

**ESTUDIO PRELIMINAR DE FITOESTABILIZACIÓN DEL  
SUELO DE UNA MINA DE CARBÓN, MEDIANTE EL USO DE LA  
PLANTA NATIVA CIRO (*Baccharis macrantha* Kunt) INOCULADA  
CON *Azospirillum brasilense* Cd**

**Natalia Margarita Torres Madariaga**

**UNIVERSIDAD EL BOSQUE**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**PROGRAMA DE BIOLOGÍA**

**BOGOTÁ D.C.**

**2018**

**ESTUDIO PRELIMINAR DE FITOESTABILIZACIÓN DEL  
SUELO DE UNA MINA DE CARBÓN, MEDIANTE EL USO DE LA  
PLANTA NATIVA CIRO (*Baccharis macrantha* Kunt) INOCULADA  
CON *Azospirillum brasilense* Cd**

Natalia Margarita Torres Madariaga

Trabajo de grado modalidad tesis presentado como requisito para optar por el título

de:

**BIÓLOGA**

**Directora**

Lidia Susana Lara  
Licenciada en Biología  
MSc Microbiología

**Co-Director**

Juan Pablo Hernández  
Biólogo  
MSc Manejo de Recursos Marinos

**UNIVERSIDAD EL BOSQUE**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**BOGOTA**

**2018**

A Dios, a mi familia, mis amigos y mis profesores, significa mucho para mí y me siento muy afortunada de haber podido contar con el apoyo el cariño, la paciencia que me tuvieron durante todo este tiempo, permitiéndome llegar hasta este momento de mi vida y poder continuar con la siguiente gran aventura.

De todo corazón

Gracias.

NOTA DE APROBACIÓN

---

LIDIA SUSANA LARA

DIRECTOR

---

JUAN PABLO HERNANDEZ

CO-DIRECTOR

---

LILIANA FIGUEROA DEL CASTILLO

JURADO

---

CAREL CARVAJAL ARIAS

JURADO

---

EDGAR PALACIOS ORTEGA

JURADO

## **Nota de Salvedad**

"La universidad El Bosque, no se hace responsable de los conceptos emitidos por el Investigador en su trabajo, solo velará por el rigor científico, metodológico y ético de este en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia"

## Tabla de Contenido

Resumen .....	14
1 Introducción .....	18
2 Marco de referencia.....	20
2.1 Minería.....	20
2.1.1 Minería de carbón.....	20
2.1.2 En Colombia.....	21
2.2 Consecuencias ambientales, económicas y social .....	23
2.3 Fitoestabilización .....	25
2.4 Generalidades de <i>Baccharis macrantha</i> Kunt .....	28
2.5 Generalidades de <i>Azospirillum brasilense</i> .....	29
3 Pregunta de Investigación .....	32
4 Justificación.....	33
5 Objetivos .....	35
5.1 Objetivo general.....	35
5.2 Objetivos específicos .....	35
6 Materiales y Métodos.....	36
6.1 Ubicación, Materiales y Condiciones de crecimiento .....	36
6.1.1 Adquisición de Plántulas .....	36
6.1.2 Recolección muestras del suelo.....	36
6.2 Método de medición condiciones fisicoquímicos, Microbiológicos del suelo..	37

6.2.1	Método de medición fisicoquímicos .....	37
6.2.2	Método medición microbiológicos.....	38
6.3	Capacidad de crecimiento de <i>Baccharis macrantha</i> inoculada con <i>Azospirillum</i> brasileense.....	40
6.3.1	Inmovilización de <i>A. brasilense</i> con perlas de alginato. ....	40
6.3.2	Inoculación en Círo. ....	40
6.3.3	Diseño Experimental y Toma de muestras .....	41
6.3.4	Análisis Estadístico .....	42
6.4	Concentración metales pesados .....	43
7	Resultados y discusión .....	44
7.1	Condiciones fisicoquímicas y microbiológicas del suelo .....	44
7.1.1	Características Físicas .....	44
7.1.2	Características Químicas .....	48
7.2	<i>Microbiológicos</i> .....	54
7.2.1	Bacterias. ....	55
7.2.2	Hongos.....	61
7.3	Discusión general fisicoquímicos y microbiológicos del suelo de mina de carbón. 64	
7.4	Capacidad de crecimiento de <i>Baccharis macrantha</i> inoculada con <i>Azospirillum</i> brasileense.....	65
7.4.1	Crecimiento en raíz. ....	65
7.4.2	Crecimiento de Tallo. ....	69

7.4.3	Biomasa.....	72
7.4.4	Índice de clorofila.....	74
7.4.5	Número de hojas.....	76
7.4.6	Grosor del Tallo.....	79
7.4.7	Discusión capacidad de crecimiento de <i>B. macrantha</i> inoculada y no inoculada con <i>A. brasilense</i> .....	81
7.5	Concentración inicial y final de Metales Pesados. ....	83
8	Conclusiones .....	85
9	Recomendaciones.....	86
10	Anexos.....	104

## Lista de tablas

<b>Tabla 1</b> Medios de cultivo para siembra de microorganismos de suelo de mina de carbón e invernadero.....	Pag 39
<b>Tabla 2</b> Tratamientos de <i>B. macrantha</i> Kunt realizados. ....	Pag 41
<b>Tabla 3:</b> Características Físicas del suelo.....	Pag 44
<b>Tabla 4:</b> Características químicas del suelo. ....	Pag 48
<b>Tabla 5.</b> Morfotipos bacterianos encontrados en los distintos medios de cultivos aislados de Suelo de Mina de carbón $10^3$ y suelo de invernadero $10^3$ (*Morfotipos hallados por grupo funcional) .....	Pag 55
<b>Tabla 6</b> Descripción macroscópica y microscópica de los Morfotipos de solubilizadores de fosfatos encontrados.....	Pag 56
<b>Tabla 7</b> Descripción macroscópica y microscópica de los Morfotipos de Fijadores de Nitrógeno encontrados. ....	Pag 58
<b>Tabla 8</b> Descripción macroscópica y microscópica de los Morfotipos de bacterias celulolíticas encontradas. ....	Pag 60
<b>Tabla 9</b> Morfotipos de hongos encontrados distintos medios de cultivos, estableciendo la presencia o ausencia en los suelos de Mina de Carbón y Suelo de Invernadero(*Morfotipos hallados por grupo funcional) .....	Pag 62
<b>Tabla 10.</b> Concentración de Metales Pesados en Suelo de Mina de Carbón al inicio del experimento y al final del mismo.....	Pag 83

## Lista de Figuras

- Figura 1** Sitio de levantamiento de suelo de Mina de Carbón, el cuadro azul indica el sitio de levantamiento. .... Pag 37
- Figura 2** Medio de cultivo y bacterias encontradas en medios de cultivos SMRS1 y Picovskaya donde MFS1 corresponde a morfotipo aislado en SMRS1 con característica microscópica: cocos Gram-positivos y Mofotipo MFP2 aislado en Picovskaya con característica microscopica Bacilo Gram-Negativo..... Pag 56
- Figura 3** Medio de cultivo OAB y ASHBY, donde MFO1 corresponde a morfotipo aislado en OAB con característica microscópica: Bacilos Gram-negativos ..... Pag 58
- Figura 4** Medio de cultivo CarboximetilCelulosa, donde MFC1 corresponde Coco Gram-positivo t MFC1 corresponde Bacilos Gram-positivos..... Pag 60
- Figura 5** Imagen microscópica de especies de hongos encontrados. .... Pag 62
- Figura 6** Crecimiento de Raíz(cm) de Ciro (*Baccharis macrantha*) en a) suelo de Mina de Carbón, b) Arena c) Suelo de Invernadero. Inoculada y no inoculada con bacteria promotora de crecimiento *Azospirillum brasilense* en distintos periodos de muestreo (se realizó 1 muestreo cada mes, durante 6 meses). Promedio seguido de letras distintas en cada muestreo, presentan diferencias estadísticas de acuerdo con prueba t Student para valores independientes ( $P < 0,05$ ). La barra en cada columna indica error estándar ( $n=3$ ) ..... Pag 66
- Figura 7** Imagen fotográfica de la comparación entre el largo de la raíz de Ciro en el último muestreo en Arena donde a) corresponde a la planta inoculada con *A. brasilense* y b) a Ciro no inoculado con *A. brasilense*. .... Pag 67

**Figura 8** Imagen fotográfica de la comparación entre el largo de la raíz de *Ciro* en el último muestreo en suelo de mina de carbón donde a) corresponde a la planta inoculada con *A. brasilense* y b) a *Ciro* no inoculado con *A. brasilense* ..... Pag 68

**Figura 9** Imagen fotográfica de la comparación entre el largo de la raíz de *Ciro* en el último muestreo en suelo de mina de carbón donde a) corresponde a la planta inoculada con *A. brasilense* y b) a *Ciro* no inoculado con *A. brasilense*. ..... Pag 68

**Figura 10** Crecimiento del Tallo(cm) de *Ciro* (*Baccharis macrantha*) en a) Suelo de Mina de Carbón, b) Arena, c) Suelo de Invernadero. Inoculada y no inoculada con bacteria promotora de crecimiento *Azospirillum brasilense* en distintos periodos de muestreo (se realizó 1 muestreo cada mes, durante 6 meses). Promedio seguido de letras distintas en cada muestreo presentan diferencias estadísticas de acuerdo con prueba t Student para valores independientes ( $P < 0,05$ ). La barra en cada columna indica error estándar ( $n=3$ ) ..... Pag 70

**Figura 11** Imagen fotográfica de la comparación entre el largo del tallo de *Ciro* en suelo de Invernadero en el último muestreo donde a) corresponde a la planta inoculada con *A. brasilense* y b) a *Ciro* no inoculado con *A. brasilense*. ..... Pag 71

**Figura 12** Imagen fotográfica de la comparación entre el largo del tallo de *Ciro* en Arena en el último muestreo donde a) corresponde a la planta inoculada con *A. brasilense* y b) a *Ciro* no inoculado con *A. brasilense*. ..... Pag 71

**Figura 13** Imagen fotográfica de la comparación entre el largo del tallo de *Ciro* en suelo de mina de carbón en el último muestreo donde a) corresponde a la planta inoculada con *A. brasilense* y b) a *Ciro* no inoculado con *A. brasilense*. ..... Pag 72

**Figura 14** Biomasa de *Ciro* (*Baccharis macrantha*) en a) Suelo de Mina de Carbón, b) Arena, c) Suelo de Invernadero. Inoculada y no inoculada con bacteria promotora de crecimiento *Azospirillum brasilense* en distintos periodos de muestreo (se realizó 1 muestreo cada mes,

durante 6 meses). Promedio seguido de letras distintas en cada muestreo presentan diferencias estadísticas de acuerdo con prueba t Student para valores independientes ( $P < 0,05$ ). La barra en cada columna indica error estándar ( $n=3$ ) ..... Pag 73

**Figura 15** Índice de Clorofila de *Ciro* (*Baccharis macrantha*) en a) Suelo de Mina de Carbón, b) Arena, c) Suelo de Invernadero. Inoculada y no inoculada con bacteria promotora de crecimiento *Azospirillum brasilense* en distintos periodos de muestreo (se realizó 1 muestreo cada mes, durante 6 meses). Promedio seguido de letras distintas en cada muestreo presentan diferencias estadísticas de acuerdo con prueba t Student para valores independientes ( $P < 0,05$ ). La barra en cada columna indica error estándar ( $n=3$ ) ..... Pag 75

**Figura 16** Número de Hojas de *Ciro* (*Baccharis macrantha*) en a) Suelo de Mina de Carbón, b) Arena, c) Suelo de Invernadero. Inoculada y no inoculada con bacteria promotora de crecimiento *Azospirillum brasilense* en distintos periodos de muestreo (se realizó 1 muestreo cada mes, durante 6 meses). Promedio seguido de letras distintas en cada muestreo presentan diferencias estadísticas de acuerdo con prueba t Student para valores independientes ( $P < 0,05$ ). La barra en cada columna indica error estándar ( $n=3$ ) ..... Pag 77

**Figura 17** Evidencia de daño causado a las plantas, por babosas presentes en el invernadero. .... Pag 78

**Figura 18** Grosor de Tallo de *Ciro* (*Baccharis macrantha*) en a) Suelo de Mina de Carbón, b) Arena, c) Suelo de Invernadero. Inoculada y no inoculada con bacteria promotora de crecimiento *Azospirillum brasilense* en distintos periodos de muestreo (se realizó 1 muestreo cada mes, durante 6 meses). Promedio seguido de letras distintas en cada muestreo presentan diferencias estadísticas de acuerdo con prueba t Student para valores independientes ( $P < 0,05$ ). La barra en cada columna indica error estándar ( $n=3$ ) ..... Pag 80

## **Lista de anexos**

- Anexo 1:** Componentes de medio de cultivos utilizados Pag. 104
- Anexo 2** Efectos del pH en la Disponibilidad de nutrientes y actividad de microorganismos.  
Pag. 110
- Anexo 3** Datos obtenidos del crecimiento *Baccharis macrantha* Kunt, inoculada y no inoculada con *Azospirillum brasilense* Cd. Pag. 112
- Anexo 4** Datos estadísticos obtenidos con SPSS Pag. 118

## Resumen

La minería de carbón es una de las fuentes de recursos primarios más importantes a nivel mundial, cuya extracción de mineral genera una serie de problemáticas ambientales y económicas, se afecta el ecosistema por la pérdida de capa vegetal, y contaminación de agua, aire y suelo, por lo que es importante buscar soluciones que permitan la recuperación de estos ambientes. Una forma de recuperar los suelos es mediante la fitoestabilización, esta consiste en el uso de plantas para reducir la contaminación generada los vertimientos químicos que provienen de la extracción de minerales de estos ambientes.

*Azospirillum brasilense* es una bacteria con capacidad de fijar nitrógeno, considerada como Bacterias Promotoras de Crecimiento (PGPB), que le permite a la planta a provechar de forma más efectiva los nutrientes que se encuentran en el suelo, y aumentar su productividad. Siendo un beneficio que se puede utilizar en conjunto con técnicas de fitoestabilización al mejorar la posibilidad de asentamiento de las plantas en suelos que presentan contaminación. El objetivo de este estudio fue evaluar el potencial de *Baccharis macrantha* Kunt inoculada con *Azospirillum brasilense* Cd como especie vegetal útil para la fitoestabilización de un suelo de mina de carbón. Para lograr este objetivo, se sembró *Baccharis macrantha* Kunt inoculada y no inoculada con *Azospirillum brasilense* Cd en suelo de mina de carbón, suelo de invernadero y arena, a las cuales se les realizó la medición de respuestas fisiológicas, adicionalmente, se determinó parámetros fisicoquímicos y microbiológicos del suelo de mina de carbón, así como la concentración de metales pesados en suelo de mina de carbón, al inicio y al final del experimento. Se encontró que no hubo una diferencia estadísticamente significativa

en el crecimiento de *Cirotia* inoculada y no inoculada con *A. brasilense* Cd, se observó una disminución en las concentraciones iniciales y finales de metales pesados presentes en el suelo de mina de carbón sembrado con *B. macrantha* Kunt. Se encontró que el suelo de mina de carbón presentó características que permite el crecimiento de especies vegetales. Con esto se concluyó que *Baccharis macrantha* es una especie vegetal útil para la fitoestabilización en suelo de mina de carbón.

**Palabras clave:** *Azospirillum brasilense* Cd, *Baccharis macrantha* Kunt, Fitoestabilización, PGPB, Minería.

## Abstract

Coal mining, is one of most important source of primary resource worldwide; whose mineral extraction creates a series of environmental and economic problems, the ecosystem is affected by the loss of vegetation, and the contamination of water, air and soil, so it's important to look for solutions that allows the recovery of this environmental issue. One type of solution is phytostabilization, which consist of the use of plants to reduce the pollution generated by chemical discharges that come from the extraction of minerals from these environments,

*Azospirillum brasilense* is a growth-promoting bacteria (PGPB), which allows the plant to have an effective intake if the nutrients found in the soil, and increase its productivity. This benefit can be used in conjunction with phytostabilization techniques to improve the possibility of survival and settlement of this plants in oils that have been contaminated. The objective of this study is to evaluate the potential of *Baccharis macrantha* Kunt inoculated with *Azospirillum brasilense* Cd as a plant species useful for the phytostabilization of a coal mine soil. To achieve this goal, *Baccharis macrantha* Kunt, inoculated and not inoculated with *Azospirillum brasilense* Cd was cultivated in coal mine soil, greenhouse soil and sand, then their physiological responses were measured, additionally, physicochemical and microbiological parameters were determined, as well as the concentration of heavy metals in coal mine soil, at the beginning and at the end of the experiment.

It was found that there was not a statistically significant difference in the growth of *Ciro* inoculated and not inoculated with *A. brasilense* Cd, there was a decrease in the initial

and final concentrations of heavy metals present in the soil of coal mine cultivated with *B. macrantha* Kunt. It was found that the coal mine soil presented characteristics that allow the growth of plant species. With this it was concluded that *Baccharis macrantha* is a useful plant species for phytostabilization in coal mine soil.

**Key Words:** *Azospirillum brasilense* Cd, *Baccharis macrantha* Kunt, Phytostabilization, PGPB, Mining.

## 1 Introducción

La minería de Carbón es una de las industrias que permite el avance económico y tecnológico de los países, al proveer la materia prima que permite desarrollar las distintas tecnologías ( International Council on Mining and Metals ICMM, 2016 ). Sin embargo, esta práctica es destructiva para el medio ambiente ya que genera la pérdida de la capa vegetal, daño en el paisaje del área; contamina el suelo por vertimientos químicos, el agua por el aumento de concentración de partículas producido por manejo inadecuado de residuos y el aire por la emisión de gases y material particulado (Acosta Bueno, 2016), lo que da como resultado el deterioro del ecosistema (Wang et al., 2014).

Aunque ya existen métodos de recuperación de zonas contaminadas por minería, estos suelen ser costosos y de difícil aplicación, por lo que es importante generar alternativas más económicas que permitan la recuperación de zonas contaminadas (Delgadillo, 2008). Dentro de estas alternativas se encuentra la fitoestabilización, la cual consiste en reducir la contaminación del suelo mediante el uso de plantas (Tobar Valenzuela & Vanegas Padilla, 2014). Sin embargo uno de los retos que presentan las plantas para establecerse en estos ambientes contaminados, son la falta de nutrientes y condiciones necesarias para que estos puedan sobrevivir, por este motivo se apoya el crecimiento de la planta, mediante el uso de bacterias promotoras de crecimiento, como *Azospirillum brasilense*, que han permitido el asentamiento de estas plantas en zonas contaminadas y la posible recuperación de su productividad (de-Bashan et al., 2010). Para este estudio, se eligió el uso de la planta nativa *Ciro* (*Baccharis macrantha* Kunt), que se encuentra presente en las zonas de mina de carbón elegida. Adicionalmente, han realizado reportes sobre la capacidad que tiene esta planta para sobrevivir en ambientes contaminados

(Ávila et al., 2015; Hidroel et al., 2015), permitiendo la recuperación de estos suelos. Sin embargo, las plantas requieren de constante acceso a minerales, los cuales no siempre se encuentran disponible para ser absorbidos. Para esto se puede utilizar bacterias promotoras de crecimiento, que permiten a la planta tener una mayor posibilidad de sobrevivir en estos terrenos y al aprovechar mejor los nutrientes del suelo.

## 2 Marco de referencia

### 2.1 Minería

La industria minera tiene una importancia económica muy grande a nivel mundial, ya que ocupa una posición primaria al inicio de la cadena de demanda de recursos (ICMM, 2016). Esta industria provee las bases para el desarrollo humano, mediante el suministro de metal y mineral siendo estos la clave para todos los servicios e infraestructura que se usan actualmente en la sociedad contemporánea, los cuales abarcan una gran cantidad de áreas e industrias que van desde vivienda, calefacción y luz, pasando por transporte, construcción, manufactura, entretenimiento, artes y turismo, todos estos, servicios de alta demanda del consumidor (ICMM, 2012).

#### 2.1.1 Minería de carbón

La minería de carbón consiste en la extracción de carbón directamente de depósitos del suelo. Este mineral está compuesto por roca sedimentaria que se encuentra entre los estratos rocosos (Energy Information Administration EIA, 2018a), es altamente valorado por su contenido energético y versatilidad; se ha utilizado como fuente para generar electricidad, en las industrias metalúrgicas, en industrias de productos especializados como carbón activado, utilizado en filtros para purificar agua; fibra de carbón utilizado como material ligero que refuerza la construcción de un elemento, y el uso dentro de otras industrias (World Coal Association, 2018b).

El carbón representa el 37% de energía utilizada a nivel mundial (World Coal Association, 2018a). Actualmente hay 11 países con las mayores producciones de carbón en el mundo, donde los tres países con mayor producción en el mundo son China (Jia,

2018), Estados Unidos (EIA, 2018b),e India (Statista, 2018). Colombia se encuentra en la posición número 11 a nivel mundial, con una producción de 61.44 millones de toneladas en el 2017, siendo el 10% del comercio a nivel mundial (CEIC, 2018).

### 2.1.2 En Colombia

Colombia cuenta con el 0.4% de reservas de carbón a nivel mundial, y la mitad de reserva de carbón dentro de Suramérica (Unidad de Planeación Minero Energética - UPME, 2017), la minería corresponde al 2.1% del PIB del país, donde la extracción de carbón tiene una participación de 1.3%; El carbón corresponde al 14.1% de las minas que se presentan en el país, y corresponden al 15% de las exportaciones totales del país (Rojas, 2015).

