

**EFFECTO DE MICROORGANISMOS PROMOTORES DEL CRECIMIENTO  
VEGETAL EN *Acacia mangium*, *Leucaena leucocephala* y *Brachiara  
decumbens* EN SUELOS DEGRADADOS POR MINERÍA AURÍFERA DE  
ALUVIÓN**

**JOSALY ANDREA MORENO CASTRO  
BEATRIZ CECILIA BARRAZA AMADOR**

**UNIVERSIDAD LIBRE SECCIONAL BARRANQUILLA  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS  
MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA  
BARRANQUILLA - ATLÁNTICO  
2020**

**EFFECTO DE MICROORGANISMOS PROMOTORES DEL CRECIMIENTO  
VEGETAL EN *Acacia mangium*, *Leucaena leucocephala* y *Brachiara  
decumbens* EN SUELOS DEGRADADOS POR MINERÍA AURÍFERA DE  
ALUVIÓN**

**JOSALY ANDREA MORENO CASTRO  
BEATRIZ CECILIA BARRAZA AMADOR**

**Tesis de Grado presentado para optar el título de  
MAGISTER EN BIOTECNOLOGÍA**

**Docente  
PhD NELSON WALTER OSORIO VEGA**

**Docente  
MSc ANA MERCEDES MEDINA BUELVAS**

**UNIVERSIDAD LIBRE SECCIONAL BARRANQUILLA  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS  
MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA  
BARRANQUILLA - ATLÁNTICO  
2020**

**NOTA DE ACEPTACIÓN**

---

---

---

---

---

---

---

Firma del Presidente del Jurado

---

Firma del Jurado

---

Firma del Jurado

Barranquilla,

## TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN .....	14
JUSTIFICACIÓN.....	16
HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN.....	18
OBJETIVOS.....	19
OBJETIVO GENERAL .....	19
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	20
1 MARCO TEÓRICO.....	22
1.1 ESTADO ACTUAL DE LA PRODUCCIÓN MINERA AURÍFERA A ESCALA MUNDIAL .....	22
1.2 DEGRADACIÓN DE LOS SUELOS POR LA MINERÍA AURÍFERA .....	22
1.3 EFECTOS NEGATIVOS DE LA EXPLOTACIÓN MINERA AURÍFERA SOBRE LAS PROPIEDADES FÍSICAS DEL SUELO .....	23
1.4 PROBLEMAS NUTRICIONALES DEL SUELO OCASIONADOS POR LA EXPLOTACIÓN MINERA AURÍFERA .....	23
1.5 PROBLEMAS DE TOXICIDAD OCASIONADOS POR LA EXPLOTACIÓN MINERA AURÍFERA.....	23
1.6 RECUPERACIÓN DE SUELOS DEGRADADOS POR MINERÍA AURÍFERA MEDIANTE PROCESOS NATURALES.....	24
1.7 RECUPERACIÓN DE SUELOS DEGRADADOS POR MINERÍA AURÍFERA MEDIANTE PROCESOS ASISTIDOS.....	25
1.8 BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL.....	25
1.9 MECANISMOS DE PROMOCIÓN VEGETAL .....	26
1.10 MECANISMOS DIRECTOS .....	27
1.10.1 FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO .....	27
1.10.2 SOLUBILIZACIÓN DE FOSFATO .....	30
1.10.3 PRODUCCIÓN DE FITOHORMONAS .....	30
1.11 MECANISMOS DE ACCIÓN INDIRECTOS.....	31
1.12 HONGOS PROMOTORES DEL CRECIMIENTO VEGETAL .....	31
1.12.1 HONGOS SOLUBILIZADORES DE FOSFATO (HSF).....	32
1.12.2 HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES.....	33
1.13 CONTRIBUCIÓN DE LOS MICROORGANISMOS PROMOTORES DEL CRECIMIENTO VEGETAL EN LA REDUCCIÓN DE LA DEGRADACIÓN AMBIENTAL.....	35

1.14 PLANTAS PIONERAS EN PROGRAMAS DE FITOESTABILIZACIÓN DE RELAVES MINEROS.....	36
2 METODOLOGÍA.....	39
2.1 TIPO DE ESTUDIO .....	39
2.2 LOCALIZACIÓN .....	39
2.3 SUELO .....	39
2.4 MATERIAL VEGETAL .....	39
2.5 INÓCULOS MICROBIANOS .....	40
2.6 TRATAMIENTOS .....	40
2.7 VARIABLES .....	40
2.8 DISEÑO EXPERIMENTAL .....	41
2.9 ANÁLISIS DE DATOS .....	41
3 RESULTADOS .....	42
3.1 CARACTERIZACIÓN DEL SUELO DE MINERÍA AURÍFERA .....	42
3.2 <i>LEUCAENA LEUCOCEPHALA</i> .....	42
3.3 <i>ACACIA MANGIUM</i> .....	50
3.4 <i>BIOFERTILIZANTE SRACHIARIA DECUMBENS</i> .....	52
4 DISCUSIÓN .....	55
CONCLUSIONES .....	59
RECOMENDACIONES .....	60
BIBLIOGRAFÍA .....	61
ANEXOS .....	72

## LISTAS DE TABLAS

<b>Tabla 3. 1.</b> Niveles de significancia (P-value) de los tratamientos obtenido de los análisis de varianza de cada una de las variables estudiadas en plántulas de <i>Leucaena leucocephala</i> .....	42
<b>Tabla 3.2.</b> Niveles de significancia (P-value) de los tratamientos obtenido de los análisis de varianza de cada una de las variables estudiadas en plántulas de <i>Acacia mangium</i> .....	50
<b>Tabla 3.3.</b> Niveles de significancia (P-value) de los tratamientos obtenido de los análisis de varianza de cada una de las variables estudiadas en plantas de <i>Brachiaria decumbens</i> .....	52

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 3.1.** Altura de plantas de *Leucaena* en función de los tratamientos con inoculación individual y combinada de un hongo micorrizal (HM), un microorganismo solubilizador de minerales (MSM) y una bacteria promotora de crecimiento vegetal (PGPB). Cada columna representa el promedio de 10 repeticiones. Las barras representan el error estándar. NS: indica que no hubo efecto significativo de los tratamientos. ....43
- Figura 3.2.** Diámetro de plantas de *Leucaena* en función de los tratamientos con inoculación individual y combinada de un hongo micorrizal (HM), un microorganismo solubilizador de minerales (MSM) y una bacteria promotora de crecimiento vegetal (PGPB). Cada columna representa el promedio de 10 repeticiones. Las barras representan el error estándar. NS: indica que no hubo efecto significativo de los tratamientos. ....43
- Figura 3.3.** Concentración de fósforo foliar de plantas de leucaena en función de los tratamientos con inoculación individual y combinada de un hongo micorrizal (HM), un microorganismo solubilizador de minerales (MSM) y una bacteria promotora de crecimiento vegetal (PGPB). Cada columna representa el promedio de 10 repeticiones. Las barras representan el error estándar. Las columnas con letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas según la prueba de rangos múltiples de Duncan ( $P<0.05$ ). ....44
- Figura 3.4.** Contenido de fósforo en la parte aérea (CPA) de plantas de *Leucaena* en función de los tratamientos con inoculación individual y combinada de un hongo micorrizal (HM), un microorganismo solubilizador de minerales (MSM) y una bacteria promotora de crecimiento vegetal (PGPB). Cada columna representa el promedio de 10 repeticiones. Las barras representan el error estándar. Las columnas con letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas según la prueba de rangos múltiples de Duncan ( $P<0.05$ ). ....45
- Figura 3.5.** Masa seca radical (MSR) de plantas de *Leucaena* en función de los tratamientos con inoculación individual y combinada de un hongo micorrizal (HM), un microorganismo solubilizador de minerales (MSM) y una bacteria promotora de crecimiento vegetal (PGPB). Cada columna representa el promedio de 10 repeticiones. Las barras representan el error estándar. Las columnas con letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas según la prueba de rangos múltiples de Duncan ( $P<0.05$ ). ....46
- Figura 3.6.** Masa seca aérea (MSA) de plantas de *Leucaena* en función de los tratamientos con inoculación individual y combinada de un hongo micorrizal (HM), un microorganismo solubilizador de minerales (MSM) y una bacteria promotora de crecimiento vegetal (PGPB). Cada columna representa el promedio de 10 repeticiones. Las barras representan el error estándar. Las columnas con letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas según la prueba de rangos múltiples de Duncan ( $P<0.05$ ). ....47

<b>Figura 3.7.</b> Colonización micorrizal (%) de plantas de <i>Leucaena</i> en función de los tratamientos con inoculación individual y combinada de un hongo micorrizal (HM), un microorganismo solubilizador de minerales (MSM) y una bacteria promotora de crecimiento vegetal (PGPB). Cada columna representa el promedio de 10 repeticiones. Las barras representan el error estándar. Las columnas con letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas según la prueba de rangos múltiples de Duncan ( $P<0.05$ ).....	48
<b>Figura 3.8.</b> A. Raíces de plantas de <i>leucaena</i> inoculadas con el microorganismo solubilizador de minerales (MSM). B: Raíces de plantas de <i>leucaena</i> del control no inoculado. ....	49
<b>Figura 3.9.</b> Altura de plantas de <i>Acacia mangium</i> en función de los tratamientos con inoculación individual y combinada de un hongo micorrizal (HM), un microorganismo solubilizador de minerales (MSM) y una bacteria promotora de crecimiento vegetal (PGPB). Cada columna representa el promedio de 10 repeticiones. Las barras representan el error estándar. NS: indica que no hubo efecto significativo de los tratamientos. ....	50
<b>Figura 3.10.</b> Diámetro de plantas de <i>Acacia mangium</i> en función de los tratamientos con inoculación individual y combinada de un hongo micorrizal (HM), un microorganismo solubilizador de minerales (MSM) y una bacteria promotora de crecimiento vegetal (PGPB). Cada columna representa el promedio de 10 repeticiones. Las barras representan el error estándar. NS: indica que no hubo efecto significativo de los tratamientos. ....	51
<b>Figura 3.11.</b> Masa seca aérea (MSA) de plantas de <i>acacia</i> en función de los tratamientos con inoculación individual y combinada de un hongo micorrizal (HM), un microorganismo solubilizador de minerales (MSM) y una bacteria promotora de crecimiento vegetal (PGPB). Cada columna representa el promedio de 10 repeticiones. Las barras representan el error estándar. Las columnas con letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas según la prueba de rangos múltiples de Duncan ( $P<0.05$ ).....	51
<b>Figura 3.12.</b> Masa seca radical (MSR) de plantas de <i>acacia</i> en función de los tratamientos con inoculación individual y combinada de un hongo micorrizal (HM), un microorganismo solubilizador de minerales (MSM) y una bacteria promotora de crecimiento vegetal (PGPB). Cada columna representa el promedio de 10 repeticiones. Las barras representan el error estándar. Las columnas con letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas según la prueba de rangos múltiples de Duncan ( $P<0.05$ ).....	52
<b>Figura 3.13.</b> Altura de plantas de <i>Brachiaria decumbens</i> en función de los tratamientos con inoculación individual y combinada de un hongo micorrizal (HM), un microorganismo solubilizador de minerales (MSM) y una bacteria promotora de crecimiento vegetal (PGPB). Cada columna representa el promedio de 10 repeticiones. Las barras representan el error estándar. NS: indica que no hubo efecto significativo de los tratamientos. ....	53
<b>Figura 3.14.</b> Masa seca aérea (MSA) de plantas de <i>Brachiaria decumbens</i> en función de los tratamientos con inoculación individual y combinada de un hongo micorrizal (HM), un microorganismo solubilizador de minerales (MSM) y una bacteria	

promotora de crecimiento vegetal (PGPB). Cada columna representa el promedio de 10 repeticiones. Las barras representan el error estándar. NS: indica que no hubo efecto significativo de los tratamientos. ....53

**Figura 3.15.** Masa seca radical (MSR) de plantas de *Brachiaria decumbens* en función de los tratamientos con inoculación individual y combinada de un hongo micorrizal (HM), un microorganismo solubilizador de minerales (MSM) y una bacteria promotora de crecimiento vegetal (PGPB). Cada columna representa el promedio de 10 repeticiones. Las barras representan el error estándar. NS: indica que no hubo efecto significativo de los tratamientos. ....54

## LISTA DE ANEXOS

<b>Anexo. 1.</b> Resultado del análisis fisicoquímico de la muestra de suelos.....	73
<b>Anexo. 2.</b> Imágenes del lugar de muestreo del suelo (Mina abandonada) .....	74
<b>Anexo. 3.</b> Montaje de bolsas con suelo y materia orgánica .....	75
<b>Anexo. 4.</b> Plantas con 20 días de crecimiento. ....	75
<b>Anexo. 5.</b> Plantas con 60 días de crecimiento. ....	75
<b>Anexo. 6.</b> Comparación de los tratamientos de las plantas de <i>Leucaena leucocephala</i> . ....	76
<b>Anexo. 7.</b> Comparación de los tratamientos de las plantas de <i>Acacia mangium</i> ..	76
<b>Anexo. 8.</b> Comparación de los tratamientos de las plantas de <i>Brachiaria decumbens</i> . ....	76
<b>Anexo. 9.</b> Raíces de leucaena colonizadas con <i>Rhizoglofus fasciculatum</i> .....	77

## GLOSARIO

**BACTERIAS DIAZÓTROFAS:** Bacterias capaces de fijar el nitrógeno atmosférico y reducirlo a amonio.

**BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL:** Bacterias que al ser inoculadas directamente sobre las semillas o en raíces y hojas, aportan efectos positivos en el crecimiento y desarrollo de una planta.

**BIOFERTILIZANTES:** Término que hace referencia al uso de microorganismos del suelo para incrementar la disponibilidad y toma de nutrientes en las plantas.

**BIORREMEDIACION:** Proceso que utiliza microorganismos, plantas o las enzimas derivadas de ellos para retornar un ambiente alterado por contaminantes a su condición natural.

**COLONIZACIÓN MICORRIZAL:** Proceso de penetración, desarrollo y establecimiento de un hongo micorrízico dentro del córtex de la raíz de una planta.

**FITOHORMONAS:** Hormonas vegetales que coordinan y regulan la actividad de los órganos y los mecanismos fisiológicos de las plantas.

**FITOESTABILIZACIÓN:** Tipo de fitorremediación en la cual las plantas inmovilizan en sus raíces contaminantes presentes en el suelo mediante mecanismos de absorción y acumulación.

**FITORREMEDIACIÓN:** Tipo de biorremediación que utiliza plantas y microorganismos asociados para secuestrar y extraer compuestos tóxicos de ambientes contaminados.

**MICORRIZAS:** Asociaciones simbióticas mutualistas entre las raíces de las plantas terrestres y ciertos hongos del suelo.

**MICORRIZAS ARBUSCULARES:** Asociaciones simbióticas ubicuas entre los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) y más del 90% de las plantas superiores terrestres.

**MICROORGANISMOS ENDÓFITOS:** Microorganismos que se desarrollan dentro de las células corticales de las raíces de las plantas o dentro de estructuras denominadas nódulos.

**MICROORGANISMOS SOLUBILIZADORES DE FOSFATO:** Microorganismos con capacidad para realizar la solubilización de las formas insolubles de fosfato.

**MINERÍA AURÍFERA DE ALUVIÓN:** Explotación minera de oro a cielo abierto a partir de depósitos dejados por corrientes fluviales.

**PLANTAS LEGUMINOSAS:** Plantas de la familia *Leguminosae* o *Fabaceae* cuyas semillas se desarrolla dentro de un fruto llamado vaina.

**PLANTAS PIONERAS:** Plantas de crecimiento rápido capaces de adaptarse rápidamente en ambientes que han sido alterados.

**RIZOBACTERIAS:** Bacterias colonizadoras de raíces.

**RIZOBACTERIAS DELETÉREAS:** Rhizobacterias, que causan deterioro en el desarrollo vegetal por producción de metabolitos fitotóxicos.

**RIZOSFERA:** Porción del suelo que rodea a una raíz en la que se dan interacciones únicas y dinámica entre esta y los microorganismos edáficos.

**RIZOPLANO:** Microambiente en la superficie de una raíz.

## RESUMEN

La explotación minera de oro aluvial degrada los suelos, afectando el desarrollo vegetal y los servicios ecosistémicos de una región. Una alternativa biotecnológica para restablecer y recuperar estos suelos es la reforestación con plantas que, al ser inoculadas con microorganismos benéficos promotores del crecimiento vegetal, puedan crecer, adaptarse y establecerse en estos ambientes. Con el objetivo de evaluar los efectos de la inoculación individual y combinada de *Azospirillum brasilense*, *Mortierella* sp., *Rhizogloium fasciculatum* sobre el crecimiento y absorción de fósforo en *Acacia mangium*, *Leucaena leucocephala* y *Brachiara decumbens* se realizaron experimentos en invernadero, como estrategia para la producción de plántulas útiles en el restablecimiento de la cubierta vegetal en suelos degradados por minería aurífera en Istmina, Chocó. El diseño experimental fue completamente al azar y consistió en la inoculación de plántulas cultivadas en un suelo degradado por minería aurífera, con tratamientos individuales, duales y triples de los microorganismos. Los resultados mostraron efectos significativos sobre plántulas de *L. leucocephala*, pero no en *A. mangium* y *B. decumbens*. Se observó promoción significativa ( $P < 0.05$ ) en el crecimiento aéreo y radical de *Leucaena* con las inoculaciones duales HM+PGPB y MSM+PGPB; y en la absorción de fósforo con las individuales (HM, MSM o PGPB). La triple inoculación no tuvo efectos significativos sobre las variables estudiadas. Con base en lo encontrado se plantea que el crecimiento y nutrición de plantas en suelos degradados por minería aurífera puede ser mejorado mediante la inoculación con microorganismos benéficos. Los efectos dependen de los tratamientos y de la especie vegetal utilizada.

**Palabras clave:** biofertilizantes, *Acacia mangium*, *Leucaena leucocephala* y *Brachiara decumbens*.

## INTRODUCCIÓN

La minería aurífera ha generado controversia en los últimos años, debido a la huella que deja en el ambiente y en salud humana (DÍAZ-ARRIAGA, 2014). La explotación de oro en Colombia ha aumentado significativamente en los últimos años, siendo uno de los principales productores en Latinoamérica. Por ejemplo, en 2016 se reportó una producción nacional de 61.8 toneladas; en el 2018 de 9.4 toneladas y para el segundo trimestre del 2019 se reportó una caída del 7,2% obteniéndose una producción de 8.7 toneladas. La meta de la institucionalidad minera es aumentar la producción del metal precioso, pero enmarcado únicamente en la legalidad (Oficina de las Naciones Unidas, 2016) (Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (UNODC), 2019) (AGENCIA NACIONAL DE MINERÍA, 2019). El departamento del Chocó ocupa el primer lugar con el mayor porcentaje de evidencia de explotación de oro aluvial detectada; sin embargo, es en Antioquia donde se registra la mayor producción de oro con un 41% en la producción total nacional, seguido del Chocó con un 39% (Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (UNODC), 2019).

La explotación aurífera aluvial se caracteriza por el traslado de grandes cantidades de material y su acumulación en depósitos, creando huecos y escombreras que alteran la fisiografía de la zona y las características productivas del terreno. Esta actividad trae como consecuencias graves problemas ambientales, ecológicos y paisajísticos (CANTERO, RHENALS, & MORENO, 2015), dentro de los cuales se destacan la contaminación, lodificación de ríos, pérdidas de suelos con su capa vegetal, desplazamiento de la fauna, cambios de la microbiota y la flora del lugar entre otros (ALVAREZ-BERRÍOS, y otros, 2016).

El material de depósito (componentes del suelo previo) que se deposita sobre la superficie se caracteriza por una baja porosidad, lo cual altera la actividad de los microorganismos edáficos que podría permanecer. Una disminución en el contenido de materia orgánica debido al retiro de los horizontes O y A, así como cambios en la estructura del suelo y de sus condiciones físicoquímicas suelen también suceder como consecuencia de la explotación minera de aluvión (DAZA & OSORIO, 2011) (MARTÍNEZ & CASALLAS, 2018). El retiro del horizonte A ocasiona además alteraciones bioquímicas en los horizontes B o C debido a la percolación de agua y de otros componentes no naturales del suelo (MARTÍNEZ & CASALLAS, 2018). Estos terrenos deteriorados por la explotación minera aurífera de aluvión se denominan pasivos ambientales y corresponden a lugares donde se ve la necesidad de realizar una restauración, por causa de una actividad extractiva o minera, que pone en riesgo la calidad de vida, la salud o los bienes públicos o privados (MARTÍNEZ & CASALLAS, 2018).

Los procesos de cianuración y amalgamación empleados en la minería de aluvión generan residuos de metales pesados particularmente mercurio y en algunos casos

de cianuro. Además de tener efectos nocivos a nivel de toda la cadena trófica, se precipitan y persisten en el medio por largos períodos de tiempo, dificultando en gran manera el restablecimiento de la vegetación y la actividad biológica de estos suelos (DAZA & OSORIO, 2011) (BELTRÁN PINEDA & GOMEZ-RODRIGUEZ, 2016).

Como solución a esta problemática ambiental, se han buscado diferentes alternativas destinadas a mitigar los impactos negativos que genera la extracción aurífera (VALOIS-CUESTA & MARTÍNEZ-RUIZ, 2016). Una de las más utilizadas es la plantación de especies vegetales nativas del lugar perturbado y el restablecimiento de la vegetación del sotobosque nativo mediante la siembra, la plantación o la colocación directa de materiales del suelo superficial (Vargas Ríos, 2011), con el fin de mejorar el comportamiento físico del suelo, incrementar la disponibilidad de nutrientes y promover el crecimiento vegetal, para así reestablecer los ciclos biogeoquímicos alterados (MACDONALD, y otros, 2015).

Los microorganismos promotores del crecimiento vegetal se constituyen en la actualidad en otra novedosa alternativa ante los problemas ocasionados por la minería de aluvión, por los múltiples beneficios que estos ofrecen al suelo. Dentro de estos podemos mencionar su capacidad de fijar nitrógeno, ya sea de manera libre o simbiótica, la solubilización de nutrientes como el fósforo y otros, permitiendo con esto reducir la utilización de fuentes externas (fertilizantes) que pueden tener efectos perjudiciales para los ecosistemas (OSORIO, 2014). El uso de los biofertilizantes permitiría establecer plantas en suelos degradados en un tiempo muy corto, mejorando así la capacidad de retención de agua creando la capa superficial del suelo y permitiéndole a las plantas adaptarse a los bajos niveles de nutrientes y a las características químicas y físicas de estos ambientes deteriorados (GARBISU, BECERRIL, EPELDE, & ALKORTA, 2007).

