (Gholizadeh et al., 2015; Puga et al., 2006). Estas alteraciones cambian la fisiografía de la zona y las características productivas del terreno, dando lugar a problemas ambientales, ecológicos y paisajísticos, que inician donde se ubica la operación minera y trasciende a los alrededores (Cantero et al., 2015).

## **2.2 ESTADO ACTUAL DE LA MINERIA.**

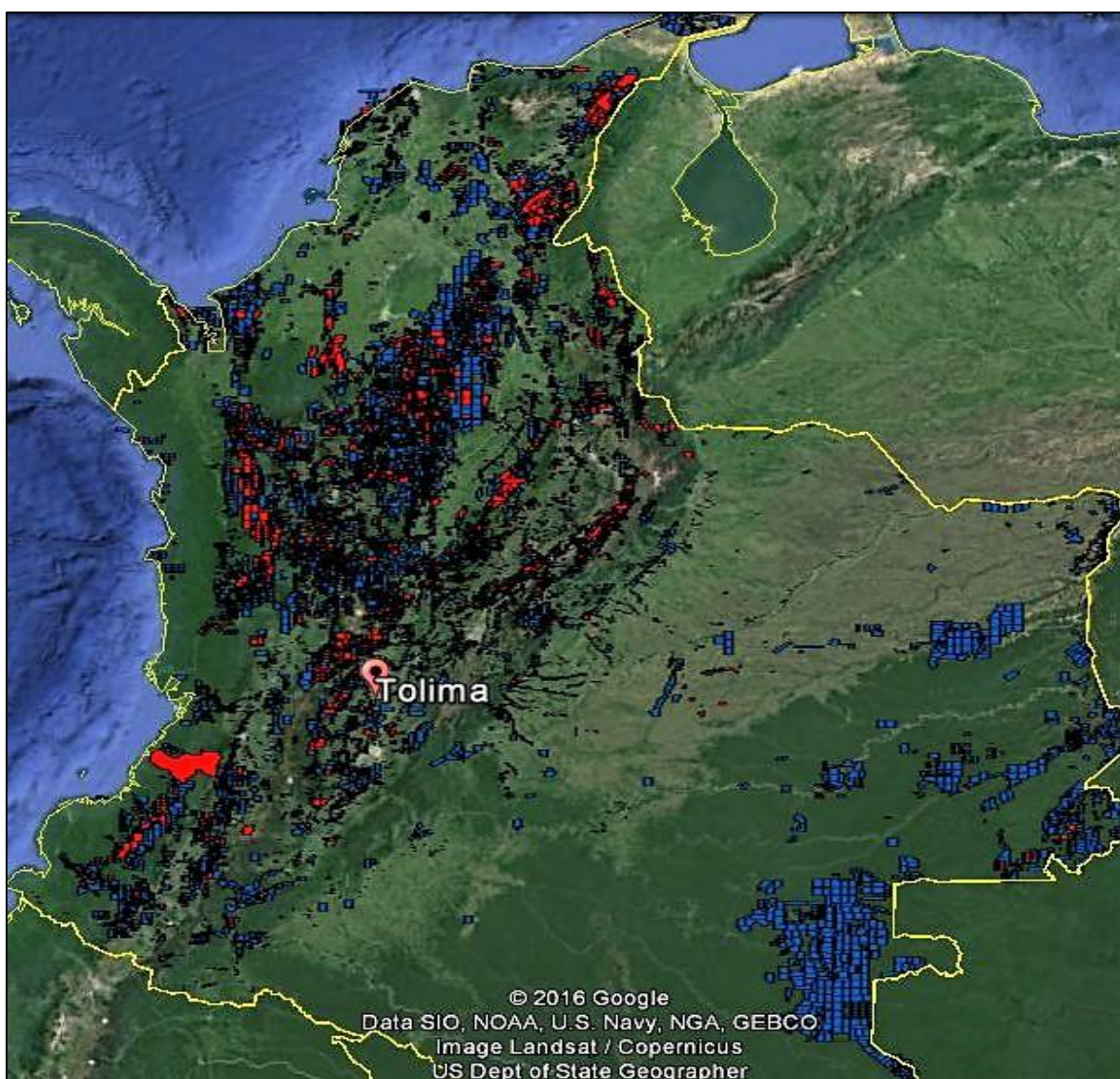
A nivel mundial, se ha presentado un aumento en el interés en la explotación de minerales, debido al incremento de los precios en los productos en mercados y al dinamismo que han tenido los flujos de inversión de las empresas mineras internacionales (Aristizábal, Ramírez, & Betancur, 2013; Cárdenas & Reina, 2008). América Latina no ha sido ajena a este fenómeno, algunos países de la región muestran un notable aporte del capital extranjero, como es el caso de Colombia, que durante el periodo 2007-2012, la inversión al sector minero superó los US 2.000 millones anuales (Escobar & Martínez, 2014; Pardo & Salazar, 2013).

La minería en Colombia ha ganado una mayor participación dentro de las actividades económicas del país durante los últimos años, entre 1990 y 2011, la producción de minerales se triplicó, al pasar de 31.7 a 99.9 millones de toneladas, adicionalmente, ésta creció a un promedio anual de 3.4% durante la década de los noventa, para luego acelerar su crecimiento a 7.7% entre 2000 y 2011 (Escobar & Martínez, 2014).



El 40% del territorio colombiano se encuentra con títulos mineros concedidos o solicitados por empresas multinacionales (Figura 1) para realizar proyectos de extracción de minerales e hidrocarburos (PeaceBrigades International, 2011). Con 10.158 títulos mineros vigentes en el país, de los cuales; 4.384 títulos son para la extracción de materiales para la construcción, 1.684 títulos donde se permite la exploración y extracción de carbón, 1.050 títulos para la minería de oro, 13 títulos para la explotación de níquel, entre otros (Escobar & Martínez, 2014).

**Figura 1.** Títulos mineros concedidos (rojo) y solicitados (azul) en Colombia.

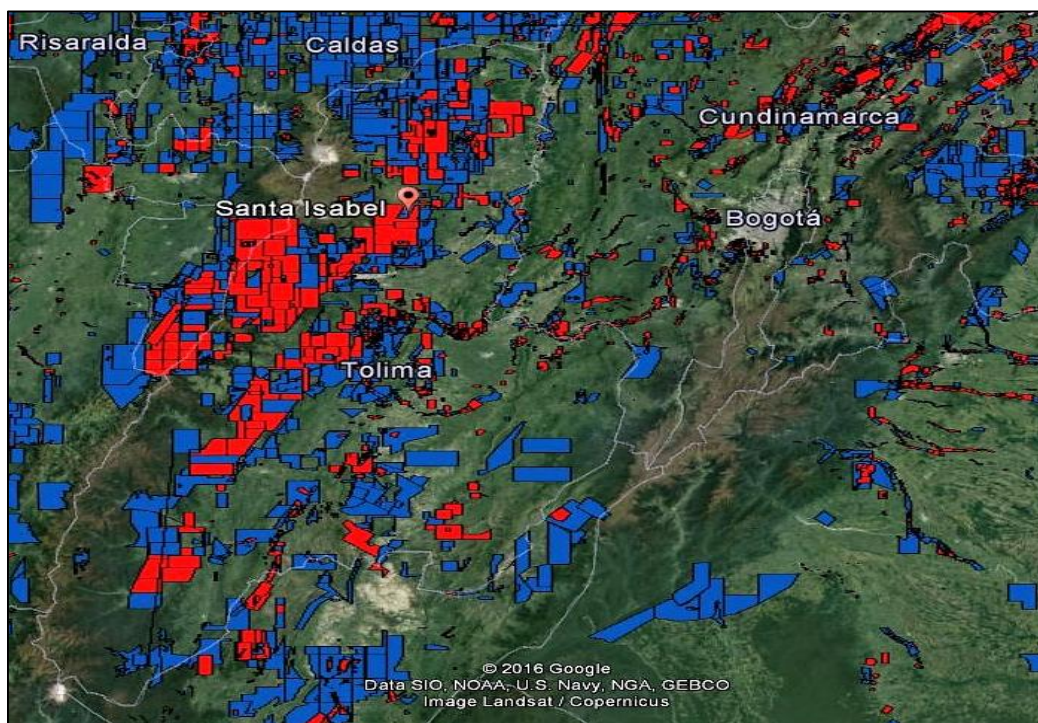


Fuente: (Google Earth, 2016; Tierra minada, 2014).

Se refleja la intención del gobierno de convertir el país en una potencia minera, a pesar de que las normas e instrumentos que regulan estas actividades no son lo suficientemente efectivas para proteger, resguardar y mantener de manera adecuada los recursos naturales renovables y los derechos fundamentales de los habitantes (Garay, 2013; PBI, 2011).

En el departamento del Tolima existen 559 títulos mineros que corresponden a 75 minas en exploración, 64 en construcción y 420 en explotación (Agencia Nacional de Minería, 2017). En cuanto a la solicitud de títulos mineros, existen 620 que abarcan: 5 solicitudes de autorizaciones temporales, 606 solicitudes de contratos de concesión, 7 solicitudes de licencias de exploración y 1 solicitud de licencia de explotación, 1 solicitud de licencia especial de materiales de construcción (Figura 2) (ANM, 2017).

**Figura 2.** Títulos mineros concedidos (rojo) y solicitados (azul) en el departamento del Tolima.



Fuente: (Google Earth, 2016; Tierra minada, 2014).

La producción de materiales de construcción proviene principalmente de los municipios de Ibagué, Guamo, Chaparral, Coello, Espinal, Carmen de Apicalá, Melgar, San Luis y Ortega. Las calizas se obtienen de San Luis, Valle de San Juan, Ibagué y Ambalema. El oro y plata proceden de los municipios de Líbano, Santa Isabel, Valle de San Juan y Ataco (ANM, 2017).

### 2.3 PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS DEL SUELO.

El suelo es un sistema vivo, heterogéneo y dinámico que incluye componentes físicos, químicos, biológicos y sus interacciones. Por lo tanto, para evaluar su calidad resulta necesario la medición y descripción de sus propiedades, con el objetivo de mejorar o conservar la fertilidad del suelo (Vallejo-Quintero, 2013). El Instituto Geográfico Agustín Codazzi (2014) establece unos niveles críticos que constituyen una pauta, para determinar la condición fisicoquímica del suelo, que permite corregir los parámetros que se encuentran desfavorables (Tabla 1).

**Tabla 1.** Niveles críticos generales para el diagnóstico de la fertilidad fisicoquímica del suelo.

PARÁMETROS	NIVELES CRÍTICOS		
	BAJO	MEDIO	ALTO
<b>D. apa (g/cc)</b>	< 1,0	1 – 1,4	1,4
<b>MO %</b>	< 1,5	1,5 – 2,8	2,8
<b>Ca cmol<sub>c</sub>/Kg<sup>-1</sup></b>	< 3	3 - 6	> 6
<b>Mg cmol<sub>c</sub>/Kg<sup>-1</sup></b>	< 1	1 - 2,5	> 2,5
<b>K cmol<sub>c</sub>/Kg<sup>-1</sup></b>	< 0,2	0,2 - 0,6	> 0,6
<b>Na</b>	< 0,1	0,1 - 0,5	> 0,5
<b>P Total mg/kg<sup>-1</sup></b>	< 15	15 - 40	> 40
<b>S (ppm)</b>	< 8	8 - 16	> 16
<b>Al+H</b>	< 0,4	0,4 – 0,9	>0,9
<b>CICE</b>	<10	10 - 20	>20

**D. apa:** densidad aparente, **MO:** materia orgánica, **CICE:** capacidad de intercambio catiónico, **Al+H:** acidez intercambiable. Fuente: (IGAC, 2014)

## 2.4 METALES PESADOS ASOCIADOS A LOS SUELOS.

Los metales pesados son aquellos que presentan una densidad mayor o igual a 5 g/cm<sup>3</sup> (Cañizares-Villanueva, 2000; Pérez, 2012). Algunos autores han utilizado el término elementos traza, para definir todos los que son tóxicos en los humanos y son usados en la industria (Pérez, 2012; Zúñiga, 1999). Por tanto, se seguirá manteniendo el término metales pesados de acuerdo con la definición antes mencionada además de incorporar los elementos que no son metales como el Arsénico (As), pero que pueden ser tóxicos.

Las principales concentraciones anómalas de metales pesados en suelos, procede mayoritariamente de la extracción de recursos minerales, éstos pueden tardar miles de años en reducir su volumen, ya que no son degradables, se acumulan en los tejidos de los organismos vivos y aumentan a medida que pasan de niveles tróficos (Ali, Khan & Sajad, 2013). Aunque la presencia en los suelos también puede deberse a fuentes naturales que dependen de la geodisponibilidad, la cual hace referencia a la porción de un elemento o compuesto químico que se libera en la superficie o cerca de ella, por procesos mecánicos, químicos o biológicos, tales como el desgaste de minerales, la erosión y la actividad volcánica. Estos son insignificantes en comparación con las derivadas de las acciones antropogénicas (Serrato, Díaz, Sarría, Brotóns, & López, 2010).

Entre los metales pesados necesarios en pequeñas cantidades para el crecimiento de los organismos se encuentran el B, Co, Cr, Cu, Mo, Mn, Ni, Se y Zn, sin embargo, estos pueden llegar a ser tóxicos una vez que sobrepasan el umbral. En los elementos no esenciales están: Ba, Cd, Hg, Pb, Sb, Bi con función biológica desconocida, altamente tóxicos, persistentes y con acumulación progresiva (Ali et al., 2013).

La contaminación por los metales pesados se da cuando el contenido en los mismos excede considerablemente los valores habituales (Serrato et al., 2010). Bowie y Thornton, (1985) establecen una serie de concentraciones consideradas normales

(CN) en suelos y para aquellos con valores anómalos (CA), independiente del tipo de suelo. De igual forma, la Compañía tecnológica de Saneamiento de São Paulo CETESB (2014), contempla tres categorías de clasificación del suelo: el valor de referencia de calidad (VR) que es catalogado como un suelo natural; el valor de prevención (VP) para posibles cambios perjudiciales y el valor de intervención (VI), que indica el límite de la contaminación en el que hay riesgos potenciales, directos o indirectos, para la salud humana lo que establece la necesidad de intervención (Tabla 2).

**Tabla 2.** Niveles de referencia para metales pesados en suelos. CN y VR son normales o de referencia, CA, anormales, VP de prevención y VI de intervención.

Elemento	Bowie & Thornton (1985)		CETESB (2014)		
	CN (ppm)	CA (ppm)	VR (mg.kg <sup>-1</sup> )	VP (mg.kg <sup>-1</sup> )	VI (mg.kg <sup>-1</sup> )
<b>As</b>	< 5 – 40	>2.500	3,5	15	150
<b>Cd</b>	< 1 – 2	>30	< 0,5	1,3	160
<b>Cu</b>	60	>2.000	35	60	10000
<b>Ni</b>	2-100	>8.000	13	30	3800
<b>Pb</b>	10-150	≥10.000	17	72	4400
<b>Zn</b>	25-200	≥10.000	60	86	10000
<b>Cr</b>	–	–	40	75	400
<b>Co</b>	–	–	13	25	90
<b>Se</b>	<1-2	500	0,25	1,2	640
<b>Hg</b>	–	–	0,05	0,5	7
<b>V</b>	–	–	275	–	1000

Fuente: (Bowie & Thornton, 1985; CESTEB, 2014).

## 2.5 IMPORTANCIA DE LOS MICROORGANISMO EN EL SUELO.

El suelo es un componente vital de los ecosistemas terrestres, mantiene funciones ecológicas esenciales como la producción primaria y la descomposición (Kapusta & Sobczyk, 2015). En él se albergan diversas comunidades microbianas las cuales son fundamentales en la transformación de residuos y en la descomposición de la materia orgánica, ya que contribuyen en el reciclaje de los nutrientes y el flujo de energía, producen hormonas vegetales, fijan el nitrógeno atmosférico, esenciales para el crecimiento de las plantas (Sipilä, Yrjälä, Alakukku, & Palojärvi, 2012; Li et al., 2016; Liu et al., 2015;) y como consecuencia de estos procesos tiene una influencia directa en la fertilidad y productividad de los suelos, permiten la supresión de algunas enfermedades para las plantas, así como la degradación de diferentes plaguicidas (Ávila & Cruz, 2008; Moratto, Martínez, Valencia & Sánchez, 2005; Pérez, 2008).

La microbiota cumple también un papel importante en la solubilización de minerales, en el caso del fósforo (P), es realizada por los microorganismos solubilizadores de fosfato (MSF) (Park, Bolan, Megharaj & Naidu, 2011), que transforman las formas insolubles del P en formas solubles, a través de procesos como: producción de ácidos orgánicos, fosfatasa, quelación e intercambio de reacciones, se genera P disponible para las necesidades de las plantas y del suelo (Beltrán, 2014; Rico, 2009; Park et al., 2011).

El P es uno de los elementos indispensables en el suelo, ya que forma parte esencial de las moléculas orgánicas para el desarrollo de los seres vivos (García, Lovaisa, & Ulla, 2015; Vargas, 2012). Es constituyente de los ácidos nucleicos, presenta características energéticas, permite procesos de respiración, fotosíntesis y en las plantas ayuda a la activación de intermediarios energéticos. Los ésteres de fosfato actúan en general como portadores energéticos en varias rutas metabólicas y como precursores de los ácidos nucleicos, mientras que los fosfolípidos juegan un papel importante en la integridad y función de las membranas celulares (García et al., 2015; Vargas, 2012).

Diversos investigadores han reportado la capacidad que tienen algunos microorganismos para solubilizar compuestos fosfatados inorgánicos insolubles como el fosfato tricálcico, fosfato dicálcico, hidroxapatita y roca fosfato (Rico, 2009). Entre las bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF) se destacan los géneros: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aerobacter*, *Flavobacterium*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Klebsiella*, *Rhodobacter* (Rico, 2009; Patiño, 2010; Pérez, 2008; Vargas, 2012), en cuanto a los hongos se encuentran principalmente, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, y *Fusarium* (Patiño, 2010, Pérez, 2008, Vargas, 2012).

Algunas BSF también tienen potencial para remediar suelos contaminados con metales pesados, ejemplo de ello son *Pantoea* sp y *Enterobacter* sp, que pueden utilizarse para mejorar la eficacia de la fitorremediación, ya que promueven el crecimiento de las plantas, además de aumentar la producción de biomasa y la absorción de contaminantes en suelos degradados (Park et al., 2011).

## **2.6 MÉTODOS BIOLÓGICOS USADOS EN LA EVALUACIÓN DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS DEL SUELO EN ÁREAS DEGRADAS.**

El estudio de las comunidades microbianas, resulta de gran utilidad para conocer los cambios que ocurren en el suelo tras una determinada modificación, como la adición de materiales orgánicos, presencia de un contaminante, sequía, quemas entre otros (Bajsa, 2008). Los microorganismos son uno de los indicadores más eficientes, ya que responden rápidamente a las alteraciones que se producen en el ecosistema (Bajsa, 2008; Sipilä et al., 2012; Li et al., 2016). De igual manera, los patrones de distribución espacial y temporal de los microorganismos se relacionan con factores como: temperatura del suelo, pH, salinidad, disponibilidad de agua y nutrientes (Latorre, 2007).

Los parámetros biológicos como: la respiración edáfica, la biomasa microbiana, la composición de las comunidades, grupos funcionales de la microflora, y las

actividades enzimáticas, son una herramienta clave para establecer la calidad de un suelo, propiedades dependientes de las prácticas de manejo y las alteraciones ambientales (Torres & Lizarazo, 2005).

Según Moreira y Siqueira (2006), la respiración edáfica, representa la oxidación de la materia orgánica hasta la formación del CO<sub>2</sub> por organismos aeróbicos del suelo, que utilizan O<sub>2</sub> como aceptor final de electrones. Al igual que otras actividades metabólicas, depende del estado fisiológico de las células y se encuentra mediada por diferentes factores fisicoquímicos en el suelo (Alef, 1993).

La biomasa microbiana del suelo, constituye la parte viviente de la materia orgánica, sin considerar las raíces de las plantas ni organismos de tamaño mayor de  $5 \times 10^3 \mu\text{m}$ , juega un papel de importancia como agente de transformación de residuos, contribuye a la estabilización de agregados del suelo además de ser la reserva lábil de N, P, S (Moreira & Siqueira, 2006). Este es un buen indicador del nivel de toxicidad de agentes contaminantes (Vallejo-Quintero, 2013).