La minería en Colombia está íntimamente relacionada con el desarrollo económico y social, fenómeno que se puede observar a nivel mundial (ICMM, 2016 y ICMM, 2012). Por la participación que tiene en el PIB, este aporta un gran impulso al crecimiento económico a las comunidades ubicadas en la zona de influencia de los yacimientos mineros (Villegas, 2017). Gracias al aporte de regalías, lo cual constituye una de las contribuciones más importantes a las finanzas públicas, representan un beneficio económico fundamental para algunos departamentos y municipios (FEDESARROLLO, 2008). El ingreso económico genera oportunidad en el desarrollo de proyectos cuyo propósito es mejorar la calidad de vida de los habitantes, permitiendo desarrollar proyectos de educación, deporte, cultura, recreación, salud, nutrición, saneamiento básico y reasentamientos. Generando fuente de ingresos a los ciudadanos mediante la creación de empleos y oportunidades de trabajo (Habib Daza, 2017).

En Colombia la extracción de carbón se realiza principalmente en los departamentos de La Guajira, Cesar, Antioquía, Valle del Cauca, Cundinamarca, Boyacá, Santander, Norte de Santander, cada uno con potenciales distintos de producción de carbón (Medina et al., 2014).

Dentro de las empresas dedicadas a la extracción en Colombia, se encuentra MinMiner, la cual es una empresa dedicada a la producción, beneficio y comercialización nacional e internacional de carbones térmicos, metalúrgicos y coque, localizada entre Cucunubá y Sutatausa Cundinamarca Colombia.

Esta empresa, cuyo enfoque está basado en la producción, calidad, posicionamiento, aumento de productos procedentes de la extracción de carbón y servicios. “Busca el mejoramiento continuo ante los clientes y competencia nacional e internacional, busca mantener su posición social como una de las mejores empresas productoras y exportadoras de alta calidad en el campo minero de Colombia. Tiene acciones orientadas al uso y manejo adecuado de recursos naturales, a la prevención de la contaminación y al cumplimiento de los requisitos legales para mantener y mejorar el desempeño ambiental, además de contribuir con el desarrollo sostenible, el equilibrio social y la conservación del espacio natural donde actúa, delimitado por el contrato de concesión 1921T” (MinMiner S.A, 2015). Parte de la problemática que presenta esta empresa, es la acumulación de inertes mineros, también conocidos como Peña, los cuales son una mezcla de roca finamente molida y fluidos de procesos que quedan luego de la extracción del mineral (Loch Arellano, 2017). Este material, actualmente solo se acumula en relaves mineros, sin un objetivo claro para su utilización, esta acumulación genera una serie de problemáticas ambientales, las cuales necesitan un acercamiento a una posible solución.

## 2.2 Consecuencias ambientales, económicas y sociales

Si bien el producto de la minería de carbón presenta ciertos beneficios, el proceso de extracción tienen el potencial de destruir flora, fauna y contaminar el suelo, aire y agua de las zonas que lo rodean, resultando en el deterioro del ecosistema (Wang et al., 2014).

Este impacto en el ambiente, tiene una serie de consecuencias que son de difícil solución. Comenzando con el daño que se genera en el suelo; alterando la concentración de nutrientes lo que lleva a afectar fertilidad, reduciendo la capacidad de prestar diversos servicios ecosistémicos. Es un recurso natural finito no renovable y tiene un papel muy importante en los ciclos biogeoquímicos, el reciclado y almacenamiento de nutrientes, la fertilidad del suelo, la formación de materia orgánica, y estos procesos contribuyen a la sustentabilidad del ecosistema, que al verse afectado interfiere con el desarrollo natural de los procesos biogeoquímicos, indispensable para la producción de alimentos y materias primas de las cuales depende la sociedad mundial y la vida en general (Burbano-Orjuela, 2016). El ambiente se ve afectado inicialmente por la pérdida de área debido a la perturbación que se da por la actividad minera, donde la transformación del terreno ocurre no sólo por la extracción del mineral, sino también por las zonas que son escogidas para ser zonas de acumulación de desechos mineros (Brundtland, 1989). Modificando el relieve e impacto visual de la zona removiendo la capa vegetal del mismo y creando peligros geotécnicos como la desestabilización de ladera y creando desniveles (Ilio, 2013).

El proceso de extracción de carbón, también genera procesos de contaminación en el suelo, mediante el vertimiento de metales pesados tales como plomo (Pb), Cobre (Cu),

Cadmio (Cd) Mercurio (Hg) entre otros, los cuales provienen del uso de químicos para extraer el mineral del suelo, afectando los procesos físicos químicos naturales, creando variaciones en el régimen hídrico del suelo, afectando la estructura del mismo, creando pérdida de horizontes por erosión inducida, cambiando los valores de pH en el suelo. Creando impacto en medios hídricos, contaminando los cuerpos de agua por procesos de lixiviación de metales pesados, y afectando la atmosfera mediante la producción de gases tóxicos producidos durante la explotación (Illio, 2013).

El deterioro y pérdida de las zonas que se produce como consecuencia por la explotación minera, tiene como efecto la reducción o alteración de los ecosistemas, cuya consecuencia está en la disminución o cese de la producción de bienes y servicios ambientales los cuales permiten mantener los equilibrios globales responsables de las condiciones que hacen posible la vida en el planeta, permitiendo a la humanidad satisfacer las diferentes necesidades (Figueroa, Reyes, et al., 2009). Afectando la productividad económica, presentando pérdidas de hasta 1.456 millones de pesos al generarse un impactando en las actividades agropecuarias por la pérdida de la productividad del suelo (Acosta Bueno, 2016).

Las concesiones mineras deben de armonizar la planeación de programas y obras de trabajo para la explotación, con las consideraciones ambientales de prevención del deterioro de los ecosistemas en el área de influencia, por este motivo deben de tener en cuenta las restricciones establecidas según el artículo 35 de la Ley 685 de 2001, por lo que deben de tener sistema de gestión ambiental el cual le permita cumplir con sus obligaciones y responsabilidades ambientales (Ministerio de Minas y Energía y Ministerio del Medio Ambiente, 2002).

Al verse afectado el ecosistema y todas las consecuencias que esto trae, es importante encontrar soluciones que permitan restaurar las zonas que han sido contaminadas por la actividad humana y se encuentran en estado no productivo. Buscar estrategias de recuperación ambiental es fundamental para el futuro.

Adicional a los ambientales y económicos hay daños a salud de la población, no solo con las personas que tienen trabajo o contacto directo con la extracción de carbón, sino también en comunidades que están cerca. Como lo reporta Acosta Bueno, en el 2016, las personas que presentan contacto directo con la extracción de carbón se les ha identificado problemas crónicos, como por ejemplo la enfermedad de pulmón negro (neumoconiosis de los mineros del carbón), mientras que las personas que viven en zonas aledañas, son afectados por los efectos de explosiones, derrumbe de minas, dispersión de polvo y contaminación auditiva generado por los camiones carboneros.

### **2.3 Fitoestabilización**

La problemática de la pérdida ecosistémica y la importancia de recuperarla, ha impulsado el desarrollo de tecnologías que tienen distintos tipos de aplicación y costos que van desde el uso de biofertilizantes, tratamientos con biopolímeros, electromagnetismo entre otros (Zúñiga et al., 2011).

Dentro de estas tecnologías, en las últimas décadas del siglo XX surgieron nuevas técnicas fundamentadas en el empleo de organismos vivos para descontaminar, en este caso, suelos contaminados por el ejercicio de la extracción de carbón mineral. La tecnología basada en el uso de plantas, se denominó fitorremediación el cual está

definido como el uso de plantas para eliminar los contaminantes del entorno o reducir su peligrosidad (Carpena Ruiz & Bernal Calderón, 2007).

La fitorremediación se divide en una serie de fitotecnologías dentro de las cuales se encuentra la fitoestabilización, la cual utiliza plantas para la reducción de la biodisponibilidad de los contaminantes en el entorno, mejorando las propiedades físicas y químicas del medio, mediante la absorción y acumulación de elementos tóxicos en las raíces, o por medio de la disminución de la precipitación de estos contaminantes que se encuentran en la zona de la rizosfera a cuerpos de agua, reduciendo la movilidad de los contaminantes y evitando así su migración a cuerpos de agua o al aire (Delgadillo, 2008).

La fitoestabilización utiliza especies vegetales nativas capaces de resistir y sobrevivir en suelos con altos niveles de metales pesados, con el fin de estabilizar física y químicamente sustratos ricos en metales como es el caso de los depósitos de relaves, comparados con otras tecnologías tradicionales como la Vitrificación o Cementación presenta ventajas a nivel ecológico (Tobar Valenzuela y Vanegas Padilla, 2014).

Los beneficios que presenta la aplicación de la fitoestabilización son varias, las cuales van desde la aplicación del tratamiento tanto *in situ* como *ex situ*. Se realiza sin necesidad de transportar el sustrato contaminado, disminuyendo así la diseminación de contaminantes. Es una tecnología sustentable, eficiente tanto para contaminantes orgánicos e inorgánicos, es de bajo costo, y no requiere de personal especializado para su manejo, no requiere de manejo de energía, solo requiere de prácticas agronómicas convencionales, actúa positivamente sobre el suelo, mejorando sus propiedades físicas y químicas debido a la formación de una cubierta vegetal en la zona (Muñoz, 2013).

La fitoestabilización puede presentar una serie de desventajas como: el tiempo de realización; la localización del contaminante el cual debe estar cercano a la rizosfera, las condiciones físicas y químicas del suelo, los cuales afectan el crecimiento de la planta. También las concentraciones del contaminante presentan una desventaja ya que este debe estar dentro de los límites tolerables para la planta. Riesgo de lixiviación de los contaminantes más móviles y accesibilidad a la zona contaminada. No todas las plantas presentan tolerancia o son acumuladoras (Carpena Ruiz y Bernal Calderón, 2007). Tampoco es muy claro cómo se realiza la disposición de una planta que presente contaminantes en su interior sin que estos sean depositados en el medio nuevamente (Tobar Valenzuela & Vanegas Padilla, 2014). Para poder realizar la fitoestabilización se requieren de un acercamiento inicial para poder poner en práctica a mayor escala, ya que existen una serie de limitaciones sobre las cuales se debe de elaborar un plan de manejo; como se menciona anteriormente la fitoestabilización requiere de plantas que presenten características de tolerancia a metales pesados, que sean nativas de la zona, se requiere de un estudio de los componentes del suelo (Tobar Valenzuela & Vanegas Padilla, 2014), con el fin de observar cuales pueden ser las posibles desventajas al tratar este tipo de suelos a gran escala; debe de haber indicios de que sí existe una reducción de contaminantes presentes en el suelo, lo cual depende del tipo de especie vegetal a ser utilizada, su capacidad de tolerancia a este tipo de suelos contaminados, y la posibilidad de usar apoyo tales como biofertilizantes o microorganismos que facilitan el establecimiento de estas plantas en los tipos de suelos que suele presentar cierto rango de dificultad, al mostrar características como poca concentración de nutrientes, humedad y poca o nula presencia de microorganismos en el suelo (Loch Arellano, 2017).

La realización de fitoestabilización consta de una serie de etapas, donde se requiere del apoyo inicial de áreas multidisciplinarias que proporcionen conocimiento adicional sobre las condiciones fisicoquímicas en las que encuentra el suelo, el grado y con qué elementos se encuentra contaminado el suelo, además de las influencias que pueden estar ejerciendo microorganismos en la dinámica del suelo (Fernández Mulas, 2016), este paso inicial va en conjunto con la prospección de uso de determinadas especies vegetales para su tolerancia y /o acumulación de contaminantes del suelo, con el fin de proporcionar una base sólida que permita seguir con la fitoestabilización realizada en el terreno de interés (Ginocchio & CIMM, 2008).

#### **2.4 Generalidades de *Baccharis macrantha* Kunt**

El *Ciro* o Chilco (*Baccharis macrantha* Kunt) es una planta de la familia Asteraceae (Mangoliopsida: Asterales). Es un arbusto con crecimiento de hasta 2 metros, ramas tortuosas, lenticeladas, hojas oblongo-elíptica, sublanceolada u oblongo-ovada atenuada hacia el ápice (Xi, 1985). Hoja verde discolor, tallos con tintes rojizos (Herbario JBB en línea, 2011).

Encontrándose entre los 2600 hasta 3500 metros de altitud presenta una distribución geográfica que se extiende por toda Colombia y Ecuador. Esta subespecie se encuentra en todos los páramos que rodean la Sabana de Bogotá, extendiéndose por toda la Cordillera Oriental (Xi, 1985).

Según Ávila et al., en el 2015 e Hidroel et al., en 2015, este arbusto presenta crecimiento rápido, asociación con la microbiota del suelo, una alta fecundidad y amplia oferta de recursos para la fauna dispersora de semillas, lo cual les confiere la capacidad de colonizar ambientes altamente perturbados y suelos empobrecidos, se le atribuye

efecto inductor sobre la sucesión vegetal, ya que soporta suelos pobres, poco profundos y erosionados, además de suelos duros y arcillosos.

Sin embargo, aún no hay reportes sobre la capacidad fitoestabilizadora o tolerancia a concentraciones de metales tóxicos.

## 2.5 Generalidades de *Azospirillum brasilense*

*Azospirillum brasilense*, es una proteo-bacteria perteneciente al género *Azospirillum*, los cuales en la actualidad son consideradas bacterias de interés científico debido a su habilidad de mejorar el rendimiento de diversas especies vegetales de interés agrícola y ambiental (Chávez Ramos, 2013).

Descritas por primera vez en 1925 por Beijerinck y redescubiertas en 1975 por Döbereiner y colaboradores, que nombraron la bacteria *Azospirillum spp.* Cuando realizaron nuevos estudios (Caballero-Mellado, 2013). En la actualidad se han reportado 10 distintas especies para este género: *A. brasilense*, *A. lipoferum*, *A. amazonense*, *A. halopreferens*, *A. irakense*, *A. largimobile*, *A. dobereineriae*, *A. oryzae*, *A. melinis* y *A. canadense* (Chávez Ramos, 2013), fueron aisladas principalmente de cereales tales como maíz, trigo, arroz, sorgo, avena y pastos forrajeros (Caballero-Mellado, 2013).

Es una bacteria fijadora de nitrógeno, consideradas como Bacterias promotoras de Crecimiento Vegetal [PBPB por sus siglas en inglés Plant Growth Promoting Bacteria (Bashan & Holguin, 1998) o PGPR, Plant Growth Promoting Rhizobacteria (Koepper & Schroth, 1980), ha sido la más estudiada, ya que es capaz de afectar el crecimiento y rendimiento de una gran variedad de especies vegetales, muchas de estas consideradas de importancia agroecológica (Dobbelaere, Vanderleyden, & Okon, 2003). Se ha

demostrado en diversos estudios el efecto que presenta la inoculación de *A. brasilense* en el crecimiento de distintas plantas, donde se observan: en la raíz, un incremento en la longitud de la misma y el volumen radicular, (de-Bashan et al., 2007). El crecimiento del tallo se incrementa por la producción de Gibelerinas (GAs), (Fabricio D Cassán, Piccoli, & Bottini, 2003), por consiguiente el efecto promotor también afecta la cantidad de hojas presentes en la planta, incrementando de esta manera la biomasa de la planta, creando de esta manera un aumento en la producción de la planta (Pereg, de-Bashan, & Bashan, 2016), también esta influye en los niveles de índice de clorofila, por la relación que existe entre *A. Brasilense* y la fijación de nitrógeno (Corrales-González, Rada, & Jaimez, 2016). Donde el nitrógeno disponible está asociado a los cloroplastos responsables de la coloración verde de las hojas, y encargado de absorber la luz necesaria para realizar la actividad fotosintética (Bernal, Navas, & Hernández, 1996).

El efecto benéfico de la bacteria depende directamente de la colonización de esta en las raíces de las plantas, la cual lo realiza en principio, mediante una fase de dispersión, seguido del movimiento de la bacteria hacia la raíz de la planta hospedera mediante quimiotaxis bacteriana. Luego sigue la fase de absorción la cual consta de dos fases: En la primera fase, la bacteria se adhiere rápidamente, de manera reversible mediante enlaces iónicos hidrofóbicos. En la segunda, ocurre absorción irreversible, la cual se forma una malla entre la bacteria y la superficie de la raíz (Parra & Cuevas, 2001). Lo que lleva a una asociación de la bacteria con la raíz.

Posterior a esto se han propuesto varios mecanismos de acción buscando explicar cómo se da el efecto promotor de esta bacteria a la planta colonizada, donde se ha sugerido que se realiza mediante el aumento de la producción de fitohormonas, mejoran la fijación de nitrógeno en las plantas (Bashan et al., 2004; Fukami et al., 2016), aumentan la

resistencia a los agentes patógenos, se ha reportado que presentan efectos antagónicos contra otros miembros de la comunidad bacteriana al poseer la capacidad de producir sideróforos (agentes quelantes del hierro) (Caballero-Mellado, 2013). Sin embargo, aún no es claro cuál es el mecanismo exacto con el que esta bacteria actúa como promotor de crecimiento vegetal (Bashan y de-Bashan, 2010).

Los efectos de *A. brasilense* se ha observado en una gran variedad de plantas, y en distintas situaciones, que varían, desde estudios en plantas de interés comercial y agrícola (Canto-Martín et al., 2004; Hungria, et al.,2010) hasta interés ambiental, como la recuperación de suelos desérticos degradados, utilizando plantas nativas de la zona (de-Bashan et al., 2010).

Sin embargo, esta bacteria puede poseer dificultades a la hora de colonizar distintas plantas, al verse afectada por distintos factores ambientales, lo cual en ciertos casos puede no hacerse efectivo su efecto promotor de crecimiento (Bashan , 2004).

### **3 Pregunta de Investigación**

*Baccharis macrantha* Kunt inoculada con *A. brasilense* Cd ¿Tiene el potencial para ser usada en la fitoestabilización de un suelo de mina de carbón?

#### 4 Justificación

El carbón es un mineral muy importante para la economía del país, el desarrollo de esta actividad está ligado a la historia del país, y las comunidades que han surgido alrededor de su explotación (Habib Daza, 2017). Encontrándose distribuida en distintos departamentos del país (Unidad de planeación minero energética Upme, 2016). Es conocido que la actividad de extracción de carbón genera una serie de impactos ecosistémicos en los sitios donde se lleva a cabo, los cuales son bastante nocivos para el ambiente, causando levantamiento de cobertura vegetal, escombros de material inerte que causan cambios tóxicos en la composición química del suelo generando un impacto ecológico y económico a las personas que residen aledañas a la zona (Acosta Bueno, 2016). Estos escombros, generados por la extracción del material, no tienen un uso establecido (Loch Arellano, 2017), y el aprovechamiento de este material en procesos industriales, es muy difícil y con excepciones muy marcadas (CEDEX, 2011). Por lo que actualmente, el manejo de este tipo de material presenta un protocolo, el cual se enfoca en la acumulación y aislamiento de este material (UPME, 2015) más no en la posible recuperación o reducción de los contaminantes que presenta este tipo de suelos.

En la actualidad existen tecnologías que buscan generar restauración ecológica de estos sitios contaminados mediante el uso de distintas técnicas que pueden presentar un reto en el costo y la implementación del mismo (Ortiz Bernad et al., 2007). Se han creado diversas tecnologías para recuperar este tipo de suelos, donde uno de los más beneficiosos es por medio de la Fitoestabilización, el cual se ha comprobado anteriormente que es viable para la recuperación de este tipo de suelos (Carpena Ruiz & Bernal Calderón, 2007; de-Bashan et al., 2012). Se recomienda que para el uso de este

método de recuperación de suelos se utilicen plantas nativas de la zona de interés, porque provee una serie de ventajas a la hora de aplicarlo (Jara-Peña et al., 2014; Lara et al., 2011). Es un método que requiere de una serie de pasos que se apoyan en áreas multidisciplinarias (Fernández Mulas, 2016), que recopilan información que permiten establecer si es posible ser aplicado en distintos sitios, los cuales, usualmente presentan características distintas uno de los otros. En Colombia este método aun no es muy aplicado y requiere de una mayor acumulación de conocimientos y estudios, la realización de este proyecto, busca generar información sobre las fases iniciales que permitan la realización de fitoestabilización en suelos de minas de carbón, estableciendo el potencial de uso por parte de la planta nativa *Ciro*, inoculada con la bacteria promotora de crecimiento *Azospirillum brasilense*, en la reducción de la contaminación del suelo de la minería de carbón localizada en el departamento de Cundinamarca.

## 5 Objetivos

### 5.1 Objetivo general

Evaluar el potencial de *Baccharis macrantha* Kunt inoculada con *Azospirillum brasilense* Cd como especie vegetal útil para la fitoestabilización de un suelo de mina de carbón.

### 5.2 Objetivos específicos

- Identificar las condiciones iniciales del suelo de mina de carbón a nivel fisicoquímico y microbiológico.
- Determinar la capacidad de crecimiento de *Baccharis macrantha* Kunt inoculada con *Azospirillum brasilense* Cd en un suelo de mina de carbón bajo condiciones de invernadero
- Comprobar la posible disminución de la concentración de metales pesados en suelo de mina de carbón, sembrado con *Baccharis macrantha* Kunt (Ciro) inoculado con *Azospirillum brasilense* Cd.