Ante la problemática ambiental generada por la actividad minera, el siguiente trabajo de grado se plantea con la finalidad de generar conocimiento de los procesos que se podrían llevar a cabo para regular la restauración ecológica de áreas afectadas por la minería aurífera en el departamento del Chocó (Colombia), mediante el uso de plantas pioneras inoculadas con microorganismos promotores del crecimiento vegetal. Este documento constituye uno de los primeros avances en el conocimiento del uso conjunto de plantas pioneras y microorganismos benéficos del suelo para la restauración de áreas afectadas por minería en el departamento del Chocó, y se espera que sea un punto de inicio para el desarrollo de programas de restauración de suelos en los territorios que han sido y serán impactados por la actividad minera.

## JUSTIFICACIÓN

Este proyecto se fundamenta en la ley 99 de 1993, que en su artículo primero manifiesta que “la biodiversidad del país, por ser patrimonio nacional y de interés de la humanidad, deberá ser protegida prioritariamente y aprovechada en forma sostenible” (Constitución Política de Colombia, 1991). Además, apunta hacia el numeral 15 de los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) u Objetivos Mundiales del Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo (PNUD), el cual establece que se debe proteger, restaurar y promover la utilización sostenible de los ecosistemas terrestres, gestionar de manera sostenible los bosques, combatir la desertificación y detener y revertir la degradación de la tierra, y frenar la pérdida de diversidad biológica (Oficina de las Naciones Unidas, 2016).

En Colombia actualmente la minería despierta un gran interés, debido a los impactos sociales y ambientales que ésta deja (Álvarez Dávila & Pérez, 2012); como por ejemplo los suelos de la vereda Peradó en el municipio de Istmina-Chocó han sido sometidos a un proceso intenso de minería de aluvión para la extracción de oro, lo cual ha causado serios deterioros en el ambiente en esta zona considerada uno de los hotspots de biodiversidad más importantes del mundo (Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (UNODC), 2019). Para devolver la sostenibilidad a estos ecosistemas deteriorados por las malas prácticas mineras se hace necesario restablecer las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo para que este pueda brindar los nutrientes y las condiciones necesarias para el crecimiento y establecimiento vegetal (MARTÍNEZ & CASALLAS, 2018).

Se ha observado que especies introducidas como *Acacia mangium* presentan alta capacidad para adaptarse y competir frente a especies nativas, favoreciendo la fertilidad de los depósitos mineros (VALOIS-CUESTA & MARTÍNEZ-RUIZ, 2016). Por otra parte, se sabe que *Leucaena leucocephala* que es una planta de crecimiento rápido se utiliza para la reforestación de zonas erosionadas, debido a su fácil adaptación a diferentes ambientes, gracias a que su sistema radical establece simbiosis con diversos microorganismos que aumentan su tolerancia a condiciones ambientales adversas (AGUIRRE-MEDINA, GÁLVEZ-LÓPEZ, & IBARRA-PUÓN, 2018). *Brachiara decumbens* es otra especie que por su excelente cobertura vegetal, resistencia a la sequía y gran producción de masa seca es utilizada también en la reforestación y recuperación de suelos (LEAL PINHEIRO, y otros, 2018).

Las cualidades anteriormente mencionadas de estas tres especies vegetales las catalogan como plantas promisorias por tener potencial para reforestación productiva en zonas degradadas de selva donde hubo explotación minera (GARATE, 2011) (CASTEBLANCO, 2018).

Para la recuperación de estos depósitos de suelos se han inoculado algunas especies vegetales con microorganismos promotores del crecimiento vegetal, los cuales permiten una mejor adaptación de las plantas a este tipo de ecosistemas (ZANGARO, NISIZAKI, DOMINGOS, & NAKANO, 2003) (SALIFU & TIMMER, 2001). En Colombia, son pocos los trabajos que se han realizados para la recuperación de suelos degradados por minería en el departamento del Chocó; por esto se hace necesario evaluar los efectos de la biofertilización con microorganismos promotores del crecimiento vegetal sobre especies promisorias para plantear futuras estrategias de reforestación agrosostenible de estos ambientes (LEÓN, DÍEZ, CASTELLANO, OSORIO, & MARÍN , 2008).

Los resultados de esta investigación son de utilidad para la formulación de nuevos modelos de restauración de suelos degradados por minería de oro de aluvión (Juan; León, Díez, Castellano, Osorio, & Marín, 2008). Además, generaría información valiosa para incorporar estas especies en programas de reforestación y recuperación de los ecosistemas degradados en el corregimiento de Peradó localizado en el municipio de Istmina–Chocó.

## **HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN**

El crecimiento y nutrición de plántulas en suelos degradados por minería aurífera puede ser mejorado a través de la inoculación con microorganismos benéficos. Los efectos dependen de la inoculación individual o combinada de estos microorganismos y del tipo de planta.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Mejorar el crecimiento y la adaptación de *Acacia mangium*, *Leucaena leucocephala*, *Brachiaria decumbens* en suelos degradados por minería aurífera de aluvión del municipio de Istmina, Chocó mediante la inoculación con *Azospirillum brasilense*, *Mortierella* sp. y *Rhizogloium fasciculatum*.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar el efecto de la inoculación individual y de las diferentes combinaciones de los microorganismos promotores del crecimiento vegetal sobre las plantas elegidas en etapa de vivero.
- Determinar cuáles de los tratamientos aplicados ejercen el mejor efecto sobre el crecimiento vegetal y la nutrición fosfórica en etapa de vivero.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El ser humano ha generado diversas estrategias para manipular y apropiarse de los distintos beneficios que brinda los ecosistemas del planeta (CARABIAS, ARRIAGA, & CERVANTES, 2007). Una de éstas es la explotación minera de oro aluvial o explotación a cielo abierto que ocasiona diversos problemas ambientales tales como alteración del paisaje, erosión del suelo, inhibición o reducción de la cobertura vegetal, contaminación de cauces de ríos y lagunas, deterioro de la calidad del agua superficial (ríos y quebradas), contaminación audiovisual, contaminación por hidrocarburos y deforestación (ÁLVAREZ DÁVILA & PÉREZ, 2012). La deforestación se ha convertido en una de las problemáticas importantes en los países en desarrollo y en todo el mundo, lo que se traduce en un incremento de los costos para la sociedad y el estado (COOKE & JOHNSON, 2002).

Según informes de Gobierno de Colombia en cabeza del Ministerio de Justicia y del Derecho y en alianza con la Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (UNODC), en Colombia existe una gran preocupación gubernamental por el reciente auge de la explotación aurífera de aluvión en el territorio nacional, la cual además de no estar enmarcada en la normatividad vigente para el desarrollo de esta actividad, es uno de los principales motores de pérdida de coberturas en Colombia. Al 2019 Colombia tenía 98.000 hectáreas afectadas por la explotación de oro de aluvión distribuidas en 14 de los 32 departamentos del país; el 77% se encuentran en dos departamentos Antioquia (41%) y Chocó (39%). En el departamento del Chocó 23 de sus 30 municipios están afectados por esta práctica, concentrada en 10 municipios como son Nóvita, Cantón de San Pablo, Istmina, Unión Panamericana, Río Quito, Condoto, Medio Atrato, Quibdó, Medio San Juan y Tadó (Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (UNODC), 2019) (Oficina de las Naciones Unidas, 2016) poniendo en riesgo una de las zonas más megadiversas con ecosistemas estratégicos para la conservación hídrica y muchas especies de flora y fauna que actualmente están incluidas en los libros rojos de especies en peligro de extinción (VALOIS-CUESTA & MARTÍNEZ-RUIZ, 2016).

Por otra parte, se sabe que los suelos quedan completamente erosionados, con escasa materia orgánica en sus horizontes superficiales, pérdida de buena parte del banco natural de semillas y el componente microbiológico seriamente afectados (VALOIS-CUESTA & MARTÍNEZ-RUIZ, 2016). Cambios en las propiedades químicas, biológicas y físicas, como la estructura del suelo limitan el crecimiento vegetal y, por ende, la reforestación y el establecimiento exitoso de actividades agrícolas y pecuarias se ven también afectados (LEÓN, DÍEZ, CASTELLANO, OSORIO, & MARÍN, 2008).

Como consecuencia de la explotación de oro de aluvión en la vereda de Peradó (municipio de Istmina, Chocó) se encuentran grandes extensiones de suelos degradados en los que se observan ausencia de vegetación arbórea y un escaso desarrollo de plantas de pequeño y mediano tamaño tipo hierbas (VALOIS-CUESTA

& MARTÍNEZ-RUIZ, 2016). Entre las pocas plantas que predominan en estos terrenos se distingue *Scleria secans* perteneciente a la familia *Cyperaceae* (plantas típicas de los trópicos) (Ramirez, Klinger, & Valois, 2016), conocida vulgarmente en Colombia como cortadera, la cual es común en ambientes abiertos, húmedos o inundados, principalmente bosques con luz difusa, pero que también se desarrolla en ambientes relativamente secos (AFFONSO, ZANIN, BRUMMITT, & ARAÚJO, 2015).

Una de las estrategias biotecnológicas utilizadas para disminuir los impactos de esta deforestación es la restauración, cuya intención es mejorar la estructura del suelo, incrementar la disponibilidad de nutrientes y promover el crecimiento vegetal, para así reestablecer los ciclos biogeoquímicos (OSORIO, 2014). Asociado a esto se usan hongos endomicorrizales que mejoran la capacidad de las plantas para absorber agua y nutrientes de baja movilidad como el fósforo (OSORIO & HABTE, 2013), bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno atmosférico (N<sub>2</sub>), microorganismos solubilizadores de minerales, productores de fitohormonas y control biológico (OSORIO, 2014). La restauración de estos ambientes trae múltiples beneficios tales como la captura de gases de efecto invernadero, la purificación del aire, el mejoramiento del paisaje, el mantenimiento de la fertilidad del suelo, la conservación del suelo frente a la erosión, el refugio para fauna, la regulación hídrica y el ciclaje de nutrientes (ÁLVAREZ DÁVILA & PÉREZ, 2012).

Entre los factores que se podrían mejorar con la restauración de estos ambientes mediante la biofertilización de plantas pioneras, está la reducción de compuestos mercuriales utilizados ampliamente en la minería de aluvión en el departamento del Chocó (LEÓN, DÍEZ, CASTELLANO, OSORIO, & MARÍN, 2008) (BELTRÁN PINEDA & GOMEZ-RODRIGUEZ, 2016). Esto se debe a que las plantas utilizadas en esta investigación se caracterizan por retener estos contaminantes vía absorción por las raíces o por su precipitación dentro de la rizosfera, evitándose de esta manera su migración a otros ambientes (TANGAHU, y otros, 2011).

Por todo lo anteriormente planteado el propósito de esta investigación fue evaluar los efectos de la inoculación de microorganismos promotores en el crecimiento y establecimiento de *Acacia mangium*, *Leucaena leucocephala* y *Brachiara decumbens*; con la finalidad de proponer especies vegetales promisorias y microorganismos promotores de crecimiento vegetal para la recuperación de suelos degradados por minería aurífera de aluvión en el departamento del Chocó.

# 1 MARCO TEÓRICO

## 1.1 ESTADO ACTUAL DE LA PRODUCCIÓN MINERA AURÍFERA A ESCALA MUNDIAL

Según informes del equipo de GFMS (Gold Fields Mineral Survey) al cierre del 2018, la producción minera mundial por año fue de 3,322 toneladas. A nivel mundial los principales países productores de oro son China, Australia, Rusia y en Suramérica, los principales productores son Perú, México, Brasil, Argentina y Colombia (GFMS GOLD SURVEY, 2019); siendo a nivel nacional el departamento del Chocó el segundo mayor exportador de oro y platino (Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (UNODC), 2019).

La minería aparte de traer grandes beneficios económico también causa destrucción de los ecosistemas naturales mediante la degradación del suelo y eliminación de la vegetación con graves consecuencias para el ambiente y las comunidades aledañas a los sitios de explotación (MARTÍNEZ & CASALLAS, 2018).

## 1.2 DEGRADACIÓN DE LOS SUELOS POR LA MINERÍA AURÍFERA

El suelo o capa superficial de la corteza terrestre, es considerado un recurso natural indispensable que debe ser protegido, y conservado con la finalidad de mantener su calidad y productividad (ALCALDE, 2015). La actividad humana suele romper el equilibrio dinámico de este cuerpo natural provocando una disminución constante de sus propiedades (CAMARGO, ARIAS, & MUÑOZ, 2015). La minería intensiva es una gran amenaza para las propiedades físico, químicas y biológicas del suelo; debido a que destruye la cubierta vegetal, provoca pérdida o disminución de la materia orgánica, pérdida de la estructura del suelo, erosión y acumulación de sustancias tóxicas (IZQUIERDO, CARAVACA , ALGUACIL , HERNÁNDEZ, & ROLDÁN, 2005) (BERNAL, 2014).

La naturaleza física y química de los sustratos derivados de las operaciones mineras presentan diversas alteraciones, debido a que la textura física puede ser muy grueso como en algunos desechos de roca, intermedios como en desechos de arena, o muy finos como en los relaves molidos (COOKE & JOHNSON, 2002). La textura fina y la ausencia de materia orgánica pueden llevar a densidades aparentes altas, compactación extrema, bajo nivel de agua y tasas de infiltración, y anegamiento superficial. Casi todos los sustratos de las minas tienen niveles muy bajos de macronutrientes (especialmente nitrógeno (N), fósforo (P), y potasio (K)) (COOKE & JOHNSON, 2002).

En los últimos 70 años se ha dado a nivel mundial un incremento en la explotación de metales y minerales de los cuales depende la economía de muchos países. En Colombia, el departamento del Chocó ocupa el segundo lugar dentro de la

producción colombiana de oro y platino (Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (UNODC), 2019). Región que se ha caracterizado por ser uno de los lugares en recursos biológicos más ricos del planeta (RANGEL-CH & RIVERA DÍAZ, 2004), así como en yacimientos de oro y platino, lo que ha llamado la atención de empresas mineras nacionales e internacionales, las cuales llevan a cabo acciones de explotación causando deterioro ambiental (ANDRADE & G, 2011) (VALOIS-CUESTA & MARTÍNEZ-RUIZ, 2016). La eliminación de los residuos generados de esta explotación son los que causan las mayores perturbaciones sobre el suelo. La disposición de rocas y sobrecargas, la construcción de embalses y diques para los relaves finos (<0.1 mm) producidos a partir de las operaciones de molienda y la eliminación de escorias desde las etapas de fundición y refinación pueden involucrar grandes áreas de suelo, ocasionando problemas físicos, nutricionales y de toxicidad (COOKE & JOHNSON, 2002).

### **1.3 EFECTOS NEGATIVOS DE LA EXPLOTACIÓN MINERA AURÍFERA SOBRE LAS PROPIEDADES FÍSICAS DEL SUELO**

Dentro de los efectos negativos de la explotación aurífera se encuentra la compactación del suelo generada por las grandes presiones ejercidas por la maquinaria pesada al momento de transportar los residuos de las minas (alrededor de 5 kg cm<sup>-2</sup> de suelos). La compactación es por lo tanto inevitable, y se ve agravada además por la textura fina y la falta de materia orgánica. Densidades aparentes del suelo de más de 1.8 normalmente inhiben completamente el crecimiento de la raíz (BRADSHAW, 1997).

### **1.4 PROBLEMAS NUTRICIONALES DEL SUELO OCASIONADOS POR LA EXPLOTACIÓN MINERA AURÍFERA**

El contenido de nutrientes en los suelos degradados por minería, varía ampliamente dependiendo si provienen de subsuelos degradados o de sobrecargas no meteorológicas más profundas. Elementos nutricionales como el nitrógeno, fósforo, potasio, magnesio y calcio suelen ser deficientes en estos tipos de suelos (BRADSHAW, 1997).

### **1.5 PROBLEMAS DE TOXICIDAD OCASIONADOS POR LA EXPLOTACIÓN MINERA AURÍFERA**

Las sustancias químicas tóxicas residuales presentes en algunos desechos mineros pueden incluir peligros radiobiológicos que puede ser tóxico para animales y microorganismos edáficos. Entre los elementos tóxicos más comúnmente encontrados están el arsénico. (As), cadmio (Cd), cromo (Cr), cobre (Cu), plomo (Pb), mercurio (Hg), níquel (Ni), selenio (Se), plata (Ag) y zinc (Zn) (Cooke & Johnson 2002) los cuales generan un alto impacto en el ambiente. El Hg tiene una particularidad debido a que es altamente tóxico y su dispersión amenaza la salud

humana y del ambiente (DHANKHER, PILON-SMITS, MEAGHER, & DOTY, 2011) (PAISIO, GONZÁLEZ, TALANO, & AGOSTINI, 2012).

Todos estos problemas afectan al suelo, haciendo que no se dé el crecimiento de especies vegetales, por esta razón es importante que primero se identifiquen y alivien al terminar el proceso de extracción, de lo contrario, es posible que el proceso de restauración no comience o falle después de unos años. Si se diseña un adecuado proceso de restauración de estas áreas degradadas por minería se puede llevar a cabo a bajo costo, con una efectividad a largo plazo y así se pueda realizar una minería que no afecte tanto al ambiente (HINTON, VEIGA, & VEIGA, 2003). En la actualidad se han utilizado diferentes alternativas para la recuperación de suelos degradados por minería aurífera de aluvión, como son los procesos naturales y los asistidos (MARTÍNEZ & CASALLAS, 2018).

#### **1.6 RECUPERACIÓN DE SUELOS DEGRADADOS POR MINERÍA AURÍFERA MEDIANTE PROCESOS NATURALES**

La recuperación o restauración de los suelos degradados por la explotación minera puede dejarse a los procesos naturales; pero en la mayoría de los casos el proceso de sucesión natural es lento y es común que transcurran 50 o 100 años antes de que se desarrolle una cubierta vegetal satisfactorio (ASH, GEMMELL, & BRASHAW, 1994). En suelos donde hay una acidez extrema, los procesos de restauración ecológicos naturales sugieren que sólo sobreviven las especies de plantas y los microorganismos tolerantes a ésta acidez, creciendo y mejorando la estructura del suelo, ayudando así a los procesos de meteorización natural que alivian la acidez extrema (BRADSHAW, 1997). En suelos que contienen altas cantidades de metales pesados, se debe de realizar un proceso de colonización asistido, con el desarrollo de especies vegetales tolerantes a metales; permitiendo un adecuado desarrollo de las plantas y dando como resultado la producción de materia orgánica a través de la hojarasca que ayuda a reducir la toxicidad del metal creando un complejo metal – materia orgánica (DELGADILLO-LÓPEZ, GONZÁLEZ-RAMÍREZ, PRIETO-GARCÍA, VILLAGÓMEZ-IBARRA, & ACEVEDO-SANDOVAL, 2011) (JARA-PEÑA, y otros, 2014) la cual es uno de los procesos que determina el ciclaje de nutrientes para la nutrición vegetal y la conservación de la fauna del suelo (NORGROVE & HAUSER, 2000).

## 1.7 RECUPERACIÓN DE SUELOS DEGRADADOS POR MINERÍA AURÍFERA MEDIANTE PROCESOS ASISTIDOS

Para la recuperación de suelos degradados se puede utilizar una técnica que se basa en importar y esparcir la parte superior del suelo; siendo una operación demasiado costosa. También se puede dar un problema geotécnico debido a que cuando se extiende el suelo sobre un material subyacente diferente, se puede formar una discontinuidad hidráulica lo que lleva a una inestabilidad del lugar que puede ser peligroso para las personas que realizan los diferentes trabajos (BRADSHAW, 1997).

Para la recuperación de suelos degradados por minería aurífera se recomienda realizar un proceso asistido, aunque se debe tener en cuenta que incluso si las especies vegetales crecen naturalmente o son introducidas, generalmente hay poco crecimiento o incluso ninguno debido a la presencia de factores que inhiben el crecimiento de éstas (BRADSHAW, 1997).

Por este motivo se han creado diferentes estrategias que permitan la adaptación de estas especies vegetales trayendo como consecuencia un buen desarrollo de la planta (MARTÍNEZ & CASALLAS, 2018). Entre estas estrategias podemos encontrar la utilización de microorganismos promotores de crecimiento vegetal (MPCV); que constituyen un grupo de microorganismos edáficos que se desarrollan cerca de la raíz de las plantas, capaces de estimular su crecimiento y desarrollo mediante la modulación de los niveles de fitohormonas, mejora en la asimilación de nitrógeno fósforo y otros elementos minerales y protección frente a la acción de microorganismos patógenos entre otros beneficios (AHEMAD & KIBRET, 2014).

## 1.8 BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL

La sigla BPCV, encierra a una gran variedad de bacterias pertenecientes a un mismo grupo funcional, las cuales al ser inoculadas directamente sobre las semillas o en raíces y hojas, aportan efectos positivos en el crecimiento y desarrollo de una planta. Este término tiene un carácter amplio y es empleado en la actualidad por varios grupos de investigación (BASHAN & HOLGUIN, 1998), ya que abarca tanto a las bacterias colonizadoras de raíces o rizobacterias así como también bacterias de la rizosfera y del rizoplano. Las rizobacterias agrupan a todas las comunidades bacterianas, que al establecerse en las zonas aledañas a las raíces, tienen la capacidad de colonizarla y desarrollar interacciones entre sus diferentes poblaciones las cuales suelen ser benéficas, perjudiciales o en algunos casos neutras para el crecimiento de las plantas (RODRÍGUEZ & FRAGA, 1999).

Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal se identifican como **(PGPR)** por sus siglas en inglés (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) y se clasifican en extracelulares (ePGPR) las que se desarrollan en la rizosfera, el rizoplano o entre los espacios intercelulares de los tejidos corticales de las raíces de las plantas.

Diversos géneros bacterianos como *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Caulobacter*, *Chromobacterium*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* y *Serratia* pertenecen a PGPR (SINGH, 2013) (GRAY & SMITH, 2005).

El otro grupo lo conforman las intracelulares o (iPGPR) que se caracterizan por desarrollarse dentro de las células corticales o dentro de estructuras denominadas nódulos de manera endófitas. A este grupo pertenece la familia Rhizobiaceae que incluye los géneros *Allorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* y *Rhizobium*. Los endófitos y el género *Frankia* que se caracterizan por ser fijadores simbióticos de nitrógeno (GUPTA, SINGH PARIHAR, KUMAR AHIRWAR, KUMAR SNEHI, & SINGH, 2015). También suelen desarrollarse dentro de las semillas, tallos, hojas y frutos (Santoyo, Moreno-Hagelsieb, Orozco-Mosqueda, & Glick, 2016) ocupando los espacios apoplásticos intracelulares, dentro del tejido parenquimatoso y en los apoplastos de los vasos del xilema (LIU, y otros, 2008).

Existen otro grupo de rizobacterias conocidas como rizobacterias deletéreas DRB por las siglas en inglés Deleterious Rhizobacteria, que causan deterioro en el desarrollo vegetal debido a que producen metabolitos fitotóxicos que retrasan el crecimiento aéreo y de las raíces de las plantas (HOYOS CARVAJAL, 2012) (KREMER, 2006). Este grupo de rizobacterias son saprófitas y a diferencia de los verdaderos patógenos no parasitan ni penetran los tejidos vasculares (Kremer, 2006). Se hace necesario además diferenciar a las rizobacterias deletéreas de las denominadas bacterias alelopáticas que también son saprofitas que causan efectos negativos en los vegetales, pero a diferencia de las DRB no son bacterias colonizadoras de las raíces (BHATTACHARYYA & JHA, 2012).

