



**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA  
SEDE GUAYAQUIL**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGIA**

**TRABAJO EXPERIMENTAL**

**DETERMINACIÓN DEL EFECTO FITOESTABILIZADOR DE HIERRO Y  
CROMO ASOCIADOS A LAS MICORRIZAS ARBUSCULARES EN DOS PLANTAS  
PTERIDOFITAS PARA LA REMEDIACIÓN DE SEDIMENTOS PROVENIENTES  
DEL ESTERO SALADO, GUAYAQUIL-ECUADOR**

*Trabajo de titulación previo a la obtención  
del título de Ingeniero (a) en Biotecnología*

**AUTORES**

NICOLE CAROLINA PAZMIÑO ARROBA  
JOSHUA EMMANUEL SAA RODRÍGUEZ

**TUTOR**

JAIME ALBERTO NARANJO MORAN

**GUAYAQUIL-ECUADOR**

**2024**

## CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

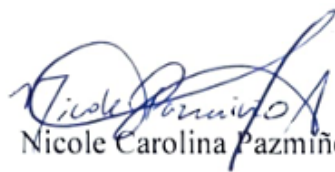
Nosotros, **Joshua Emmanuel Saa Rodríguez** con documento de identificación N° 0950259481 y **Nicole Carolina Pazmiño Arroba** con documento de identificación N° 0954373122; manifestamos que:

Somos las autores y responsables del presente trabajo; y, autorizamos a que sin fines de lucro la Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total o parcial el presente trabajo de titulación.

Guayaquil, 02 de febrero del año 2024

Atentamente,

  
Joshua Emmanuel Saa Rodríguez  
CI: 0950259481

  
Nicole Carolina Pazmiño Arroba  
CI: 0954373122

**CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN A LA  
UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

Nosotros, **Joshua Emmanuel Saa Rodríguez** con documento de identificación N° 0950259481 y **Nicole Carolina Pazmiño Arroba** con documento de identificación N° 0954373122, expresamos nuestra voluntad y por medio del presente documento cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del trabajo experimental: **“DETERMINACIÓN DEL EFECTO FITOESTABILIZADOR DE HIERRO Y CROMO ASOCIADOS A LAS MICORRIZAS ARBUSCULARES EN DOS PLANTAS PTERIDOFITAS PARA LA REMEDIACIÓN DE SEDIMENTOS PROVENIENTES DEL ESTERO SALADO, GUAYAQUIL-ECUADOR”**, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniero/a en Biotecnología, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En concordancia con lo manifestado, suscribimos este documento en el momento que hacemos la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Guayaquil, 02 de febrero del año 2024

Atentamente,

  
Joshua Emmanuel Saa Rodríguez  
CI: 0950259481

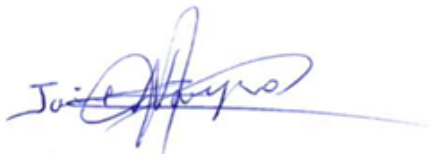
  
Nicole Carolina Pazmiño Arroba  
CI: 0954373122

## **CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN.**

Yo, **Jaime Alberto Naranjo Morán** con documento de identificación N° 0927155226, docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: **“DETERMINACIÓN DEL EFECTO FITOESTABILIZADOR DE HIERRO Y CROMO ASOCIADOS A LAS MICORRIZAS ARBUSCULARES EN DOS PLANTAS PTERIDOFITAS PARA LA REMEDIACIÓN DE SEDIMENTOS PROVENIENTES DEL ESTERO SALADO, GUAYAQUIL-ECUADOR”**, realizado por **Joshua Emmanuel Saa Rodríguez** con documento de identificación N° 0950259481 y **Nicole Carolina Pazmiño Arroba** con documento de identificación N° 0954373122, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción de trabajo experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Guayaquil, 02 de febrero del año 2024

Atentamente,



Jaime Alberto Naranjo Morán

CI: 0927155226

### *Dedicatoria*

*Este trabajo va dedicado a mis padres, quienes me hay apoyado siempre en todo lo que me propongo; a mis hermanos por estar siempre ahí cuando los necesito; a mis amigos, por ser en quienes me he podido apoyar a lo largo de toda la carrera y a mis profesores por la guía que me brindaron.*

### *Agradecimiento*

*Le agradezco a la Universidad Politécnica Salesiana por haberme permitido usar sus instalaciones, equipos y materiales para el desarrollo de esta investigación. Al Ing. Jaime Naranjo, por guiar con paciencia a lo largo de este trabajo y a Ruth por haber sido de gran ayuda.*

### *Dedicatoria*

*Dedico esta tesis a mis padres, por ser mi mayor soporte y motivación. Gracias, mamá y papá por confiar en mis capacidades, por todo el esfuerzo realizado para apoyar mis estudios, por su amor y los valores que me han inculcado. Todo esto no hubiera sido posible sin ustedes, son mi orgullo y mi mayor fortaleza.*

### *Agradecimiento*

*Al Ing. Jaime Naranjo, por depositar su confianza en mí, por su orientación académica, tiempo, paciencia y disponibilidad en cada etapa de este trabajo de titulación y al laboratorio de biotecnología de la Universidad Politécnica Salesiana por facilitarnos los equipos, materiales, reactivos e instalaciones para la realización de los ensayos experimentales.*

## Resumen

El Estero Salado presenta contaminación por metales pesados que impactan la biodiversidad del ecosistema. Este estudio tiene como objetivo establecer una bioprospección de micorrizas arbusculares en dos plantas pteridofitas, para mitigar la contaminación de Fe y Cr en el sedimento del Estero Salado, de esta forma se evaluó el potencial fitorremediador, para mitigar el hierro (Fe) y cromo (Cr). Mediante bioensayos en invernadero, las plántulas se expusieron a tratamientos con sedimento contaminados artificialmente con concentraciones crecientes de dichos metales. Los resultados evidencian factores de bioacumulación de 2,9 (Fe) y 2,8 (Cr) en la especie *Dryopteris filix-mas* y 1,6 (Fe) y 3,5 (Cr) en la especie *Pityrogramma ebenea* confirmando absorción en raíces. Por otra parte, el factor de traslocación para cada especie fue de 0,117 (Fe), 0,148 (Cr) y 0,071 (Fe), 0,091 (Cr) respectivamente. También se registró el aumento en torno al 80% en colonización micorrícica ante el estrés metálico. En conclusión, estas especies de helechos y sus micorrizas asociadas presentan capacidad elevada de fitorremediar Fe y Cr en sedimentos del Estero. Se recomiendan más estudios aplicados in situ para implementar posteriormente un programa de biorremediación de metales integrado a la rehabilitación del humedal.

- Palabras claves: Contaminación; Cromo; Estero Salado; Hierro; Micorriza Arbuscular.

## **Abstract**

The Estero Salado has heavy metal contamination that impacts the biodiversity of the ecosystem. This study aims to establish a bioprospecting of arbuscular mycorrhizae in two pteridophyte plants to mitigate Fe and Cr contamination in the sediment of the Estero Salado, thus evaluating the phytoremediation potential to mitigate iron (Fe) and chromium (Cr). Through greenhouse bioassays, seedlings were exposed to sediment treatments artificially contaminated with increasing concentrations of these metals. The results showed bioaccumulation factors of 2,9 (Fe) and 2,8 (Cr) in the species *Dryopteris filix-mas* and 1,6 (Fe) and 3,5 (Cr) in the species *Pityrogramma ebenea*, confirming absorption in roots. On the other hand, the translocation factor for each species was 0,117 (Fe), 0,148 (Cr) and 0,071 (Fe), 0,091 (Cr) respectively. The increase of about 80% in mycorrhizal colonization under metallic stress was also recorded. In conclusion, these fern species and their associated mycorrhizae have a high capacity to phytoremediate Fe and Cr in sediments of the Estero. Further studies applied in situ are recommended to subsequently implement a metal bioremediation program integrated to the rehabilitation of the wetland.

- **Keys words:** Arbuscular mycorrhiza; Chrome; Estero Salado; Iron; Pollution.



## ÍNDICE DE CONTENIDO

Capítulo 1.....	1
Antecedentes .....	1
1.1.    Introducción.....	1
1.2.    Problema de investigación .....	3
1.3.    Delimitación.....	4
1.4.    Pregunta de investigación .....	4
1.5.    Objetivos generales y específicos .....	4
1.5.1.    Objetivo general.....	4
1.5.2.    Objetivos específicos .....	4
1.6.    Hipótesis .....	5
Capítulo 2.....	6
Marco teórico .....	6
2.1.    Biotecnología ambiental .....	6
2.2.    Fitorremediación.....	6
2.3.    Pteridofitas .....	6
2.4.    Helecho blanco ( <i>Pityrogramma ebenea</i> ) .....	7
2.5.    Taxonomía de <i>Pityrogramma ebenea</i> .....	7
2.6.    Helecho macho ( <i>Dryopteris filix-mas</i> ).....	8
2.7.    Taxonomía de <i>Dryopteris filix-mas</i> .....	9
2.8.    Hierro (Fe) .....	9
2.9.    Dinámica de Fe .....	10
2.10.    Cromo (Cr).....	10
2.11.    Dinámica de Cr .....	10
2.12.    Fuentes de contaminación.....	11
2.13.    Bioprospección .....	11
2.14.    Factores de bioconcentración y translocación .....	11
2.15.    El Estero Salado.....	12
2.16.    Dinámica de micorrizas con metales pesados.....	13
2.17.    Simbiosis de micorrizas con los sedimentos.....	13
2.18.    Impacto ambiental de metales pesados en el ecosistema manglar.....	13
Capítulo 3.....	15
Materiales y métodos .....	15

3.1.	Materiales.....	15
3.2.	Metodología de investigación.....	15
3.3.	Población y muestra.....	15
3.4.	Material biológico.....	15
3.5.	Diseño de experimento .....	16
3.6.	Modelo estadístico .....	17
3.7.	Variables .....	18
3.7.1.	Variables cuantitativas .....	18
3.7.2.	Variables cualitativas .....	21
3.8.	Lavado de raíces .....	23
3.9.	Montaje de raíces .....	23
3.10.	Colonización micorrízica de plantas pteridofitas.....	24
3.11.	Tamizaje húmedo para cuantificar esporas de MA.....	24
3.12.	Aislamiento de esporas para análisis taxonómico .....	25
3.13.	Identificación taxonómica de esporas.....	25
3.14.	Digestión ácida de la muestra .....	26
Capítulo 4.....		27
Resultados y discusiones.....		27
4.1. Resultados.....		27
Capítulo 5.....		38
Conclusiones y recomendaciones.....		38
5.1. Conclusiones.....		38
5.2. Recomendaciones .....		38
Bibliografía .....		39
Anexos .....		49

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Descripción taxonómica de <i>Pityrogramma ebenea</i> .....	8
Tabla 2. Descripción taxonómica de <i>Dryopteris filix-mas</i> .....	9
Tabla 3. Diseño bifactorial para pteridofitas evaluadas para Fe y Cr .....	17
Tabla 4. Tratamientos de Fe y Cr colonizados en la planta <i>Dryopteris filix-mas</i> .....	29
Tabla 5. Tratamientos de Fe y Cr colonizados en la planta <i>Pityrogramma ebenea</i> .....	30
Tabla 6. Diversidad de la comunidad micorrizica en plantas pteridofitas .....	35

## ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1. Fotografía de <i>Pityrogramma</i> .....	7
Figura 2. Fotografía de <i>Dryopteris filix-mas</i> .....	9
Figura 3. Mapa del Estero Salado .....	12
Figura 4. Cuantificación de esporas en <i>Dryopteris filix-mas</i> .....	27
Figura 5. Cuantificación de esporas en <i>Pityrogramma ebanea</i> .....	28
Figura 6. Colonización micorrízica de la planta <i>Dryopteris filix-mas</i> .....	29
Figura 7. Colonización micorrízica de la planta <i>Pityrogramma ebanea</i> .....	30
Figura 8. Géneros de los hongos micorrizicos arbusculares en <i>Dryopteris filix-mas</i> .....	32
Figura 9. Géneros de los hongos micorrizicos arbusculares en <i>Pityrogramma ebenea</i> .....	32
Figura 10. Análisis de conglomerado relación planta metal.....	36
Figura 12. Análisis de conglomerado relación tratamiento metal .....	36
Figura 13. Análisis multifactorial tratamiento metal .....	37

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Equipos, materiales y reactivos .....	49
Anexo 2. Soluciones previas a los protocolos de tinción de raíces y cuantificación de esporas .....	49
Anexo 3. Muestreo del sedimento .....	50
Anexo 4. Recolección de muestra de sedimento del Estero Salado .....	50
Anexo 5. Recolección de muestra de sedimento de suelo de los Helechos .....	51
Anexo 6. <i>Pityrogramma ebenea</i> tratamiento Fe y Cr .....	51
Anexo 7. <i>Dryopteris filix-mas</i> tratamiento Fe y Cr .....	52
Anexo 8. Proceso de tamizaje húmedo .....	52
Anexo 9. Tinción y montaje de micorrizas .....	53
Anexo 10. Estimación de Colonización micorrízica en DFM control inicial .....	53
Anexo 11. Estimación de colonización micorrízica en PEB control inicial .....	54
Anexo 12. Estimación de colonización micorrízica en DFM para Fe y Cr .....	54
Anexo 13. Estimación de colonización micorrízica en PEB para Fe y Cr .....	55
Anexo 14. Cuantificación de esporas en DFM y PEB inicial .....	55
Anexo 15. Cuantificación de esporas en PEB y DFM inoculadas con Fe y Cr .....	56

# Capítulo 1

## Antecedentes

### 1.1. Introducción

El término micorriza se refiere a una simbiosis mutualista entre un hongo micorrízico junto a las raíces de las plantas. Esta interacción aumenta la superficie de absorción de la planta para mejorar la captación de nutrientes, agua, iones poco móviles y minerales, con la finalidad de mejorar el balance hídrico, así como la nutrición de la planta (Garzón, 2016). La filogenética de las micorrizas según Camarena (2012) menciona que existen siete tipos de micorrizas: Ectendo-micorrizas, Ericoide, Arbutoide, Monotropoide, Orquideoide, Ectomicorrizas y Arbusculares cada una con características específicas en su morfología, esporas e hifas.

La unión de una de estas micorrizas con hongos del género *Glomerocytas* se denomina micorriza arbuscular (MA), estos consorcios logran presentar una mejor en la absorción de nutrientes y minerales disueltos en el suelo, de ahí su importancia de estudio (Seguel, 2014). Dado a la diversidad no heterogénea de los hongos, estos presentan cambios en sus estructuras y composiciones de acuerdo con el lugar. Debido a ello, se registró una actualización taxonómica del este nuevo phylum. Se determinó cuatro órdenes subordinados: orden Glomerales (*Glomeraceae*), Diversisporales (*Acaulosporaceae* y *Gigasporaceae*), Archaeosporales (*Archaeosporaceae*) y Paraglomerales (*Paraglomeraceae*). De esta manera se otorga importancia a la bioprospección para la identificación de individuos locales (Salmeron *et al.*, 2015).

Los hongos micorrizicos arbusculares (HMA) se reportan en más de 200 familias y desarrollando simbiosis en 1,000 géneros de plantas, distribuidas en el grupo de las Briofitas, Pteridofitas, Angiospermas y Gimnospermas, dentro de las cuales se incluyen muchas especies

de cultivos importantes para la agricultura, con énfasis en gramíneas y leguminosas (Guzmán, 2005).

Los HMA son utilizadas para mantener estable el suelo presente en el agroecosistema (al contribuir en la mejora de la fertilidad de este), además de desarrollar la planta y acumular metales pesados (MP). Estudiar el complejo suelo/planta/micorriza representa un avance biotecnológico al obtener un agroecosistema sustentable (Carreón *et al.*, 2008).

Dentro de las plantas vasculares que forman consorcios fúngicos se encuentran las plantas pteridofitas. Las plantas pteridofitas son especies biológicas que habitan diversos ambientes, con diferentes condiciones biofísicas como altitud, exposición, humedad y precipitación (León *et al.*, 2022). Las pteridofitas cuentan con alrededor de 12 mil especies y seis clases: Lycopodiopsida (licófitas), Equisetopsida (colas de caballo), Psilotopsida (helechos batidores), Ophioglossopsida (helechos de lengua), Marattiopsida (helechos gigantes) y Pteridopsida (helechos verdaderos) (Shipunov, 2022).