Anderson & Domsch (1990), determinaron el cociente metabólico ( $q\text{CO}_2$ ), que expresa la tasa de respiración por unidad de la biomasa microbiana del suelo. Es una medida indicadora de modificaciones en procesos edáficos puesto que refleja la energía de mantenimiento de los microorganismos. Puede contribuir al entendimiento de los cambios químicos y biológicos que ocurren bajo diferentes prácticas, debido a que provee una medida específica de la actividad metabólica que varía en función de la composición y estado fisiológico de la comunidad microbiana, de la disponibilidad de sustratos y de diferentes factores abióticos (Ferrerías et al., 2009).

La abundancia microbiana, disminuye en respuesta a perturbaciones o estrés ambiental. Las poblaciones sobrevivientes poseen propiedades específicas que le permiten persistir dentro de las zonas perturbadas (García, 2013). Puede ser evaluada mediante los sistemas de enumeración directa, como siembra en placa, microscopia por epifluorescencia, determinación del número más probable (Corral-



Lugo et al., 2012; Latorre, 2007). Las ventajas de este tipo de metodologías clásicas, es que los procedimientos son ampliamente utilizados, debido a su facilidad de implementación y medición en el laboratorio (Ávila & Cruz, 2008).

El recuento en placa es comúnmente empleado para la enumeración de microorganismos viables, especialmente para bacterias y hongos (Latorre, 2007; Ávila & Cruz, 2008). Las colonias que crecen sobre los medios de cultivo dan un estimado de la cantidad de microorganismos presentes en una muestra, esto se realiza por medio del recuento de las unidades formadoras de colonia (UFC), es el término que debe utilizarse para reportar el número de colonias en placa, en donde cada microorganismo en un medio de cultivo da origen a una colonia (Latorre, 2007). Esta técnica permite aislar grupos específicos en condiciones de cultivo, además, se logran obtener cultivos puros, que pueden usarse para análisis posteriores, como taxonómicos o moleculares (Ávila & Cruz, 2008). Sin embargo, una de las limitaciones en esta metodología, es que solamente del 1 al 10% del total de la microflora del suelo es recuperada (Ávila & Cruz, 2008; Moreira & Siqueira, 2006).

En las últimas décadas, el desarrollo de herramientas de biología molecular ha jugado un papel fundamental en la taxonomía moderna de los hongos y bacterias del suelo. Esta herramienta ha mejorado el nivel de conocimiento sobre la biología de los microorganismos y sus relaciones filogenéticas con otros organismos (Álvarez, 2012). La técnica molecular más empleada para la detección de microorganismos, es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), cuyo objetivo es obtener un gran número de copias a partir de un fragmento de ADN. Luego se realiza la secuenciación, y se compara con bases de datos de microorganismos reportados, lo que permite encontrar similitud, y con ello determinar que género o especie corresponde (Garzón, 2015).

La descripción de los microorganismos presentes en muestras de suelo, ha mostrado grandes avances, gracias a la utilización de la información que proporcionan los genes que codifican para ADN ribosómico (Nogales, 2005). En el caso de las

eucariotas el ribosoma posee dos subunidades de ADN Ribosomal (rDNA) con diferentes gradientes de sedimentación: 40S y 60S, el cual está codificado por tres genes, la subunidad grande (28S), la subunidad pequeña (18S) y el gen 5.8S, separados por las regiones ITS (Rodríguez, 2007). El estudio molecular a base del análisis de los ITS por medio secuenciación, se ha usado ampliamente como un marcador para diferenciar entre especies fúngicas (López, 2015). Por el hecho de ser intrones, es un área de alta variabilidad al no tener una función biológica aparente y por esto acumula mutaciones neutrales a lo largo del tiempo, lo que permite diferenciar individuos relacionados genéticamente. Ha sido muy útil para estudios de sistemática molecular al nivel de especie (López, 2015; Rodríguez, 2007).

La macromolécula más utilizada en estudios de filogenia y taxonomía bacteriana es (ARNr) 16S. La cual presenta una serie de características, que fundamentan su empleo como herramienta clave:

- Se trata de una molécula muy antigua, presente en todas las bacterias actuales.
- Su estructura y función han permanecido constantes durante un tiempo muy prolongado, de modo que las alteraciones en la secuencia reflejan probablemente cambios aleatorios.
- Los cambios ocurren de manera suficientemente lenta, como para aportar información acerca de todos los procariotas y junto con las variaciones en los ARNr 18S, a lo largo de toda la escala evolutiva. Los ARNr SSU contienen, sin embargo, suficiente variabilidad para diferenciar no sólo los organismos más alejados, sino también los más próximos.
- El tamaño relativamente largo de los ARNr 16S (1.500 nucleotidos), minimiza las fluctuaciones estadísticas.
- La conservación en estructura secundaria puede servir de ayuda en las comparaciones, que aportan una base para el alineamiento preciso.
- Resulta relativamente fácil secuenciar los ARNr 16S existen bases de datos amplias, en continuo crecimiento (Rodicio & Mendoza, 2004; Rodallega, 2015)

## 2.7 MICROORGANISMOS COMO INDICADORES DE LA CALIDAD DEL SUELO, EN ÁREAS MINERAS.

El suelo es uno de los ecosistemas más complejos, ya que este ambiente aloja una alta diversidad de comunidades, 1 g de suelo puede contener miles de millones de especies diferentes de bacterias, arqueas y eucariotas (Hernández-León, Velázquez-Sepúlveda, Orozco-Mosqueda & Santoyo, 2010). La caracterización de la diversidad filogenética de la microbiota edáfica y sus respuestas al cambio global son una contribución significativa a la comprensión de estos ecosistemas (Mocali & Benedetti, 2010).

Dentro de los grupos microbianos más afectados por las perturbaciones se encuentran las comunidades de bacterias y hongos, se conoce que la minería puede provocar cambios en su composición, abundancia y actividad (Liao & Xie, 2007). Además, la estimación de estas propiedades biológicas del suelo, puede resultar útil tanto para detectar posibles procesos degradativos, que no podrían revelarse con métodos tradicionales, como para el seguimiento de la recuperación de un suelo degradado (García, 2013).

A nivel mundial, diversos estudios son realizados sobre la comunidad microbiana en minas de: carbón, oro, hierro, plomo, azufre y zinc (Xiao, Xie & Liu, 2009; Schimann et al., 2012; Mastrogianni et al., 2014; Wei, Yu, & Zhang, 2015), para el caso de áreas de minería de oro se ha encontrado que las actividades microbiológicas presentan una reducción significativa (Schimann et al., 2012; Tomczyk-Żak et al., 2013; Díaz et al., 2013), ejemplo de ello es la respiración inducida por sustrato (RI), que fue significativamente menor en las minas de oro que en los bosques, esta disminución caracteriza una reducción en la abundancia de la comunidad heterotrófica global, y por lo tanto una pérdida de la capacidad biótica de los suelos (Schimann et al., 2012).

En los residuos de minas de oro y plata, se evaluaron la composición de comunidades microbianas en dos conjuntos distintos de muestras de sedimentos recogidos cerca

a los relaves. Las identificaciones en uno de los sedimentos estaban estrechamente relacionados con bacterias acidófilas de los taxones *Acidobacterium* (18%), *Acidomicrobineae* (14%) y *Leptospirillum* (10%). Y en el otro sedimento, con *Methylobacterium* (79%) y *Ralstonia* (19%), bacterias bien conocidas por ser resistentes a los metales. Se observó que las condiciones geoquímicas extremas afectaron la distribución de la comunidad microbiana, incluso en una pequeña escala espacial (Kwon et al., 2015).

En Colombia, pocos son los estudios donde se ha determinado el impacto de la minería sobre el ambiente, entre ellos se encuentra el realizado por Rojas & Dussán (2008), quienes evaluaron la diversidad microbiana en el suelo asociado a las actividades en una mina de carbón en el Cerrejón, donde las condiciones físicas y químicas, como la comunidad microbiana del suelo cambiaron después de la extracción de los minerales, comportamiento que fue afianzado por los resultados metagenómicos, donde se observó que la diversidad de microorganismos cambia a medida que el suelo es transformado.

López (2015), estudió la diversidad bacteriana presente en efluentes residuales de procesos de cianuración en plantas de beneficio de oro artesanal y una planta industrializada, ubicadas en el municipio de Marmato (Caldas, Colombia). El análisis de la diversidad muestra que las comunidades bacterianas pertenecieron a los filos Firmicutes, Actinobacteria y Proteobacteria, los medios de cultivo dependientes permitieron aislar trece bacterias, que se les demostró actividad positiva, las cuales disminuyen la concentración de cianuro con respecto al control. Este trabajo permitió caracterizar patrones de diversidad bacteriana en lugares contaminados con cianuro y sugiere que la presencia de estos microorganismos en dichos ambientes tiene un papel en la degradación biológica de estos compuestos.

García (2016), evaluó las comunidades bacterianas asociadas a depósitos calcáreos en una mina de piedra caliza, situadas en Antioquia, Colombia. Las bacterias se aislaron en medios selectivos, fueron determinadas mediante la secuenciación de

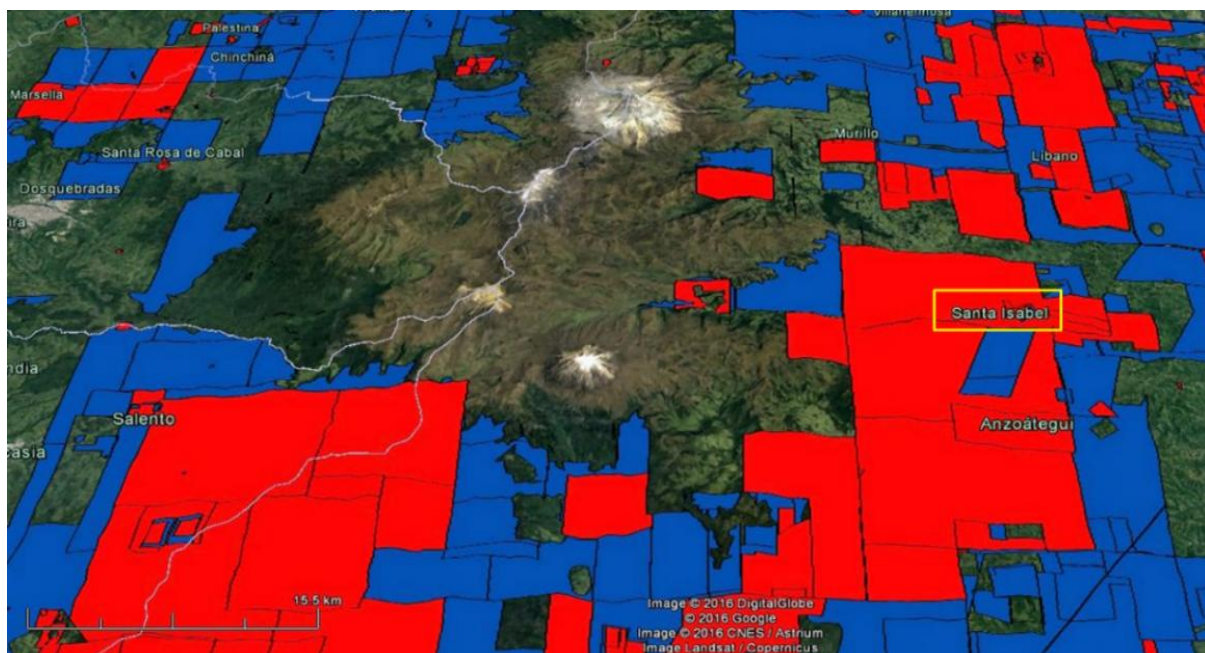
genes 16S rRNA, se agruparon en dos filos: Proteobacteria y Firmicutes. Dentro de estos, siete géneros fueron capaces de precipitar carbonatos de calcio: *Lysinibacillus*, *Bacillus*, *Strenotrophomonas*, *Brevibacillus*, *Methylobacterium*, *Aeromicrobium* y *Acinetobacter*. Destacan la capacidad de estos aislados para precipitar carbonato de calcio.

### 3 METODOLOGÍA

#### 3.1 ÁREA DE ESTUDIO.

El área de estudio se encuentra ubicada en el municipio de Santa Isabel, al norte del departamento del Tolima, en la parte alta de la Cordillera Central Colombiana en límites con el Parque Nacional Natural los Nevados (PNNN). La región es considerada como bosque montano bajo, según Holdridge (1967), con una altitud entre 1877- 1953 m.s.n.m. con precipitaciones de 1.000 mm a 1.600 mm y una temperatura media anual entre 17° - 24°C, con presencia de vegetación ribereña y rastrojo alto (Yepes, 2012). La zona cuenta con proyectos mineros (Figura 3), puesto que presenta un alto geopotencial por la presencia de elementos como oro, plata, cuarzo y materiales de construcción para piedra de enchape (Yepes, 2012).

**Figura 3.** Títulos mineros concedidos (rojo) y solicitados (azul) en zonas aledañas al área de estudio.



Fuente: (Google Earth, 2016; Tierra minada, 2014).

Las muestras fueron colectadas en un área de minería de oro localizada a 04°43'N 75°04'W, con explotación subterránea de filón, y labores de extracción desde el año 1990 y próxima a cerrar su actividad. Para la producción de oro en la mina de Santa Isabel, se lleva a cabo una conminución (trituración y molienda), donde se fragmenta y extrae el material con Xantato Amílico de potasio, Ditioposfato, Metasilicato de Sodio y Aerofroth, para liberar los elementos metálicos. Luego, se procede a la lixiviación con cianuro de sodio, que disuelve el oro contenido en el mineral. Posteriormente, se realiza la recuperación del metal de la solución de cianuro de oro (AuCn), con la posterior adición de polvo de zinc, que permite precipitar el oro. Luego es sometido a operaciones de secado y fundición, y de esta manera se obtienen como producto final los lingotes de oro.

### 3.2 COLECTA DE LAS MUESTRAS.

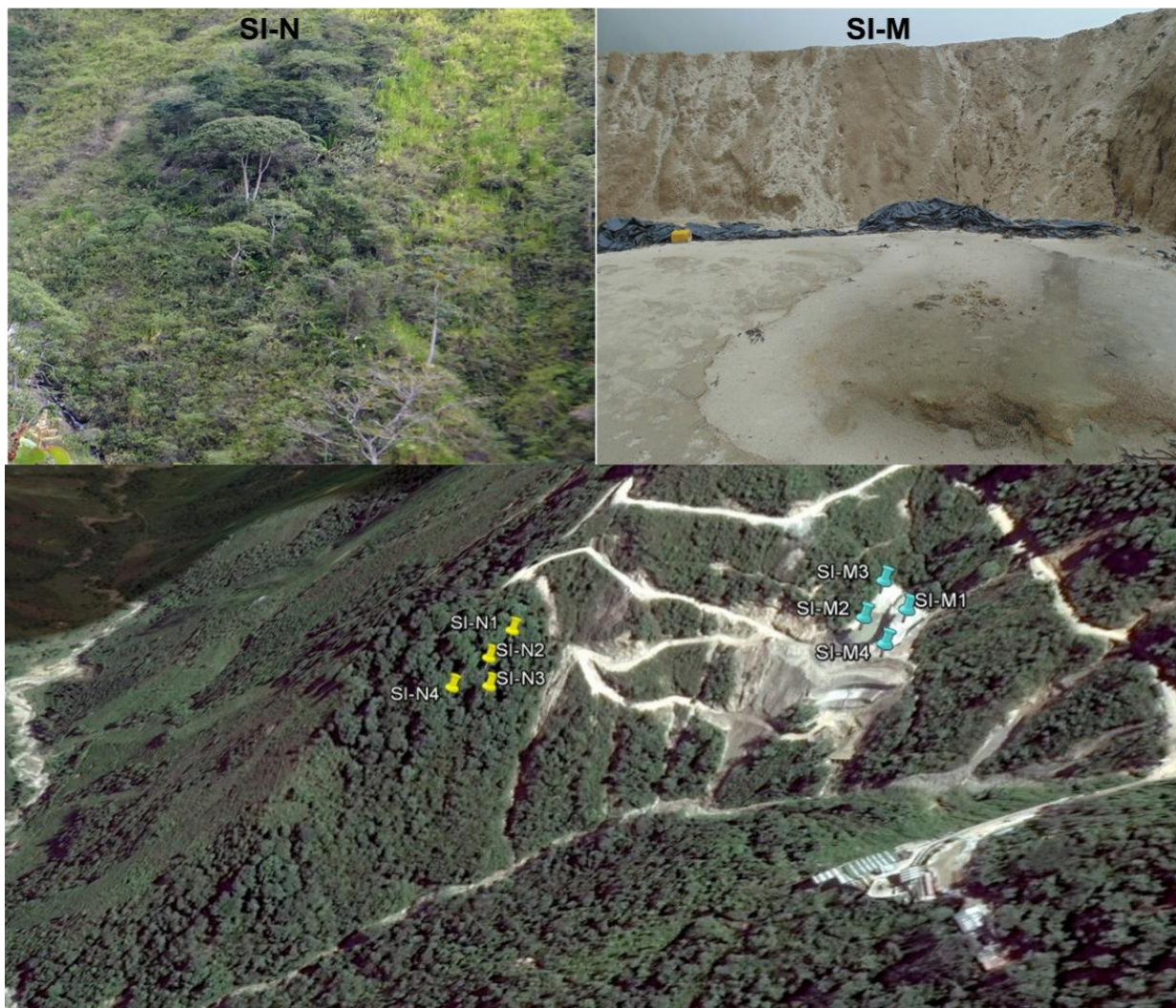
Se evaluaron dos zonas aledañas a la mina, localizadas a una distancia 281,56 m entre ellas. Un área de relave y sin vegetación (**SI-M**) y la otra adyacente, con vegetación nativa y sin ningún tipo de depósito mineros (**SI-N**) (Figura 4). En cada área fueron seleccionados cuatro puntos de muestreo, obtenidos a partir de la mezcla de cinco submuestras. El suelo se colectó a una profundidad entre 10 y 20 cm, con un barreno Pressler. Las muestras se guardaron en bolsas plásticas y fueron llevadas al laboratorio de Ecología microbiana (ECOMIB) de la Universidad del Tolima, en cajas de icopor y refrigeradas a 4°C hasta su análisis.

### 3.3 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS DE LAS MUESTRAS DEL SUELO DE LAS ÁREAS SI-M Y SI-N.

Los análisis realizados fueron: pH por el método potenciométrico; materia orgánica por el método de Walkley - Black; P disponible por Bray II; S por extracción con fosfato de calcio monobásico y determinación por colorimetría; acidez intercambiable mediante KCl 1 N; bases de cambio por medio de absorción atómica: acetato de amonio 1M; capacidad de intercambio catiónico efectiva (sumatoria de bases);

elementos menores por absorción atómica : Olsen modificado, B por agua caliente Azometino H y la conductividad eléctrica por el método conductimétrico, estos parámetros se evaluaron en el laboratorio de servicios agropecuarios y laboratorio de suelos “Agroanálisis”. Los metales pesados As, Cd, Cr, Co, Pb, Zn, Cu, V, Hg y Ni, fueron identificados por fluorescencia de rayos X en el laboratorio Alpha 1.

**Figura 4.** Área de estudio donde se observan, las zonas de muestreo de depósitos mineros (SI-M) y con vegetación nativa (SI-N) y el mapa del área de estudio donde se indican las zonas y puntos evaluados.



Fuente: (Google Earth, 2016).



### 3.4 PARÁMETROS BIOLÓGICOS

**3.4.1** Densidad microbiana. Se determinó por el método de dilución seriada, para ello se colocaron 10 g de cada muestra de suelo en un frasco de vidrio con 90 ml de solución salina estéril (0,85 %), luego se agitó durante 15 min, a 150 rpm y se transfirió 1 ml de alícuota a tubos que contenían 9 ml de el mismo diluyente, proceso que se realizó sucesivamente hasta obtener la dilución deseada. Posteriormente, se sembró por superficie alícuotas de 0,1 ml de cada dilución por triplicado, en medios de cultivo específicos (Brock, 1978).

El conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) se efectuó por triplicado para cada punto de muestreo. La siembra de bacterias se realizó en agar nutritivo (peptona 5 g, extracto de carne 3 g, extracto de levadura 1 g, glucosa 5 g, agua destilada 1000 ml, agar 15 g, pH 6,8) (Wollum, 1982); los hongos, en papa dextrosa agar (extracto de papa 4.0 g, glucosa 20 g agar 15 g) y los microorganismos solubilizadores de fosfato (MSF) en medio Pikovskaya (glucosa 10 g,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)$  5 g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.5 g, NaCl 0.2 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 g, KCl 0.2 g, extracto de levadura 0.5 g,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.002 g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.002 g, purpura de bromocresol 0.1 g, agar 15 g, agua destilada 1000 ml, el fosfato  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)$  fue autoclavado por separado) (Patiño & Sánchez de Prager, 2012). Las UFC fueron incubadas a 28°C y contadas al segundo, tercero y quinto día, para bacterias, MSF y hongos respectivamente.