Las PGPR son empleadas en la actualidad como biofertilizantes, término que aún no está muy claro pero que hace referencia a uso de microorganismos del suelo para incrementar la disponibilidad y toma de nutrientes en las plantas (SINGH, 2013). Cabe resaltar que no todas las PGPR son biofertilizantes, ya que existen PGPR que estimulan el crecimiento de los vegetales mediante la protección de microorganismo patógenos (VESSEY, 2003).

## **1.9 MECANISMOS DE PROMOCIÓN VEGETAL**

Los microorganismos pueden estimular el crecimiento vegetal de manera directa e indirecta. Los mecanismos directos incluyen procesos como la fijación biológica de nitrógeno atmosférico, producción de sideróforos, secreción de fitohormonas (citoquininas, auxinas y giberilinas) y enzimas, así como también la solubilización de minerales necesarios como el fósforo y la inducción de resistencia sistémica. (SANTOYO, MORENO-HAGELSIEB, OROZCO-MOSQUEDA, & GLICK, 2016). Por otro lado los mecanismos indirectos están direccionados hacia el control biológico de fitopatógenos o a su inhibición, mediante la producción de antibióticos, quelación de hierro disponible, secreción de enzimas hidrolíticas extracelulares que degradan

las paredes celulares de los hongos fitopatógenos, síntesis de compuestos volátiles altamente inhibidores de patógenos y reducción de los niveles de etileno en la planta (BHATTACHARYYA & JHA, 2012) (SANTOYO, MORENO-HAGELSIEB, OROZCO-MOSQUEDA, & GLICK, 2016).

## 1.10 MECANISMOS DIRECTOS

Los mecanismos directos de promoción vegetal incluyen:

### 1.10.1 FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO

La fijación biológica de nitrógeno (FBN) corresponde a la reducción enzimática de nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ) a amonio ( $NH_4$ ) y puede ser llevada a cabo por bacterias simbióticas y por bacterias de vida libre, siendo las primeras la que mayor cantidad de nitrógeno fijan por hectárea anualmente (GUPTA, SINGH PARIHAR, KUMAR AHIRWAR, KUMAR SNEHI, & SINGH, 2015). El proceso de fijación es realizado por la enzima nitrogenasa, cuya síntesis y funcionalidad dependen de los genes (*nif*) que incluyen genes estructurales, genes involucrados en la activación de la proteína de hierro, y en la biosíntesis del cofactor Fe-Mo (AHEMAD & KIBRET, 2014). En las bacterias diazotrofas fijadoras de nitrógeno, los genes (*nif*) se organizan en un cluster de aproximadamente entre 20-40 kb con siete operones que codifican para 20 proteínas (GLICK B. R., 2012). Dentro del grupo de las bacterias fijadoras no simbióticas se destacan *Azoarcus*, *Azotobacter*, *Acetobacter*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Diazotrophicus*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Pseudomonas* y las cianobacterias (*Anabaena*, *Nostoc*). Las fijadoras simbióticas incluyen los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, y *Mesorhizobium* que establecen simbiosis tipo mutualista con plantas leguminosas y el actinomiceto *Frankia* con plantas no leguminosas (AHEMAD & KIBRET, 2014). Para la fijación de nitrógeno de forma simbiótica, los microorganismos forman nódulos en las raíces con la finalidad de evitar la inactivación de la enzima nitrogenasa por parte del oxígeno presente (GUPTA, SINGH PARIHAR, KUMAR AHIRWAR, KUMAR SNEHI, & SINGH, 2015).

Dentro de las bacterias que fijan nitrógeno de manera no simbiótica se destaca el género *Azospirillum*, el cual pertenece al grupo de las alfa proteobacterias (CÁRDENAS, GARRIDO, BONILLA, & BALDANI, 2010). Estas bacterias Gram negativas son consideradas como Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (RPCV) por los múltiples beneficios que aportan en el crecimiento y rendimiento de los cultivos en las plantas gramíneas y cereales en diversas regiones tropicales y de climas templados (STEENHOUDT & VANDERLEYDEN, 2000). Entre los efectos benéficos que ofrecen a las plantas, se pueden mencionar el incremento de la toma de nutrientes y agua, la solubilización de fosfatos, así como también la inducción de genes que confieren tolerancia al estrés (PÉREZ PÉREZ, SAN JUAN RODRÍGUEZ, TORTORA, VERA, & CASAS GONZÁLEZ, 2019).

En ambientes con limitaciones nutricionales y problemas de desecación, *Azospirillum* spp recurre a diferentes rutas metabólicas para la utilización del carbono y del nitrógeno. Otras adaptaciones de esta especie para sobrevivir a condiciones desfavorables corresponden a mecanismos fisiológicos eficientes como la floculación, síntesis de melanina, formación de quistes, y mecanismos de protección interna contra las esporas de otros hongos (BACA, SÁNCHEZ, CARREÑO, & MENDOZA, 2010).

Como característica sorprendente de *Azospirillum* spp, se puede mencionar el hecho, que aunque no existan especies patógenas dentro del género, son capaces de inducir mecanismos de defensa en las plantas para contrarrestar el ataque de microorganismos patógenos mediante un mecanismo conocido como resistencia sistémica inducida (ISR). Esta propiedad se caracteriza porque las bacterias inducen una reacción en las plantas mediante la liberación de proteínas relacionadas con la patogénesis las cuales se propagan sistemáticamente por los tejidos mejorando la capacidad defensiva contra patógenos por periodos prolongados (FUKAMI, OLLERO, MEGÍAS, & HUNGRIA, 2017).

La gran versatilidad en el metabolismo del nitrógeno le permite a este género de bacterias establecerse y adaptarse a las condiciones y al ambiente competitivo de la rizosfera (DE-BASHAN, HOLGUIN, GLICK, & BASHAN, 1996). Se han identificado numerosos genes implicados en la quimiotaxis, motilidad, producción de polisacáridos extracelulares, fijación de nitrógeno y biosíntesis de ácido indolacético. Actualmente se reconocen doce especies pertenecientes a este género bacteriano: *A. lipoferum* y *A. brasilense*, *A. amazonense*, *A. halopraeferens*, *A. irakense*, *A. largimobile*, *A. doebereineriae*, *A. oryzae*, *A. melinis*, *A. canadense*, *A. zea* y *A. rugosum* (STEENHOUDT & VANDERLEYDEN, 2000).

*Azospirillum brasilense* desarrolla y utiliza dos tipos de flagelos dependiendo si crece en medio líquido o sólido. En medios líquidos nada mediante un flagelo polar, y en medios sólidos se desplaza por un flagelo lateral adicional (STEENHOUDT & VANDERLEYDEN, 2000). Tanto la motilidad como la producción de polisacáridos son rasgos que facilitan la colonización de las raíces por parte de especies endófitas como *A. brasilense* (SANTOYO, MORENO-HAGELSIEB, OROZCO-MOSQUEDA, & GLICK, 2016). *A. brasilense* al ser inoculados en la rizosfera es capaz de producir hormonas como auxinas y otras sustancias que promueven el crecimiento de las plantas. Son muchos los estudios realizados por investigadores de muchas partes del mundo para evaluar el efecto promotor de la inoculación con *A. brasilense* sobre diversas plantas de interés agrícola y forestal (BODDEY, BALDANI, BALDANI, & BÖBEREINER, 1986).

La inoculación de *Setaria italica* con *A. brasilense* (cepa Cd) mostró aumentos en la actividad de reducción de acetileno medida en plantas no perturbadas con unas magnitudes de 1 a 2.5 micromole C<sub>4</sub>H<sub>4</sub> por plantas<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (BODDEY, BALDANI, BALDANI, & BÖBEREINER, 1986). Algunas investigaciones han demostrado que

algunas PGPBs productoras de auxinas pueden incrementar la emergencia de semillas vegetales. *Azospirillum brasilense* por producir este tipo de hormona vegetal es considerado también como una bacteria promotora de emergencia (ZAMBRANO & DIAZ, 2008). Estudios realizados demostraron que el sistema de crecimiento y la inoculación de *A. brasilense* tiene un efecto significativo ( $p < 0.01$ ) sobre la germinación en condiciones de vivero de las semillas de *Gmelina arborea*, especie latifoliada tropical, utilizada en el establecimiento y manejo de bosques comerciales en los suelos de la Costa Norte de Colombia. Dado que este género de bacterias tiene una amplia distribución, se asocia con diferentes especies vegetales como forestales, frutales, gramíneas y además no presenta especificidad en la asociación (una bacteria aislada de una especie forestal puede ser inoculada en otra especie forestal diferente) *Azospirillum brasilense* representa una especie promisoría para la inoculación de especies forestales con fines de reforestación en ecosistemas perturbados por diferentes causas; como es el caso de los suelos degradados por la explotación minera de oro de aluvión (ZAMBRANO & DIAZ, 2008).

La inoculación en soya (*Glycine max* (L) Merr) con *Azospirillum brasilense*, no produjo modificaciones en la biomasa de la parte aérea de la planta ni en la actividad nitrogenasa en nódulos pero si produjo incrementos en la biomasa de raíces y nódulos. Con esta investigación se demostró que *A. brasilense* es capaz de colonizar la superficie de la raíz de soya mediante adhesión a la capa mucilaginosa formando microcolonias entre los espacios intercelulares y las diferentes capas del parénquima radicular, lo que sugiere que puede vivir como endófito en este tipo de plantas y por lo tanto un candidato para la inoculación de plantas leguminosas (ALBERTO-CASAS, y otros, 2019).

Estudios realizados para evaluar el crecimiento de *Leucaena leucocephala* inoculada con *A. brasilense* solo y en combinación con el hongo micorrízico *Rhizophagus intraradices* demostraron que hubo un incremento en el peso seco de tallo y hojas a partir de los 15 días de la siembra. *A. brasilense* indujo la mayor biomasa en el sistema radical (AGUIRRE-MEDINA, GÁLVEZ-LÓPEZ, & IBARRA-PUÓN, 2018).

En una investigación encaminada a optimizar el aprovechamiento de nitrógeno por parte de la planta forrajera *Brachiaria decumbens* cv. Decumbens, se realizó la inoculación con bacterias diazotróficas del género *Azospirillum spp*, reportándose un incremento en su crecimiento y desarrollo, lo que permitiría reducir los gastos que en abonos nitrogenados se requieren para la producción de estas gramíneas (GUIMARÃES, BONFIN-SILVA, KROTH, & FORNAZIER, 2011). Existe un alto grado de asociación entre esta planta con la especie *A. brasilense*, en donde se observó una mayor producción de biomasa al inocular a *Brachiaria decumbens* con este microorganismo en un tratamiento combinado con fertilización nitrogenada de  $40 \text{ kgN ha}^{-1}$  (HUNGRÍA, NOGUEIRA, & SILVA, 2016).

En otro estudio encaminado a reducir los altos costos que acarrear el uso de fertilizantes nitrogenados en los cultivos de pastos para la alimentación animal, se evaluó el efecto de la inoculación conjunta de *Azospirillum brasilense* y diferentes niveles de nitrógeno en el rendimiento, la tasa de acumulación de forraje, la composición botánica y estructural de pastos forrajeros Coastcross-1 pertenecientes al género *Cynodon*. Los resultados del estudio arrojaron que el rendimiento del forraje aumentó considerablemente en los tratamientos inoculados sólo con la bacteria sin aplicación de los fertilizantes nitrogenados y sin necesidad de reinoculación, lo que demuestra que la bacteria promotora del crecimiento vegetal *Azospirillum brasilense*, se constituye en una alternativa económica de fertilización de pastos forrajeros destinados a la alimentación animal (AGUIRRE, y otros, 2018).

### 1.10.2 SOLUBILIZACIÓN DE FOSFATO

El fósforo (P) es uno de los nutrientes esenciales para el desarrollo y crecimiento de las plantas, debido a que se requiere para la síntesis de compuestos celular y organelos como azúcares, ácidos nucleicos, nucleótidos, coenzimas, fosfolípidos, nucleótidos, coenzimas y fosfolípidos. Los fosfatos orgánicos e inorgánicos también sirven como tampón en el mantenimiento del pH celular. El fósforo se encuentra disponible abundantemente en el suelo (orgánica e inorgánica), pero generalmente su disponibilidad es baja debido a que su naturaleza es insoluble (OSORIO & HABTE, 2009). Su distribución en el suelo depende del tipo de suelo, pH, tipo de vegetación, actividad microbiana y entradas de fertilizantes (Rooney & Clipson, 2009). Las plantas absorben el fósforo del suelo en forma de ortofosfatos las cuales son formas inorgánicas solubles: ( $\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$ ) y ( $\text{HPO}_4^{-2}$ ) (OSORIO & HABTE, 2009).

En el suelo existen muchos microorganismos con capacidad para realizar la solubilización de las formas insolubles de fosfato. Los principales mecanismos que estos emplean son la secreción de ácidos orgánicos e inorgánicos y la liberación de protones hacia la solución del suelo, lo que ocasiona la acidificación del medio extracelular a un pH cercano a 2,0, facilitando de esta manera el proceso de solubilización (BELTRÁN PINEDA, 2014). Géneros bacterianos como *Azotobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* y *Serratia* han sido reportados como solubilizadores de fosfatos insolubles en el suelo (AHEMAD & KIBRET, 2014). Especies de *Pseudomonas* sp., *Erwinia herbicola*, *Pseudomonas cepacia* y *Burkholderia cepacia* producen ácido glucónico que es el agente solubilizador más frecuente. *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium meliloti* y *Bacillus firmus* producen ácido 2-cetoglucónico. Algunas cepas de *Bacillus liqueniformis* y *B. amyloliquefaciens* producen mezclas de ácidos láctico, isovalérico, isobutírico y acético (BELTRÁN PINEDA, 2014).

### 1.10.3 PRODUCCIÓN DE FITOHORMONAS

El incremento en el crecimiento de las plantas ocasionado por los microorganismos promotores de crecimiento vegetal se debe a la producción de fitohormonas; como son el ácido indolacético, el ácido giberílico, zeatina, ácido abscísico, citoquininas y el etileno son producidas por una variedad de microorganismos promotores del crecimiento en plantas (GONZALEZ H & FUENTES N, 2017). Entre estos se encuentra *Acetobacter diazotrophicus* y *Herbaspirillum seropedicae* son productoras de ácido indolacético, *Azospirillum* sp. Produce Zeatina y etileno, *Azospirillum lipoferum* produce ácido giberílico y *Azospirillum brasilense* produce ácido abscísico (SINGH, 2013).

### **1.11 MECANISMOS DE ACCIÓN INDIRECTOS**

El principal mecanismo de acción indirecto es actuar como agentes de control biológicos, produciendo metabolitos antifúngicos que protegen a las plantas de diferentes bacterias patógenas, hongos y virus conociendo este fenómeno como resistencia sistémica inducida (ISR) (GLICK B. R., 2012) (BHATTACHARYYA & JHA, 2012). La utilización excesiva de las bacterias productoras de antibióticos puede provocar que algunos microorganismos fitopatógenos desarrollen resistencia a estos antibióticos; por esta razón actualmente se utilizan cepas que sintetizan cianuro de hidrógeno y otros que producen enzimas que incluyen quitinasas, celulasas, gluc-1,3 glucanasas, proteasas y lipasas que pueden lisar una parte de las paredes celulares de muchos hongos patógenos. Se ha encontrado que estas enzimas tienen actividad de biocontrol sobre hongos patógenos como *Botrytis cinerea*, *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora* spp., *Rhizoctonia solani* y *Pythium ultimum* (FRANKOWSKI, y otros, 2001).

Otros mecanismos utilizados es la producción de sideróforos evitando que los fitopatógenos adquieran una cantidad suficiente de hierro, limitando así su proliferación en la rizosfera de las raíces de la planta huésped (MORENO RESÉNDEZ, GARCÍA MENDOZA, REYES CARRILLO, VÁSQUEZ ARROLLO, & CANO RÍOS, 2018). También se utilizan mecanismos como son la producción de lipopolisacáridos (LPS), flagelos, lipopéptidos cíclicos, 2,4-diacetilfloroglucinol, homoserina lactonas y compuestos volátiles como, acetoina y 2,3-butanodiol (LUGTENBERG & KAMILOVA, 2009).

### **1.12 HONGOS PROMOTORES DEL CRECIMIENTO VEGETAL**

Los hongos al igual que las bacterias ejercen un papel fundamental e importante en el crecimiento de las plantas. Dentro de los efectos benéficos que generan está el control biológico, inducción de resistencia sistémica en las plantas, cambios en la composición de la microbiota de las raíces, mejora en la absorción y solubilización de nutrientes, mayor desarrollo radical, aumento de pelos radiculares y un enraizamiento más profundo (CANO, 2011). Se destacan los hongos solubilizadores de fosfato y los hongos formadores de micorrizas (RAMÍREZ, OSORNO, OSORIO, & MORALES, 2013).

### 1.12.1 HONGOS SOLUBILIZADORES DE FOSFATO (HSF)

Además de las bacterias, muchos hongos exhiben una gran capacidad solubilizadora y aunque estas han recibido mayor atención al respecto, los hongos son más efectivos solubilizando fósforo inorgánico (KUCEY, 1983). Entre los hongos solubilizadores se encuentran *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Sclerotium*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Syrialidium*, *Scopulariopsis*, *Moniliella* y *Mortierella* (Useche, Valencia, & Perez, 2004; Ramírez Gil *et al.*, 2013). *Mortierella* spp ha sido citado en la literatura científica, como solubilizador debido a que mejoran la eficiencia de la fertilización fosfórica y aumenta la solubilización de este elemento (OSORIO & HABTE, 2013) (RAMÍREZ, OSORNO, OSORIO, & MORALES, 2013).

Entre las características del género *Mortierella* encontramos que está ubicado en la familia *Mortierellaceae* dentro del orden *Mortierellales*. (NCBI Taxonomy). Todas sus estructuras son generalmente más delicadas que la de los otros miembros del phylum Mucoromycota al cual pertenece también el género *Mucor*. Los esporangios hialinos carecen de columela o, si está presente, es muy pequeña, poseen numerosas, pocas o una espora, muchas veces denominados esporangiolas en el caso que sólo posean una o 2 esporas. El desarrollo micelial es delicado y se da de manera dicotómica presentando un olor aliáceo (ajo) característico del género. Las especies de *Mortierella* se encuentran entre los hongos más comunes del suelo, donde probablemente jueguen un papel menor en el reciclado de materia orgánica (CABELLO, 1997).

La producción de ácidos grasos poliinsaturados al convertir el exceso de azúcares y otras fuentes de carbón en lípidos bajo diferentes condiciones de fermentación es una característica de este género. Varios estudios han demostrado la capacidad de algunas especies de *Mortierella* de acumular ácidos araquidónicos, gamma-linolénico, eicosapentaenoico y docosahexaenoico en el micelio los cuales están involucrados en la inducción de resistencia a fitopatógenos en plantas de importancia agrícola (MARES-PONCE DE LEÓN, y otros, 2017).

Estudios con la finalidad de buscar alternativas microbiológicas para el cultivo de la planta leguminosa de alto contenido proteico conocida como Caupí (*Vigna unguiculata* L. Walp.), demostraron que la inoculación de estas plantas con el hongo *Mortierella* sp y la adición de roca fosfórica no tuvo un efecto estadísticamente significativo ( $P > 0,05$ ) sobre las variables evaluadas, pero sin embargo, en todos los tratamientos se incrementó significativamente el P soluble (RAMÍREZ, OSORNO, OSORIO, & MORALES, 2013). Otros estudios con este mismo hongo, pero de manera dual con el hongo micorrízico arbuscular *Rhizoglyphus fasciculatum* también fue realizado para evaluar la efectividad sobre el crecimiento de cuatro especies de árboles muy utilizadas en Colombia en programas de reforestación (*Tecoma stans*, *Dodonaea viscosa*, *Fraxinus chinensis* y *Lafoensia speciosa*). Los tratamientos aplicados en etapa de vivero incrementaron el crecimiento y la absorción de P de

las cuatro especies; pero se observó un efecto significativamente mayor cuando los hongos *R. fasciculatum* y *Mortierella sp.*, fueron conjuntamente inoculados que cuando se usó sólo *R. fasciculatum* (MORENO, LEÓN, & OSORIO, 2016).

### 1.12.2 HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES

Las micorrizas arbusculares son asociaciones simbióticas ubicuas entre los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) y más del 90% de las plantas superiores terrestres (SMITH & READ, 2008). Los HMA ofrecen múltiples beneficios a las plantas con las que establecen simbiosis, siendo los más importantes, la producción de fitohormonas, mejora en la absorción de nutrimentos, protección contra algunos fitopatógenos del suelo y la disminución de los efectos causados por estrés abiótico y biótico (DÍAZ FRANCO, ESPINOSA RAMÍREZ, & ORTIZ CHÁIREZ, 2019).

Los hongos micorrizo arbusculares se pueden encontrar en diferentes ambientes e incluso en los ecosistemas frágiles, degradados y contaminados formando una extensa red extraradical ayudando a las plantas a explorar los nutrientes (especialmente el fósforo (P)) y el agua del suelo, contribuyendo a los procesos asociados en ésta matriz y ayudando a mantener la estabilidad, productividad y funcionamiento del ecosistema de la comunidad de plantas (WANG, 2017). Las HMA produce la glomalina que se deposita en las paredes hifales externas del micelio extraradical y en las partículas adyacentes del suelo, permitiendo ser un agente de unión al suelo a largo plazo (LOPES LEAL, y otros, 2016). Las HMA pueden traer muchos beneficios en el crecimiento de las plantas al aliviar diversas tensiones ambientales como son la toxicidad por metales pesados, estrés a la sequía, salinidad y la compactación del suelo permitiendo así la adaptación y el desarrollo de diferentes plantas bajo estas condiciones (MEIER, BORIE, BOLAN, & CORNEJO, 2012) (MIRANSARI, 2010).

Los hongos micorrízicos arbusculares son uno de los principales medidores de las comunidades perturbadas y la sucesión de distintos ecosistemas, por lo que contribuyen significativamente con la restauración a diferentes escalas (Quoreshi, 2008; Wang, 2017). Esta tecnología está orientada a restaurar suelos aprovechando el potencial de inóculo micorrizal. Todo esto se puede lograr a través de procesos de bioaumentación, inoculando suelos con HMA o mediante el uso de plántulas trasplantadas que ya tengan el hongo micorrizal en sus raíces (Jeffries, Gianinazzi, Perotto, Turnau, & Barea, 2003).

Son muchas las investigaciones que se han llevado a cabo empleando esta tecnología; una de ellas encaminada a evaluar el efecto de la inoculación de micorrizas arbusculares y la fertilización en el crecimiento de las plántulas de *Acacia mangium*; demostró que los tratamientos inoculados con micorrizas más fertilizantes aumentaron significativamente el crecimiento, comprobándose de esta manera, el efecto benéfico que sobre las plantas tienen las micorrizas arbusculares (JEYANNY , LEE , & WAN RASIDAH, 2011).

