UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

FACULTAD DE CIENCIAS

"LOS LÍQUENES COMO BIOINDICADORES DE PRESENCIA DE METALES PESADOS EN ECOSISTEMAS DE MONTAÑA: EXPERIENCIA EN LA CORDILLERA BLANCA, ANCASH-PERÚ"

Presentada por:

JOSÉ ANTONIO ARROYO SÁNCHEZ

Tesis para Optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO

Lima – Perú

2022

La UNALM es la titular de los derechos patrimoniales de la presente investigación (Art. 24. Reglamento de Propiedad Intelectual)

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA

FACULTAD DE CIENCIAS

"LOS LÍQUENES COMO BIOINDICADORES DE PRESENCIA DE METALES PESADOS EN ECOSISTEMAS DE MONTAÑA: EXPERIENCIA EN LA CORDILLERA BLANCA, ANCASH-PERÚ"

Presentada por:

JOSÉ ANTONIO ARROYO SÁNCHEZ

Tesis para Optar el Título Profesional de:

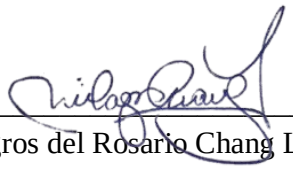
BIÓLOGO

Sustentada y aprobada por el siguiente jurado:

Ph.D. Aldo Humberto Isidoro Ceroni Stuva
PRESIDENTE

Ph.D. Alfredo Salomón Rodríguez Delfín
MIEMBRO

Ph.D. Lizardo Visitación Figueroa
MIEMBRO



Biol. Milagros del Rosario Chang La Rosa
ASESORA

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA
FACULTAD DE CIENCIAS

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO 003/2022/FC

Los Miembros del Jurado que suscriben, se han reunido en la Ceremonia Virtual de Sustentación de Tesis que presenta el Bachiller **José Antonio Arroyo Sánchez**, titulada: **"LOS LÍQUENES COMO BIOINDICADORES DE PRESENCIA DE METALES PESADOS EN LOS GLACIARES ANDINOS: EXPERIENCIA EN LA MICROCUENCA DE PARÓN ANCASH".**

Atendida la exposición oral y oídas las respuestas a las preguntas y observaciones formuladas, se propone el cambio del Título de la Tesis por:

"LOS LÍQUENES COMO BIOINDICADORES DE PRESENCIA DE METALES PESADOS EN ECOSISTEMAS DE MONTAÑA: EXPERIENCIA EN LA CORDILLERA BLANCA, ANCASH-PERÚ"

Declaramos la tesis como:

APROBADA

con el calificativo de:

SOBRESALIENTE

y se acuerda que su redacción final sea publicada en una revista científica de importancia.

En consecuencia, el Bachiller **José Antonio Arroyo Sánchez** queda en condiciones de ser calificado apto por el Consejo de Facultad y recibir el Título Profesional de:

BIÓLOGO

De conformidad con lo estipulado en la Resolución N° 0268-2019-CU-UNALM, Resolución N° 0103-2020-CU-UNALM y el Art. 327° inciso "O" del Reglamento General de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

La Molina, 20 de enero de 2022.

Ph.D. Aldo Humberto Isidoro Ceroni Stuva
PRESIDENTE

Ph.D. Alfredo Salomón Rodríguez Delfín
MIEMBRO

Ph.D. Lizardo Visitación Figueroa
MIEMBRO

Biol. Milagros del Rosario Chang La Rosa
ASESORA

Declaramos: Aprobado, Desaprobado
Calificativos: Regular, Bueno, Muy Bueno y Sobresaliente (Art.48° y 49 del Reglamento del Trabajo de Investigación y Tesis)

DEDICATORIA

A mi madre por su apoyo incondicional para el desarrollo de esta investigación

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue realizada gracias al financiamiento del Proyecto de Concytec – Banco Mundial "Mejoramiento y Ampliación de los Servicios del Sistema Nacional de Ciencia Tecnología e Innovación Tecnológica" 8682-PE, a través de su unidad ejecutora ProCiencia. [Contrato N°003-2018-FONDECYT-BM-IADT-AV], proyecto "Aporte social, económico y ambiental en la conservación y pérdida de la biodiversidad marina-lacustre por el retroceso glaciar" PANT-BIOGLACIAR del Instituto Nacional de Investigación en Glaciares y Ecosistemas de Montañas (INAIGEM).

Asimismo, se agradece a los especialistas ambientales, tesistas y personal administrativo de la Dirección de Investigación Glaciar (DIG) del INAIGEM, por el apoyo en las gestiones logísticas para las salidas de campo, solicitud de servicios analíticos y salidas de capacitación.

A mi co-asesora de tesis, la Ing. Mayra Mejía Camones, especialista ambiental de INAIGEM, por sus sugerencias brindadas durante las reuniones de avance de tesis realizadas semanalmente y a la directora de la Dirección de Ecosistemas de Montaña del INAIGEM, la Dra. Beatriz Fuentealba Durand por sus sugerencias brindadas en dos oportunidades que sirvieron de mucha guía para los análisis de los resultados de la tesis.

Por otro lado hago agradecimiento al Blgo. Daniel Fernando Ramos Araníbar, especialista en Liquenología y Botánica del Instituto Científico Michael Owen Dillon (IMOD) de Arequipa, por sus enseñanzas en la identificación taxonómica de líquenes, sin los cuales no hubiera sido posible la identificación de los líquenes colectados durante el presente estudio.

También a mi patrocinadora de tesis, la profesora Blga. Milagros del Rosario Chang La Rosa, por sus sugerencias de mejora del proyecto de tesis y de la redacción final de la misma. Además, por poner a mi disposición el laboratorio B-4 de la UNALM con sus equipos, para llevar a cabo el trabajo de identificación taxonómica. Asimismo, a los profesores, miembros de mi jurado, por su tiempo en la revisión y corrección de mi trabajo de tesis.

Al departamento de Química de la Facultad de Ciencias de la UNALM por brindarme las facilidades para utilizar el laboratorio de Servicios de Análisis Químico (LASAQ) para llevar a cabo el proceso de digestión seca y ácida de las muestras biológicas y de suelo, paso previo para los análisis de metales por ICP-MS.

Finalmente, a mis amigos y colegas Richard Quispe Quispe por su apoyo para la obtención de algunos materiales de laboratorio necesarios para el proceso de digestión de las muestras de líquenes, y Alex Portocarrero Gálvez por hospedarme en su vivienda de La Molina durante un mes para poder realizar los trabajos de laboratorio desde tempranas horas de la mañana.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN x

ABSTRACT xi

I. INTRODUCCIÓN 1

II. REVISIÓN DE LITERATURA 3

2.1 PRESENTACIÓN DEL ÁMBITO DE ESTUDIO 3

2.1.1 Clima del ámbito de estudio 4

2.1.2 Zonas de vida del ámbito de estudio 5

2.1.3 Geología del ámbito de estudio 5

2.1.4 Mineralogía del ámbito de estudio 6

2.1.5 Suelos del ámbito de estudio 7

2.2 METALES PESADOS 8

2.3 PRESENCIA DE METALES PESADOS EN LOS GLACIARES DE LA CORDILLERA DE LOS ANDES 8

2.4 BIOINDICADORES Y BIOMONITORES AMBIENTALES 9

2.5 LÍQUENES 10

2.5.1 Fotobiontes 11

2.5.2 Micobiontes 12

2.5.3 Relación física entre los simbiontes 13

2.5.4 Estructura y formas del talo 14

2.5.5 Estructuras reproductivas 17

2.5.6 Fisiología de los líquenes 18

2.6 LOS LÍQUENES COMO BIOINDICADORES DE CALIDAD AMBIENTAL 21

2.7 LÍQUENES COMO BIOACUMULADORES DE METALES PESADOS 22

2.7.1 Mecanismos de acumulación de metales en los líquenes 22

2.8 METODOLOGÍAS DE ESTUDIO DE LÍQUENES COMO BIOINDICADORES DE METALES 25
2.9 ESTUDIOS REALIZADOS EN EL PERÚ DE LOS LÍQUENES COMO BIOINDICADORES DE PRESENCIA DE METALES PESADOS 27
III. MATERIALES Y MÉTODOS 29
3.1 SITIOS DE ESTUDIO 30
3.1.1 Sitios de estudio establecidos para la parte alta de la subcuenca de Parón 30
3.1.2 Sitio de estudio establecido para la parte alta de la subcuenca de Yanayacu 31
3.2 PERIODO DE MUESTREO 32
3.3 MUESTREO DE LÍQUENES 32
3.4 IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LOS LÍQUENES COLECTADOS 33
3.5 MUESTREO DE SUELO 36
3.6 MEDICIÓN DE METALES PESADOS EN LÍQUENES Y SUELOS 36
3.6.1 Medición de metales en líquenes 38
3.6.2 Medición de metales en las muestras de suelo 39
3.6.3 Conversión de mg/L a mg/kg o ppm 40
3.7 ANÁLISIS DE DATOS 41
3.7.1 Análisis de datos para el desarrollo del objetivo 1 41
3.7.2 Análisis de datos para el desarrollo del objetivo 2 41
3.7.3 Análisis de datos para el desarrollo del objetivo 3 45
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 47
4.1 RESULTADOS 47
4.1.1 Liquenobiota de las áreas de estudio 47
4.1.2 Concentración de metales en los líquenes 52
4.1.3 Relación suelo-líquen en la bioacumulación de metales 61

4.2 DISCUSIÓN 66
4.2.1 Discusión sobre los resultados obtenidos para el logro del objetivo 1 66
4.2.2 Discusión sobre los resultados obtenidos para el logro del objetivo 2 71
4.2.3 Discusión sobre los resultados obtenidos para el logro del objetivo 3 80
V. CONCLUSIONES 85
VI. RECOMENDACIONES 87
VII. BIBLIOGRAFÍA 89
VIII. ANEXOS 102

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Temperaturas del ámbito de estudio por regiones naturales (SERNANP , 2011) 4

Tabla 2: Clases de metales clasificadas según la afinidad a los sitios de unión extracelular de los líquenes (Nieboer y Richardson ,1980)..... 24

Tabla 3: Reactividad de las pruebas de coloración de algunas sustancias liquénicas, obtenidas del libro de Chaparro de Valencia y Aguirre Ceballos (2002). 35

Tabla 4: Metales pesados analizados en el presente estudio, sus densidades y su categoría como esenciales y/o como potencialmente tóxicos. 37

Tabla 5: Promedios de los Factores de Enriquecimiento por transecto 66

Tabla 6: Otros registros en el departamento de Ancash de la liquenobiota obtenida en el presente estudio, y la condición de tolerancia a metales pesados según referencia bibliográfica para los géneros de los líquenes registrados en los sitios de estudio. 68

Tabla 7: Comparación entre los intervalos de concentraciones de metales bioacumulados (en ppm) obtenidos en áreas naturales, áreas de actividad antrópica y en el presente estudio 72

Tabla 8: Comparación entre los valores bioacumulados en las partes bajas y altas de las subcuencas en estudio. 74

Tabla 9: Concentraciones en mg/kg de metales en los suelos de los sitios de estudio contrastados con los ECAs para suelos del Perú y valores encontrados en suelos similares a nivel mundial. 82

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Mapa del ámbito de estudio. Subcuencas de Llullán-Parón y de Yanayacu, en el norte y sur, respectivamente, de la Cordillera Blanca, dentro del Parque Nacional Huascarán, Departamento de Ancash, Perú. 3

Figura 2: Fotobiontes frecuentemente observados en las simbiosis liquénicas. Cianobacteria A. Nostoc, Algas verdes (B-C): B. Trebouxia, C. Trentehpolia. Imágenes extraídas de Friedl y Büdel (2008)..... 12

Figura 3: Contacto Físico del Fotobionte. A. Collema, B. Cladonia, C, D. Lempholemma, E-G Haustorios intracelulares en Clorofíceas. Imágenes extraídas de Chaparro de Valencia y Aguirre Ceballos (2002) 13

Figura 4: Talo heterómero. Corte transversal del talo en Sticta aff. weigelii . De arriba hacia abajo, flechas señalando la corteza superior, capa del fotobionte, médula, corteza inferior, respectivamente. Fotografía propia. 17

Figura 5: Esquema general del flujo del carbono en el líquen. Ilustración extraída y modificada de Brodo et al. (2001) 19

Figura 6: Flujo metodológico utilizado para la realización de los objetivos específicos del presente trabajo. 29

Figura 7: Mapa de ubicación del sitio de estudio Parón arriba y las coordenadas UTM de sus transectos. 30

Figura 8: Mapa de ubicación del sitio de estudio Parón abajo y las coordenadas UTM de sus transectos. 31

Figura 9: Mapa de ubicación del sitio de estudio Querococha arriba y las coordenadas UTM de sus transectos. 31

Figura 10: Dimensiones de los transectos utilizados para el muestreo de líquenes 32

Figura 11: Análisis de la liquenobiota del sitio de estudio Parón arriba. a) Rango por abundancia de los líquenes colectados en este sitio de estudio, b) Abundancia según el biotipo, c) Abundancia según el hábito que presentan las especies de líquenes de este sitio de estudio. 48