## 6 Materiales y Métodos

### 6.1 Ubicación, Materiales y Condiciones de crecimiento

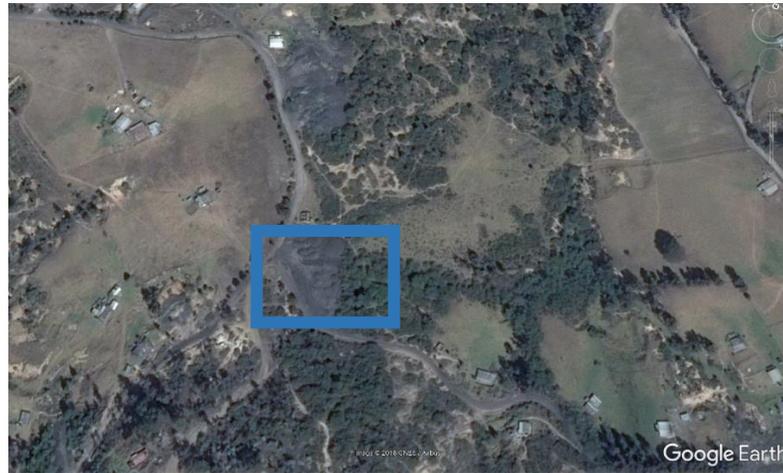
#### 6.1.1 Adquisición de Plántulas.

Para el estudio se emplearon 108 plantas de *Cirol* (*Baccharis macrantha* Kunt). Las cuales fueron adquiridas en el vivero La Mana, localizado en Km25 Autopista Norte, Yerba Buena, Chía, Cundinamarca. Estas se adquirieron en estadio de plántula, con un periodo de 75 días de crecimiento.

#### 6.1.2 Recolección muestras del suelo

1. Arena, muestras dispuestas por el Laboratorio INBIBO de la Universidad El Bosque.
2. Suelo de Invernadero, recolectado del vivero La Mana, mencionado anteriormente.
3. Suelo de mina de carbón se recolectó de las instalaciones de Minas y Minerales S.A (MINMINER) localizada en la Cra 10 N° 8A - 28 Zipaquirá – Cundinamarca. Con las coordenadas: 05° 10' 29.6" N 073° 52' 51.6" W. La Figura 1 corresponde al sitio en la mina donde se acumula el material inerte, proveniente de la extracción de carbón, también conocido como peña.

*Figura 1 Sitio de levantamiento de suelo de Mina de Carbón, el cuadro azul indica el sitio de levantamiento.*



Se siguió el método de muestreo de suelo según Sosa en el 2012, donde se hizo un levantamiento de muestra de suelo compuesta, se recolecto la muestra de forma al azar, siguiendo un patrón de Zigzag, dentro de un área de 50 metros. con una pala.

El montaje se llevó a cabo en las instalaciones de la Universidad El Bosque sede Bogotá, donde se realizó el levantamiento de un invernadero de 9m<sup>3</sup> de 2.5 metros de altura, con techo de plástico, y paredes cubiertas con malla, con el objetivo de preservar las condiciones ambientales más natural posibles.

## **6.2 Método de medición condiciones fisicoquímicas, microbiológicas del suelo**

### **6.2.1 Método de medición fisicoquímicos**

Con el fin de identificar cual era el estado inicial desde el punto de vista fisicoquímico del suelo de mina de carbón, se tuvieron en cuenta los siguientes parámetros físicos: Capacidad de Campo (5%P/V), Densidad Aparente (g/cm<sup>3</sup>), Densidad Real (g/cm<sup>3</sup>), Textura y Humedad (%).

Para los parámetros químicos se seleccionaron: pH, Potasio (meq/100g), Fósforo (mg/kg), Nitratos (ppm), Nitritos (ppm), Nitrógeno Total (%), y Carbono Orgánico Total (%) (Gómez-Luna et al., 2010).

Para tal fin, de la muestra de suelo recolectada en MinMiner, previamente homogeneizada, se tomó 1 kilogramo y se envió a un laboratorio certificado para su análisis. En conjunto se envió una muestra de 1 kilogramo de suelo de Invernadero recolectada de la misma muestra de suelo utilizada para control positivo.

#### 6.2.2 Método medición microbiológicos

Se realizó aislamiento de los microorganismos presentes en suelo de mina y en suelo de invernadero, tomando una muestra de 10g de suelo, la cual se tamizó y trituró para posteriormente ser diluida en un Elenmeyer con 90 mL de solución salina al 0.85%, posteriormente a esto se realizaron diluciones seriadas hasta  $10^{-3}$ .

Para medio solido se tomaron 100  $\mu$ L donde se procedió inocular, por método de siembra masiva las diluciones  $10^{-1}$  y  $10^{-3}$  para suelo de Mina de Carbón; para aislamiento en medio líquido se tomaron 1 mL de estas diluciones, se introdujeron en un tubo Falcón con un volumen de 9mL del medio líquido, las siembra microbiológica se realizó por triplicado (Holguin et al., 1996). Este mismo procedimiento se realizó para suelo de invernadero con la concentración de  $10^{-3}$ .

Se evaluó la presencia o ausencia de microorganismos de cuatro grupos funcionales, siendo solubilizadores de fosfato (Corrales Ramíres et al., 2014; Lara et al., 2011; Scattareggia, 2016), bacterias fijadoras de nitrógeno (De-Bashan et al, 2015; León & Rojas, 2015), celulíticos (Gaitan Bohorquez & Perez Perez, 2007). y

nitrificantes (Rodríguez Moreno & Toro Lozano, 2006). Cuyo método de aislamiento se presencia en la Tabla 1

Grupo Funcional	Medio de Cultivo	Método de preparación	
		Temperatura	Tiempo de Incubación
Solubilizadores de Fosfato	Picovskaya	35°C	5 días
	SMRS1	30°C	5 días
Fijadores de Nitrógeno	ASHBY	35°C	8 días
	OAB	32°C	8 días
Celulolíticos	Carboximetilcelulosa	35°C	8 días
Nitrificantes	Caldo Amonio	28°C	15 días
	Caldo Nitrato	28°C	15 días

*Tabla 1 Medios de cultivo para siembra de microorganismos de suelo de mina de carbón e invernadero*

Para los microorganismos solubilizadores de fosfato determinó la presencia o ausencia de crecimiento y presencia de halos de degradación; para revelar los microorganismos celulolíticos en medio de cultivo Carboximetilcelulosa, se aplicó rojo Congo al medio del cultivo, se dejó 15 minutos, luego se adicionó NaCl a una concentración de 0.1 M por 15 minutos y por ultimo para revelar los microorganismos nitrificantes presentes en el medio de cultivo Caldo amonio, se utilizó caldo de Griess y para revelar los microorganismos en el medio de cultivo Nitrato se usó reactivo Nessler. (Rodríguez Moreno & Toro Lozano, 2006). Las concentraciones y los componentes de los medios de cultivo se observan en Anexo 1

### **6.3 Capacidad de crecimiento de *Baccharis macrantha* inoculada con *Azospirillum brasilense*.**

#### 6.3.1 Inmovilización de *A. brasilense* con perlas de alginato.

Para la inmovilización de *A. brasilense* en perlas de alginato se sigue el método propuesto por de-Bashan et al., 2015. Donde se realizó un cultivo de *A. brasilense* Cd DSM 1843 en un medio de cultivo OAB; luego de 12 horas a  $30\pm 2^{\circ}\text{C}$  el cultivo fue lavado tres veces con solución salina al 0.85% y centrifugado a 4200 rpm, posterior a esto se ajustó la densidad óptica del inóculo a 1 con una longitud de onda de 540 nm para obtener una concentración de  $10^5$  UFC/mL. Luego en condiciones asépticas se mezclaron 80 mL de alginato de sodio al 2% con 20 mL bacterias suspendidas en solución salina hasta conseguir una muestra homogénea. Para luego, dejar caer gota a gota con una jeringa en una solución de  $\text{CaCl}_2$  al 2% donde se forman las perlas de alginato con el inóculo. Se refrigeraron hasta el momento de la inoculación.

#### 6.3.2 Inoculación en Ciro.

Una vez finalizada la inmovilización de *A. brasilense*, el proceso de inoculación se realizó en la raíz de las plántulas de *B. macrantha*, donde se realizó un orificio en el suelo a utilizar, previamente localizado en una maceta de 17 cm de diámetro y 14 cm de alto, y se introdujeron 4 perlas de alginato con una concentración de  $10^5$  de *A. brasilense*. (de-Bashan et al., 2010). Después de haber completado este procedimiento, las macetas se introdujeron en el invernadero, Donde se les realizó regado con agua normal cada 2 días manteniendo condiciones de humedad óptimas. Para confirmar la presencia de *A.*

*brasilense* Cd en la raíz *Baccharis macrantha* Kunt. se tomaron muestra de las raíces de las plantas inoculadas en arena, Suelo de invernadero y suelo de mina de carbón en el mes 4 y mes 6, donde siguiendo el método propuesto por Cassán et al., en el 2015, se trituró y se mezcló con 90 mL de solución salina a 0.85%, posteriormente se realizó diluciones seriadas hasta  $10^7$ , y se cultivaron en agar OAB, luego se identificó la presencia de la bacteria siguiendo las características mencionadas por los autores.

### 6.3.3 Diseño Experimental y Toma de muestras

Se realizó un diseño totalmente aleatorizado el cual consistió en 2 tratamientos principales, los cuales se dividieron en, 1) tratamiento de Ciro inoculada con *Azospirillum brasilense* y 2) Ciro sin inoculación. Cada tratamiento se realizó en 3 tipos de suelos diferentes los cuales corresponden a suelo de Invernadero como control positivo, Arena, como control negativo y Suelo de Mina de Carbón, donde cada uno cuenta con 6 individuos. Con el fin de disminuir el error experimental (Easterling, 2015). Se realizaron tres réplicas, los cuales con un total de 108 plántulas se distribuyó como se observa en Tabla 2

<i>B. macrantha</i> Kunt					
Inoculada con <i>A. brasilense</i> Cd			No Inoculada con <i>A. brasilense</i> Cd		
Suelo mina de carbón	Arena	Suelo de invernadero	Suelo mina de carbón	Arena	Suelo de invernadero

Tabla 2 Tratamientos de *B. macrantha* Kunt realizados.

Se realizaron 6 muestreos mensuales, durante los meses de abril y septiembre, donde se realizó un levantamiento de las plántulas, seleccionando por cada suelo y tratamiento una planta al azar, para observar el efecto promotor de crecimiento realizado por *A. brasilense* en *B. macrantha* se siguió el método realizado por Hungria et al, en el 2010 y por Fukami et al., en el 2016, donde se realizaron mediciones de largo de raíz (cm), largo de tallo (cm), con pie de rey marca Vernier. Biomasa (g) donde se realizó peso seco, cada unidad fue colocada en el horno con circulación forzada de aire marca Pinzuar del Herbario de la Universidad el Bosque (HUB) por 2 días a 75°, luego se determinó el peso seco de cada uno con una balanza analítica Boeco BAS 31 Plus. Se realizó medición del índice de clorofila, tomando 3 plantas de cada suelo por tratamiento, y se realizaron 3 mediciones que luego fueron promediadas. Las mediciones se realizaron a condiciones ambientales en el horario comprendido entre las 9 am y 11 am mediante un clorofilómetro Spectrum CM 1000 de la marca FieldScout. Este equipo permite evaluar el contenido de la clorofila por medio de la transmisión de luz

#### 6.3.4 Análisis Estadístico

El análisis estadístico partió de la hipótesis nula, donde no se muestran diferencias significativas entre los tratamientos, y la hipótesis alterna donde sí se presentan diferencias estadísticas entre estos tratamientos. Con el programa SPSS se realizó pruebas de normalidad (Test de Shapiro-Wilk) y de Homogeneidad de Varianzas (Test de Levene), posterior al cumplimiento de estos supuestos se llevó a cabo un análisis de varianza (ANAVA), lo que permitió conocer las diferencias significativas entre los tipos de suelos utilizados ( $P \leq 0.05$ ) también se realizó la Prueba *t* de Student para muestras independientes, para medir la diferencia entre los dos tratamientos principales.

#### **6.4 Concentración metales pesados**

Para realizar el análisis de la concentración de metales pesados en suelo de mina de carbón, se tomó 1 kilogramo de la muestra proveniente de suelo homogeneizada anteriormente del sitio de recolección de muestra del suelo (6.1.2), y 1 kilogramo de muestra final del suelo en el último muestreo realizado en tratamiento de Fitoestabilización con *Ciro* donde se recolectó la muestra y se homogeneizó. Estas muestras fueron enviadas al laboratorio Doctor Calderón Asistencia Técnica Agrícola LTD, donde se midieron las concentraciones Cadmio, Plomo, Zinc, Cobalto y Mercurio los cuales son contaminantes reportados en la contaminación generados por extracción de carbón en sus diferentes modalidades de actividad. (Guerrero Useda & Pineda Acevedo, 2016)

## 7 Resultados y discusión

### 7.1 Condiciones fisicoquímicas y microbiológicas del suelo

#### 7.1.1 Características Físicas

Las características físicas de los suelos se muestran en los resultados obtenidos tanto del suelo MC como del Suelo de INV observados en la Tabla 3

Suelo	Capacidad de campo (%P/V)	Densidad Aparente (g/cm <sup>3</sup> )	Densidad Real (g/cm <sup>3</sup> )	Textura	Humedad (%)
Mina de Carbón	15,16	1,50	2,27	Arenoso-Franca	2,00
				Arena:75% Limo:22% Arcilla: 3%	
Invernadero	52,08	0,68	1,78	Franco-Limoso	40,06
				Arena:2% Limo:86% Arcilla:12%	

Tabla 3: Características Físicas del suelo.

#### 7.1.1.1 Capacidad de campo y Textura

La capacidad de campo, se refiere a la cantidad relativamente constante de agua que contiene un suelo saturado después de 48 horas de drenaje, donde este drenaje ocurre por la transmisión del agua a través de los poros (FAO, 2007b). El agua es indispensable para las plantas, no solo como alimento, sino también como componente esencial para sus procesos metabólicos y los elementos nutritivos involucrados en estas.

En la Tabla 3 se observan los distintos porcentajes obtenidos por los distintos suelos, donde el suelo de MC presentó un porcentaje de 15.16, porcentaje mucho menor, comparado con el de suelo de INV el cual presentó un porcentaje de 52.08.

Estos valores obtenidos por el suelo de MC corresponden a los niveles que se presentan en un tipo de suelo con textura Arenoso-Franca (Facultad de Agronomía

Universidad de la República Montevideo-Uruguay, 2013), también son resultados que se esperan observar en suelos de Invernadero.

La capacidad de campo de un suelo afecta la disponibilidad de agua para la planta y todos sus procesos esenciales, causando que cuando este se encuentra en valores muy pequeños, el suelo tenga un drenaje mayor, por lo tanto, una menor retención de humedad. Indicando que en este tipo de suelos, se puede generar una serie de inconvenientes que dificulta el desarrollo normal de las raíces de las plantas, al limitar la expansión que esta pueda realizar (Khalajabadi & Salamanca Jimenez, 2005). La textura del suelo indica la proporción de cada elemento que constituye el suelo, los cuales se componen por arena gruesa, arena media, arena fina, limo y arcilla. La textura es la que le da la capacidad al suelo de favorecer la fijación del sistema radicular de las plantas y de su nutrición (Rucks, Garcia, Kaplán, Ponce de León, & Hill, 2004).

Visualizando la Tabla 3, la textura obtenida por el Suelo MC se observa que es un suelo de tipo arenoso-franca, el cual está compuesto por arena 75%, Limo 22% y Arcilla 3%, este parámetro junto con la densidad aparente y densidad real (7.1.1.2; 7.1.1.3), que es un suelo con poca capacidad de retención de agua, lo cual se evidencia en el porcentaje de humedad, este efecto ha sido reportado anteriormente por (Juárez Sanz, 2004; Vargas Rojas, 2009).

En cuanto al suelo de INV, este presenta una textura Franco-Limosa, el cual está compuesto por arena 2%, Limo 86% y arcilla con un 12% indicando que presenta un suelo irregular con capacidad de plasticidad y absorción de agua, retrasando el movimiento de agua y aire (Rucks et al., 2004).

#### 7.1.1.2 Densidad Aparente

Definida como la masa de suelo por unidad de volumen ( $\text{g}/\text{cm}^3$ ), describe la compactación de los suelos, representando la relación entre sólidos y el espacio poroso. Es una propiedad física que influye altamente en la productividad de los suelos (Rojas & Saenz Peña, 2012).

Como se puede observar en la Tabla 3 la Densidad Aparente del suelo MC fue de 1.50 ( $\text{g}/\text{cm}^3$ ), mientras que en el suelo de INV el valor obtenido fue de 0.69 ( $\text{g}/\text{cm}^3$ )

Esto quiere decir como lo establece Khalajabadi & Salamanca Jimenez, en el 2005 cuando se encuentra un mayor número de densidad aparente, se disminuye las condiciones de retención de humedad, limitando a su vez el crecimiento de las raíces, estos resultados concuerdan con los valores de humedad obtenidos anteriormente. Caso contrario se observa en los resultados obtenidos por suelo de Invernadero, donde una menor densidad aparente, permite que haya un mayor porcentaje de humedad.

#### 7.1.1.3 Densidad Real

La densidad real es la relación que existe entre la masa de las partículas secas y el volumen real de la fase sólida, conformada por la misma.

Siendo observada en la Tabla 3 las características físicas, el suelo MC presenta una densidad real de 2,27 ( $\text{g}/\text{cm}^3$ ), mientras que el suelo de INV presentó una densidad real de 1.78 ( $\text{g}/\text{cm}^3$ )

Esta medida junto con la Densidad Aparente nos indican la porosidad en que se encuentra el suelo, donde el porcentaje de porosidad=  $\frac{\text{Densidad Real}-\text{Densidad Aparente}}{\text{Densidad real}} * 100$  (EDUCARM, 2015) esto nos da como resultado:

$$\% \text{ porosidad Suelo de Mina de Carbón} = \frac{(2.27-1.50)}{2.27} * 100 = 33\%$$

$$\% \text{ Porosidad suelo de Invernadero} = \frac{(1.78-0.68)}{1.78} * 100 = 61\%$$

Observando los valores obtenidos, se observa que el suelo de mina de carbón presenta un valor de porosidad media, mientras que el suelo de invernadero presenta un valor de porosidad amplio. Entre mayor porosidad permite una mayor aireación en el suelo, permitiendo un buen soporte a las raíces, sin reducir su desarrollo (FAO, 2007b).

#### 7.1.1.4 Humedad

Uno de los factores más importantes para determinar la salud del suelo, es la humedad, el cual está definido como la cantidad de agua por volumen de suelo que hay en determinada muestra. (Fernández Gálvez, Simminds, & Barahona, 2005) ya que este es un factor que controla el crecimiento y la composición de vegetación en el suelo (Liang, Sugimoto, Tei, & Bragin, 2014).

Observando la Tabla 3 la humedad de suelo de MC corresponde a un 2% el cual es un valor mucho menor, comparado con el suelo INV el cual presenta un 40% de humedad; los valores de MC son valores muy inferiores, El porcentaje de humedad obtenido se explica gracias al valor de Densidad aparente (Tabla 3), y que cuando esta aumenta, se incrementa la compactación del suelo y afecta las condiciones de retención de agua. (Khalajabadi & Salamanca Jimenez, 2005). Caso contrario al que se observa con la relación de la densidad aparente del suelo INV frente al porcentaje de humedad.

Para el suelo de Mina de Carbón, es un suelo con tendencia arenoso, con poca capacidad de retención de agua, una densidad aparente y real un poco más alta, esto influye directamente en la capacidad de humedad dando como resultado un suelo con un porcentaje bajo de humedad (Vargas Rojas, 2009).

Mientras que el suelo de Invernadero presenta condiciones opuestas, indicando que físicamente el suelo con mejores condiciones de crecimiento es el suelo de Invernadero, mientras que el suelo de Mina de Carbón, presentaría una serie de inconvenientes en el crecimiento de plantas, ya que cuando hay un % muy bajo de humedad las plantas comienzan a presentar marchitamiento, crecimiento atrofiado, hojas rizadas y mayor susceptibilidad a plagas (Perry, 2017).

### 7.1.2 Características Químicas

Las características químicas se pueden observar en la Tabla 4

Suelo	pH	Potasio (meq/100g)	Fósforo (mg/kg)	Nitrogeno Total (%)	Nitratos (ppm)	Nitritos (ppm)	Carbono Orgánico Total (%)
Mina de Carbón	6,77	0,25	26,00	0,32	5,00	0,25	2,82
Invernadero	5,20	0,38	4,00	0,40	5,00	0,25	3,48

Tabla 4: Características químicas del suelo.

#### 7.1.2.1 pH

La medición pH indica las condiciones de alcalinidad o la acidez que presenta el suelo (Brown et al., 2007).