**3.4.2** Respiración basal e inducida. La estimación de la respiración basal (RB) se determinó de acuerdo al método descrito por Alef (1995). Las muestras de suelo fueron llevadas a 40% de capacidad de campo, se pesaron 20 g los cuales fueron colocados en frascos herméticos, junto con frascos de vidrio que contenían 10 ml de NaOH (0,5 M), incubados en la oscuridad a 28°C durante 3 días. Después de este período, el  $\text{CO}_2$  respirado fue atrapado por el NaOH, y después de la incubación el  $\text{CO}_2$  capturado fue precipitado como  $\text{BaCO}_3$ , al adicionar 5 ml de  $\text{BaCl}_2$  (0,5 M). El NaOH sin reaccionar se valoró con HCl (0,5 M) en presencia del indicador de fenolftaleína 0.1%. La cuantificación de la respiración inducida por sustrato (RI) se

determinó de la misma manera que RB, pero con la adición de glucosa (0,5%) en cada muestra, antes de la incubación (Alef, 1995; Dos Santos et al., 2015). La RB como la RI fueron medidas por triplicado y expresadas en  $\text{mg CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ suelo día}^{-1}$

**3.4.3** Carbono de la biomasa microbiana (CBM). Se determinó por el método de fumigación-extracción (da Silva, de Azevedo & De-Polli, 2007; Vance, Brookes, & Jenkinson, 1987). El suelo fue tamizado y llevado a 40% de capacidad de campo, posteriormente 20 g del suelo fueron colocados en frascos de vidrio, por cada punto de muestreo por triplicado. Los suelos a excepción del control, se fumigaron con cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ ). Se incubó por 24 horas, en oscuridad a una temperatura de  $28^\circ\text{C}$ . Al término de la incubación, el  $\text{CHCl}_3$  de los suelos fumigados se dejó evaporar. Se agregó 50 ml de  $\text{K}_2\text{SO}_4$  (0,5 M) a cada recipiente, fue agitado durante 30 minutos y se descartó durante 30 minutos. El contenido del carbono se determinó por oxidación del dicromato y titulación por triplicado con sulfato ferroso amoniacal (0,033 N). El CMB es expresado mediante  $\text{mg C Kg}^{-1} \text{ suelo}$ .

**3.4.4** Cociente metabólico ( $q\text{CO}_2$ ). Se calculó el  $q\text{CO}_2$ , mediante la relación de RB con CBM, de acuerdo con la siguiente ecuación (Anderson & Domsch, 1990):

$$q\text{CO}_2 = (\mu\text{g C-CO}_2 \text{ RB h}^{-1} \times \mu\text{g CBM}) \times 10^3$$

### **3.5 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE MSF.**

**3.5.1** Aislamiento de cepas. Se seleccionaron para la identificación molecular, las cepas de MSF obtenidas del suelo del área de relave (SI-M) que presentaron la mayor actividad de solubilización de fosfato. Los aislamientos obtenidos se purificaron por resiembras en el medio y se evaluaron a los cinco días después de sembrados (Patiño & Sánchez de Prager, 2012). Fue calculado el índice de solubilización (IS) mediante la fórmula descrita a continuación (Sánchez, 2011):

$$\text{IS} = \frac{\text{Diámetro halo} + \text{Diámetro de colonia}}{\text{Diámetro colonia}}$$

**3.5.2 Extracción de ADN.** Para la extracción del ADN de bacterias, las cepas se repicaron en BHI y se incubaron a 30°C por 24 horas, alícuotas de 1 ml se centrifugaron a 7400 rpm por 10 min a 4°C; posteriormente se descartó el sobrenadante y el pellet fue colocado en 50 µl de sodio dodecil sulfato (SDS) al 10% (p/v) y 50 µl de tampón de lisis (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM EDTA pH 8,0, 1% (p/v) SDS, 50 mM NaCl), y se dejó en incubación a 37°C por 30 min. Seguidamente, fue adicionado 200 µl de fenol, se invirtió el tubo por 30 s y se centrifugó a 12000 rpm por 10 min a 4°C. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo, al cual se le adicionó un volumen igual de cloroformo, se homogenizó y centrifugó nuevamente. Se tomó la parte superficial en un nuevo tubo y se adicionó un volumen de 2,5 de etanol absoluto frío, fue mezclado por inversión y centrifugado a 12000 rpm por 10 min a 4°C, se dejó por 24 horas en el refrigerador. Luego, se descartó el etanol absoluto y se adicionó etanol al 70%, fue centrifugado a 12000 rpm por 10 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se permitió su completa evaporación. Finalmente, se suspendió el pellet de ADN en agua estéril, y se llevó a incubación a 37°C por 30 minutos (López & Mejía, 2012).

La extracción del ADN de los hongos se realizó en medio PDA a 28°C. El micelio fue tomado cuando presento una buena cantidad en la caja de Petri, se raspó superficialmente y se procedió a macerar con nitrógeno líquido, fue adicionado 1.5 ml del tampón de extracción (SDS 1%, EDTA 25 mM, Tris- HCl pH 8,0 200 mM, NaCl 250 Mm). La mezcla del micelio y el tampón, se colocó en tubos eppendorf a 60°C por 30 min, fue centrifugado a 10.000 rpm por 10 min. Se adicionó 600 µl del sobrenadante a un nuevo tubo y se agregó la misma cantidad de Fenol: Cloroformo 1:1, seguido de centrifugación. Luego, se le añadió un volumen igual de Cloroformo: alcohol isoamilico (24:1) y después de centrifugar, se tomó el sobrenadante y se realizaron dos lavados con 1.000 µl de etanol al 80%, nuevamente se centrifugó y se descartó el sobrenadante. El pellet fue suspendido en 25 µl de agua estéril y se almacenó a 20°C hasta su utilización (Glienke-Blanco, Aguilar-Vildoso, Vieira, Barroso & Azevedo, 2002).

**3.5.3** Identificación molecular. Para las bacterias se amplificó la subunidad pequeña (16S) del ADNr, cada reacción se llevó a cabo en 25 µl con 12,5 µl Mix-Corpogen PCR-2X (20mM Tris-HCl pH 8.5, KCL 100mM, 400uM de DNTP, 3 mM de MgCl<sub>2</sub> y 0.1 unidad/µl de Taq DNA polimerasa), 1,25 µl ADN, 10,25 µl Agua ultrapura y 0,5 µl de cada uno de los cebadores U1 (CCAGCAGCCGCGGTAATACG) y U2 (ATCGG(C/T) TACCTTGTTACGACTTC) (Lu, Perng, Lee & Wan, 2000). Las amplificaciones fueron realizadas, en un termociclador VWR, bajo las siguientes condiciones: 94 ° C durante 5 min y 40 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 53°C durante 30 segundos y 72°C durante 50 segundos, y una extensión final a 72°C durante 10 minutos.

La región ITS fue amplificada con los cebadores universales ITS1 (5' TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3') y ITS4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3') (White, 1990). Cada reacción contenía: 12,5 µl Mix Corpogen, 9 µl Agua ultrapura, 1 µl ADN y 1,25 µl de cada uno de los cebadores. Las condiciones de amplificación fueron: 95°C por 2 minutos; 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 53°C, por 45 segundos, 72°C por 1 minuto, y una extensión final a 72°C por 7 minutos.

Los amplicones para hongos y bacterias fueron evaluados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (TBE 0.5X) en una cámara horizontal GENTECH a 100 V. Los geles fueron teñidos con EZ-visión y observados en un transiluminador UV Spectroline.

**3.5.4** Secuenciación. Los productos de PCR con un tamaño de 500- 600 pb para hongos y 1000-1200 pb para bacterias, se enviaron a secuenciar a Macrogen Inc. en Corea del Sur, mediante secuenciación unidireccional. Las secuencias obtenidas fueron editadas con Chromas, y comparadas en el Banco de datos del Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) a través del alineamiento de secuencias de tipo local (BLAST). Se empleó el programa MEGA versión 6 (Tamura, Stecher, Peterson, Filipiski & Kumar, 2013), para realizar el alineamiento, el cual se llevó a cabo con Muscle. La matriz generada se utilizó para el análisis filogenético basado en el método

de unión de vecinos (The Neighbor joining) ( Saitou & Nei, 1987) con el modelo de Jukes-Cantor para bacterias (Jukes & Cantor, 1969), y Kimura 2 para hongos (Kimura, 1980). El soporte interno del árbol filogenético se realizó por el método de bootstrap con 1000 repeticiones (Felsenstein, 1985).

### **3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

El análisis de los resultados se realizó con el programa INFOSTAT. Con los valores obtenidos durante el estudio se llevó a cabo la prueba de normalidad (Shapiro & Wilk, 1965). Para aquellos datos no paramétricos se les efectuó la prueba de Kruskal-Wallis, mientras que los datos que se encuentran dentro del supuesto de normalidad, se les aplicó el análisis de varianza (ANOVA) y la comparación entre tratamientos mediante la prueba de Tukey (Tukey, 1949). Se realizó análisis multivariado mediante el análisis de componentes principales (ACP), para observar la relación entre los parámetros biológicos y los fisicoquímicos.

## 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### 4.1 ANÁLISIS FISCOQUÍMICOS Y METALES PESADOS DE LAS ÁREAS DE ESTUDIO.

**4.1.1** Propiedades fisicoquímicas de las zonas de muestreo. Las dos áreas evaluadas mostraron diferencias significativas en los parámetros fisicoquímicos de pH, densidad aparente, Na, Ca, Mg, Al+H, Cu, Zn, Fe y Mn (Tabla 3). El área de relave se caracterizó por tener un pH neutro, concentración alta de S, bajos contenidos de P, Mg, Al+H y CIC. Mientras que el área nativa presentó un pH bajo con una disminución en los contenidos de Mg, Ca, K, S, P y capacidad de Intercambio catiónico (CICE) (Tabla 3). Estos parámetros fueron contrastados con los estándares propuestos para la fertilidad química del suelo por el Instituto Geográfico Agustín Codazzi (Tabla 2).

Es conveniente que todo tipo de suelo presente un valor alto de CIC, debido a que se encuentra asociado con la saturación de bases, lo que indica una gran capacidad para suministrar P, Mg y K a las plantas, pero en las áreas muestreadas tienen un bajo contenido de CIC (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2013) por lo tanto, estos suelos tienen un bajo potencial para almacenar estos nutrientes (Ross, 2004).

El Zn y Ca tienen una mayor concentración en el área SI-M en comparación con el área SI-N, probablemente a que el Zn es empleado para precipitar el oro después de la lixiviación. En cuanto a la cal ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) es usada comúnmente para mantener elevado el pH en el tanque de cianuración, lo que puede generar alcalinidad en áreas de minería (López, 2015). Además, en el proceso de extracción se utilizan reactivos como Xantato Amílico de Potasio, Ditiófosfato, Metasilicato de Sodio entre otros, que provocan incremento en el pH del suelo (Grupo Transmerquin, 2014). En minas con características similares, como la de oro en Marmato, Caldas, el pH, en las plantas

de extracción varió de 7.83 a 11.69, en estas condiciones es necesario mantener el pH con valores superiores de 7.0, para evitar la volatilización del cianuro en cianuro de sodio (HCN) (López, 2015).

**Tabla 3.** Propiedades fisicoquímicas del suelo en (SI-M) que corresponde al área de depósitos mineros y (SI-N) a la zona con vegetación nativa ( $\pm$  desviación estándar).

	SI-M	SI-N
<b>Textura % A</b>	66,75 ( $\pm$ 10,28) a	78 ( $\pm$ 3,11) a
<b>Textura % L</b>	27,75 ( $\pm$ 9,67) a	17,50 ( $\pm$ 1,29) a
<b>Textura % Ar</b>	5,5 ( $\pm$ 2,31) a	4,50 ( $\pm$ 2,00) a
<b>D.apa g/cc</b>	1,16 ( $\pm$ 0,10) a	0,90 ( $\pm$ 0,02) b
<b>C.Elect mS</b>	424,98 ( $\pm$ 0,10) a	181,18 ( $\pm$ 27,55) a
<b>pH</b>	7,0 ( $\pm$ 0,70) a	5,08 ( $\pm$ 0,12) b
<b>MO %</b>	1,88 ( $\pm$ 2,0) a	3,62 ( $\pm$ 0,53) a
<b>S mg/Kg<sup>-1</sup></b>	43,79 ( $\pm$ 44,98) a	14,94 ( $\pm$ 2,63) a
<b>P mg/Kg<sup>-1</sup></b>	3,5 ( $\pm$ 2,12) a	4,36 ( $\pm$ 5,45) a
<b>Na cmol<sub>c</sub>/Kg<sup>-1</sup></b>	0,41 ( $\pm$ 0,04) a	0,17 ( $\pm$ 0,06) b
<b>K cmol<sub>c</sub>/Kg<sup>-1</sup></b>	0,25 ( $\pm$ 0,06) a	0,19 ( $\pm$ 0,02) a
<b>Ca cmol<sub>c</sub>/Kg<sup>-1</sup></b>	3,87 ( $\pm$ 0,27) a	2,97 ( $\pm$ 0,31) b
<b>Mg cmol<sub>c</sub>/Kg<sup>-1</sup></b>	0,97 ( $\pm$ 0,06) a	0,78 ( $\pm$ 0,07) b
<b>Al+H cmol<sub>c</sub>/Kg<sup>-1</sup></b>	0 ( $\pm$ 0,00) a	0,63 ( $\pm$ 0,20) b
<b>CICE</b>	3,15 ( $\pm$ 0,00) a	3,15 ( $\pm$ 0,00) a
<b>Cu mg/Kg<sup>-1</sup></b>	0,58 ( $\pm$ 0,07) a	0,23 ( $\pm$ 0,08) b
<b>Zn mg/Kg<sup>-1</sup></b>	1,25 ( $\pm$ 0,00) a	0,68 ( $\pm$ 0,17) b
<b>Fe mg/Kg<sup>-1</sup></b>	99,33 ( $\pm$ 15,70) a	63,33 ( $\pm$ 19,01) b
<b>Mn mg/Kg<sup>-1</sup></b>	64,27 ( $\pm$ 21,94) a	24,74 ( $\pm$ 10,08) b
<b>B mg/Kg</b>	0,36 ( $\pm$ 0,07) a	0,47 ( $\pm$ 0,18) a

**Textura % A:** arena, **Textura % L:** limo, **Textura % Ar:** arcilla **D. apa:** densidad aparente, **C.Elect:** conductividad eléctrica, **MO:** materia orgánica, **Al+H:** acidez intercambiable, **CICE:** capacidad de intercambio catiónico efectiva. Letras distintas en cada fila indican diferencias significativas entre SI-M y SI-N donde el  $p < 0.05$  se rechaza la hipótesis de igualdad de varianzas.

El área SI-N presentó un pH ácido puesto que, el municipio de Santa Isabel se encuentra en límites con el PPNN con influencia de flujos piroclásticos (Yepes, 2012). La acidez en suelos derivados de cenizas volcánicas genera problemas de disponibilidad de nutrientes como Ca, Mg y P, lo que concuerda con lo mencionado anteriormente, donde la Zona SI-N presenta deficiencias en estos elementos (Cisneros & Sánchez de Prager, 2012). Los parámetros fisicoquímicos encontrados en esta zona son congruentes con los citados por Franco et al., (2010) quienes registran que los suelos del bosque andino son superficiales a moderadamente profundos, ligeramente ácidos, con textura gruesa, además de presentar un relieve fuertemente ondulado y con altas pendientes (70-80% en promedio), con evidencias de erosión hídrica, deslizamientos y escurrimientos difusos.

El 85% de los suelos colombianos tienen un pH ácido inferior a 5,5 con contenidos altos de aluminio, en ello radica que el 98% de los suelos del país presente deficiencias en P (IGAC, 2014). Las dos zonas evaluadas tienen un bajo contenido de este macronutriente en el suelo.

**4.1.2 Metales pesados en las áreas de estudio.** Las zonas SI-M y SI-N mostraron diferencias significativas en las concentraciones de los metales pétales pesados: As, Cd, Co, Pb, Zn, Cu y V (Tabla 4). Latorre (2014), manifiesta que el departamento del Tolima presenta niveles de As mayores a 40 ppm en suelos y sedimentos. La presencia del metaloide es atribuida al desarrollo de las crecientes actividades mineras. En el área de relave SI-M, el As tiene un valor de 50 ppm, lo que muestra concentraciones por encima de lo normal (Bowie & Thornton, 1985), y en la normativa del CETESB esta concentración es catalogada como VI, lo que indica que hay riesgos potenciales para la salud humana y del ecosistema.

El As ha sido clasificado por la Organización Mundial de la Salud como una sustancia cancerígena humana (Li et al., 2016), es altamente tóxico para todas las formas de vida (Nicomel, Leus, Folens, Van Der Voort & Laing, 2015). Las concentraciones de este elemento se deben mantener en el organismo en niveles bajos, debido a que la



ingestión continuada durante largos periodos de tiempo, deriva en la manifestación de sus efectos tóxicos, produciéndose cambios fisiológicos y desórdenes estructurales (Moreno, 2010).

**Tabla 4.** Metales pesados del suelo en (SI-M) que corresponde al área de depósitos mineros y (SI-N) a la zona con vegetación nativa ( $\pm$  desviación estándar).

<b>Metales pesados (ppm)</b>	<b>SI-M</b>	<b>SI-N</b>
<b>As</b>	50 ( $\pm$ 51) a	6,25 ( $\pm$ 0,75) b
<b>Cd</b>	150 ( $\pm$ 237) a	7 ( $\pm$ 0) b
<b>Cr</b>	51 ( $\pm$ 31) a	8 ( $\pm$ 4,2) a
<b>Co</b>	46,5 ( $\pm$ 72) a	1,5 (0,5) b
<b>Pb</b>	538 ( $\pm$ 777) a	9,5 ( $\pm$ 1,65) b
<b>Zn</b>	1940,25 ( $\pm$ 2790) a	89 ( $\pm$ 6,36) b
<b>Cu</b>	61,5 ( $\pm$ 56) a	5,75 ( $\pm$ 1,25) b
<b>V</b>	91,75 ( $\pm$ 17,9) a	26,5 ( $\pm$ 7,04) b
<b>Hg</b>	< 1 ( $\pm$ 0) a	< 1 ( $\pm$ 0) a
<b>Ni</b>	28,25 ( $\pm$ 21,6) a	10 ( $\pm$ 1,08) a
<b>Se</b>	< 1 ( $\pm$ 0) a	< 1 ( $\pm$ 0) a

Letras distintas en cada fila indican diferencias significativas entre SI-M y SI-N donde el  $p < 0.05$  se rechaza la hipótesis de igualdad de varianzas.

Los elementos Cd, Co, Pb, Zn y Cu tienen concentraciones que se clasificaron como VP, en la zona SI-M, lo que evidencia posibles cambios perjudiciales en el suelo (CETESB, 2014). Mientras que en la zona SI-N las concentraciones de los metales pesados se encuentran en el rango considerado normal en suelos (Bowie & Thornton, 1985), y es catalogado por el CETESB como VR es decir un suelo no alterado. Por lo tanto, al contrastar estas dos zonas de muestreo, se evidencia la pérdida en la

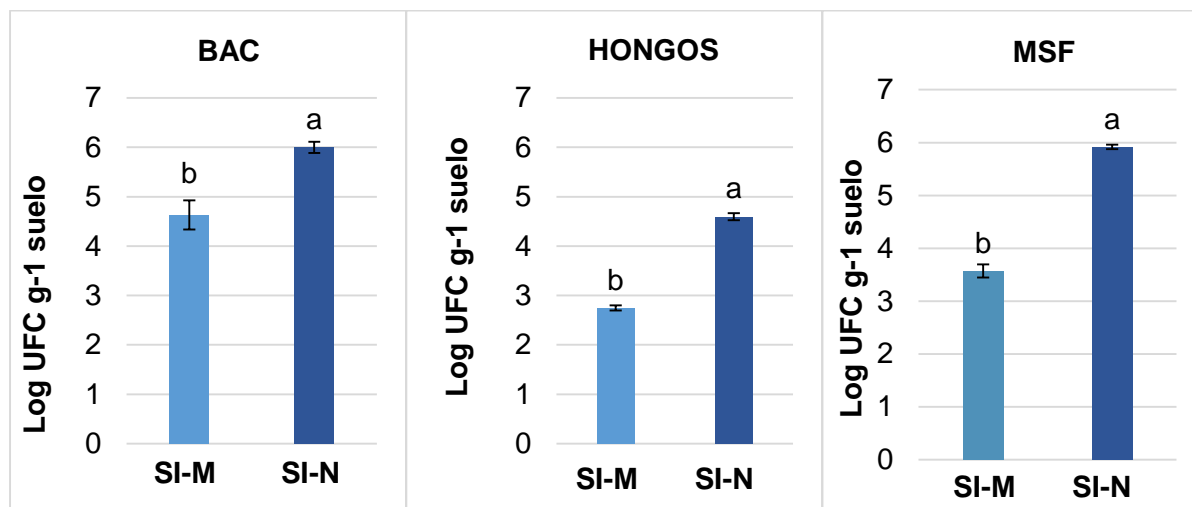
calidad del suelo originado por las actividades extractivas, que provocan concentraciones de metales pesados por encima de lo normal.