Estudios actuales identifican a 6 familias de pteridofitas que, expuestas a los contaminantes, se adaptaron mediante la modificación fisicoquímica. A consecuencia de estas características que se ha logrado evidenciar la acumulación de arsénico y cadmio (con números de oxidación parecidos al de los MP a estudiar); se ha podido demostrar una reducción del 20,59 y 3,58% respectivamente (Tan *et al.*, 2023). Es por estas características que se las implementan en la fitorremediación de los suelos contaminados (Rubio *et al.*, 2016).

Los MP se presentan de manera natural en los suelos, no obstante, las actividades antropogénicas han motivado su acumulación, estos desencadenan efectos tóxicos para el medio ambiente (Torres *et al.*, 2018). En este trabajo de investigación se busca el establecimiento de una bioprospección de micorrizas arbusculares en dos especies vegetales pteridofitas con el objetivo de mitigar la contaminación de hierro (Fe) y cromo (Cr) en el sedimento del Estero Salado.

## 1.2. Problema de investigación

El Estero Salado es un cuerpo de agua que atraviesa parte de Guayaquil, la ciudad más poblada de Ecuador. En los últimos años, ha sufrido un grave deterioro en la calidad de sus aguas por actividades humanas, como el vertido de aguas residuales domésticas, agrícolas e industriales sin tratamiento. Como resultado, este estuario se ha convertido en un reservorio de varios MP (Monserrate *et al.*, 2011). De acuerdo con el Texto Unificado de Legislación Secundaria de Medio Ambiente (TULSMA) establece que los límites permitidos de Fe en sedimentos son de 0.3 mg/L, mientras que el valor aceptable para Cr es de 0.05 mg/L (Correa *et al.*, 2015).

Los hongos micorrízicos arbusculares pueden ayudar a combatir el estrés metálico en las plantas al fitoestabilizar las concentraciones de metales pesados en el suelo, evitando la toxicidad en las plantas o la hiperacumulación. También, estos hongos pueden almacenar cationes de metales pesados, al reducir la incorporación de estos en los tejidos vegetales (Rioperde *et al.*, 2021).

Se estima un aporte científico mediado por consorcios fúngico que poseen actividad biorremediadora, entre ellas están las micorrizas arbusculares que puedan ser usadas para absorber Fe y Cr mediante la bioacumulación en pared celular. En este contexto, se ha demostrado que las micorrizas pueden absorber MP, además de retención en el suelo, protegiendo las plantas. Esto se debe a que las hifas de los hongos forman una barrera física para impedir a los MP llegar a las raíces de las plantas, así mismo pueden producir pueden producir sustancias químicas que se unen a los MP y los inmovilizan en el suelo (Alvarado *et al.*, 2011).

Así poder establecer información para futuras investigaciones que, con un fin ambiental, logren producir un consorcio fúngico para reducir la alta contaminación de MP en el Estero Salado y brindar a sus moradores una mejor calidad de agua.



### **1.3. Delimitación**

El enfoque que la investigación tiene es el determinar si la asociación simbiótica existente entre las micorrizas arbusculares y las plantas pteridofitas contribuye a la estabilización de los sedimentos contaminados con MP, tales como Fe y Cr, presentes en el Estero Salado de Guayaquil. Implementando dos plantas pteridofitas con el objetivo de evaluar la actividad de fitorremediación de los HMA en las raíces de estas plantas tienen esta capacidad de acumular metales pesados y vivir en ambiente contaminados.

Se utilizarán técnicas de química analítica para determinar la presencia y concentración de los MP en los sedimentos, así como para evaluar la colonización micorrízica en las raíces de las plantas.

Los resultados de esta investigación contribuirán al conocimiento científico sobre el papel de los HMA en la remediación de sedimentos contaminados con MP. Además, se espera que los hallazgos de este estudio se apliquen en futuros proyectos de remediación ambiental en el Estero Salado y en otros ecosistemas similares.

### **1.4. Pregunta de investigación**

¿Cuál consorcio micorrízico de plantas pteridofitas demuestra mejor acumulación de metales pesados y facilita la extracción de estos del sedimento?

### **1.5. Objetivos generales y específicos**

#### *1.5.1. Objetivo general*

Establecer una bioprospección micorrizas arbusculares en dos especies vegetales pteridofitas, para mitigar la contaminación de Fe y Cr en el sedimento del Estero Salado.

#### *1.5.2. Objetivos específicos*

- Cuantificar el número de esporas y el grado de colonización micorrízica asociada a la rizosfera de plantas pteridofitas, para visualizar la simbiosis.

- Identificar la morfología de las especies de micorrizas arbusculares asociadas a las plantas fitoremediadoras.
- Evaluar la bioacumulación y traslocación de Fe y Cr en la simbiosis micorrízica de plantas pteridofitas, para retener la contaminación de sedimentos del Estero Salado.

### **1.6. Hipótesis**

Las micorrizas arbusculares encontradas en plantas pteridofitas acumuladoras de hierro y cromo en el Estero Salado mejoran la extracción de metales pesados del sedimento.

## Capítulo 2

### Marco teórico

#### 2.1. Biotecnología ambiental

La biotecnología ambiental consiste en implementar sistemas biológicos para renovar la calidad del medio ambiente eliminando agentes contaminantes (Hernández *et al.*, 2020). También se considera a esta rama un conjunto de tecnologías que permiten manejar sistemas biológicos sostenibles para generar un producto o servicio (Blanch, 2010). Las tecnologías de tratamiento convencionales suelen ser más costosas, requerir más mantenimiento, además, suelen generar subproductos tóxicos. Mientras que las tecnologías implementadas en la biotecnología ambiental conllevan una alternativa menos costosa y sistemas fáciles de operar sin producir contaminantes secundarios (Mishra *et al.*, 2018).

#### 2.2. Fitorremediación

La fitorremediación se basa en el uso de plantas y microorganismos para la remoción *in situ* y *ex situ* de contaminantes. Como la planta suele degradar compuestos contaminantes se la emplea para alcanzar más eficacia en la reducción de estos (Cerrón *et al.*, 2018). Para lograr una reducción óptima de los MP se implementan diversos métodos como fitoextracción, fitovolatilización, fitoestabilización y fitofiltración, sin embargo, se debe tener en cuenta la biomasa y la biodisponibilidad de MP en el sitio contaminado pues estos llegan a afectar los resultados de la fitorremediación. Mediante el empleo de enfoques de tipo biológico, físico, químicos, agronómicos y genéticos se busca la correcta eliminación de los MP para evitar lixiviársela lixiviación a aguas subterráneas y causen mayor contaminación a los cuerpos de aguas (Shen *et al.*, 2022).

#### 2.3. Pteridofitas

Las plantas pteridofitas son plantas vasculares que tienen un ciclo de vida dividido en dos fases: esporofitos, en donde se producen esporas y el gametofito, donde se generan los

gametos. El primero es una reproducción asexual, mientras que el segundo es sexual (Ortiz, 2020). Estas plantas crecen en bosques mesófilos de montaña, de pino, de encino, selvas altas perennifolias, matorrales xerófilos, y en vegetación acuática (Sánchez *et al.*, 2008).

#### **2.4. Helecho blanco (*Pityrogramma ebenea*)**

*Pityrogramma ebenea* es una especie de helecho que pertenece al género *Pityrogramma*, a la familia Pteridaceae. Las hojas de esta especie son coriáceas, miden de 10 a 30 cm de largo y son 2-pinnado-pinnatífidas, lo que significa que las pinnas están divididas en pinnulas que, a su vez, se dividen en pinnulillas. Los soros gimnogramoides, que son los esporangios que contienen las esporas, se distribuyen a lo largo de las venas de las hojas. La presencia de farina sobre la superficie de las hojas es una característica distintiva de esta especie. *Pityrogramma ebenea* se reproduce por medio de rizomas y se encuentra en América, desde las Antillas hasta Argentina (Murillo & Murillo, s.f.).

#### **2.5. Taxonomía de *Pityrogramma ebenea***

**Figura 1.** Fotografía de *Pityrogramma*



*Nota.* Fotografía del haz y envés de la hoja de *P. ebenea*  
*Fuente:* Los autores, 2023

**Tabla 1. Descripción taxonómica de *Pityrogramma ebenea***

<b>Reino</b>	<i>Plantae</i>	Planta
<b>Subreino</b>	<i>Tracheobionta</i>	Plantas vasculares
<b>División</b>	<i>Pteridophyta</i>	Helechos
<b>Clase</b>	<i>Filicopsida</i>	
<b>Orden</b>	<i>Polypodiales</i>	
<b>Familia</b>	<i>Pteridaceae</i> E.D.M. Kirchn.	Familia de helechos culantrillo
<b>Género</b>	<i>Pityrogramma</i> Link	Helecho espalda dorada
<b>Especie</b>	<i>Pityrogramma ebenea</i> (L.) Proctor	helecho espalda plateada de montaña

USDA, s.f.

## 2.6. Helecho macho (*Dryopteris filix-mas*)

*Dryopteris filix-mas*, también conocido como helecho macho, es una especie de helecho común en el hemisferio norte templado, nativo de gran parte de Europa, Asia, así como de América del Norte. Es un helecho grande, deciduo con rizomas erectos y robustos que soportan elegantes ramilletes de frondas lanceoladas de color verde opaco. Cada fronda es pinnado-pinnatífida con 20-30 pares de folíolos largos, puntiagudos por hoja. El color de las frondas es verde oscuro y se tornan cobrizas en otoño. *Dryopteris filix-mas* prefiere áreas sombreadas y húmedas en el sotobosque de bosques, pero también lugares sombreados en bordes de setos, rocas o escombros. Es una planta resistente que se adapta para prosperar en suelos húmedos y bien drenados en sombra parcial o completa (Wildflower, s.f.; Missouri Botanical Garden, s.f.).

## 2.7. Taxonomía de *Dryopteris filix-mas*

**Figura 2.** Fotografía de *Dryopteris filix-mas*



*Nota.* Fotografía del haz y envés de la hoja de *D. filix-mas*

*Fuente:* los autores

**Tabla 2.** Descripción taxonómica de *Dryopteris filix-mas*

<b>Reino</b>	<i>Plantae</i>	Plantas
<b>Subreino</b>	<i>Tracheobionta</i>	Plantas vasculares
<b>División</b>	<i>Pteridophyta</i>	Helechos
<b>Clase</b>	<i>Filicopsida</i>	
<b>Orden</b>	<i>Polypodiales</i>	
<b>Familia</b>	<i>Dryopteridaceae</i> Herter	Familia de helechos de madera
<b>Género</b>	<i>Dryopteris</i> Adans.	Helecho carpintero
<b>Especie</b>	<i>Dryopteris filix-mas</i> (L.) Schott	Helecho macho

USDA, *s.f.*

## 2.8. Hierro (Fe)

El Fe conforma el 5% de la corteza terrestre, es el segundo metal de mayor abundancia junto al Al y el cuarto elemento más abundante después del O, Si y Al (The Editors of Encyclopaedia Britannica, 2023). En los últimos años, Fe de valencia cero ha llamado la atención por su prometedora capacidad de eliminación de contaminantes ambientales tanto en aguas residuales como en subterráneas; debido a su alta capacidad reductora y a la producción de óxidos de hierro no tóxicos, para el ambiente, luego de la remoción del contaminante (Sun *et al.*, 2016).

## **2.9. Dinámica de Fe**

El Fe es un nutriente esencial para las plantas, sin embargo, en exceso llega a ser tóxico. La acumulación de Fe provoca la disminución en la absorción de otros nutrientes, en la producción de clorofila y en la tasa de fotosíntesis. De igual manera, provoca que los radicales libres se formen, causando daño en la membrana celular (Esquivel, 2018). La toxicidad de Fe en plantas puede ser causada por presencia excesiva de este metal, suelo con un pH bajo o absorción excesiva de Fe por las raíces de la planta (García, 2008). La dinámica de Fe en suelo-planta juega un papel importante en la nutrición de cultivos, lo que ha permitido aumentar la disponibilidad de este metal en el suelo y, de esta manera, mejorar su absorción, para mantener un equilibrio adecuado entre el Fe presente tanto en el suelo como en la planta, a fin de asegurar una planta saludable (Juárez *et al.*, 2008).

## **2.10. Cromo (Cr)**

El Cr es un elemento presente en la corteza terrestre, se encuentra disperso de manera amplia en depósitos naturales en donde se llega a encontrar también oxígeno, magnesio, aluminio y silicio (Gregersen, 2023). Es de los metales pesados más nocivos, además de contaminante que se encuentra presente en efluentes industriales (Rosas, 2019).

## **2.11. Dinámica de Cr**

El Cr es un metal pesado que, en exceso llega a ser tóxico tanto en plantas, en donde desencadena la disminución en la absorción de otros nutrientes, en la producción de clorofila y en la tasa de fotosíntesis; como en suelo, en donde llega a ocasionar el deterioro en la calidad del agua (Gómez, 2017). Ya que la dinámica del Cr en suelo-plantas juega un papel importante en varias investigaciones, en la actualidad se han desarrollado estrategias para remediar suelos contaminados con el objetivo de mejorar su absorción en plantas (Ramos, 2018).

## 2.12. Fuentes de contaminación

Debido al aumento de la población se ha incrementado la demanda de fuentes de agua, lo que a su vez genera crecimiento en los niveles de contaminación, dado que las actividades antropogénicas como la agricultura, la minería, las descargas de aguas domésticas e industriales, que se acumulan en cuerpos de agua como manglares o estuarios, originan problemas al medio ambiente. Se logra evidenciar una mayor amenaza con respecto a los desechos domésticos, puesto que contiene materia orgánica y microorganismos patógenos capaces de propagarse a través del agua (Forero *et al.*, 2019; Pino *et al.*, 2021).

## 2.13. Bioprospección

Se entiende por bioprospección a la recopilación e identificación de muestras biológicas, en conjunto con el conocimiento indígena, para descubrir nuevos recursos y otorgarles un valor comercial (Hernández *et al.*, 2022). La bioprospección se implementa en diversas industrias como la farmacéutica, biotecnológica, agro insumos, medicina botánica entre otras áreas del conocimiento, lo cual representa un gran aporte a los mercados mundiales de producción (Duarte, 2009). Para nuestra investigación se busca bioprospectar MA que contribuyan a la mitigación de los MP al utilizar tecnología de fitorremediación en sedimentos contaminados como los que se encuentran en el Estero Salado.

## 2.14. Factores de bioconcentración y translocación

Se entiende por factores de bioconcentración (FBC) a la relación que existe entre la concentración de metal pesado encontrado en las raíces o del tejido aéreo de las plantas sobre la concentración en el suelo (Vargas *et al.*, 2017). Los FCB son calculados usando la fórmula propuesta por Shi *et al.* (2010).

$$FCB = \frac{\text{concentración de metal raíces}}{\text{concentración total de metal suelo}}$$



Los factores de translocación (FT) son usados para determinar el índice de movilización relativa de metales encontrados en el suelo hacia las demás partes de la planta. Para realizar el cálculo se utiliza la fórmula propuesta por Singh *et al.* (2010).

$$FT = \frac{\text{concentración de metal en el tejido aereo vegetal}}{\text{concentración de metal raíz}}$$

### 2.15. El Estero Salado

El Estero Salado de Guayaquil en la provincia del Guayas constituye a un brazo de mar cercano a 50 km con diversidad de ramificaciones a lo largo de la ciudad siendo su presencia imperativa en la vida de los locales (Rojas & Rojas, 2019).

**Figura 3.** Mapa del Estero Salado



*Nota. Foto tomada de GoogleMaps*

El ecosistema del estero salado es un manglar que contiene una diversidad de flora y fauna alta con 100 especies de aves, 12 mamíferos, crustáceos, peces, cocodrilos, entre otros por lo que se cataloga como Reserva de Producción Faunística Manglares El Salado, RPFMS este acuerdo solo protege cerca del 77% de la extensión total (Ministerio del Ambiente, s.f.). A pesar de las iniciativas por parte de diversos organismos para mejorar la situación existe un índice alto de contaminación que prevalece por cuestiones antropogénicas hasta el punto de

que logran condiciones anoxidas, así mismo en los sedimentos se encontraron MP (Pernía *et al.*, 2018).