Figura 12: Análisis de la liquenobiota del sitio de estudio Parón abajo. d) Rango por abundancia de los líquenes colectados en este sitio de estudio, e) Abundancia según el biotipo, f) Abundancia según el hábito que presentan las especies de líquenes de este sitio de estudio 49
Figura 13: Análisis de la liquenobiota del sitio de estudio Querococha Arriba. d) Rango por abundancia de los líquenes colectados en este sitio de estudio, e) Abundancia según el biotipo de líquen, f) Abundancia según el hábito que presentan las especies de líquenes de este sitio de estudio. 50
Figura 14: Distribución de las familias taxonómicas de los líquenes presentes en los sitios de estudio 51
Figura 15: Comparación de los valores del índice de diversidad de Shannon entre los sitios de estudio 51
Figura 16: Gráficas de barra de las concentraciones medias bioacumuladas para cada metal, según las especies de líquenes y los sitios de estudio donde se colectaron. 53
Figura 17: Diagramas de cajas de las concentraciones del manganeso bioacumulados en función al sitio de estudio. 55
Figura 18: Diagramas de cajas de las concentraciones del arsénico bioacumulados en función a la especie de líquen 55
Figura 19: Diagramas de cajas de las concentraciones del arsénico bioacumulados en función al sitio de estudio. 56
Figura 20: Matriz de correlaciones entre los metales bioacumulados (las variables) y significancia ($p<0.05$). Nota: Las aspas (X) indican correlaciones no significativas. 57
Figura 21: Círculo de correlaciones entre las variables (metales pesados bioacumulados) y los primeros dos componentes principales. 58
Figura 22: Gráfica del paquete corrplot indicando mediante gradiente de color azul, los valores de Cos2 de cada metal en cada componente principal 59

Figura 23: Plot de los primeros dos componentes principales para los individuos (Nlíquenes=27), agrupados en elipses según el tipo de especie (izquierda) y los sitios de estudio (derecha). 60
Figura 24: Concentraciones de los metales presentes en las muestras compuestas de suelo obtenidas en cada transecto. 62
Figura 25: Comparación de rangos de abundancia entre los metales presentes en los suelos y en los líquenes (*Usnea* y *Sticta*) en Parón arriba. 63
Figura 26: Comparación de rangos de abundancia entre los metales presentes en los suelos y en los líquenes (*Usnea* y *Sticta*) en Parón abajo. 64
Figura 27: Comparación de rangos de abundancia entre los metales presentes en los suelos y en los líquenes (*Usnea* y *Sticta*) en Querococha arriba. 65
Figura 28: Comparación entre los FEs de varios metales en los líquenes (Usnea sp) del Himalaya y los Alpes. Fuente: Imagen extraída del artículo de Bergamaschi et al. (2005) 84

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Registro taxonómico para las especies de líquenes registrados por sitio de estudio 103

Anexo 2: Fichas de caracteres taxonómicos de los líquenes seleccionados para el estudio de biomonitoreo de metales pesados. 105

Anexo 3: Álbum de fotos de las especies de líquenes registrados en los sitios de estudio (Excepto Usnea sp1, Usnea sp2 y Sticta weigelii, mostradas en el Anexo anterior) 107

Anexo 4: Permiso de colecta por el SERNANP 116

Anexo 5: Informes de ensayo de metales pesados en las muestras de líquenes y suelos 122

Anexo 6: Tabla de resultados de las concentraciones de metales bioacumulados transformados a mg/kg peso seco del líquen (ppm) 126

Anexo 7: Tabla de resultados de las concentraciones de metales en los suelos de los sitios de estudio transformados a mg/kg 127

Anexo 8: Análisis exploratorio de los datos (Salidas del software R) 128

Anexo 9: Tabla con las estadísticas descriptivas de la data winzorizada de metales en líquenes 129

Anexo 10: Histogramas múltiples de densidad de los valores bioacumulados de metales con ajustes a la curva normal (data post winzorización) 130

Anexo 11: Pruebas de normalidad de los valores de los metales post winzorización (Salidas del software R) 130

Anexo 12: Salidas del software R de los resultados del análisis de varianzas de dos vías (Two-way ANOVA) para la evaluación del efecto de los sitios de estudio y/o el tipo de especie de líquen sobre los valores de los metales pesados bioacumulados 132

Anexo 13: Salidas del software R de los resultados del test no paramétrico Kruskal-Wallis aplicados a las variables sitios de estudio y/o el tipo de especie de líquen 135
Anexo 14: Análisis de correlación de los metales bioacumulados con sus coeficientes de correlación de Spearman 137
Anexo 15: Salidas del software R del análisis de componentes principales aplicado a los metales bioacumulados 138

RESUMEN

Los líquenes son considerados acumuladores de una variedad de contaminantes como los metales pesados, por lo que son usados para determinar el estado de estos elementos en el ambiente en una zona específica. El objetivo de este estudio fue evaluar a los líquenes como bioindicadores de la presencia de diez metales pesados en las partes altas de dos subcuencas de la Cordillera Blanca (Ancash, Perú): Llullán-Parón (02 sitios adyacentes a la laguna de Parón) y Yanayacu (01 sitio próximo a la laguna de Querococha). Como primera aproximación se evaluó las diferencias de liquenobiota entre los sitios de estudio afín de determinar si estas diferencias responden a posibles efectos de toxicidad de los metales en el ambiente ó, a condiciones netamente naturales de los lugares en estudio, de donde, posteriormente, se infirió lo último. Luego, 03 especies, de las 33 especies de líquenes identificadas, fueron seleccionadas para la determinación de las concentraciones de metales pesados bioacumulados: dos especies del género *Usnea*, uno de hábito saxícola y el otro cortícola, y un líquen folioso de la especie *Sticta weigelii*. Los resultados de los metales, analizados por ICP-MS, fueron evaluados con una ANOVA para dos factores: "lugar de estudio" y "tipo de especie", obteniéndose resultados significativos que mostraron una mayor bioacumulación de Mn en los sitios de Parón y de As en Querococha. Mientras que, a nivel de especie, se registró una mayor bioacumulación de "As" en la especie *Sticta weigelii* que las especies del género *Usnea*. El análisis de correlaciones y de componentes principales mostró una fuerte relación de la mayoría de metales con los elementos litofílicos Al y Fe indicando que el mecanismo de bioacumulación fue principalmente a través del "atrapamiento de partículas". Finalmente, se evaluó el aporte de metales del suelo hacia los líquenes mediante la comparación de rangos de abundancia de metales entre los líquenes y suelos, y el análisis de factores de enriquecimiento, dando como resultado un evidente aporte de los suelos en la composición metálica en los líquenes aunque para algunos elementos como el Cr, As, Pb y Zn, una parte del aporte provendría de un transporte atmosférico de partículas provenientes de actividades antrópicas en ambos sitios de estudio.

Palabras clave: líquenes, metales pesados, bioindicadores, género *Usnea*, *Sticta weigelii*, Llullán-Parón, Yanayacu, laguna de Parón, laguna de Querococha, Cordillera Blanca, factor de enriquecimiento.

ABSTRACT

Lichens are mostly considered as accumulators of a variety of pollutants such as heavy metals, so they are used to determine the level of these elements in the environment in a specific area. The objective of this study was to evaluate lichens as bioindicators for the presence of ten heavy metals in the highlands of two Cordillera Blanca main basins: Llullán-Parón (02 sites near to the Parón Lake) and Yanayacu (01 site near to the Querococha Lake). As a first approximation, the differences between the study sites lichen communities were evaluated in order to determine whether they respond to possible effects of metal toxicity in the environment or to purely natural conditions, although finally the latter was inferred. Then, 03 species, of the 33 species of lichens identified, were selected for the bioaccumulation assessment: two species of the genus *Usnea*, one saxicolous (growing on rock surface) and the other corticolous (growing on tree bark), and the foliose lichen specie *Sticta weigelii*. The metals concentration values, obtained by ICP-MS, were evaluated with an ANOVA for two factors: "study site" and "species type". As a result, the manganese values were significantly higher in Parón's sites, while arsenic values, in Querococha's sites. At the species level, a higher As bioaccumulation was recorded in the *Sticta weigelii* species than the species of the genus *Usnea*. The correlation and principal component analysis showed a strong relationship of most metals with the lithophilic Al and Fe elements indicating that the bioaccumulation mechanism was mainly through "Particulate entrapment" uptake. Finally, the contribution of metals from the soil to the lichens was evaluated by comparing the element ranks in lichens and soils, and the analysis of Enrichment Factors for each element, resulting in an evident contribution of the soils on the elemental composition of the lichens. However, for some elements such as Cr, As, Pb and Zn, part of the contribution would come from an atmospheric transport of particles associated to anthropic activities in both study sites.

Keywords: lichens, heavy metals, bioindicators, genus *Usnea*, *Sticta weigelii* specie, Llullán-Parón, Yanayacu, Parón Lake, Querococha Lake, Cordillera Blanca, Enrichment Factor.

I. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, se han realizado diversos estudios que han demostrado la presencia de metales pesados (elementos trazas) de origen antrópica en zonas muy alejadas de cualquier fuente de contaminación, incluso alcanzando lugares remotos. Así, quedó evidenciado en los estudios de Wolff y Suttie (1994) y Wolff et al. (1999), ambos efectuados en la Antártida; de Barbante et al. (2003), en Groenlandia y de Shotyk et al. (2005), en el Ártico canadiense. Asimismo, estudios de esta misma naturaleza se han realizado en cadenas montañosas, como los Alpes italianos (Gabrielli et al. ,2006) y en los Andes, donde se tienen los estudios de Ferrari et al.(2001) y de Correia et al. (2003), llevados a cabo en los glaciares bolivianos de Sajama y de Illimani, respectivamente. Los elementos metálicos de origen antrópico encontrados en la mayoría de estos estudios correspondieron al Pb, Cu y Zn, cuyo origen estaría en las emisiones por combustión de gasolina o actividades extractivas mineras, fundiciones e industria química. Aunque también existió una alta contribución de partículas que conforman la corteza terrestre, como es el polvo de suelo o de roca, suspendido en el aire y transportado hasta esas zonas. En el Perú también se tienen evidencias de este fenómeno, como el estudio realizado por Jaworowski et al. (1981) en la Cordillera Vilcanota (Cordillera Oriental peruano). Incluso, en la Cordillera Blanca (Cordillera Occidental peruano), donde se desarrolló el presente estudio, Wallis (2016), registró la presencia de metales pesados en siete glaciares, en cantidades, que en algunos casos, superaron estándares internacionales de calidad de agua.

La evaluación de la deposición atmosférica de estos elementos metálicos presentes en las partículas en suspensión seca o húmeda (sea de origen natural o antrópico), es compleja, debido a sus concentraciones muy bajas. Sin embargo, la acumulación en organismos biológicos supera esta dificultad. Los líquenes, son bien conocidos por su capacidad para la bioacumulación, ya que, acumulan más contaminantes que las plantas vasculares (Agnan et al. ,2013). Éstos consisten en asociaciones simbióticas de lento crecimiento entre hongos (micobiontes) y algas o cianobacterias (fotobiontes), el cual forma una estructura común denominado talo que no posee raíces, tampoco cutículas ni estomas. Sin embargo, la ausencia de estas estructuras hace que estos organismos simbióticos puedan capturar y

acumular directamente contaminantes atmosféricos gaseosos (Garty ,2001, Zvěřina et al. ,2014) y aquellos provenientes del suelo (Węgrzyn et al. ,2016). Por lo tanto, debido a estas características, sumada a su naturaleza cosmopolita, los líquenes son utilizados comúnmente como bioindicadores de metales pesados presentes en el aire (Garty ,2001,Węgrzyn et al. ,2016), tanto en áreas próximas a las ciudades, como en regiones lejanas de las actividades antrópicas, como el Ártico, la Antártida y las cumbres de alta montaña, donde estos organismos representan uno de los mayores componentes bióticos. De hecho, ya existen estudios utilizando líquenes como bioindicadores, entre los cuales se encuentran, los realizados por Rivera et al. (2018), Poblet et al. (1997), Zvěřina et al. (2014), en la Antártida; los de Darnajoux et al.(2015), Nash III y Gries (1995), Węgrzyn et al (2016), en el Ártico; el de Riget et al. (2000), en Groenlandia; el de Bergamaschi et al. (2005), en los Himalaya y Alpes; y los de Conti et al. (2009) y Conti et al.(2012) en la Patagonia, Argentina. En general, estos estudios tuvieron como objetivo establecer una línea base que sirva de referencia para el monitoreo de metales pesados evaluados a mediano y largo plazo, logrando con ello un mejor diagnóstico sobre el estado de conservación de estos sitios, considerados prístinos. Sin embargo, para las zonas montañosas de gran altitud en los Andes peruanos, casi no existen estudios de bioindicación mediante líquenes, por lo que este trabajo buscó generar este tipo de información en una las cordilleras montañosas más importantes del país, la Cordillera Blanca, la cual concentra la mayor cantidad de glaciares tropicales del mundo (Wallis ,2016). Para ello, este estudio se planteó los siguientes objetivos:

Objetivo general

Evaluar a los líquenes como bioindicadores de presencia de metales pesados en la parte alta de dos subcuencas de la Cordillera Blanca: Llullán-Parón y Yanayacu.

Objetivos específicos

1. Evaluar la composición liquénica presente en las partes altas de las dos subcuencas.
2. Medir la concentración de metales pesados en los líquenes fruticosos y foliosos que habitan estos sitios y evaluar sus posibles fuentes de variabilidad.
3. Estimar el grado de aporte de los metales pesados provenientes de los suelos en los líquenes.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 PRESENTACIÓN DEL ÁMBITO DE ESTUDIO

El ámbito de estudio abarcó el área de dos microcuencas localizados en las partes altas de las subcuencas Llullán-Parón y Yanayacu pertenecientes a la Cordillera Blanca en el departamento de Ancash (Figura 1): la microcuenca de Parón y la microcuenca de Yanamarey, respectivamente.