## 4.2 PARÁMETROS BIOLÓGICOS.

**4.2.1 Densidad Microbiana.** Las densidades de los tres grupos microbianos estudiados presentaron diferencias significativas. Las bacterias y los hongos fueron 12 y 71 veces menor para el área de relave en comparación con el área nativa, los MSF mostraron la mayor reducción, con una densidad 199 veces menor en SI-M, siendo el grupo más sensible a los depósitos generados por la minería (Figura 5). La disminución drástica en la comunidad microbiana puede estar asociada a la presencia de metales pesados, estos generan efectos negativos en los microorganismos, como desnaturalización de las proteínas, inactivación de enzimas y daño de las células que actúan como antimetabolitos (Narendrula-Kotha & Nkongolo, 2017).

La densidad de bacterias en el área SI-M presentó un valor de  $9,4 \times 10^4$  UFC/g, en zonas perturbadas se han reportado  $8,3 \times 10^2$  UFC/g (Romero, Santamaría & Zafra, 2009),  $5,5 \times 10^4$  UFC/g (Dos Santos et al., 2015). En este estudio en la zona SI-N mostró una abundancia de  $1,5 \times 10^6$  UFC, de igual forma en áreas no intervenidas, se han reportado valores para bacterias de  $2,5 \times 10^6$  UFC/g, destacándose como el grupo más predominante en el suelo (Chaves-Bedoya, Ortiz-Moreno & Ortiz-Rojas, 2013), esta abundancia puede deberse a su multiplicación por fisión binaria, proceso durante el cual se originan mutaciones que se pueden expresar rápidamente y sufrir o no un proceso selectivo, además, de fuentes adicionales de variabilidad genética como son los mecanismos de recombinación (transformación, conjugación, y la transducción). Estos factores en su conjunto, son los responsables de la extraordinaria capacidad de adaptación y diversidad en bacterias en los diferentes ambientes (Curtis & Schnek, 2008; Sadaba, Heller, Orians, Purves, & Hillis, 2009).

**Figura 5.** Densidad microbiana del suelo, en las zonas de depósitos mineros (SI-M) y de vegetación nativa (SI-N).



Número de UFC **Bac**: Bacterias, **MSF**: Microorganismos Solubilizadores de Fosfato. Letras distintas en cada barra indican diferencias significativas entre SI-M y SI-N donde el  $p < 0.05$  rechaza la hipótesis de igualdad de varianzas.

La densidad de hongos en el área de relave minero presentó un valor de  $5,9 \times 10^2$  UFC/g en contraste con la zona nativa que tiene  $4,17 \times 10^4$  UFC/g, lo que concuerda con los resultados obtenidos por Romero et al., (2009) en un Bosque Húmedo Montano con presencia de explotación de la industria extractiva de canteras y ladrillera, en Cundinamarca, Colombia, donde se determinó la UFC de hongos en un estrato con cárcavas y sin vegetación con  $12,0 \times 10^2$  UFC/g, mientras que la zona con presencia de pastos y vegetación moderada tuvo un valor de  $4,7 \times 10^3$  UFC/g. Los autores manifestaron que existe una relación entre la UFC micóticas y el grado de erosión del suelo. De igual forma, en estudio realizado en América del sur, el número de UFC de hongos filamentosos, arrojó diferencias significativas, ya que el suelo sin cobertura vegetal posee menor cantidad con  $5,66 \times 10^4$  UFC/g mientras que el suelo natural  $6,6 \times 10^4$  UFC/g (Pacasa, Loza, Bonifacio, Vino & Serrano, 2017).

En suelos Colombianos no intervenidos, los MSF han mostrado una densidad microbiana entre  $5,5 \times 10^4$  y  $8,75 \times 10^5$  UFC/g (Pérez, 2008; Chaves-Bedoya et al., 2013). En este estudio, los MSF presentaron valores para el área nativa de  $8,41 \times 10^5$

UFC/g y en la zona de relave  $4,22 \times 10^3$  UFC/g, siendo el grupo más sensible a la acumulación de los depósitos mineros. Diferentes autores han determinado que la abundancia de los MSF se ven fuertemente afectados por el uso del suelo. Useche et al., (2004) manifestaron que la tala del bosque no solo cambia las propiedades estructurales, sino que también perturba a los MSF, lo que altera el funcionamiento del ecosistema. Así mismo, Chaves et al., (2013) establecieron a los MSF como el grupo más afectado por la aplicación de agroquímicos, se observó una reducción altamente significativa cuando se aplicó Glifosato, Bispiribac, y Azoxystrobin.

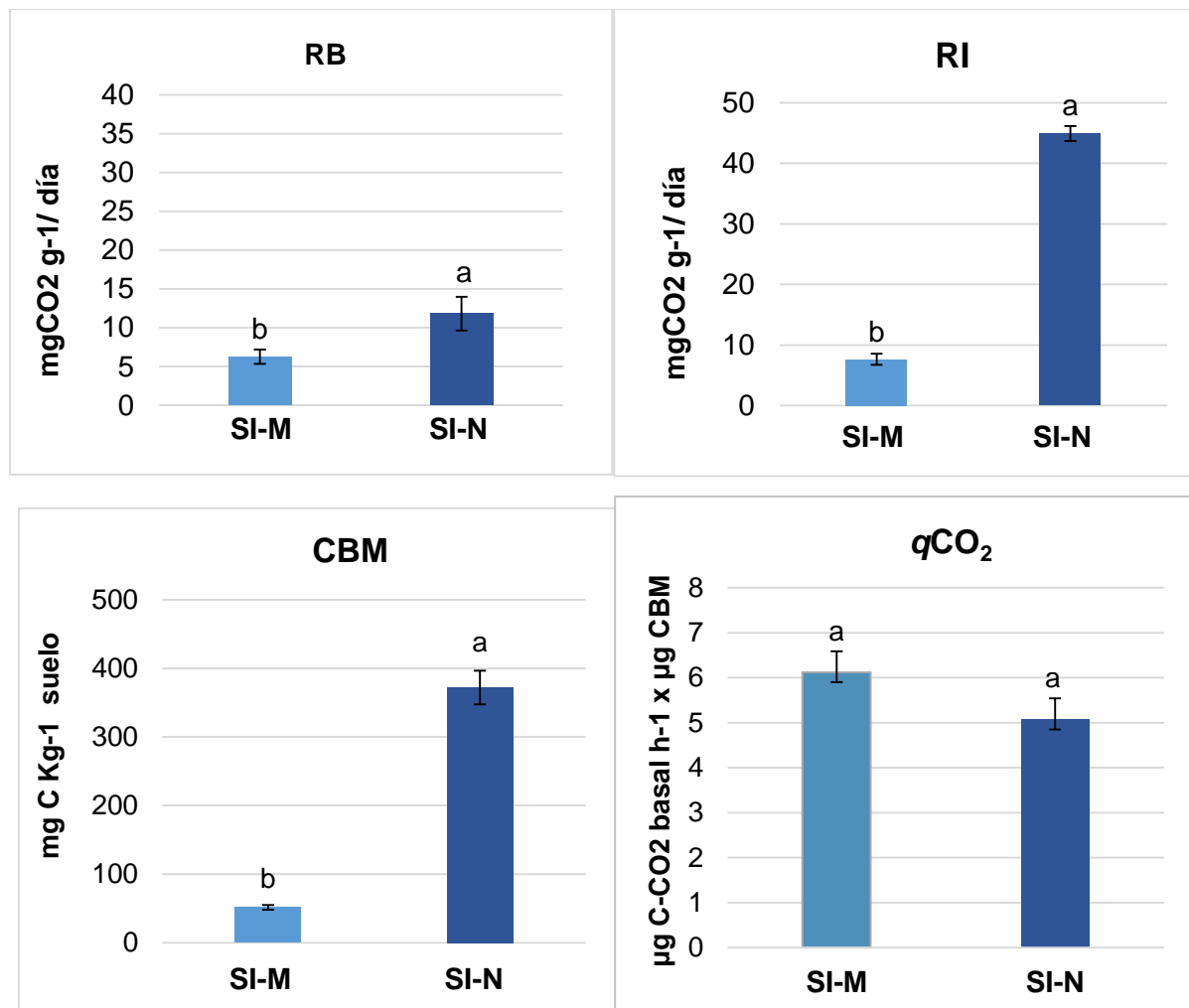
Pese a la disminución de los microorganismos del suelo, hay algunos que toleran estas condiciones adversas, puesto que presentan diferentes estrategias que le permiten evadir y resistir a la toxicidad generada por los metales pesados, estos mecanismos incluyen la acumulación de los iones dentro de la célula activa o pasivamente, la absorción en las paredes celulares, formación de complejos y reacciones de oxidación-reducción entre otros (Ahemad, 2014; Restrepo-Franco et al., 2015).

El área SI-M el punto 3, presentó el mayor valor de UFC de bacterias y MSF en comparación con los otros sitios de la misma área (Anexo B), comportamiento que se debe posiblemente a que el lugar de muestreo se encontraba aledaño a la zona de vegetación, esto concuerda con los resultados del trabajo realizado por Dos Santos et al (2015), en una antigua zona minera ubicada en las Tres Marias - Brazil, donde el número de UFC para bacterias y actinobacterias presentaron valores más altos en sitios con presencia de vegetación. De igual forma, Liu et al (2016) en áreas de minería, encontraron que, al aumentar la cobertura de la vegetación, la diversidad genética de las bacterias mejora significativamente, dado que el metabolismo de las plantas favorece la permeabilidad del suelo, y proporcionan un ambiente rico en compuestos orgánicos que incrementan la diversidad microbiana. Por tanto, se puede evidenciar el papel que cumplen las plantas en la creación de un medio favorable para los microorganismos, principalmente mediante su actividad radicular (Sánchez, 2015).

**4.2.2 Respiración microbiana.** Se presentó una disminución significativa en la emisión de CO<sub>2</sub>, estimada mediante la RB del área SI-M (6,26 mg CO<sub>2</sub>) al ser comparada con SI-N (11,80 mg CO<sub>2</sub>,) (Figura 6). Renella et al (2008), reportaron valores similares en una mina de oro en Jales de Portugal, la RB fue menor para el sitio muestreado en la mina con de 2,5 mg CO<sub>2</sub>, mientras que en las muestras de control fue 9,5 mg CO<sub>2</sub>. Diferentes estudios en zonas de minería, han determinado que las altas concentración de metales pesados disminuyen la respiración debido a la muerte de microorganismos, lo que genera un efecto deletéreo sobre la estabilidad de los ecosistemas (Liao & Xie, 2007; Renella et al 2008; Schimann et al., 2012).

Para la RI, se presentó una diferencia aún más notoria con valores de 7,6 y 44,9 mg CO<sub>2</sub>, para SI-M y SI-N (Figura 6). El incremento en los valores de CO<sub>2</sub>, en la RI se debe al aumento de la actividad de la microflora presente en el suelo (Anderson & Domsch, 1973). En este estudio, la adición de glucosa como fuente de carbono adicional, estimuló la respiración de la microbiota edáfica en el área SI-N, mientras que el área SI-M no presentó este comportamiento, al compararse con la RB. Esto muestra que los microorganismos presentes en el área SI-M, no respondieron a estímulos derivados del suministro de carbono orgánico. Por lo tanto, para una recuperación de la zona se debe llevar a cabo procesos de bioaumentación, que se realizan cuando se agregan grupos microbianos al suelo (Pino, Carvajal, Gallo & Peñuela, 2012) y una bioestimulación, la cual se efectúa mediante la adición de nutrientes para favorecer el crecimiento de la microbiota y la biodegradación de los contaminantes. En este tratamiento se da la incorporación de Nitrógeno, Fósforo, Potasio, humedad, Oxígeno entre otros para mejorar las condiciones del suelo (Richardson, Jones, Singleton, & Aitken, 2012).

**Figura 6.** Actividad microbiana del suelo en las zonas SI-M y SI-N.



**RB:** Respiración basal, **RI:** Respiración inducida por sustrato, **CBM:** Carbono de la biomasa microbiana, **qCO<sub>2</sub>:** cociente metabólico. Letras distintas en cada fila indican diferencias significativas entre SI-M y SI-N, para una media de 4 muestras por punto, donde el  $p < 0.05$  rechaza la hipótesis de igualdad de varianzas.

Adicionalmente, la respiración edáfica además de reflejar la tasa de mineralización del carbono orgánico del suelo, muestra la actividad respiratoria de sus microorganismos, que biodegradan compuestos orgánicos y se encuentra estrechamente relacionado con la calidad ambiental del suelo (Liao & Xie, 2007; Schimann et al., 2012). Por lo tanto, en esta área de relave se evidencia una pérdida de la capacidad biótica y de su calidad.

**4.2.3** Carbono de la Biomasa Microbiana (CBM). En este estudio, el CBM presentó diferencias estadísticas significativas, puesto que se redujo drásticamente en el área de relave (51,56 mg C Kg<sup>-1</sup> suelo) siendo 7 veces menor en comparación con el área nativa (372,08 mg C Kg<sup>-1</sup> suelo) (Figura 6). Moreira & Siqueira, (2006) manifiestan que en áreas degradadas por la minería y sin vegetación, se han presentado valores de 60 mg C Kg<sup>-1</sup> suelo. De igual forma, en un suelo erosionado en el Piedemonte de la Cordillera Occidental Colombiana se estimó el CBM con un valor de 62 mg C Kg<sup>-1</sup> (Zapata, Sánchez de Prager, & Azakawa, 2003), estos resultados concuerdan con los obtenidos en este estudio. Para los suelos Colombianos no intervenidos por la minería se han reportado valores de 233,3 mg C Kg<sup>-1</sup> (Sánchez de Prager, Rojas, Pérez, Zúñiga & Gascó, 2006), 565 mg C Kg<sup>-1</sup> (Zapata et al., 2003). Estos trabajos coinciden que CBM resulta ser un indicador sensible al impacto generado en el suelo.

Diferentes autores manifiestan una disminución en el CBM del suelo como resultado de la contaminación por metales pesados (Liao & Xie, 2007, Renella et al 2008; Zhang et al 2010). Las razones de la reducción del CBM están posiblemente en que los microorganismos del suelo bajo condiciones de estrés por estos metales desvían la energía del crecimiento a las funciones de mantenimiento celular (Zhang et al 2010). Además, en los suelos contaminados las comunidades microbianas necesitan más energía para sobrevivir y un menor porcentaje de esta se usa para integrar el C a componentes orgánicos (Mikanova, 2006; Zhang et al 2010).

**4.2.4** El cociente metabólico ( $qCO_2$ ). El  $qCO_2$  no presentó diferencias estadísticas significativas, sin embargo el suelo nativo SI-N mostró un valor menor de  $qCO_2$  (5,07  $\mu\text{g C-CO}_2$  basal h<sup>-1</sup> x  $\mu\text{g CBM}$ ) que el suelo de relave minero (6,12  $\mu\text{g C-CO}_2$  basal h<sup>-1</sup> x  $\mu\text{g CBM}$ ), lo que muestra un menor estrés microbiano en el área SI-N, donde un bajo cociente corresponde a una mayor asimilación del C orgánico en la biomasa microbiana y en la construcción de la materia orgánica del suelo (Palma, 2011). Por lo tanto, en ecosistemas estables el  $qCO_2$  tiende a ser bajo, debido a que disminuye progresivamente a medida que el ecosistema alcanza el estado de equilibrio o estabilidad (Montenegro, 2008).

Los valores mayores de  $q\text{CO}_2$  indican una actividad respiratoria más elevada en relación al tamaño de la biomasa microbiana, debido a una menor eficiencia metabólica de los microorganismos, ocasionada por una mayor energía de mantenimiento como respuesta a la baja disponibilidad de nutrientes o sustratos como el carbono orgánico (Álvarez, Díaz, León & Guillén, 2010; Ferreras et al., 2009). De igual forma, Dos Santos et al., (2013), reportan que en los sitios con presencia de condiciones adversas para microorganismos del suelo, como altas concentraciones de As, se reflejan los mayores valores de  $q\text{CO}_2$ . Debido a que, la microbiota edáfica tiende a dirigir su metabolismo hacia el mantenimiento de la biomasa a expensas del aumento de su población.

#### **4.3 RELACIÓN ENTRE LAS PROPIEDADES BIOLÓGICAS Y LOS PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS/ METALES PESADOS DEL SUELO.**

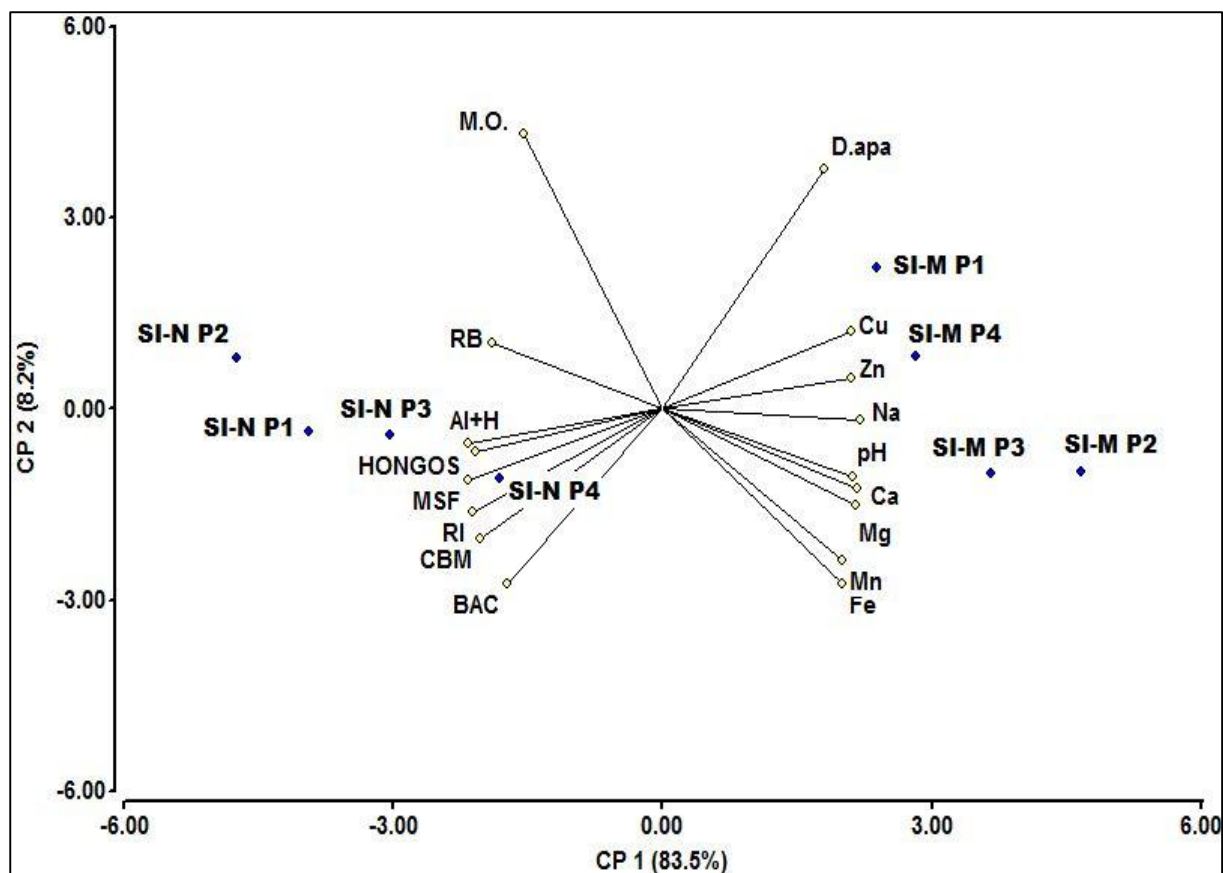
**4.3.1** Análisis de componentes principales (ACP) entre los parámetros biológicos y fisicoquímicos. Se evidenció la separación de las dos zonas evaluadas, donde el área SI-N tuvo una correlación con el % MO, Al+H, RB, RI, CBM, UFC de bacterias, hongos y MSF mientras que, la zona SI-M presentó asociación con el pH, Cu, Zn, Mg, Na, Ca, Mg, Mn, Fe y densidad aparente (Figura 7).