### **2.16. Dinámica de micorrizas con metales pesados**

Las micorrizas arbusculares cuentan con un mecanismo que les permite captar metales pesados específicos hasta cierta concentración, lo que involucra el traspaso de MP a través de la pared celular. El micelio externo de las raíces tiene un efecto predominante en la inmovilización de metales en el suelo estresado debido a su mayor superficie, lo que las hace más eficientes que las raíces de las plantas para absorber metales. Este mecanismo de retención por los hongos micorrízicos disminuye la translocación de MP protege los tejidos foliares de lesiones al retenerlos en las raíces, contribuyendo así a la fitoestabilización (Dhalaria *et al.*, 2020).

### **2.17. Simbiosis de micorrizas con los sedimentos**

Los HMA pueden inducir algunos de los cambios en las plantas huésped para hacer frente a un entorno tan tóxico. Los HMA inducen en menor medida a la tolerancia en las plantas mejorando la absorción de agua y nutrientes minerales, posibilitan el incremento de la biomasa de los brotes, provocando modificaciones en la morfología de las raíces, y aliviando así el estrés oxidativo producido por los metales pesados (Delgado & Gutiérrez, 2022).

La evidencia recopilada por Pietro *et al.* (2024) sugiere que la simbiosis HMA cuenta con efectos en la formación de estructuras del suelo, así como influencia en la producción de glomalina. Así mismo, permite que la actividad fotosintética de las plantas incremente y se reduzcan los niveles de absorción de los MP, lo que se traduce en una mejor salud del suelo.

### **2.18. Impacto ambiental de metales pesados en el ecosistema manglar**

El ecosistema manglar localizado en un brazo del Estero Salado (Anexo 3) se encuentra influenciado por actividades antropológicas que elevan la concentración de Fe y Cr autosustentable. La evidencia establece que la pérdida de diversidad, crecimiento atrofiado en

plantas endémicas que resulta en la pérdida del remanente boscoso en zona de manglar adjunto con el deterioro fisiológico de las ya existentes por los niveles de contaminación que resultan elevados (Zhou *et al.*, 2022).

## Capítulo 3

### Materiales y métodos

#### 3.1. Materiales

Se emplearán diversos equipos y materiales de laboratorio, así como de reactivos necesarios para la eficaz ejecución de los procesos detallados en la parte metodológica de este trabajo. La lista de estos puede ser consultada en el Anexo 1 y 2.

#### 3.2. Metodología de investigación

El tipo de enfoque que adquiere este trabajo es descriptivo y experimental, donde la parte descriptiva se refiere a la documentación de la taxonomía de los MA encontrados en plantas pteridofitas que crecen o sobreviven en el sedimento del Estero Salado de Guayaquil. Por otro lado, la parte experimental se refiere a la evaluación del potencial fitoestabilizador de estas plantas en suelos contaminados con MP.

#### 3.3. Población y muestra

La población de interés a investigar consta de dos especies pteridofitas con población micorrízica desconocida, tomando en cuenta la muestra de alrededor de la rizosfera que serán sometidas a una presión contaminante de sedimento del Estero Salado en la ciudad de Guayaquil. Se tomaron en cuenta estas especies pteridofitas debido a sus propiedades hiperacumuladoras y a su abundancia, desarrollo en ambientes contaminados y en suelos con pocos nutrientes.

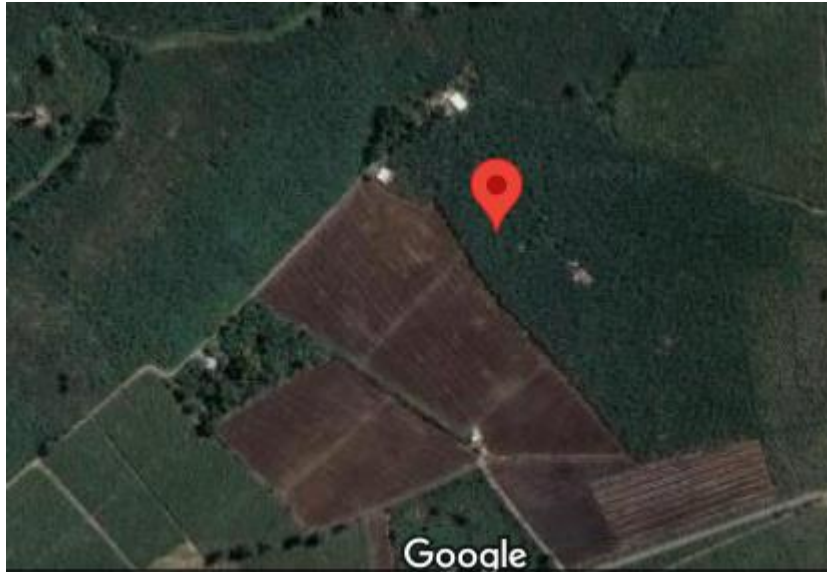
Se tomó dos ejemplares de las pteridofitas de manera aleatoria, siendo estas *Pityrogramma ebenea* (PEB) y *Dryopteris filix-mas* (DFM), obtenidas de una plantación bananera.

#### 3.4. Material biológico

La recolección de las pteridofitas para la comprobación de plantas hiperacumuladoras de Fe y Cr se dio en la localización de 2°08'01.1"S 79°29'01.9"W en el cantón Milagro

provincia del Guayas. Las muestras fueron tomadas en la Finca Orgánica San José, con ayuda del propietario el señor Segundo Naranjo.

**Imagen 4.** *Recolección de plantas Pteridofitas*



*Nota. Finca Orgánica San José*

### **3.5. Diseño de experimento**

Para el desarrollo de esta investigación se usó dos tipos de helechos, macho y blanco, lo que fue una base para un diseño bifactorial. Las plantas fueron sembradas en fundas de vivero de un tamaño 10x12 cm, donde se colocó tres ejemplares por cada funda. De esta manera se colocaron 30 muestras por cada especie de pteridofitas, es decir 60 especímenes en total, es importante recalcar que se separaron del pan de tierra de su lugar de origen.

Para la preparación de sustrato usado en la bioprospección de micorrizas se definió mezclas de suelo con diferentes concentraciones de sedimento del Estero Salado, organizado de la siguiente manera sedimento al 25 (T1), 50 (T2), 100% (T3) y turba al 100% como control positivo (T4); finalmente se aforó el resto de sustrato con turba y arena en proporción 1:1. Para cada tratamiento se realizó tres réplicas especificadas con anterioridad, se especifica cuatro fundas para sedimentos más el control por cada especie de helechos.

Con respecto a la inoculación de MP en los diferentes niveles de concentración de sedimento, esta se realizó empleando dos soluciones, una de Fe y otra de Cr, ambas a concentraciones de 500 y 80 ppm respectivamente. Los 60 ejemplares fueron divididos en 4 grupos con 15 plantas cada uno. Después de la siembra de las plantas se llevó a cabo la inoculación con las soluciones metálicas.

Mediante el montaje de una zona cubierta, cuya finalidad era la de evitar la radiación solar de manera directa, mantener niveles de humedad constantes y evitar algún tipo de contaminación cruzada, se dieron las adecuaciones para mantener el control de las condiciones. El experimento se llevó a cabo en el lapso de un mes, en donde se estipuló el riego a capacidad de campo diario en un horario entre las 6h00 y 18h00.

### 3.6. Modelo estadístico

$$v_{ij} = \mu + \tau_i + \beta_j + (\tau\beta)_{ij} + E_{ijk}$$

Donde:

$i = 1,2,3,4,5$  (número de tratamientos con sedimentos)

$j = 1,2$  (plantas por bloque)

$k = 1,2,3$  (replicas)

**Tabla 3. Diseño bifactorial para pteridofitas evaluadas para Fe y Cr**

Elemento	Tratamientos	Concentración del sedimento (%)	DFM (ppm)	PEB (ppm)
Fe	T0	Control	500	500
	T1	25		
	T2	50		
	T3	100		
	T4	100 (turba)		
Cr	T0	Control	80	80
	T1	25		
	T2	50		
	T3	100		
	T4	100 (turba)		

DFM: *Dryopteris filix-mas*; PEB: *Pityrogramma ebenea*

### **3.7. Variables**

Las variables consideradas en este estudio comprenden tanto atributos cualitativos como cuantitativos, obtenidos mediante la observación directa y la medición con diferentes instrumentos. La inclusión de este conjunto de variables de diversa naturaleza busca permitir una mejor comprensión y caracterización de la relación existente entre las plantas evaluadas y las condiciones ambientales de su entorno.

#### *3.7.1. Variables cuantitativas*

- **Porcentaje de tasa de supervivencia**

Durante el experimento, se realizó un monitoreo y recolecta de datos de forma diaria tanto del estado como de la supervivencia de las plantas de los grupos control, así como de los experimentales expuestos a metales pesados. En particular, se registró información sobre la cantidad de individuos que presentaban marchitez, necrosis o muerte en cada grupo. Además de la cantidad, se llevó cuenta del día exacto post-inoculación en el que ocurrían estas fatalidades.

La recolecta rigurosa de estos datos temporales de toxicidad tiene como objetivo principal comparar el efecto causado entre los grupos. Es decir, determinar si existen diferencias estadísticas significativas en cuanto al número de fatalidades y días de supervivencia entre los helechos no expuestos a metales pesados (control) y los que sí recibieron la inoculación con hierro y cromo (grupos experimentales).

De esta manera se buscaba correlacionar, de manera indirecta, que a mayor cantidad de metal absorbido por las raíces y transportado a tallos-hojas, mayor era el impacto tóxico sobre los tejidos, acelerando la muerte de las plantas.

- **Porcentaje de micorrización inicial**

Para evaluar la presencia de micorrizas, se realizó la observación microscópica de raíces provenientes de las plantas de helechos seleccionadas como grupo control y grupo

experimental, tanto antes como después de iniciado el ensayo. Se estableció como "día 0" el momento previo a la inoculación con los tratamientos, donde se hizo un conteo inicial de las estructuras micorrízicas presentes. Para esto, se tomaron al azar submuestras de 20 g de raíz fina de 3 plantas por cada una de las especies de pteridofitas bajo estudio.

- **Porcentaje de micorrización final**

Transcurrido un mes (30 días) desde la inoculación inicial de las soluciones metálicas, se realizó una segunda observación microscópica de las raíces de los helechos (machos y blancos), tanto del grupo control como de los grupos experimentales expuestos a Fe y Cr. Este nuevo tiempo de análisis buscaba evidenciar si ha ocurrido algún cambio o efecto provocado por la exposición prolongada a dichos metales pesados.

Para potenciar la presión tóxica de los metales pesados sobre las raíces en este segundo periodo, a los grupos experimentales se les adicionó una dosis extra de 500 ppm de Fe y 80 ppm de Cr, concentraciones establecidas según estudios previos.

- **Número de esporas encontradas en el suelo inicial**

En los hoyos dejados en el suelo luego de la extracción de las plantas, se seleccionaron al azar 12 puntos de muestreo. Con ayuda de una pala pequeña en forma de "V", para minimizar alteración del estrato, se procedió a excavar allí hasta los 30 cm de profundidad. De esa capa de suelo asociada a cada especie se extrajo una porción de 500 g, con la finalidad de completar alrededor de 12 kg recolectados por especie. Además, se contabilizó, por observación directa, la cantidad de esporas presentes en cada submuestra de suelo en el campo. Se registró esta información en las fundas respectivas. Como "día 0" de los análisis se estableció la fecha de recolección y conteo inicial de esporas en cada submuestra.



- **Número de esporas encontradas en el suelo final**

Luego de culminados los 30 días del ensayo con las plántulas de helechos bajo sus respectivas condiciones control y con la adición de metales pesados, se realizó un último conteo del número de esporas presentes en las muestras de suelo asociado. El procedimiento consistió en tomar submuestras representativas de 100 g de suelo rizosférico de cada unidad experimental. Estas submuestras fueron sometidas a un proceso de centrifugación en gradiente de sacarosa para concentrar los propágulos. Posterior a esto, el pellet obtenido fue resuspendido y una alícuota conocida fue dispensada en una caja Petri seccionada para su observación. Se contabilizaron todas las esporas observadas en 8 campos ópticos por preparación.

Los datos finales de abundancia esporas por g de suelo seco fueron registrados y analizados estadísticamente para determinar posibles diferencias significativas entre los grupos control y con metales pesados al final del ensayo.

- **Cuantificación de metales pesados en estudio (Fe y Cr)**

Se realizó un análisis inicial y uno final del número aproximado de estructuras micorrícicas (hifas, arbuscúlos y vesículas) y de esporas presentes de forma natural en las raíces de las pteridofitas estudiadas, tanto en los grupos control como en los inoculados con los metales pesados hierro (Fe) y cromo (Cr). Para así comparar estos análisis pre y post inoculación evidenciando si existían diferencias en la colonización micorrícica radical entre grupos luego del periodo experimental. De esta forma, establecer la posible influencia de la absorción de los metales pesados sobre la abundancia de propágulos fúngicos al finalizar ensayo.

- **Concentración de metales en el sedimento**

La concentración total de metales pesados en las muestras de sedimento fue determinada mediante técnicas analíticas como Espectrometría de Masas (ICP-OES). Estas

concentraciones fueron expresadas en % de metal pesado en la muestra. Los resultados permitieron categorizar las muestras en dos niveles cualitativos de concentración (baja y alta), con relación a las muestras iniciales tomadas en campo. Con el fin de evaluar el efecto de la contaminación del sedimento sobre las especies vegetales, se establecieron cuatro tratamientos consistiendo en la mezcla del sedimento con un sustrato inerte (turba).

### 3.7.2. Variables cualitativas

- **Tipo de pteridofita**

Las plantas de prueba seleccionadas para el estudio correspondían a plantas jóvenes de helechos presentes en un radio cercano a plantaciones bananeras de la zona. Los ejemplares escogidos presentaban una altura promedio entre 30 y 40 cm.

La colecta de los especímenes se realizó extrayendo, en su totalidad, las plantas junto con su cepellón de suelo circundante utilizando herramientas de excavación. Esto con el fin de evitar dañar su parte subterránea. Una vez extraídos, los ejemplares de cada punto de muestreo fueron depositados con su suelo asociado en bolsas de polietileno transparentes con dimensiones de 58x71 cm, las cuales permiten su manipulación y observación directa.

Después de ello, los grupos de plantas fueron expuestos, bajo condiciones controladas, a tratamientos que consistían en diferentes concentraciones de sedimento contaminado con metales pesados de origen industrial. A partir de este momento se efectuó un monitoreo visual diario para evaluar y comparar la respuesta sintomatología, así como de sensibilidad que presentaban ambas especies de helechos ante la exposición a las variables de estudio: tipo de sedimento y niveles de contaminación con metales.

- **Colecta del sedimento del Estero Salado**

La muestra de sedimento fue recolectada en tres puntos escogidos al azar a lo largo de un brazo del Estero Salado de Guayaquil. La selección aleatoria de estos sitios de muestreo buscaba garantizar la representatividad del sedimento en ese sector del estuario. En cada uno

de los tres puntos demarcados se extrajeron, mediante palas de mano, 20 kg de sedimento a una distancia aproximada de 3 m desde la orilla. La profundidad de recolección en ese radio de 3 m varió entre los 20 cm y 1 m, buscando sedimentos más profundos no expuestos. Durante la extracción se tuvo especial cuidado en evitar la contaminación de la muestra con especies vegetales (macrófitas, raíces, semillas) y otros residuos orgánicos presentes en los estratos más superficiales.

De esta forma, con los 20 kg obtenidos en cada punto de muestreo, se completó un total de 60 kg de sedimento recolectado. Este material se transportó y almacenó en tres baldes plásticos con capacidad para 20 l cada uno, los cuales fueron rotulados con los datos de fecha, sitio, coordenadas, entre otros, para su correcta trazabilidad. Las coordenadas de la zona exacta de recolección se listan a continuación: -2,197065, -79,944675; -2,195990, -79,945049; -2,194819, -79,945393.

- **Análisis de los factores de bioconcentración y traslocación en plantas pteridofitas para Fe y Cr**

El factor de bioconcentración (FBC) es un parámetro importante que indica la eficiencia de una especie vegetal para absorber un contaminante desde el sustrato y acumularlo en sus tejidos en relación con la concentración en el medio. Se calcula mediante el cociente entre la concentración del contaminante en la raíz y su nivel en el suelo.

De forma similar, el factor de traslocación (FT) denota la efectividad de la planta para movilizar dicho contaminante desde el sistema radical hasta los tallos y hojas. Su cálculo se realiza mediante la razón entre la concentración en parte aérea y raíz. Valores de FBC por encima de 1 y FT inferiores a 1 indican un buen potencial fitoestabilizador de la especie analizada para absorber, retener y traslocar el contaminante desde el medio de cultivo hasta su parte aérea (Orozco-Corona *et al.*, 2022).