Este indicador es considerado de gran importancia en los estudios de suelo ya que se encuentra asociado a la actividad microbiana y a la disponibilidad de nutrientes para las plantas. (Ver Anexo 2)

En la Tabla 4 se observa que el suelo de MC tuvo un pH cercano a neutro (6.77) mientras que el suelo de INV, presentó un pH un poco más ácido (5.20). El pH del suelo se considera neutro cuando se encuentra en 7, debajo de ese valor el pH se considera ácido y por encima de 7 es alcalino; sin embargo, muchas plantas pueden tolerar rangos de pH entre los 5.2 y 7.8 donde se encuentran establecidos el pH del suelo de MC y de INV. (Rosen et al., 2008) La variación de acidez o alcalinidad que presenta un suelo, afecta la biodisponibilidad de nutrientes en el mismo, donde un pH alcalino incrementa los valores de Nitrito, causando interferencia con los procesos naturales de transformación a nitrato, volviéndolos tóxicos al generar acumulación del mismo. También afecta la acumulación de calcio y fósforo, ya que en valores por debajo de 7.0 el calcio tiende a reaccionar con iones fosfato, precipitándose y formando sales de calcio o fósforo disminuyendo la disponibilidad en el suelo; cuando los valores de pH se encuentran muy ácidos, hay una marcada tendencia de des-nitrificación, ya que afecta la comunidad de colonias bacterianas, además se acumulan cantidades tóxicas de iones de aluminio y manganeso que crean ambientes desfavorables alrededor de las raíces de las plantas impidiendo que haya una correcta absorción de potasio, calcio magnesio y molibdeno. (Ecotk, 2015) los resultados de pH de suelo de Mina de carbón están dentro de los límites establecidos por CEDEX, en el 2011 reportados para suelos de minería de carbón indicando valores que van desde 4.2 y 8.5 Estos valores de pH varían según el sitio de muestreo y localización de la mina, (Arranz-González, 2011; Maharana & Patel,

2013). El suelo de invernadero también se encuentra dentro de los límites establecidos para el crecimiento óptimo de las plantas (Rosen et al., 2008).

#### 7.1.2.2 Potasio

El Potasio (K) juega un papel importante en la regulación osmótica de las plantas, también es la responsable de activar muchas enzimas involucradas en la respiración y la fotosíntesis. (Taiz & Zeiger, 2002) Por lo tanto la concentración en la que se encuentre en el suelo es fundamental para determinar la salud del mismo.

En la Tabla 4 se observa la concentración de Potasio en suelo MC corresponde a un 0.25 (meq/100g), mientras que la concentración en suelo de INV corresponde a un 0.38 (meq/100g). La concentración de K puede variar en los suelos, encontrándose entre un 0,5 y 4 (Pellegrini, 2017) si bien se encuentran en menor concentración que los valores sugeridos, es posible que las bajas concentraciones que se presentaban en el suelo fueran provocadas por condiciones previas al uso del suelo para este proyecto (Agronomy Department, 2018).

#### 7.1.2.3 Fósforo

El fósforo (P) es un macronutriente esencial para el crecimiento y desarrollo de todos los seres vivos, ya que forma parte de la composición de las moléculas orgánicas esenciales para la vida (Restrepo et al., 2015).

En la Tabla 4 se observa que el suelo de INV presenta una concentración de 4.00 (mg/kg), mientras que para el suelo de MC, la concentración es mucho mayor con un

valor de 26.00 (mg/kg). Los niveles de P óptimos se encuentran entre los 10 – 20 mg/kg, donde valores inferiores a 10 (mg/kg) se consideran como contenido bajo, por encima de los 20 (mg/kg) (Jose y Barletto, 2011), con valores muy altos, las concentraciones de fósforo se vuelven un problema porque empiezan a generar contaminación por procesos de lixiviación afectando cuerpos de agua y suelos (Fernandez-marcos, 2014), Valores de concentración menor, como los que fueron obtenidos en el suelo de Invernadero, son resultados esperados en el suelo, ya que, al haber un pH ácido, como el que presenta este suelo, las concentraciones de P tienden a ser menores. (Borges et al., 2012) Ya que la concentración y disponibilidad óptima de P se encuentra entre pH 6 y 7, en suelos ácidos la disponibilidad es baja debido a que el elemento se encuentra absorbido en la superficie del suelo, siendo precipitado como Fosfato de Hierro y Aluminio insoluble (Pinzón Uribe & Sotelo Rojas, 2010). Por este motivo es común encontrar concentraciones bajas de P en suelos de pH ácidos, como lo discute. Garrido & Marcela, 2017; Matula en el 2011. Caso contrario ocurrió con los resultados obtenidos por el Suelo de MC, donde se encontraron concentraciones altas de fósforo. El Suelo de MC, está compuesto principalmente por rocas mezcladas con otros minerales. (Restrepo et al., 2015) El fosfato tiene la propiedad de adherirse al material inerte en forma inorgánica, lo cual posiblemente explica el origen de la alta concentración del mismo. En estudios realizados anteriormente se ha reportado que el suelo de MC suele presentar concentraciones de P bajas debido a las características ácidas que típicamente presentan estos suelos. (Arranz-González, 2011). No se ha reportado concentraciones de P alto en suelos de MC anteriormente; esto puede verse influenciado por el pH que presenta tendencia a neutro en vez de ácido.

#### 7.1.2.4 Nitrógeno Total

El Nitrógeno (N) es un componente celular muy importante, sin el cual no podría existir ningún organismo. En el suelo, las concentraciones de N suelen ser bajas, permaneciendo en estado orgánico, el cual no es asimilable por las plantas (Juárez Sanz, 2004) por lo que es necesario que se realicen procesos de transformación química, denominada mineralización ejercida por microorganismos, que permitan que N entre en las raíces como Nitrato ( $\text{NO}_3$ ) o Amonio ( $\text{NH}_4$ ), y por consiguiente ser utilizado en las rutas metabólicas del mismo. (Kantharaj, 2017)

En la Tabla 4 se observa que para el suelo de MC se encontró una concentración de 0.32%. Mientras que el suelo de INV resultó con una concentración de 0.40 %. El Nitrógeno Total mide las concentraciones de todas las formas orgánicas e inorgánicas de N que se encuentran en el suelo. (Agrolab, 2005) Este puede verse afectado por el tipo de textura que presente el suelo; tanto en el suelo MC como de INV el porcentaje de Nitrógeno total no es muy alto; Posiblemente pueda estar ocurriendo una adherencia de  $\text{NH}_4$  en las arcillas presentes en el suelo de invernadero disminuyendo la concentración de nitrógeno total (De Miguel-Fernández & Vázquez-Taset, 2006). En el suelo de carbón el bajo porcentaje de nitrógeno puede estar relacionado con la poca capacidad de retención de humedad que presenta el suelo, como ha sido reportado anteriormente por Liang et al en el 2014

#### 7.1.2.5 Nitratos Y Nitritos

El nitrógeno mineral del suelo puede aparecer en forma de Amoniacó ( $\text{NH}_3$ ), Amonio ( $\text{NH}_4$ ) y por oxidación de estas formas reducidas, las cuales se pueden transformar en

Nitrito ( $\text{NO}_2$ ) y finalmente en Nitrato ( $\text{NO}_3$ ), donde estos procesos de oxidación-reducción de las especies nitrogenadas, ocurren por fenómenos biológicos y, en consecuencia, los productos finales de número y tipo de organismos que intervengan en ellos. (De Miguel-Fernández & Vázquez-Taset, 2006) Este elemento es importante para la salud del suelo y de las plantas que habitan en él.

En la Tabla 4 se puede observar que, tanto para los valores de ppm de Nitratos y Nitritos, en suelo de MC y de INV dieron iguales. Siendo para Nitratos un valor de 5.00 (ppm) y Nitritos 0.25 (ppm). Según Hartz, Davis, & Smith en el 2012 y colaboradores, los valores óptimos de Nitrato en el suelo está entre los rangos de 5-10 ppm indicando que los valores encontrados en los resultados corresponden a valores normales, en el suelo. (Ohyama, 2009).

#### 7.1.2.6 Carbono Orgánico Total

El carbono orgánico total es un componente muy importante en el ciclo global del Carbono (C), siendo el suelo un importante reservorio de C dependiendo de su uso y manejo, ya que estos presentan una mayor concentración de C. (Martinez Het al., 2008)

Los resultados obtenidos para el carbono orgánico total para el suelo MC es de 2.82 % y para el suelo de INV 3.48 %

El C total es un indicador de las condiciones de salud en las que se encuentra el suelo. Cuando el suelo presenta una menor intervención antrópica, se encuentra una mayor concentración de carbono orgánico; este afecta las propiedades físicas, químicas y biológicas del mismo, vinculadas a la calidad y productividad y sustentabilidad del mismo entre menos concentración existe en el suelo, hay una mayor alteración y mayor

pérdida de productividad (Martínez H et al., 2008). Estos resultados indican que las condiciones en el suelo podrían ser mejor. Valores no muy altos de Carbono total se esperan encontrar en Suelo de MC por las condiciones en las que se extrae el mismo, sin embargo, no hay mucha diferencia con respecto al suelo de INV, indicando que el sitio de recolección de ese suelo tiene algún tipo de interferencia antrópica.

## **7.2 Microbiológicos.**

El suelo, definido como cuerpo natural que consiste de capas de suelo compuestas por materiales de minerales meteorizados, materia orgánica, aire y agua, es el resultado de la influencia del tiempo y combinado con clima, topografía y organismos (flora y fauna), es un componente esencial en para el ecosistema (FAO, 2007a) .

Como resultado se obtuvieron microorganismos en distintos grupos funcionales, cuya presencia o ausencia se identificó en los distintos medios de cultivos utilizados, los cuales fueron empleados según el grupo funcional que los medios de cultivos puedan

identificar se encontraron un total de 12 Morfotipos bacterianos y 9 Morfotipos de hongos.

### 7.2.1 Bacterias.

Grupos Funcionales	Medio de Cultivo	Morfotipos*	UFC/mL	UFC/mL
			Mina de Carbón	Suelo de Invernadero
Solubilizadoras de Fosfato	Picovskaya	MFP1	1,4x10 <sup>5</sup>	2,2x10 <sup>5</sup>
		MFP2	3,6x10 <sup>5</sup>	8,5x10 <sup>4</sup>
		MFP3	1,6x10 <sup>4</sup>	3,7x10 <sup>4</sup>
		MFP4	2,0x10 <sup>5</sup>	1,5x10 <sup>4</sup>
	SMRS1	MFS1	1,1x10 <sup>5</sup>	9,0x10 <sup>4</sup>
		MFS2	2,6x10 <sup>4</sup>	8,5x10 <sup>4</sup>
MFS3		1,6x10 <sup>4</sup>	2,5x10 <sup>4</sup>	
Fijadoras de Nitrógeno	ASHBY	MFA1	1,5x10 <sup>6</sup>	2,1x10 <sup>5</sup>
	OAB	MFO1	3,6x10 <sup>5</sup>	1,1x10 <sup>5</sup>
		MFO2	4,5x10 <sup>4</sup>	2,6x10 <sup>4</sup>
Celulíticos	Carboximetil-celulosa	MFC1	9,6x10 <sup>4</sup>	1,2x10 <sup>5</sup>
		MFC2	1,8x10 <sup>8</sup>	3,5x10 <sup>5</sup>
Nitrificantes	Caldo Amonio	-	-	-
	Caldo Nitrito	-	-	-

Tabla 5. Morfotipos bacterianos encontrados en los distintos medios de cultivos aislados de Suelo de Mina de carbón 10<sup>3</sup> y suelo de invernadero 10<sup>3</sup> (\*Morfotipos hallados por grupo funcional)

7.2.1.1 Bacterias Solubilizadoras de Fosfato.

Grupo Funcional	Medio de Cultivo	Morfofoto	Macroscópica					Microscópica	
			Borde	Forma	Color	Consistencia	Elevación	Gram	Forma
Solubilizadoras de Fosfato	Picovskaya	MFP1mc	Entero	Circular	Beige	Cremosa	Convexa	Negativo	Bacilo
		MFP2mc	Entero	Circular	Rosa Claro	Cremosa	convexa	Negativo	Bacilo
		MFP3mc	Ondulado	Irregular	Transparente	Cremosa	Convexa	Negativa	Bacilo
		MFP4mc	Entero	Circular	Amarillo	Cremosa	Plana	Positivo	Coco
	SMRS1	MFS1mc	Entero	Circular	Beige	Cremoso	convexa	Negativo	Bacilo
		MFS2mc	Entero	Circular	Beige oscuro	Cremoso	Convexo	Negativo	Bacilo
		MFS3mc	Entero	Circular	Transparente	Cremoso	Convexo	Positivo	Coco

Tabla 6 Descripción macroscópica y microscópica de los Morfotipos de solubilizadores de fosfatos encontrados.

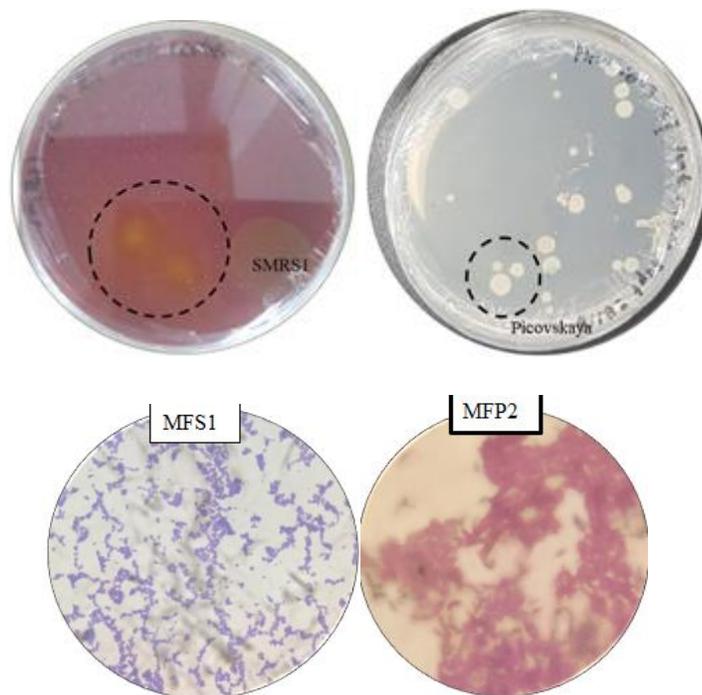


Figura 2 Medio de cultivo y bacterias encontradas en medios de cultivos SMRS1 y Picovskaya donde MFS1 corresponde a morfotipo aislado en SMRS1 con característica microscópica: cocos Gram-positivos y Mofotipo MFP2 aislado en Picovskaya con característica microscopica Bacilo Gram-Negativo

Dentro de los resultados de Bacterias Solubilizadoras de fosfato en los dos agares se encontraron un total de 7 colonias de bacterias distintas las cuales fueron seleccionadas

por la presencia de halo alrededor de las colonias. 4 crecieron dentro del agar Picovskaya y 3 en Agar SMRS1. (Tabla 6)

Donde los MFP1 a 3 y MFS1 a 2 corresponden a bacilos Gram negativos, mientras que MFP5 y MFS3; corresponden a cocos Gram positivos. (Figura 2)

Estos resultados coinciden con Lara et al., en 2011, donde encontraron que la mayoría de bacterias Solubilizadoras de fosfato, correspondían con bacilos Gram negativos, entre ellas *Burkholderia cepacia*, *Enterobacter cloacae*, *Pantoea sp.*, *Aeromonas hydrophila* y *Enterobacter nakasaki* además de encontrar cocos Gram positivos dentro de sus muestras.

De forma inicial se confirma la presencia de bacterias Solubilizadoras de fosfato, las cuales adquieren ese nombre por tener la capacidad de transformar el P insoluble del suelo en formas asimilables para la planta, el cuál es fundamental para el crecimiento de las plantas-. (Patiño-Torres & Sanclemente-Reyes, 2014) ya que el fosfato, después del nitrógeno es el nutriente inorgánico más requerido por plantas, y es el factor limitante del desarrollo vegetal. Transformándolo mediante distintos mecanismos directos o indirectos, entre los que se encuentran: La acción de ácidos orgánicos producidos por estos; La quelación de los elementos responsables de la insolubilidad de los fosfatos presentes y la asimilación directa de fosfatos insolubles por microorganismos que lo acumulan en sus células y los liberan posteriormente (Restrepo Franco et al., 2015). Son bacterias que por su importancia en la nutrición de las plantas también se consideran como bacterias promotoras de crecimiento, y se han utilizado en distintos estudios para comprobar su efectividad en distintas especies vegetales. (Buono et al., 2014; Cisneros-Rojas et al., 2016) Donde se observan que incrementan el peso seco, la longitud de la raíz y volumen de la raíz entre otros. (Cisneros-Rojas et al., 2016)

Dentro de todo el grupo de grupos funcionales de bacterias pertenecientes a la fauna del suelo, Las bacterias Solubilizadoras de Fosfato presentaron el mayor número de Morfotipos la mayor cantidad de UFC/mL, esto es posible debido a la mayor concentración de P que presenta el suelo (Tabla 4).

### 7.2.1.2 Bacterias Fijadoras de Nitrógeno

Grupo Funcional	Medio de Cultivo	Morfotipo	Macroscópica					Microscópica	
			Borde	Forma	Color	Consistencia	Elevación	Gram	Forma
Fijadoras de Nitrógeno	ASHBY	MFA1mc	Entero	Circular	Transparente	Cremoso	Convexo	Negativo	Bacilo
	OAB	MFO1mc	Entero	Circular	Transparente	Cremoso	Convexo	Negativo	Bacilo
		MFO2mc	Filamentoso	Circular	Blanco /Transparente	Cremoso	Plano	Negativo	Bacilo

Tabla 7 Descripción macroscópica y microscópica de los Morfotipos de Fijadores de Nitrógeno encontrados.



Figura 3 Medio de cultivo OAB y ASHBY, donde MFO1 corresponde a morfotipo aislado en OAB con característica microscópica: Bacilos Gram-negativos

Se encontraron 3 Morfotipos en total, donde 1 se encontró en agar ASHBY y 2 en agar OAB. Todos los Morfotipos encontrados presentan características de Bacilos Gram negativos. (Tabla 7) Resultados que concuerdan con los encontrados por Ibarra Sánchez

en el 2010) encontrando Bacilos Gram-negativos (Figura 3). Indicando una presencia inicial de bacterias fijadores de Nitrógeno

Siendo que ASHBY es un medio selectivo para *Azotobacter*, es normal que solo se haya aislado un morfotipo en ese medio de cultivo, donde *Azotobacter* sp se ha reportado que hace asociación con las raíces de especies vegetales (León & Rojas, 2015). El Nitrógeno es un elemento esencial para la sostenibilidad agrícola, ya que es un elemento importante para muchos procesos bioquímicos presentes en las plantas, las cuales utilizan N (Taiz & Zeiger, 2002). Sin embargo este se encuentra en la atmósfera como gas, siendo un reservorio no disponible para las plantas, por lo que se requiere de procesos de descomposición y de mineralización los cuales son llevados a cabo por las bacterias para que puedan ser utilizadas por las plantas (Celaya-Michel & Castellanos-Villegas, 2011). Estas bacterias tienen diversos mecanismos de acción siendo un ejemplo, los llevados a cabo por *Azospirillum* sp mencionados por (Yoav Bashan & de-Bashan, 2010; Yoav Bashan et al., 2004). Si bien, estos microorganismos se encuentran presentes en el suelo de MC como se observa en Tabla 5 presentan un menor número de Morfotipos que los presentados por las bacterias Solubilizadoras de Fosfato, posiblemente debido a la competencia por espacio que pueda haber (Daughtry et al., 2000).

#### 7.2.1.3 Bacterias Nitrificantes

En este estudio se encontró un resultado negativo de bacterias nitrificantes.

Como se mencionó anteriormente, el Nitrógeno es uno de los macronutrientes de mayor importancia en los procesos biológicos. Las bacterias nitrificantes juegan un papel muy importante debido el servicio que presentan, al ser capaces de realizar procesos de

Nitrificación, los cuales se refieren a la oxidación secuencial aeróbica del amonio a nitrito y luego a nitrato (Avendaño V, 2011). Pueden existir varias razones por las cuales no se encontraron bacterias de este grupo funcional, donde posiblemente las bacterias no puedan ser cultivadas como individuos aislados ya que necesitan de unas poblaciones que les den los requerimientos nutricionales que necesiten. (FCNUNP, 2017), posiblemente pueda deberse a competencia por espacio o recursos.

#### 7.2.1.4 Bacterias Celulolíticas

Grupo Funcional	Medio de Cultivo	Morfotipo	Macroscópica					Microscópica	
			Borde	Forma	Color	Consistencia	Elevación	Gram	Forma
Celulolíticos	Carboximetil-celulosa	MFC1mc	Filamentoso	Circular	Blanco	Membranosa	Plana	Positivo	Bacilo
		MFC2mc	Ondulado	Circular	Blanco transluc	Cremoso	plana	Positivo	Coco

Tabla 8 Descripción macroscópica y microscópica de los Morfotipos de bacterias celulolíticas encontradas.