El pH ácido estimula las poblaciones de solubilizadores de fosfato (Chaves-Bedoya et al., 2013), características presentes en el área SI-N y contrarias al área de depósitos mineros con un pH neutro. De igual forma, Frouz & Novakova, (2005) determinaron que el bajo aporte de materia orgánica y un pH alto limitan el desarrollo de la comunidad microbiana, lo que concuerda con el ACP donde el área SI-M, muestran una relación negativa con los parámetros microbianos. La deforestación causada en áreas de relave origina una marcada disminución en el contenido de MO, además de la pérdida de la cobertura vegetal, son generados cambios físicos; como el aumento en la temperatura y la pérdida de la microestructura lo que impide la oxigenación y la retención de agua, por lo tanto estos cambios provocan la



destrucción de microhábitats favorables para el desarrollo de los microorganismos (Zapata, 2017).

**Figura 7.** Análisis de componentes principales de los parámetros biológicos y fisicoquímicos del suelo en SI-M y SI-N.



**SI-M (P1, P2, P3, P4):** corresponde a los puntos evaluados en el área de relave minero, y **SI-N (P1, P2, P3, P4)** a los puntos evaluados en el área nativa **Rb:** Respiración basal, **RI:** Respiración inducida por sustrato, **CBM:** Carbono de la biomasa microbiana **Bac:** UFC de Bacterias, **Hongos:** UFC de Hongos, **MSF:** Microorganismos Solubilizadores de Fosfato.

Las altas concentraciones de Zn en el área SI-M presentan una correlación negativa con los hongos y los MSF, se ha demostrado que este metal inhibe la producción de conidios en algunas especies (Narendrula-Kotha & Nkongolo, 2017). El Cu, también ha mostrado efectos sobre los hongos, mediante la inhibición de la germinación de las esporas, razón por la cual es empleado comúnmente como fungicida (Cortés,

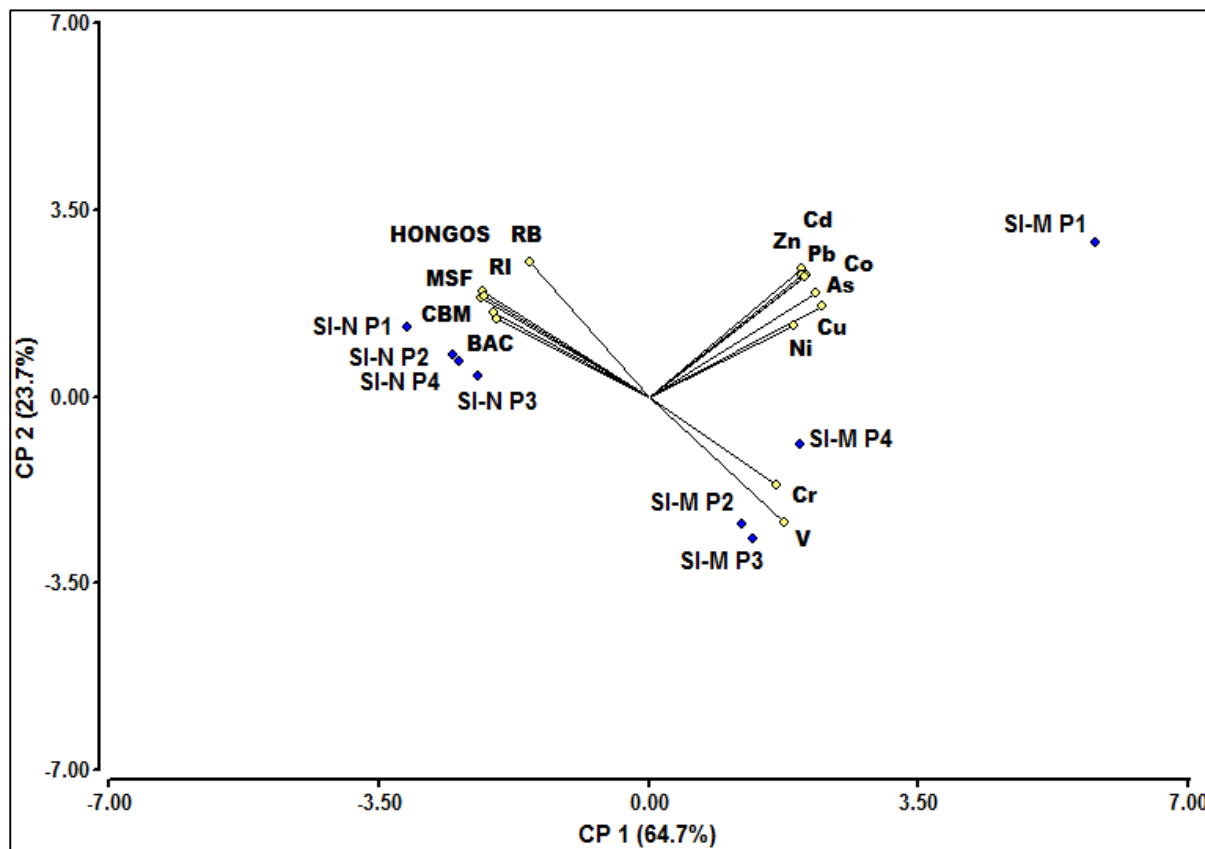
2008). En diferentes estudios se ha observado que el alto contenido de Cu en el suelo genera una reducción drástica de la población total de los hongos (Dos Santos et al., 2007; Frostegård, 1993)

**4.3.2** El análisis de componentes principales (ACP) de los parámetros biológicos y los metales pesados. Se puede observar la clara separación de las dos zonas evaluadas (Figura 8), donde el área SI-N tiene una estrecha relación con los atributos biológicos mientras que, la zona SI-M presenta asociación con todos los metales pesados evaluados. Además, el punto 1 del área SI-M se encuentra separado de los otros sitios de muestreo, debido a que este lugar presentó valores altos para la mayoría de metales (Anexo A).

La RB y RI, presentaron asociación con el área nativa (SI-N), debido a que la respiración del suelo muestra una mayor correlación con la diversidad de especies de plantas (Dias, Van Ruijven & Berendse, 2010), mientras que en la zona SI-M que tiene escasa vegetación, fue encontrada una menor relación con estos parámetros, esto puede ser debido a que las altas concentraciones de los metales pesados provocan alteraciones fisiológicas en las plantas, en el caso del Cd origina la inhibición de la fotosíntesis y la transpiración, el Zn altera la permeabilidad de la membrana celular, el Pb inhibe el crecimiento y la acción enzimática, el Cu provoca desbalance iónico y reducción del crecimiento (Acosta, 2007).

Los metales que más afectan a la comunidad microbiana son el As, Cr y V. En el caso del As es un elemento que causa serios problemas medioambientales debido a su uso extensivo y a su alta toxicidad (Peinado et al., 2012). El mayor nivel de toxicidad de As se observa en las formas inorgánicas As (III) y As (V) que son las formas predominantes en los relaves mineros. El As (V) actúa como fosfato y por lo tanto puede acceder a las células microbianas a través del sistema de transporte destinado a la captación de esta sal esencial. Una vez dentro de la célula, inhibe la fosforilación oxidativa debido a su interferencia con los procesos de generación de energía basados en fosfato (Landi, Renella, Moreno, Falchini & Nannipieri, 2000).

**Figura 8.** Análisis de componentes principales de los parámetros biológicos y los metales pesados del suelo en SI-M y SI-N.



**SI-M (P1, P2, P3, P4):** corresponde a los puntos evaluados en el área de relave minero, y **SI-N (P1, P2, P3, P4):** a los puntos evaluados en el área de nativa **Rb:** Respiración basal, **RI:** Respiración inducida por sustrato, **CBM:** Carbono de la biomasa microbiana **Bac:** UFC de Bacterias, **Hongos:** UFC de Hongos, **MSF:** Microorganismos Solubilizadores de Fosfato.

Los puntos SI-M P2 y SI-M P3, se caracterizaron por las altas concentraciones de V y Cr los cuales presentaron una correlación negativa con los parámetros microbiológicos (Figura 8). En el caso del Cr presenta una alta solubilidad y movilidad que le permite filtrarse en las membranas biológicas, es capaz de generar daño oxidativo en el ADN (Landi et al., 2000). El V es requerido por los microorganismos como un oligoelemento, pero se vuelve tóxico a concentraciones altas, dado que la forma aniónica del V tiene una estructura similar al fosfato, la absorción biológica puede afectar negativamente al metabolismo del fosfato como la inhibición de muchas enzimas (Zhang et al., 2014).

Diferentes autores atribuyeron una menor producción de biomasa microbiana a mayores concentraciones de V debido a que genera deformación de la morfología del microorganismo lo cual puede impedir el crecimiento celular (Fukuda & Yamase, 1997; van Marwijk et al., 2009; Zhang et al., 2014) se han reportado estudios de bacterias como *Enterobacter cloacae*, aislada de una mina de oro de Sudáfrica, que cultivada en presencia de vanadio (4 mM) se hizo más grande con un mayor espesor celular (van Marwijk et al., 2009). Fukuda & Yamase (1997), encontraron que *Streptococcus pneumoniae* podría sobrevivir a una baja concentración de V, pero la forma celular se alargó y a mayores concentraciones la producción de biomasa disminuyó.

El Cd afecta varias actividades metabólicas de las bacterias del suelo tales como mineralización del nitrógeno, mineralización del carbón, producción del CO<sub>2</sub> y actividades enzimáticas (Fashola, Ngole-Jeme, & Babalola, 2016). También se ha determinado que las actividades de deshidrogenasa y fosfatasa, así como la biomasa microbiana, disminuyen debido a las altas concentraciones de Cd en el suelo (Landi et al., 2000).

En el caso del Pb este tiene acceso a las células bacterianas a través de las vías de absorción de metales divalentes esenciales como Mn y Zn. Ejerce efectos negativos sobre las especies bacterianas que cambian la conformación de ácidos nucleicos, proteínas, inhibición de la actividad enzimática, interrupción de las funciones de membrana y fosforilación oxidativa, así como alteraciones del equilibrio osmótico de las células (Landi et al., 2000).

#### **4.4 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE MSF.**

**4.4.1 Aislamiento de MSF.** se aislaron nueve microorganismos con capacidad de solubilizar el fosfato en el medio PVK, cuatro bacterias y cinco hongos. De las bacterias, el aislado B1 (Tabla 5) fue el que presentó la mayor actividad solubilizadora, sin diferencias significativas con los demás aislados bacterianos, en

cuanto a los hongos, el aislamiento del hongo H4, mostró los mayores índices de solubilización, y con diferencias significativas (Tabla 6).

**Tabla 5.** Índice de solubilización de fosfato de cepas de bacterias y hongos aislados del área de relave minero ( $\pm$  desviación estándar).

CEPAS	BACTERIAS	HONGOS
1	3,04 ( $\pm$ 0,64) a	2,7 ( $\pm$ 0,11) a
2	2,79( $\pm$ 0,19) a	2,4 ( $\pm$ 0,05) a
3	2,78( $\pm$ 0,28) a	2,6 ( $\pm$ 0,2) a
4	2,76 ( $\pm$ 0,08) a	3,6 ( $\pm$ 0,3) b
5		2,3 ( $\pm$ 0,06) a

Los valores presentados en la tabla corresponden a la media de tres repeticiones, con valores medidos en cm. Letras distintas en cada fila indican diferencias significativas entre el ISF de los aislados fúngicos donde el  $p < 0.05$  se rechaza la hipótesis de igualdad de varianzas.

El mecanismo que más se asocia a la solubilización de fósforo inorgánico es la biosíntesis de ácidos orgánicos, los cuales disminuyen el pH (Sánchez, 2011). La síntesis de ácidos orgánicos suele estar asociada al metabolismo de algunos carbohidratos, en este caso glucosa. Lo cual da lugar a la generación de ácidos intermediarios que pueden ser excluidos al medio con efectos directos sobre la biodisponibilidad de nutrientes poco solubles y el pH (Flores, 2016; Sánchez, 2011).

**4.4.2** Identificación y análisis de secuencias. Las secuencias obtenidas para el análisis filogenético, llevaron a la identificación de cuatro bacterias, tres a nivel de

especie y uno a nivel de género. Para los hongos se logró la identificación de cinco aislados a nivel de especie.

El árbol filogenético de bacterias se construyó con 4 secuencias obtenidas en el presente trabajo y 8 secuencias de bacterias depositadas en el GenBank, seleccionadas por presentar altos niveles de identidad con las secuencias evaluadas (Tabla 6). Como grupo externo se empleó el baston gram negativo *Enterobacter cloacae* (JX081461). Se obtuvieron II clados identificados como: clado I, que comprenden a los aislados bacterianos: B1, B2, B3 con 97% de similaridad con *Pseudomonas* sp. y *Pseudomonas cedrina* subsp. *Cedrina*; el Clado II, que incluye a la bacteria B4, presenta 87% de similaridad con *Pseudomonas chlororaphis* (Figura 9)

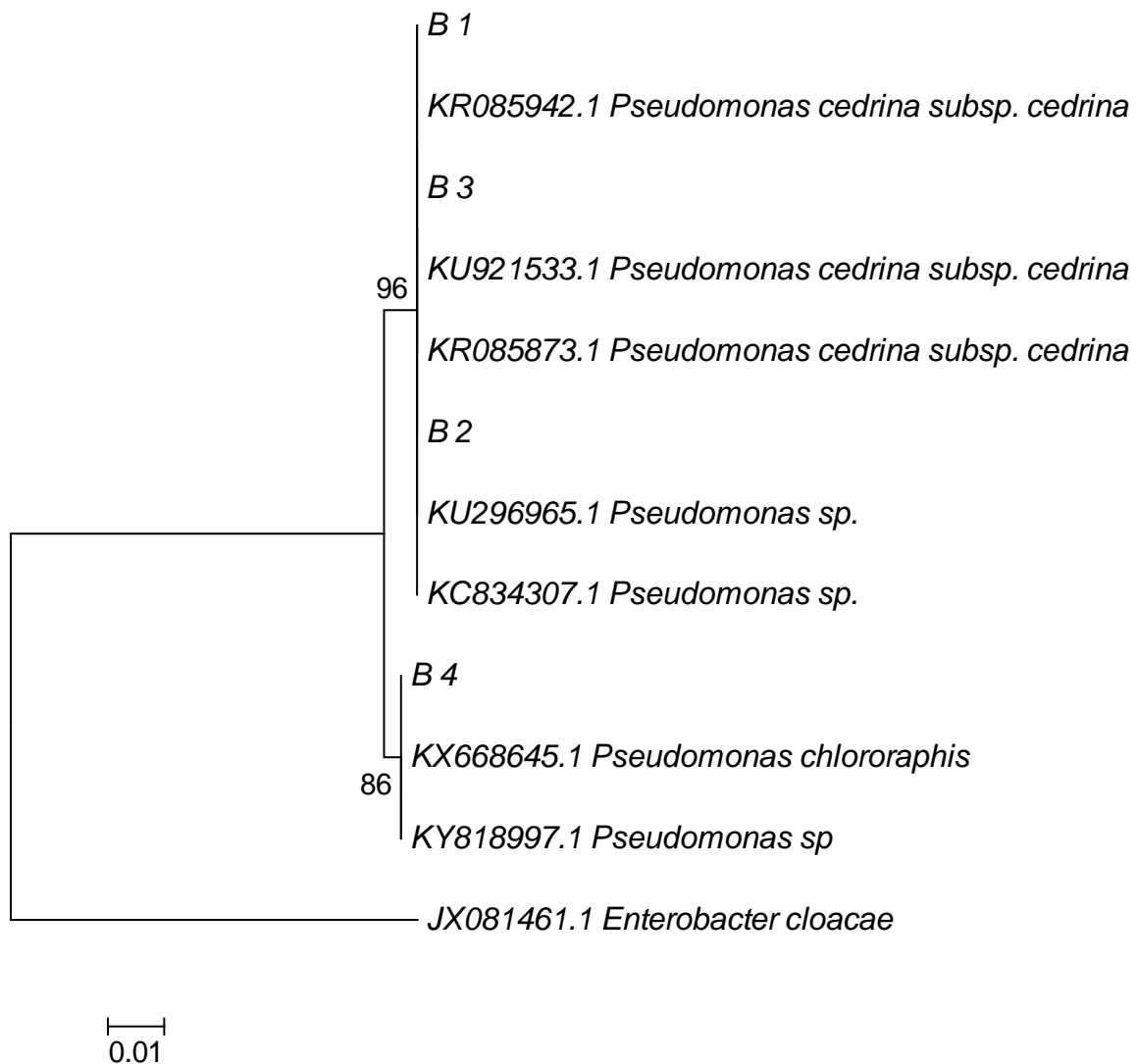
**Tabla 6.** Resultados de identidad en GenBank de secuencias 16S de BSF aislados del área SI-M.

Aislado	Identificación en GenBank	Puntuación Máxima	Identidad Max	Identidad
B 1	<i>KU921533</i> <i>Pseudomonas cedrina</i> subsp. <i>Cedrina</i>	1046	100%	100%
	<i>KR085942</i> <i>Pseudomonas cedrina</i> subsp. <i>Cedrina</i>	1046	100%	100%
	<i>KU296965</i> <i>Pseudomonas</i> sp.	1242	100%	100%
B 2	<i>KC834307</i> <i>Pseudomonas</i> sp.	1242	100%	100%
	<i>KU921533</i> <i>Pseudomonas cedrina</i> subsp. <i>Cedrina</i>	1096	100%	100%
B 3	<i>KR085873</i> <i>Pseudomonas cedrina</i> subsp. <i>Cedrina</i>	1096	100%	100%
	<i>KY818997</i>	900	100%	100%

<i>Pseudomonas sp.</i>				
<b>B 4</b>	<i>KX668645</i>	900	100%	100%
	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>			

Valor (e) para todas las comparaciones fue de 0,0

**Figura 9.** Análisis filogenético de bacterias aisladas de SI-M, basado en el método de unión de vecinos, modelo Jukes-Cantor.



La identificación molecular arrojó que todas las cepas aisladas pertenecen al género *Pseudomonas*, lo cual concuerda con diferentes estudios que han reportado a este

grupo de bacterias como uno de los MSF más eficientes (Álvarez, Osorio & Marín, 2013; Patiño & Sanchez, 2012; Paul & Sinha, 2016). Se destacan por tener varios mecanismos de solubilización, entre ellos, la producción de ácidos orgánicos y elevados niveles de enzimas fosfatasas, lo que genera efectos benéficos en el crecimiento de las plantas (Restrepo-Franco et al., 2015; Vargas, 2012). Este género es la base de un producto comercial denominado Fosforina, que incrementa la disponibilidad de fósforo en el suelo, permite el crecimiento vegetal y reduce la aplicación de fertilizantes fosforados entre 50% y 100% (Beltran, 2014; Restrepo-Franco et al., 2015).

Dentro de las *Pseudomonas* que solubilizan fosfato se resalta la actividad de las especies *P. chlororaphis* y *P. putida* (Weyens et al., 2009; Yu et al., 2012). Zhao et al., (2013) aislaron a *P. chlororaphis* de nódulos de las raíces de la leguminosa *Sophora alopecuroides*, y evaluaron la solubilización de fósforo en medio PVK, mostró un resultado positivo para esta actividad, lo que coincide con el presente estudio, donde esta bacteria también fue capaz de solubilizar fosfato.

Las *Pseudomonas* se han aislado en suelos contaminados y procedentes de minería, siendo uno de los grupos más representativos en estas áreas (Cardona, 2013). Esta amplia distribución de *Pseudomonas* se debe, a su conformación genética versátil, por poseer operones, elementos móviles como transposones y plásmidos, que permiten la transferencia de los genes y, por lo tanto, la rápida adaptación frente a la presencia de agentes contaminantes, lo que les da la capacidad de competir con éxito en todos los nichos en que habita (Gómez et al., 2008; Patiño & Sánchez, 2012).