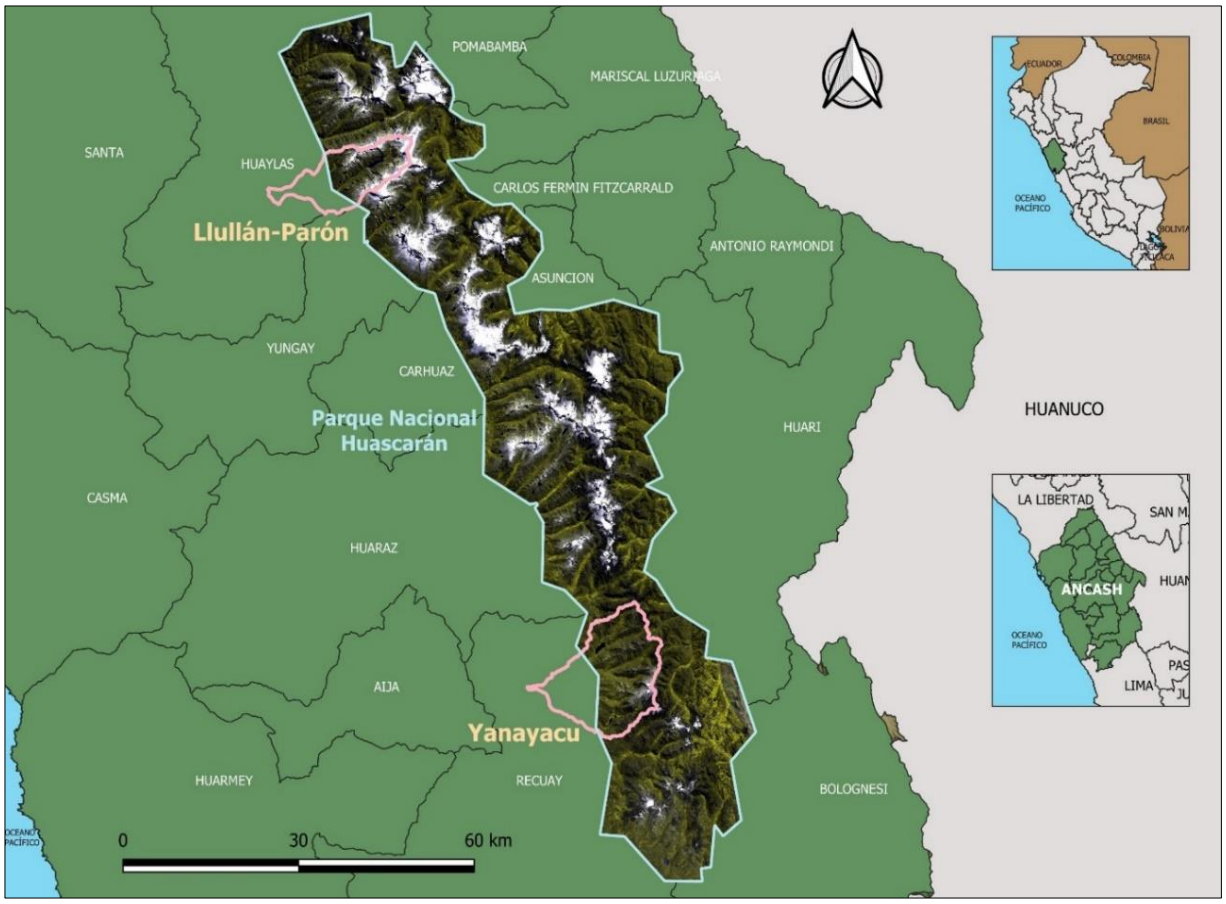


Figura 1: Mapa del ámbito de estudio. Subcuencas de Llullán-Parón y de Yanayacu, en el norte y sur, respectivamente, de la Cordillera Blanca, dentro del Parque Nacional Huascarán, Departamento de Ancash, Perú.
FUENTE: Base de datos (INAIGEM, 2019)

La microcuenca de Parón se ubica en la provincia ancashina de Huaylas a 32 km al noreste de la ciudad de Caraz. Está caracterizada por la presencia de un conjunto de glaciares que rodean a la laguna de Parón (con coordenadas UTM 18L 206609.88 m E, 9004906.52 m S), considerada como la laguna más grande de origen glaciar de la Cordillera Blanca. Sus dimensiones son de aproximadamente de 3 km de largo y 0.8 km de ancho. Los glaciares que rodean a esta laguna son, al sur, los glaciares Huandoy y Chacraraju; por el norte, el glaciar Artesonraju, Caraz y Aguja Nevada y el glaciar Pirámide por el este (ONDS y PCM ,2014). Por otra parte, la microcuenca de Yanamarey está localizada a 15 km al este del poblado de Catac, en la provincia ancashina de Recuay. En su parte más alta se ubica el glaciar de montaña del mismo nombre cuyas aguas drenan sobre la laguna de Querococha, considerado la segunda laguna más grande de esta Cordillera. Cabe señalar que ambas microcuencas se encuentran dentro del Parque Nacional Huascarán siendo de los lugares más estudiados de la hidrología glaciar en esta parte de la Cordillera de los Andes Peruanos (Bury et al. ,2011).

2.1.1 Clima del ámbito de estudio

El ámbito de estudio abarca las regiones naturales de Suni (3500 a 4000 msnm) y Puna (4000 a 4800 msnm) cuyas temperaturas se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 1: Temperaturas del ámbito de estudio por regiones naturales (SERNANP ,2011)

Regiones Naturales	**Temperatura (°C)**		
	Mínima	Media	Máxima
Suni	-16 a -1 (mayo a agosto)	7 a 10	>20
Puna	-25 a -9 mayo a agosto)	0 a 7	15 a 22 (septiembre a abril)

Los meses de estación seca se dan entre los meses de mayo a noviembre mientras que la estación húmeda, de diciembre a abril, tal como sucede en casi toda la región andina. En la microcuenca de Parón, la temperatura media anual es de 6,6 °C, con una humedad relativa en promedio anual de 68% y una precipitación media anual de 800 mm – 900 mm. (Untiveros ,2011).

Mientras que, en la microcuenca de Yanamarey, el Plan Maestro del Parque Nacional Huascarán (SERNANP ,2011), se cita a Silverio (2003) quien menciona que durante los

años 1965 a 1986, a 3955 msnm, la estación de Querococha registró una temperatura media de 7,7 °C (mínima 1,6 y máxima 13,8).

2.1.2 Zonas de vida del ámbito de estudio

Según el mapa ecológico elaborado por la Oficina Nacional de Evaluación de Recursos Naturales – ONERN, basado en los Sistemas de Zonas de Vida de Holdridge, el ámbito de estudio presenta las siguientes zonas de vida:

- Páramo Pluvial Subalpino Tropical: Presentes en las dos microcuencas, por debajo de la zona de vida Nival Tropical. Esta zona de vida se encuentra dentro de los 3900 y 4500 msnm. Asimismo presenta una biotemperatura media anual que varía entre 3°C y 6 °C y un promedio máximo de precipitación total máxima por año de 1819 milímetros. De acuerdo al Diagrama Bioclimático de Holdridge, la evapotranspiración potencial total por año varía entre la octava parte y la cuarta parte del promedio de la precipitación total por año, caracterizando a la humedad como superhúmedo. Es posible encontrar pequeños árboles del género *Polylepis* (INRENA ,1994).
- Tundra pluvial Alpino Tropical: Presente solamente en la microcuenca de Yanamarey. Geográficamente se encuentra entre los 4300 y 5000 msnm. La biotemperatura media anual es de 3,2 °C, asimismo, el promedio de evapotranspiración total por año varía, entre la octava y la cuarta parte del promedio de la precipitación total por año dándole una característica de superhúmedo. A nivel de suelos, estos pueden tener naturaleza ácida presentando un horizonte A oscuro, rico en materia orgánica. En lo que respecta al tipo de vegetación, esta zona de vida presenta una diversidad florística de arbustos, semiarbustos y hierbas de tipo graminal. En los lugares pedregosos habitan líquenes crustosos como el *Rhizocarpum geographicum*. (INRENA ,1994)

2.1.3 Geología del ámbito de estudio

Las dos microcuencas se localizan próximos a los glaciares de la Cordillera Blanca donde las formaciones geológicas corresponden básicamente a depósitos sedimentarios productos de procesos de erosión glaciar durante la era Cuaternaria y a la presencia de la unidad plutónica (intrusiva) del Batolito de la Cordillera Blanca formado a finales del Cretácico.

En el mapa geológico del Perú realizado por el Instituto Geológico, Minero, Metalúrgico (INGEMMET ,1995), la geología de los ámbitos de estudio se encuentran descritas por las cartas geológicas 18-h Corongo y 19-h Carhuaz para la microcuenca de Parón y la carta 20-i Recuay para la microcuenca de Yanamarey.

De forma específica, las microcuencas de Parón y de Yanamarey están conformadas por las siguientes unidades litoestratigráficas:

A nivel de Unidades Sedimentarias / Volcánicas:

La microcuenca de Parón presenta las siguientes unidades:

- Qh-gl: Son depósitos glaciares, conformados por acumulaciones morrénicas resultado de la erosión del hielo producido por su movimiento. Los materiales varían en su tamaño y composición existiendo arcillas, gravas y bloques con matriz arenosa y limoarcillosa.
- Qh-fg: Son depósitos fluvioglaciares, resultados de la erosión de las corrientes de agua de fusión sobre los depósitos glaciares, conformados por gravas subredondeadas con matriz areno-limosa.

  Entre las dos unidades abarcan un total del 50% del área total de la microcuenca de Parón.

Por otro lado, la microcuenca de Yanamarey presenta las siguientes unidades:

- Qh-gf: Esta unidad corresponde a depósitos glaciofluviales con gravas subredondeadas con matriz areno-limosa.
- Q-mo: Esta unidad corresponde a depósitos morrénicos, conformada por gravas subredondeadas a subangulosas con matriz arena-limosa.

  Entre estas dos unidades abarcan solamente un 18% del área total de la microcuenca de Yanamarey.

A nivel de Unidades intrusivas

- Nm-cb/gd, to: Presente en ambas subcuencas. Esta unidad corresponde al Batolito de la Cordillera Blanca, conformado por rocas intrusivas entre ellas, el granito, granodiorita, diorita y tonalita de grano grueso. En la microcuenca de Parón, representa un 40% de su área mientras que en la microcuenca de Yanamarey representa un 45% de su área.

- Js-ch: Formación Jurásica Chicama, rocas sedimentarias conformadas por lutitas y pizarras con intercalaciones delgadas de arenisca. Solo está presente en la microcuenca de Yanamarey, donde representa el 35% de su área.

2.1.4 Mineralogía del ámbito de estudio

Como se mencionó en el acápite anterior, dentro de la geología en la Cordillera Blanca, se encuentra el complejo plutónico conocido como Batolito de la Cordillera Blanca, el cual está

constituido de granito, granodiorita y diorita que son los minerales más comunes. Aquellos minerales que están en contacto con el batolito en forma abundante son la zoicita (silicatos) y la andalusita (aluminosilicato). Asimismo, el cuarzo es abundante constituyendo entre 10-15% de la roca aunque también existen afloramientos de granito (Wilson, J.J., Reyes, L., Garayar ,1967).

La deposición de los metales base presentes en la Cordillera Blanca tendría origen de la actividad ígnea durante su formación a fines del Cretácico que interaccionaron con rocas del Jurásico (v. g. depósitos de la Formación Chicama) sufriendo transformaciones en rocas metamórficas. De modo que, el batolito de la Cordillera Blanca incluye la presencia de rocas metamórficas con litologías ricas en sulfuros como la pirita (sulfuro de hierro) los cuales en muchos casos se encuentran cubiertos por sedimentos clásticos depositados durante el retroceso glacial. Este tipo de rocas ocupan especialmente las regiones de grandes altitudes del noreste de la Cordillera Blanca (Fortner et al. ,2011, Wilson et al.,1967) por donde se localizan los ámbitos de estudio.

Los minerales sulfurosos más comunes hallados en las rocas que conforman el Batolito de la Cordillera Blanca, son la galena (PbS), la esfalerita (ZnS) y pirita (FeS), aunque también es posible encontrar calcopirita ($CuFeS_2$), tennantita ($Cu_{12}As_4S_{13}$), arsenopirita (FeAsS) y estibina (SbS_3). Cabe señalar que estos minerales se encuentran acompañados por otros elementos metálicos, como por ejemplo, la esfalerita, que tiene contenida al hierro por lo que la fórmula más precisa sería (Zn,Fe)S; asimismo, la galena contiene plata, de ahí que se le conoce también como galena argentífera (Bodenlos y Ericksen ,1955).

Por otro lado, de acuerdo a los estudios mineralógicos efectuados por Wilson et.al (1967), además del batolito, como fuente de metales, existe una faja mineralizada que recorre el Flanco Oriental de la Cordillera Blanca y sus continuaciones al norte, sobre el cual se encuentran repartidos principalmente depósitos metálicos de plomo, zinc y plata, y en menor cantidad minerales de cobre, tungsteno y molibdeno.