En un estudio realizado para evaluar la efectividad de la inoculación individual y conjunta de un consorcio de hongos micorrícicos y hongos solubilizadores de fósforo (*Aspergillus niger*, *Penicillium brevicompactum* y *Penicillium waksmanii*), sobre la micorrización, el contenido de fósforo foliar, la altura, y longitud de la raíz de plantas de jitomate, se obtuvo un rango de colonización del 48-66%; detectándose los mayores valores con los tratamientos de HMA y HMA + *Aspergillus niger*. Se detectó a su vez un incremento (191%) del fósforo foliar en los tratamientos consorcios de HSF y HSF+HMA y en la altura de las plantas de jitomate en todos los tratamientos con respecto al testigo. El tratamiento HMA junto con el testigo presentaron los valores más altos para la longitud de raíz. Los resultados de esta investigación llevada a cabo en condiciones de invernadero demuestran una vez más el alto potencial, que tiene el uso de consorcios de hongos solubilizadores de fósforo y hongos micorrícicos como biofertilizantes para el cultivo de diferentes plantas de importancia agrícola como es el caso del jitomate (ARIAS MOTA, ROMERO FERNÁNDEZ, BAÑUELOS TREJO, & DE LA CRUZ ELIZONDO, 2019).

En otra investigación se evaluó el crecimiento de *Leucaena leucocephala* biofertilizada con hongos micorrícicos arbusculares en condiciones de vivero; demostrando que los HMA mejoraron las características de la planta en comparación con el testigo y la fertilización química. La biofertilización con *Rhizophagus intraradices* promovió un mayor crecimiento vegetal de *L. leucocephala* en la parte aérea, menor en el sistema radical y mayor contenido de fósforo. Con esta investigación quedó comprobado que los HMA en *L. leucocephala* promueven el crecimiento vegetal y a su vez permiten disminuir el uso de fertilizantes químicos en condiciones de vivero (AGUIRRE-MEDINA, GÁLVEZ-LÓPEZ, & IBARRA-PUÓN, 2018).

En otro estudio se evaluó el efecto que tenía la inoculación del pasto *Brachiaria decumbens* con hongos nativos del trópico húmedo ecuatoriano formadores de micorrizas arbuscular (*Scutellospora* spp, *Glomus* spp, *Scutellospora* spp, *Acaulospora* spp y *Gigaspora* spp) encontrando que las plantas inoculadas con *Glomus* spp, o en combinación con *Scutellospora* spp. mostraron las mejores respuestas en las variables de crecimiento evaluadas, dejando en evidencia la eficiencia de los hongos formadores de micorrizas en la infección radicular y su contribución para mejorar la calidad de plantas de *B. decumbens*, así como los beneficios fisiológicos y ecológicos ejercidos por los mismos (PRIETO BENAVIDES, y otros, 2011).

Entre las características de *Rhizoglyphus fasciculatum* encontramos que es un hongo formador de micorrizas arbusculares, que pertenece a la familia *Glomeraceae* y al orden *Glomerales*. El género *Rhizoglyphus* comprende especies de hongos micorrízicos arbusculares que frecuentemente forman abundantes esporas en el suelo y en las raíces. Estas esporas se desarrollan sobre hifas sustentoras cilíndricas usualmente con un poro abierto en la base y contienen por lo menos dos

o tres capas de pared distintas (SIEVERDING, ALVES DA SILVA, BERNDT, & EOHL, 2014).

### **1.13 CONTRIBUCIÓN DE LOS MICROORGANISMOS PROMOTORES DEL CRECIMIENTO VEGETAL EN LA REDUCCIÓN DE LA DEGRADACIÓN AMBIENTAL**

Los microorganismos promotores del crecimiento vegetal además de ser aplicados en los cultivos agrícolas para mejorar su productividad presentan un gran potencial para ser empleados en la recuperación de ambientes degradados (DE-BASHAN, HERNANDEZ, & BASHAN, 2012). Pueden ser empleados para evitar los problemas de erosión de los suelos en regiones áridas ya que mejoran el crecimiento de las plantas de regiones desérticas, en programas de reforestación, restauración de los ecosistemas deteriorados de manglar, así como también en proyectos de fitorremediación para la descontaminación de suelos y aguas (DE-BASHAN, HERNANDEZ, & BASHAN, 2012).

La fitorremediación es una estrategia de biorremediación ambiental, que utiliza plantas con microorganismos asociados para secuestrar y extraer compuestos tóxicos de ambientes contaminados (DELGADILLO-LÓPEZ, GONZÁLEZ-RAMÍREZ, PRIETO-GARCÍA, VILLAGÓMEZ-IBARRA, & ACEVEDO-SANDOVAL, 2011) (JARA-PEÑA, y otros, 2014). Las técnicas de fitorremediación incluyen: fitodegradación cuando los contaminantes son degradados por las plantas; la fitotransformación que reduce la toxicidad ya que inactiva o degrada los contaminantes resultantes del metabolismo de las plantas, la rizodegradación que mejora la actividad microbiana del suelo para degradar contaminantes por parte de las bacterias rizosféricas; la fitoextracción en la cual se absorben contaminantes de los suelos contaminados y se almacena las sustancias en la biomasa de la planta; (para el caso metales pesados, estos se pueden recuperar y reutilizar posteriormente) y; la fitoestabilización que reduce la movilidad de sustancias tóxicas en los suelos, como en el caso de los relaves mineros (DELGADILLO-LÓPEZ, GONZÁLEZ-RAMÍREZ, PRIETO-GARCÍA, VILLAGÓMEZ-IBARRA, & ACEVEDO-SANDOVAL, 2011) (MACEK, MACKOVÁ, & KÁS, 2000) (SURESH & RAVISHANKAR, 2004).

Aunque las plantas toleran parcialmente los contaminantes, su crecimiento en estos ambientes es lento y sólo remueven pequeñas cantidades, por lo que se hace necesario estimular el crecimiento de estas plantas mediante la inoculación con PGPM, con el fin de mejorar su crecimiento bajo las condiciones de estrés a las que se encuentran sometidas. La inoculación con estos microorganismos benéficos incrementa la biomasa vegetal permitiendo que la fitorremediación sea un proceso más rápido, efectivo y atractivo (GLICK B. , 2003).

#### 1.14 PLANTAS PIONERAS EN PROGRAMAS DE FITOESTABILIZACIÓN DE RELAVES MINEROS.

Los relaves de mina constituyen una fuente continua de contaminación con elementos metales, debido a la pérdida de la cobertura vegetal y a los cambios que esta actividad ocasiona en la estructura del suelo (PILON-SMITS, 2005). Bajo estas circunstancias, la fitoestabilización se considera una estrategia económica y efectiva que utiliza plantas nativas como cubierta del suelo para evitar la erosión y reducir los riesgos para la salud. Características de estos terrenos como la alta toxicidad de los metales, pH bajo, carencia de minerales esenciales, la falta de arcilla y materia orgánica para retener el agua, la falta de estructura del suelo o la falta de una fuente de semilla de especies nativas, lo convierten en un sustrato no apto para el crecimiento de la mayoría de las especies vegetales (MENDEZ & MAIER, 2008). La ausencia de vegetación se puede extender por muchos años o se suele desarrollar una cobertura vegetal muy ligera (GONZALEZ-CHÁVEZ, CARRILLO-GONZÁLEZ, & GUTIÉRREZ-CASTORENA, 2009).

Una alternativa más práctica es adicionar grandes cantidades de compost, biosólidos y agua; además el uso de plantas pioneras, principalmente arbustos leguminosos y árboles que fijan el nitrógeno para que agreguen contenido orgánico, mejoren las características del suelo, se reduzca su toxicidad y de esta manera se desarrollen posteriormente plantas más sensibles, permitiendo el desarrollo de un ecosistema más estable y diversificado. Muchos investigadores han propuesto para la recuperación de suelos degradados por minería, el establecimiento de plantas pioneras inoculadas con PGPB y con hongos micorrizico y adición de pequeñas cantidades de compost (DE-BASHAN, HERNANDEZ, & BASHAN, 2012). Se suelen utilizar microorganismos promotores nativos aislados de los mismos suelos contaminados y degradados por minería o evaluar o probar microorganismos utilizado en otras aplicaciones, principalmente agrícolas, que podrían ayudar a las plantas a crecer en estos suelos. Dada la capacidad de los árboles leguminosos como *Acacia mangium* y *Leucaena leucocephala* de tolerar suelos contaminados con metales pesados, son buenos candidatos para ser empleados en programas de reforestación de suelos degradados por minería como es el caso de la minería aurífera de aluvión (DE-BASHAN, HERNANDEZ, & BASHAN, 2012).

*Acacia mangium* es una especie leguminosa arbórea perteneciente a la familia Fabácea originaria de Australia y Asia Central, capaz tolerar condiciones de suelos degradados ácidos con baja fertilidad y escasa materia orgánica (GHOSH & VERMA, 2006) (PAVLOTZKY-BLANK & MURILLO-GAMBOA, 2012). Esta planta considerada pionera, presenta un crecimiento rápido y una elevada productividad de biomasa por lo que sido empleada en programas de reforestación en varios países de Asia, el Pacífico y en el Trópico húmedo, así como en Puerto Rico, Brazil y República Dominicana (PÉREZ, y otros, 2012). Asimismo, su cultivo constituye una alternativa de mejora de las propiedades del suelo. Esta especie se introdujo en Colombia con fines ambientales, para manejo de suelos erosionados y degradados,

gracias a la capacidad de fijar nitrógeno y fósforo (REYES, CARMONA, & FERNÁNDEZ, 2018).

*A. mangium* se caracteriza por presentar filodios, pecíolos ensanchados que se desarrollan después de cuatro semanas de edad cuando pierden las hojas verdaderas y realizan actividad fotosintética que le confiere tolerancia por tiempo prolongado a la planta. El desarrollo inicial de las hojas verdaderas es una estrategia de esta especie para el establecimiento rápido, ya que con este tipo de superficie de intercambio gaseoso se presenta un uso más eficiente del nitrógeno en la fotosíntesis que con los filodios. Esta especie vegetal alcanza tallos de hasta 30m, con fuste recto y libre de ramas hasta cerca de la mitad de la altura total y fuera de su hábitat tiene la tendencia a bifurcarse a diferentes alturas. Sin embargo, en sitios donde la nutrición es baja los árboles pueden alcanzar alturas que van de 7 a 10m (REYES, CARMONA, & FERNÁNDEZ, 2018).

Pequeñas flores en racimo de color blanco conforman las inflorescencias que posterior a la fertilización desarrollan vainas verdes y en la maduración oscurecen su color. Las flores generalmente son hermafroditas y están conformadas por cinco pétalos y cinco sépalos. Las semillas son negras, brillantes, elípticas y ovaladas con medidas entre 3-5 a 2-3 mm (REYES, CARMONA, & FERNÁNDEZ, 2018).

En Colombia, la detección de Hg en hojas y madera de *A. mangium* de plantaciones establecidas exitosamente hace más de 11 años en suelos degradados por minería de aluvión en la región del Bajo Cauca Antioqueño, hacen suponer que esta planta bioacumula estos metales pesados en sus tejidos y se sugiere por lo tanto que esta especie podría utilizarse en proyectos de biorremediación de suelos degradados y contaminados por Hg como consecuencia de la explotación minera de aluvión (LEÓN, DÍEZ, CASTELLANO, OSORIO, & MARÍN , 2008).

*Leucaena leucocephala* es otra especie leguminosa forrajera empleada en procesos de fitorremediación la cual se caracteriza por ser un arbusto de crecimiento rápido (pueden vivir más de 50 años) caducifolio o perennifolio de 3 a 6 m (hasta 12 m) de altura con un diámetro a la altura del pecho de hasta 25 cm (ZÁRATE, 1994). Las hojas bipinnadas están dispuestas de forma alterna a lo largo del tallo. Los pecíolos tienen 10–25 cm de largo, contienen de 4 a 9 pares de pinnas por hoja y 13–21 pares de folíolos de tamaño intermedio por pinnas, los cuales pueden ser arrojados prematuramente como respuesta a condiciones de estrés ambiental. La inflorescencia es de forma globular, de color crema y desarrolla racimos de vainas planas marrones, de 12 a 17 mm de largo que contienen 12-28 semillas (VERMA, 2016).

Esta especie tropical para su crecimiento óptimo requiere temperaturas cálidas de 25 a 35 °C, presenta baja tolerancia al frío y su crecimiento se reduce significativamente durante el invierno en áreas subtropicales. Con relación a la humedad, crece bien en climas subhúmedos o húmedos con precipitaciones que

oscilan desde los 650 mm a 3000 mm, aunque puede tolerar estaciones secas moderadas de hasta 4 a 6 meses. Cabe destacar además que no tolera suelos con pH por debajo de 5.5, pobres en potasio, calcio, salinos, con alto contenido de aluminio y en estado de anegamiento. En suelos poco profundos, las capas de arcillas hacen que las raíces se ramifiquen y crezcan lateralmente a 30 cm, pero generalmente la raíz principal suele ser larga (5m), fuerte y bien desarrollada. Debido a que los pelos radiculares son poco desarrollados, la planta suele depender en gran medida de asociaciones micorrícicas para la absorción de nutrientes, micorrizas vesiculares / arbusculares y nodulación con *Rhizobium*, al menos durante las etapas iniciales del desarrollo de las plántulas (VERMA, 2016)

La capacidad de establecer estas asociaciones simbióticas, le permite a esta planta adaptarse fácilmente a diferentes ambientes, por lo que ha sido empleada para rehabilitar sitios donde hubo explotación minera (AGUIRRE-MEDINA, GÁLVEZ-LÓPEZ, & IBARRA-PUÓN, 2018) (FERRARI & WALL, 2004).

Estudios destacan el efecto de los hongos micorríco arbusculares en el aumento de la tolerancia de *L. leucocephala* al stress por arsénico y enfatizaron el potencial de la simbiosis *L. leucocephala*- *R. Clarus* para fitoestabilización de arsénico en suelos moderadamente contaminados con este metal (SCHNEIDER, BUNDSCHUH, RANGEL, & GUILHERME, 2017).

Por otro lado, se sabe que *Brachiaria decumbens*, una especie de pasto introducida en las estribaciones de la Amazonía en Colombia en 1970 como un forraje para mejorar la productividad del ganado, desarrolla un amplio sistema radicular, y en suelos estresados forma relaciones con micorrizas vesículo arbusculares (POSADA, y otros, 2008). Sus bajos requerimientos nutricionales, y su alta adaptabilidad a suelos poco fértiles y ácidos, han propiciado el remplazo de pastizales nativos por *Brachiaria decumbens* en los suelos pobres de las sabanas de varios países de América como es el caso de Brazil y Colombia. En comparación con otros pastos tropicales, las pasturas de *Brachiaria* tienen una mayor calidad de forraje y muestran una mayor producción en comparación con la sabana nativa (SIMIONI & VALLE , 2011).

Se reproducen asexualmente a través de apomixis facultativa por lo tanto, los embriones son partenogenéticos y las progenies son idénticas a la planta madre, lo que conlleva a pastos homogéneos, lo cual es ventajoso para el manejo de los animales, pero representa un grave riesgo cuando se planta en grandes extensiones de tierra (SIMIONI & VALLE , 2011).

## 2 METODOLOGÍA

### 2.1 TIPO DE ESTUDIO

Esta investigación fue de tipo experimental con un enfoque cuantitativo; las poblaciones del estudio estuvieron conformadas por microorganismos promotores del crecimiento vegetal, plantas pioneras y suelos degradados por minería.

Las muestras escogidas para este estudio fueron:

- Microorganismos promotores del crecimiento vegetal: *Azospirillum brasilense*, *Mortierella* sp., *Rhizogloium fasciculatum*.
- Plantas pioneras: *Acacia mangium*, *Brachiaria decumbens* y *Leucaena leucocephala*.
- Suelos degradados por minería: Suelo degradado por minería aurífera de aluvión.

### 2.2 LOCALIZACIÓN

Esta investigación se desarrolló en el Laboratorio de Microbiología de Suelos de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín (6° 15' N y 75° 34' W, con 1450 m de altitud).

### 2.3 SUELO

Las muestras de material de depósito se tomaron de una mina de explotación de oro aluvial recién abandonada, localizada en el municipio de Istmina, vereda Peradó (LAT: 5.178663 LONG: -76.739744). La profundidad de muestreo fue de 0-25cm (MORENO, LEÓN, & OSORIO, 2016).

El material de depósito se secó al aire y se tamizó utilizando una malla de 4 mm de poro (Josaly Moreno *et al.*, 2016); posteriormente se envió al Laboratorio Suelo Vital de la Universidad Católica de Oriente en Rionegro – Antioquia para su análisis fisicoquímico.

El material sin desinfectar se sirvió en bolsas plásticas negras de 12x12 cm con una capacidad para 1Kg suelo base seca las cuales se perforaron en la parte inferior para favorecer el drenaje. A cada bolsa con el material de estudio se le adicionó 1 cm de hojarasca proveniente de la vereda Peradó del municipio de Istmina.

### 2.4 MATERIAL VEGETAL

Se usaron las siguientes especies vegetales: *Acacia mangium*, *Leucaena leucocephala* y *Brachiaria decumbens* a partir de semillas certificadas obtenidas de la empresa El Semillero SAS. Las semillas de *Leucaena* y *Acacia* se escarificaron

en ácido sulfúrico concentrado por 10 min y posteriormente se lavaron con abundante agua y junto con las semillas de *Brachiaria* se dejaron germinar en cámara húmeda (OROZCO CARDONA, FRANCO HERRERA, & TABORDA BELTRÁN, 2010) (MARTINEZ, RODRIGUEZ TREJOS, GUIZAR NOLAZCO, & BONILLA BEAS, 2008).

## 2.5 INÓCULOS MICROBIANOS

Las cepas de *Azospirillum brasilense*, *Mortierella* sp. y *Rhizoglosum fasciculatum* son de uso comercial suministradas por la empresa Biofertilizar S.A.S. ubicada en la ciudad de Medellín. *Azospirillum brasilense* se mantuvo en medio OAB (BASHAN & HOLGUIN, 1993) en una concentración de  $1 \times 10^5$  UFC/ml, en una dosis 5 ml por planta; el hongo solubilizador de fosfatos *Mortierella* sp. se mantuvo en PDA en una concentración de  $1 \times 10^5$  UFC/ml, 5 ml por planta y el hongo micorrízico arbuscular *Rhizoglosum fasciculatum* se aplicó 30 g por cada kg de suelo, y cada gramo contenía una concentración de 300 esporas (MORENO, LEÓN, & OSORIO, 2016).

## 2.6 TRATAMIENTOS

Los tratamientos se realizaron de la siguiente manera: (i) inóculo arbuscular-micorrízico (HM) que contenía propágulos infecciosos del hongo *Rhizoglosum fasciculatum* suspendido en un suelo: matriz de arena (3: 1); (ii) inóculo con *Mortierella* sp. (MSM); (iii) inóculo con *Azospirillum brasilense* (PGPB); (iv) inoculación dual (HM + MSM) compuesto por el mismo inóculo micorrízico y el hongo de solubilización de fosfato, (v) inoculación dual (HM + PGPB) compuesto por el mismo inóculo micorrízico y *A. brasilense*; (vi) inoculación dual (MSM + PGPB); (vii) inoculación triple compuesta (HM + MSM + PGPB) y (viii) control no inoculado.

Se sembraron 2 semillas germinadas para los tratamientos de *Leucaena* y *Acacia*, y 8 para *Brachiaria*. transcurridos quince días, se realizó un raleo y se dejó una sola plántula por bolsa para *Leucaena* y *Acacia* y 5 plántulas para *Brachiaria*. Se mantuvieron durante 110 días en el invernadero de la Universidad Nacional sede Medellín bajo luz natural a una temperatura entre 20 a 37°C (media 26°C), fueron regadas con agua y en las últimas etapas del experimento con solución Hoagland libre de P; el material de depósito se mantuvo a una humedad relativa entre 30% a 90% (media 60%) según su capacidad de campo.

## 2.7 VARIABLES

Al final del período de crecimiento, se tomaron medidas biométricas de la altura de las plántulas (cm), el diámetro del cuello de la raíz (mm) y la masa seca aérea (MSA) (secado en estufa a 60°C por 48 h) y la masa seca radical (MSR) (g/planta). Se

determinó el contenido de P foliar (%), para tal fin, submuestras del tejido, se llevaron a una mufla (500°C, 4 h) y las cenizas obtenidas se disolvieron con HCl 1M. La concentración de P se midió por el método de azul de molibdato propuesto por Habte y Osorio (2001). Adicionalmente se calculó el contenido de fósforo en la parte aérea, mediante la multiplicación de la MSA y la concentración de fósforo foliar, se expresó en términos de mg/planta.

Además, se determinó la colonización micorrizal en raíces finas para lo cual estas fueron sometidas a un aclareamiento con KOH (10%) (Phillips y Hayman, 1970), luego se tiñeron con fucsina ácida 0.015% (KORMANIK, BRYAN, & SCHULTZ, 1979) y posteriormente se midió la intensidad de la colonización con el método del intercepto de cuadrícula de Giovannetti & Mosse (1980). Adicionalmente, se determinó la presencia de *Mortierella* sp. en raíces, siguiendo el protocolo propuesto por Osorio y Habte (2013).

## **2.8 DISEÑO EXPERIMENTAL**

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar. Cada tratamiento consistió en la aplicación individual o combinada de los inóculos y se incluyó un control no inoculado. Cada tratamiento tuvo 10 réplicas.

## **2.9 ANÁLISIS DE DATOS**

El efecto de los tratamientos sobre las variables se determinó a través de un análisis de varianza y para la separación de medias se empleó la prueba de rangos múltiples de Duncan. Ambas pruebas con un nivel de significancia (*P value*)  $\leq 0.05$ . Estos análisis se realizaron con el software Statgraphics Centurion XVI.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 CARACTERIZACIÓN DEL SUELO DE MINERÍA AURÍFERA

Este suelo presentó las siguientes características textura (A: 88%, L: 6% y Ar: 6%) Arenoso a Areno Franco (Bouyucos), pH 4.6 (relación 1:2), materia orgánica 0.8% (calcinación); P disponible 4.7 mg/kg (Bray II); Al, Ca, Mg, Na y K intercambiables N.D., 0.09, 0.08, 0.02 y N.D.  $\text{cmol}_c \text{kg}^{-1}$  (acetato de amonio);  $\text{NO}_3^-$  35.0,  $\text{NH}_4^+$  3.8 (potenciometría); Fe, Mn, Cu y Zn 84.8, N.D., 1.9 y 0.6 mg/Kg (Olsen-EDTA); B 0.06 mg/kg (agua caliente).