- **Diversidad de la comunidad micorrízica en plantas pteridofitas**

Mediante el uso de manuales, tales como: Manual para la Identificación de Hongos Micorrízicos Arbusculares (Méndez *et al.*, 2012), en conjunto con Micorrizas arbusculares de la Amazonia colombiana (Peña *et al.*, 2006) se realizó el análisis morfológico de los atributos como la forma, el tamaño, rango de diámetro, color de la espora, número de paredes visible, estructura y conexión hifal.

### **3.8. Lavado de raíces**

Las raíces seleccionadas fueron almacenadas en viales ámbar para, posterior, sumergirlas hasta la mitad con hidróxido de potasio (KOH) durante 6 días. Después se les realizó un lavado con peróxido de hidrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) cada 10 min, con la finalidad que cambien de color a uno más claro. Una vez logrado el cambio, fueron sumergidas en ácido clorhídrico (HCl) durante 5 min. Pasado el tiempo, fueron sacadas del envase, enjuagadas con agua y depositadas en un nuevo envase con azul de tripán durante 24 horas con la finalidad de lograr una buena observación (Gerdemann y Nicolson, 1963).

### **3.9. Montaje de raíces**

Pasadas las 24 horas estipuladas, las raíces de los helechos (tanto machos como blancos) fueron extraídas de los frascos que contenían las muestras y depositadas sobre cajas Petri, para tener un mejor manejo visual. Una vez trasladadas, las raíces fueron separadas unas de otras con la ayuda de agujas estériles de disección, facilitando así la selección posterior.

Tras la separación, se seleccionaron al azar 10 raicillas de cada grupo de helechos (machos y blancos). Cada segmento fue colocado sobre placas portaobjetos de vidrio para microscopio, y luego cubiertas con el cubreobjetos correspondiente. Las raíces no seleccionadas para esta parte del procedimiento se desecharon en bolsas rotuladas de residuos biológicos peligrosos, por la conocida toxicidad que puede provocar el azul de tripán.

El procedimiento de selección, montaje sobre portaobjetos y cubrimiento para cada muestra se realizó por triplicado, para contar con suficientes especímenes para la observación microscópica posterior.

### **3.10. Colonización micorrízica de plantas pteridofitas**

En el microscopio se observan las raicillas teñidas y separadas para determinar características morfológicas de las especies encontradas. Los resultados se obtuvieron usando la fórmula propuesta por McGonigle *et al.* (1990).

$$\% \text{ de micorrizas total} = \frac{N \text{ campos infectados (hifas, vesículas, arbuscúlos)}}{\text{Total de campos observados}} \times 100$$

### **3.11. Tamizaje húmedo para cuantificar esporas de MA**

En una balanza de precisión se pesaron 300 g de la muestra de suelo, divididas en 3 jarras medidoras, correspondiente a cada especie. Una vez colocada en las jarras, estas fueron aforadas con agua para pasar a ser revueltas, de manera constante, con una cucharilla durante 15 min. Para evitar residuos grandes, tales como piedras y ramitas, la muestra pasó primero por un colador. De igual manera, fueron pasadas a través de los coladores de 75 y 60  $\mu\text{m}$  para separar las esporas, al quedar atrapadas en los mismos. Con ayuda de agua y una piseta, las esporas pudieron ser recogidas en tubos Falcón rotulados, del 1 al 18, de antemano.

Los tubos Flacón fueron llevados a la centrifuga, donde se llevó a cabo el proceso en dos rondas. La primera ronda se ejecutó durante 5 min a 3000 rpm, una vez pasado ese tiempo se recolectó el sobrenadante en tubos Falcón nuevos y se añadió la solución de sacarosa + tween 80 al sedimento que quedó. Los tubos fueron devueltos a la centrifuga para iniciar la siguiente ronda, la cual fue llevada a cabo durante 3 min a 3000 rpm. Al terminar, el sobrenadante fue recolectado de nuevo en tubos Falcón y llevado a la refrigeradora a 10 °C (Furlan *et al.*, 1980a).

El sobrenadante aislado se vertió en una caja Petri, dividida en 8 secciones iguales, y fue llevado al estereoscopio para realizar el conteo (Furlan *et al.*, 1980b). Este proceso se realiza

por cada tubo Flacón obtenido. Al finalizar, se toma lo estipulado por Sieverding (1983) para determinar la densidad de esporas; en donde si se encuentran de 1-10 esporas se considera una densidad baja, caso contrario se considera una densidad alta a más de 10 esporas por gramo de suelo.

### **3.12. Aislamiento de esporas para análisis taxonómico**

Las esporas identificadas en el conteo fueron seleccionadas y depositadas en una placa portaobjetos. Fueron llevadas al microscopio donde son aplastadas, de manera leve, con ayuda de una aguja para ser colocadas en la estufa a una temperatura de 65 °C durante 12-24 horas con la finalidad de eliminar residuos y burbujas de aire. Se procedió a cubrir las esporas con una placa cubreobjetos, selladas con esmalte transparente, por último, ser etiquetadas con el nombre de la especie, así como quien y cuando se realizó el montaje para proceder a realizar la identificación taxonómica (Soto *et al.*, 2022).

### **3.13. Identificación taxonómica de esporas**

A través del microscopio, se realizó la identificación taxonómica; durante este proceso se observó características morfológicas tales como la forma, composición, ornamentación, estructura, paredes, presencia de hifas, tipos de hifas conectoras, escudos, gránulos y el diámetro (Reina *et al.*, 2023).

La metodología presentada en el siguiente apartado para la determinación taxonómica establecido por el “Manual para la Identificación de Hongos Micorrízicos Arbusculares”, realizado por M.C. Heriberto Méndez *et al.*, y emitido por el Centro de Investigación y de Estudio Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

$$\% \text{ de micorrizas total} = \frac{N \text{ campos infectados (hifas, vesículas, arbusculos)}}{\text{Total de campos observados}} \times 100$$

En adición se realizaron consultas en páginas electrónicas oficiales tales como: The international collection of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi, perteneciente a la

Universidad de Kansas y Arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota), Endogone, and Complexipes species deposited in the Laboratory of Plant Protection, West Pomeranian University of Technology, Szczecin, Poland de Janusz Błaszowski.

### **3.14. Digestión ácida de la muestra**

La muestra de suelo seca fue triturada con la ayuda de un mortero eléctrico hasta obtener un polvo fino homogéneo, el cual fue pesado en una balanza analítica de precisión para obtener porciones exactas. Dichas porciones fueron depositadas luego en viales de teflón, agregando a cada uno 10 ml de ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) como agente digestor de la matriz orgánica. Los viales cerrados se dejaron en reposo durante 20 min para permitir la reacción ácida inicial y evaporación de gases formados.

Transcurrido ese tiempo, los viales se colocaron en el rotor calefaccionado de un digestor microondas para realizar la digestión durante 30 min a presión y temperatura controlada. Una vez finalizado el programa de digestión y enfriados los viales, se destaparon con cuidado para permitir evaporar cualquier residuo gaseoso.

El contenido digerido y filtrado fue recolectado en matraces Kitasato, enrazando hasta 500 ml con  $\text{HNO}_3$  al 2% para tener la disolución lista para su posterior análisis mediante Espectroscopía de Emisión Atómica con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-OES). Este procedimiento se llevó a cabo según lo estipulado en el método EPA 3051.

Se evalúa la concentración de MP en las distintas partes de las plantas (suelo, raíz y hojas) con respecto a la concentración inicial en el suelo.

## Capítulo 4

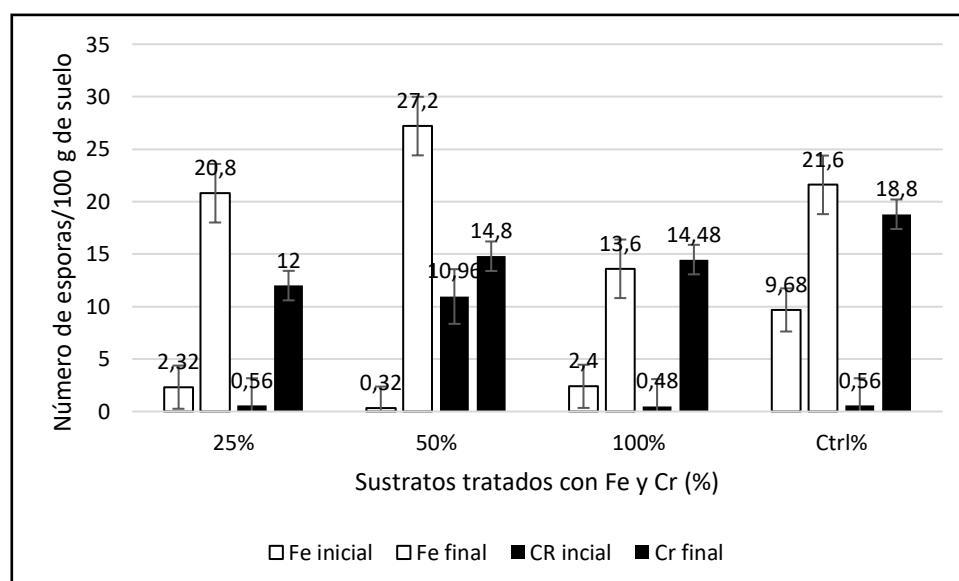
### Resultados y discusiones

#### 4.1. Resultados

Los resultados conforme a la cuantificación de número de esporas en la planta *D. filix-mas* se evidenció que existe una cantidad de 27,2 esporas por 100 gramos de suelo (Figura 4), para el tratamiento de Fe al 50% respecto al control que tuvo 21,6 esporas por 100 gramos de suelo para este elemento. Por otra parte, para el Cr se obtuvo 14,8 esporas por 100 gramos de suelo en el tratamiento de 50% respecto al tratamiento control que obtuvo 18,8 esporas por 100 gramos de suelo en la evaluación final. Estos resultados nos indican que la influencia del Fe fue importante para la producción de esporas.

Estos resultados difieren de los obtenidos por Gunwal *et al.* (2014) puesto que en su estudio lograron obtener mayor cantidad de esporas. Esta diferencia puede deberse a que en la presente investigación se usaron plántulas, caso contrario con el estudio antes mencionado.

**Figura 4.** Cuantificación de esporas en *Dryopteris filix-mas*

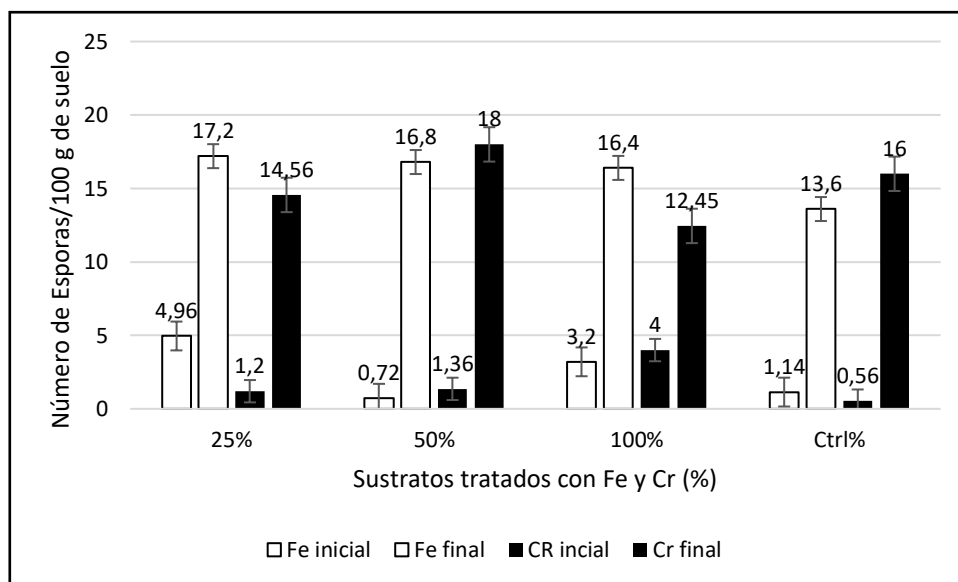


La cuantificación de número de esporas en la planta *P. ebanea* se evidencio que existe una cantidad de 17,2 esporas por 100 gramos de suelo (Figura 5), para el tratamiento de Fe al 25% respecto al control que tuvo 13,6 esporas por 100 gramos de suelo para este elemento. Al



contrario, el Cr obtuvo 18 en el tratamiento de 50% respecto al tratamiento control que obtuvo 16 esporas por 100 gramos de suelo en la evaluación final. Estos resultados nos indican que el Cr influyo en la producción de esporas. A pesar de estos resultados estudios relacionados a la producción de esporas en plantas pteridofitas indican una producción de entre un 5- 85% (Gunwal *et al*, 2014), algunos artículos sugieren que la presencia de MP son importantes para la colonización micorrizica y la producción de esporas.

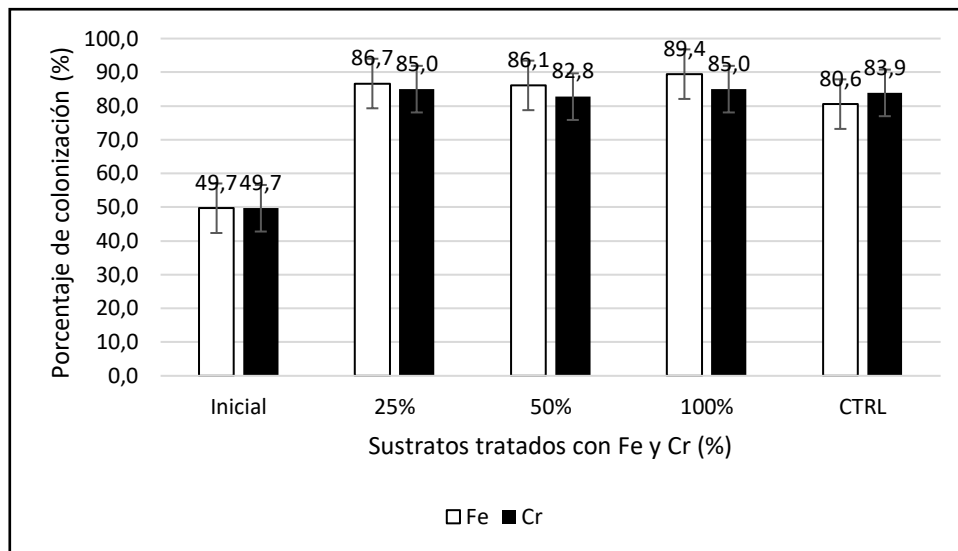
**Figura 5.** Cuantificación de esporas en *Pityrogramma ebanea*



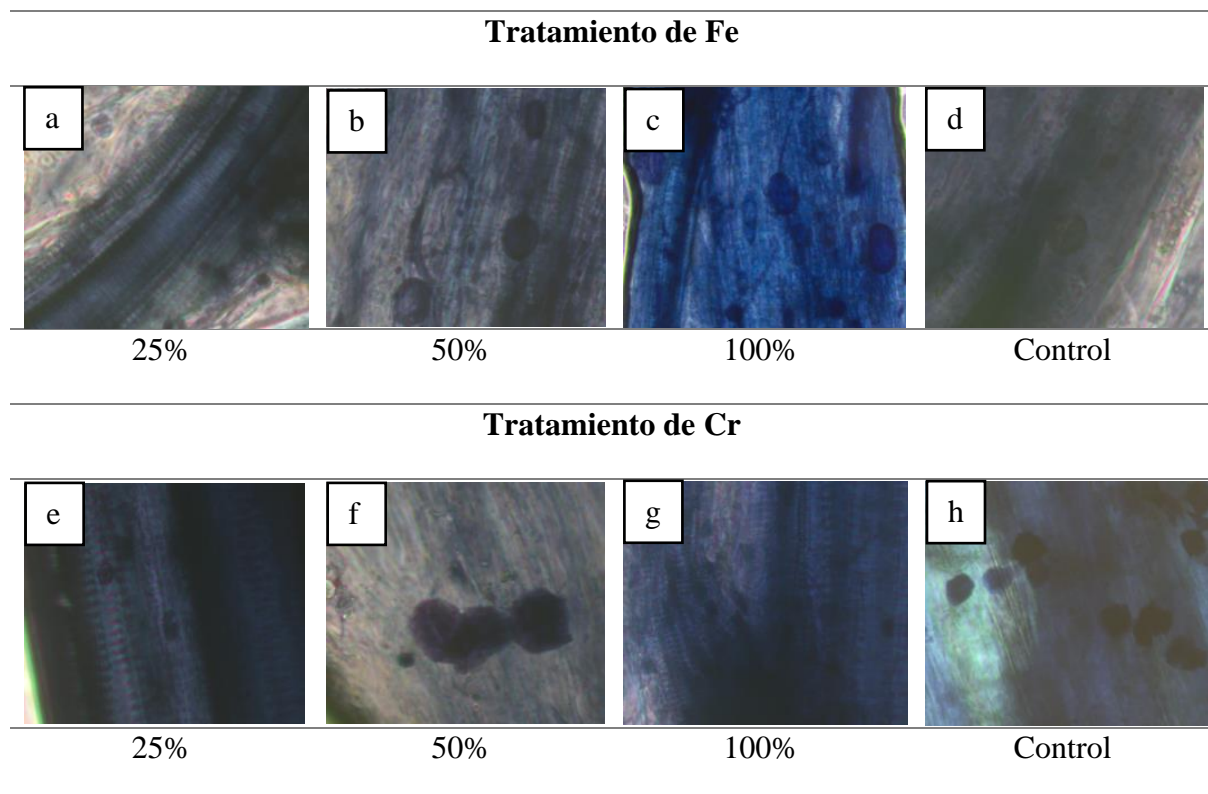
El grado de colonización micorrizica para la planta *D. filix-mas* fue superior al 80% para ambos MP respecto al inicial que fue de 49,69% como se observa en la Figura 6. Cabe recalcar que en estudios anteriores se ha demostrado que otras especies también han aumentado su población debido a la presencia de MP (Alvarado *et al.*, 2011).