2.1.5 Suelos del ámbito de estudio

De acuerdo a la Clasificación de suelos elaborado por ONERN en el Perú, los ámbitos de estudio presentan un tipo de suelo descrito como Regosol dístrico - Afloramiento lítico (con símbolo RGd-R). Los suelos de tipo Regosol se caracterizan por ser poco desarrollados, poco evolucionados y poco profundos (inferior a los 25 cm), sin presencia de horizontes distintivos y formados a partir de materiales no consolidados de origen aluvio coluvial,

fluvioaluvial localizados en terrazas medias o en forma de deposiciones en laderas. Su proceso de formación es muy lento desarrollándose sobre aportes recientes no aluviales o sobre zonas que están bajo fuertes procesos erosivos que hacen rejuvenecer los suelos continuamente. Dentro de sus características físicas se encuentran una escasa retención de agua debido a su delgado espesor y a una textura gruesa con bajo contenido de materia orgánica. Es por ello, que su capacidad agrícola es muy escasa por lo que su aptitud está orientada básicamente a tierras de protección y forestales con fines de protección (Pomas Rojas W y Alcántara Boñon G.H ,2012).

El término dístrico hace alusión a que estos suelos tienen una saturación de bases (Ca, Mg, Na, K, determinados por acetato de amonio 1M) menor del 50 por ciento, asimismo por presentar pH ácido (Alfaro Sanchez y Cervantes Borja ,1987).

2.2 METALES PESADOS

El término metales pesados ha recibido un uso generalizado y popular como metales potencialmente tóxicos con una gravedad específica cercanos o mayores a 5 (Garty ,2001). Sin embargo, algunos autores han agrupado a los metales en Clase A, Clase B y Clase Intermedia de acuerdo a los grupos químicos que presentan y afinidad de unión al ligando. Por tanto, se tiene a los metales de clase A que buscan unirse al oxígeno (o donadores O- N- S-) y los de clase B que buscan unirse al nitrógeno o azufre (o donadores S- N- O-) y los metales intermedios (Nieboer y Richardson ,1980). Los metales pertenecientes a la clase A son el Cs, Th, U, Al, Ba, Be, Ca. Ce, Eu, K, La, Li, Lu, Mg, Na, Nd, Sc, Sm, Sr, Tb, Y y Yb a la clase B pertenecen los elementos Cu, Hg y el Pb. Finalmente al grupo intermedio como el As, Cd, Co, Cr, Fe, Ga, Mn, Ni, Sn, Ti, V y Zn han sido detectados en líquenes (Nash III ,1996).

La presencia de metales pesados puede tener diversos orígenes; proveniente de la meteorización química de unidades geológicas o sedimentológicas, efluentes domésticas o industriales y de actividades mineras (Guittard et al. ,2017).

2.3 PRESENCIA DE METALES PESADOS EN LOS GLACIARES DE LA CORDILLERA DE LOS ANDES

A lo largo de las últimas décadas diversos estudios han puesto en evidencia que diferentes contaminantes provenientes de la actividad antropogénica o de la misma naturaleza pueden ser transportados por la atmósfera hasta llegar lugares remotos y/o prístinos como son los

ecosistemas de alta montaña y en los glaciares del cual forman parte. De manera que, se tiene evidencia de presencia de metales en los glaciares de la Cordillera de los Andes. A continuación, se presenta dos estudios de ejemplo.

En el glaciar Marinelli, localizado en la Cordillera Darwin, Tierra del Fuego, Chile, Grigholm et al. (2009) halló en muestras de nieve, valores de factor de enriquecimiento[1] bastante elevados en los elementos bismuto (Bi) y cadmio (Cd) que sugiere que estos elementos provendrían de fuentes antropogénicas o que estarían asociados a un transporte de largo rango de contaminantes antropogénicas cuyo origen estén en las actividades portuarias de la ciudad de Punta Arenas, tráfico marino o a actividades de tala.

Mientras que para el caso de los Andes Peruanos, a nivel de la Cordillera Blanca, al cual pertenecen los ámbitos de estudio, un estudio realizado por Wallis (2016) mostraron que las muestras de nieve obtenidas de siete montañas localizadas con mayor proximidad a la ciudad capital de Huaraz (Ishinca, Tocllaraju, Urus Este, Vallunaraju), presentaban valores significativamente mayores en concentración de los metales Pb, As, Mn, Ca, que aquellas que estaban más alejadas de esta ciudad (Alpamayo, Pisco, Yannapacha). Incluso, en algunos casos, los valores de estos metales superaban a los límites que el USEPA (United States Environmental Protection Agency) establece para minimizar el riesgo de la mayoría de las especies acuáticas que están bajo exposiciones crónicas y agudas de contaminantes.

2.4 BIOINDICADORES Y BIOMONITORES AMBIENTALES

El término “Bioindicador” se refiere a la respuesta de los organismos frente a la presencia y cantidad de contaminantes presentes en el ambiente (Garty ,2001). En ese sentido, los organismos bioindicadores son organismos que pueden ser usados para determinar de forma cualitativa o cuantitativa, los impactos antrópicos sobre el ambiente (Conti y Tudino ,2016). Los bioindicadores pueden categorizarse en tres grandes grupos: a) un grupo de especies que manifiestan cambios de presencia y ausencia frente a las perturbaciones, b) verdaderos indicadores que muestran daño proporcional a la concentración del contaminante, c) acumuladores de materiales potencialmente tóxicos en alguna de sus estructuras (Garty ,2001, Díaz ,2006). Aunque, si el organismo bioindicador es capaz de brindar información de naturaleza cuantitativa respecto a los niveles de contaminación y mostrar los cambios en

[1] Relación de la concentración de un elemento con respecto a elementos asociados a la composición de la corteza terrestre como el Al, Fe o el Ti.

una escala temporal, se denominan biomonitores (Garty ,2001). Estos últimos pueden clasificarse como sensitivos o acumulativos. Los biomonitores **sensitivos** son usados para estimar los efectos biológicos de los contaminantes mediante la medición de cambios en la estructura poblacional o de comunidad, cambios morfológicos, o de alteraciones en la actividad de los sistemas enzimáticos y la actividad fotosintética o respiratoria, pudiendo actuar estos cambios, como sistemas de alarmas frente al efecto nocivo de los contaminantes (Conti y Tudino ,2016). En lo que respecta a los biomonitores de tipo **acumulativo**, éstos tienen la capacidad de almacenar contaminantes en sus tejidos pudiendo relacionarse con las concentraciones de estos agentes en el medio (Barreno y Pérez ,2003).

Un gran número de organismos son usados como bioindicadores (o biomonitores, según el tipo de información brindada), tanto en ecosistemas acuáticos como en ecosistemas terrestres. Estos pueden ser vegetales como las algas, musgos, pastos, árboles; o animales que incluyen el uso de invertebrados hasta mamíferos.

Los líquenes en los últimos 30 años han sido considerados como los bioindicadores más confiables de calidad de aire debido a sus características anatómicas y fisiológicas detallados en el acápite anterior y por otras características que se explicarán a continuación.

2.5 LÍQUENES

Los líquenes o también llamados hongos liquenizados forman parte del reino Fungi. Estos organismos son el resultado de una asociación simbiótica entre dos tipos de microorganismos: un hongo (o también llamado micobionte), heterótrofo y un organismo fotosintético (o también llamado fotobionte), autótrofo el cual puede ser un alga y/o una cianobacteria (Ramos et al. ,2013, Signoret ,2018), éstos últimos también denominados algas verdeazules. De esta manera, esta asociación es sostenido por los diferentes roles que cumplen cada componente: el fotobionte como proveedor de carbohidratos y el micobionte, como proveedor de humedad, nutrientes y vitaminas para la asociación. Asimismo, el contacto físico de ambos microorganismos da origen a una estructura estable denominado talo, el mismo que presenta una morfología, anatomía, fisiología, genética y ecología específicas (Barreno y Pérez-Ortega ,2003).

Sin embargo, los líquenes no son considerados como un grupo taxonómico, sino que su taxonomía está basado en la taxonomía del micobionte (Oksanen ,2006) ya que el

componente micobionte es el constituyente esencial de la biomasa liquénica representando aproximadamente un 90% de la masa seca.

Se estima que existen aproximadamente 13500 especies de líquenes dentro de 600 géneros. (Castro Mandujano ,2010) aunque otras fuentes estiman que hay entre 17500-20000 especies con cerca de 1500 hongos liquenícolas (Illana-Esteban ,2012).

Los líquenes pueden ser considerados como ecosistemas donde la interacción de los hongos, algas y/o cianobacterias resulta en una forma y comportamiento de vida particular no observado de manera aislada en los integrantes que la conforman (Nash III ,1996) . Aunque vale señalar que, solo algunos hongos de esta asociación pueden vivir sin su componente fotosintético mientras que éste último puede a menudo vivir independientemente de la presencia del micobionte (Signoret ,2018). Por ello, hoy en día todavía está en debate la naturaleza simbiótica de los líquenes. Algunos autores presentan a los líquenes como un caso clásico de mutualismo donde ambos componentes se benefician de la asociación casi en el mismo grado de importancia, mientras que otros autores lo ven como un caso de parasitismo, ya que el micobionte, al parecer, obtiene mayor beneficio a costa de mermar el normal crecimiento y desarrollo del fotobionte cuando está en su estado libre (Castillo Rodríguez ,2011). También se ha descubierto en los últimos años, que un tercer componente se sumaría a la naturaleza dual del líquen, tradicionalmente definida como la simbiosis entre un único elemento micobionte y un único fotobionte. Este componente correspondería a levaduras basidiomicetas específicas incrustadas en la corteza que participaría en la formación de esta estructura (Spribille et al. ,2016).

2.5.1 Fotobiontes

Cerca de 40 géneros de algas y cianobacterias han sido reportados como fotobiontes en los líquenes. Las algas son mayormente representadas por las clorofíceas o algas verdes del phylum Chlorophyta (90%) de la familia Trebouxiophyceae y Ulvophyceae (Shukla et al. ,2013), solo el 10% por las cianobacterias y 3% por ambos alga verde y cianobacterias juntos como sucede en el género *Stereocaulon* (Mercado-Díaz et al. ,2015). En el lado de las algas verdes los géneros, *Trebouxia* y *Trentepohlia*, son los fotobiontes más frecuentes de naturaleza eucariota, en tanto que, en el lado de las cianobacterias, el género *Nostoc* es el principal representante perteneciente a las bacterias fotosintéticas oxigénicas.

Los fotobiontes eucarióticos generalmente presentan pigmentación debido a la presencia de clorofila a y b, presentes también en las plantas terrestres, en tanto que las cianobacterias no

presentan cloroplastos, mitocondrias ni núcleo definido. La transferencia metabólica del fotobionte autótrofo al micobionte heterótrofo depende del tipo de fotobionte implicado. En los líquenes con fotobiontes de algas verdes, los carbohidratos producidos son los alcoholes de azúcar como el sorbitol, manitol, ribitol o eritrol; en los líquenes con cianobacterias es la glucosa (Friedl y Büdel ,2008).

En estado liquenizado, tanto las algas como las cianobacterias sufren algunas modificaciones. En las algas la reproducción se ve limitada a su forma asexual mientras que en las cianobacterias presentan mayor cantidad de heterocistos permitiéndoles fijar mayor cantidad de nitrógeno (Friedl y Büdel ,2008).

En un estado de vida libre, el alga tropical filamentoso *Trentepohlia* (Fig. 1.C), es observado frecuentemente en forma libre, mientras que el alga verde *Trebouxia* (Fig. 1.B), es raro encontrarse en forma no-liquenizado (Mercado-Díaz et al. ,2015).

Figura 2: Fotobiontes frecuentemente observados en las simbiosis liquénicas. Cianobacteria A. *Nostoc*, Algas verdes (B-C): B. *Trebouxi*a, C. *Trentehpolia*. Imágenes extraídas de Friedl y Büdel (2008)

2.5.2 Micobiontes

Los hongos son organismos heterótrofos que han desarrollado varias estrategias para la obtención de carbohidratos. Uno de cada cinco especies de hongos es liquenizado. Mayormente las especies de hongos liquenizados pertenecen al phylum Ascomycota (98%), mientras que sólo el 0.4% corresponde al Phylum Basidiomycota y el 1.5% (200 especies) pertenecen a hongos anamórficos. El 42% de los Ascomicetos están liquenizados (13500 especies) todos perteneciendo al subphylum Pezizomycotina. A nivel de categorías taxonómicas inferiores, el Orden Lecanorales es el Orden más grande que agrupa a 5500 especies de hongos casi en su totalidad en forma liquenizada. La liquenización permite la

obtención de carbono fijo proveniente de las células algales y cianobacterial. Algunos hongos formadores de líquenes pertenecen a órdenes con estrategias nutricionales únicas mientras que otras pertenecen a órdenes con diversas estrategias de obtención de nutrientes (Honegger ,2008). En contraste a la capacidad de vida libre de los fotobiontes, los hongos de los líquenes casi siempre son simbiontes estrictos y no son capaces de prosperar en la naturaleza sin el fotobionte adecuado, es decir que estos hongos son simbiontes obligados. Los hongos separados del fotobionte forman un micelio carente de organización donde no existe diferenciación celular propia del talo del líquen. También son incapaces de formar un cuerpo reproductivo bien estructurado

2.5.3 Relación física entre los simbiontes

La interacción física que se presenta entre los simbiontes puede darse sin contacto, propiamente dicho, y con contacto físico. El primer caso es observado en los líquenes gelatinosos. Las hifas pasan a lo largo de las cianobacterias (algas verde-azules) y mediante una gelatina gonoidal producida por el fotobionte, las sustancias producidas por los simbiontes se difunden. Esta interacción es considerada como primitiva y es típica en los líquenes del género *Collema* sp. (Figura 2A).