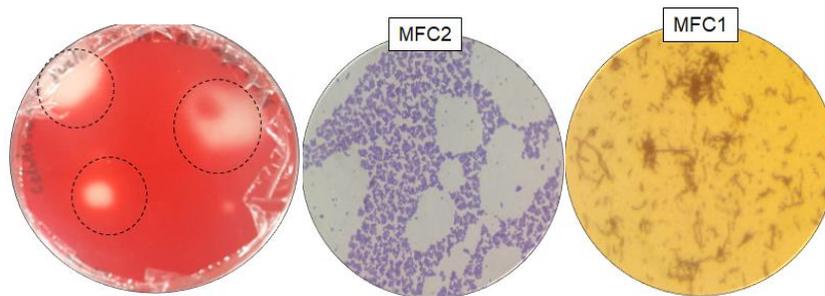


Figura 4 Medio de cultivo CarboximetilCelulosa, donde MFC1 corresponde Coco Gram-positivo t MFC1 corresponde Bacilos Gram-positivos

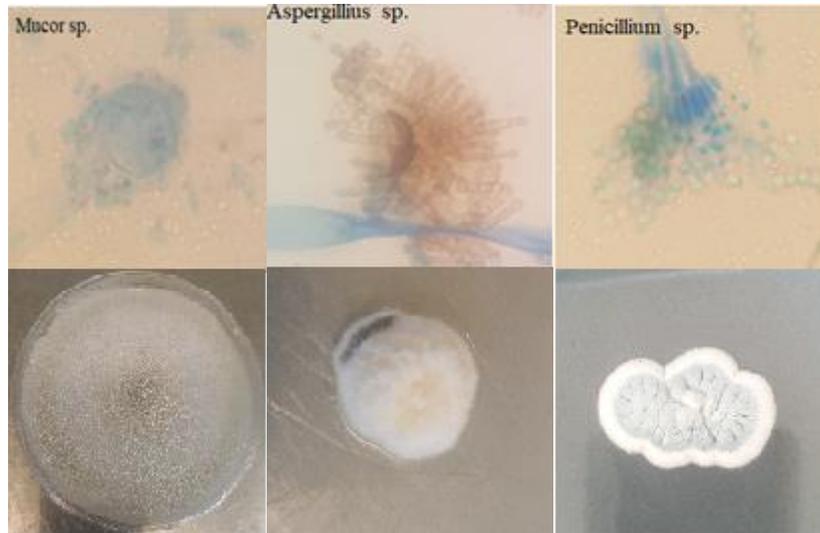
Se encontraron 2 Morfotipos de bacterias donde se encontró una mayor concentración de UFC/mL en el MFC1mc. (Tabla 8) Con características de bacilos y cocos Gram positivos, (Figura 4) resultados que concuerdan con lo establecido por Gaitan Bohorquez & Pérez Pérez, en el 2007 y por Piñero Bonilla & Rivas, en 2004.

Dentro de los organismos capaces de degradar la celulosa se encuentran los actinomicetos, presentan colonias pulverulentas, y se ven beneficiadas por la presencia de carbono en el suelo (FCA-UNER, 2007) como se observa en la Tabla 4 se encuentra disponible en el suelo, donde prestan un servicio ecosistémicos degradando la celulosa mediante distintos mecanismos de degradación (UNJu, 2013). Tienen una gran importancia en el equilibrio ecológico del mismo al presentar una actividad metabólica alta, con la cual pueden desencadenar reacciones como la producción de pigmentos y enzimas extracelulares con las que son capaces de degradar materia orgánica de origen vegetal y animal (Salazar Loaiza & Ordoñez Guerrero, 2013). Las presencias de estas bacterias junto con los otros distintos grupos funcionales indican un ecosistema en el suelo en el cual se puede mantener distintas plantas.

### 7.2.2 Hongos.

<b>Grupo Funcional</b>	<b>Medio de Cultivo</b>	<b>Morfotipos*</b>	<b>Hongo</b>	<b>Tipo de suelo</b>
Solubilizadoras de Fosfato	Picovskaya	MFHP1	<i>Aspergillus</i> sp.	Mina de Carbón y Suelo Invernadero
		MFHP2 a 4	<i>Penicillium</i> sp.	Mina de Carbón y Suelo Invernadero
	SMRS1	MFHS1 a 3	<i>Penicillium</i> sp.	Mina de Carbón y Suelo Invernadero
Fijadoras de Nitrógeno	OAB	MFHO1	<i>Aspergillus</i> sp.	Mina de Carbón y Suelo Invernadero
Celulolíticas.	Carboximetilcelulosa	MFHC1	<i>Aspergillus</i> sp.	Mina de Carbón y Suelo Invernadero
		MFHC2	<i>Mucor</i> sp.	Mina de Carbón

*Tabla 9 Morfotipos de hongos encontrados distintos medios de cultivos, estableciendo la presencia o ausencia en los suelos de Mina de Carbón y Suelo de Invernadero(\*Morfotipos hallados por grupo funcional)*



*Figura 5 Imagen microscópica de especies de hongos encontrados.*

Los hongos constituyen la segunda porción de biomasa microbiana del suelo, después de Bacterias y Actinomicetos, la presencia de estos corresponde a la disponibilidad de carbono orgánico. Las presencias de estas especies de hongos han sido encontradas anteriormente en estudios de suelos impactados en sitios de extracción minera, (Pierina Méndez, 2016). Se encontraron 9 morfotipos de hongos (Tabla 9), que correspondieron a tres especies *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, y *Mucor sp.* (Figura 5)

*Aspergillus sp.* Pertenecientes a la división Deuteromycota, se caracterizan por tener micelio vegetativo compuesto por hifas septadas, ramificadas. Son miembros aerobios de crecimiento rápido, con colonias inicialmente planas que al crecer se van haciendo algodonosa. (Arias Cifuentes & Piñeros Espinosa, 2008) se puede explicar ya que existen especies aisladas de *Aspergillus sp.* Solubilizadoras de fosfato, (Gurdeep y Sudhakara Reddy, 2017; Pinzón Uribe y Sotelo Rojas, 2010) Aunque en el pasado se han reportado

especies de *Aspergillus* fijadoras de nitrógeno, (Charles, 1911) Sin embargo no hay estudios recientes que tengan que ver con un hongo *Aspergillus* sp. Indicando que el crecimiento en ese tipo de agar pueda ser debido a la facilidad que presenta esta especie de crecer en distintos medios de cultivo.

*Penicillium* sp. Son hongos de crecimiento rápido que dan colonias blancas aterciopeladas que al final de su crecimiento presentan aspecto pulverulento cubierta de esporos. (Arias Cifuentes y Piñeros Espinosa, 2008) Se ha reportado como hongo solubilizador de fosfato por Flores en el 2014 lo cual explica su crecimiento en medio de cultivo SMRS1 indicado específicamente para crecimiento de organismos Solubilizadores de fosfato.

*Mucor* sp. Son hongos filamentosos que presentan esporangiofóros con ramificación irregular en el micelio aéreo, presentan colonias de crecimiento rápido, muy vellosas, algodonosas. Inicialmente blancas y posteriormente toman una coloración grisácea. (Pontón et al., 2002) Se ha reportado la acción celulolítica de este tipo de hongo por Gaitan Bohorquez & Perez Perez, en el 2007 lo que explica la presencia en agar Carboximetilcelulosa, medio de cultivo específico para crecimiento de este tipo de hongos.

La presencia o ausencia de estos microorganismos concuerda con los resultados encontrados por Pierina Méndez, en 2016 donde los organismos *Aspergillum* sp y *Penicillium* sp. Se pueden encontrar en tanto suelos impactados como no impactados por la minería, mientras que *Mucor* sp. Se encuentra solo en suelos impactados por la minería.

### 7.3 Discusión general fisicoquímicos y microbiológicos del suelo de mina de carbón.

Se ha reportado que el suelo de minería suele presentar características consideradas negativas, por las afectaciones causadas en la práctica de extracción minera, tales como el vertimiento químico, entre otros, cuya consecuencia es la alteración en los procesos fisicoquímicos del suelo, el pH, la capacidad de retención de humedad etc. (Acosta Bueno, 2016) No obstante, este suelo de mina de carbón muestra características que permiten el desarrollo de plantas, tales como el pH, el cual se encuentra dentro de los rangos reportados para el crecimiento de distintas especies vegetales (Rosen et al., 2008). Presenta nutrientes, microorganismos y puede soportar el crecimiento de las raíces. Este suelo presenta como desventaja, altas concentraciones de metales pesados, con valores más altos que los aceptados (Upme, 2016) que pueden causar un daño en el crecimiento de plantas que no presentan tolerancia a metales pesados, donde se observa una reducción muy marcada en el crecimiento de la planta, en la biomasa y en el número de hojas causado por la toxicidad originada por la concentración de metales pesados dentro de la planta (Jara-Peña et al., 2014).

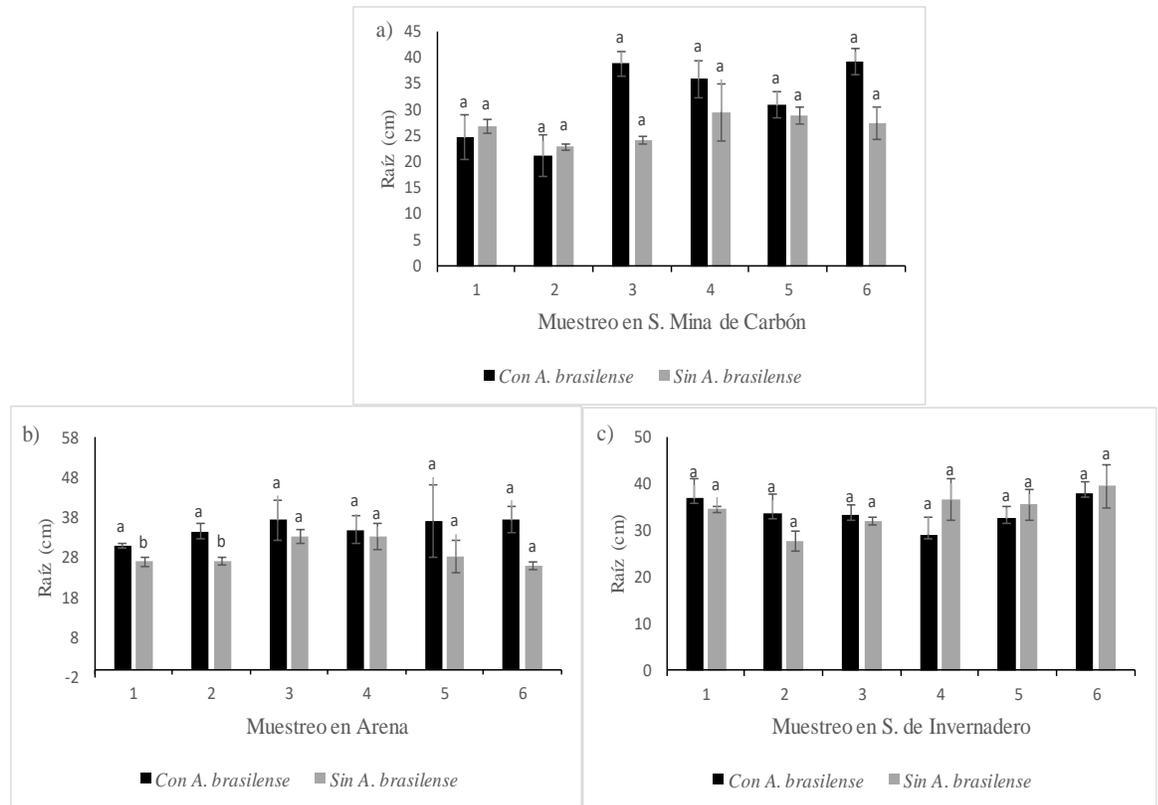
Sin embargo, este efecto no fue observado en *Baccharis macrantha* Kunt, durante el periodo de muestreo. Se ha reportado que en especies de *Baccharis* sp, presentan tolerancia a suelos degradados, contaminados y con poco porcentaje de agua (Prada Muñoz, 2015). Por lo que es posible que la especie tomada para este estudio pueda crecer y sobrevivir en este tipo de suelos gracias a esa capacidad de tolerancia y supervivencia que tiene.

## **7.4 Capacidad de crecimiento de *Baccharis macrantha* inoculada con *Azospirillum brasilense*.**

### 7.4.1 Crecimiento en raíz.

La raíz es la parte inferior del eje de la planta, cuya función principal es la absorción de agua y minerales del suelo, por lo que la supervivencia de la planta depende de la capacidad que tiene esta de crecer y mantenerse en el suelo. (Uvigo, 2018), por este motivo la salud y el estado en que se encuentra la raíz es un importante indicador de crecimiento y desempeño de la planta.

El crecimiento de la raíz observado en *B. macrantha* no presentó diferencias estadísticamente significativas entre las raíces inoculadas y no inoculadas con *A. brasilense* en suelo Mina de Carbón (Figura 6)



*Figura 6 Crecimiento de Raíz(cm) de Ciro (Baccharis macrantha) en a) suelo de Mina de Carbón, b) Arena c) Suelo de Invernadero. Inoculada y no inoculada con bacteria promotora de crecimiento Azospirillum brasilense en distintos periodos de muestreo (se realizó 1 muestreo cada mes, durante 6 meses). Promedio seguido de letras distintas en cada muestreo, presentan diferencias estadísticas de acuerdo con prueba t Student para valores independientes ( $P < 0,05$ ). La barra en cada columna indica error estándar ( $n=3$ )*

Este resultado es similar a los obtenidos en el crecimiento de raíz en suelos de Arena (b) y suelo de Invernadero (c) como se puede observar en la Figura 6, no se presentaron diferencias estadísticamente significativas en el crecimiento de raíz inoculada y no inoculada en estos suelos. Sin embargo, a pesar de no encontrarse diferencias, si hubo un crecimiento de las raíces inoculadas en los tres tipos de suelo, donde morfológicamente se observaron diferencias. (Ver Anexo 4.sección 2) Este es especialmente notorio al observar el número de ramificaciones encontradas en las raíces

laterales, como se observa en la Figura 7 la cual corresponde al crecimiento de la Ciro inoculada con *A. brasilense*. Se observa un incremento en volumen mucho más marcado que en el crecimiento en Arena Figura 8 y en Suelo de Invernadero. Figura 9.



*Figura 7 Imagen fotográfica de la comparación entre el largo de la raíz de Ciro en el último muestreo en Arena donde a) corresponde a la planta inoculada con A. brasilense y b) a Ciro no inoculado con A. brasilense.*



Figura 8 Imagen fotográfica de la comparación entre el largo de la raíz de Ciro en el último muestreo en suelo de mina de carbón donde a) corresponde a la planta inoculada con *A. brasilense* y b) a Ciro no inoculado con *A. brasilense*



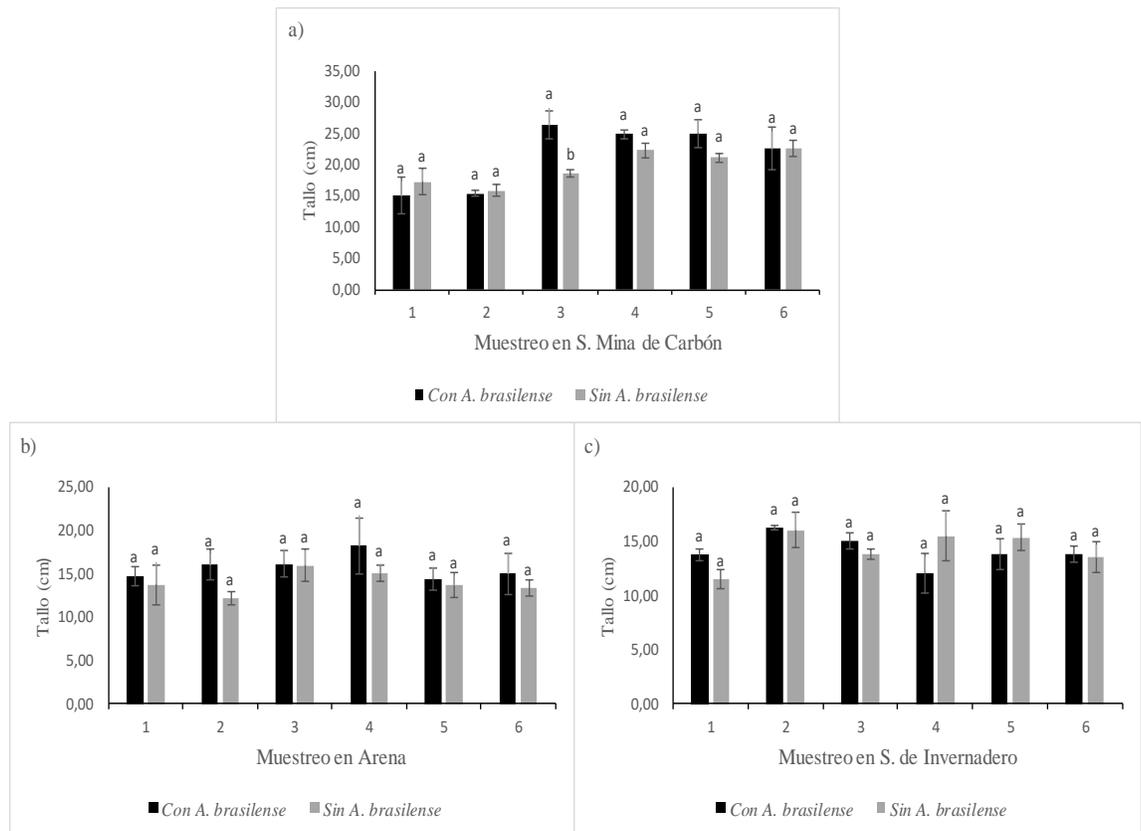
Figura 9 Imagen fotográfica de la comparación entre el largo de la raíz de Ciro en el último muestreo en suelo de mina de carbón donde a) corresponde a la planta inoculada con *A. brasilense* y b) a Ciro no inoculado con *A. brasilense*.

Comparando el crecimiento obtenido entre arena, suelo de mina de carbón y suelo de invernadero, las plantas inoculadas con *A. brasilense* presentan un crecimiento en la raíz ligeramente mayor que las plantas no inoculadas, resultado especialmente notorio en el suelo de mina de Carbón, al compararse con los resultados de Arena y suelo de Invernadero.

#### 7.4.2 Crecimiento de Tallo.

El Tallo, es la parte aérea de la planta, es la estructura responsable de soportar el resto de órganos laterales, como las hojas, además de realizar funciones importantes para la supervivencia de la planta como lo son, la conducción. Fotosíntesis y almacenamiento de sustancia (Uvigo, 2018b), es un claro indicador del crecimiento de la planta y el estado de salud en el que se encuentra.

Los resultados de crecimiento en Tallo observado en Suelo de Mina de Carbón (a), (Figura 10) no presentaron diferencias significativas en los muestreos 1, 2, 4, 5 y 6 con valores similares de crecimiento, siendo la excepción el muestreo 3 con un  $P= 0.04$ . En cuando al crecimiento del tallo tanto en arena (b), como al crecimiento suelo de Invernadero. (c), tampoco presentaron diferencias estadísticamente significativas.



**Figura 10** Crecimiento del Tallo (cm) de *Cirol* (*Baccharis macrantha*) en a) Suelo de Mina de Carbón, b) Arena, c) Suelo de Invernadero. Inoculada y no inoculada con bacteria promotora de crecimiento *Azospirillum brasilense* en distintos periodos de muestreo (se realizó 1 muestreo cada mes, durante 6 meses). Promedio seguido de letras distintas en cada muestreo presentan diferencias estadísticas de acuerdo con prueba t Student para valores independientes ( $P < 0,05$ ). La barra en cada columna indica error estándar ( $n=3$ )

Sin embargo, como se observa en los datos de crecimiento del tallo en Anexo 3 sección 2, si se encuentra una diferencia visual en el crecimiento del tallo en Suelo de Mina de carbón (Figura 11); el crecimiento en Arena presenta una menor altura, visualmente no presentó una diferencia muy marcada entre el inicio del estudio, y al final del mismo (Figura 12). Lo mismo se puede decir de los resultados del crecimiento de Tallo en suelo de INV (Figura 13).



Figura 11 Imagen fotográfica de la comparación entre el largo del tallo de Ciro en suelo de Invernadero en el último muestreo donde a) corresponde a la planta inoculada con *A. brasilense* y b) a Ciro no inoculado con *A. brasilense*.



Figura 12 Imagen fotográfica de la comparación entre el largo del tallo de Ciro en Arena en el último muestreo donde a) corresponde a la planta inoculada con *A. brasilense* y b) a Ciro no inoculado con *A. brasilense*.



*Figura 13 Imagen fotográfica de la comparación entre el largo del tallo de Ciro en suelo de mina de carbón en el último muestreo donde a) corresponde a la planta inoculada con A. brasilense y b) a Ciro no inoculado con A. brasilense.*

Esta diferencia observada morfológicamente, puede deberse a las condiciones fisicoquímicas que se encuentran en el suelo que le proveen mayor nutrientes a los suelos de Invernadero, como de Mina de Carbón, como se ve la presencia en las Tabla 3 y Tabla 4, cuya presencia provee unas condiciones de crecimiento mayores a las que se encuentran normalmente en Arena.

Se alcanza a notar una diferencia en el crecimiento del tallo de las plantas inoculadas y no inoculadas, donde en el caso del suelo de Mina de Carbón es un poco más notorio.

#### 7.4.3 Biomasa

La biomasa, es la materia viva el cual es el conjunto de la materia orgánica, donde en este caso es de origen vegetal. Es la fuente de energía renovable que aporta la planta para las necesidades energéticas que pueda requerir otros organismos vivos, (EPEC, 2018) por lo que la concentración de esta es un indicador la producción que tiene la planta.