El experimento dio resultados del estrés que catalogó una retroalimentación negativa a la concentración de metales pesados, Fe y Cr, donde las micorrizas absorbaron sustancias contaminantes para sobrevivir, la densidad poblacional aumentó más de un 50%, hasta que todos los estudios presentaron tendencias altas de densidad, un crecimiento poblacional como respuesta al estrés.

**Figura 6.** Colonización micorrízica de la planta *Dryopteris filix-mas*



**Tabla 4.** Tratamientos de Fe y Cr colonizados en la planta *Dryopteris filix-mas*

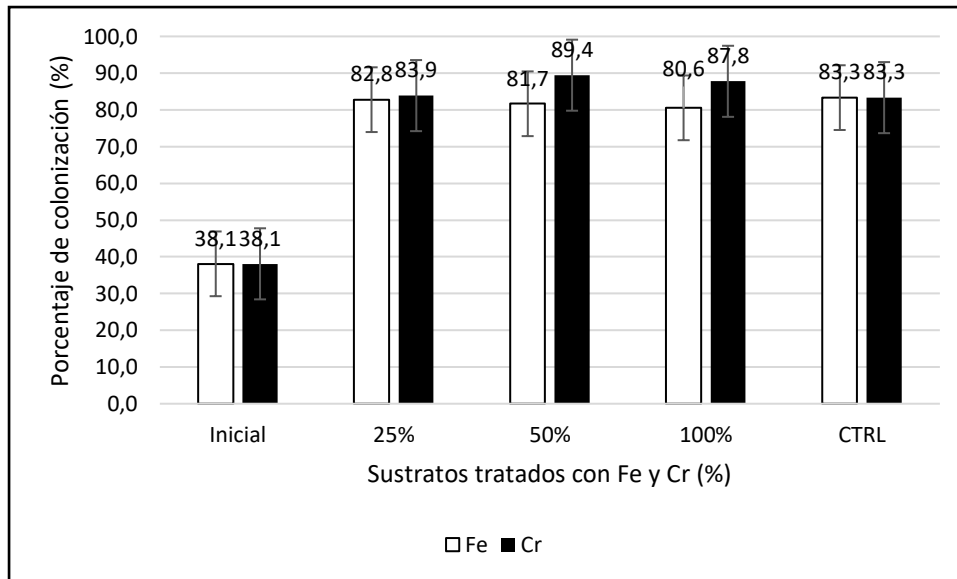


*Nota.* Vesículas (b-c-d-e-f-g-h), Arbusculos (a-d-e-g), Hifas (b-c)

De la misma forma el grado de colonización micorrízica observado para *P. ebanea* fue superior al 80,6% con relación al conteo inicial que fue de 38,09% de forma similar se ha encontrado resultados en investigaciones recientes superiores al 80% utilizando sustrato

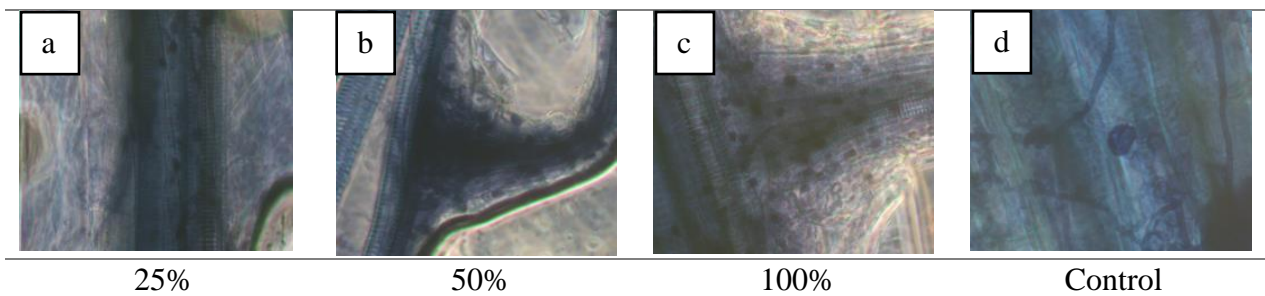
contaminado por MP (Ouyang *et al.*, 2023), lo que demuestra una respuesta significativa a la estimulación y fitoestabilización en la simbiosis micorrízica.

**Figura 7.** Colonización micorrízica de la planta *Pityrogramma ebenea*

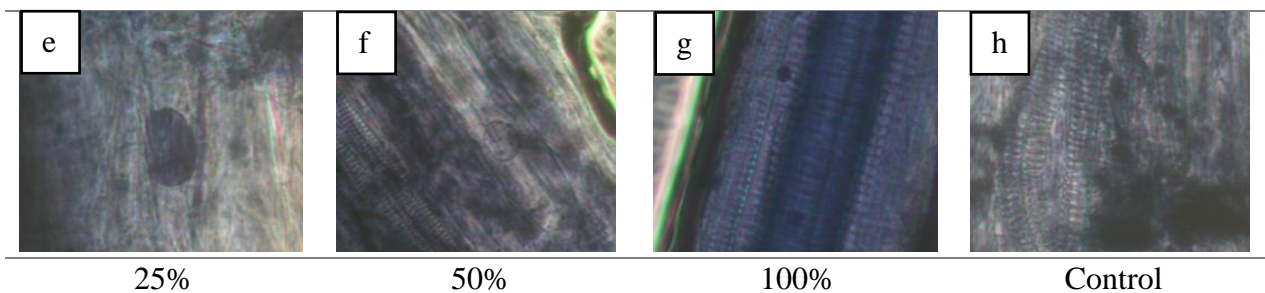


**Tabla 5.** Tratamientos de Fe y Cr colonizados en la planta *Pityrogramma ebenea*

**Tratamiento de Fe**



**Tratamiento de Cr**



*Nota.* Vesículas (b-c-d-e-f-g-h), Arbusulos (a-b-h), Hifas (b-c-d-e)

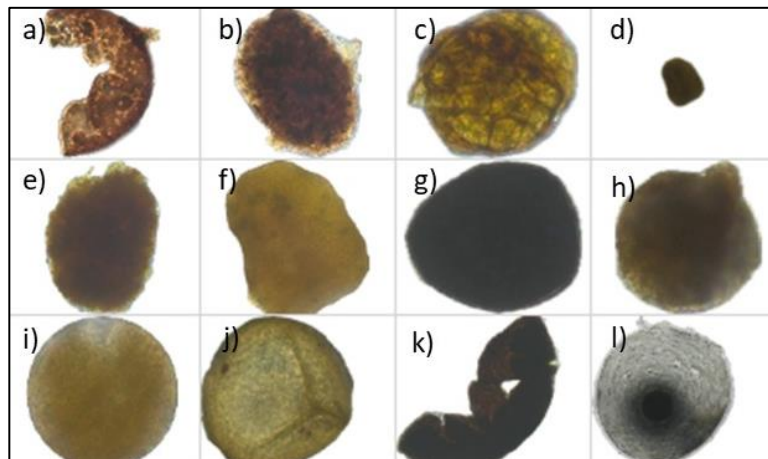
Además de la cuantificación de esporas, se evidenció un crecimiento en el número de hifas, vesículas, arbusculos en los dos tipos de pteridofitas. El helecho macho aumento en cerca

de un 80-86% en esos parámetros, en cambio en el helecho blanco fue cerca un 80-83%. Si bien los porcentajes son similares se acota que la simbiosis realizada en el ecosistema del helecho macho fue mejor que en la otra pteridofita, de tal manera que el porcentaje de micorrización aumento en un 30% a comparación de condiciones iniciales.

La adaptabilidad de las micorrizas en suelos contaminados delimita un nuevo paradigma hacia su interacción con la rizosfera planta adjunto con las condiciones edafológicas. Por lo tanto, la fitorremediación medida por los hongos micorrízicos en sedimento de manglar mediante la acumulación de metales pesados en sus paredes celulares y la interacción rizosfera-pteridofitas como organismo hiper acumulador de Fe y Cr evidencia una retroalimentación negativa hacia la perturbación bajo condiciones controladas, así como lo realizó Wężowicz K *et al.* (2015) en sedimentos de manglar chinos para evidenciar la colonización de los hongos además de la disminución de la concentración de diversos metales. Se identificó para la especie de *D. filix-mas* 8 géneros siendo estos los siguientes: *Acaulospora sp.*, *Pacispora sp.*, *Scutellospora sp.*, *Diversispora sp.*, *Ambispora sp.*, *Sclerocyttis sp.*, *Entrophospora sp.*, *Giastpora sp.*

Resultados similares se han encontrado en especies pteridofitas en Brasil identificando así las especies del género Acaulosporaceae, Glomeraceae, Diversisporaceae, Archaeosporaceae, Claroideoglomeraceae, Gigasporaceae, Ambisporaceae, Paraglomeraceae, Sacculosporaceae, Entrophospora (Melo *et al.*, 2020).

**Figura 8.** Géneros de los hongos micorrizicos arbusculares en *Dryopteris filix-mas*

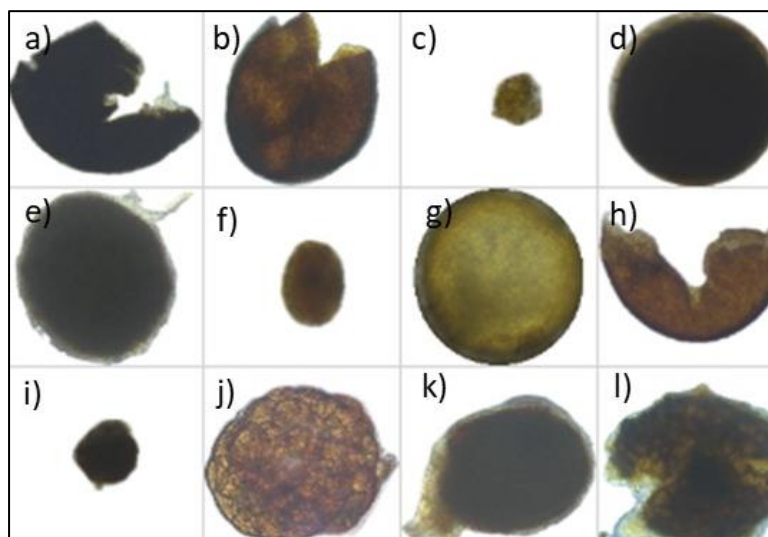


*Nota.* *Acaulospora* sp. (a-g-k), *Pacispora* sp. (b), *Scutellospora* sp. (c-j-l), *Diversispora* sp. (d), *Ambispora* sp. (e), *Sclerocyttis* sp. (f), *Entrophospora* sp. (h), *Gigaspora* sp. (i)

Así mismo se identificó para la especie *P. ebanea* 8 géneros siendo estos los siguientes:

*Acaulospora* sp., *Funneliformis* sp., *Glomus* sp., *Racocetra* sp., *Gigaspora* sp., *Pacispora* sp., *Entrophospora* sp., *Ambispora* sp.

**Figura 9.** Géneros de los hongos micorrizicos arbusculares en *Pityrogramma ebanea*



*Nota.* *Acaulospora* sp. (a-h), *Funneliformis* sp. (b), *Glomus* sp. (c-f-i), *Racocetra* sp. (d-e), *Gigaspora* sp. (g), *Pacispora* sp. (j), *Entrophospora* sp. (k), *Ambispora* sp. (l)

La biodiversidad de micorrizas es inmensa siendo Latinoamérica un punto caliente dentro su diversidad ecológica donde la familia más común registrada es *Glomeraceae* (Stürmer *et al.*, 2018). En este estudio se hallaron microorganismos simbiosntes clasificados por su morfología asociada a las plantas fitoremediadores se evidencian en la Figura 8. Es

imperativo resaltar que los taxones encontrados son específicos a la planta usada, pteridofitas, condiciones edafológicas, temperatura, entre otras condiciones, así como lo menciona Albornoz *et al.*, (2020).

En cada ecosistema resaltan organismos comunes, sin embargo, los hallazgos demostraron que se presentan una diversidad de especies de micorrizas en el sedimento (Figura 4), si bien se caracterizan por ser cosmopolitas comparado con lo hallado por Stürmer *et al.* (2018) comprueban que la familia con mayor proporción es *Glomeraceae* su adaptabilidad hacia condiciones anegadas proporcionan una valoración hacia el campo de la fitorremediación lo confirma (Gío *et al.*, 2022) que los HMA Cosmopolitan son inóculos capaces de adaptarse de manera fácil a condiciones adversas con una alta tasa de reproducción adjunto de una sobrevivencia alta.

La riqueza de micorrizas arbusculares en sedimentos del manglar estero salado significan una oportunidad de estudio en sus mecanismos de interacción, a pesar de que Ecuador sea un país megadiverso consta con limitada investigación en la identificación morfológica de estos hongos (Cofré *et al.*, 2019).

Los resultados obtenidos de la cuantificación de Fe y Cr mediante la técnica ICP-OES en las plantas pteridofitas se encontró niveles de inferiores a 1,812% de Fe en la muestra de suelo T0 (control inicial) respecto al tratamiento 2 (50% de sedimento) que obtuvo 0,996% de Fe, lo que quiere decir el Fe fue removido en un 0,816% en la planta *D. filix-mas*, de igual manera se observó este mismo comportamiento en presencia del Cr.

En la muestra radicular hubo una mayor presencia de Fe en todos los tratamientos destacando el T1 donde se denota un valor de 4,151% de Fe frente a 0,794% de la muestra inicial de raíces debido a la bioacumulación. Por otra parte, en las muestras foliares hubo mayor concentración del metal con relación a la muestra inicial sin embargo cabe mencionar que hubo mayor fitoestabilización en el T2 comparado con el inicial es de 0,958% y después del

tratamiento 2 fue de 0,117% si bien no es un valor de medida destaca como el menor valor pudiendo indicar mayor fitoestabilización.

Usando Cr en la misma especie la planta *D. filix-mas* mostró una disminución con un valor de 0,003% de Cr en el suelo al comparar el T0 (control inicial) con el tratamiento 2 (50% de sedimento) que tenía 0,008% de Cr. Este comportamiento fue parecido al que se dio con el Fe. En la raíz, el Cr se acumuló más en todos los tratamientos, destacando el T2 con 0,007% de Cr en comparación con 0,002% de la raíz inicial. En la hoja, el metal disminuyó su concentración respecto a la inicial, donde se redujo de 0,002% a 0,001%, lo que puede sugerir una mayor habilidad de fijar el metal.