En el segundo caso, el contacto físico entre los simbiontes se presenta como un recubrimiento estrechamente adherido de la hifa sobre el ficobionte (Figura 2B) o por haustorios de tipo intramembranoso (Figuras 2C y 2D) o intracelular (Figuras 2E, 2F y 2G). Los líquenes con talos pobremente desarrollados tienen haustorios intracelulares, mientras que los líquenes con un talo más compacto los presentan intramembranoso.

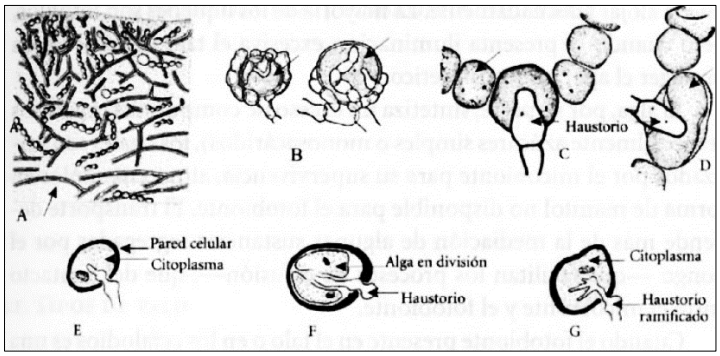


Figura 3: Contacto Físico del Fotobionte. A. *Collema*, B. *Cladonia*, C, D. *Lempholemma*, E-G Haustorios intracelulares en Clorofíceas. Imágenes extraídas de Chaparro de Valencia y Aguirre Ceballos (2002)

2.5.4 Estructura y formas del talo

Los líquenes se encuentran estructurados en una variedad de formas de talo el cual está determinado principalmente por el componente fúngico, mientras que las células algales y/o las cianobacterias constituyen una proporción mucho menor de aproximadamente 7%. (Ramos Aranibar ,2012). Sin embargo, cabe señalar que en los líquenes gelatinosos de los géneros *Leptogium* o *Collema*, el fotobionte determina la forma ya que corresponde a una cianobacteria (Barreno y Pérez-Ortega ,2003).

En general, en los líquenes existen cuatro tipos de formas de crecimiento o biotipos, estos son Crustoso, Foliosos, Fruticoso y Dimórficos (Chaparro de Valencia y Aguirre Ceballos ,2002). El tamaño de estas formas de crecimiento es muy variable, desde unos pocos milímetros en la especies crustosas hasta más de 2 metros en algunas especies de *Usnea* pendulosas (Mercado-Díaz et al. ,2015).

a. Líquenes crustosos

Las formas crustosas presentan un talo cuya superficie inferior está completamente adherida al sustrato, con aspecto de costra, el cual no pueden ser separadas del sustrato sin ser destruida. La estructura del talo (vista trasversal) de los líquenes crustosos gruesos se asemeja a los presentes en los otros biotipos con la diferencia de que no cuentan con la corteza inferior. En los crustosos de talo muy delgado, puede no presentar ni corteza superior o una médula distinguible, compuesta solamente de partículas de polvo o gránulos de diversas formas o tamaños (Brodo et al. ,2001). Algunos pueden presentar el talo de colores brillantes y pueden ser gruesos o ásperos Este tipo de líquenes es observado comúnmente sobre rocas de ambientes en condiciones ambientales extremas (Chaparro de Valencia y Aguirre Ceballos ,2002). El talo de la mayoría de estos líquenes está constituido de pequeñas escamas denominadas areolas, los cuales se conectan entre sí mediante filamentos fungales delgados que conforman otra estructura denominada hipotalo (Barreno y Pérez-Ortega ,2003).

b. Líquenes foliosos

El segundo tipo corresponde al tipo folioso el cual presenta unos lóbulos similares a las hojas de las plantas dispuestas radialmente. Tienen forma laminar y son los que presentan una estructura más compleja, con organización dorsiventral diferenciado, es decir superficies superiores e inferiores distintos. La mayoría de líquenes foliosos tienen los lóbulos redondeados algo angulares en los márgenes del talo. La forma de los lóbulos, su longitud,

anchura y el modo que se dispone el talo, por ejemplo, talos con tendencia a enrollarse, formas convexas o cóncavas, inflado o plano, son las características más importantes para diferenciar un líquen folioso de otro (Brodo et al. ,2001). Poseen crecimiento marginal, con capacidad de habitar sobre diversos sustratos. Asimismo, captan el agua tanto del sustrato como de la atmósfera.

Se pueden diferenciar dos tipos de líquenes foliosos (Chaparro de Valencia y Aguirre Ceballos ,2002):

i) Laciniados: Son aquellos líquenes que se adhieren al sustrato en casi toda su extensión por medio de estructura de fijación llamados rizinas, que permiten el desprendimiento con diferente grado de dificultad. En este grupo se encuentran los líquenes más grandes, presentando además una alta variabilidad en coloración, consistencia, forma, lobulación y tamaño. Ejemplos: *Xanthoparmelia* spp., *Lobaria* spp., *Physcia* spp., *Solorina* spp. *Parmotrema* spp. , *Pseudocyphellaria* spp. *Heterodermia* spp., *Hypotrachyna* spp.

ii) Umbilicados: Estos líquenes presentan el talo en forma de disco y están unidos al sustrato por su parte central a manera de ombligo, el cual recuerda a un cordón umbilical, por ello, se les atribuye ese nombre. Estos líquenes suelen desarrollarse en superficies rocosas (saxícolas). Los géneros característicos de esta forma de crecimiento son *Umbilicaria*, *Dermatocarpon*, *Rhizoplaca* y *Omphalora*.

c. Líquenes fruticosos

Los líquenes de tipo fruticoso son aquellos que presentan ejes ramificados con aspecto de pequeños arbustos. No tienen superficies superior e inferior sino su simetría es radial. Algunos son erectos, otros son colgantes (o pendulosos). En su mayoría se unen al sustrato por una mínima superficie, discos de fijación o hapterios. Los talos pueden ser cilíndricos (macizos o huecos) o aplanados (simetría dorsiventral). El tamaño es muy diverso que va desde pequeños arbustos con longitudes menores a 1 centímetro hasta los que tienen varios metros de largo (Barreno y Pérez-Ortega ,2003). Ejemplos de talos cilíndricos: *Usnea* spp. *Teloschistes* spp., algunas especies de *Cladonia, Stereocaulon*. Con talos aplanados especies de *Ramalina*, *Rocella* (Chaparro de Valencia y Aguirre Ceballos ,2002).

d. Líquenes Dimórficos

Los líquenes dimórficos son aquellos líquenes que están constituidos por un talo horizontal (talo primario) el cual está adherido al sustrato y una estructura vertical que presenta cuerpos

fructíferos (talo secundario, también llamado podecio). El talo horizontal puede ser folioso como en *Cladonia*.

Tanto el líquen de tipo folioso y crustoso tienen un crecimiento radial aunque con una tasa de crecimiento muy lento el cual puede variar entre 2 a 5 mm por año para los tipos foliosos, mientras en muchos líquenes de tipo crustáceo, el crecimiento es de aproximadamente de 0,5 mm por año (Armstrong ,2004).

De acuerdo a las características anatómicas del talo, los líquenes se pueden clasificar en homómeros o heterómeros.

i) *Homómeros*

Son aquellos líquenes que poseen talos simples o poco diferenciados. Tanto el micobionte y el fotobionte están uniformemente distribuidos; esto es observado frecuentemente en los líquenes gelatinosos de los géneros *Leptogium* o *Collema*, o en líquenes crustosos como el género *Caloplaca* donde el fotobionte es una cianobacteria.

ii) *Heterómeros*

Son aquellos que tienen una anatomía estratificada compuesta por varias capas dispuestas de forma ordenada: córtex superior, capa de fotobionte, médula y córtex inferior. El cortex está constituido de una capa fúngica cuyo grosor puede variar lo que permite proteger al fotobionte. En esta capa algunas sustancias pueden acumularse como el ácido úsnico, la atranorina o la parietina, que cumplen una función de protección del aparato fotosintético del fotobionte. Es posible también encontrar pruina, que consiste en un depósito superficial de cristales de oxalato. Debajo del córtex se encuentra una única capa formado por el fotobionte el cual mantiene contacto físico con las hifas. Bajo la capa de fotobionte se localiza la médula, que es una capa fúngica conformado por hifas laxamente combinadas, de aspecto algodonoso y con espacios que favorecen la circulación del aire y el intercambio de gases en el talo además de permitir el ingreso de agua para el proceso de la fotosíntesis. Esta capa suele tener mayor grosor que el resto de capas por lo que representa el mayor volumen en el talo. La mayor parte de sustancias liquénicas son acumuladas en esta capa. Finalmente, en gran parte de los líquenes foliosos se forma un cortex inferior de color oscuro que suele observarse en los líquenes de tipo foliosos o fruticosos de simetría dorsiventral. Este córtex normalmente es más delgado que el córtex superior y cumple la función de conducir el agua y los gases hacia el interior del talo.

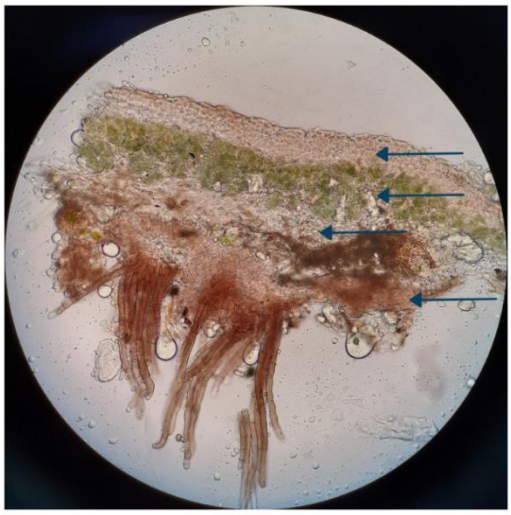


Figura 4: Talo heterómero. Corte transversal del talo en *Sticta* aff. *weigelii* . De arriba hacia abajo, flechas señalando la corteza superior, capa del fotobionte, médula, corteza inferior, respectivamente. Fotografía propia.

2.5.5 Estructuras reproductivas

Los líquenes tienen dos mecanismos de reproducción: sexual y asexual, basado principalmente en la reproducción del micobionte. El fotobionte, cuando está liquenizado, solamente está limitado a la reproducción asexual, mientras que en estado libre desarrolla ambos mecanismos de reproducción. La reproducción sexual consiste en la producción de millones de esporas microscópicas a través de cuerpos fructíferos, donde la espora debe hallar el fotobionte apropiado, y que el desarrollo de la combinación tenga lugar en el hábitat correcto (Brodo et al. ,2001). Mientras que, la reproducción asexual se basa en el desarrollo de propágulos vegetativos en el cual están presentes los dos simbiontes. Para ambos mecanismos de reproducción se desarrollan estructuras especiales.

En la reproducción sexual, el aparato fructífero es denominado ascocarpo (ascomata en inglés) que son estructuras que contienen a los ascos y éstos a su vez a las ascosporas. Usualmente existen dos tipos de ascocarpos: apotecios, peritecios y lirelas. Los apotecios son básicamente estructuras en forma de disco o copa en cuya parte superior se localiza los ascos. El disco puede ser plano, cóncavo o convexo. Se diferencian los siguientes tipos de apotecio: lecanorino, donde el margen del disco es una extensión del talo, lecideíno, donde el disco tiene un margen de color negro y otro producido por el talo. Los peritecios son estructuras en forma de matraz que tiene encerrada a la capa productora de esporas la cual se abren por algún tipo de poro o agujero en la parte superior. Otras variantes de ascocarpos pueden ser observados, como las lirelas, de forma alargada, estrecho, a veces de aspecto ramificado, presentes en los líquenes de los géneros *Graphis* y *Opegrapha*. Las ascosporas

pueden adquirir diferentes aspectos que va desde lo unicelular a pluricelular, hialinas o coloreadas, morfológicamente pueden presentar septos (divisiones), de esta manera existen ascosporas uniseptadas, biseptadas o multiseptadas (muriformes).

En lo que respecta a la reproducción asexual, el consorcio liquénico desarrolla cuerpos vegetativos denominados soredios e isidio, además de tener capacidad de desarrollarse a partir de sus fragmentos.

De acuerdo al sustrato donde crecen, los líquenes se pueden clasificar en:

- Corticícolas: Líquenes que crecen sobre cortezas de árboles
- Folíicolas: Líquenes que crecen sobre hojas de las plantas.

Los dos tipos de líquenes anteriores se les denominan en conjunto epífitas.

- Muscícolas: Líquenes que crecen sobre musgos.
- Saxícolas: Líquenes que crecen sobre superficies rocosas.
- Terrícolas o Epigeos: Aquellos que crecen en los suelos.
- Los cinco tipos anteriores es mencionado por Moreno et al. (2007)
- Liquenícolas: Líquenes que crecen sobre otros líquenes.

La mayoría de los hongos liquenizados (>55%) forman talo no estratificado (forma crustoso, microfilamentosos, etc.), un 20% con talos de forma escamosa o placodioides, y el 25% con talos con formas más avanzados, foliados o fruticosos con estratificación interna.