Para los resultados de Biomasa, ( Figura 14) se observa una pequeña diferencia en los resultados anteriores donde el incremento de biomasa no presenta diferencias significativas en Arena (b), o Suelo de Invernadero (c), (Anexo 4sección 2)sin embargo, en el Suelo de Mina de Carbón (a), la diferencia solo ocurre en el muestreo 4 con  $P=0.01$  como se puede observar en Figura 14. Se puede observar que durante los primeros 3 muestreos en S. MC la biomasa presentó un mayor valor cuando no presentaba inoculación con la bacteria promotora de crecimiento, caso contrario ocurrió durante los últimos muestreos, donde si bien, resultado ser valores no estadísticamente significativos, se observa una diferencia física en el aumento de gramos que presenta la biomasa.

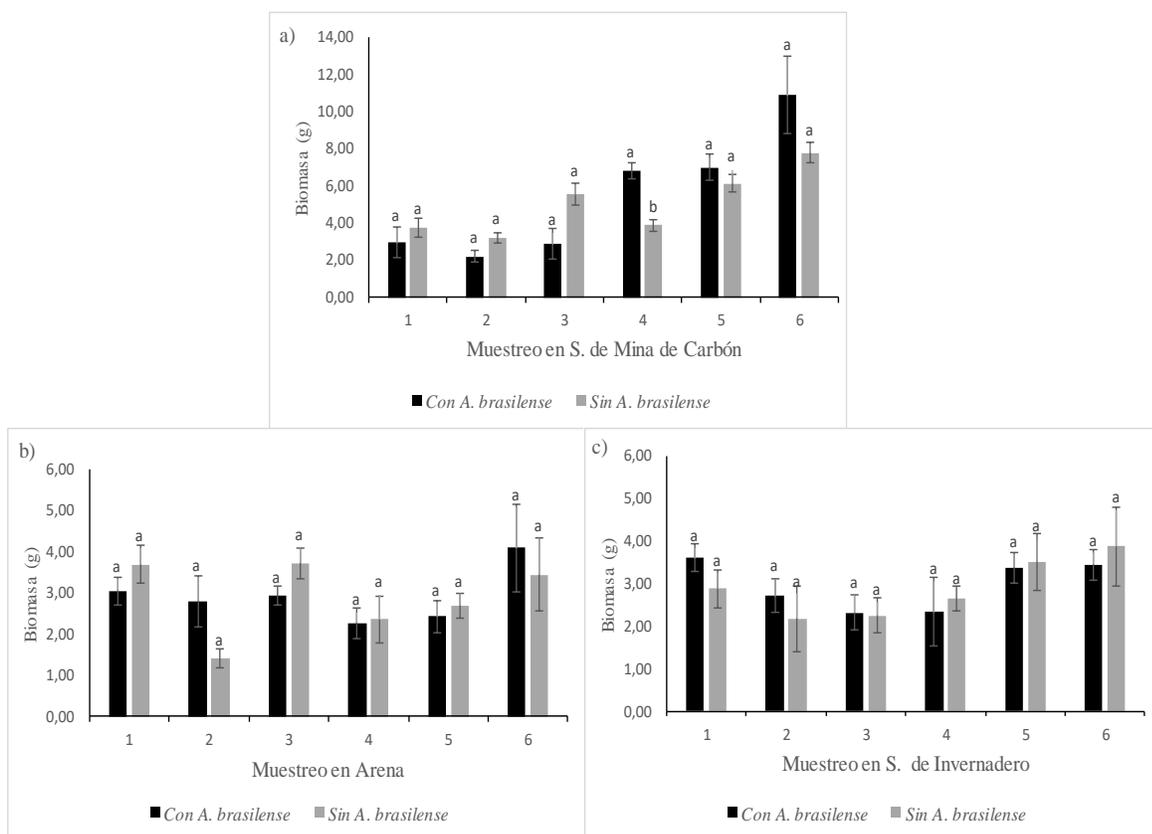


Figura 14 Biomasa de *Ciro* (*Baccharis macrantha*) en a) Suelo de Mina de Carbón, b) Arena, c) Suelo de Invernadero. Inoculada y no inoculada con bacteria promotora de

*crecimiento Azospirillum brasilense en distintos periodos de muestreo (se realizó 1 muestreo cada mes, durante 6 meses). Promedio seguido de letras distintas en cada muestreo presentan diferencias estadísticas de acuerdo con prueba t Student para valores independientes ( $P < 0,05$ ). La barra en cada columna indica error estándar ( $n=3$ )*

A pesar de no encontrar diferencias significativas en la mayoría de los casos, se observan tendencias de crecimiento en la biomasa distintas en los 3 tipos de sustratos, donde la mayor concentración de Biomasa, la presentó el suelo de Mina de Carbón, seguido por valores similares entre el suelo de Invernadero y el de Arena.

No obstante, si se compara las diferencias de concentración entre la biomasa de las plantas sembradas en el suelo de mina de carbón, con la biomasa que se presenta en Arena y suelo de Invernadero, se observa que hay una mayor acumulación en la biomasa del suelo de mina de carbón.

A pesar de que no hay una diferencia entre tratamientos con inoculación de *A. brasilense*, hay una diferencia entre suelos y sustrato. Se ha reportado que en especies que presentan capacidad fitorremediadora, donde exhiben tolerancia a la acumulación de metales pesados dentro de sus estructuras vegetales, muestran un aumento en la biomasa por la concentración de estos dentro de la planta (Galaciz Lozano & Trejo Calzada, 2011).

#### 7.4.4 Índice de clorofila

El contenido de clorofila es uno de los parámetros biofísicos más relacionado con la cantidad de nitrógeno en la planta, por lo tanto está relacionado con la salud y productividad de la misma (Daughtry et al., 2000). En los resultados obtenidos de índice de Clorofila, (Figura 15) se observó que no hubo diferencias estadísticas significativas en ninguno de los suelos muestreados.(Anexo 4 seccion 2)

La clorofila es indicadora de la disponibilidad de N en la planta, ya que este está asociado a los cloroplastos y son responsables de la coloración verde en las hojas (Daughtry et al., 2000). Se observa una ligera tendencia de incremento en el suelo de Mina de Carbón, mientras que en suelo de arena y de Invernadero el índice de clorofila no presenta muchas diferencias

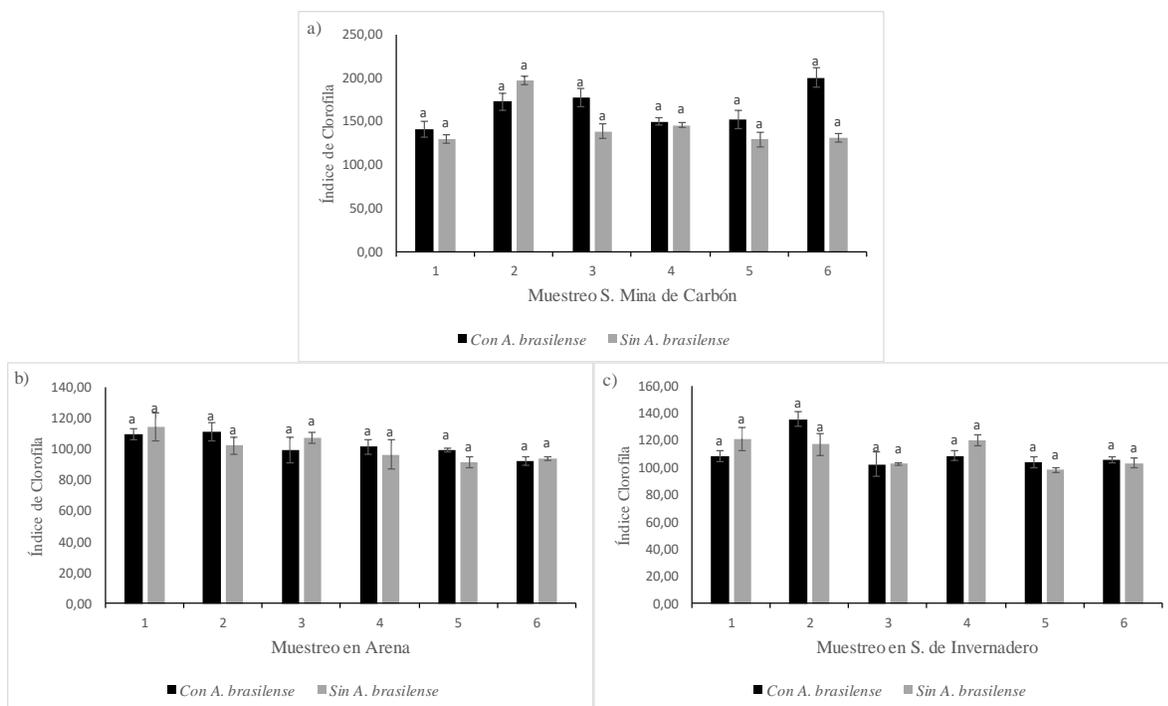


Figura 15 Índice de Clorofila de *Cirol* (*Baccharis macrantha*) en a) Suelo de Mina de Carbón, b) Arena, c) Suelo de Invernadero. Inoculada y no inoculada con bacteria promotora de crecimiento *Azospirillum brasilense* en distintos periodos de muestreo (se realizó 1 muestreo cada mes, durante 6 meses). Promedio seguido de letras distintas en cada muestreo presentan diferencias estadísticas de acuerdo con prueba t Student para valores independientes ( $P < 0,05$ ). La barra en cada columna indica error estándar ( $n=3$ )

Los niveles de Clorofila se ven afectados por la concentración de N en el suelo, es posible que las bacterias presentes en el mismo (7.2.1.2) estén realizando un efecto en la concentración de N, causando un ligero aumento en el mismo, que no llega a ser estadísticamente significativo. Entre las plantas inoculadas y no inoculadas, la diferencia del índice de clorofila no es tan notorio, presentando valores muy similares.

#### 7.4.5 Número de hojas.

La presencia o ausencia del número de hojas en las plantas corresponden a la salud del mismo donde la pérdida de follaje, en caso de presentarse pueden afectar el crecimiento normal de la planta, ya que son el órgano por el cual la planta realiza la gran mayoría de procesos fotosintéticos, además de ser el responsable de controlar la transpiración de la planta, donde el intercambio gaseoso es esencial para la supervivencia de la misma (Hidroel et al., 2015).

El resultado número de hojas presentes en *B. macrantha* observado en Figura 16 obtuvo resultados similares a los observados anteriormente, no se observó diferencias estadísticamente significativas en el número de hojas presentes en las plantas inoculadas y no inoculadas con *A. brasilense* en los distintos suelos muestreados (Anexo 4, sección 2), sin embargo, se observa una diferencia en la tendencia del número de hojas en el Suelo de Mina de Carbón (a) donde a medida que pasaba el tiempo aumentó hasta un punto en que se mantuvo relativamente constante, a diferencia del Suelo de Invernadero (c) donde se observó una tendencia a disminuir, mientras que el número de hojas en el suelo de Arena (b) se mantuvo más o menos estable.

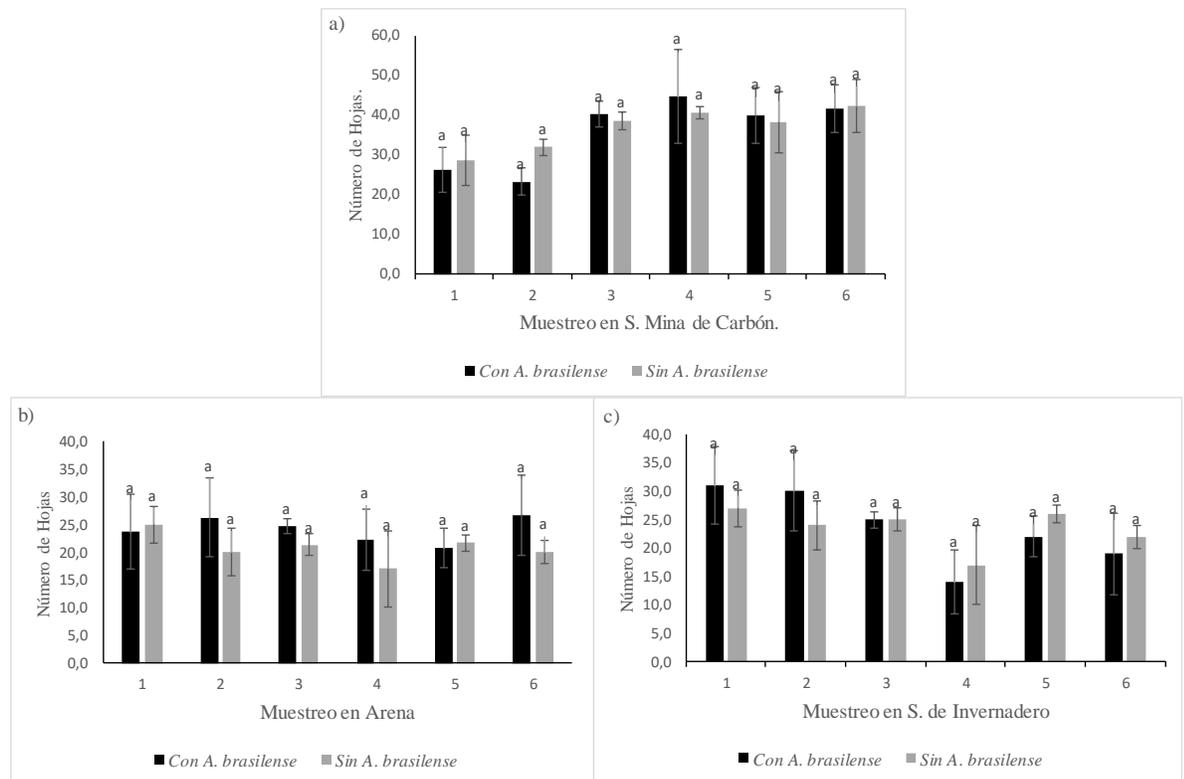


Figura 16 Número de Hojas de *Cirol* (*Baccharis macrantha*) en a) Suelo de Mina de Carbón, b) Arena, c) Suelo de Invernadero. Inoculada y no inoculada con bacteria promotora de crecimiento *Azospirillum brasilense* en distintos periodos de muestreo (se realizó 1 muestreo cada mes, durante 6 meses). Promedio seguido de letras distintas en cada muestreo presentan diferencias estadísticas de acuerdo con prueba t Student para valores independientes ( $P < 0,05$ ). La barra en cada columna indica error estándar ( $n=3$ )

La cantidad de hojas que se presenta en una planta depende en gran medida por las genéticas de la misma, sin embargo, condiciones de estrés afectan el número presente en estas (SAPS, 2018), se puede observar que en Arena, las diferencias no están tan marcadas, indicando que las condiciones de crecimiento, no favorecían a la planta, pero tampoco la perjudicaban hasta el punto de hacerla perecer. En otras palabras, la planta se encontraba sobreviviendo sin aumentar realmente su producción, al presentar un crecimiento pobre en el sustrato indica la falta de N en el mismo (FAO, 2007a). En el

caso de las plantas que se encontraban en el suelo de Invernadero, la disminución de las hojas se puede ser debido a una posible herbívora que ocurrió durante el muestreo 4, donde ocurrió una plaga que consumían las hojas, como se ve en la Figura 17. Sin embargo, se observó que las plantas que estaban sembradas en suelo de mina de carbón, no fueron consumidas por las babosas, lo cual se especula que es debido al sabor que presentan las hojas, el cual no fue de agrado para las babosas.



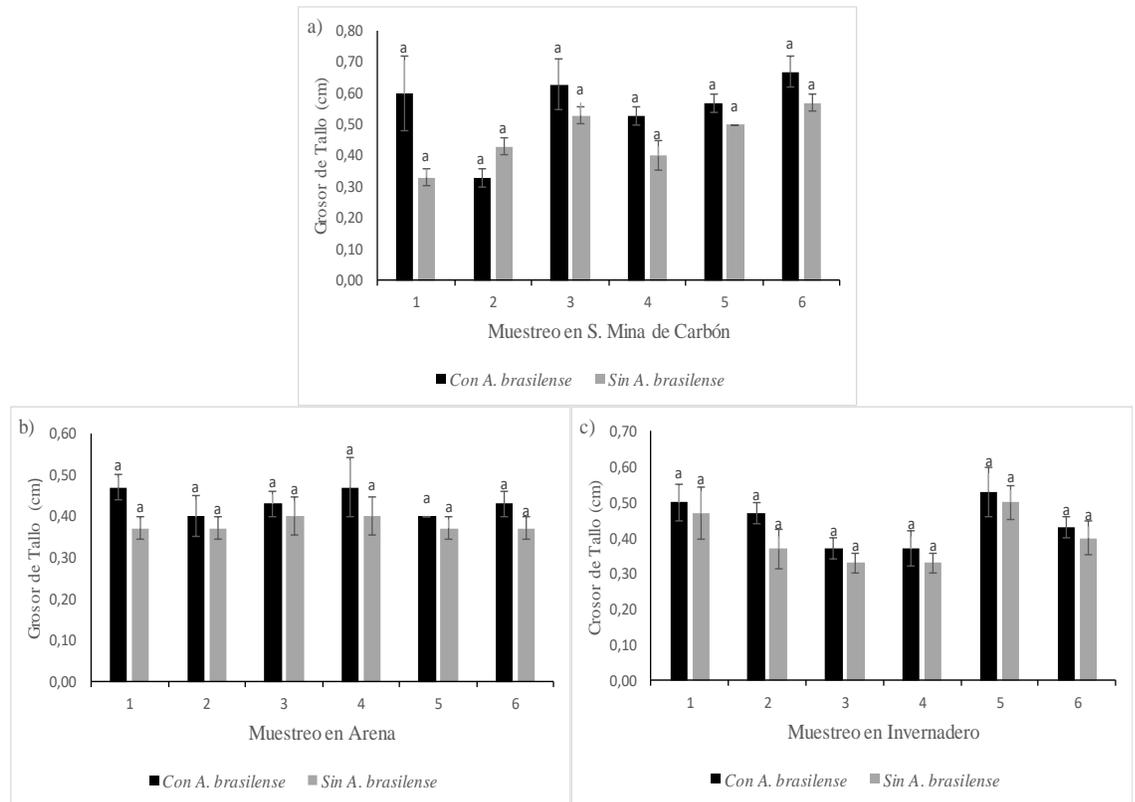
*Figura 17 Evidencia de daño causado a las plantas, por babosas presentes en el invernadero.*

En la comparación entre las plantas inoculadas y no inoculadas, se observa una diferencia entre los tratamientos, donde el suelo de Mina de Carbón, el promedio es similar; en Arena, el número de hojas tiende a incrementar, mientras que el número en el suelo de Invernadero las plantas inoculadas tienden a disminuir.

#### 7.4.6 Grosor del Tallo.

El grosor del Tallo ocurre cuando dentro de la planta se va generando nueva formación de Xilema, a medida que la planta se va alongando, para de esta manera ser capaz de conducir el agua y las sales minerales desde la raíz hasta el extremo de la planta (Taiz & Zeiger, 2002; Uvigo, 2018b), el grosor, junto con el crecimiento del tallo indican medidas de crecimiento de la planta a lo largo del tiempo.

En cuanto al incremento de grosor del tallo presentado en *B. macrantha* (Figura 18) no se encuentra diferencia estadísticamente significativa, siendo como resultado de unos valores similares durante el proceso de crecimiento de la planta. Sin embargo, entre los distintos suelos si se observan diferencias en el tamaño del grosor del tallo, donde los suelos de Arena (b) e Invernadero (c) presentan un grosor de tamaño similar, el grosor del tallo de las plantas que se encuentran en Suelo de Mina de Carbón presentan un mayor diámetro, aunque la diferencia no es muy grande.



*Figura 18 Grosor de Tallo de Cirol (Baccharis macrantha) en a) Suelo de Mina de Carbón, b) Arena, c) Suelo de Invernadero. Inoculada y no inoculada con bacteria promotora de crecimiento Azospirillum brasilense en distintos periodos de muestreo (se realizó 1 muestreo cada mes, durante 6 meses). Promedio seguido de letras distintas en cada muestreo presentan diferencias estadísticas de acuerdo con prueba t Student para valores independientes ( $P < 0,05$ ). La barra en cada columna indica error estándar ( $n=3$ )*

Comparando el grosor entre los distintos tratamientos presentes en los 3 sustratos, se observa una tendencia donde las plantas inoculadas presentan un mayor grosor en el tallo que las plantas no inoculadas.

#### 7.4.7 Discusión capacidad de crecimiento de *B. macrantha* inoculada y no inoculada con *A. brasilense*.

En forma general no se encontró una tendencia de crecimiento muy marcada en ninguno de los suelos, esto puede ser debido a que, al momento de conseguir las plántulas, no presentaban un crecimiento homogéneo, (Anexo 4, sección 2) lo cual posiblemente pudo afectar la línea de tendencia de la planta en crecimiento. Otras razones como plagas y condiciones ambientales también afectan el crecimiento de las plantas, ya que retrasando el crecimiento de la misma (Navarro, 2017).

Estadísticamente no se observó un efecto promotor en la planta ejercido por *A. brasilense*. Puede haber dos posibles respuestas siendo la primera:, la planta de Ciro tiene un crecimiento de 2 años (Xi, 1985), por lo tanto, para poder un crecimiento con tendencia más marcadas se requiere un periodo de muestreo más largo. También puede ser debido a que posiblemente, no hubo una buena asociación entre la bacteria y la raíz de la planta hospedera, lo que da como resultados efectos nulos o marginales en el crecimiento, como fue reportado por Bashan et al. (2004).