El Fe y el Cr en el suelo T0 (control inicial) se contrastaron con el tratamiento 2 (50% de sedimento) que registró 1,817% de Fe y 0,009% de Cr, lo que implica que ambos metales se aumentaron respectivamente en la planta *P. ebenea*. En la muestra de raíz, el Fe y el Cr fueron más frecuentes en todos los tratamientos, sobresaliendo el T1 con 1,090% de Fe y 0,009% de Cr frente a 0,536% de Fe y 0,002% de Cr de la muestra inicial de raíz debido a la bioacumulación. En las muestras de hoja, el metal presentó una mayor concentración que la muestra inicial, pero se evidenció una mayor fitoestabilización en el T2.

**Tabla 6. Diversidad de la comunidad micorrizica en plantas pteridofitas**

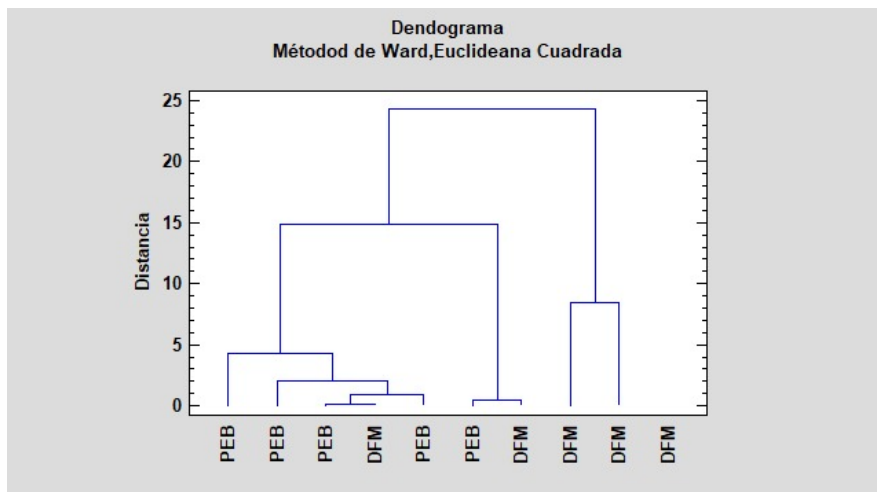
Especies	Tratamientos	Metales	Suelo (%)	Raíz (%)	Hoja (%)	FBC	FT
<i>Dryopteris filix-mas</i>	T0	Fe	1,812	0,794	0,215	0,438	0,958
	T1		1,402	4,151	0,571	2,960*	0,121
	T2		0,996	1,523	0,248	1,529	0,117*
	T3		1,304	1,673	0,433	1,283	0,186
	T4		1,462	1,293	0,244	0,884	0,169
	T0	Cr	0,008	0,002	0,002	0,300	0,270
	T1		0,006	0,006	0,001	0,970	0,237
	T2		0,003	0,007	0,001	2,846*	0,148*
	T3		0,004	0,004	0,002	0,935	0,474
	T4		0,005	0,008	0,001	1,598	0,154
<i>Pityrogramma ebenea</i>	T0	Fe	0,536	0,536	0,035	0,287	0,149
	T1		1,090	1,090	0,222	0,731	0,154
	T2		1,817	1,817	0,151	1,690*	0,071*
	T3		1,335	1,335	0,121	0,938	0,078
	T4		1,256	1,256	0,069	0,847	0,040
	T0	Cr	0,002	0,002	0,000	0,245	0,065
	T1		0,009	0,009	0,002	1,768	0,269
	T2		0,009	0,009	0,001	3,589*	0,091*
	T3		0,008	0,008	0,001	1,691	0,140
	T4		0,009	0,009	0,000	1,400	0,056

%= porcentaje de metal pesado analizado en la muestra; FBC= factor de bioconcentración; FT= factor de traslocación; \* tratamiento con una mayor bioacumulación

La evaluación de los factores de bioacumulación y traslocación de los metales pesados, Fe y Cr en las plantas pteridofitas evidencia la retención de estos contaminantes en los sedimentos del Estero Salado, dio como resultado que las dos plantas pteridofitas son consideradas como acumuladoras con un valor >1 en FBC lo que indicaría que *D. filix-mas* y *P. ebenea*, pueden soportar una concentración alta de metales pesados antes que causen repercusiones concertantes en su fisiología.



**Figura 10.** Análisis de conglomerado relación planta metal

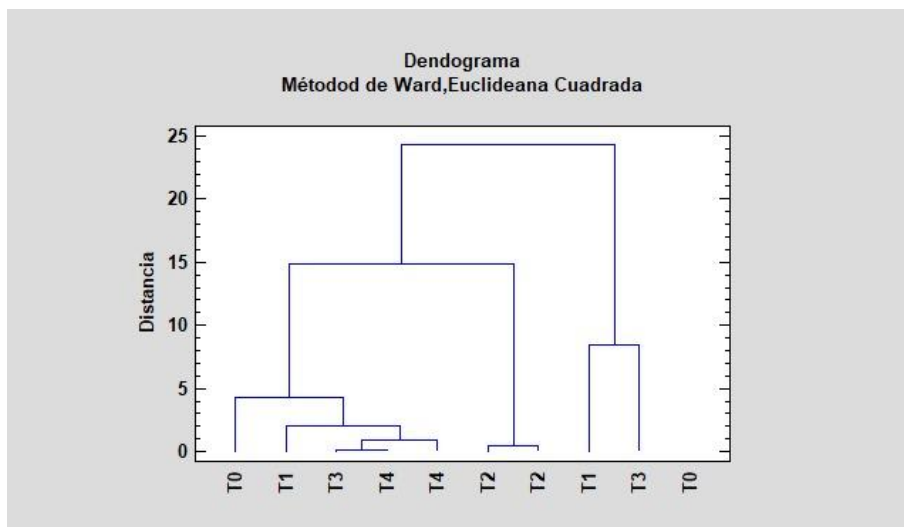


**Figura 11.** Análisis multifactorial planta metal

Etapa	Conglomerado 1 Combinado	Conglomerado 2 Combinado	Distancia	Etapa Previa Conglomerado 1
1	4	10	0,0697666	0
2	3	8	0,458126	0
3	4	5	0,907197	1
4	2	4	2,08722	0
5	1	2	4,29344	0
6	7	9	8,43284	0
7	1	3	14,8669	5
8	1	7	24,3227	7

De igual manera en el análisis por tratamientos el T2 (50%) de las especies *D. filix-mas* y *P. ebanea* tuvieron una mayor traslocación en su relación con los MP como se muestra en la figura 12 dando valores óptimos para su empleo en una fitorremediación.

**Figura 12.** Análisis de conglomerado relación tratamiento metal



**Figura 13.** Análisis multifactorial tratamiento metal

Etapa	Conglomerado 1 Combinado	Conglomerado 2 Combinado	Distancia	Etapa Previa Conglomerado 1
1	4	10	0,0697666	0
2	3	8	0,458126	0
3	4	5	0,907197	1
4	2	4	2,08722	0
5	1	2	4,29344	0
6	7	9	8,43284	0
7	1	3	14,8669	5
8	1	7	24,3227	7

Las concentraciones de metales pesados se movilizan dentro del experimento in-vivo, en donde las concentraciones van a disminuir desde: suelo, raíz, hoja, confirmando lo propuesto por Rashid *et al.* (2023) es decir que el factor de traslocación en *D. filix-mas* y *P. ebanea* muestra un indicador  $<1$ , lo que quiere decir que ambas especies pueden fitoestabilizar ambos MP.

Esta habilidad les confiere a las micorrizas arbusculares propiedades de resiliencia a los metales pesados. Por lo que redujeron en % la concentración de Fe y Cr, esto concuerda con lo hallado por Ibrahim *et al.* (2023) que redujeron en 38% en Cr y por García *et al.* (2017) que describe una reducción significativa en la movilidad del Fe.

## Capítulo 5

### Conclusiones y recomendaciones

#### 5.1. Conclusiones

- El aumento de producción de esporas y el alto grado de colonización micorrízica en respuesta al estrés inducido, evidenciaron una relación simbiótica, rizosfera-planta, en el traspaso de nutrientes de manera más eficiente con el fin de asegurar su sobrevivencia.
- La evaluación morfológica de micorrizas arbusculares asociadas a fitoremediadoras estableció una diversidad de especímenes que comparten características de acumulación y retención de metales pesados entre ellos, Fe y Cr en las raíces.
- Las plantas pteridofitas en simbiosis con las micorrizas hacia los metales Fe y Cr resaltan características acumuladoras y fitoestabilizadoras, al ser capaces de emplearse para estudios relacionados en los procesos de fitorremediación o fitoestabilización en sedimentos del Estero Salado de Guayaquil.

#### 5.2. Recomendaciones

- Evaluar el efecto protector de las micorrizas con ensayos de inoculación con otros compuestos a las plantas usando soluciones que contengan diferentes contaminantes emergentes como plaguicidas, fármacos o microplásticos en sedimentos del Estero Salado.
- Estudiar a mayor escala por medio de pruebas en campo, bajo condiciones no controladas para evaluar el comportamiento real de las especies vegetales pteridofitas y su asociación micorrízicas frente a la contaminación ambiental.
- Se sugiere identificación molecular de hongos micorrízicos mediante la extracción de ADN de las estructuras fúngicas presentes en las raíces de las plantas en estudio, seguido de la amplificación mediante PCR de regiones específicas como ITS o 18S rDNA. Esto permitiría la identificación molecular de las distintas especies fúngicas asociadas.

## Bibliografía

- Albornoz, F. E., Dixon, K. W., & Lambers, H. (2020). Revisiting mycorrhizal dogmas: Are mycorrhizas really functioning as they are widely believed to do? *Soil Ecology Letters*, 3(1), 73-82. <https://doi.org/10.1007/s42832-020-0070-2>
- Alvarado, C. J., Dasgupta-Schubert, N., Ambriz, E., Sánchez-Yáñez, J. M., & Villegas, J. (2011). Hongos micorrízicos arbusculares y la fitorremediación de plomo. *Revista Internacional De Contaminación Ambiental*, 27(4), 357-364. <http://www.redalyc.org/pdf/370/37020721008.pdf>
- Blanch, A. R. (2010). Biotecnología ambiental. Aplicaciones biotecnológicas en la mejora del medio ambiente. *Nota d'economía*, 3, 97-98.
- Camarena, G. (2012). Interacción planta-hongos micorrízicos arbusculares. *Revista Chapingo serie ciencias forestales y del ambiente*, XVIII (3), 409-421. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2011.11.093>
- Carreón, Y., Gómez, N., & Martínez, M. (2013). Las micorrizas arbusculares en la protección vegetal. *Biológicas Revista de la DES Ciencias Biológico Agropecuarias Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo*, 10(1), 60-70. <https://www.biologicas.umich.mx/index.php/biologicas/article/download/39/39>
- Cerrón, R., Loli, O., Azabache, A., & Sánchez, G. (2018). Phytoremediation with corn (*Zea mays* L.) and stevia compost on soils degraded by contamination with heavy metals. *Scientia Agropecuaria*, 9(4), 551-560. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2018.04.11>
- Cofré, M. N., Soteras, F., Del Rosario Iglesias, M., Velázquez, S., Abarca, C., Risio, L., Ontivero, E., Cabello, M. N., Domínguez, L. S., & Lugo, M. A. (2019). Biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi in South America: a review. In *Fungal biology* (pp. 49–72). [https://doi.org/10.1007/978-3-030-15228-4\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-030-15228-4_3)

- Correa, M., Bolaños, M., Rebolledo, E., Rubio, D., & Salinas, E. (2015). Análisis del contenido de metales pesados en aguas, sedimentos y peces en la cuenca del Río Santiago, Provincia de Esmeraldas, Ecuador. *Revista Científica Interdisciplinaria Investigación y Saberes*, 4(2), 32-42. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=8487650>
- Delgado Silva, H.D. and Gutiérrez Montoya, L.V. (2022) 'Hongos Micorrizas Arbusculares: La Simbiosis de los Múltiples Beneficios', *Revista Ciencia y Tecnología El Higo*, 12(2), pp. 2–14. doi:10.5377/elhigo.v12i2.15196.
- Dhalaria, R., Kumar, D., Kumar, H., Nepovimova, E., Kuca, K., Islam, M. T., & Verma, R. (2020). Arbuscular Mycorrhizal Fungi as Potential Agents in Ameliorating Heavy Metal Stress in Plants. *Agronomy* 2020, Vol. 10, Page 815, 10(6), 815. Doi: 10.3390/AGRONOMY10060815
- Duarte, O. and Velho, L. (2009) Capacidades Científicas Y tecnológicas de Colombia para adelantar prácticas de bioprospección, *Revista iberoamericana de ciencia tecnología y sociedad*. Available at: [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S1850-00132009000100004&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S1850-00132009000100004&script=sci_arttext).
- Esquivel, G. (2018). Importancia del hierro (Fe) en la agricultura. *Drokasa Perú*.
- Forero, G., Baren, L., Domínguez, L., Cevallos, J., & Marín, J. (2019). Heavy metals contamination in the gulf of Guayaquil: even limited data reflects environmental impacts from anthropogenic activity. *Revista Internacional De Contaminacion Ambiental*, 35(3), 731-755. <https://doi.org/10.20937/rica.2019.35.03.18>
- Furlan, V., Bartschi, H. & Fortin, J. (1980). Media for density gradient extraction of endomycorrhizal spores. *Transactions of the British Mycological Society*, 75, 336338. doi: 10.1016/S0007-1536(80)80102-1
- García, F. (2008). Dinámica de nutrientes en el sistema suelo-planta. IPNI.

- García-Sánchez, M., Stejskalová, T., García-Romera, I., Száková, J., & Tlustoš, P. (2017). Risk element immobilization/stabilization potential of fungal-transformed dry olive residue and arbuscular mycorrhizal fungi application in contaminated soils. *Journal of environmental management*, 201, 110–119. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.06.036>
- Garzón, L. (2015). Importancia de las micorrizas arbusculares (MA) para un uso sostenible del suelo en la Amazonia colombiana. *Revista luna azul*, 42, 217-234. <https://doi.org/10.17151/luaz.2016.42.14>
- Gerdemann, J. & Nicolson, T. (1963) Spores of Mycorrhizal Endogone Species Extracted from Soil by Wet Sieving and Decanting. *Transactions of the British Mycological Society*, 46, 235-244. [http://dx.doi.org/10.1016/S0007-1536\(63\)80079-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0007-1536(63)80079-0)
- Gio, J., Alvarado, C., Pacheco, N., Alejo, J., Ramirez, A. & De la Cruz, J. (2022). Bioprospección de micorrizas arbusculares en suelos de vegetación secundaria para la producción de calabaza. *ResearchGate*. [https://www.researchgate.net/publication/366622579\\_BIOPROSPECCION\\_DE\\_MICORRIZAS\\_ARBUSCULARES\\_EN\\_SUELOS\\_DE\\_VEGETACION\\_SECUNDARIA\\_PARA\\_LA\\_PRODUCCION\\_DE\\_CALABAZA](https://www.researchgate.net/publication/366622579_BIOPROSPECCION_DE_MICORRIZAS_ARBUSCULARES_EN_SUELOS_DE_VEGETACION_SECUNDARIA_PARA_LA_PRODUCCION_DE_CALABAZA)
- Gómez, B. (2017). Fitorremediación de cromo con plantas acuáticas flotantes: lineamientos para su implementación en la rehabilitación de cuerpos de agua. *Biblioteca Digital*. [https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/download/seminario/seminario\\_nBIO001608\\_Gomez.pdf](https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/download/seminario/seminario_nBIO001608_Gomez.pdf)
- Gregersen, E. (2023). Chromium | Uses, Properties, & Facts. *Encyclopedia Britannica*. <https://www.britannica.com/science/chromium>