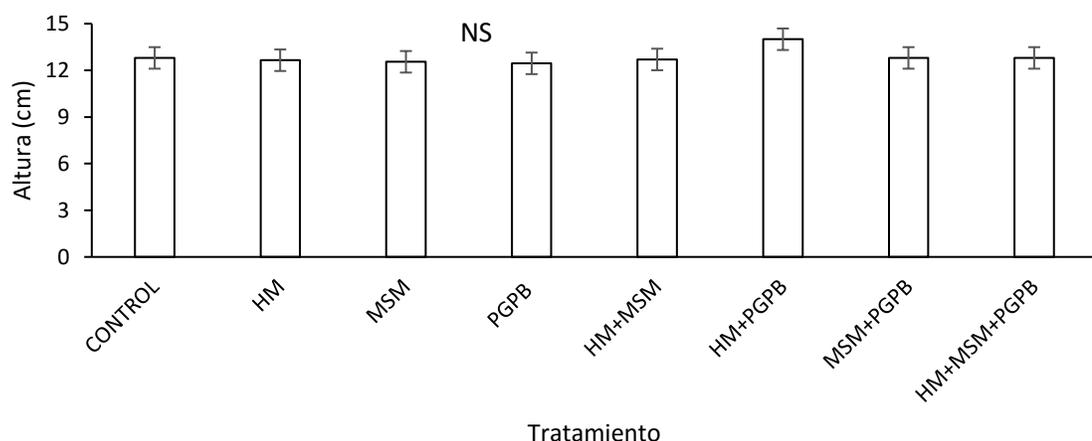
#### 3.2 *Leucaena leucocephala*

En la tabla 3.1. se muestran los niveles de significancia obtenidos de los análisis de varianza hechos sobre las variables *Leucaena*. Se resalta que los tratamientos tuvieron efectos altamente significativos ( $P < 0.01$ ) sobre las variables MSA, MSR y P foliar. El PTA fue afectado a un nivel de significancia de 0.0788. Por otro lado, las variables altura y diámetro no fueron afectadas significativamente por los tratamientos.

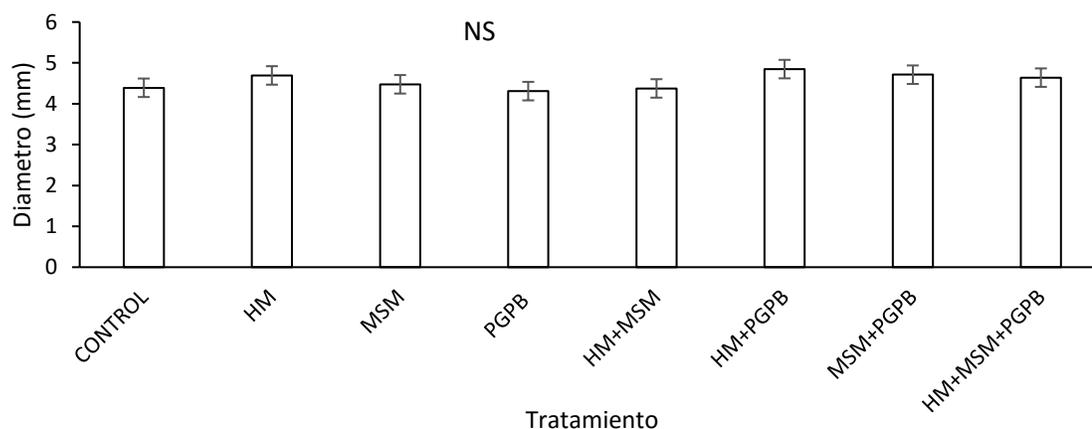
**Tabla 3. 1.** Niveles de significancia (*P-value*) de los tratamientos obtenido de los análisis de varianza de cada una de las variables estudiadas en plántulas de *Leucaena leucocephala*

Fuente	Altura (cm)	Diámetro (cm)	MSA (g/planta)	MSR (g/planta)	P Foliar (%)	PTA (mg/planta)	Colonización micorrizal (%)
Tratamientos	0,839 NS	0,6460 NS	0,0011**	0,0026**	<0,0001***	0,0788	<0,0001***

Los resultados de la Figura 3.1 muestran que las plántulas de *L. leucocephala* no presentaron diferencias estadísticamente significativas sobre la altura (cm) con relación a los diferentes tratamientos empleados. Los valores fluctuaron entre 12.45 a 14 cm; sin embargo, el tratamiento donde se dio una mayor altura con respecto al control fue HM+PGPB con un incremento de 9.4%. Tampoco se presentaron efectos significativos sobre el diámetro de las plantas, los tratamientos HM, HM+PGPB, MSM+PGPB, HM+MSM+PGPB presentan un incremento del 25% por encima del control y de los otros tratamientos (Figura 3.2). Ninguna de las inoculaciones simples provocó un incremento en la altura de la plántula en comparación con el control. El mismo comportamiento se evidenció con los tratamientos individuales de MSM y PGPB con respecto al diámetro de las plántulas.



**Figura 3.1.** Altura de plantas de *Leucaena* en función de los tratamientos con inoculación individual y combinada de un hongo micorrizal (HM), un microorganismo solubilizador de minerales (MSM) y una bacteria promotora de crecimiento vegetal (PGPB). Cada columna representa el promedio de 10 repeticiones. Las barras representan el error estándar. NS: indica que no hubo efecto significativo de los tratamientos.

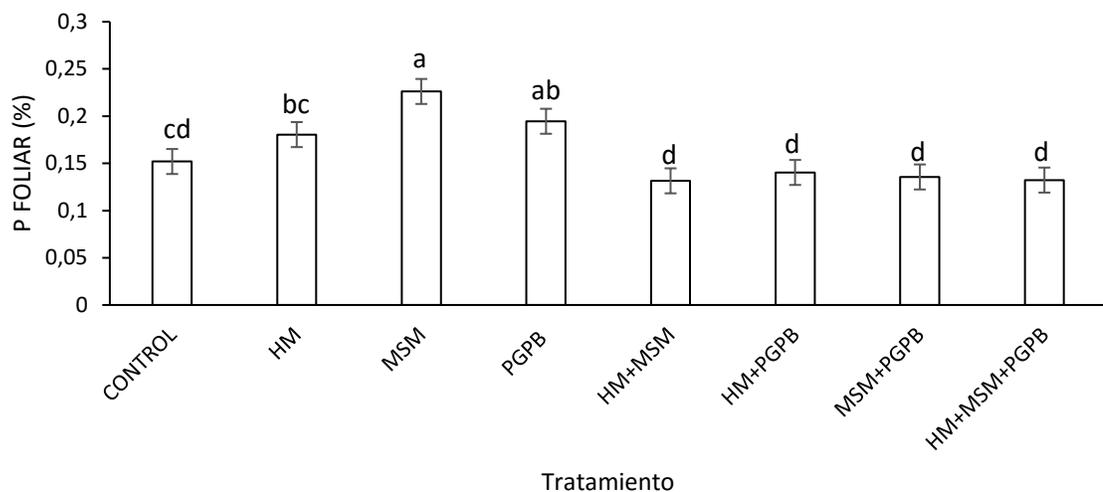


**Figura 3.2.** Diámetro de plantas de *Leucaena* en función de los tratamientos con inoculación individual y combinada de un hongo micorrizal (HM), un microorganismo solubilizador de minerales (MSM) y una bacteria promotora de crecimiento vegetal (PGPB). Cada columna representa el promedio de 10 repeticiones. Las barras representan el error estándar. NS: indica que no hubo efecto significativo de los tratamientos.

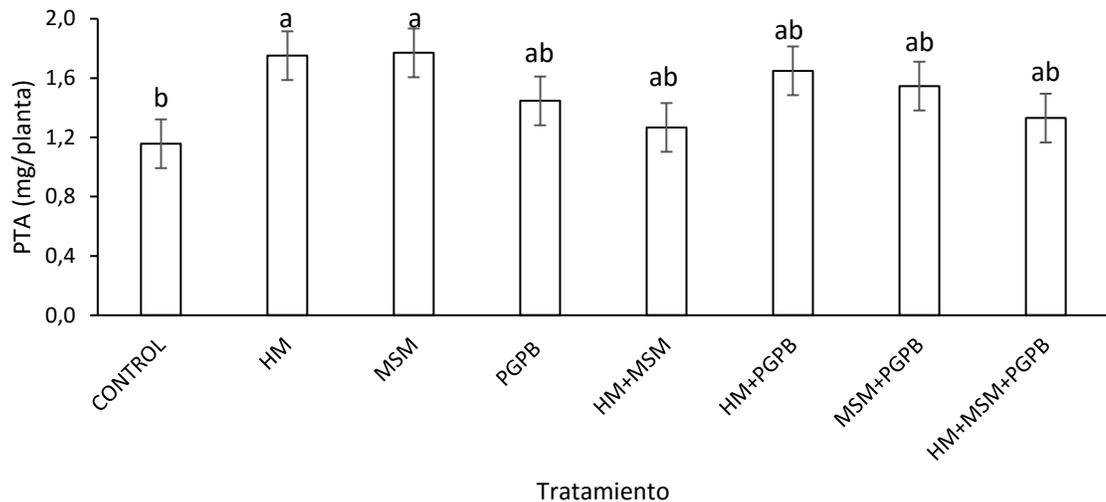
En la Figura 3.3. se muestra la evaluación de la concentración de fósforo foliar de plántulas de leucaena; las plántulas del control no inoculado presentaron una concentración de P en las hojas de 0.152%. Hubo una concentración de este nutriente significativamente mayor al inocular individualmente con MSM y con PGPB

comparado con el control, obteniéndose valores de 0.226 y 0.195 %, respectivamente, los cuales no difirieron entre sí. Estos valores fueron seguidos por la concentración de P foliar hallada al inocular individualmente con el HM (0.181%), el cual no fue significativamente diferente del control. Por otro lado, las inoculaciones duales y la triple no generaron concentraciones de P foliar diferentes a las del control.

Las plantas control exhibieron un PTA de 1.157 mg/planta, el cual fue significativamente mayor cuando se inoculó individualmente con el HM y con MSM alcanzándose valores de 1.751 y 1.770 mg/planta, respectivamente. Estos corresponden a incrementos de 51.3 y 53.0% con respecto al control. El resto de los tratamientos generaron valores intermedios (1.267 – 1.649 mg/planta), los cuales no fueron significativamente diferentes del control ni de los tratamientos HM y MSM (Figura 3.4).

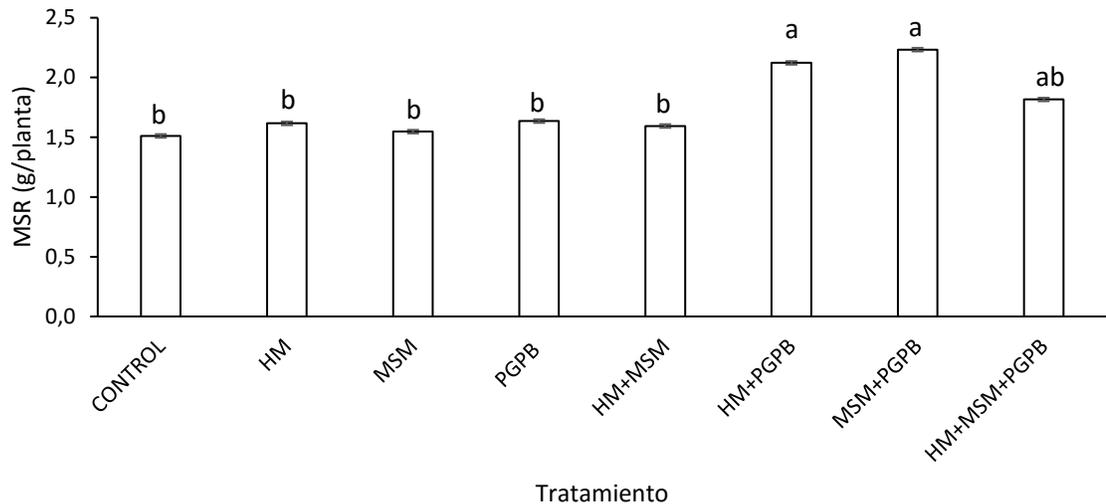


**Figura 3.3.** Concentración de fósforo foliar de plantas de leucaena en función de los tratamientos con inoculación individual y combinada de un hongo micorrizal (HM), un microorganismo solubilizador de minerales (MSM) y una bacteria promotora de crecimiento vegetal (PGPB). Cada columna representa el promedio de 10 repeticiones. Las barras representan el error estándar. Las columnas con letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas según la prueba de rangos múltiples de Duncan ( $P < 0.05$ ).



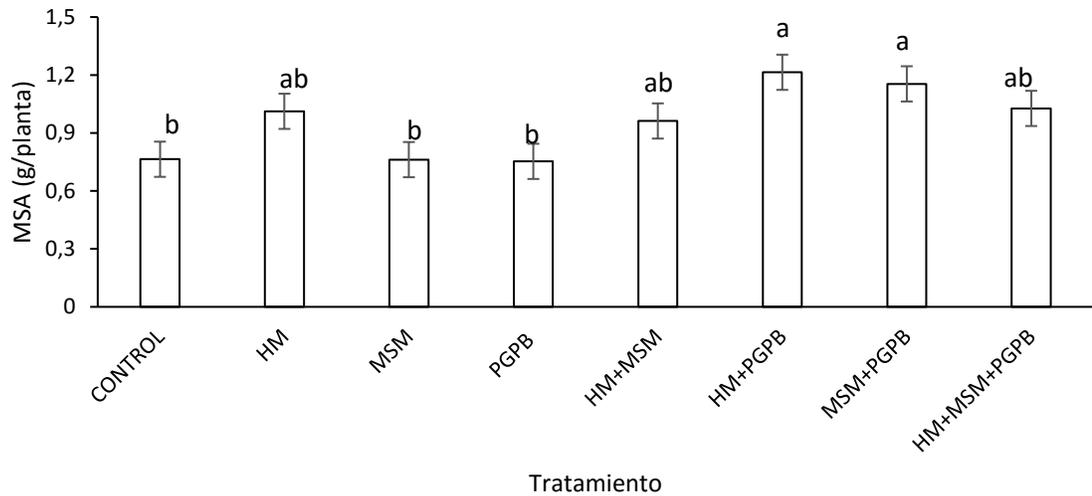
**Figura 3.4.** Contenido de fósforo en la parte aérea (CPA) de plantas de *Leucaena* en función de los tratamientos con inoculación individual y combinada de un hongo micorrizal (HM), un microorganismo solubilizador de minerales (MSM) y una bacteria promotora de crecimiento vegetal (PGPB). Cada columna representa el promedio de 10 repeticiones. Las barras representan el error estándar. Las columnas con letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas según la prueba de rangos múltiples de Duncan ( $P < 0.05$ ).

Los tratamientos también tuvieron un efecto significativo sobre la MSR de las plantas de *Leucaena* (Figura 3.5). De esta manera, las plantas control no inoculadas presentaron un valor medio de 1.511 g/planta, mientras que con las inoculaciones duales MSM + PGPB y HM+ PGPB se incrementó a 2.233 y 2.122 g/plantas, respectivamente. Incrementos que corresponden a 40.4 - 47.8%. Las otras inoculaciones no presentaron efectos significativos sobre la MSR, sin embargo, todos los tratamientos individuales HM, MSM, PGPB incrementaron la MSR en un 6.9%, 2.4% y 8.2% respectivamente en comparación con el control.



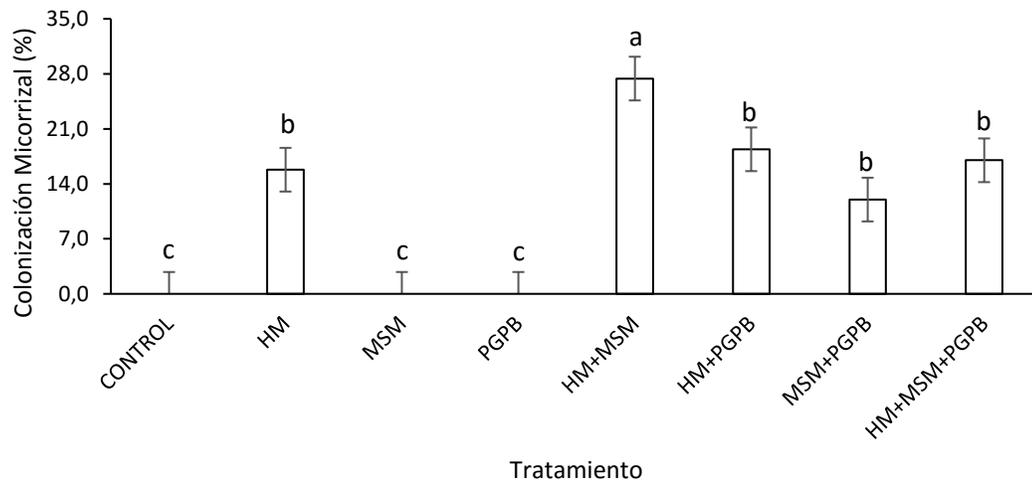
**Figura 3.5.** Masa seca radical (MSR) de plantas de *Leucaena* en función de los tratamientos con inoculación individual y combinada de un hongo micorrizal (HM), un microorganismo solubilizador de minerales (MSM) y una bacteria promotora de crecimiento vegetal (PGPB). Cada columna representa el promedio de 10 repeticiones. Las barras representan el error estándar. Las columnas con letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas según la prueba de rangos múltiples de Duncan ( $P < 0.05$ ).

Los tratamientos tuvieron un efecto estadísticamente significativo en la MSA de las plántulas de *L. leucocephala* (Figura 3.6). Las plántulas no inoculadas tuvieron una MSA promedio de 0.764 g/planta, mientras que al inocular con HM+ PGPB y MSM + PGPB se produjo una MSA significativamente mayor alcanzando valores de 1.214 y 1.154 g/planta, respectivamente. Esto representa un incremento sobre el control del 51.0 – 58.9%. Los otros tratamientos no tuvieron efecto significativo sobre esta variable. Con respecto a los tratamientos individuales se obtuvo únicamente un incremento de 32.5% en la MSA con HM.



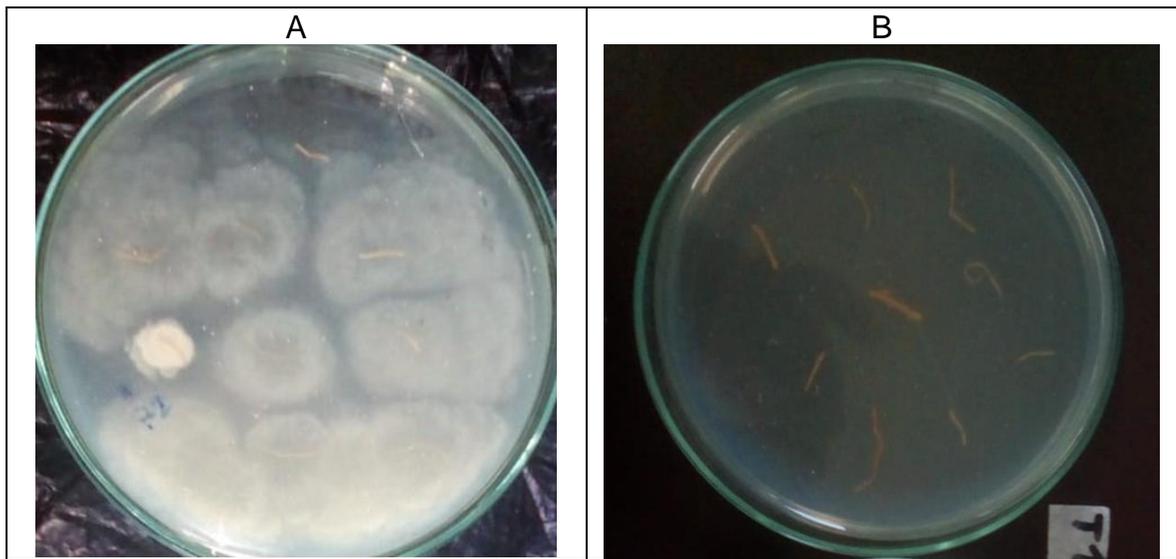
**Figura 3.6.** Masa seca aérea (MSA) de plantas de *Leucaena* en función de los tratamientos con inoculación individual y combinada de un hongo micorrizal (HM), un microorganismo solubilizador de minerales (MSM) y una bacteria promotora de crecimiento vegetal (PGPB). Cada columna representa el promedio de 10 repeticiones. Las barras representan el error estándar. Las columnas con letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas según la prueba de rangos múltiples de Duncan ( $P < 0.05$ ).

Los tratamientos tuvieron efectos significativos sobre el valor de la colonización micorrizal en las plántulas de *leucaena* (Figura 3.7). Las raíces de las plántulas control, MSM y PGPB no presentaron asociación micorrizal (0%); mientras que con las inoculaciones HM, HM+PGPB, MSM+PGPB, HM+MSM+PGPB presentaron un incremento de 15.8, 18.4, 12.0 y 17.0, respectivamente; sin embargo, con la inoculación dual HM+MSM se incrementó a 27.4%, lo cual es superior significativamente con respecto a los otros tratamientos.



**Figura 3.7.** Colonización micorrizal (%) de plantas de *Leucaena* en función de los tratamientos con inoculación individual y combinada de un hongo micorrizal (HM), un microorganismo solubilizador de minerales (MSM) y una bacteria promotora de crecimiento vegetal (PGPB). Cada columna representa el promedio de 10 repeticiones. Las barras representan el error estándar. Las columnas con letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas según la prueba de rangos múltiples de Duncan ( $P < 0.05$ ).

Por otro lado, se detectó en las raíces de las plántulas inoculadas con el MSM la presencia de colonias morfológicamente distinguibles con *Mortierella sp.*, a parte de otros hongos (Figura 3.8A), en el control no inoculado no se detectaron colonias de este hongo (Figura 3.8B).



**Figura 3.8.** A. Raíces de plantas de leucaena inoculadas con el microorganismo solubilizador de minerales (MSM). B: Raíces de plantas de leucaena del control no inoculado.

En las plántulas de *A. mangium* y *B. decumbens* los tratamientos no tuvieron efectos estadísticamente significativos ( $P < 0.01$ ) sobre las variables estudiadas (Tablas 3.2 y 3.3).

Para las plántulas de Acacia los valores de la altura fluctuaron entre 18.5 a 21.8 cm; diámetro entre 3.0 a 3.2 mm en donde el control presentó el valor más alto con respecto a los otros tratamientos empleados (Figuras 3.9 y 3.10). Para la MSA los valores estuvieron entre 1.9 a 2.4 g/planta y aunque no se dio una diferencia estadísticamente significativa las inoculaciones simples Hm, MSM y PGPB incrementaron esta variable en un 1.15%, 6.5% y 24.9% respectivamente con relación al control (Figuras 3.11). La MSR presentó valores que van desde 0.9 a 1.2 g/planta, y aunque no se evidencian diferencias estadísticamente significativas, HM, MSM y PGPB presentaron un incremento con respecto al control del 3.0%, 0.96% y 19.4% respectivamente (Figuras 3.12).