En un área de relave minero de extracción de oro y plata, se realizaron análisis metagenómicos que determinaron que el género *Pseudomonas* es uno de los más abundantes en suelos con altas concentraciones de cianuro (Cornejo, 2016). De igual forma, en Turquía en una mina de cobre se aislaron e identificaron nueve cepas de *Pseudomonas* sp. y a dos de ellas se les determinó actividad para degradar cianuro (Akcil, Karahan, Ciftci, & Sagdic, 2003).



Algunas cepas de *Pseudomonas* presentan una amplia producción de metabolitos bioactivos tales como la fenazina, pyoluteorin, pirrolnitrina, cianuro de hidrógeno, 2,4-diacetilfloroglucinol, proteasa, lipasa y quitinasa (Chen et al., 2015, Shen, Hu, Peng, Wang, & Zhang, 2013). La capacidad de liberar estos productos con actividad antimicrobiana es el principal mecanismo por el cual suprimen los patógenos (Chen et al., 2015). Una de las especies que presenta esta actividad es *P. chlororaphis*, la cual fue aislada e identificada molecularmente en este estudio. Según reportes de diferentes autores esta bacteria es un eficiente promotor de crecimiento vegetal, que pueden ser utilizados como inoculantes para biofertilización, y biocontrol (Chen et al., 2015; Deng, Wang, Baird & Lu, 2015; Nandi et al., 2015; Shen et al 2013).

Las actividades antimicrobianas y los bajos riesgos para la vida silvestre han hecho de *P. chlororaphis* un prometedor agente de control biológico, altamente potencial en la agricultura (Deng et al., 2015). Además, muestra una amplia actividad antagonista contra un número de patógenos que causan enfermedades en las plantas, tales como *Rosellinia necatrix*, *Fusarium oxysporum f. sp. radices lycopersici*, *Colletotrichum lagenarium*, *Phytophthora capsici*, *Pythium aphanidermatum*, *Pythium ultimum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Corticium sasakii*, *Rhizoctonia solani* y *Gaeumannomyces graminis* (Chen et al., 2015, Nandi et al., 2015; Shen et al., 2013). También, presentan otros metabolitos secundarios que incluyen ácido indol-3-acético (IAA) y sideróforos que contribuyen al desarrollo de las plantas (Shen et al., 2013).

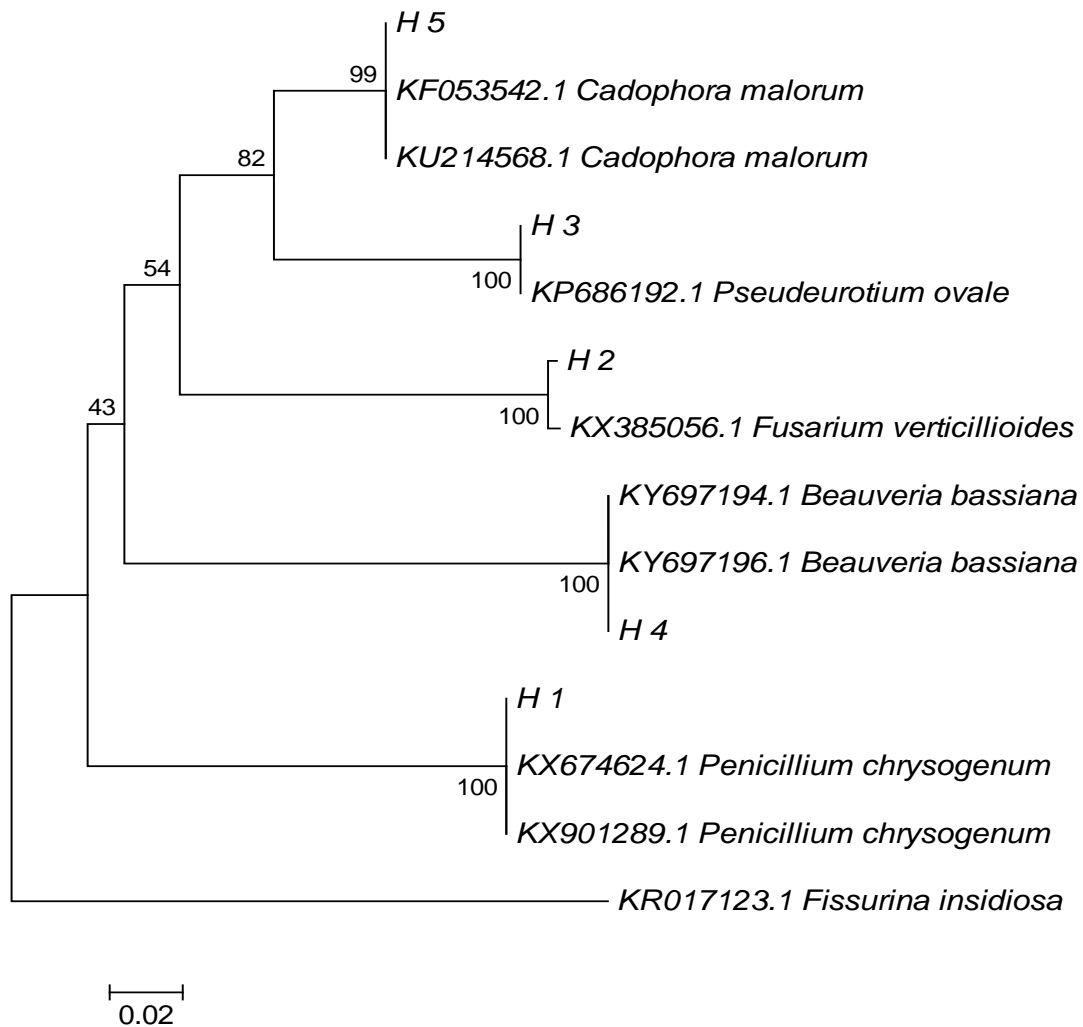
El árbol filogenético de los hongos se realizó con 5 secuencias obtenidas en este estudio y 8 depositadas en el GenBank (Tabla 7). El grupo externo fue el ascomiceto *Fissurina insidiosa*. Se obtuvieron 5 clados (Figura 10) que corresponde: clado I, el hongo 5 que presentó 99% de similaridad con *Cadophora malorum*; clado II, hongo 3 que tiene 100% de similaridad con *Pseudeurotium ovale*; clado III, incluye al hongo 2, presenta 100% de similaridad con *Fusarium verticillioides*; clado VI, el hongo 4, 100% de similaridad con *Beauveria bassiana*; clado V con el hongo 1, 100% de similaridad con *Penicillium chrysogenum*.

**Tabla 7.** Resultados de identidad en GenBank de secuencias ITS del ADNr de hongos solubilizadores de fosfato aislados del área SI-M.

<b>Aislamiento</b>	<b>Identificación en GenBank</b>	<b>Puntuación Máxima</b>	<b>Identificación Máxima</b>	<b>Identidad</b>
<b>H 1</b>	<i>KX674624</i> <i>Penicillium chrysogenum</i>	655	100%	100%
	<i>KX901289.1</i> <i>Penicillium chrysogenum</i>	655	100%	100%
<b>H 2</b>	<i>KX385056.1</i> <i>Fusarium verticillioides</i>	841	100%	99%
<b>H3</b>	<i>KP686192.1</i> <i>Pseudeurotium ovale</i>	863	100%	99%
<b>H 4</b>	<i>KY697196.1</i> <i>Beauveria bassiana</i>	900	100%	100%
	<i>KY697194.1</i> <i>Beauveria bassiana</i>	900	100%	100%
<b>H 5</b>	<i>KU214568.1</i> <i>Cadophora malorum</i>	968	100%	100%
	<i>KF053542.1</i> <i>Cadophora malorum</i>	968	100%	100%

Valor (e) para todas las comparaciones fue de 0,0.

**Figura 10.** Análisis filogenético de hongos aislados de SI-M, basado en el método de unión de vecinos, modelo Kimura 2.



De los aislados fúngicos identificados en este estudio, el género *Penicillium* es considerado uno de los grupos claves en la microbiota del suelo, ya que están involucrados en el ciclaje del fosforo, actúan como controladores biológicos, producen metabolitos secundarios y promueven el crecimiento vegetal (Bernal, 2009; Pandey, Das, Kumar, Rinu, & Trivedi, 2008). Su actividad como solubilizadores de fosforo es atribuida a la producción de ácidos orgánicos, la quelación de iones metálicos y la producción de enzimas (Hernández-Leal et al., 2011). Las especies pertenecientes a

este género han mostrado gran tolerancia a condiciones de frío, pH y salinidad (Pandey et al., 2008)

En Colombia, actualmente se comercializa Fosfosol, producto de la investigación sobre MSF realizada por la Universidad Nacional, cuyo ingrediente activo es un *Penicillium*. Está dirigido especialmente al cultivo del arroz, producen incrementos del rendimiento entre el 5 y el 38% con respecto a cultivos no inoculados (Patiño, 2012)

Gómez & Zabala (2001), determinaron la capacidad y eficiencia solubilizadora por parte de los hongos aislados de la rizósfera del maní (*Arachis hypogae* L.) para establecer la posibilidad de su empleo como inóculo en suelos ácidos enmendados con fuentes insolubles de fósforo. De un total de trece organismos, sólo cinco presentaron la capacidad para solubilizar. Los hongos con esta habilidad, pertenecieron en su totalidad a los géneros *Penicillium* y *Aspergillus*. La mayor capacidad solubilizadora correspondió a *P. brevicompactum* y *P. chrysogenum*. Lo que confirma los resultados obtenidos en el presente estudio donde este último hongo mostró una alta actividad de solubilización en medio PVK.

*Beauveria bassiana*, es un ascomiceto entomopatógeno con una distribución geográfica generalizada (Kotta-Loizou & Coutts, 2017). Se utiliza comercialmente en la actualidad como agente de control biológico para diferentes plagas de artrópodos tales como la oruga del pino (*Thaumetopoea pityocampa*), barrenador del maíz (*Ostrinia furnacalis*), áfido del melocotón (*Myzus persicae*), la broca (*Hypothenemus hampei*) entre otros (Valero-Jiménez et al., 2016). Estudios recientes han manifestado el papel que cumple este hongo, en el control de las poblaciones de vectores de enfermedades humanas, tales como *Anopheles*, que transmite la malaria, el *Triatoma infestans* bug, que es el vector de la enfermedad de Chagas e *Ixodes ricinus*, el cual transmite la enfermedad de Lyme (Pedrini, Ortiz, Zhang, & Keyhani, 2013; Valero-Jiménez et al., 2014).

El hongo *B. bassiana* además de ser usado con fines de control biológico, tiene el potencial para favorecer la solubilización de fósforo (Fernández, Hernández & Carrión, 2015). Perea (2013), evaluó la actividad para solubilizar el fosfato tricálcico por parte de micromicetos saprobios nativos de suelos en Veracruz, México, donde el hongo *B. bassiana* presentó respuesta positiva a la solubilización.

*Fusarium* ha sido reportado como uno de los géneros de hongos solubilizadores de fosfato (Beltran, 2014; Bernal, 2013). Pero también, algunas especies originan graves daños y difícil control de las enfermedades en los cultivos (Palmero, 2008). Uno de ellos es *F. verticilloides* un ascomiceto cosmopolita que puede causar marchitamiento en semilleros, podredumbres radiculares, retraso de crecimiento o hipertrofias en gramíneas (Alberts, van Zyl & Gelderblom, 2016). Palmero (2008) realizó diferentes ensayos de viabilidad que mostraron la alta capacidad de los aislados de *F. verticilloides* para formar colonias viables en condiciones extremas.

Del ascomiceto *Pseudeurotium ovale*, se ha aislado el metabolito secundario denominado *pseurotin* (Bloch, Tamm, Bollinger, Petcher & Weber, 1976). Este compuesto ha sido estudiado en diferentes hongos, y se ha determinado la actividad antibacteriana moderada contra las bacterias fitopatógenas *Erwinia carotovora* y *Pseudomonas syringae* (Stierle, A & Stierle, D., 2015). Aún no se conocen estudios que evalúen la actividad solubilizadora de fosfato por parte de este hongo.

De *Cadophora malorum* también se han extraído metabolitos como el sclerosporin que actúa a modo de antifúngico (Almeida, Eguereva, Kehraus, Siering, & König, 2010). Este hongo filamentoso se encuentra adaptado para tolerar ambientes extremos, se han aislado cepas en la Antártida y sitios hidrotermales (Rédou et al., 2016). En Corea del Sur en la región costera, fueron aislados los hongos endofíticos de las raíces de *Calystegia soldanella*, y se determinó la presencia de giberelinas fisiológicamente activas en *C. malorum*. Los autores resaltan la influencia de este hongo para el crecimiento y el desarrollo de las plantas en áreas de salinidad y estrés; pero no se había registrado su actividad solubilizadora de fosfato (You et al., 2013).

## 5 CONCLUSIONES

Se observó que el relave de minería de oro, genera una disminución significativa en las densidades de todos los microorganismos evaluados en comparación con el área nativa, donde el grupo menos afectado fueron las bacterias.

Los depósitos de la minería de oro influyen negativamente en los parámetros biológicos: la respiración edáfica y la biomasa microbiana, los cuales disminuyeron drásticamente debido a las condiciones adversas de la zona. Por lo tanto, se evidencia el papel que cumplen los microorganismos como bioindicadores sensibles para evaluar las alteraciones causadas en áreas impactadas.

Se determinó que la concentración de metales pesados principalmente de Cr, V y As, en la zona de relave minero (SI-M) afecta de manera notoria las propiedades microbiológicas del suelo.

Características fisicoquímicas como el bajo contenido de materia orgánica y un pH alto limitan el desarrollo de la comunidad microbiana en la zona de relave de minería de oro (SI-M).

Se identificaron molecularmente las bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas* y cinco aislados fúngicos que se identificaron como: *Penicillium chrysogenum*, *Fusarium verticillioides*, *Beauveria bassiana* y los hongos *Pseudeurotium ovale* y *Cadophora malorum*. son nuevos reportes para esta actividad solubilizadora de fosfato. Estos microorganismos identificados podrían ser utilizados en procesos de bioaumentación en zonas degradadas por la minería, debido a su capacidad para tolerar ambientes de estrés además que algunos actúan como controladores biológicos.

Este estudio constituye un punto de partida para el establecimiento y/o monitoreo de estrategias de recuperación en áreas impactadas por la minería.

## RECOMENDACIONES

Se propone realizar ensayos a partir de los MSF identificados en este estudio, que permitan determinar actividades tales como fijación de nitrógeno, asimilación de hierro, crecimiento vegetal y la capacidad de degradación de metales pesados por parte de estas cepas nativas.

Se proponen realizar análisis independientes de cultivo, que permitan un mayor conocimiento de la diversidad de las comunidades microbianas en los relaves mineros.

Llevar a cabo procesos como la bioestimulación o la bioaumentación, que contribuyan en la recuperación en estas zonas de minería del departamento del Tolima.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta, M. (2007). Determinación de metales pesados en suelos agrícolas del Valle del Mezquital, HGO. *Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo*, 20-21.
- Agencia nacional de minería (ANM). (2017). *Caracterización de la actividad minera departamental*. Bogotá, Colombia.
- Ahemad, M. (2014). Remediation of metalliferous soils through the heavy metal resistant plant growth promoting bacteria: Paradigms and prospects. *Arabian Journal of Chemistry*.
- Alberts, J. F., van Zyl, W. H., & Gelderblom, W. C. (2016). Biologically based methods for control of fumonisin-producing *Fusarium* species and reduction of the fumonisins. *Frontiers in microbiology*, 7.
- Alef, K. (1995). Estimation of soil respiration. In: Alef K, Nannipieri P (eds) *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. Academic, New York, pp 464–470.
- Ali, H., Khan, E., & Sajad, M. A. (2013). Phytoremediation of heavy metals—concepts and applications. *Chemosphere*, 91(7), 869-881.
- Almeida, C., Eguereva, E., Kehraus, S., Siering, C., & König, G. M. (2010). Hydroxylated sclerosporin derivatives from the marine-derived fungus *Cadophora malorum*. *Journal of natural products*, 73(3), 476.
- Akcil, A., Karahan, A. G., Ciftci, H., & Sagdic, O. (2003). Biological treatment of cyanide by natural isolated bacteria (*Pseudomonas* sp.). *Minerals engineering*, 16(7), 643-649.
- Álvarez, L. C. (2012). *Identificación y caracterización bioquímica, morfológica y molecular de microorganismos cultivables asociados a la rizosfera y al sustrato de plantas de vainilla* (Tesis de Maestría). Facultad de Ciencias: Universidad Nacional de Colombia. Medellín.
- Álvarez, L. C., Osorio, N. W. O., & Marín, M. (2013). Identificación molecular de microorganismos asociados a la rizosfera de plantas de vainilla en Colombia. *Acta Biológica Colombiana*, 18(2), 293-305.
- Álvarez, J. D., Díaz, E., León, N. S., & Guillén, J. (2010). Enmiendas orgánicas y



- actividad metabólica del suelo en el rendimiento de maíz. *Terra Latinoamericana*, 28(3), 239-245.
- Anderson, J. P. E., & Domsch, K. H. (1973). Quantification of bacterial and fungal contributions to soil respiration. *Archives of Microbiology*, 93(2), 113-127.
- Anderson, T. H., & Domsch, K. H. (1990). Application of eco-physiological quotients ( $q\text{CO}_2$  and  $q\text{D}$ ) on microbial biomasses from soils of different cropping histories. *Soil Biology and Biochemistry*, 22(2), 251-255.
- Aristizábal, C.A., Ramírez, J.P., & Betancur, L. (2013). Informes y análisis del problema minero en Colombia, *Contexto*. Universidad Pontificia Bolivariana.
- Astete, J., Cáceres, W., Gastañaga, M. D. C., Lucero, M., Sabastizagal, I., Oblitas, T., ... & Rodríguez, F. (2009). Intoxicación por plomo y otros problemas de salud en niños de poblaciones aledañas a relaves mineros. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 26(1), 15-19.
- Ávila, H., & Cruz, A. M. (2008). *Efecto de coberturas vegetales y época climática sobre la densidad de microorganismos totales y heterótrofos en suelos de la eco-región cafetera colombiana*. (Tesis de pregrado). Facultad de Ciencias: Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.
- Bajsa, N. (2008). *Efecto del pastoreo bovino sobre la comunidad bacteriana en un suelo de pradera natural*. (Tesis de pregrado). Facultad de Ciencias: Universidad de la Republica, Ciudad Montevideo, Uruguay.
- Badii, M. H., & Landeros, J. (2015). Plaguicidas que afectan a la salud humana y la sustentabilidad. *CULCyT*, (19): 21-34.
- Beltrán, M. E. (2014). La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 15(1), 101-113.
- Bernal, L. M. (2009). *Aislamiento de microorganismos solubilizadores de p (PSM) de las raíces de vanilla sp.* (Tesis de pregrado). Facultad de Ciencias: Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.
- Bloch, P., Tamm, C., Bollinger, P., Petcher, T. J., & Weber, H. P. (1976). Pseurotin, a New Metabolite of *Pseudeurotium ovalis* STOLK Having an Unusual Hetero-

- Spirocyclic System. (Preliminary Communication). *Helvetica chimica acta*, 59(1), 133-137.
- Bowie, S. H. U., & Thornton, L. (1985). *Environmental Geochemistry and Health*. Hingham, USA: Kluwer Academic Publ.
- Brock, T.D. (1978). *Biología de los microorganismos*. Ed. Omega. Barcelona, España.
- Cantero, M. C., Rhenals, V. I., & Moreno, A. J. (2015). Determinación de la degradación de suelos por minería aurífera aluvial en la ribera del río San Pedro, Puerto Libertador, Córdoba, Colombia. *Ingeniería e Innovación*, 3(1).
- Cañizares-Villanueva, R. O. (2000). Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. *Revista Latinoamericana De Microbiología*. 42(3), 131-143.
- Cárdenas, M., & Reina, M. (2008). *La minería en Colombia: impacto socioeconómico y fiscal*. Fedesarrollo.
- Cardona, E. A. *Microorganismos potenciales degradadores de cianuro en residuos de minería de oro* (Tesis de Maestría). Facultad de Minas: Universidad Nacional de Colombia, Medellín.
- Castilla, J., & Herrera, J. (2014). Environmental analysis of mining operations: Dynamic tools for impact assessment. *Minerals Engineering*, 77.
- Cébron, A., Cortet, J., Criquet, S., Biaz, A., Calvert, V., Caupert, C... Leyval, C. (2011). Biological functioning of PAH-polluted and thermal desorption-treated soils assessed by fauna and microbial bioindicators. *Research in microbiology*, 162(9), 896-907.
- Chaves-Bedoya, G., Ortiz-Moreno, M. y Ortiz-Rojas, L. (2013) Efecto de la aplicación de agroquímicos en un cultivo de arroz sobre los microorganismos del suelo. *Acta Agronómica*, 62(1), 66-72.
- Chen, Y., Shen, X., Peng, H., Hu, H., Wang, W., & Zhang, X. (2015). Comparative genomic analysis and phenazine production of *Pseudomonas chlororaphis*, a plant growth-promoting rhizobacterium. *Genomics data*, 4, 33-42.
- Cisneros, C. A., & Sánchez de Prager, M. (2015). Solubilización de fosfatos por hongos asociados a un Andisol de tres agroecosistemas cafeteros de la región andina colombiana. *Ingenium*, 9(25), 37-46.