- Gunwal, I., Sharma, K. and Mago, P. (2014) 'Spore density and root colonization by arbuscularmycorrhizal fungi in heavy-metal-contaminated soils', *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 9(3), pp. 49–53. doi:10.9790/3008-09334953.
- Guzmán-González, S., & Farías-Larios, J. (2005). *Biología y regulación molecular de la micorriza arbuscular*. *Avances en Investigación Agropecuaria*, 9(2), 17-31. <https://biblat.unam.mx/en/revista/avances-en-investigacion-agropecuaria/articulo/biologia-y-regulacion-molecular-de-la-micorriza-arbuscular>
- Hernández, M. L., López, J. A., Eguiluz, K. I., & Salazar, G. R. (2020). Environmental biotechnology. *Revista Peruana de Biología*, 27(1), 043-048. <https://doi.org/10.15381/rpb.v27i1.17578>
- Hernández, V. A., Jarquín, R., Lara, J. P., & Aguilar, G. (2022). Bioprospección de insectos benéficos en sistemas de producción agroecológicos y orgánicos en San Luis Potosí. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 13(3), 511-525. <https://doi.org/10.29312/remexca.v13i3.2896>
- Ibrahim, E.A., El-Sherbini, M.A. and Selim, E.-M.M. (2023) 'Effects of biochar, zeolite and mycorrhiza inoculation on soil properties, heavy metal availability and cowpea growth in a multi-contaminated soil', *Scientific Reports*, 13(1). doi:10.1038/s41598-023-33712-z.
- Juaréz, M., Cerdán, M., Sanchez, A. (2008). *Hierro en el sistema suelo-planta*. Departamento de agroquímica y bioquímica. Facultad de ciencias. Universidad de Alicante.
- León, B., Acuña, M., & Mellado, F. (2022). Pteridofitas: helechos y licófitos de El mundo vegetal de los andes peruanos en el contexto actual. *Revista Peruana de Biología*, 29(3), e22890. <https://doi.org/10.15381/rpb.v29i3.22890>
- McGonigle, T., Miller, M., Evans, D., Fairchild, G. & Swan, J. (1990). A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal

- fungi. *New Phytologist*, 115, 495–501 (1990). doi: 10.1111/j.1469-8137.1990.tb00476.x
- Melo, C., Walker, C., Freitas, H., Machado, A. C., & Borges, P. A. V. (2020). Distribution of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) in Terceira and São Miguel Islands (Azores). *Biodiversity Data Journal*, 8. <https://doi.org/10.3897/bdj.8.e49759>
- Mishra, S., Bharagava, R. N., More, N., Yadav, A., Zainith, S., Mani, S., & Chowdhary, P. (2018). Heavy metal contamination: an alarming threat to environment and human health. En *Springer eBooks* (pp. 103-125). [https://doi.org/10.1007/978-981-10-7284-0\\_5](https://doi.org/10.1007/978-981-10-7284-0_5)
- Missouri Botanical Garden. (s.f.). *Dryopteris filix-mas* - Plant Finder. <https://www.missouribotanicalgarden.org/PlantFinder/PlantFinderDetails.aspx?taxonid=285742>
- Monserate, L., Medina, J. y Calle, P. (2011). Estudio de condiciones físicas, químicas y biológicas en la zona intermareal de dos sectores del Estero Salado con diferente desarrollo urbano. Tesis. Escuela Superior Politécnica del Litoral Guayaquil. Recuperado de: <http://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/19190>
- Murillo, J. & Murillo, M. (s.f.) Pteridófitos de Colombia II. El género *Pityrogramma* (Pteridaceae). *Rev. Acad. Colomb. Cienc.*, 23 (Suplemento especial): 89-96, 1999. ISSN 0370-3908
- Orozco-Corona, Dulce & León, Consuelo & Megchún-García, Juan Valente & Hernández, Alejandro. (2022). Determinación de los factores de bioconcentración, traslocación y riesgos potenciales a la salud en *Capsicum annum* L.
- Ortiz, M. S. (2020). Biodiversidad de pteridofitas en la Sierra de Juárez, Chihuahua, México.
- Ouyang, J., He, Y., Yang, B., Zhou, J., Li, W., & Cao, Y. (2023). Elevation, but not phosphorus, shapes arbuscular mycorrhizal fungal colonization of plateau wetland plants: A case



- study of the Qinghai-Tibet Plateau. *Global Ecology And Conservation*, 46, e02611. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2023.e02611>
- Pernía, B., Mero, M., Cornejo, X., Ramírez-Prado, N., Ramírez, L., Bravo, K., López, D. B., Muñoz, J., & Zambrano, J. (2018). Determinación de cadmio y plomo en agua, sedimento y organismos bioindicadores en el estero salado, Ecuador. *Enfoque*, 9(2), 89-105. <https://doi.org/10.29019/enfoqueute.v9n2.246>
- Pino, S., Barros, D., Sisalema, L., Fernández, P., & Molina, C. (2021). El costo de remediación del recurso agua por contaminación de coliformes fecales en el estero Salado, sector La Chala, Guayaquil-Ecuador. *Espacios*, 42(04), 102-120. <https://doi.org/10.48082/espacios-a21v42n04p09>
- Prieto Benavides, O.O. *et al.* (2024) 'Beneficios de las micorrizas arbusculares en técnicas de Fitorremediación para Descontaminación de Suelos en Ecuador', *Revista Científica Arbitrada Multidisciplinaria PENTACIENCIAS*, 6(1), pp. 187–202. doi:10.59169/pentaciencias.v6i1.980.
- Rajapitamahuni, S., Kang, B. R., & Lee, T. K. (2023). Exploring the roles of arbuscular mycorrhizal fungi in Plant–Iron homeostasis. *Agriculture*, 13(10), 1918. <https://doi.org/10.3390/agriculture13101918>
- Ramos, L. (2018). Estudio de la dinámica del cromo en la cuenca alta del río bogotá mediante la selección y aplicación de un modelo de calidad de agua para la representación de contaminantes conservativos en cuerpos de agua lóticos. Universidad Nacional Abierta y a Distancia.
- Rashid, A., Schutte, B. J., Ulery, A., Deyholos, M. K., Sanogo, S., Lehnhoff, E. A., & Beck, L. (2023). Heavy metal contamination in agricultural soil: Environmental pollutants

- affecting crop health. *Agronomy*, 13(6), 1521.  
<https://doi.org/10.3390/agronomy13061521>
- Reina, A. M. (2023). Determinación de la diversidad ecológica y funcional de micorriza arbuscular de la rizosfera de sitios de historial de deposición de municiones. Trabajo de integración curricular. Universidad de las Fuerzas Armadas.ca
- Rioperde, T., Delgado, A., Cabrera, J., & Cartaya, O. (2021). Relación entre los metales pesados y los hongos formadores de micorrizas arbusculares. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0258-59362021000400014](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362021000400014)
- Rojas Mosquera, M.N. and Rojas Criollo, D.A. (2019) 'El Estero salado en el Desarrollo Urbano de Guayaquil: Crónicas de un recurso natural en decadencia', XI Seminario Internacional de Investigación en Urbanismo, Barcelona-Santiago de Chile, Junio 2019 [Preprint]. doi:10.5821/siiu.6590.
- Rosas, Y. (2019). Caracterización y remoción de cromo (III) de aguas residuales de curtiembres del Parque Industrial de Rio Seco utilizando hueso de olivo (*Olea europea*) procesado como biosorbente. En Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa. <http://repositorio.unsa.edu.pe/handle/UNSA/9250>
- Rubio, D. I., Delgado, D. R., & Oyala, A. (2016). Remoción de metales pesados comúnmente generados por la actividad industrial, empleando macrófitas neotropicales. *Producción + limpia*, 11(2), 126-149. <https://doi.org/10.22507/pml.v11n2a11>
- Salmeron, I. A., Pedraza, M. E., Mendoza, L. S., & Chávez, A. T. (2015). Cronología de la taxonomía y cladística de los glomeromicetos. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 38(2), 153. <https://doi.org/10.35196/rfm.2015.2.153>
- Sánchez, L., Arreguín, M., & Fernández, R. (2008). Gametofitos y esporofitos jóvenes de dos pteridofitas: *Asplenium monanthes* L. (Aspleniaceae-Pteridophyta) y *Elaphoglossum*

- minutum (Pohl ex fée) T. moore (Lomariopsidaceae-Pteridophyta). *Polibotánica*, 25, 29-43. <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/5652522.pdf>
- Seguel, A. (2014). El potencial de las micorrizas arbusculares en la agricultura desarrollada en zonas áridas y semiáridas. *Idesia*, 32(1), 3-8. <https://doi.org/10.4067/s0718-34292014000100001>
- Shen, X., Dai, M., Yang, J., Lin, S., Tan, X., Peng, C., Ali, I., & Naz, I. (2022). A Critical Review on the phytoremediation of Heavy Metals from Environment: Performance and Challenges. *Chemosphere*, 291, 132979. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132979>
- Shi, G., Liu, C., Cai, Q., Liu, Q., & Hou, C. (2010). Cadmium accumulation and tolerance of two safflower cultivars in relation to photosynthesis and antioxidative enzymes. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 85(3), 256-263. <https://doi.org/10.1007/s00128-010-0067-0>
- Shipunov, A. (2022). 6.2: Pteridophyta - Los helechos. LibreTexts Español. [https://espanol.libretexts.org/Biologia/Bot%C3%A1nica/Introducci%C3%B3n\\_a\\_la\\_Bot%C3%A1nica\\_\(Shipunov\)/06%3A\\_Diversidad\\_creciente\\_de\\_plantas/6.02%3A\\_Pteridophyta\\_-\\_los\\_helechos#:~:text=La%20pteridopsida%20\(helechos%20verdaderos\)%20tiene,\(Figura6.2.2\).](https://espanol.libretexts.org/Biologia/Bot%C3%A1nica/Introducci%C3%B3n_a_la_Bot%C3%A1nica_(Shipunov)/06%3A_Diversidad_creciente_de_plantas/6.02%3A_Pteridophyta_-_los_helechos#:~:text=La%20pteridopsida%20(helechos%20verdaderos)%20tiene,(Figura6.2.2).)
- Sieverding, E. (1983). Manual de métodos para la investigación de la micorriza vesículo arbuscular en el laboratorio. CIAT. [http://ciat-library.ciat.cgiar.org/ciat\\_digital/CIAT/books/historical/198.pdf](http://ciat-library.ciat.cgiar.org/ciat_digital/CIAT/books/historical/198.pdf)
- Singh, R., Singh, D. P., Kumar, N., Sk, B., & Barman, S. C. (2010). Accumulation and translocation of heavy metals in soil and plants from fly ash contaminated area. *PubMed*, 31(4), 421-430. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21186714>

- Soto, J. E., Pinto, J. E., & Millán, E. E. (2022). Micorrizas arbusculares y las técnicas de visión artificial para su identificación. *Tecno Lógicas*, 25(54), e2348. <https://doi.org/10.22430/22565337.2348>
- Stürmer, S. L., Bever, J. D., & Morton, J. B. (2018). Biogeography of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota): a phylogenetic perspective on species distribution patterns. *Mycorrhiza*, 28(7), 587-603. <https://doi.org/10.1007/s00572-018-0864-6>
- Sun, Y., Li, J., Huang, T., & Guan, X. (2016). The influences of iron characteristics, operating conditions and solution chemistry on contaminants removal by zero-valent iron: a review. *Water Research*, 100, 277-295. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.05.031>
- Tan, Q., Guo, Q., Wei, R., Zhu, G., Du, C., & Hu, H. (2023). Influence of arbuscular mycorrhizal fungi on bioaccumulation and bioavailability of AS and CD: a meta-analysis. *Environmental Pollution*, 316, 120619. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120619>
- Texto Unificado de Legislación Secundaria de Medio Ambiente (2017). Norma de calidad ambiental del recurso suelo y criterios de remediación para suelos contaminados. Libro IV.
- The Editors of Encyclopaedia Britannica (2023) Britannica. Available at: <https://www.britannica.com/science/iron-chemical-element>.
- Torres, M. V., Mora, M. J. M., Aymacaña, L. J., Paspuezan, M. B. M., Villacrés, D. C., Cevallos, O. G., Caisaguano, M. M., & Rodríguez, V. D. (2018). Caracterización físico-química del suelo del Botadero de Portoviejo y análisis de la distribución espacial de cromo (VI), níquel, bromo y hierro. FIGEMPA. <https://doi.org/10.29166/revfig.v1i2.1608>
- Vargas, J. T., Rodríguez-Monroy, M., Meyer, M. L., Montes-Belmont, R., & Sepúlveda-Jiménez, G. (2017). *Trichoderma asperellum* ameliorates phytotoxic effects of copper

in onion (*Allium cepa* L.). *Environmental and Experimental Botany*, 136, 85-93. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.01.009>

Wężowicz K, Turnau K, Anielska T, Zhebrak I, Gołuszka K, Błaszczkowski J, Rozpądek P. Metal toxicity differently affects the *Iris pseudacorus*-arbuscular mycorrhiza fungi symbiosis in terrestrial and semi-aquatic habitats. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2015 Dec;22(24):19400-7. doi: 10.1007/s11356-015-5706-x. Epub 2015 Nov 20. PMID: 26585452; PMCID: PMC4679110.

Wildflower (s.f.). *Dryopteris filix-mas* (Male fern) | Native Plants of North America. [https://www.wildflower.org/plants/result.php?id\\_plant=DRFI2](https://www.wildflower.org/plants/result.php?id_plant=DRFI2)

Zhou, X., Wang, Y.-P. and Song, Z. (2022) 'Heavy metal contamination and ecological risk assessments in urban mangrove sediments in Zhanjiang Bay, South China', *ACS Omega*, 7(24), pp. 21306–21316. doi:10.1021/acsomega.2c02516.

## Anexos

### Anexo 1. Equipos, materiales y reactivos

Equipos	Materiales	Reactivos
Centrifuga	Tamiz 60	KOH
Microscopio invertido	Tamiz 45	Azul de tripán
Estereoscopio	Cajas Petri	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Autoclave	Matraz 1 L	Sacarosa
Estufa	Frascos ámbar	Agua destilada
Cabina	Placa cubreobjeto	Ácido láctico
Microscopio	Placa portaobjeto	Glicerol
ICP OES	Aguja	Tween 80
	Bandejas de aluminio	Etanol
	Vasos de precipitación	
	Pinceles	
	Papel aluminio	
	Bisturí	
	Tubo Falcón 50 ml	
	Gradilla	
	Vaso de precipitación	

### Anexo 2. Soluciones previas a los protocolos de tinción de raíces y cuantificación de esporas

#### *Solución Azul de tripán 1L*

Se pesaron, en una balanza analítica, 50 g de azul de tripán; de igual manera, 333.3 ml de ácido láctico y de glicerol fueron medidos en probetas. Estos fueron depositados en un frasco ámbar, aforando con agua destilada. La preparación se llevó a cabo dentro de una Sorbona a causa de lo tóxico que puede llegar a ser el azul de tripán.

#### *Solución de Sacarosa al 72% + Tween 80*

Se pesó, en una balanza de precisión, 720 g de sacarosa. Así mismo, 20 ml de Tween 80 fueron medidos en una probeta. Ambos se depositaron en un frasco de 1L donde fueron aforados con agua destilada.

### *Solución fijadora*

Con ayuda de probetas de 250 se midió 250 ml de ácido láctico y de glicerol, con una concentración 1:1. Esta solución fue almacenada en un frasco transparente de 500 ml.

### *AFA*

Se midieron 520 ml de alcohol al 96% y 480 ml de agua destilada con ayuda de probetas de 250 ml. Esta solución fue almacenada en un frasco de vidrio de 1 L.