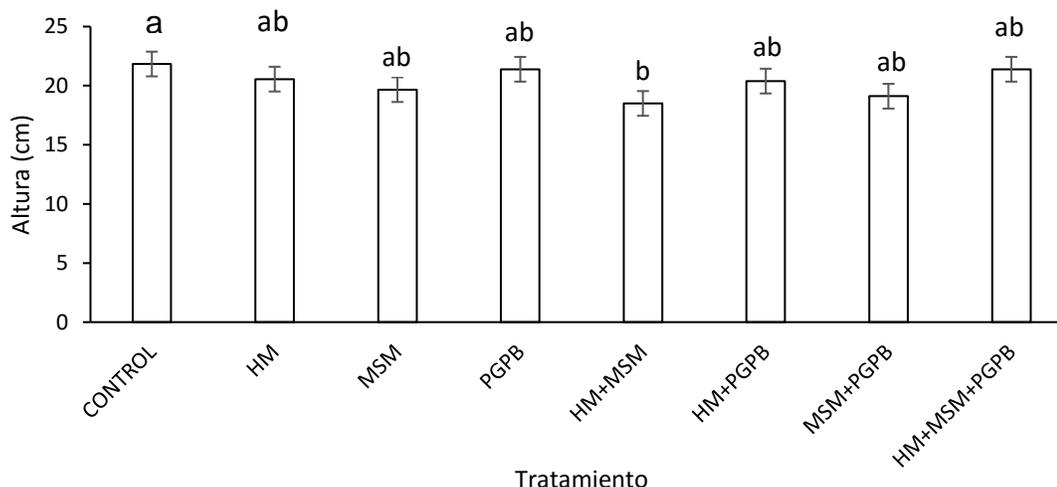
Para las plántulas de Brachiaria, los resultados de la Figura 3.13 y Figura 3.14 muestran que no hubo diferencias estadísticamente significativas sobre la altura (cm) y la MSR (g) con relación a los diferentes tratamientos empleados. Para éstas dos variables el control presentó un valor de 61.26 cm y 2.52 g respectivamente, siendo estos valores mayores con respecto a los otros tratamientos. Para la MSA (g) aunque no se dieron diferencias estadísticamente significativas, los tratamientos HM, PGPB y HM+PGPB presentaron un incremento en comparación al control de

5.6%, 4.24% y 9.1% respectivamente. Dado los anteriores resultados, no se hicieron análisis de la concentración de P en los tejidos ni presencia de los microorganismos en raíces o rizosfera.

### 3.3 *Acacia mangium*

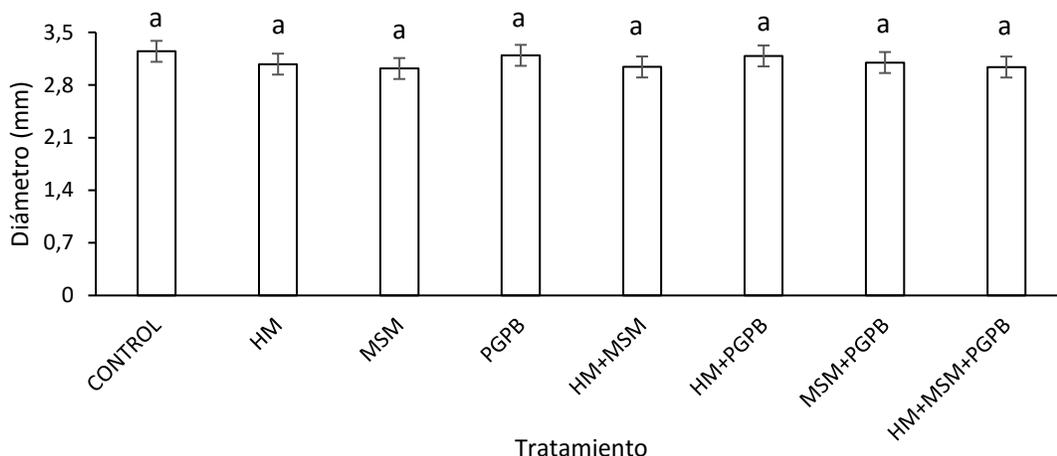
**Tabla 3.2.** Niveles de significancia (P-value) de los tratamientos obtenido de los análisis de varianza de cada una de las variables estudiadas en plántulas de *Acacia mangium*

Fuente	Altura (cm)	Diámetro (cm)	MS Aérea (g/planta)	MS Raíz (g/planta)
Tratamientos	0.2730	0.9123	0.5156	0.3222

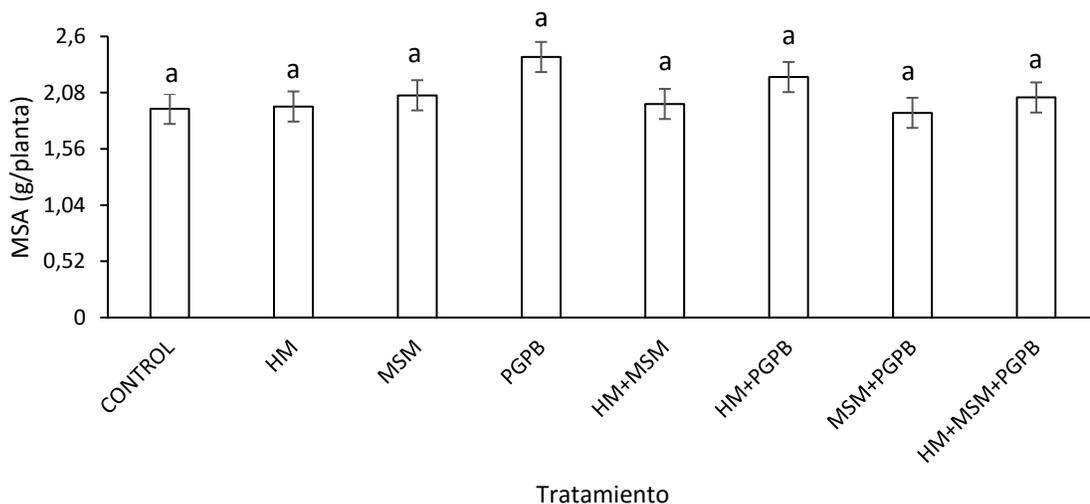


**Figura 3.9.** Altura de plantas de *Acacia mangium* en función de los tratamientos con inoculación individual y combinada de un hongo micorrizal (HM), un microorganismo solubilizador de minerales (MSM) y una bacteria promotora de crecimiento vegetal (PGPB). Cada columna representa el promedio de 10 repeticiones. Las barras

representan el error estándar. NS: indica que no hubo efecto significativo de los tratamientos.

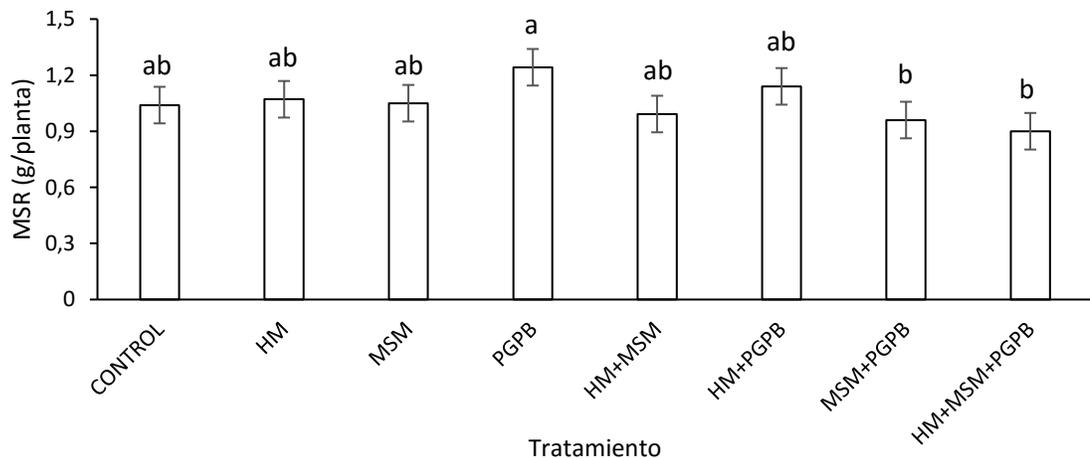


**Figura 3.10.** Diámetro de plantas de *Acacia mangium* en función de los tratamientos con inoculación individual y combinada de un hongo micorrizal (HM), un microorganismo solubilizador de minerales (MSM) y una bacteria promotora de crecimiento vegetal (PGPB). Cada columna representa el promedio de 10 repeticiones. Las barras representan el error estándar. NS: indica que no hubo efecto significativo de los tratamientos.



**Figura 3.11.** Masa seca aérea (MSA) de plantas de acacia en función de los tratamientos con inoculación individual y combinada de un hongo micorrizal (HM), un microorganismo solubilizador de minerales (MSM) y una bacteria promotora de crecimiento vegetal (PGPB). Cada columna representa el promedio de 10 repeticiones. Las barras representan el error estándar. Las columnas con letras

minúsculas diferentes indican diferencias significativas según la prueba de rangos múltiples de Duncan ( $P < 0.05$ ).

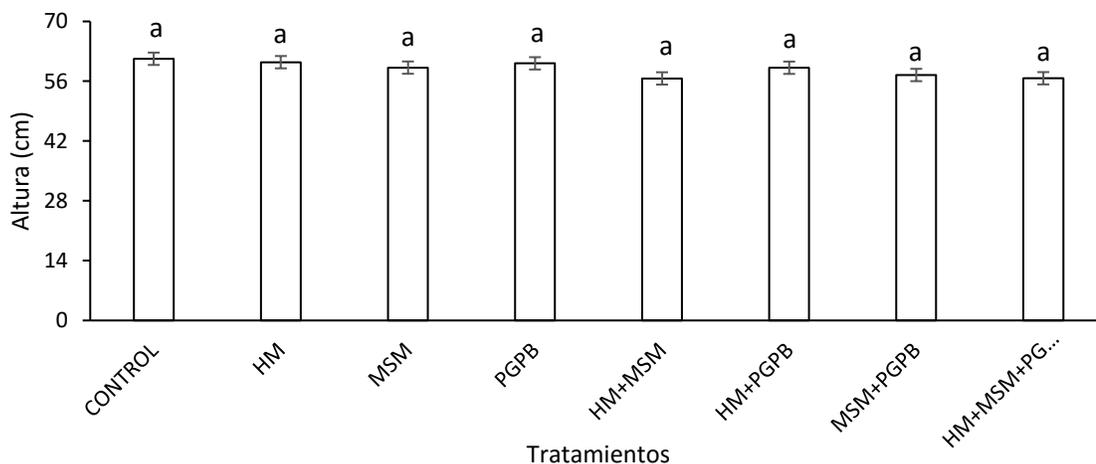


**Figura 3.12.** Masa seca radical (MSR) de plantas de acacia en función de los tratamientos con inoculación individual y combinada de un hongo micorrizal (HM), un microorganismo solubilizador de minerales (MSM) y una bacteria promotora de crecimiento vegetal (PGPB). Cada columna representa el promedio de 10 repeticiones. Las barras representan el error estándar. Las columnas con letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas según la prueba de rangos múltiples de Duncan ( $P < 0.05$ ).

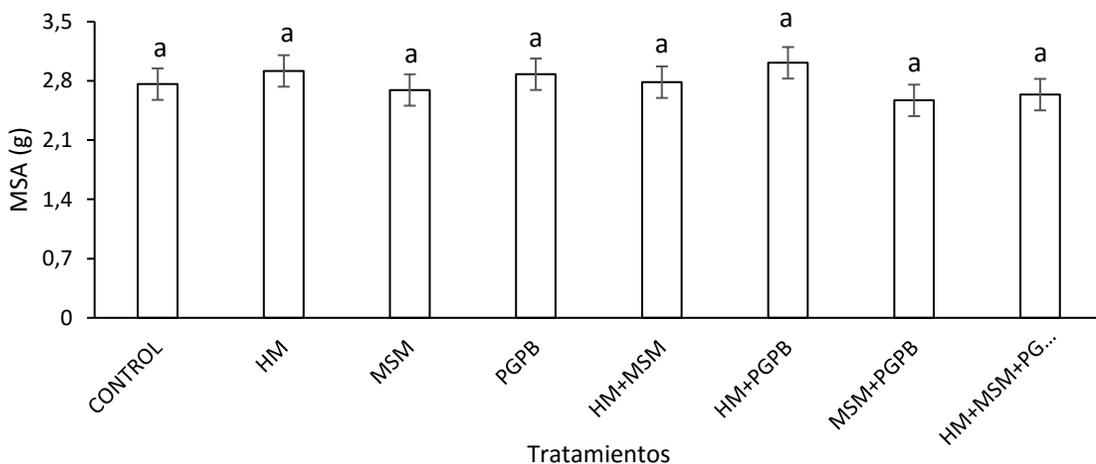
### 3.4 *Brachiaria decumbens*

**Tabla 3.3.** Niveles de significancia (P-value) de los tratamientos obtenido de los análisis de varianza de cada una de las variables estudiadas en plantas de *Brachiaria decumbens*

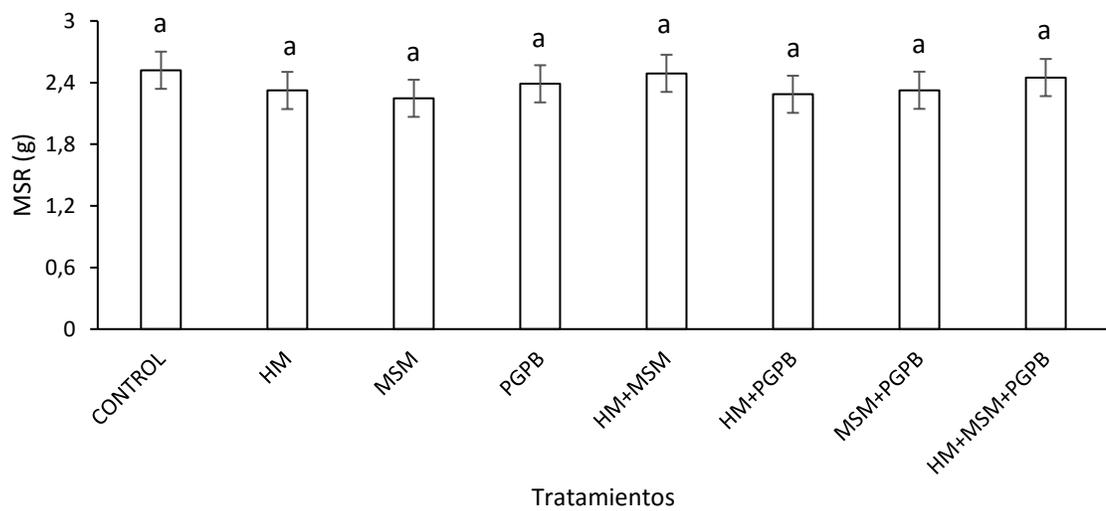
Fuente	Altura (cm)	MS Aérea (g/planta)	MS Raíz (g/planta)
Tratamientos	0.1831	0.7193	0.9505



**Figura 3.13.** Altura de plantas de *Bracharia decumbens* en función de los tratamientos con inoculación individual y combinada de un hongo micorrizal (HM), un microorganismo solubilizador de minerales (MSM) y una bacteria promotora de crecimiento vegetal (PGPB). Cada columna representa el promedio de 10 repeticiones. Las barras representan el error estándar. NS: indica que no hubo efecto significativo de los tratamientos.



**Figura 3.14.** Masa seca aérea (MSA) de plantas de *Bracharia decumbens* en función de los tratamientos con inoculación individual y combinada de un hongo micorrizal (HM), un microorganismo solubilizador de minerales (MSM) y una bacteria promotora de crecimiento vegetal (PGPB). Cada columna representa el promedio de 10 repeticiones. Las barras representan el error estándar. NS: indica que no hubo efecto significativo de los tratamientos.



**Figura 3.15.** Masa seca radical (MSR) de plantas de *Brachiaria decumbens* en función de los tratamientos con inoculación individual y combinada de un hongo micorrizal (HM), un microorganismo solubilizador de minerales (MSM) y una bacteria promotora de crecimiento vegetal (PGPB). Cada columna representa el promedio de 10 repeticiones. Las barras representan el error estándar. NS: indica que no hubo efecto significativo de los tratamientos.

## 4 DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos confirman la hipótesis de investigación planteada en la que el crecimiento y nutrición de plantas establecidas en suelos degradados por minería aurífera puede ser mejorado a través de la inoculación con microorganismos benéficos. Los efectos dependen de la inoculación individual o combinada de estos microorganismos y del tipo de planta.

La respuesta a las inoculaciones con microorganismos benéficos al parecer está controlada por el tipo de especie vegetal que se espera se beneficie de estos tratamientos. La leucaena es una especie adaptada a suelos desde moderadamente ácidos a neutros con buenos contenidos de bases intercambiables (Ca, Mg, K), no crece bien en suelos fuerte a extremadamente ácidos (FRANCIS & LOWE, 2000). Esta especie también es poco eficiente en la toma de P y por eso requiere altas concentraciones del elemento en el suelo para tener un buen desarrollo; por lo anterior se espera tal como ocurrió, que responda a las inoculaciones orientadas a mejorar la disponibilidad y captación de nutrientes por parte de los microorganismos (Tabla 3.1) (OSORIO & HABTE, 2013).

Es claro que los microorganismos utilizados cumplen unas funciones de promoción de crecimiento en las plantas. Por ejemplo, los HM forman asociación micorrizal con las raíces de la mayoría de plantas incluidas las tres estudiadas (WANG, 2017) y mejoran la capacidad de la planta para absorber agua y nutrientes particularmente aquellos de baja movilidad (AGUIRRE-MEDINA, GÁLVEZ-LÓPEZ, & IBARRA-PUÓN, 2018). Adicionalmente, pueden promover la salud vegetal mediante la inducción de resistencia sistémica frente a patógenos (AGUIRRE-MEDINA, GÁLVEZ-LÓPEZ, & IBARRA-PUÓN, 2018). En el presente estudio es claro que la inoculación individual con el hongo micorrizal promovió una mayor acumulación de fósforo en la parte aérea de la planta y al combinarse con PGPB (HM+PGPB) mejoró la masa seca aérea y radical. Éstos efectos interactivos de HM con otros microorganismos han sido previamente reportados por otros autores (AGUIRRE-MEDINA, LEY-DE COSS, VELAZCO-ZEBADÚA, & AGUIRRE-CADENA, 2015) (MORENO, LEÓN, & OSORIO, 2016) (ZAMBRANO & DIAZ, 2008).

En la Figura 3.1 se observa que todos los tratamientos inoculados presentaron menor altura que el testigo, a excepción del tratamiento HMA + PGPB. Esto pudo haber estado relacionado con la demanda de fotosintatos que tienen los microorganismos inoculados al comienzo de la colonización, lo que disminuye la disponibilidad de carbohidratos hacia los vástagos y los incrementa hacia la raíz (AGUIRRE-MEDINA, LEY-DE COSS, VELAZCO-ZEBADÚA, & AGUIRRE-CADENA, 2015). El tratamiento en donde la altura fue mayor que el testigo tenía presencia de *R. fasciculatum* y *A. brasilense* esto posiblemente se dio por un aumento en la capacidad de absorción, solubilización de nutrientes y un mayor desarrollo radical promovido por estos microorganismos; efectos similares fueron obtenidos en una investigación realizada en *Gmelina arborea* con *Glomus sp.* y *A.*

*brasilienses* (ZAMBRANO & DIAZ, 2008) (AGUIRRE-MEDINA, LEY-DE COSS, VELAZCO-ZEBADÚA, & AGUIRRE-CADENA, 2015).

Los resultados con relación a la concentración de fósforo foliar muestran que la inoculación de leucaena con MSM. y con PGPB por separado, permitió una mayor acumulación de este elemento en las hojas posiblemente debido a la capacidad de estos dos microorganismos de solubilizar el fósforo insoluble presente en el material de depósito utilizado (4.7 mg/kg), convirtiéndolo en una forma disponible para la plántula. En contraste ni las dobles inoculaciones, ni la inoculación triple potenció el efecto, lo cual puede estar asociado a la competencia que se establecen entre estos microorganismos por espacio y compuestos carbonáceos que secreta la raíz (Figura 3.3). Esta situación ha sido reportada por otros autores previamente (RAMÍREZ, OSORNO, OSORIO, & MORALES, 2013) (TAVARES DE LIMA, y otros, 2011).

Por otro lado, el hongo solubilizador de minerales *Mortierella sp.* ha sido reportado como un promotor de crecimiento de varias especies vegetales en diferentes tipos de suelos. El mecanismo específico está asociado a la producción de ácidos orgánicos (p.e., ácido oxálico) que ayudan a disolver minerales nativos del suelo o aplicados (RAMÍREZ, OSORNO, OSORIO, & MORALES, 2013). En suelos con baja fijación de fósforo, como el estudiado (entisol) la actividad individual del MSM puede promover la absorción de P como se observó en este estudio y el crecimiento de las plantas al estar combinado con otros microorganismos; en otros suelos con mayor fijación de P (p.e. oxisoles, ultisoles, andisoles) puede requerir la presencia de los HM para que éstos últimos absorban el  $H_2PO_4^-$  producto de su disolución (Figura 3.3 y Figura 3.4) (OSORIO & HABTE, 2013).

Adicionalmente, la mayor promoción de crecimiento radical se dio en dos de los tratamientos que incluían *A. brasilense*; ésta es una de las bacterias más empleadas para promover el crecimiento de las plantas, tanto de interés agrícola, forestal y ambiental (STEENHOUDT & VANDERLEYDEN, 2000). Sus mecanismos de acción están asociados a la fijación asimbiótica de nitrógeno atmosférico, la solubilización de fosfatos (PÉREZ PÉREZ, SAN JUAN RODRÍGUEZ, TORTORA, VERA, & CASAS GONZÁLEZ, 2019), la producción de fitohormonas (p.e., auxinas, giberilinas, ácido indol acético) (AGUIRRE-MEDINA, LEY-DE COSS, VELAZCO-ZEBADÚA, & AGUIRRE-CADENA, 2015) (DOBBELAERE, VANDERLEYDEN, & OKON, 2003), que modifica la morfología y generan un mejor desarrollo radicular como el obtenido en este estudio. Normalmente, la promoción en el sistema de raíces consiste en aumentar el número y longitud de pelos radicales que son los responsables de la absorción de nutrientes particularmente de aquellos de baja movilidad como el P (Figura 3.5) (GUPTA, SINGH PARIHAR, KUMAR AHIRWAR, KUMAR SNEHI, & SINGH, 2015) (STEENHOUDT & VANDERLEYDEN, 2000).