La reproducción de los líquenes puede darse a través de las esporas de los hongos el cual tendrá que encontrar el fotobionte adecuado, o sino también a través de propágulos vegetativos que contiene a los integrantes de la asociación simbiótica (Oksanen ,2006).

2.5.6 Fisiología de los líquenes

Diferentes roles fisiológicos son realizados por los componentes del líquen para poder sobrevivir incluso en regiones con condiciones extremas como las áreas de estudio del presente trabajo.

a) Aspectos metabólicos: Fotosíntesis y Respiración

El fotobionte gracias a la clorofila permite que se lleve a cabo la fotosíntesis para producir carbohidratos que servirán como fuente de energía disponible para el líquen. Los carbohidratos producidos por el fotobionte como el ribitol o sorbitol (si se trata de un alga

verde) o glucosa (si se trata de una cianobacteria) son almacenados en el micobionte como manitol que es otro carbohidrato.

Para que el líquen se desarrolle plenamente, el proceso de fotosíntesis debe tener una tasa mayor al de la respiración capaz de cubrir su constante demanda energética a pesar que sólo tenga las horas de luz del día para hacerlo. Por tanto, es necesario que el líquen se encuentre hidratado para poder realizar de forma óptima la fotosíntesis. Un líquen seco permanece dormante hasta recuperar la humedad suficiente para volver a realizar dicho proceso. La temperatura también influye en el desarrollo de los líquenes. Por ejemplo, los líquenes antárticos tienen una temperatura óptima para la fotosíntesis entre 0-10 °C mientras que otras especies lo hacen mejor entre 10 a 15 °C. La respiración, en cambio, es más eficiente en la mayoría de líquenes entre 15 a 30 °C (Brodo et al. ,2001).

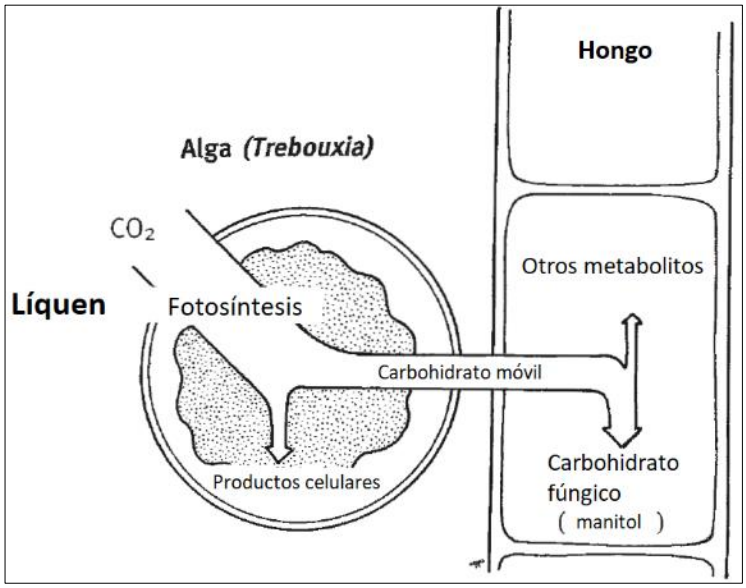


Figura 5: Esquema general del flujo del carbono en el líquen. Ilustración extraída y modificada de Brodo et al. (2001)

b) Aspectos metabólicos: Nutrición mineral y acumulación de nutrientes

Otros procesos fisiológicos son vitales para el crecimiento y desarrollo de los líquenes, éstos son los mecanismos de acumulación y procesamiento de macronutrientes y micronutrientes esenciales. El agua y los minerales disueltos son absorbidos a través de toda la superficie del talo del líquen ya que no cuenta con una cutícula cerosa y estomas asociados como sí sucede en las plantas vasculares. La presencia de una capa superior de hifas fúngicas hace innecesario la existencia de un sistema radicular en estas asociaciones. En consecuencia, los nutrientes pueden ser captados de partículas o iones disueltos en vapor de agua presente en

el aire húmedo (niebla o rocío), en nieve derretida o en lluvia aunque en menor concentración, ya que en esta última hay mayor dilución. Sin embargo, algunos nutrientes como el nitrógeno, depende de transformaciones bioquímicas previas para ser asimiladas. Los líquenes que presentan cianobacterias como fotobionte o en que están presentes en sus cefalodios tienen al nitrógeno atmosférico como su fuente principal ya que las cianobacterias son capaces de convertir el nitrógeno atmosférico en compuestos biológicamente asimilables a través de un proceso de fijación de nitrógeno. Mientras que los líquenes que tienen a las algas verdes como su fotobionte deben encontrar fuentes de nitrógenos en el sustrato natural o en el agua. Algunos hábitats están enriquecidos de nitrógenos, como las zonas cercanas a las granjas, refugios de los animales en estado salvaje, donde el nitrógeno es abundante en forma de úrea y amonio (Brodo et al. ,2001).

Por otro lado, otra fuente de nutrientes para los líquenes son los sustratos sobre el cuál estas asociaciones están unidos (Shukla et al. ,2013). Muchos líquenes se desarrollan sobre el suelo y las rocas, donde actúan como un agente de meteorización física y química (Nash III ,1996). Esto les permite solubilizar los minerales de las superficies rocosas convirtiéndolas en su fuente principal de nutrientes. Sin embargo, la solubilidad de muchos nutrientes está afectada por el pH por lo que la disponibilidad de nutrientes varía de acuerdo a la naturaleza de la roca. Por tanto, una roca ácida puede tener una comunidad de líquenes muy diferente a una roca caliza (Nash III ,1996).

La mayoría de los líquenes, principalmente las que habitan en los suelos y rocas están expuestos al polvo que sopla el viento que en gran parte proviene de la superficie del suelo. Estas partículas del suelo pueden ingresar fácilmente a los espacios intracelulares y por consecuencia presentar altos niveles de aluminio (Al), hierro (Fe), escandio (Sc), titanio (Ti) y otros elementos de origen lítico al interior del talo. El proceso de solubilización de estos elementos es lento y muy probablemente no logren asimilarse al líquen.

Por otro lado, en los líquenes que habitan los árboles (líquenes epífitos), la disponibilidad de nutrientes dependerá de la naturaleza de la corteza del árbol, es decir de su composición de nutrientes o de su pH. Como resultado se tienen comunidades muy heterogéneas en árboles con corteza ácida (coníferas) y en aquellos con corteza neutra (Nash III ,1996).

De esta manera, los líquenes pueden acumular minerales incluyendo a los metales pesados, presente en trazas en los sustratos o en la atmósfera. Incluso pueden acumularlos a niveles que exceden sus necesidades fisiológicas (Bačkor y Loppi ,2009), pudiendo causar daños severos al fotobionte y por ende provocando el deceso del líquen.

Los mecanismos de acumulación de metales pesados de los líquenes se describirán más detalladamente en los acápites posteriores.

2.6 LOS LÍQUENES COMO BIOINDICADORES DE CALIDAD AMBIENTAL

Las primeras observaciones sobre esta capacidad bioindicadora de los líquenes datan del siglo XIX cuando los estudios realizados por el liquenólogo William Nylander (1866) en el Jardín de Luxemburgo en la ciudad de París mostraron una disminución progresiva y una desaparición posterior de la liquenobiota de los árboles en esta ciudad mientras que en las afueras de la ciudad cada árbol presentaba una liquenobiota en mejor estado de conservación. (Seaward ,1993). Pero es a lo largo del siglo XX, que realmente comenzó la preocupación por disminuir la contaminación del aire en las ciudades por lo que muchos países de Europa Occidental redujeron fuertemente los niveles de emisión de contaminantes como el Dióxido de Azufre (Signoret ,2018) . Es en ese contexto que se toman en cuenta los cambios cualitativos en las comunidades liquénicas para evaluar los cambios en las políticas energéticas, la legislación y las prácticas agrícolas en calidad de aire. Actualmente la lista de contaminantes del aire es numerosa el cual comprende oxidantes, fluoruro de hidrógeno, metales, lluvia ácida y compuestos orgánicos (Nash, 2008).Generalmente los líquenes cumplen con las siguientes condiciones de un buen bioindicador y bioacumulador: 1. Presentan un ciclo de vida largo talo perenne, 2. Una amplia distribución, 3. Reacciones de tolerancia o evasión a los contaminantes, 4. Escasa movilidad, 5. Biomasa suficiente, 6. Interacciones mínimas con el sustrato, 7. Carecen de protección (cutícula) frente al exterior, lo que hace que los líquenes adquieran sus nutrientes por deposición ambiental a través de sus talos, 8. No excretan, permitiendo acumular o concentrar los diferentes compuestos presente en el medio, incluso más allá de sus necesidades 9. Suelen ser estenoicos reaccionando frente a las pequeñas variaciones del ambiente. 10. Pueden seleccionar las sustancias que absorben y concentran las soluciones diluidas, 11. No son dañados por las plagas ni son afectadas por las anomalías del suelo (Barreno y Pérez ,2003, Díaz ,2006).

Todas estas condiciones permiten que los líquenes cuenten con una aceptación amplia para ser usados como bioindicadores.

Los métodos más comunes para emplear a los líquenes como bioindicadores de calidad de aire comprende el muestreo de especies nativas a quienes se les realizan mediciones de los contaminantes de aire (de naturaleza orgánica o inorgánica) acumulados en el talo. O también, el uso del método del trasplante, que consiste en el trasplante de líquenes de un

lugar “no contaminado” (con baja presencia de actividad antrópica) hacia otro que presenta polución, donde finalmente se evalúan los cambios morfológicos o fisiológicos en el talo y las variaciones en las cantidades bioacumuladas de los contaminantes en esta estructura (Conti y Tudino ,2016).

La repetitividad del estudio y el no elevado costo de estos métodos permiten colocar a los líquenes como buenas alternativas frente al uso convencional de equipos para medición de calidad de aire que suelen ser caros y limitados a brindar información puntual e incompleta sobre la evolución y los efectos sobre el ecosistema de los niveles de polución en un periodo determinado (Garty ,2001).

2.7 LÍQUENES COMO BIOACUMULADORES DE METALES PESADOS

Diversos estudios realizados en los últimos 40 años han demostrado la capacidad que tienen los líquenes de acumular un amplio rango de elementos que van desde metales alcalinos e isótopos como el Cs^{137} hasta metales de transición más pesados como el plomo (Pb) y el mercurio (Hg) (Richardson ,1995), asociados a deposiciones húmedas (precipitaciones que lavan aerosoles y partículas en el aire) y secas (neblinas, rocío) de las partículas presentes en el aire. Asimismo, estos estudios también se han enfocado en desvelar los mecanismos fisiológicos que están detrás de esta capacidad acumuladora y en diseñar y/o emplear diferentes metodologías para utilizar a los líquenes como monitores capaces de detectar los cambios ambientales en el tiempo.

2.7.1 Mecanismos de acumulación de metales en los líquenes

Debido a que los nutrientes provenientes de la atmósfera son escasos en comparación de los que presenta el suelo, los líquenes han desarrollado mecanismos de concentración para su sobrevivencia. Para el caso de los metales en líquenes, Richardson (1995) mencionó que éstos son absorbidos por tres procesos: a) por atrapamiento de partículas enriquecidos en metales, b) absorción intracelular mediante un proceso de intercambio y c) acumulación intracelular.

a) Atrapamiento de partículas

Los líquenes pueden acumular partículas ricas en metales, el cual puede comenzar dentro de las primeras 24 horas y pudiendo alcanzar el equilibrio con la deposición en el medio ambiente en cuatro meses (Richardson ,1995). La semejanza que existe entre el cociente de hierro (Fe) y el titanio (Ti) presentes en los líquenes frente al cociente de estos

elementos en la corteza terrestre, representaría una evidencia de la capacidad para atrapar partículas del polvo del suelo (Nieboer et al. ,1978). Este mecanismo de acumulación es responsable de la presencia de concentraciones extremadamente altas de ciertos elementos en los líquenes que habitan en las proximidades de complejos metalúrgicos (Nash III ,1996). Los niveles de los metales depositados o atrapados en formas de partículas están determinados por factores físicos o químicos, su abundancia, la forma química, diferencias en la solubilidad en el agua, pH y temperatura (Bačkor y Loppi ,2009). Varios líquenes especialmente aquellos que crecen sobre suelos o rocas obtienen sus nutrientes del polvo transportado por el viento, el mismo que proviene de la superficie del suelo. Estas partículas del suelo pueden ser incorporados fácilmente en los espacios intracelulares dentro de los líquenes y dar como resultado concentraciones relativamente altas de Aluminio (Al), Hierro (Fe), Escandio (Sc) o Titanio (Ti), y otros elementos de origen lítico dentro del talo. Por tanto, para evaluar la contribución relativa de las partículas del suelo a la carga de elementos asimilados por el líquen se puede evaluar comparando las proporciones de macronutrientes o micronutrientes con elementos inertes, como el Sc o el Ti (Nash III ,1996).

b) Intercambio iónico

O también llamado intercambio **extracelular** de metales. Los iones metálicos son básicamente cationes aunque también pueden ser aniones como el Uranio (Nash III ,1996). El proceso de unión es rápido, físico-químicamente pasivo y liberador de protones, el cual puede incrementarse con la muerte celular al exponer en mayor proporción los sitios de unión que estuvieron protegidos por la membrana celular (Nimis et al. ,2002).Se ha demostrado que la captación de estos metales se debe a la presencia de sitios de unión aniónicos cargados negativamente (con presencia de grupos ácidos carboxílicos y ácidos hidrocarboxílico) o positivamente los cuales están fijados en algunas partes del talo, al interior de la estructura de polisacáridos de las paredes celulares. Así, por ejemplo, los grupos carboxílicos han sido observados envueltos en la complejación del plomo en *Xanthoria parietina* (Garty ,2001).