- Coelho, P., Teixeira, J. P. F., & Gonçalves, O. N. (2011). Mining activities: Health impacts. *Encyclopedia of environmental health*, 3, 788-802.
- Compañía de Tecnología de Saneamiento Ambiental (CETESB). (2014). Decisão de diretoria no 045/2014/E/C/I, DOU – SP, Caderno Executivo I, n. 124, 36, (2014) 53.
- Cornejo, M. (2016). *Biorremediación de Relaves Mineros con un Consorcio Microbiano Nativo Caracterizado Molecularmente y Productor de Enzimas Degradadoras de Cianuro y Derivados*. (Tesis de Maestría). Universidad Nacional de Tumbes, Perú.
- Corral-Lugo, A., Morales-García, Y. E. Pazos-Rojas, L. A., Martínez-Contreras, R. D., Muñoz-Rojas, J., & Ramírez-Valverde, A. (2012). Cuantificación de bacterias cultivables mediante el método de "Goteo en Placa por Sellado (o estampado) Masivo". *Revista colombiana de biotecnología*, 14(2), 147.
- Cortés, J. (2008). *Evaluación del efecto de extractos etanólicos de própolis sobre el control de Alternaria solani en cultivo ecológico de tomate (Solanum lycopersicum.)*. (Tesis de pregrado). Escuela Superior de Agricultura de Barcelona, España.
- Curtis, H., & Schnek, A. (2008). *Curtis. Biología*. Ed. Médica Panamericana.
- da Silva, E. E., de Azevedo, P. H., & De-Polli, H. (2007). Determinação do carbono da biomassa microbiana do solo (BMS-C). *Embrapa Agrobiologia. Comunicado Técnico*.
- de la Cruz, M. C., Zamudio, M., Corona, A. I., González-, J. U., & Rojas, R. A. (2015). Importancia y estudios de las comunidades microbianas en los recursos y productos pesqueros. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 2(4), 99-115.
- Deng, P., Wang, X., Baird, S. M., & Lu, S. E. (2015). Complete genome of *Pseudomonas chlororaphis* strain UFB2, a soil bacterium with antibacterial activity against bacterial canker pathogen of tomato. *Standards in genomic sciences*, 10(1), 117.
- Díaz, L. C., Arranz, J. C., & Peñuela, G. (2013). Caracterización físico-química y mineralógica de suelos en zona carbonífera del Cesar, Colombia. *Interciencia*, 38(1), 42.

- Di Ciocco, C. A., Sandler, R. V., Falco, L. B., & Coviella, C. E. (2014). Actividad microbiológica de un suelo sometido a distintos usos y su relación con variables físico-químicas. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias*. Universidad Nacional de Cuyo, 46(1), 73-85.
- Dos Santos, J. V., de Melo Rangel, W., Guimaraes, A. A., Jaramillo, P. M., Rufini, M., Marra, M ... de Souza Moreira, F. M. (2013). Soil biological attributes in arsenic-contaminated gold mining sites after revegetation. *Ecotoxicology*, 22(10), 1526-1537.
- Dos Santos, J. V., Varón-López, M., Soares, C. R., Leal, P. L., Siqueira, J. O., & de Souza Moreira, F. M. (2015). Biological attributes of rehabilitated soils contaminated with heavy metals. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(7), 6735-6748.
- Dos Santos, L. C., Antonioli, Z. I., Leal, L. T., & Lupatini, M. (2007). População de bactérias e fungo no solo contaminado com cobre nas Minas do Camaquã, RS, Brasil. *Ciência e Natura*, 29(2), 15.
- Escobar, A., & Martínez, H. (2014). *El sector minero colombiano actual*. Bogotá: Unidad de Planeación Minero Energética.
- Fashola, M. O., Ngole-Jeme, V. M., & Babalola, O. O. (2016). Heavy Metal Pollution from Gold Mines: Environmental Effects and Bacterial Strategies for Resistance. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 13(11), 1047.
- Fernández, R. F., Hernández, T. I., & Carrión, G. (2015). Efecto del hongo *Beauveria bassiana* sobre solubilización de fosfatos y la disponibilidad de fósforo en el suelo. In *Ciencias de la Biología y Agronomía: Handbook TI*.
- Ferreras, L., Toresani, S., Bonel, B., Fernández, E., Bacigaluppo, S., Faggioli, V., & Beltrán, C. (2009). Parámetros químicos y biológicos como indicadores de calidad del suelo en diferentes manejos. *Ciencia del suelo*, 27(1), 103-114.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 783-791.
- Flores, L. E. (2016). *Identificación de bacterias endofitas aisladas de Teocintle y Maíz con potencial para promover el crecimiento vegetal*. (Tesis de Maestría). Instituto Politécnico Nacional, Michoacán.

- Franco, M., Betancur, J., & Franco, P. (2010). Diversidad florística y estructura de remanentes de bosque andino en la zona de amortiguación del Parque Nacional Natural los Nevados, Cordillera Central Colombiana. *Caldasia*, 32(1).
- Frostegård, Å., Tunlid, A., & Bååth, E. (1993). Phospholipid fatty acid composition, biomass, and activity of microbial communities from two soil types experimentally exposed to different heavy metals. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(11), 3605-3617.
- Fukuda, N., & Yamase, T. (1997). In vitro antibacterial activity of vanadate and vanadyl compounds against *Streptococcus pneumoniae*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 20(8), 927-930.
- Garay, L. J. (2013). *Minería en Colombia. Fundamentos para superar el modelo extractivista*. Bogotá: Contraloría General de la Nación.
- García, E. (2013). *Estrategias para la recuperación de suelos degradados en ambientes semiáridos: adición de dosis elevadas de residuos orgánicos de origen urbano y su implicación en la fijación de carbono*. (Tesis Doctoral) Universidad de Murcia.
- García, R. A., Lovaisa, N. C., & Ulla, E. L. (2015). Aislamiento y caracterización de bacterias solubilizadoras de fosfatos del Noroeste Argentino y su efecto en la promoción de crecimiento en maíz (*Zea mays* L.). *Revista agronómica del noroeste argentino*, 35(1), 13-28.
- García, M. (2016). Characterization of bacterial diversity associated with calcareous deposits and drip-waters, and isolation of calcifying bacteria from two Colombian mines. *Microbiological research*, 182, 21-30.
- Garzón, V. M. (2015). *Aislamiento e identificación de bacterias halófilas con potencial bioactivo aisladas de las Salinas de Zipaquirá, Colombia* (Tesis de maestría) Facultad de Ingeniería: Universidad de La Sabana, Bogotá.
- Glienke-Blanco, C., Aguilar-Vildoso, C. I., Vieira, M. L. C., Barroso, P. A. V., & Azevedo, J. L. (2002). Genetic variability in the endophytic fungus *Guignardia citricarpa* isolated from citrus plants. *Genetics and Molecular Biology*, 25(2), 251-255.

- Gholizadeh, A., Borůvka, L., Vašát, R., Saberioon, M., Klement, A., Kratina, J., ... & Drábek, O. (2015). Estimation of potentially toxic elements contamination in anthropogenic soils on a brown coal mining dumpsite by reflectance spectroscopy: A case study. *PloS one*, *10*(2), e0117457.
- Gomez, S. E., Gutierrez, D. C., Hernandez, A. M., Hernandez, C. Z., Losada, M., & Mantilla, P. C. (2008). Factores bióticos y abióticos que condicionan la biorremediación por *Pseudomonas* en suelos contaminados por hidrocarburos. *Nova*, *6*(9)
- Gómez, Y., & Zabala, M. (2001). Determinación de la capacidad solubilizadora del P en hongos aislados de la rizósfera del maní (*Arachis hypogaea* L.). *Universidad de Oriente, Venezuela*, *13*(1), 8-13.
- Grupo Transmerquin (GTM). (2014). *Hoja de datos de seguridad de Metasilicato de sodio petahidratado*. Brasil.
- Hernández-León, R., Velázquez-Sepúlveda, I., Orozco-Mosqueda, M. C., & Santoyo, G. (2010). Metagenómica de suelos: grandes desafíos y nuevas oportunidades biotecnológicas. *Phyton (Buenos Aires)*, *79*(2), 133-139.
- Instituto geográfico Agustín Codazzi (IGAC).(2014). *Manejo de suelos Colombianos*. Bogotá, Colombia.
- Jukes, T. H., & Cantor, C. R. (1969). Evolution of protein molecules. *Mammalian protein metabolism*, *3*(21), 132.
- Kapusta, P., & Sobczyk, Ł. (2015). Effects of heavy metal pollution from mining and smelting on enchytraeid communities under different land management and soil conditions. *Science of the Total Environment*, *536*, 517-526.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, *16*(2), 111–20.
- Kotta-Loizou, I., & Coutts, R. H. (2017). Studies on the Virome of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* Reveal Novel dsRNA Elements and Mild Hypervirulence. *PLoS Pathogens*, *13*(1).
- Kwon, M. J., Yang, J. S., Lee, S., Lee, G., Ham, B., Boyanov, M. I., ... & O'Loughlin, E. J. (2015). Geochemical characteristics and microbial community composition in

- toxic metal-rich sediments contaminated with Au–Ag mine tailings. *Journal of hazardous materials*, 296, 147-157.
- Latorre, N. (2007). Evaluación de medios de cultivo altos y bajos en nutrientes para la recuperación de heterótrofos edáficos en la ecorregión cafetera de los andes. (Tesis de pregrado). Facultad de Ciencias: Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.
- Latorre, S. M. (2014). *Búsqueda de genes de resistencia a arsénico en el metagenoma microbiano de la Sabana de Bogotá* (Tesis de maestría). Facultad de Ciencias: Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Landi, L., Renella, G., Moreno, J. L., Falchini, L., & Nannipieri, P. (2000). Influence of cadmium on the metabolic quotient, L-: D-glutamic acid respiration ratio and enzyme activity: microbial biomass ratio under laboratory conditions. *Biology and Fertility of Soils*, 32(1), 8-16.
- Li, Y., Ye, F., Wang, A., Wang, D., Yang, B., Zheng, Q., Guifan, S., & Gao, X. (2016). Chronic arsenic poisoning probably caused by arsenic-based pesticides: findings from an investigation study of a household. *International journal of environmental research and public health*, 13(1), 133.
- Liao, M., & Xie, X. M. (2007). Effect of heavy metals on substrate utilization pattern, biomass, and activity of microbial communities in a reclaimed mining wasteland of red soil area. *Ecotoxicology and environmental safety*, 66(2), 217-223.
- Liu, S., Liu, W., Yang, M., Zhou, L., & Liang, H. (2016). The genetic diversity of soil bacteria affected by phytoremediation in a typical barren rare earth mined site of South China. *SpringerPlus*, 5(1), 1-12
- López, D.A., & Mejía G, C. (2012). Evaluación de métodos de extracción de ADN para detección de *Listeria monocytogenes* en productos cárnicos. *Revista MVZ Córdoba*, 17(3), 3169-3175
- López, M. O. (2015). *Empleo de marcadores moleculares para el análisis de la prevalencia y diseminación de cepas de beauveria bassiana* (Tesis de doctorado) Facultad de Ciencias Biológicas: Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey.

- López, V.(2015). *Estudio de la diversidad microbiana en efluentes de una planta de beneficio de oro y evaluación de su posible actividad degradadora de cianuro* (Tesis de maestría). Facultad de Minas: Universidad Nacional de Colombia, Medellín.
- Lu, J. J., Perng, C. L., Lee, S. Y., & Wan, C. C. (2000). Use of PCR with universal primers and restriction endonuclease digestions for detection and identification of common bacterial pathogens in cerebrospinal fluid. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(6), 2076-2080.
- Martín, S. (2013). *Papel de los constituyentes edáficos en la disponibilidad de metales pesados en suelos calcáreos de uso agrícola del área Meditarránea. Enfoque químico y biológico.* (Tesis De Doctorado). Facultad De Farmacia: Universidad Complutense De Madrid, España.
- Mastrogianni, A., Papatheodorou, E. M., Monokrousos, N., Menkissoglu-Spiroudi, U., & Stamou, G. P. (2014). Reclamation of lignite mine areas with *Triticumaestivum*: The dynamics of soil functions and microbial communities. *Applied Soil Ecology*, 80, 51-59.
- Mocali, S., & Benedetti, A. (2010). Exploring research frontiers in microbiology: the challenge of metagenomics in soil microbiology. *Research in microbiology*, 161(6), 497-505.
- Montenegro, S. P. (2008). *Influencia de la aplicación de vinaza sobre la presencia, actividad y biomasa microbiana del suelo en el cultivo de maíz dulce (Zea mays)* (Tesis de maestría). Facultad de Ciencias: Universidad Nacional de Colombia, Palmira.
- Moratto, C., Martínez, L. J., Valencia, H., & Sánchez, J. (2005). Efecto del uso del suelo sobre hongos solubilizadores de fosfato y bacterias diazotróficas en el páramo de Guerrero (Cundinamarca). *Agronomía colombiana*, 23(2), 299-309.
- Moreira, F.M.S. & Siqueira, J.O. (2006). *Microbiología e bioquímica do solo*. Lavras, Universidad Federal de Lavras.
- Moreno, E. (2010). *Recuperación de suelos mineros contaminados con arsénico mediante fitotecnologías* (Tesis doctoral). Universidad Autónoma de Madrid, España.



- Nandi, M., Selin, C., Brassinga, A. K. C., Belmonte, M. F., Fernando, W. D., Loewen, P. C., & De Kievit, T. R. (2015). Pyrrolnitrin and hydrogen cyanide production by *Pseudomonas chlororaphis* strain PA23 exhibits nematicidal and repellent activity against *Caenorhabditis elegans*. *PloS one*, *10*(4).
- Narendrula-Kotha, R., & Nkongolo, K. K. (2017). Bacterial and fungal community structure and diversity in a mining region under long-term metal exposure revealed by metagenomics sequencing. *Ecological Genetics and Genomics*, *2*, 13-24.
- Ngole-Jeme, V. M., & Fantke, P. (2017). Ecological and human health risks associated with abandoned gold mine tailings contaminated soil. *PloS one*, *12*(2).
- Nicomel, N. R., Leus, K., Folens, K., Van Der Voort, P., & Laing, G. (2015). Technologies for arsenic removal from water: current status and future perspectives. *International journal of environmental research and public health*, *13*(1), 62.
- Nogales, B. (2005). La microbiología del suelo en la era de la biología molecular: descubriendo la punta del iceberg. *Revista Ecosistemas*, *14*(2).
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). (2013). *El manejo del suelo en la producción de hortalizas con buenas prácticas agrícolas*. Paraguay.
- Orgiazzi, A., Bardgett, RD., Barrios, E., Behan-Pelletier V, Briones MJI, Chotte J-L, De Deyn GB, Eggleton P, Fierer N, Fraser T. (2016). *Global Soil Biodiversity Atlas*. Luxembourg: European Commission publications, Office of the European Union.
- Pacasa, F., Loza, M. G., Bonifacio, A., Vino, L., & Serrano, T. (2017). Comunidad de hongos filamentosos en suelos del Agroecosistema de K iphak iphani, Comunidad Choquenaira-Viacha. *Journal of the Selva Andina Research Society*, *8*(1), 2-25.
- Palma, D. R. (2011). *Evaluación de la actividad biológica (respiración y biomasa microbiana) como indicadores de la salud de suelos ubicados en San Joaquín, Estado Carabobo*. (Tesis de pregrado). Facultad Experimental de Ciencia y Tecnología: Universidad de Carabobo, Valencia.
- Palmero, D. (2008). *Biogeografía y patología del género Fusarium en ambientes salinos y semiáridos del litoral mediterráneo de España* (Tesis Doctoral). Universidad Politécnica de Madrid, España.

- Pandey, A., Das, N., Kumar, B., Rinu, K., & Trivedi, P. (2008). Phosphate solubilization by *Penicillium* spp. isolated from soil samples of Indian Himalayan region. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(1), 97-102.
- Patiño, C. O. (2010). *Solubilización de fosfatos por poblaciones bacterianas aisladas de un suelo del valle del cauca*. (Tesis Doctoral). Facultad de ciencias Agropecuarias: Universidad Nacional de Colombia, Palmira.
- Patiño, C. P., & Sánchez, M. (2012). Aislamiento e identificación de bacterias solubilizadoras de fosfatos, habitantes de la rizósfera de chontaduro (b. *Gassipaes kunth*). *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 10(2).
- Pardo, K., & Salazar, E. M. (2013). *Minería, medio ambiente y paisaje cultural cafetero en el municipio de Quinchía, Risaralda: un reto hacia la sustentabilidad*. (Tesis de pregrado). Facultad de Ciencias Ambientales: Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira.
- Park, J. H., Bolan, N., Megharaj, M., & Naidu, R. (2011). Isolation of phosphate solubilizing bacteria and their potential for lead immobilization in soil. *Journal of Hazardous Materials*, 185(2), 829-836.
- Paul, D., & Sinha, S. N. (2016). Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* KUPSB12 with antibacterial potential from river Ganga, India. *Annals of Agrarian Science*.
- Pedrini, N., Ortiz-Urquiza, A., Zhang, S., & Keyhani, N. O. (2013). Targeting of insect epicuticular lipids by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: hydrocarbon oxidation within the context of a host-pathogen interaction. *Frontiers in microbiology*, 4, 24.
- Peinado, F. J., Freire, A., Lázaro, E., Aragón, M., Ortiz, I., & Abbaslou, H. (2012). Assessment of arsenic toxicity in spiked soils and water solutions by the use of bioassays. *Span J Soil Sci*, 2(3), 45-56.
- Perea, Y. D. (2013). *Estudio preliminar del potencial solubilizador de fosfato tricálcio por micromicetos saprobios de suelos del estado de Veracruz*. Universidad Veracruzana, Mexico.

- Pérez, A., Céspedes, C., Almonte, I., Ramírez, D. S., Cruz, C. E., & Núñez, P. A. (2012). Evaluación de la calidad del suelo explotado para la minería después de diferentes sistemas de manejo. *Terra Latinoamericana*, 30(3).
- Pérez, B. (2008). *Evaluación microbiológica de la calidad del suelo en cultivos de tabaco (Nicotiana tabacum) en los municipios de Girón y Piedecuesta (Santander) utilizando como indicadores grupos funcionales de microorganismos*. (Tesis de Pregrado). Facultad de ciencias: Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga.
- Pérez, F. (2012). *Comparación de cantidades de metales pesados en dos campos de cultivo de la Comarca Lagunera*. (Tesis de pregrado). Universidad Autónoma Agraria, México.
- PeaceBrigades International (PBI). (2011). Minería en Colombia ¿A qué precio? Colombia. *Boletín informativo N° 18*.
- Pino, N., Carvajal, S., Gallo, A., Peñuela. G. (2012). Comparación entre bioestimulación y bioaumentación para la recuperación de suelos contaminados con diesel. *Producción + Limpia*, 7(1), 101-108.
- Puga, S., Sosa, M., Lebgue, T., Quintana, C., & Campos, A. (2006). Contaminación por metales pesados en suelo provocada por la industria minera: Heavy metals pollution in soils damaged by mining industry. *Ecología Aplicada*, 5(1-2), 149-155.
- Rédou, V., Kumar, A., Hainaut, M., Henrissat, B., Record, E., Barbier, G., & Burgaud, G. (2016). Draft genome sequence of the deep-sea ascomycetous filamentous fungus *Cadophora malorum* Mo12 from the Mid-Atlantic Ridge reveals its biotechnological potential. *Genome announcements*, 4(4), e00467-16.
- Restrepo-Franco, G. M., Marulanda-Moreno, S., de la Fe-Pérez, Y., Díaz-de la Osa, A., Lucia-Baldani, V., & Hernández-Rodríguez, A. (2015). Bacterias solubilizadoras de fosfato y sus potencialidades de uso en la promoción del crecimiento de cultivos de importancia económica. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 46(1), 63-76.
- Richardson, S. D., Jones, M. D., Singleton, D. R., & Aitken, M. D. (2012). Long-term simulation of in situ biostimulation of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil. *Biodegradation*, 23(4), 621-633.