### **Anexo 3. Muestreo del sedimento**



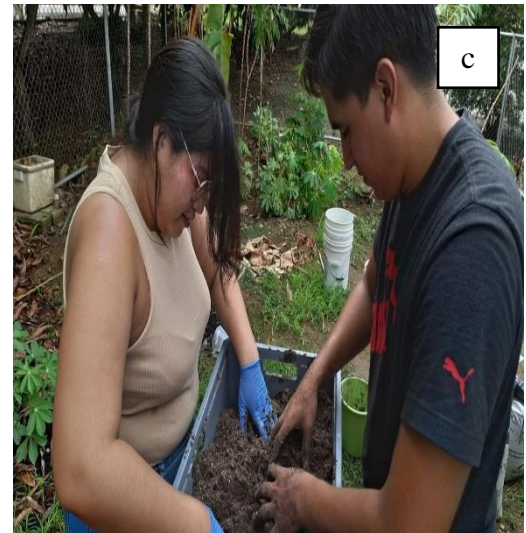
### **Anexo 4. Recolección de muestra de sedimento del Estero Salado**



## Anexo 5. Recolección de muestra de sedimento de suelo de los Helechos



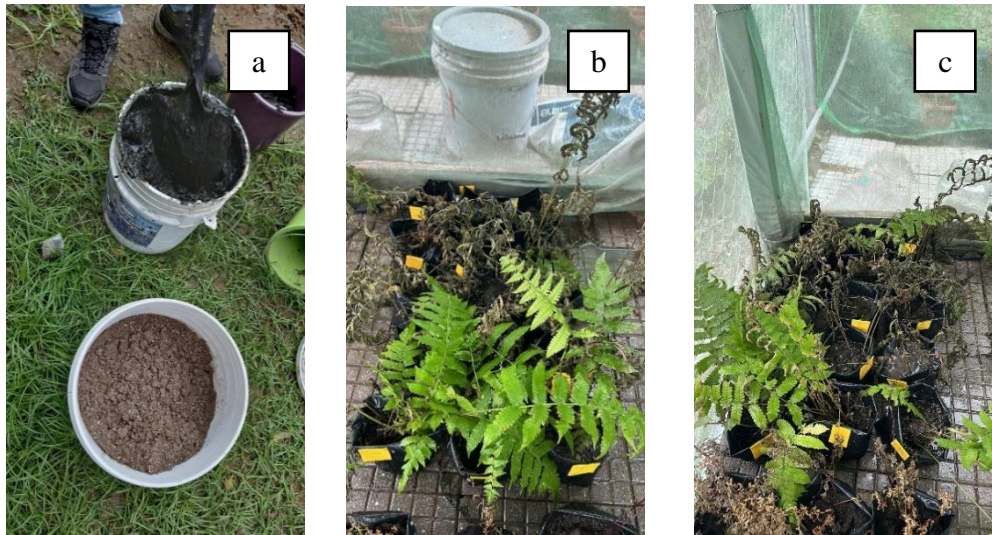
## Anexo 6. *Pityrogramma ebenea* tratamiento Fe y Cr



*Nota. a) Planta PEB sembrada en tratamiento con Fe., b) Planta PEB sembrada en tratamiento con Cr., c) Preparación de sustrato con sedimento.*

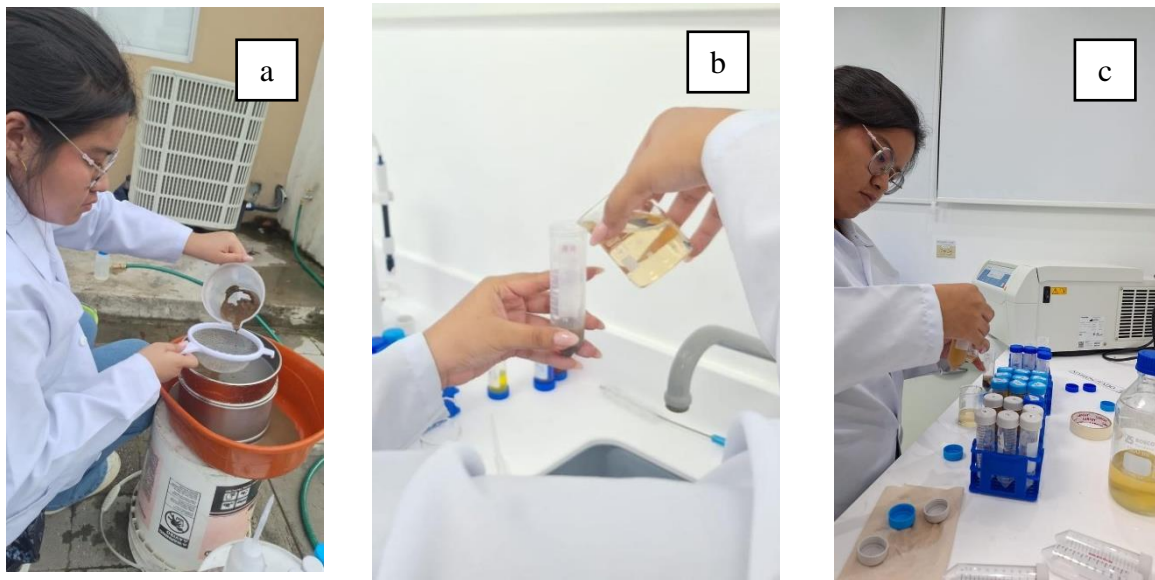


### Anexo 7. *Dryopteris filix-mas* tratamiento Fe y Cr



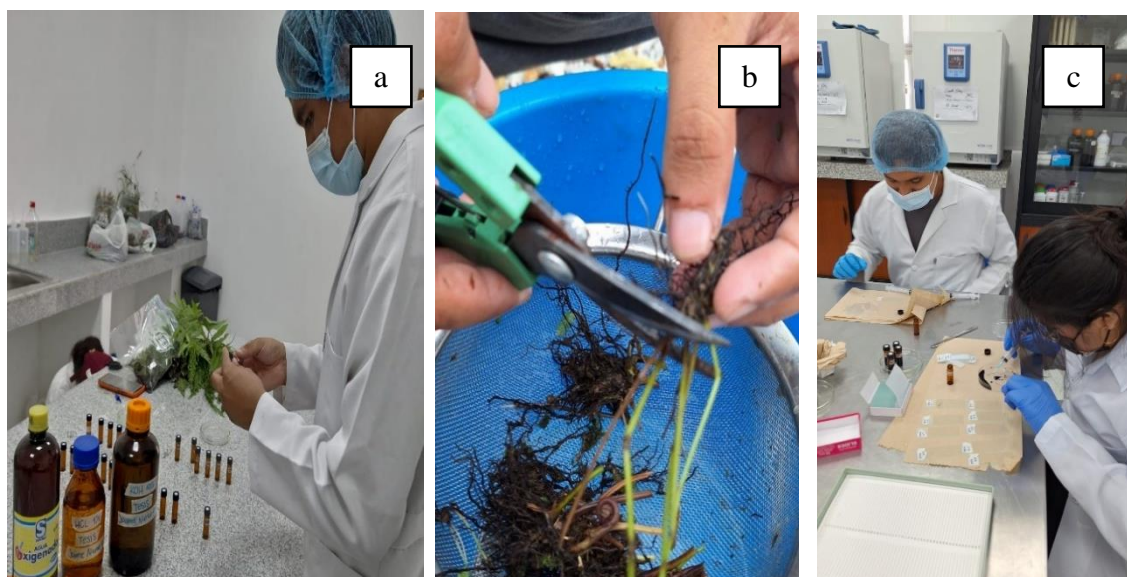
*Nota. a) Mezcla de sustrato con sedimento., b) Planta DFM sembrada en tratamiento con Fe., Planta DFM sembrada en tratamiento con Cr.*

### Anexo 8. Proceso de tamizaje húmedo



*Nota. Tamizaje húmedo., b) Adición de solución de sacarosa + tween 80., c) Recolección de sobrenadante.*

## Anexo 9. Tinción y montaje de micorrizas



*Nota. a) Clasificación de raíces., b) selección de raicillas., c) Adaptación de raíces para tinción.*

## Anexo 10. Estimación de Colonización micorrízica en DFM control inicial

Muestras	H	cálculo	V	cálculo	A	cálculo	MIC Total	cálculo
DFM 1.1	24.00	26.67	11.00	12.22	19.00	21.11	54.00	60.00
DFM 1.2	27.00	30.00	13.00	14.44	14.00	15.56	54.00	60.00
DFM 1.3	25.0	27.78	8.0	8.89	16.0	17.78	49.00	54.44
DFM 2.1	29.0	32.22	10.0	11.11	7.0	7.78	46.00	51.11
DFM 2.2	27.0	30.00	12.0	13.33	23.0	25.56	62.00	68.89
DFM 2.3	26.0	28.89	8.0	8.89	11.0	12.22	45.00	50.00
DFM 3.1	29.0	32.22	4.0	4.44	16.0	17.78	49.00	54.44
DFM 3.2	25.0	27.78	13.0	14.44	11.0	12.22	49.00	54.44
DFM 3.3	21.0	23.33	9.0	10.00	12.0	13.33	42.00	46.67
DFM 4.1	29.0	32.22	14.0	15.56	10.0	11.11	53.00	58.89
DFM 4.2	24.0	26.67	5.0	5.56	14.0	15.56	43.00	47.78
DFM 4.3	24.0	26.67	8.0	8.89	13.0	14.44	45.00	50.00
DFM 5.1	18.0	20.00	8.0	8.89	14.0	15.56	40.00	44.44
DFM 5.2	20.0	22.22	4.0	4.44	11.0	12.22	35.00	38.89
DFM 5.3	20.0	22.22	7.0	7.78	11.0	12.22	38.00	42.22
DFM 6.1	21.0	23.33	3.0	3.33	7.0	7.78	31.00	34.44
DFM 6.2	21.0	23.33	7.0	7.78	9.0	10.00	37.00	41.11
DFM 6.3	17.0	18.89	3.0	3.33	13.0	14.44	33.00	36.67
<b>Promedio</b>		26.36		9.07		14.26		49.69

### Anexo 11. Estimación de colonización micorrízica en PEB control inicial

Muestras	H	cálculo	V	cálculo	A	cálculo	MIC Total	cálculo
PEB 1.1	22.00	24.44	6.00	6.67	10.00	11.11	38.00	42.22
PEB 1.2	18.00	20.00	5.00	5.56	9.00	10.00	32.00	35.56
PEB 1.3	15.0	16.67	8.0	8.89	7.0	7.78	30.00	33.33
PEB 2.1	21.0	23.33	6.0	6.67	9.0	10.00	36.00	40.00
PEB 2.2	23.0	25.56	3.0	3.33	6.0	6.67	32.00	35.56
PEB 2.3	25.0	27.78	4.0	4.44	10.0	11.11	39.00	43.33
PEB 3.1	19.0	21.11	6.0	6.67	8.0	8.89	33.00	36.67
PEB 3.2	18.0	20.00	9.0	10.00	11.0	12.22	38.00	42.22
PEB 3.3	18.0	20.00	4.0	4.44	7.0	7.78	29.00	32.22
PEB 4.1	16.0	17.78	10.0	11.11	8.0	8.89	34.00	37.78
PEB 4.2	17.0	18.89	7.0	7.78	8.0	8.89	32.00	35.56
PEB 4.3	18.0	20.00	3.0	3.33	9.0	10.00	30.00	33.33
PEB 5.1	23.0	25.56	4.0	4.44	11.0	12.22	38.00	42.22
PEB 5.2	21.0	23.33	6.0	6.67	7.0	7.78	34.00	37.78
PEB 5.3	18.0	20.00	7.0	7.78	9.0	10.00	34.00	37.78
PEB 6.1	19.0	21.11	6.0	6.67	9.0	10.00	34.00	37.78
PEB 6.2	22.0	24.44	6.0	6.67	10.0	11.11	38.00	42.22
PEB 6.3	18.0	20.00	9.0	10.00	9.0	10.00	36.00	40.00
<b>Promedio</b>		21.67		6.73		9.69		38.09

### Anexo 12. Estimación de colonización micorrízica en DFM para Fe y Cr

Muestras	H	cálculo	V	cálculo	A	cálculo	MIC Total	cálculo
DFM Fe 25	27.0	90.0	27.0	90.0	26.0	86.7	80.0	88.9
DFM Fe 25	26.0	86.7	28.0	93.3	22.0	73.3	76.0	84.4
DFM Fe 50	30.0	100.0	25.0	83.3	23.0	76.7	78.0	86.7
DFM Fe 50	26.0	86.7	26.0	86.7	25.0	83.3	77.0	85.6
DFM Fe 100	30.0	100.0	25.0	83.3	30.0	100.0	85.0	94.4
DFM Fe 100	28.0	93.3	27.0	90.0	21.0	70.0	76.0	84.4
DFM Fe ctrl	26.0	86.7	24.0	80.0	22.0	73.3	72.0	80.0
DFM Fe ctrl	25.0	83.3	26.0	86.7	22.0	73.3	73.0	81.1
DFM Cr 25	28.0	93.3	27.0	90.0	25.0	83.3	80.0	88.9
DFM Cr 25	25.0	83.3	22.0	73.3	26.0	86.7	73.0	81.1
DFM Cr 50	23.0	76.7	24.0	80.0	27.0	90.0	74.0	82.2
DFM Cr 50	24.0	80.0	27.0	90.0	24.0	80.0	75.0	83.3
DFM Cr 100	25.0	83.3	27.0	90.0	24.0	80.0	76.0	84.4
DFM Cr 100	23.0	76.7	26.0	86.7	28.0	93.3	77.0	85.6
DFM Cr ctrl	24.0	80.0	28.0	93.3	26.0	86.7	78.0	86.7
DFM Cr ctrl	24.0	80.0	23.0	76.7	26.0	86.7	73.0	81.1
<b>Promedio</b>		86.3		85.8		82.7		84.9

### Anexo 13. Estimación de colonización micorrízica en PEB para Fe y Cr

Muestras	H	cálculo	V	cálculo	A	cálculo	MIC Total	cálculo
PEB Fe 25	25.0	83.3	27.0	90.0	23.0	76.7	75.0	83.3
PEB Fe 25	25.0	83.3	26.0	86.7	23.0	76.7	74.0	82.2
PEB Fe 50	26.0	86.7	23.0	76.7	23.0	76.7	72.0	80.0
PEB Fe 50	28.0	93.3	21.0	70.0	26.0	86.7	75.0	83.3
PEB Fe 100	27.0	90.0	22.0	73.3	24.0	80.0	73.0	81.1
PEB Fe 100	26.0	86.7	22.0	73.3	24.0	80.0	72.0	80.0
PEB Fe ctrl	25.0	83.3	26.0	86.7	22.0	73.3	73.0	81.1
PEB Fe ctrl	30.0	100.0	24.0	80.0	23.0	76.7	77.0	85.6
PEB Cr 25	27.0	90.0	26.0	86.7	23.0	76.7	76.0	84.4
PEB Cr 25	28.0	93.3	25.0	83.3	22.0	73.3	75.0	83.3
PEB Cr 50	30.0	100.0	25.0	83.3	30.0	100.0	85.0	94.4
PEB Cr 50	25.0	83.3	23.0	76.7	28.0	93.3	76.0	84.4
PEB Cr 100	27.0	90.0	28.0	93.3	27.0	90.0	82.0	91.1
PEB Cr 100	23.0	76.7	27.0	90.0	26.0	86.7	76.0	84.4
PEB Cr ctrl	25.0	83.3	24.0	80.0	27.0	90.0	76.0	84.4
PEB Cr ctrl	26.0	86.7	23.0	76.7	25.0	83.3	74.0	82.2
<b>Promedio</b>		88.1		81.7		82.5		84.1

### Anexo 14. Cuantificación de esporas en DFM y PEB inicial

Análisis de suelo	Resultado (Promedio de Esporas/100 g de suelo)	Densidad
DFM-T1	2,32	MEDIA
DFM-T2	0,32	BAJA
DFM-T3	2,4	MEDIA
DFM-T4	9,68	ALTA
DFM-T5	0,56	BAJA
DFM-T6	10,96	ALTA
DFM-T7	0,48	BAJA
DFM-T8	0,48	BAJA
PEB- T1	4,96	MEDIA
PEB- T2	0,72	BAJA
PEB- T3	3,2	MEDIA
PEB- T4	1,14	MEDIA
PEB- T5	1,2	MEDIA
PEB- T6	1,36	MEDIA
PEB- T7	4	MEDIA
PEB- T8	0,56	BAJA

**Comentarios: Criterio de relación de la densidad de esporas por Guerra (2012):**

**Baja: < 1 espora/ gr de suelo**

**Media: 1 – 10 esporas/ gr de suelo**

**Alta: > 10 esporas/ gr de suelo**

### Anexo 15. Cuantificación de esporas en PEB y DFM inoculadas con Fe y Cr

<b>Análisis de suelo</b>	<b>Resultado (Promedio de Esporas/100 g de suelo)</b>	<b>Densidad</b>
PEB Fe 25	17.2	ALTA
PEB Fe 50	16.8	ALTA
PEB Fe 100	16.4	ALTA
PEB Fe ctrl	13.6	ALTA
PEB Cr 25	14.56	ALTA
PEB Cr 50	18	ALTA
PEB Cr 100	12.45	ALTA
PEB Cr ctrl	16	ALTA
DFM Fe 25	20.8	ALTA
DFM Fe 50	27.2	ALTA
DFM Fe 100	13.6	ALTA
DFM Fe ctrl	21.6	ALTA
DFM Cr 25	12	ALTA
DFM Cr 50	14.8	ALTA
DFM Cr 100	14.48	ALTA
DFM Cr ctrl	18.8	ALTA

**Comentarios: Criterio de relación de la densidad de esporas por Guerra (2012):**

**Baja: < 1 espora/ gr de suelo**

**Media: 1 – 10 esporas/ gr de suelo**

**Alta: > 10 esporas/ gr de suelo**