Dentro de las posibles razones por la que no puede ocurrir una asociación de la bacteria a la planta hospedera puede ser debido a las condiciones del suelo, ya sea por entornos que le causan estrés, tales como la microflora que se presenta en el suelo o rizosfera de la planta, cuya presencia se encontró en los suelos muestreados (Tabla 5 y Tabla 9), donde se generan interacciones de competencia por nutrientes, o interacciones antagónicas, sinérgicas o del tipo predador-presa, las cuales pueden estar afectando la interacción de *A. brasilense* con la raíz de *B. macrantha*. (Yoav Bashan et al., 2004; L. De-Bashan et al., 2007), donde bacterias fijadoras de nitrógeno, como *Azotobacter*

(León & Rojas, 2015) o bacterias solubilizadoras de fosfato (Restrepo et al., 2015), pueden estar ejerciendo este tipo de interacciones, dando una posible razón al porque los resultados fueron similares tanto para las plantas inoculadas con *A. brasilense*, como a las no inoculadas. Esto concuerda con lo que se ha reportado anteriormente por Ávila Martínez et al., 2015, demostrando que *Baccharis macrantha* Kunt, presenta asociación con bacterias solubilizadoras de fosfato. Sin embargo, no se ha reportado asociaciones entre *B. macrantha* y bacterias fijadoras de nitrógeno esto puede ser debido a motivo es que simplemente *A. brasilense* no presenta una interacción directa con las raíces de la planta, ya que hay factores genotípicos que no permiten que ocurre una interacción (Rangel Lucio et al., 2011). Debido a las diferencias en los niveles de asimilación que se pueden encontrar en las distintas especies de plantas (Pereg et al., 2016). Otra posible explicación del porqué no se presentó diferencia estadísticamente significativa en el crecimiento de la planta inoculada y no inoculada, puede ser por la interacción que presenta la bacteria con las partículas del suelo, esta presenta un obstáculo físico evitando que ocurra una interacción directa con las raíces (Yoav Bashan & de-Bashan, 2010).

*Baccharis macrantha* posee la habilidad de crecer en suelos que poseen altas concentraciones de metales pesados, y como se observó en este estudio posiblemente realizan reducción de la concentración de metales pesados. Aunque el suelo de mina de carbón no es un suelo que se considera degradado, ya que presenta características que permiten el crecimiento de especies vegetales en su superficie, al ser capaz de crecer en un sustrato como lo es la Arena, esta planta tiene la capacidad de crecer en suelos con condiciones pobres de crecimiento, demostrando una capacidad para colonizar ambientes perturbados y sustratos empobrecidos, resultados que concuerda con los

realizados por Hidroel et al., en el 2015 , No se han realizado muchos reportes sobre *Baccharis macrantha* Kunt, pero este tipo de resultados han sido reportados en otros miembros de *Baccharis* sp. como *B. Latifolia*, o *B. Bogotensis*, los cuales son especies de arbustos conocidos por presentar una alta tolerancia a suelos pobres y difíciles, con alta pedregosidad y carentes de agua (Prada Muñoz, 2015).

### 7.5 Concentración inicial y final de Metales Pesados.

La extracción de carbón genera contaminación en los suelos al realizar la explotación minera, tanto de cielo abierto como extracción subterránea; comúnmente se encuentran metales tóxicos como Cadmio (Cd), Plomo (Pb), Zinc (Zn), Cobalto (Co) y Mercurio (Hg) (Brundtland, 1989; Guerrero Useda y Pineda Acevedo, 2016) Los resultados de la concentración de metales pesados en suelo de MC se pueden observar en la Tabla 10

<b>Metal Pesado</b>	<b>Inicio (mg/kg)</b>	<b>Final (mg/kg)</b>
Plomo	11,75	1,17
Cadmio	0,38	0,20
Zinc	26,7	7,79
Cobalto	14,06	9,15
Mercurio	<0,05	<0,05

*Tabla 10. Concentración de Metales Pesados en Suelo de Mina de Carbón al inicio del experimento y al final del mismo.*

Según la Unidad de Planeación Minero Energética (UPME) en 2015 los niveles iniciales de estos elementos traza se encuentran por encima de la concentración permitida, donde está establecido que niveles de concentración aceptados para estos son:

- Cd los niveles están en 0,05 (mg/kg)
- Pb el nivel permitido es de 0.20 (mg/kg)
- Zn el nivel permitido es 3,00 (mg/kg)
- Hg es de 0.002(mg/kg)

Valores por encima de estos niveles generan una serie de problemas al medio ambiente y salud humana, por lo que estos suelos requieren de un manejo especial de almacenamiento y descarte, siguiendo esta norma de control ambiental, las concentraciones que resultaron de las pruebas son muy altas y poseen un riesgo para el medio que los rodea (Pérez Espinosa, 1997).

En los resultados se puede observar que la concentración inicial de todos estos metales pesados tuvo una reducción entre la toma inicial de la muestra y la toma final de la misma; siendo las concentraciones que mayor presentaron reducción, Zinc, con una reducción de 18,91 (mg/kg), Plomo con 10,58 (mg/kg), seguido de Cobalto con 4,91 (mg/kg), y Cadmio con 0,18 (mg/kg). Esto indica, que, al parecer, *B. Macrantha* está ejerciendo una reducción en las concentraciones de estos metales pesados en el suelo. Este resultado es consistente con otros estudios realizados con plantas nativas, en Lima Perú utilizando plantas alto andinas (Jara-Peña et al., 2014) y en Coahuila México (Galaciz Lozano & Trejo Calzada, 2011) donde se observó la reducción de metales pesados.

## 8 Conclusiones

- Las condiciones fisicoquímicas iniciales del suelo de mina de carbón, presenta textura franco-arenosa, una porosidad media, pH de 6.7, presencia baja de nitrógeno y potasio, pero una presencia muy alta de fósforo, poca humedad y baja capacidad de retención de agua, indicando que plantas resistentes a la baja concentración de agua, pueden crecer en este tipo de suelos.
- El suelo de Mina de carbón presenta comunidades bacterianas y fúngicas, que pertenecen a los grupos funcionales: solubilizadoras de fosfato, fijadoras de nitrógeno y celulolíticos, los cuales son indicadores de calidad del suelo, es decir la presencia, ausencia de estas permite evaluar el impacto de las prácticas, en este caso mineras, que se tienen en este tipo de suelo. Sin embargo, no presentó bacterias nitrificantes, posiblemente por la baja concentración de nitrógeno.
- *Baccharis macrantha* Kunt, puede crecer en suelos de mina de carbón que presenten las características mencionadas anteriormente.
- No hubo diferencia estadísticamente significativa en el crecimiento entre *Baccharis macrantha* Kunt, inoculada y no inoculada con *Azospirillum brasilense* Cd., aunque no se descarta un posible efecto promotor ejercido por *Azospirillum brasilense* Cd
- Hubo reducción en la concentración de metales pesados en suelo de Mina de carbón sembrado con *Baccharis macrantha*, lo que indica que es una especie vegetal que tiene el potencial para ser utilizada en fitoestabilización, por su

capacidad de crecer en suelos con altas concentraciones de metales pesados; posiblemente presenta capacidad de absorción de estos metales, al observarse disminución entre las concentraciones al inicio y final del experimento.

## 9 Recomendaciones

- Se recomienda evaluar a nivel molecular, los microorganismos encontrados, para poder realizar la identificación y relacionar posibles factores que estén afectando la interacción de *A. brasilense* con *B. macrantha*, y poder corroborar el posible efecto que estén realizando en el suelo y en la planta.
- Debido a la naturaleza de este estudio se recomienda llevar un seguimiento más largo respecto a los niveles de tolerancia que puede presentar *B. macrantha* a las concentraciones de metales tóxicos en su interior.
- Dada la presencia de microorganismos fijadores de nitrógenos en el suelo, se recomienda realizar un estudio con estos microorganismos para determinar si generan competencia en el efecto de *Azospirillum brasilense* Cd en las raíces de *Baccharis macrantha* Kunt.
- Se recomienda realizar este ensayo con mucho más tiempo, con un número más grande de individuos y proceder a realizarlo in situ.

•

### Referencias

- Acosta Bueno, D. M. (2016). *Impactos ambientales de la minería de carbón y su relación con los problemas de salud de la población del municipio de Samaca (Boyacá), según reportes Asis 2005-2011*. Universidad Distrital Francisco José de Caldas.
- Agrolab. (2005). Referencia para la interpretación de análisis de suelos AGROLAB. Retrieved from [http://www.agrolab.com.mx/sitev002/sitev001/assets/interpretacion\\_fertsuel.pdf](http://www.agrolab.com.mx/sitev002/sitev001/assets/interpretacion_fertsuel.pdf)
- Agronomy Department. (2018). Potassium. Retrieved from <https://www.agronomy.k-state.edu/documents/nutrient-management/nmrg-potassium-management.pdf>
- Arias Cifuentes, E. L., & Piñeros Espinosa, P. A. (2008). *Aislamiento e Identificación de Hongos Filamentosos de Muestras de Suelo de los Páramos de Guasca y Cruz Verde*. Pontificia Universidad Javeriana.
- Arranz-González, J. C. (2011). Suelos mineros asociados a la minería de carbón a cielo abierto en España: Una revisión. *Boletín Geológico y Minero*, 122(2), 171–186.
- Avendaño V, L. M. (2011). *Estudio de la población de bacterias nitrificantes y su relación con los parámetros físico-químicos, biológicos y operacionales en una EDAR con sistema convencional de Fangos Activos*. Universidad Politécnica de Valencia. Retrieved from [https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/15902/Tesina\\_Liz\\_Avendaño.pdf?sequence=1](https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/15902/Tesina_Liz_Avendaño.pdf?sequence=1)
- Ávila Martínez, E. G., Lizarazo Forero, L. M., & Cortés Pérez, F. (2015). Growth promotion

- of baccharis macrantha (Asteraceae) by phosphate solubilizing rhizosphere bacteria | Promoción del crecimiento de baccharis macrantha (Asteraceae) con bacterias solubilizadoras de fosfatos asociadas a su rizosfera. *Acta Biologica Colombiana*, 20(3), 121–131. <https://doi.org/10.15446/abc.v20n3.44742>
- Bashan, Y., & de-Bashan, L. E. (2010). *How the plant growth-promoting bacterium azospirillum promotes plant growth-a critical assessment. Advances in Agronomy* (1st ed., Vol. 108). Elsevier Inc. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(10\)08002-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(10)08002-8)
- Bashan, Y., & Holguin, G. (1998). Inoculant of plant growth promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnology Advances*, 16(4), 729–770.
- Bashan, Y., Holguin, G., & De-Bashan, L. E. (2004). Azospirillum-plant relationships : physiological , molecular , ...
- Bashan, Y., Holguin, G., & De-Bashan, L. E. (2004). Azospirillum-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003. - *Cabadian Journal of Microbiology*, 50, 521–577.
- Bernal, J. H., Navas, G. E., & Hernández, S. (1996). Requerimientos y respuestas a la fertilización del maíz en suelos de Sabanas Ácidas de Colombia. *Corpoica*, 6–10.
- Borges, J., Barrios, M., Sandoval, E., Bastardo, Y., & Márquez, O. (2012). Características físico-químicas del suelo y su asociación con macroelementos en áreas destinadas a pastoreo en el estado Yaracuy. *Bioagro*, 24(2), 121–126. Retrieved from <http://www.redalyc.org/pdf/857/85723473006.pdf>
- Brown, T., LeMay, H., Bursten, B., & Murphy, C. (2007). *Química La Ciencia Central* (Decimoprim). Mexico: Prentice Hall. <https://doi.org/10.1097/BLO.0b013e3181576080>
- Brundtland, G. (1989). Nuestro futuro comun: El impacto ambiental de la actividad minera.

*Ponencias y Comunicaciones: Congreso ...*, 1–5. <https://doi.org/conocido> como informe Brundtland

Buono, N. I., Peralta, J. M., Rodríguez, P. I., Sandoval, E., & Ulla, E. L. (2014). Efectos de la inoculación con bacterias solubilizadoras de fosfato en tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) y pimiento (*Capsicum annuum* L.) en condiciones controladas. *Revista Agronómica Del Noroeste Argentino*, 34(2), 130–131. Retrieved from <http://www.faz.unt.edu.ar/ranar/rana34245.pdf>

Burbano-Orjuela, H. (2016). El suelo y su relación con los servicios ecosistémicos y la seguridad alimentaria. *Revista de Ciencias Agrícolas*, 33(2), 117. <https://doi.org/10.22267/rcia.163302.58>

Caballero-Mellado, J. (2013). El Género *Azospirillum*. Retrieved from <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap10/>

Canto-Martín, J. C., Medina-Peralta, S., & Morales Avelino, D. (2004). Efecto de la Inoculación con *Azospirillum* sp. en Plantas de Chile Habanero. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 4, 21–27.

Carpena Ruiz, R. O., & Bernal Calderón, M. P. (2007). Claves de la fitorremediación: fitotecnologías para la recuperación de suelos. *Ecosistemas*, Vol. 16, n. 2 (Mayo-Ag. 2007); Pp. 1-3.

Cassán, F. D., Okon, Y., & Creus, C. M. (2015). *Handbook for Azospirillum*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-06542-7>

Cassán, F. D., Piccoli, P., & Bottini, R. (2003). Promoción del crecimiento vegetal por *Azospirillum* sp. a través de la producción de giberelinas . ¿ Un modelo alternativo para incrementar la producción agrícola ? *Research Gate*, (October 2015).

CEDEX. (2011). Estériles de Carbón.

- CEIC. (2018). Colombia Coal production. Retrieved from <https://www.ceicdata.com/en/indicator/colombia/coal-production>
- Celaya-Michel, H., & Castellanos-Villegas, A. E. (2011). Mineralización de nitrógeno en el suelo de zonas áridas y semiáridas. *Terra Latinoamericana*, 29(3), 343–356. <https://doi.org/10.1044/nnsld21.2.64>
- Charles, B. Y. (1911). FIXATION Nitrogen Fixation by Yeasts.
- Chávez Ramos, C. G. (2013). *Efecto de la Inoculación con Azospirillum brasilense en el Flujo de Protones de la Membrana Celular de Raiz de Mezquite (Prosopis articulata) en un Sistema Aeropónico*. Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste, S.C.
- Cisneros-Rojas, C. A., Sánchez-de Prager, M., & Menjivar-Flores, J. C. (2016). Efecto de bacterias solubilizadoras de fosfatos sobre el desarrollo de plántulas de café. *Agronomía Mesoamericana*, 28(1), 149. <https://doi.org/10.15517/am.v28i1.22021>
- Corrales-González, M., Rada, F., & Jaimez, R. (2016). Efecto del nitrógeno en los parámetros fotosintéticos y de producción del cultivo de la gerbera (*Gerbera jamesonii* H. Bolus ex Hook. F.). *Acta Agronomica*, 65(3), 255–260. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.15446/acag.v65n3.49555>
- Corrales Ramírez, L. C., Arévalo Galvez, Z. Y., & Moreno Burbano, V. E. (2014). Solubilización de fosfatos: una función microbiana importante en el desarrollo Vegetal. *Nova Publicación En Ciencias Biomédicas*, 12(21). Retrieved from <http://unicolmayor.edu.co/publicaciones/index.php/nova/article/view/251/502>
- Daughtry, C. S. T., Walthall, C. L., Kim, M. S., Brown de Colstun, E., & McMurtrey III, J. E. (2000). Estimating corn leaf chlorophyll concentration from leaf and canopy reflectance. *Remote. Sens. Environ*, 74, 229–239.
- De-Bashan, Juan P., Bashan, Y. E., & Hernandez. (2015). Interactions of *Azospirillum* spp.

- whit Microalgae: Basic Eukaryotic-Prokaryotic Model and Its Biotechnological Applications. In *Handbook for Azospirillum: Technical Issues and Protocols* (pp. 1–514). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-06542-7>
- 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*, *61*, 171–189. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.09.003>
- de-Bashan, L. E., Hernandez, J. P., Nelson, K. N., Bashan, Y., & Maier, R. M. (2010). Growth of Quailbush in Acidic, Metalliferous Desert Mine Tailings: Effect of *Azospirillum brasilense* Sp6 on Biomass Production and Rhizosphere Community Structure. *Microbial Ecology*, *60*(4), 915–927. <https://doi.org/10.1007/s00248-010-9713-7>
- De-Bashan, L., Holguin, G., Glick, B., & Bashan, Y. (2007). Bacterias promotoras de crecimiento en plantas para propósitos agrícolas y ambientales. *Microbiología Agrícola, Hongos, Bacterias, Micro y Macrofauna, Control Biológico, Planta-Microorganismo*, 170–224. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12855>
- De Miguel-Fernández, C., & Vázquez-Taset, Y. M. (2006). Origen de los Nitratos (NO<sub>3</sub>) y Nitritos (NO<sub>2</sub>) y su influencia en la potabilidad de las aguas subterráneas. *Minería y Geología*. Retrieved from <http://www.redalyc.org/pdf/2235/223517652002.pdf>
- Delgadillo, A. (2008). “Fitorremediación: una alternativa para eliminar contaminación.” *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, *14*(2011), 597–612. Retrieved from <http://www.scielo.org.mx/pdf/tsa/v14n2/v14n2a2.pdf>
- Dobbelaere, S., Vanderleyden, J., & Okon, Y. (2003). Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Critical Reviews in Plant Sciences*, *22*(2), 107–149.

<https://doi.org/10.1080/713610853>

Easterling, R. G. (2015). *Fundamentals of Statistical Experimental design and Analysis*.

Sussex: John Willey & Sons.

Ecotk. (2015). Disponibilidad de nutrientes con relacion de pH en el suelo. *Bioteología*

*Agrícola*. Retrieved from <https://www.ecotk.com.mx/2015/09/11/disponibilidad-de-nutrientes-en-relación-con-el-ph-del-suelo/>

EDUCARM. (2015). Prpiedades físicas del suelo. Retrieved from

[http://servicios.educarm.es/templates/portal/ficheros/websDinamicas/20/suelos\\_tema\\_2..pdf](http://servicios.educarm.es/templates/portal/ficheros/websDinamicas/20/suelos_tema_2..pdf)

EIA. (2018a). Coal Explained. Retrieved from

[https://www.eia.gov/energyexplained/index.cfm?page=coal\\_home](https://www.eia.gov/energyexplained/index.cfm?page=coal_home)

EIA. (2018b). U.S coal production, export and prices in 2017. Retrieved from

<https://www.eia.gov/todayinenergy/detail.php?id=34992>

EPEC. (2018). Energía renovable : la biomasa Conceptos y definiciones. Retrieved from

<https://www.epec.com.ar/docs/educativo/institucional/biomasa.pdf>

Facultad de Agronomía. (2013). Agua en el Suelo. Retrieved from

<http://www.fagro.edu.uy/~hidrologia/paisajismo/AGUA EN EL SUELO.pdf>

FAO. (2007a). Mejoramiento del Suelo. *Cartilla Tecnológica*. Retrieved from

<http://www.fao.org/docrep/V5290S/v5290s30.htm>

FAO. (2007b). Términos sobre Humedad del suelo. Retrieved from

<http://www.fao.org/docrep/008/y4690s/y4690s02.htm>

FCA-UNER. (2007). Microorganismos del suelo. Retrieved from

[http://www.fca.uner.edu.ar/files/academica/deptos/catedras/microbiologia/parte\\_de\\_unidades\\_10\\_y\\_11.pdf](http://www.fca.uner.edu.ar/files/academica/deptos/catedras/microbiologia/parte_de_unidades_10_y_11.pdf)

- FCNUNP. (2017). Cultivos de Bacterias. Retrieved from <http://www.fcn.unp.edu.ar/sitio/microgeneral/wp-content/uploads/2017/02/04-CULTIVO-DE-BACTERIAS.pdf>
- FEDESARROLLO. (2008). La Minería En Colombia : Impacto Socioeconómico y Fiscal. *Cámara ASOMINEROS de La ANDI*, 17(2), 46–55. Retrieved from <http://www.fedesarrollo.org.co/wp-content/uploads/2011/08/La-mineria-en-Colombia-Informe-de-Fedesarrollo-2008.pdf>
- Fernandez-marcos, M. L. (2014). Contaminación por fósforo procedente de la fertilización orgánica de suelos agrícolas, (January 2011).
- Fernández Gálvez, J., Simmonds, L. P., & Barahona, E. (2005). Interpretation of soil moisture profiles on ravel rich soils derived from soil dielectric measurements. *Advances in GeoEcology*, 36, 241–250.
- Fernández Mulas, R. (2016). Fitorremediación de Suelos. Retrieved from [http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/IQM\\_fitorremediacion\\_Valladolid\\_25615.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/IQM_fitorremediacion_Valladolid_25615.pdf)
- Figueroa, E., Reyes, P., & Rojas, J. (2009). *Pago por servicios ambientales en áreas protegidas en América Latina. Programa FAO/OAPN*. Retrieved from <http://www.fao.org/3/a-i0822s.pdf>
- Flores, C. (2014). *Penicillium* como solubilizador de fosfato, (April).
- Fukami, J., Nogueira, M. A., Araujo, R. S., & Hungria, M. (2016). Accessing inoculation methods of maize and wheat with *Azospirillum brasilense*. *AMB Express*, 6(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13568-015-0171-y>
- Gaitan Bohorquez, D. M., & Perez Perez, L. I. (2007). *Aislamiento y Evaluación de Microorganismos Celulolíticos A partir de Residuos Vegetales Frescos en Compost*