Las combinaciones HM+PGPB y MSM+PGPB muestran claramente que los efectos interactivos de estos microorganismos sobre el crecimiento de la planta fueron mayores a comparación de los efectos individuales. En ambos casos coinciden la

presencia del PGPB debido quizás a una mejora de la captación del N<sub>2</sub> por parte de la bacteria y su transformación a amonio y aminoácidos que le cede a las raíces (SANGOQUIZA CAIZA, YÁNEZ GUZMAN, & BORGES, 2019). Los hongos en estas combinaciones pueden estar ayudando a suplir P y otros nutrientes de baja movilidad que son transportados a la parte aérea y en interacción con la radiación solar inducen la fotosíntesis, la respiración, transpiración y el transporte de productos fotoasimilados, que se traducen en una mayor producción de biomasa (AGUIRRE-MEDINA, LEY-DE COSS, VELAZCO-ZEBADÚA, & AGUIRRE-CADENA, 2015). Es bien sabido que la fijación biológica de nitrógeno requiere de una alta cantidad de P (FERRARI & WALL, 2004) que puede ser obtenido a través de la asociación micorrizal o de una disolución de compuestos de P insolubles (Figura 3.6) (AGUIRRE-MEDINA, GÁLVEZ-LÓPEZ, & IBARRA-PUÓN, 2018).

Con relación a la colonización micorrizal, se detectó la presencia del hongo micorrícico tanto en el tratamiento individual, como en los tratamientos combinados e inclusive en uno de los tratamientos donde no se inoculó. El mayor porcentaje de colonización se observó en el tratamiento HM + MSM, lo que no sorprende debido a que varios estudios han demostrado que diferentes hongos solubilizadores pueden modificar por medio de sus exudados parámetros pre-infectivos, como la longitud hifal de las esporas germinadas y el número de ramificaciones hifales. Este aumento en el crecimiento del micelio pre-infectivo y/o en el número de ápices hifales, permite una mayor infección sobre las raíces de las plantas ya que incrementa la posibilidad de contacto entre una mayor cantidad de ápices de HMA y las raíces; por lo que influye positivamente en el transporte de nutrientes (Figura 3.7) (MÓNICA, GODEAS, & SCERVINO, 2018).

Por otra parte en el tratamiento HM+PGPB también se evidenció la colonización micorrizal aunque en menor porcentaje; estudios han demostrado que *Azospirillum* sp juega un papel importante en la regulación y formación de la asociación simbiótica mutualista planta – HMA, por lo que es considerada una bacteria ayudadora de la simbiosis; lo que se puede corroborar con la investigación realizada en *Gmelina arborea* en donde se evaluó el efecto de la inoculación de *Azospirillum brasilense* y *Glomus* sp logrando una colonización de más del 50% (Figura 3.7) (ZAMBRANO & DIAZ, 2008).

El desarrollo de una colonización radical en el tratamiento MSM+PGPB, se dio probablemente por la presencia de otros hongos micorrícicos nativos del suelo, que al estar bajo la influencia de *Mortierella* sp. y *A. brasilenses* se le facilitó la penetración y la posterior colonización de la raíz. Éste hecho explicaría porque en el tratamiento control los hongos nativos no lograron colonizar exitosamente la raíz de leucaena (Figura 3.7) (ZAMBRANO & DIAZ, 2008).

En contraste, se tiene a *A. mangium* y *B. decumbens* que son especies muy bien adaptadas a los suelos fuertes y extremadamente ácidos en los cuales son eficientes tomando los pocos nutrientes disponibles. Estas dos especies son poco

exigentes en P (FERRARI & WALL, 2004) (SIABABA AGGANGAN, KYU MOON, & HEE HAN, 2010) (de FÁTIMA PEDROSO, y otros, 2018). Quizás por lo anterior no se presentó respuesta a la inoculación con estos microorganismos. Sin embargo, hay reportes en la literatura que indican que ellas pueden responder en algún grado a la inoculación con estos microorganismos (Tabla 3.2 y 3.3).

En un sentido práctico es importante resaltar que estos microorganismos de manera individual o combinada pueden mejorar la nutrición y el crecimiento de las plantas y que por tanto deberían considerarse en una alternativa para la reforestación de suelos degradados por minería aurífera de aluvión. Esta alternativa puede ser más viable que el uso de grandes cantidades de enmiendas orgánicas o de fertilizantes que pueden traer efectos negativos en el ambiente (p.e., eutrofización de aguas corrientes) particularmente si se consideran sitios alejados. Sin embargo, es claro a partir de los resultados que los beneficios de estos tratamientos dependen de la especie vegetal. Por lo anterior, se recomienda para el establecimiento masivo de especies vegetales hacer ensayos previos con estos microorganismos y otros de interés, de tal manera que se obtengan los mejores beneficios posibles.

## CONCLUSIONES

- Los tratamientos tuvieron efecto estadísticamente significativo en las plántulas de *Leucaena leucocephala*, pero no sobre *Acacia mangium* y *Brachiaria decumbens*.
- En *Leucaena* se detectó una promoción en el crecimiento con las inoculaciones duales HM+PGPB y MSM+PGPB; debido a que estos microorganismos tienden a asociarse eficientemente incrementando así la captación de nutrientes en las plántulas, generando un mayor crecimiento de la parte aérea y radical trayendo como consecuencia una alta productividad en el cultivo.
- En las plántulas de *Leucaena* se observó que las inoculaciones con un consorcio de micorrizas arbusculares, hongos solubilizadores y bacteria promotora de crecimiento pueden actuar sinérgicamente mejorando la concentración de fósforo foliar y la cantidad de fósforo absorbido. Por lo tanto, el uso de dichos consorcios microbianos puede representar una estrategia biotecnológica para la producción de plántulas de *Leucaena* que pueden ser utilizadas en programas de reforestación de suelos degradados.
- No se evidencia la necesidad de inocular con microorganismos promotores de crecimiento vegetal a plántulas de *Acacia* y *Brachiaria* para que se adapten a estos suelos degradados al menos bajo las condiciones dadas en este estudio.
- La triple inoculación no tuvo efectos significativos para promover el crecimiento y la nutrición fosfórica.

## RECOMENDACIONES

Vale la pena recomendar que en futuras investigaciones se busque microorganismos nativos con funciones similares a las consideradas en este estudio, para así obtener resultados satisfactorios a partir de los recursos biológicos localmente disponibles. Igualmente, se debe considerar el estudio de especies nativas promisorias en estas regiones que al tener una adaptabilidad al menos a las condiciones del clima puedan ser mejoradas con microorganismos benéficos.

Dado los alcances de la investigación que permite la evaluación del potencial de la utilización de especies vegetales pioneras inoculadas con microorganismos promotores de crecimiento vegetal para la restauración en un ecosistema, se recomienda su utilización no solo para ecosistemas intervenidos por minería, sino en cualquier ecosistema en el que se pretendan establecer programas de recuperación, rehabilitación y restauración ecológica. Sin embargo, es importante mencionar que los efectos pueden ser específicos a cierto tipo de suelos, y por eso se recomienda que en futuras investigaciones se debe evaluar el impacto de los suelos en diferentes localidades.

Probar en condiciones de campo los tratamientos que arrojaron los mejores resultados en Leucaena junto con Acacia y Brachiaria desde un enfoque agroecológico.

## BIBLIOGRAFÍA

- AFFONSO, R., ZANIN, A., BRUMMITT, N. A., & ARAÚJO, A. (2015). *Diversity of Scleria (Cyperaceae) in Santa Catarina*. Brazil: Rodriguesia. doi: <https://doi.org/10.1590/2175-7860201566206>
- AGENCIA NACIONAL DE MINERÍA. (5 de Septiembre de 2019). *AGENCIA NACIONAL DE MINERÍA*. Obtenido de <https://www.anm.gov.co/?q=cifras-de-produccion-de-mineria-en-el-segundo-trimestre-de-2019>
- AGUIRRE, P. F., OLIVO, C. J., RODRIGUES, P. F., FALK, D. R., ADAMS, C. B., & SCHIAFINO, H. P. (2018). Forage yield of Coastcross-1 pastures inoculated with *Azospirillum brasilense*. *Acta Scientiarum - Animal Sciences*, 1–8. doi:<https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v40i1.36392>
- AGUIRRE-MEDINA, J. F., GÁLVEZ-LÓPEZ, A. L., & IBARRA-PUÓN, J. C. (2018). Growth of *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit biofertilized with arbuscular mycorrhizal fungi in the nursery. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y Del Ambiente*, 49–58. doi:<https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2017.07.043>
- AGUIRRE-MEDINA, J. F., LEY-DE COSS, A., VELAZCO-ZEBADÚA, M. E., & AGUIRRE-CADENA, J. F. (2015). Crecimiento de *Leucaena leucocephala* (Lam.) De Wit inoculada con hongo micorrízico y bacteria fijadora de nitrógeno en vivero. *Revistas Forestales*, 15–22.
- AHEMAD, M., & KIBRET, M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University - Science*, 1–20. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jksus.2013.05.001>
- ALBERTO-CASAS, M., PEREZ, J., JEREZ, F., FAJARDO-MOLINA, S., MORCILLO-BLANCO, C., & FERNANDEZ-PASCUAL, M. (2019). Respuesta de la soya (*Glycine max* (L) Merr) a la inoculación con *Azospirillum* y *Bradyrhizobium*. *Cultivos Tropicales*, 1-34.
- ALCALDE, S. (2015). Impulso y difusión de la Ciencia del Suelo en el 2015, Año internacional de los Suelos (IYS2015). *Enseñanza de Las Ciencias de La Tierra*, 330–342.
- ALI MALBOOBI, M., OWLIA, P., BAHBAHANI, M., SAROKAHANI, E., MORADI, S., YAKHCHALI, B., & MORABBI, K. (2009). Solubilization of organic and inorganic phosphates by three highly efficient soil bacterial isolates. *Microbiol Biotechnol*, 1471–147. doi:<https://doi.org/10.1007/s11274-009-0037-z>
- ÁLVAREZ DÁVILA, E., & PÉREZ, A. (2012). Bosques y Minería Responsable en Antioquia. *Revista Ambiental ÉOLO*, 197-210.
- ALVAREZ-BERRÍOS, N., CAMPOS-CERQUEIRA, M., HERNÁNDEZ-SERNA, A., DELGADO C, J. A., ROMÁN-DAÑOBEYTIA, F., & AIDE, T. M. (2016). Impacts of small-scale gold mining on birds and anurans near the Tambopata Natural Reserve, Peru, assessed using passive acoustic monitoring. *Tropical Conservation Science*, 832–851. doi:<https://doi.org/10.1177/194008291600900216>

- ANDRADE, C., & G, M. (2011). Estado del conocimiento de la biodiversidad en Colombia y sus amenazas. Consideraciones para fortalecer la interacción Ciencia-Política. *Revista de La Academia Colombiana de Ciencia*, 491–507.
- ARIAS MOTA, R. M., ROMERO FERNÁNDEZ, A. D., BAÑUELOS TREJO, J., & DE LA CRUZ ELIZONDO, Y. (2019). Inoculación de hongos solubilizadores de fósforo y micorrizas arbusculares en plantas de jitomate. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 1747–1757. doi:<https://doi.org/10.29312/remexca.v10i8.1558>
- ASH, H. J., GEMMELL, R. P., & BRASHAW, A. D. (1994). The introduction of native plant species on industrial waste heaps: a test of immigration and other factors affecting primary succession. *Applied Ecology*, 74–84.
- BACA, K., SÁNCHEZ, M., CARREÑO, C., & MENDOZA, G. (2010). Polihidroxicanoatos de cepas de *Azospirillum* spp. aisladas de raíces de *Lycopersicon esculentum* Mill. “tomate” y *Oryza sativa* L. “arroz” en Lambayeque. *Scientia Agropecuaria*, 213–224.
- BASHAN, Y., & HOLGUIN, G. (1993). Anchoring of *Azospirillum brasilense* to hydrophobic polystyrene and wheat roots. *Journal of General Microbiology*, 379–385. doi:<https://doi.org/10.1099/00221287-139-2-379>
- BASHAN, Y., & HOLGUIN, G. (1998). Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: Biocontrol-PGPB (Plant Growth-Promoting Bacteria) and PGPB. *Soil Biology and Biochemistry*, 1225–1228. doi:[https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(97\)00187-9](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(97)00187-9)
- BELTRÁN PINEDA, M. E. (2014). La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal. *Microbiología de Suelo*, 101–113.
- BELTRÁN PINEDA, M. E., & GOMEZ-RODRIGUEZ, A. M. (2016). Biorremediación de metales pesados Cadmio (Cd), Cromo (Cr) y Mercurio (Hg) mecanismos bioquímicos e ingeniería genética: Una Revisión. *Facultad de Ciencias Básicas*, 172–197. doi:<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.18359/rfcb.2027>
- BERNAL, A. (2014). Fitorremediación en la recuperación de suelos: una visión general. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 245–258.
- BHATTACHARYYA, P. N., & JHA, D. K. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *Microbiol Biotechnol*, 1327–1350. doi:<https://doi.org/10.1007/s11274-011-0979-9>
- BODDEY, R., BALDANI, V., BALDANI, J., & BÖBEREINER, J. (1986). Effect of inoculation of *Azospirillum* spp. on nitrogen accumulation by field-grown wheat. *Plant and Soil*, 109–110.
- BRADSHAW, A. (1997). Restoration of mined lands — using natural processes. *Ecological Engineering*, 255–269.
- CABELLO, M. N. (1997). El género *Mortierella* (Zygomycotina, Mucorales) en tierra del fuego (Argentina). . *Boletín de La Sociedad Argentina de Botánica*, 53–58.

- CAMARGO, J., ARIAS, J., & MUÑOZ, D. (2015). Evaluación del contenido de mercurio en suelos y lechos de quebradas en la zona minera de Miraflores, Quinchía, Colombia. *Acta Agronómica*, 165–177. doi:<https://doi.org/10.15446/acag.v64n2.40639>
- CANO, M. A. (2011). Interacción de microorganismos benéficos en plantas: Micorrizas, Trichoderma spp. y Pseudomonas spp. Una revisión. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 15–31.
- CANTERO, M., RHENALS, V., & MORENO, A. (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*, 18–31.
- CARABIAS, J., ARRIAGA, V., & CERVANTES, V. (2007). Las políticas públicas de la restauración ambiental en México: Limitantes, avances, rezagos y retos. . *Restauración EcoLogica En México*, 85–100.
- CÁRDENAS, D. M., GARRIDO, M. F., BONILLA, R. R., & BALDANI, V. L. (2010). Aislamiento e identificación de cepas de Azospirillum sp. en pasto guinea (Panicum maximum Jacq.) del Valle del Cesar. *Pastos y Forrajes*, 33(3). Obtenido de <http://scielo.sld.cu/pdf/pyf/v33n3/pyf05310.pdf>
- CASTEBLANCO, J. A. (2018). Técnicas de remediación de metales pesados con potencial aplicación en el cultivo de Cacao. *La Granja: Revista de Ciencias de La Vida*, 21–35.
- COOKE, J. A., & JOHNSON, M. S. (2002). Ecological restoration of land with particular reference to the mining of metals and industrial minerals: A review of theory and practice. *Environmental Reviews*, 41–71. doi:<https://doi.org/10.1139/a01-014>
- DAZA, P. C., & OSORIO, N. W. (2011). Promoción de crecimiento y absorción de fósforo de plántulas de Leucaena por un hongo micorrizal en un suelo degradado por minería de aluvión. *Suelos Ecuatoriales*, 144–149.
- de FÁTIMA PEDROSO, D., VIANA BARBOSA, M., DOS SANTOS, J. V., ARAÚJO PINTO, F., OSWALDO SIQUEIRA, J., & CARBONE CARNEIRO, M. A. (2018). Los hongos micorrícicos arbusculares favorecen el crecimiento inicial de Acacia mangium, Sorghum bicolor y Urochloa brizantha en suelos contaminados con Zn, Cu, Pb y Cd. *Boletín de Contaminación Ambiental y Toxicología*, 386 - 391. doi:<https://doi.org/10.1007/s00128-018-2405-6>
- DE-BASHAN, L. E., HERNANDEZ, J. P., & BASHAN, Y. (2012). The potential contribution of plant growth-promoting bacteria to reduce environmental degradation - A comprehensive evaluation. *Applied Soil Ecology*, 171–189. doi:<https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.09.003>
- DE-BASHAN, L. E., HOLGUIN, G., GLICK, B., & BASHAN, Y. (1996). Bacterias promotoras de crecimiento en plantas para propósitos agrícolas y ambientales. *In Microbiología Agrícola* , 161–215.
- DELGADILLO-LÓPEZ, A. E., GONZÁLEZ-RAMÍREZ, C. A., PRIETO-GARCÍA, F., VILLAGÓMEZ-IBARRA, J. R., & ACEVEDO-SANDOVAL, O. (2011). Fitorremediación: Una alternativa para eliminar la contaminación. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 597–612. Obtenido de

[http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1870-04622011000200002&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1870-04622011000200002&script=sci_arttext)

- DHANKHER, O. P., PILON-SMITS, E. A., MEAGHER, R. B., & DOTY, S. (2011). Biotechnological approaches for phytoremediation. *Plant Biotechnology and Agriculture*, 309–328. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381466-1.00020-1>
- DÍAZ FRANCO, A., ESPINOSA RAMÍREZ, M., & ORTIZ CHÁIREZ, F. E. (2019). Reducción de la fertilización inorgánica mediante micorriza arbuscular en Sorgo. *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental*, 683–692. doi:<https://doi.org/10.20937/RICA.2019.35.03.13>
- DÍAZ-ARRIAGA, F. (2014). Mercurio en la minería del oro: impacto en las fuentes hídricas destinadas para consumo humano. *Revista Salud Pública*, 947–957.
- DOBBELAERE, S., VANDERLEYDEN, J., & OKON, Y. (2003). Plant Growth-Promoting Effects of Diazotrophs in the Rhizosphere Plant Growth. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 107–149.
- FERRARI, A. E., & WALL, L. G. (2004). Utilización de árboles fijadores de nitrógeno para la revegetación de suelos degradados. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 63-87.
- FRANCIS, J., & LOWE, C. (2000). Bioecología de Arboles Nativos y Exóticos de Puerto Rico y las Indias Occidentales. . *General Technical Report IITF-15*, 1–582.
- FRANKOWSKI, J., LORITO, M., SCALA, F., SCHMID, R., BERG, G., & BAHL, H. (2001). Purification and properties of two chitinolytic enzymes of *Serratia plymuthica* HRO-C48. *Arch Microbiol*, 421–426. doi:<https://doi.org/10.1007/s002030100347>
- FUKAMI, J., OLLERO, F., MEGÍAS, M., & HUNGRIA, M. (2017). Phytohormones and induction of plant-stress tolerance and defense genes by seed and foliar inoculation with *Azospirillum brasilense* cells and metabolites promote maize growth. *AMB Express*, 1-13. doi:<https://doi.org/10.1186/s13568-017-0453-7>
- GARATE, J. S. (2011). Diez años de proyecto piloto de revegetación de áreas degradadas por minería aluvial en el distrito de Huepetuhe, Madre de Dios. *Revista Científica*, 54–64.
- GARBISU, C., BECERRIL, J., EPELDE, L., & ALKORTA, I. (2007). Bioindicadores de la calidad del suelo: herramienta metodológica para la evaluación de la eficacia de un proceso fitorremediador. *Ecosistemas*, 44–49.
- GFMS GOLD SURVEY. (Mayo de 2019). *REFINITIV*. Obtenido de <https://www.refinitiv.com/en/products/eikon-trading-software/metal-commodities/>
- GHOSH, S., & VERMA, N. (2006). Growth and mycorrhizal dependency of *Acacia mangium* willd. Inoculated with three vesicular arbuscular mycorrhizal fungi in lateritic soil. *New Forests*, 75–81. doi:<https://doi.org/10.1007/s11056-004-4763-7>
- GIOVANNETTI, B., & MOSSE, B. (1979). An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *The New Phytologist*, 489–500.

- GLICK, B. (2003). Phytoremediation: Synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. *Biotechnology Advances*, 383–393. doi:[https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(03\)00055-7](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(03)00055-7)
- GLICK, B. R. (2012). Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. *Scientifica*, 1–15. doi:<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.6064/2012/963401>
- GONZALEZ H, & FUENTES N. (2017). *Mecanismo de acción de cinco microorganismos promotores de crecimiento vegetal*, Revista de Ciencia Agrícolas, 34(1), 17–31.
- GONZALEZ-CHÁVEZ, M. C., CARRILLO-GONZÁLEZ, R., & GUTIÉRREZ-CASTORENA, M. C. (2009). Natural attenuation in a slag heap contaminated with cadmium: The role of plants and arbuscular mycorrhizal fungi. *Journal of Hazardous Materials*, 1288–1298. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.04.110>
- GRAY, E. J., & SMITH, D. L. (2005). Intracellular and extracellular PGPR: Commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. *Soil Biology and Biochemistry*, 395–412. doi:<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.08.030>
- GUIMARÃES, S. L., BONFIN-SILVA, E. M., KROTH, B. E., & FORNAZIER, J. C. (2011). Crecimiento e desenvolvimiento inicial de *Brachiaria decumbens* inoculada con *Azospirillum* spp. *Enciclopédia Biosfera*, 286–295.
- GUPTA, G., SINGH PARIHAR, S., KUMAR AHIRWAR, N., KUMAR SNEHI, S., & SINGH, V. (2015). Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and Future Prospects for Development of Sustainable Agriculture. *Microbial & Biochemical Technology*, 96–102. doi:<https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000188>
- HINTON, J. J., VEIGA, M. M., & VEIGA, A. T. (2003). Clean artisanal gold mining: a utopian approach. *Journal of Cleaner Production*, 99–115.
- HOYOS CARVAJAL, L. M. (2012). *Enfermedades de plantas: control biológico*. Medellín: Universidad Nacional de Colombia.
- HUNGRIA, M., NOGUEIRA, M., & SILVA, R. (2016). Inoculation of *Brachiaria* spp. with the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*: An environment-friendly component in the reclamation of degraded pastures in the tropics. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 125–131. doi:<https://doi.org/10.1016/j.agee.2016.01.024>
- ILYAS, S. (2013). Allometric Equation and Carbon Sequestration of *Acacia mangium* Willd. in Coal Mining Reclamation Areas. *Civil and Environmental Research*, 8–16.
- IZQUIERDO, I., CARAVACA, F., ALGUACIL, M., HERNÁNDEZ, G., & ROLDÁN, A. (2005). Use of microbiological indicators for evaluating success in soil restoration after revegetation of a mining area under subtropical conditions. *Applied Soil Ecology*, 3–10. doi:<https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2005.02.004>
- JARA-PEÑA, E., GOMEZ, J., MONTOYA, H., CHANCO, M., MARIANO, M., & CANO, N. (2014). Capacidad Fitorremediadora De 5 Sp Altoandinas En Suelos Contaminados con metales pesados. *Revista Peruana de Biología*, 145–154.