- Rico, M. (2009). *Capacidad promotora de crecimiento vegetal por bacterias del género Azotobacter y Actinomicetos aislados de cultivos de Solanum tuberosum Linnaeus, 1753 (Papa) cultivados en zonas altoandinas del Perú*. (Tesis de pregrado) Facultad de Ciencias Biológicas: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima.
- Rodallega, S. (2015). *Aislamiento y caracterización de bacterias capaces de degradar cianuro presente en tanques de almacenamiento de cianuro en una mina de oro del municipio de buenos aires cauca*. (Tesis de pregrado). Facultad de Ciencias Naturales: Universidad Icesi, Santiago de Cali.
- Rodicio, M., & Mendoza, M. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 22(4), 238-245.
- Rodríguez, A. F. (2007). *Caracterización molecular de poblaciones de Colletotrichum spp, asociadas a coffea arabica en Colombia y su aplicación en el diagnóstico de CBD* (Tesis de pregrado). Facultad de Ciencias: Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- Rojas, D., & Dussán, J. (2008). *Diversidad microbiana en el suelo asociado a las actividades en la mina de carbón Cerrejón, Colombia*. Universidad de los Andes, Bogotá.
- Romero, M. P., Santamaría, D. M., & Zafra, C. A. (2009). bioingeniería y suelo: abundancia microbológica, ph y conductividad eléctrica bajo tres estratos de erosión. *Umbral Científico*, (15), 67-74.
- Ross, M. (2004). Importancia del magnesio para altos rendimientos sostenibles en palma de aceite. *Revista Palmas*, 25(especial,), 98-104.
- Sadaba, D., Heller, G., Orians, G., Purves, W., & Hillis, D. (2009) *Vida, la ciencia de la biología*. Ed. Médica Panamericana.
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, 4(4), 406-425.
- Sánchez, C. (2015). Evolución de la calidad del suelo, disponibilidad de metales pesados y vegetación en un depósito minero de la Sierra Minera de Cartagena-La

- Unión tras su rehabilitación mediante fitoestabilización asistida. Facultad de Ingeniería: Universidad Politécnica de Cartagena, Cartagena.
- Sánchez, D. (2011). *Efecto de la inoculación con bacterias promotoras de crecimiento vegetal sobre el cultivo de tomate (Solanum Lycopersicum var. Sofía) bajo invernadero* (Tesis de Maestría). Facultad de ciencias: Pontificia universidad Javeriana, Bogotá.
- Sánchez de Prager, M. S., Rojas, A., Pérez, J., Zúñiga, O., & Gascó, J. M. (2006). Actividad y biomasa microbianas como indicadores de materia orgánica en sistemas de cultivo de maracuyá (*Passiflora edulis*) en Toro, Valle del Cauca, Colombia. *Acta Agronómica*, 55(4), 7.
- Schimann, H., Petit-Jean, C., Guitet, S., Reis, T., Domenach, A. M., & Roggy, J. C. (2012). Microbial bioindicators of soil functioning after disturbance: The case of gold mining in tropical rainforests of French Guiana. *Ecological Indicators*, 20, 34-41.
- Serrato, F. B., Díaz, A. R., Sarría, F. A., Brotóns, J. M., & López, S. R. (2010). Afección de suelos agrícolas por metales pesados en áreas limítrofes a explotaciones mineras del Sureste de España. *Papeles de Geografía*, (51-52), 45-54.
- Shapiro, S. S., & Wilk, M. B. (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*, 52(3-4), 591-611.
- Shen, X., Hu, H., Peng, H., Wang, W., & Zhang, X. (2013). Comparative genomic analysis of four representative plant growth-promoting rhizobacteria in *Pseudomonas*. *BMC genomics*, 14(1), 271.
- Silva, S. M., & Correa, F. J. (2009). Análisis de la contaminación del suelo: revisión de la normativa y posibilidades de regulación económica. *Semestre economico*, 12(23), 13-34.
- Simbaña, C. J. (2016). *Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos de la Parroquia Taracoa en Francisco de Orellana, mediante el Hongo pleurotus ostreatus* (Tesis de pregrado). Facultad de ciencias: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Ecuador.
- Sipilä, T. P., Yrjälä, K., Alakukku, L., & Palojarvi, A. (2012). Cross-site soil microbial communities under tillage regimes: Fungistasis and microbial biomarkers. *Applied and environmental microbiology*, 78(23), 8191-8201.

- Soto, C., Gutiérrez, S., Rey-León, A., & González-Rojas, E. (2010). Biotransformación de metales pesados presentes en lodos ribereños de los ríos Bogotá y Tunjuelo. *NOVA*, 8(14).
- Stierle, A. A., & Stierle, D. B. (2015). Bioactive secondary metabolites produced by the fungal endophytes of conifers. *Natural product communications*, 10(10), 1671.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipiński, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, 30(12), 2725-2729.
- Tomczyk-Żak, K., Kaczanowski, S., Drewniak, Ł., Dmoch, Ł., Skłodowska, A., & Zielenkiewicz, U. (2013). Bacteria diversity and arsenic mobilization in rock biofilm from an ancient gold and arsenic mine. *Science of the Total Environment*, 461, 330-340.
- Torres, M. V., & Lizarazo, L. M. (2006). Evaluación de grupos funcionales (ciclo del C, N, P) y actividad de la fosfatasa ácida en dos suelos agrícolas del departamento de Boyacá (Colombia). *Agronomía colombiana*, 24(2), 317.
- Tukey, J. W. (1949). Comparing individual means in the analysis of variance. *Biometrics*, 99--114.
- Useche, Y. M., Valencia, H., & Pérez, H. (2004). Caracterización de bacterias y hongos solubilizadores de fosfato bajo tres usos de suelo en el sur del trapecio amazónico. *Acta Biológica Colombiana*, 9(2), 129.
- Valero-Jiménez, C. A., Debets, A. J., van Kan, J. A., Schoustra, S. E., Takken, W., Zwaan, B. J., & Koenraadt, C. J. (2014). Natural variation in virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* against malaria mosquitoes. *Malaria journal*, 13(1), 479.
- Valero-Jiménez, C. A., Faino, L., Spring, D., Smit, S., Zwaan, B. J., & van Kan, J. A. (2016). Comparative genomics of *Beauveria bassiana*: uncovering signatures of virulence against mosquitoes. *BMC genomics*, 17(1), 986.
- Vallejo-Quintero, V. (2013). Importancia y utilidad de la evaluación de la calidad de suelos mediante el componente microbiano: experiencias en sistemas silvopastoriles. *Colombia Forestal*, 16(1), 83-99.

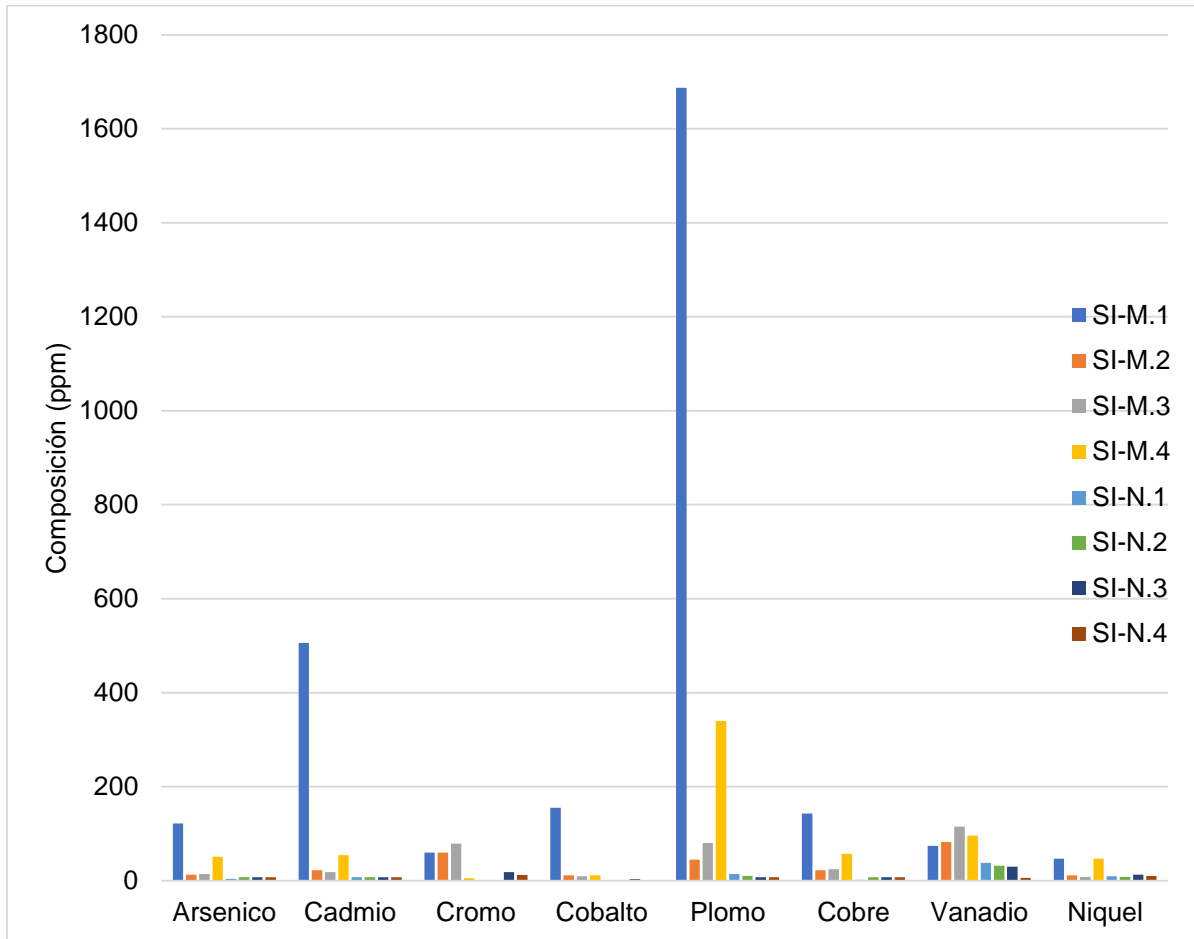
- van Marwijk, J., Opperman, D. J., Piater, L. A., & van Heerden, E. (2009). Reduction of vanadium (V) by *Enterobacter cloacae* EV-SA01 isolated from a South African deep gold mine. *Biotechnology letters*, 31(6), 845-849.
- Vance, E. D., Brookes, P. C., & Jenkinson, D. S. (1987). An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil biology and Biochemistry*, 19(6), 703-707.
- Vargas, S. (2012). *Microorganismos solubilizadores de Fosfato en suelos*.(Trabajo de grado). Facultad de ciencias: Universidad de Santander, Bucaramanga.
- Varón, M. (2010). *Microbiota edáfica como indicadora da reabilitação de áreas contaminadas por elementos-traço*. (Tesis de maestría). Universidad Federal de Lavras, Brasil.
- Wei, M., Yu, Z., & Zhang, H. (2015). Molecular characterization of microbial communities in bioaerosols of a coal mine by 454 pyrosequencing and real-time PCR. *Journal of Environmental Sciences*.
- Weyens, N., van der Lelie, D., Taghavi, S., Newman, L., & Vangronsveld, J. (2009). Exploiting plant–microbe partnerships to improve biomass production and remediation. *Trends in biotechnology*, 27(10), 591-598.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds. Academic Press, New York, USA: 315–322.
- Wollum, A. (1982) Cultural Methods for soil Microorganisms. In: Page A.L.; Miller, R.H.; Keeny, D.R (Eds) *Methods of soil analysis. Part 2: chemical and microbiological properties*, 2nd edn. ASA, Madison, 781–802.
- Xiao, S., Xie, X., & Liu, J. (2009). Microbial communities in acid water environments of two mines, China. *Environmental pollution*, 157(3), 1045-1050.
- Yepes, G. (2012). *Plan de desarrollo Santa Isabel Tolima 2012-2015*. Santa Isabel, Colombia.
- You, Y. H., Yoon, H., Kang, S. M., Woo, J. R., Choo, Y. S., Lee, I. J., ... & Kim, J. G. (2013). *Cadophora malorum* Cs-8-1 as a new fungal strain producing gibberellins isolated from *Calystegia soldanella*. *Journal of basic microbiology*, 53(7), 630-634.

- Yu, X., Liu, X., Zhu, T. H., Liu, G. H., & Mao, C. (2012). Co-inoculation with phosphate-solubilizing and nitrogen-fixing bacteria on solubilization of rock phosphate and their effect on growth promotion and nutrient uptake by walnut. *European Journal of Soil Biology*, 50, 112-117.
- Zapata, C. F., Sánchez de Prager, M., & Azakawa, N. M. (2003). Indicadores de actividad biológica en suelos con diferentes grados de intervención en el Ecoparque Cerro de la Bandera. *Acta Agronómica*, 52(1), 45-52.
- Zhang, A., & Moffat, K. (2015). A balancing act: The role of benefits, impacts and confidence in governance in predicting acceptance of mining in Australia. *Resources Policy*, 44, 25-34.
- Zhang, F. P., Li, C. F., Tong, L. G., Yue, L. X., Li, P., Ciren, Y. J., & Cao, C. G. (2010). Response of microbial characteristics to heavy metal pollution of mining soils in central Tibet, China. *Applied Soil Ecology*, 45(3), 144-151.
- Zhao, L. F., Xu, Y. J., Ma, Z. Q., Deng, Z. S., Shan, C. J., & Wei, G. H. (2013). Colonization and plant growth promoting characterization of endophytic *Pseudomonas chlororaphis* strain Zong1 isolated from *Sophora alopecuroides* root nodules. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(2), 629-637.
- Zúñiga, F. B. (1999). *Introducción al estudio de la contaminación del suelo por metales pesados*. Universidad Autónoma de Yucatán, México.



# **ANEXOS**

**ANEXO A.** Metales pesados en cada punto de muestreo en las áreas SI-M y SI-N.



**ANEXO B.** Densidad microbiana en cada punto de muestreo de las áreas SI-M y SI-N.

ÁREA	PUNTO	Bacterias	Mohos y Levaduras	MSF
		UFC g <sup>-1</sup>		
SI-M	P1	2,7 X 10 <sup>4</sup>	7,7 X10 <sup>2</sup>	4,2 x10 <sup>3</sup>
	P2	1,1 X 10 <sup>4</sup>	4,7X10 <sup>2</sup>	2,4 x10 <sup>3</sup>
	P3	2,8 X 10 <sup>5</sup>	6,0X10 <sup>2</sup>	7,9 x10 <sup>3</sup>
	P4	3,5 X 10 <sup>4</sup>	4,5X10 <sup>2</sup>	2,3 x10 <sup>3</sup>
SI-N	P1	1,7 x 10 <sup>6</sup>	3,0 X10 <sup>4</sup>	9,6 x10 <sup>5</sup>
	P2	5,0 x10 <sup>5</sup>	5,4X10 <sup>4</sup>	1,0 x10 <sup>6</sup>
	P3	1,0 x10 <sup>6</sup>	5,0X10 <sup>4</sup>	6,7 x10 <sup>5</sup>
	P4	1,1 x10 <sup>6</sup>	2,9X10 <sup>4</sup>	7,3 x10 <sup>5</sup>

	<b>SISTEMA DE GESTION DE LA CALIDAD</b> <b>FORMATO DE AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL</b>	Página 1 de 3
		Código: GB-P04-F03
		Versión: 02

Los suscritos:

<b>LILY JULIETH VARGAS OSORIO</b>	con C.C N°	<b>1.110.558.213</b>
<b>MARYEIMY VARÓN LÓPEZ</b>	con C.C N°	<b>28.556.259</b>
_____	con C.C N°	_____
_____	con C.C N°	_____
_____	con C.C N°	_____

Manifiesto (an) la voluntad de:

Autorizar

No Autorizar  Motivo: \_\_\_\_\_

La consulta en físico y la virtualización de **mi OBRA**, con el fin de incluirlo en el repositorio institucional de la Universidad del Tolima. Esta autorización se hace sin ánimo de lucro, con fines académicos y no implica una cesión de derechos patrimoniales de autor.

Manifestamos que se trata de una OBRA original y como de la autoría de LA OBRA y en relación a la misma, declara que la UNIVERSIDAD DEL TOLIMA, se encuentra, en todo caso, libre de todo tipo de responsabilidad, sea civil, administrativa o penal (incluido el reclamo por plagio).

Por su parte la UNIVERSIDAD DEL TOLIMA se compromete a imponer las medidas necesarias que garanticen la conservación y custodia de la obra tanto en espacios físico como virtual, ajustándose para dicho fin a las normas fijadas en el Reglamento de Propiedad Intelectual de la Universidad, en la Ley 23 de 1982 y demás normas concordantes.

La publicación de:

Trabajo de grado	<input checked="" type="checkbox"/>	Artículo	<input type="checkbox"/>	Proyecto de Investigación	<input type="checkbox"/>
Libro	<input type="checkbox"/>	Parte de libro	<input type="checkbox"/>	Documento de conferencia	<input type="checkbox"/>
Patente	<input type="checkbox"/>	Informe técnico	<input type="checkbox"/>		
Otro: (fotografía, mapa, radiografía, película, video, entre otros)					<input type="checkbox"/>

Fecha Versión 02: 04-11-2016

	<b>SISTEMA DE GESTION DE LA CALIDAD</b> <b>FORMATO DE AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL</b>	Página 2 de 3
		Código: GB-P04-F03
		Versión: 02

Producto de la actividad académica/científica/cultural en la Universidad del Tolima, para que con fines académicos e investigativos, muestre al mundo la producción intelectual de la Universidad del Tolima. Con todo, en mi condición de autor me reservo los derechos morales de la obra antes citada con arreglo al artículo 30 de la Ley 23 de 1982. En concordancia suscribo este documento en el momento mismo que hago entrega del trabajo final a la Biblioteca Rafael Parga Cortes de la Universidad del Tolima.

De conformidad con lo establecido en la Ley 23 de 1982 en los artículos 30 “**...Derechos Morales. El autor tendrá sobre su obra un derecho perpetuo, inalienable e irrenunciable**” y 37 “**...Es lícita la reproducción por cualquier medio, de una obra literaria o científica, ordenada u obtenida por el interesado en un solo ejemplar para su uso privado y sin fines de lucro**”. El artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, “**los derechos morales sobre el trabajo son propiedad de los autores**” y en su artículo 61 de la Constitución Política de Colombia.

- Identificación del documento:

**EVALUACIÓN DE INDICADORES MICROBIOLÓGICOS EN SUELOS DE UN ÁREA IMPACTADA POR LA MINERÍA DE ORO, EN EL MUNICIPIO DE SANTA ISABEL- TOLIMA.**

Título completo: Trabajo de grado presentado para optar al título de:

**BIÓLOGO**

- Proyecto de Investigación correspondiente al Programa (No diligenciar si es opción de grado “Trabajo de Grado”):

\_\_\_\_\_

- Informe Técnico correspondiente al Programa (No diligenciar si es opción de grado “Trabajo de Grado”):

\_\_\_\_\_

- Artículo publicado en revista:

\_\_\_\_\_

- Capítulo publicado en libro:

\_\_\_\_\_

- Conferencia a la que se presentó:

\_\_\_\_\_

Fecha Versión 02: 04-11-2016

	<b>SISTEMA DE GESTION DE LA CALIDAD</b> <b>FORMATO DE AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL</b>	Página 3 de 3
		Código: GB-P04-F03
		Versión: 02

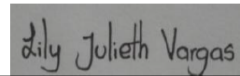
Quienes a continuación autentican con su firma la autorización para la digitalización e inclusión en el repositorio digital de la Universidad del Tolima, el:

Día: **25** Mes: **07** Año: **2017**

Autores:

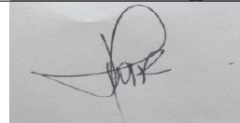
Firma

Nombre: **LILY JULIETH VARGAS OSORIO**



C.C. **1.110.558.213**

Nombre: **MARYEIMY VARÓN LÓPEZ**



C.C. **28.556.259**

Nombre:

C.C.

Nombre:

C.C.

El autor y/o autores certifican que conocen las derivadas jurídicas que se generan en aplicación de los principios del derecho de autor.

Fecha Versión 02: 04-11-2016