- Generados en un Cultivo de Crisantemo (Dendranthema grandiflora). Dental management. Pontificia Universidad Javeriana.* <https://doi.org/9968-904-02-3>
- Galaciz Lozano, A. D., & Trejo Calzada, R. (2011). *Cenchrus ciliaris L . USE AND Setaria verticillata L . PHYTOSTABILIZATION IN CONTAMINATED SOIL LEAD AND CADMIUM. Revista Chapingo Zonas Aridas, 10, 27–31.*
- Garrido, J., & Marcela, L. M. (2017). *Caracterización Fisicoquímica de los suelos agrícola del distrito de riego del municipio de repelón, Atlántico. Universidad de la Costa (CUC).*
- Ginocchio, R., & CIMM. (2008). *Uso de Recursos Fitogenéticos Nativos para a Fitoestabilización de Relaves Mineros en la Región de Coquimbo. Retrieved from [http://repositoriodigital.corfo.cl/bitstream/handle/11373/3150/04CR9IXD-01\\_ITF.pdf?sequence=1](http://repositoriodigital.corfo.cl/bitstream/handle/11373/3150/04CR9IXD-01_ITF.pdf?sequence=1)*
- Gómez-Luna, B. E., Vázquez-Marrufo, G., Ruiz-Aguilar, G. M. de la L., & Olalde-Portugal, V. (2010). *Cambios en las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas del suelo generados por la producción del carbón vegetal en el bosque templado de (Quercus spp) en Santa Rosa, GTO. Mexico. Historia, 6(2), 187–197. Retrieved from <http://www.revistas.unam.mx/index.php/rxm/article/view/21061/19888>*
- Guerrero Useda, M. E., & Pineda Acevedo, V. (2016). *CONTAMINACIÓN DEL SUELO EN LA ZONA MINERA DE RASGATÁ BAJO (TAUSA). MODELO CONCEPTUAL CONCEPTUAL MODEL OF SOIL POLLUTION IN THE MINING ZONE OF RASGATÁ BAJA (TAUSA). Ciencia e Ingeniería Neogranadina, 26(1), 57–74. <https://doi.org/10.18359/rcin.1664>*
- Gurdeep, K., & Sudhakara Reddy, M. (2017). *Improvement of crop yield by phosphate-solubilizing Aspergillus species in organic farming. Archives of Agronomy and Soil Sciences, 63(1), 24–34.*

- Habib Daza, S. (2017). Colombia no sería la misma sin su Carbon. Retrieved from <https://www.semana.com/contenidos-editoriales/carbon-la-base-de-todo-/articulo/la-importancia-del-carbon-en-colombia/535801>
- Hartz, T., Davis, U. C., & Smith, R. (2012). Pruebas de Nitrato en Suelos en Temporada. Retrieved from [http://www.greatermontereyirwmp.org/wp-content/uploads/2012/03/Appendix-L07\\_On-Farm-Solutions\\_App-B\\_Soil-Nitrate-Testing-Explained\\_Spanish.pdf](http://www.greatermontereyirwmp.org/wp-content/uploads/2012/03/Appendix-L07_On-Farm-Solutions_App-B_Soil-Nitrate-Testing-Explained_Spanish.pdf)
- Herbario JBB en línea. (2011). *Baccharis marantha* Kunth. Retrieved from <http://coleccion.jbb.gov.co/herbario/especimen/7206>
- Hidroel, C., Nepomorpha, H., Cadenas, L., Andr, S., & Salle, L. (2015). Biota colombiana. *Biota Colombiana*, 16(1), 179–207. <https://doi.org/10.21068/c001>
- Holguin, G., Bashan, Y., & Ferrera-Cerato, R. (1996). Interactions between plants and beneficial microorganisms: III methods for isolation and characterization of mycorrhizal fungi and plant growth-promoting microorganisms. *Terra*, 14, 211–227.
- Hungria, M., Campo, R. J., Souza, E. M., & Pedrosa, F. O. (2010). Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. *Plant and Soil*, 331(1), 413–425. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0262-0>
- Ibarra Sánchez, C. L. (2010). *Diversidad de Bacterias Fijadoras de Nitrógeno aisladas de Suelo de Chinampa y su Efecto en Plantas de Interés Agrícola*. Instituto Politécnico Nacional. Retrieved from <https://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/9203/33.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- ICMM. (2012). Trends in the mining and metals industry. *ICMM*, 88(11), 1–16. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(20000601\)88:11<2452::AID-CNCR5>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/1097-0142(20000601)88:11<2452::AID-CNCR5>3.0.CO;2-3)

- ICMM. (2016). Role of mining in national economies, 68.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.05.008>
- Illio, J. (2013). Impactos de la minería en el medio natural. Retrieved from  
[https://www.ucm.es/data/cont/media/www/pag-15564/Impactos de la minería - Javier Lillo.pdf](https://www.ucm.es/data/cont/media/www/pag-15564/Impactos%20de%20la%20miner%C3%ADa%20-%20Javier%20Lillo.pdf)
- International Council on Mining and Metals (ICMM). (2012). The role of mining in national economies - mining's contribution to sustainable development, (October), 1–20.  
<https://doi.org/10.1039/c2cc16333k>
- Jara-Peña, E., Gómez, J., Montoya, H., Chanco, M., Mariano, M., & Cano, N. (2014). Capacidad fitorremediadora de cinco especies altoandinas de suelos contaminados con metales pesados, *21*(October), 145–154.
- Jia, J. (2018). China 2017 raw coal output up. Retrieved from  
<http://www.sxcoal.com/news/4567443/info/en>
- Jose, E., & Barletto, O. (2011). Características físico-químicas del suelo y su incidencia en la absorción de nutrientes , con énfasis en el cultivo, (1).
- Juárez Sanz, M. (2004). *Diagnóstico del potencial nutritivo del suelo*. Alicante: Digitalia.  
Retrieved from [https://web-b-ebsohost-com.ezproxy.unbosque.edu.co/ehost/detail?sid=2628e1bf-6ee8-4751-8157-fb1ab8b13ac1@sessionmgr104&vid=0&format=EB&lpid=lp\\_15&rid=0](https://web-b-ebsohost-com.ezproxy.unbosque.edu.co/ehost/detail?sid=2628e1bf-6ee8-4751-8157-fb1ab8b13ac1@sessionmgr104&vid=0&format=EB&lpid=lp_15&rid=0)
- Kantharaj, G. R. (2017). Nitrogen Metabolism. Retrieved from  
[https://plantcellbiology.masters.grkraj.org/html/Plant\\_Cell\\_Biochemistry\\_And\\_Metabolism4-Nitrogen\\_Metabolism.htm](https://plantcellbiology.masters.grkraj.org/html/Plant_Cell_Biochemistry_And_Metabolism4-Nitrogen_Metabolism.htm)
- Khalajabadi, S. S., & Salamanca Jimenez, A. (2005). La densidad aparente y su relación con otras propiedades en suelos de la zona cafetera colombiana. *Cenicafé*, *56*(4), 381–397.

- Koepper, J. W., & Schroth, M. N. (1980). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria and Plant Growth Under Gnotobiotic Conditions. *Ecology and Epidemiology*, 71, 642–644. Retrieved from [https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1981Articles/Phyto71n06\\_642.PDF](https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1981Articles/Phyto71n06_642.PDF)
- Lara, C., Esquivel Avila, L. M., & Negrete Peñata, J. L. (2011). Native Phosphate Solubilizing Bacteria To Increase the Crops in the Department of Cordova-Colombia. *Biotecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 9(2), 114–120. Retrieved from [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1692-35612011000200013&lng=en&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-35612011000200013&lng=en&nrm=iso&tlng=es)
- León, L. H., & Rojas, L. M. (2015). Determination of plant growth promoting potential of *Azotobacter* spp. isolated from the rhizosphere of weeds in maize crop (*Zea mays* L.). *Scientia Agropecuaria*, 6(4), 247–257. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2015.04.02>
- Liang, M., Sugimoto, A., Tei, S., & Bragin, I. V. (2014). Importance of soil moisture and N availability to larch growth and distribution in the Arctic taiga-tundra boundary ecosystem, northeastern Siberia. *Polar Science*, 8(4), 327–341. <https://doi.org/10.1016/j.polar.2014.07.008>
- Loch Arellano, B. N. (2017). *Evaluación del uso de *Atriplex nummularia* con la aplicación de enmiendas húmicas para la fitoestabilización de relaves mineros*. Universidad de Chile. Retrieved from <http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/146093/FinalB.Loch.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Maharana, J. K., & Patel, A. K. (2013). Physico-Chemical Characterization and Mine Soil

- Genesis in Age Series Coal Mine Overburden Spoil in Chronosequence in a Dry Tropical Environment. *Phylogen Evolution*, 1(1), 1–7. <https://doi.org/10.4172/2329-9002>
- Martinez H, E., Fuentes E, J. P., & Edmundo Acevedo, H. (2008). Carbono Orgánico Y Propiedades del Suelo. *J Soil Sc, Plant Nutr*, 8(1), 68–96. Retrieved from <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rcsuelo/v8n1/art06.pdf>
- Matula, J. (2011). Relationship between phosphorus concentration in soil solution and phosphorus in shoots of barley. *Plant Soil Environment*, 2011(7), 307–314.
- Medina, A. A., Constanza, M., Botero, G., Catalina, S., Castillo, C., De Minería, S., ... De, J. (2014). Plan Nacional de Ordenamiento Minero PNOM, 217. Retrieved from [http://www1.upme.gov.co/simco/PlaneacionSector/Documents/PNOM\\_EN\\_EXTENS O.pdf](http://www1.upme.gov.co/simco/PlaneacionSector/Documents/PNOM_EN_EXTENS O.pdf)
- Ministerio de Minas y Energía, & Ministerio del Medio Ambiente. (2002). Capitulo 7. Manejo de Impactos Ambientales. *Guía Minero Ambiental De Explotación*, 71–127. <https://doi.org/10.1074/jbc.R111.254359>
- MinMiner S.A. (2015). MinMiner. Retrieved from <http://minminersa.com/responsabilidad-corporativa/responsabilidad-ambiental-2/>
- Muñoz, V. (2013). Fitorremediación. Retrieved from <http://colaboraonambien.blogspot.com/2013/03/ventajas-y-desventajas-de-la.html>
- Navarro, K. (2017). Plagas afectan cultivos. Retrieved from <https://www.informeagricola.com/que-plagas-afectan-nuestros-cultivos/>
- Nogales, B. (2005). La microbiología del suelo en la era de la biología molecular : descubriendo la punta del iceberg, *14*(2), 41–51.
- Ohyama, T. (2009). *Nitrogen Fixation and Metabolism in Soybean Plants*. hauppauge, N.Y:

Nova Science Publishers, Inc. Retrieved from <http://eds.a.ebscohost.com.ezproxy.unbosque.edu.co/eds/ebookviewer/ebook/bmxIYmtfXzI4MTE2N19fQU41?sid=f4a5adc7-5042-4a21-874e-4adb57033b2b@sdc-v-sessmgr06&vid=0&format=EB&rid=1>

Ortíz Bernad, I., Sanz García, J., Dorado Valiño, M., & Villar Fernandez, S. (2007). Técnicas de recuperación de suelos contaminados. Retrieved from [https://www.madrimasd.org/informacionidi/biblioteca/publicacion/doc/vt/vt6\\_tecnicas\\_recuperacion\\_suelos\\_contaminados.pdf](https://www.madrimasd.org/informacionidi/biblioteca/publicacion/doc/vt/vt6_tecnicas_recuperacion_suelos_contaminados.pdf)

Parra, Y., & Cuevas, F. (2001). Potencialidades de *Azospirillum* como inoculante para la agricultura. *Cultivos Tropicales*, 23(3), 31–41.

Patiño-Torres, C. O., & Sanclemente-Reyes, O. E. (2014). Los microorganismos solubilizadores de fósforo (MSF): Una alternativa biotecnológica para una agricultura sostenible. *Entramado*, 10(2).

Pellegrini, A. E. (2017). Potasio calcio y magnesio del suelo. Retrieved from [http://aulavirtual.agro.unlp.edu.ar/pluginfile.php/35408/mod\\_resource/content/1/14 - CALCIO%2C MAGNESIO Y POTASIO.pdf](http://aulavirtual.agro.unlp.edu.ar/pluginfile.php/35408/mod_resource/content/1/14_CALCIO%2C%20MAGNESIO%20Y%20POTASIO.pdf)

Pereg, L., de-Bashan, L. E., & Bashan, Y. (2016). Assessment of affinity and specificity of *Azospirillum* for plants. *Plant and Soil*, 399(1–2), 389–414. <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2778-9>

Pérez Espinosa, A. (1997). *Tesis doctoral y Efectos en el Dinámica del Cobalto Suelo-Planta Sistema*. Universidad de Alicante. Retrieved from [http://www1.upme.gov.co/simco/Cifras-Sectoriales/EstudiosPublicaciones/Guia\\_orientacion\\_correcto\\_manejo\\_vertimientos.pdf](http://www1.upme.gov.co/simco/Cifras-Sectoriales/EstudiosPublicaciones/Guia_orientacion_correcto_manejo_vertimientos.pdf)

- Perry, J. A. (2017). Influencia de humedad en Calidad de Cultivos. Retrieved from <https://www.pthorticulture.com/es/centro-de-formacion/como-influye-la-humedad-en-la-calidad-de-los-cultivos/>
- Pierina Méndez, G. (2016). *Analisis de la microbiota de los suelos impactados y no impactados por minería metálica en República Dominicana*. Zamorano: Escuela Agrícola Panamericana.
- Piñero Bonilla, J., & Rivas, N. (2004). Aislamiento y caracterización de una cepa de actinomiceto, celulolítico, termófilo moderado y acidófilo. *Revista Científica*, 15(5), 412–418.
- Pinzón Uribe, L. F., & Sotelo Rojas, H. (2010). ANALYSIS OF CHEMICAL AND PHYSICAL PROPERTIES OF SOILS USED ON THE FINAL COVERAGE IN DOÑA JUANA LANDFILL. *Universidad Militar*.
- Pontón, J., Moragues, J., Gené, J., Guarro, J., & Quindós, G. (2002). *Mucor mucedo*. Retrieved from <http://hongos-alergicos.reviberoammicol.com/files/034.PDF>
- Prada Muñoz, J. K. (2015). *ANÁLISIS METABOLÓMICO DE LA ESPECIE Baccharis latifolia ( ASTERACEAE ) EN LA SABANA*. Universidad Militar Nueva Granada.
- Rangel Lucio, J. A., Rodríguez-Mendoza, M. de las N., Ferrera-Cerrato, R., Castellanos-Ramos, J. Z., Ramírez-Gama, R. M., & Alvarado-Bárcenas, E. (2011). Afinidad y efecto de *Azospirillum* sp. En *Maíz*, 22(2), 1–17.
- Restrepo Franco, G. M., Marulanda Moreno, S., De la Fe-Pérez, Y., & Días de la Osa, A. (2015). Bacterias solubilizadoras de fosfato y sus potencialidades de uso en la promoción del crecimiento de cultivos de importancia. *Cenic*, 46(1). Retrieved from <https://revista.cnic.edu.cu/revistaCB/articulos/bacterias-solubilizadoras-de-fosfato-y-sus-potencialidades-de-uso-en-la-promoción-del>

- Restrepo, G. M., Marulanda, S., Del a Fe-Perez, Y., Días-De la Osa, A., Lucía-Baldani, V., & Hernández-Rodríguez, A. (2015). Phosphate solubilizing bacteria and their potential use on plant growth promoting in economic important crops. *Cenic*, 46(1). Retrieved from <https://revista.cnic.edu.cu/revistaCB/articulos/bacterias-solubilizadoras-de-fosfato-y-sus-potencialidades-de-uso-en-la-promoción-del>
- Rodriguez Moreno, N. C., & Toro Lozano, C. A. (2006). *Estandarización del Tiempo de Incubación y Concentración de CaCO<sub>3</sub>, SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>) y KNO<sub>3</sub>) para la Prueba NMP con Bacterias Nitrificantes y Desnitrificantes Usando Matriz Compost*. Pontificia Universidad JAveriana.
- Rojas, C. (2015). MINING SECTOR IN -MOVING FORWARD- Colombia at a glance. *Agencia Nacional de Minería*.
- Rojas, J. M., & Saenz Peña, E. E. A. (2012). Densidad Aparente. Retrieved from [https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta-\\_densidad\\_aparente.pdf](https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta-_densidad_aparente.pdf)
- Rosen, C. J., Bierman, P. M., & Eliason, R. D. (2008). Soil test interpretations and fertilizer management for lawns, turf, gardens, and landscape plants, 44. Retrieved from <http://conservancy.umn.edu/handle/11299/49265>
- Rucks, L., Garcia, F., Kaplán, A., Ponce de León, J., & Hill, M. (2004). Propiedades físicas del suelo. <https://doi.org/10.1039/TF9686403358>
- Salazar Loaiza, A. M., & Ordoñez Guerrero, C. A. (2013). *Aislamiento e identificación de Actinomicetos Fijadores de Nitrógeno en el suelo del Jardín Botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira*. Universidad Tecnológica de Pereira.
- SAPS. (2018). Influencing leaf size and number of leaves. Retrieved from <http://www.saps.org.uk/saps-associates/browse-q-and-a/654-how-can-you-increase-the-leaf-size-on-fast-plants-how-can-you-increase-the-number-of-leaves-a-plant-will->

grow

Scattareggia, J. (2016). Aislamiento y selección de bacterias solubilizadoras de fósforo de un suelo cultivado con tomate para industria (*Solanum lycopersicum* L.), (54 261).

Sosa, D. A. (2012). Muestras de Suelo. Retrieved from <https://inta.gov.ar/documentos/muestreo-de-suelos>

Statista. (2018). Volumen of Coal production in India. Retrieved from <https://www.statista.com/statistics/666788/india-coal-production/>

Taiz, L., & Zeiger, E. (2002). *Plant Physiology* (Third). Sunderland: Sinauer Associates, Inc.

Tobar Valenzuela, P., & Vanegas Padilla, T. A. (2014). *Fitoestabilización de depositos de relaves*. Universidad de Chile.

Unidad de Planeación Minero Energética - UPME. (2017). Plan nacional de desarrollo minero con horizonte a 2025: Minería responsable con el territorio, 174.

UNJu. (2013). 3. Microbios del suelo 3.1. Retrieved from [http://www.microbiota.com.ar/sites/default/files/magric13\\_3-4.pdf](http://www.microbiota.com.ar/sites/default/files/magric13_3-4.pdf)

Upme. (2016). Minas y energía 2012 – 2016. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

UPME. (2015). Guía de orientación para el minero sobre el correcto manejo de vertimientos para la minería de metales preciosos y de carbón. Retrieved from [http://www1.upme.gov.co/simco/Cifras-Sectoriales/EstudiosPublicaciones/Guia\\_orientacion\\_correcto\\_manejo\\_vertimientos.pdf](http://www1.upme.gov.co/simco/Cifras-Sectoriales/EstudiosPublicaciones/Guia_orientacion_correcto_manejo_vertimientos.pdf)

Uvigo. (2018a). Raíz. Retrieved from [https://mmegias.webs.uvigo.es/2-organos-v/guiada\\_o\\_v\\_raiz.php](https://mmegias.webs.uvigo.es/2-organos-v/guiada_o_v_raiz.php)

- Uvigo. (2018b). Tallo. Retrieved from [https://mmegias.webs.uvigo.es/2-organos-v/guiada\\_o\\_v\\_tprimario.php](https://mmegias.webs.uvigo.es/2-organos-v/guiada_o_v_tprimario.php)
- Vargas Rojas, R. (2009). *Guía para la descripción de suelos*. D-Fao. Retrieved from <https://ebookcentral-proquest-com.ezproxy.unbosque.edu.co/lib/bibliobosquesp/detail.action?docID=3202427>
- Villegas, M. C. (2017). Impacto de la minería en la economía y desarrollo social parte 1. Retrieved from <http://focoeconomico.org/2017/01/06/el-impacto-de-la-mineria-en-la-economia-y-el-desarrollo-social-parte-1/>
- Wang, W., Hao, W., Bian, Z., Lei, S., Wang, X., Sang, S., & Xu, S. (2014). Effect of coal mining activities on the environment of *Tetraena mongolica* in Wuhai, Inner Mongolia, China-A geochemical perspective. *International Journal of Coal Geology*, 132, 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.coal.2014.08.006>
- World Coal Association. (2018a). Coal & Energy. Retrieved from <https://www.worldcoal.org/coal/uses-coal/coal-electricity>
- World Coal Association. (2018b). Uses of coal. Retrieved from <https://www.worldcoal.org/coal/uses-coal>
- Xi, L. (1985). *Baccharis macrantha*, 3286, 17525.
- Zúñiga, O., Osorio, J. C., Cuero, R., & Peña, J. A. (2011). Evaluation of technologies for the recovery of soils degraded by salinity. *Revista Facultad Nacional de Agronomía - Medellín*, 64(1), 5769–5779. Retrieved from <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=179922364003>