Los cationes metálicos se retienen principalmente de manera externa al citoplasma de los fotobiontes y en los sitios de intercambio catiónico de los micobiontes (Nash III ,1996). Aunque, es la quitina, polímero de N-acetyl-D-glucosamina, presente en el micobionte, quien representa el componente de unión importante capaz de captar una

mayor cantidad de metales que el fotobionte (Garty ,2001). Se estima que la capacidad de retención de cationes dentro de la pared celular varía aproximadamente entre 6 a 77 $\mu molg^{-1}$ dependiendo de la especie.

La unión extracelular es un proceso reversible donde los cationes que están unidos pueden ser desplazados por otros cationes que presentan mayor afinidad a los sitios de unión o por aquellos con menor afinidad pero que están en mayor concentración. En ese sentido, los iones metálicos han sido clasificados de acuerdo con sus afinidades de unión a los ligandos y a su poder de polarización (cociente carga/radio atómico). De esta manera, se tienen tres grupos de metales: Clase A, Clase B y una clase fronteriza (en inglés "*Borderline metals*") que se muestran en la Tabla 2. Los metales de clase A buscan unirse a donadores de electrones de acuerdo a la secuencia oxígeno (O)>nitrógeno (N)> azufre (S), los de clase B, buscan unirse a donadores en secuencia S> N>O. Mientras que, los metales de clase fronteriza tienen afinidad para ambas secuencias (Nieboer y Richardson ,1980).

Tabla 2: Clases de metales clasificadas según la afinidad a los sitios de unión extracelular de los líquenes (Nieboer y Richardson ,1980)

Clase de metales	Iones metálicos
A	Al^{+3}, Ba^{+2}, Ca^{+2}, K^{+}, Mg^{+2}, Na^{+} y Sr^{+2}
B	Ag^{+}, Cu^{+}, Hg^{+2} y Pb^{+2}
Fronteriza	As^{+2}, Co^{+2}, Cd^{+2}, Cr^{+2}, Cu^{+2} Fe^{+3}, Mn^{+2}, Ni^{+2}, Sn^{+2}, Ti^{+3}, V^{+3} y Zn^{+2}

Diferentes experimentos han establecido un orden secuencial sobre el grado de afinidad a los sitios de intercambio: metales monovalentes de Clase A < metales divalentes de Clase A < metales fronterizos divalentes < metales divalentes de Clase B. Para los estudios de biomonitoreo con líquenes, esta información es importante ya que el contenido de metales presentes en los líquenes podría reflejar una deposición atmosférica reciente, producto, posiblemente, del intercambio de cationes disueltos en la lluvia o por exposición, de corto plazo, a los contaminantes (Nimis et al. ,2002). Por otro lado, algunos compuestos también pueden participar en la captación de metales mediante el intercambio extracelular. Por ejemplo los cristales de oxalato de calcio, que se encuentran principalmente en la médula, y los ácidos líquénicos, como el ácido nostíctico, que son capaces de acomplejar los metales pesados formando quelatos (Díaz

,2006), que luego pueden ser almacenados en los espacios intercelulares de la médula y permanecer por un largo período (Garty et al. ,1979).

c) Captación y acumulación intracelular

A diferencia del intercambio extracelular, la captación de metales a nivel intracelular es un proceso lento que se incrementa con el tiempo y posiblemente dependiente de energía (Richardson ,1995). Por ejemplo, luego de 2.5 horas de exposición a una solución con cadmio, la captación intracelular del Cd fue menos del 10% del total capturado en *Peltigera*, mientras que en el líquen *Ramalina fastigiata* la captura de cobre fue mucho menor que la captura extracelular (Garty ,2001). Se ha observado que la captura de metales tiene una relación linear con la temperatura y la luz lo que indicaría su relación con el metabolismo. En lugares oscuros se ha encontrado que la captura intracelular del cadmio Cd muestra una declinación rápida. La captura intracelular de metales puede variar de acuerdo a la especie. Por otro lado, en experimentos donde se utilizaban líquenes muertos por calor se observó que la captura de metales catiónicos no paralizaba, incluso puede incrementarse como sucede en algunas especies (Richardson et al. ,1985).

2.8 METODOLOGÍAS DE ESTUDIO DE LÍQUENES COMO BIOINDICADORES DE METALES

Las metodologías empleadas en los estudios de bioindicación de metales por líquenes, pueden llevarse a cabo tomando algunas de estas tres vías: (1) la medida de los cambios en la comunidad de líquenes en relación al contenido de metales presente en su entorno (a través de la presencia/ausencia de especies, cambios en la composición de la liquenobiota o en su riqueza de especies), (2) medida en los tejidos de los líquenes in situ de los metales pesados, (3) medición de las concentraciones metálicas presentes en líquenes trasplantados de un lugar no contaminado a otro que sí (Vitarana ,2013).

Como estas metodologías se desarrollan a una escala temporal, también son denominadas como técnicas de biomonitoreo. Así, las primeras dos vías se encuentran dentro de lo que se conoce técnicas de biomonitoreo pasivo (Herzig et al. ,1989), mientras que la tercera vía corresponde al biomonitoreo activo.

La primera vía está basada en el hecho que el contenido metálico del aire puede causar perturbaciones ecológicas que provocan una disminución en la diversidad y abundancia de

especies de líquenes, una disminución de especies sensibles o aumento de especies tolerantes.

En lo que concierne a la segunda vía, esta permite cuantificar metales específicos de la atmósfera presentes en los líquenes, buscando, a través del tiempo, identificar los impactos de estas sustancias en los ecosistemas y/o entre áreas diferentes (Vitarana ,2013).

Sin embargo, la tercera vía, el cual utiliza trasplantes de líquenes (biomonitoreo activo) está siendo preferido sobre las vías del monitoreo pasivo por varias razones (Cecconi ,2019). En primer lugar, no enfrenta el problema de que la o las especies de líquenes seleccionadas no están presentes en todos los lugares de evaluación. Cabe indicar que las vías de biomonitoreo pasivo trabajan con especies nativas mientras que la tercera vía tiene la flexibilidad de trabajar con líquenes no nativos. En segundo lugar, la facilidad de realizar el trasplante directamente a las zonas de evaluación utilizando materiales simples. Asimismo, tiene la ventaja de poder definir los periodos de exposición evitando utilizar estimaciones de crecimiento anual, aunque se recomienda que sea corto el periodo ya que si se prolonga el líquen puede sufrir cambios fisiológicos alterando los valores de acumulación. En ese aspecto, las vías de biomonitoreo pasivo tienen la ventaja sobre el activo ya que permite evaluar los niveles de las deposiciones en periodos largos (Cecconi ,2019). Finalmente permite comparar los valores de las concentraciones entre un sitio expuesto y no expuesto, e investigar la capacidad de acumulación de diferentes especies bajo mismas condiciones (Giordani et al. ,2019).

En lo que respecta al tipo de líquenes idóneos para efectuar estas vías, se tiene que los líquenes epífitos de biotipos fruticoso y folioso pueden considerarse para las vías de biomonitoreo pasivo mientras que para el biomonitoreo activo se recomienda el uso de líquenes fruticosos por presentar una mayor biomasa que los líquenes foliosos (Giordani et al. ,2019).

Tomando en cuenta lo anterior, el presente estudio (puntual en el tiempo), buscaría establecer una *línea base* para el biomonitoreo temporal de metales (de tipo *pasivo*) en los sitios de estudio de Parón y Querococha, ya que es un estudio pionero en ambos lugares.

2.9 ESTUDIOS REALIZADOS EN EL PERÚ DE LOS LÍQUENES COMO BIOINDICADORES DE PRESENCIA DE METALES PESADOS

Básicamente estos estudios se enfocaron en evaluar, mediante los líquenes, los impactos ambientales sobre los lugares de influencia minera generados por las actividades mineras actuales o por pasivos ambientales mineros (restos antiguos de actividad minera).

Entre estos estudios se tiene por ejemplo el trabajo realizado por Díaz (2006), en el Distrito de Huay Huay, Provincia de Yauli, departamento de Junín, el cual tuvo como objetivo demostrar que los líquenes podrían medir la contaminación en los alrededores de la Unidad Minera Andaychagua. En su estudio pudo seleccionar y calificar a algunas especies de líquenes foliosos como bioindicadores luego de aplicar las metodologías de biomonitoreo pasivo (presencia/ausencia de especies sensibles) comparando la liquenobiota de los lugares próximos y alejados de la zona impactada. También utilizó las técnicas de cuantificación de metales (segunda vía, ver acápite anterior) donde evaluó la capacidad de los líquenes seleccionados para la acumulación, remoción y liberación de estas sustancias. Del mismo modo, Castillo Rodríguez (2011) aplicó las metodologías utilizadas por Díaz (2006) y propuso un grupo de especies de líquenes capaces de evidenciar la presencia de metales pesados a diferentes niveles de contaminación. En este caso, el trabajo se llevó a cabo en una zona de pasivos ambientales correspondiente a la mina Pushaquilca en el Distrito de Pampas, Provincia de Pallasca, Departamento de Ancash.

A nivel de la Cordillera Blanca, Mejía y Ángeles (2014) realizaron un estudio de bioindicación con líquenes en la parte alta, media y baja de la cuenca del río Santa. En ello pudieron observar que la menor diversidad de liquenobiota y los mayores valores de acumulación de metales se encontraron en la parte baja de esta cuenca donde se registraron los mayores valores de material particulado PM_{10} y de metales pesados en el aire. Con ello, el estudio concluyó que los niveles de bioacumulación de los líquenes estarían asociados a los niveles de estos contaminantes en el ambiente presentes a lo largo de esta cuenca.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Para evaluar la capacidad bioindicadora de los líquenes ante la presencia de metales pesados en el ambiente de las partes altas de las subcuencas de Llullán-Parón y de Yanayacu (Objetivo General), se siguió el siguiente flujo metodológico (Figura 6):

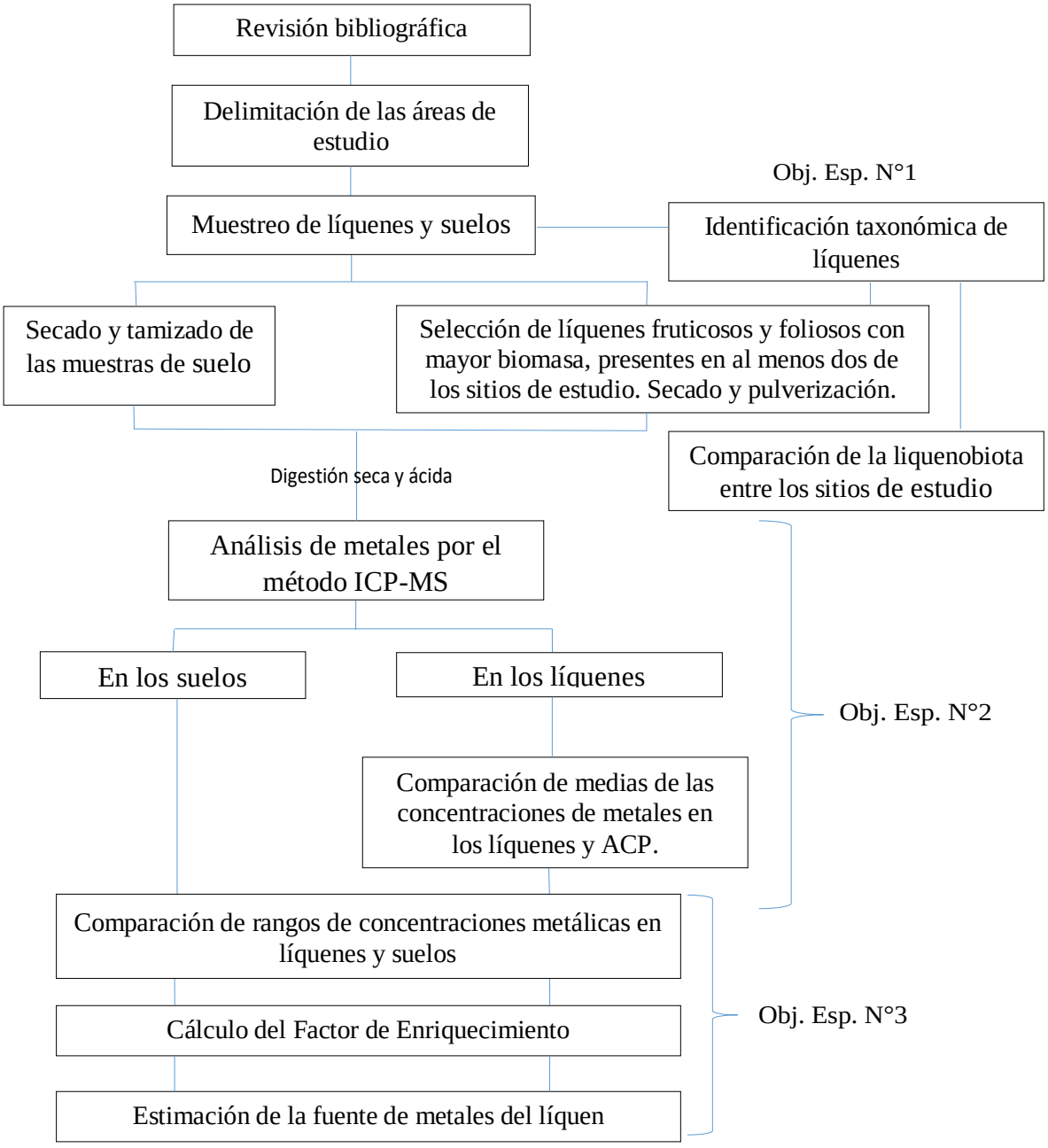


Figura 6: Flujo metodológico utilizado para la realización de los objetivos específicos del presente trabajo**.**

3.1 SITIOS DE ESTUDIO

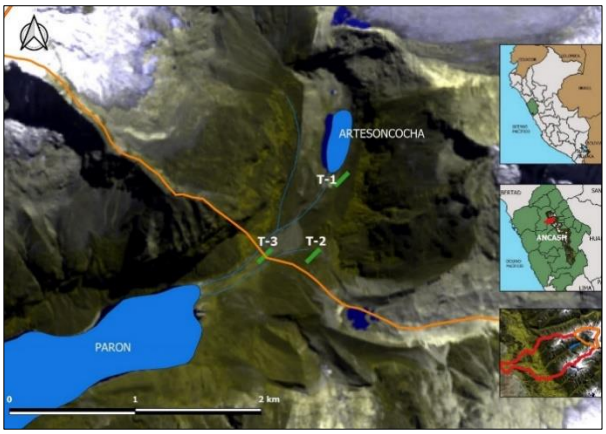
Los sitios de estudio fueron establecidos en las partes altas de las dos subcuencas tomando como referencia sus lagunas principales. En el caso de la Subcuenca de Parón se tomó como referencia a la laguna de Parón mientras para la Subcuenca de Yanayacu, la laguna de Querococha.