- JEFFRIES , P., GIANINAZZI , S., PEROTTO, S., TURNAU, K., & BAREA, J. M. (2003). The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. *Biology and Fertility of Soils*, 1–16. doi:<https://doi.org/10.1007/s00374-002-0546-5>
- JEYANNY , V., LEE , S. S., & WAN RASIDAH, K. (2011). Effects of arbuscular mycorrhizal inoculation and fertilisation on the growth of *Acacia mangium* seedlings. *Journal of Tropical Forest Science*, 404–409.
- KORMANIK, P., BRYAN, C., & SCHULTZ, R. (1979). Procedures and equipment for staining large numbers of plant root samples for endomycorrhizal assay. 1-3.
- KREMER, R. (2006). Deleterious Rhizobacteria. *Plant-Associated Bacteria*, 1-712. doi:<https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4538-7>
- KUCEY, R. (1983). Phosphate-solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin alberta soils. *Soil Science*, 671–678.
- LEAL PINHEIRO, P. L., RIBEIRO PASSOS, R. R., LOPES PECANHA, A. L., PASQUALOTO CANELLAS, L. P., LOPES OLIVARES, F. L., & DE SÁ MENDONCA, E. S. (2018). Promoting the growth of *Brachiaria decumbens* by humic acids (HAs). *Australian Journal of Crop Science*, 1114–1121. doi:<https://doi.org/10.21475/ajcs.18.12.07.PNE1038>
- LEÓN, J., DÍEZ, M., CASTELLANO, J., OSORIO, L., & MARÍN , N. (2008). Grupos funcionales de microorganismos en suelos degradados por minería de aluvi3n plantados con *Acacia mangium*. *Suelos Ecuatoriales*, 75–80.
- LIU, H., CARVALHAIS, L., CRAWFFORD, M., SINGH, E., DENNIS, P., PIETERSE, C., & SCHENK, P. (2008). Inner plant values: Diversity, colonization and benefits from endophytic bacteria. *Frontiers in Microbiology* , 1-17. doi:<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02552>
- LOPES LEAL, P., VAR3N-L3PEZ, M., OLIVEIRA PRADO, I. G., DOS SANTOS, J. V., FONSECA SOUSA SOARES, C. R., OSWALDO SIQUEIRA, J., & SOUZA MOREIRA, F. M. (2016). Enrichment of arbuscular mycorrhizal fungi in acontaminated soil after rehabilitation. *Sociedade Brasileira de Microbiologia*, 1-10. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2016.06.001>
- LUGTENBERG, B., & KAMILOVA, F. (2009). Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Revista de Microbiologia*, 541–556. doi:<https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.162918>
- MABOOD, F., ZHOU, X., & SMITH, D. (2014). Microbial signaling and plant growth promotion. *Canadian Journal of Plant Science*, 1051–1063. doi:<https://doi.org/10.4141/CJPS2013-148>
- MACDONALD, S. E., LANDHÄUSSER, S. M., SKOUSEN, J., FRANKLIN, J., FROUZ, J., HALL, S., & QUIDEAU, S. (2015). Forest restoration following surface mining disturbance: challenges and solutions. *New Forests*, 703–732. doi:<https://doi.org/10.1007/s11056-015-9506-4>
- MACEK, T., MACKOVÁ, M., & KÁS, J. (2000). Macek, T., Macková, M., & Kás, J. (2000). Exploitation of plants for the removal of organics in environmental remediation. *Biotechnology Advances*, 23–34.

- MARES-PONCE DE LEÓN, Y., MUÑOZ CASTELLANOS, L., RUIZ CISNEROS, M., PÉREZ CORRAL, D., ORNELAS PAZ, J., ACOSTA MUÑOZ, C., & RIOS VELAZCO, C. (2017). Identificación morfológica y molecular de especies de *Mortierella* asociados a rizosfera de manzanos con síntomas de enfermedades radiculares. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 184–195. doi:<https://doi.org/10.18781/r>
- MARTÍNEZ, J., & CASALLAS, M. (2018). Contaminación y remediación de suelos en Colombia Aplicación a la minería de Oro. *Ediciones EAN*, 1-113.
- MARTINEZ, J., RODRIGUEZ TREJOS, D., GUIZAR NOLAZCO, E., & BONILLA BEAS, R. (2008). Escarificación artificial y natural de la semilla *Lupinus bilineatus* Benth. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y Del Ambiente*, 73–79.
- MEIER, S., BORIE, F., BOLAN, N., & CORNEJO, P. (2012). Critical Reviews in Environmental Science and Technology Phytoremediation of Metal-Polluted Soils by Arbuscular Mycorrhizal Fungi Phytoremediation of Metal-Polluted Soils by Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *ENVIRONMENTAL SCIENCE AND TECHNOLOGY*, 741–775. doi:<https://doi.org/10.1080/10643389.2010.528518>
- MENDEZ, M. O., & MAIER, R. M. (2008). Phytostabilization of Mine Tailings in Arid and Semiarid Environments - An Emerging Remediation Technology. *Environmental Health Perspectives*, 278 - 283.
- MIRANSARI, M. (2010). Contribution of arbuscular mycorrhizal symbiosis to plant growth under different types of soil stress. *Plant Biology*, 563–569. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2009.00308.x>
- MÓNICA, I., GODEAS, A., & SCERVINO, J. (2018). Interacciones microbianas: efecto de hongos biocontroladores y solubilizadores de fósforo en los estadios pre-simbióticos de hongos micorrízico arbusculares. *Boletín de La Sociedad Argentina de Botánica*, 153–160. doi:<https://doi.org/10.31055/1851.2372.v53.n2.20500>
- MORENO RESÉNDEZ, A., GARCÍA MENDOZA, V., REYES CARRILLO, J., VÁSQUEZ ARROLLO, J., & CANO RÍOS, P. (2018). Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal: una alternativa de biofertilización para la agricultura sustentable. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 68–83. doi:<https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v20n1.73707>
- MORENO, J., LEÓN, J., & OSORIO, N. (2016). Tree seedling growth promotion by dual inoculation with *Rhizoglyphus fasciculatum* (Thaxt.) Sieverding, Silva & Oehl and *Mortierella* sp., rhizosphere fungi for reforestation purposes, to promote plant P uptake and growth at the nursery state. *Acta Agronómica*, 239-247. doi:<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.15446/acag.v65n3.51106>
- NORRGROVE, L., & HAUSER, S. (2000). Production and nutrient content of earthworm casts in a tropical agrisilvicultural system. *Soil Biology & Biochemistry*, 1651–1660.
- Oficina de las Naciones Unidas. (2016). *Agenda 2030 y los Objetivos de Desarrollo Sostenible. Una oportunidad para América Latina y el Caribe*. Santiago: Naciones Unidas. Obtenido de

<https://www.cepal.org/es/publicaciones/40155-la-agenda-2030-objetivos-desarrollo-sostenible-oportunidad-america-latina-caribe>

- Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (UNODC). (Junio de 2019). *Explotación de oro de aluvión. Evidencias a partir de percepción remota 2018*. Colombia: Ministerio de Energía. Obtenido de Explotación de oro de aluvión. Evidencias a partir de percepción remota: <https://www.minenergia.gov.co/documents/10192/24159317/EVOA+espanol.pdf>
- Organización Mundial de la Salud. (2017). *Riesgos para la salud relacionados con el trabajo y el medioambiente asociados a la extracción*. CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- OROZCO CARDONA, A. F., FRANCO HERRERA, N., & TABORDA BELTRÁN, L. A. (2010). Evaluación de tres métodos de escarificación en semillas de algarrobo (*Hymenaea courbaril* L.). *Revista Investigación Universidad Quindío*, 36–41.
- OSORIO, N. W. (2014). *Manejo de nutrientes en suelos del trópico*. Medellín: Universidad Nacional de Colombia.
- OSORIO, N. W., & HABTE, M. (2009). Strategies for Utilizing Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Phosphate-Solubilizing Microorganisms for Enhanced Phosphate Uptake and Growth of Plants in the Soils of the Tropics. *Microbial Strategies for Crop Improvement*, 325–351. doi:<https://doi.org/10.1007/978>
- OSORIO, N. W., & HABTE, M. (2013). Phosphate desorption from the surface of soil mineral particles by a phosphate-solubilizing fungus. *Biology and Fertility of Soils*, 481–486. doi:<https://doi.org/10.1007/s00374-012-0763-5>
- OSORIO, N. W., & HABTE, M. (2013). Synergistic effect of a phosphate-solubilizing fungus and an arbuscular mycorrhizal fungus on leucaena seedlings in an Oxisol fertilized with rock phosphate. *Botany*, 274–281. doi:<https://doi.org/10.1139/cjb-2012-0226>
- PAISIO, C. E., GONZÁLEZ, P. S., TALANO, M. A., & AGOSTINI, E. (2012). Remediación biológica de Mercurio: Recientes avances. *Latinoam Biotecnol Amb Algal*, 119–146.
- PAVLOTZKY-BLANK, B., & MURILLO-GAMBOA, O. (2012). Ganancia genética esperada en *Acacia mangium* en Los Chiles, zona norte de Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana*, 93. doi:<https://doi.org/10.15517/am.v23i1.2138>
- PÉREZ PÉREZ, J. M., SAN JUAN RODRÍGUEZ, A. N., TORTORA, M. L., VERA, L., & CASAS GONZÁLEZ, M. (2019). Caracterización serológica y molecular de la cepa 8-INICA de *Azospirillum brasilense* utilizada en la biofertilización de la caña de azúcar. *Centro Agrícola*, 5–12.
- PÉREZ, A., CÉSPEDES, C., ALMONTE, I., SOTOMAYOR, D., CRUZ, C., & NÚÑEZ, P. (2012). Evaluación de la calidad del suelo o explotado para la minería después de diferentes sistemas de manejo. *Tierra Latinoamericana*, 201–211.
- PHILLIPS, J. M., & HAYMAN, D. S. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid

- assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*, 158–161. doi:[https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(70\)80110-3](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(70)80110-3)
- PILON-SMITS, E. (2005). Phytoremediation. *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*, 15–39. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394807-6.00016-2>
  - POSADA, R. H., FRANCO, L. A., RAMOS, C., PLAZAS, L. S., SUÁREZ, J. C., & ÁLVAREZ, F. (2008). Effect of physical, chemical and environmental characteristics on arbuscular mycorrhizal fungi in *Brachiaria decumbens* (Stapf) pastures. *Journal of Applied Microbiology*, 132–140. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03533.x>
  - PRIETO BENAVIDES, O., BELEZACA PINARGOTE, C., MORA SILVA, W., VALLEJO ZAMBRANO, E., GUTIÉRREZ LARA, V., & PINARGOTE MENDOZA, E. (2011). Inoculación de *Brachiaria decumbens* con hongos formadores de micorriza arbuscular nativos. *Ciencia y Tecnología*, 9-18.
  - PRIETO, O., BELEZACA, C., MORA, W., VALLEJO, E., GUTIERREZ, V., & PINARGOTE, E. (2011). Inoculación de *Brachiaria decumbens* con hongos formadores de micorrizas arbuscular nativos del trópico húmedo ecuatoriano. *Ciencia y Tecnología*, 9 –18.
  - QUORESHI, A. M. (2008). The use of mycorrhizal biotechnology in restoration of disturbed ecosystem. *Agriculture and Forestry*, 303–320.
  - RAMÍREZ, G., KLINGER, W., & VALOIS, H. (2016). Lineamientos de manejo ecosistémico post aprovechamiento minero en ambientes naturales del Chocó, Colombia. *Biochocó*, 1–33.
  - RAMÍREZ, J., OSORNO, L., OSORIO, N., & MORALES, J. (2013). Alternativas Microbiológicas para Mejorar el Crecimiento del Caupí. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*, 7035–7044.
  - RANGEL-CH, J. O., & RIVERA DÍAZ, O. (2004). DIVERSIDAD Y RIQUEZA DE ESPERMATÓFITOS EN EL CHOCÓ BIOGEOGRÁFICO. *Universidad Nacional de Colombia*, 83-104.
  - REYES, G., CARMONA, S. L., & FERNÁNDEZ, M. E. (2018). Aspectos fisiológicos y de aprovechamiento de *Acacia mangium* Willd. Una revisión. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 244–253.
  - RODRÍGUEZ, H., & FRAGA, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, 319–339.
  - ROONEY, D. C., & CLIPSON, N. J. (2009). Phosphate Addition and Plant Species Alters Microbial Community Structure in Acidic Upland Grassland Soil. *Microbial Ecology*, 4–13. doi:<https://doi.org/10.1007/s00248-008-9399-2>
  - SALIFU, K. F., & TIMMER, V. R. (2001). Nutrient Retranslocation Response of *Picea mariana* Seedlings to Nitrogen Supply. *Soil Science Society of America*, 905–913.
  - SANGOQUIZA CAIZA, C. A., YÁNEZ GUZMAN, C. F., & BORGES, M. (2019). Respuesta de la absorción de nitrógeno y fósforo de una variedad de maíz al inocular *Azospirillum* sp. y *Pseudomonas fluorescens* Influencia de los biofertilizantes en la extracción de nitrógeno y fósforo Response of a maize variety in the absorption of nit. *Acta Avances En Ciencias e Ingenierías*, 84–95.

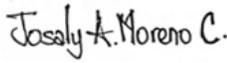
- SANTOYO, G., MORENO-HAGELSIEB, G., OROZCO-MOSQUEDA, C., & GLICK, B. R. (2016). Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological Research*, 92–99. doi:<https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.11.008>
- SCHNEIDER, J., BUNDSCHUH, J., RANGEL, W. D., & GUILHERME, L. R. (2017). Potential of different AM fungi (native from As-contaminated and uncontaminated soils) for supporting *Leucaena leucocephala* growth in As-contaminated soil. *Environmental Pollution*, 125–135. doi:<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.01.071>
- SIABABA AGGANGAN, N., KYU MOON, H., & HEE HAN, S. (2010). Growth response of *Acacia mangium* Willd. seedlings to arbuscular mycorrhizal fungi and four isolates of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker and Couch. *New Forests*, 215–230. doi:<https://doi.org/10.1007/s11056-009-9165-4>
- SIEVERDING, E., ALVES DA SILVA, G., BERNDT, R., & EOHL, F. (2014). *Rhizoglosum*, a new genus of the Glomeraceae. *Mycotaxon*, 373–386. doi:<https://doi.org/10.1007/BF02852425>
- SIMIONI, C., & VALLE, C. B. (2011). Meiotic analysis in induced tetraploids of *Brachiaria decumbens* Stapf. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 43–49. doi:<https://doi.org/10.1590/s1984-70332011000100006>
- SINGH, J. S. (2013). Plant Growth Promoting Rhizobacteria. Potential Microbes for Sustainable Agriculture. *Resonance*, 275–281.
- SMITH, S., & READ, D. (2008). Mycorrhizal symbiosis. *Academic Press, London*, 3rd Edition.
- STEENHOUDT, O., & VANDERLEYDEN, J. (2000). *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiology*, 487–506.
- SURESH, B., & RAVISHANKAR, G. A. (2004). Phytoremediation - A novel and promising approach for environmental clean-up. *Critical Reviews in Biotechnology*, 97–124. doi:<https://doi.org/10.1080/07388550490493627>
- TANGAHU, B. V., SHEIKH ABDULLAH, S. R., BASRI, H., IDRIS, M., ANUAR, N., & MUKHLISIN, M. (2011). A review on heavy metals (As, Pb, and Hg) uptake by plants through phytoremediation. *International Journal of Chemical Engineering*, 1-32. doi:<https://doi.org/10.1155/2011/939161>
- TAVARES DE LIMA, A. S., FERREIRAB XAVIER, T., PEREIRA DE LIMA, C. E., de PAULA OLIVEIRA, J., do ESPÍRITU SANTO Mergulhao, A. C., & do VALE BARRETO FIGUEIREDO, M. (2011). Triple inoculation with *Bradyrhizobium*, *Glomus* and *Paenibacillus* on cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) development. *Brazilian Journal of Microbiology*, 919-926. doi: 10.1590 / S1517-838220110003000010
- 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 trapezoido amazónico. *Acta Biológica Colombiana*, 129–130.

- VALOIS-CUESTA, H., & MARTÍNEZ-RUIZ, C. (2016). Vulnerabilidad de los bosques naturales en el Chocó biogeográfico colombiano: actividad minera y conservación de la biodiversidad. *Bosque*, 295–305.
- VARGAS RÍOS, O. (2011). Restauración ecológica; Biodiversidad y conservación. *Acta Biológica Colombiana*, 221–246.
- VERMA, S. (2016). A Review Study on *Leucaena leucocephala*: A Multipurpose Tree. *Journal of Biological Engineering*, 103–105. doi:<https://doi.org/10.1186/1754-1611-3-14>
- VESSEY, J. K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, 571–586. doi:<https://doi.org/10.1023/A:1026037216893>
- WANG, F. (2017). Technology Occurrence of arbuscular mycorrhizal fungi in mining-impacted sites and their contribution to ecological restoration: Mechanisms and applicationS. *Environmental science and technology*, 1–57. doi:<https://doi.org/10.1080/10643389.2017.1400853>
- ZAMBRANO, J. A., & DIAZ, L. A. (2008). Efecto de la inoculación de *Azospirillum brasilense* y *Glomus* sp. en *Gmelina arborea* durante su germinación y manejo en vivero. *Universitas Scientiarum*, 162-170.
- ZANGARO, W., NISIZAKI, S. M., DOMINGOS, J. C., & NAKANO, E. M. (2003). Mycorrhizal response and successional status in 80 woody species from south Brazil. *Journal of Tropical Ecology*, 315–324. doi:<https://doi.org/10.1017/s0266467403003341>
- ZÁRATE, S. (1994). Revisión del género *Leucaena* en México. *Anales Inst. Biol. Univ. Auton. México, Ser. Bot.*, 83-162.

**ANEXOS**

**ANEXOS**

ANEXO. 1. RESULTADO DEL ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO DE LA MUESTRA DE SUELOS.

 <b>UCO</b> Universidad Católica de Oriente		<h3>Resultado Análisis de Suelos</h3>							
<b>Laboratorio Suelos</b>	<b>Empresa</b>	Josaly Andrea Moreno Castro							
<b>Suelo Vital</b>	<b>Municipio</b>	Peradó/ Istmina/ Chocó							
<a href="mailto:suelovital@uco.edu.co">suelovital@uco.edu.co</a>	<b>Cultivo</b>	Estudio de Suelo							
Tel: (57) (4) 569-90-90. Ext. 778-409	<b>Fecha in.</b>	D: 07	M: 12	A: 2018					
<b>Rionegro-Antioquia-Colombia</b>	<b>Fecha fin.</b>	D: 20	M: 12	A: 2018					
	<b>Móvil</b>	3173663822					<b>Fijo</b>		
<b>Código</b>	<b>Correo</b>	josalyamc@gmail.com							
<b>Nombre de campo</b>	<b>Textura</b>				<b>cmolc/ kg <sup>(+)</sup></b>	<b>dS/m</b>	<b>%</b>		
General	<b>Fracción</b>	<b>%</b>	<b>Clase</b>	<b>pH</b>	<b>Al</b>	<b>C.E</b>	<b>M.O</b>		
<b>Tipo de prueba-análisis</b>	<b>Arena</b>	88	Arenoso a Arenoso Franco	4,6	N.D.	0,061	0,8		
22801	<b>Limo</b>	6							
	<b>Arcilla</b>	6							
 Rubén Darío David I.A., M.Sc	<b>cmol <sup>(+)</sup>/ kg ó meq-g / 100 g</b>								
	<b>K</b>	<b>Ca</b>	<b>Mg</b>	<b>Na</b>	<b>CIC (E)</b>				
	N.D.	0,09	0,08	0,02	0,19				
 Josaly A. Moreno C.	<b>mg/Kg (ppm)</b>								
	<b>N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>	<b>N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	<b>Fe</b>	<b>Mn</b>	<b>Cu</b>	<b>Zn</b>	<b>B</b>	<b>P</b>	<b>S</b>
<b>Microbióloga. Josaly A. Moreno Castro</b>	3,84	35,00	84,82	N.D.	1,92	0,64	0,06	4,66	24,16
<b>Métodos.</b> Textura: Bouyoucos. pH: agua (1:2). C.E: agua (1:2). CIC(E): suma cationes. M.O: calcinación. Ca-Mg-Na-K intercambiables: acetato de amonio 1M y pH=7. Al intercambiable: KCl 1N. P: Bray II. S: fosfato calcio 0.008M. B: agua caliente. Si: cloruro de calcio. Fe-Mn-Cu-Zn: Olsen modificado. N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> : cloruro de potasio 1N. N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> : sulfato de aluminio 0.025M. Las pruebas solubles utilizan agua desionizada como extractante. N.D: no detectable. N.A: no analizada.									
NOTA: Consulte con su asistente técnico.									

ANEXO. 2. IMÁGENES DEL LUGAR DE MUESTREO DEL SUELO (MINA ABANDONADA)



ANEXO. 3. MONTAJE DE BOLSAS CON SUELO Y MATERIA ORGÁNICA.



ANEXO. 4. PLANTAS CON 20 DÍAS DE CRECIMIENTO.



ANEXO. 5. PLANTAS CON 60 DÍAS DE CRECIMIENTO.



ANEXO. 6. COMPARACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS DE LAS PLANTAS DE *Leucaena leucocephala*.



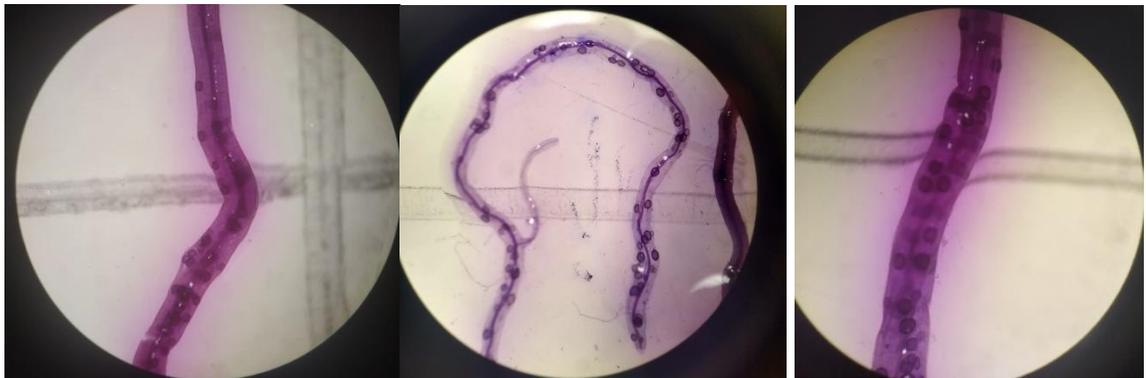
ANEXO. 7. COMPARACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS DE LAS PLANTAS DE *Acacia mangium*



ANEXO. 8. COMPARACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS DE LAS PLANTAS DE *Brachiaria decumbens*.



ANEXO. 9. RAÍCES DE LEUCAENA COLONIZADAS CON *Rhizoglyphus fasciculatum*.



Aumento 40X en el tratamiento HM+PGPB