3.1.1 Sitios de estudio establecidos para la parte alta de la subcuenca de Parón

Dos sitios de estudio fueron establecidos para esta parte de la subcuenca de Parón, un sitio localizado aguas arriba de la laguna de Parón hasta la laguna de Artesoncocha (4260 msnm) y otro situado aguas abajo de la laguna (hasta 2 km hacia abajo).

a. Aguas arriba de la laguna de Parón

De acuerdo al Mapa Nacional de Ecosistemas publicado por el Ministerio del Ambiente en 2018, esta parte de la subcuenca de Parón, se encuentra sobre un ecosistema denominado Periglaciar. Este sitio de estudio se caracterizó por la presencia de morrenas conformadas por rocas fragmentadas sobre el cual corrían las aguas provenientes de la laguna Artesoncocha. La vegetación en esta zona es arbustiva y se desarrolla sobre las laderas de los cerros adyacentes a los cuerpos de agua. Una mayor presencia de materia orgánica fue observada en los suelos a medida que se descendía hacia la laguna de Parón, así como una mayor cobertura de vegetación arbustiva. Los puntos de muestreo fueron tomados en relación de la heterogeneidad del terreno afín de alcanzar una mayor representatividad del sitio de estudio. Por tanto, fueron considerados tres puntos de muestreo o transectos: T-1, T-2 y T-3 (Ver Figura 7). En adelante a este sitio se le abreviará como “Parón arriba”.



Transecto	Altura (m)	Coord. UTM (WGS84) Zona 18 S	
		Norte (m)	Este (m)
T1	4264	9006670	209254
T2	4225	9006068	209015
T3	4200	9006073	208631

Figura 7: Mapa de ubicación del sitio de estudio Parón arriba y las coordenadas UTM de sus transectos.
FUENTE: Elaboración propia (Base de datos del INAIGEM)

b. Aguas abajo de la laguna de Parón

Aguas abajo de la laguna de Parón, se encuentra un **bosque relicto altoandino** (MINAM, 2018) dominado por asociaciones de "queñua" (*Polylepys* spp.), acompañada de una gran cobertura arbustiva. Por tanto, los suelos mostraron una mayor composición de materia orgánica que aguas arriba. Frente a una relativa homogeneidad del terreno solo se consideraron la toma de muestras en dos puntos: T-4 y T-5 (Ver Figura 8). En adelante fue asignado este sitio como "Parón abajo".

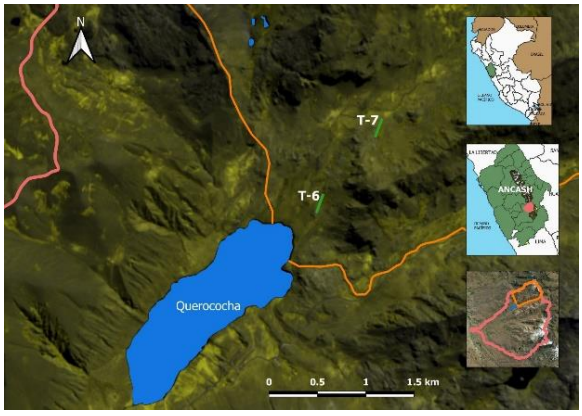
Transecto	Altura (m)	Coord. UTM (WGS84)	
		Zona 18 S	
		Norte (m)	Este (m)
T4	4089	9003631	204363
T5	3980	9002654	203141

Figura 8: Mapa de ubicación del sitio de estudio Parón abajo y las coordenadas UTM de sus transectos.
FUENTE: Elaboración propia (Base de datos del INAIGEM)

3.1.2 Sitio de estudio establecido para la parte alta de la subcuenca de Yanayacu

Aguas arriba de la laguna de Querococha

Por otro lado el sitio evaluado en la subcuenca de Yanayacu, se localizó aguas arriba de la laguna de Querococha, en dirección al glaciar de Yanamarey. Dentro de esa área también fue posible observar un **bosque relicto altoandino**. Cercano a este bosque se tomaron dos puntos de muestreo señalados como T-6 y T-7. En los siguientes párrafos esta área será denominada como Querococha arriba. (Ver Figura 9).



Transecto	Altura (m)	Coord. UTM (WGS84)	
		Zona 18 S	
		Norte (m)	Este (m)
T6	4038	8926083	246087
T7	3980	8926864	246695

Figura 9: Mapa de ubicación del sitio de estudio Querococha arriba y las coordenadas UTM de sus transectos.
FUENTE: Elaboración propia (Base de datos del INAIGEM)

3.2 PERIODO DE MUESTREO

El muestreo se llevó a cabo en los meses de julio (Parón arriba y abajo) y agosto (Querococha arriba) del 2019, dentro del periodo de estiaje (Abril – Septiembre) presente en las regiones altoandinas del país.

3.3 MUESTREO DE LÍQUENES

El método de muestreo utilizado para el presente trabajo fue el del tipo "oportunista" (one-time non-quantitative opportunistic sampling per site, en inglés) que consistió en realizar la colecta basada en una selección visual de todos los líquenes presentes durante el muestreo (Cáceres et al. ,2008); esto debido a las condiciones climáticas de las zonas de muestreo que sólo permitía un corto periodo de muestreo.

Los biotipos de líquenes muestreados fueron los del tipo: folioso, crustoso (siempre que era factible), fruticoso y dimórficos; mientras que a nivel de los sustratos, sobre las cuales se desarrollan los líquenes, fueron tomados en cuenta las rocas, corteza de árboles y musgos. De acuerdo a lo anterior, se delimitó las áreas de colecta mediante el trazo de transectos de 30 metros de longitud sobre los puntos de muestreo.

Sobre cada transecto se dispuso de 4 puntos en el cual se trazaron rectas cruzadas perpendicularmente de una longitud de 4 metros (dos metros a cada lado del transecto) donde se realizó el muestreo oportunista, colectándose todos los líquenes que se pudieron observar en estas 4 rectas y seleccionando a los líquenes más abundantes (Ver Figura 10).

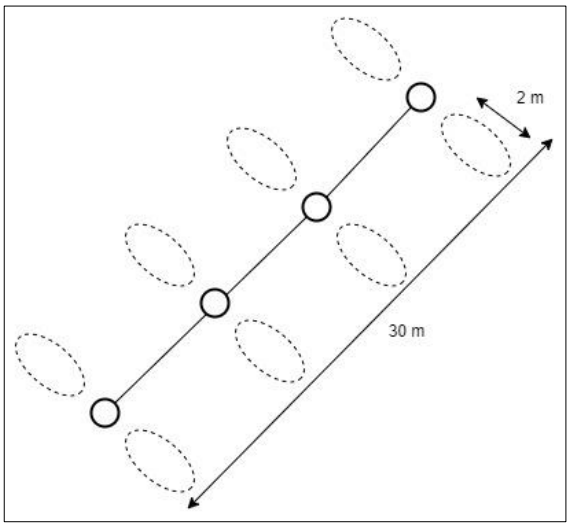


Figura 10: Dimensiones de los transectos utilizados para el muestreo de líquenes

La recolección se realizó en forma manual utilizando cuchillos y palas de jardinería de plástico afín de evitar toda contaminación de partículas metálicas provenientes de estos materiales. Asimismo, se utilizaron bolsas de papel kraft donde se depositaron las muestras de líquenes.

Los datos de campo registrados durante el muestreo fueron el tipo de sustrato, biotipo, color, fecha de recolección, coordenadas geográficas y elevación. Durante el muestreo también se tomaron fotografías de alta resolución con ayuda de una cámara modelo NIKON 7200.

Las muestras de líquenes se dispusieron dentro de sobres de papel kraft y luego se almacenaron en recipientes de plástico para el posterior trabajo de identificación en las instalaciones del laboratorio B-4 de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

Las muestras se codificaron según la zona de las cuales fueron recolectadas, el número de transecto (1-7), el punto en el transecto (1-4) y los subpuntos sobre las rectas de cuatro metros que cruzaron perpendicularmente a los transectos (1-4).

Cabe señalar que la recolecta estuvo sujeta al permiso otorgado por el Servicio Nacional de Áreas Naturales Protegidas – SERNANP de acuerdo a la Autorización del Ingreso al ANP-N° 070 – 2019 – SERNANP – PNH/J y la Resolución Jefatural del Parque Nacional Huascarán N° 013-2019-SERNANP-JEF (Ver Anexo 4).

3.4 IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LOS LÍQUENES COLECTADOS

La identificación taxonómica fue realizada mediante el uso de claves de identificación de líquenes hasta nivel de género. Para ello se consultó las claves de los líquenes que habitan en las regiones tropicales de Sudamérica elaborado por Sipman (2005). Durante la corrida de estas claves, fue necesario diferenciar y reconocer a través del estereoscopio los siguientes caracteres macroscópicos de cada muestra de líquen:

Tipo de talo, color y características de las superficies de las caras superior e inferior del talo. Asimismo, la presencia de cuerpos fructíferos (color y tipo de ascocarpo) y/o cuerpos reproductivos vegetativos (soredios y picnidios). También fue necesario reconocer la morfología de estructuras especiales como las rizinas, cifelas y/o las pseudocifelas.

A nivel microscópico, con ayuda de un microscopio óptico compuesto se buscó observar, el tipo de fotobionte, la forma de las ascas (células sexuales productoras de esporas), tipo de septación y el número de ascosporas presentes en el asca. Esto se logró mediante cortes

transversales muy finos a los apotecios y de los talos de los líquenes dispuestos en los portaobjetos para su visualización.

Las claves taxonómicas también exigieron, además de caracteres morfológicos, el uso de pruebas de color mediante la aplicación de reactivos químicos como el hidróxido de potasio al 10% (abreviado con la letra K en las claves), hipoclorito de sodio (abreviado con la letra C en las claves) y lugol (abreviado con la letra I en las claves). También fue posible observar en algunos casos la sigla KC que significó la aplicación de KOH 10% seguido del hipoclorito de sodio.

Las reacciones se observaron usando estereoscopio y el microscopio compuesto inmediatamente después que se aplicó el/los reactivo (s). Estas reacciones pusieron en evidencia la presencia de compuestos moleculares propios de determinados taxones (Ver la Tabla 3) ya que al interaccionar con estos reactivos adquirieron un color particular señalados por la clave taxonómica.

Cabe señalar que para una determinación a nivel de especie, las claves taxonómicas suelen exigir la prueba de color con un compuesto denominado parafenilendiamina (abreviado como PD o P en las claves), sin embargo para el presente estudio, no fue utilizado por motivos de logística y de falta de técnica para su manipulación, ya que, es un compuesto altamente tóxico.

Para alcanzar la identificación a nivel de especie se usaron claves locales o regionales, o las elaboradas para sitios con características geográficas y/o climáticas similares a los que presenta los ámbitos de estudio. Por ejemplo, se tiene las claves elaboradas por Ramírez y Cano (2005) para la liquenobiota que habitan en la localidad de Pueblo Libre, en la provincia de Huaylas, departamento de Ancash. Asimismo se acudió a claves elaboradas por investigadores peruanos en otras regiones del Perú como el desarrollado por Ramos et al. (2013), en la localidad de Tuctumpaya en la provincia y departamento de Arequipa a 3013 msnm.

Tabla 3: Reactividad de las pruebas de coloración de algunas sustancias liquénicas, obtenidas del libro de Chaparro de Valencia y Aguirre Ceballos (2002)**.**

Reacción*		**Compuestos liquénicos**
		Pigmentos
K+	Rojo a violeta	Antraquinonas. Bisantraquinonas, terpenil quinonas, naftoquinonas, pyxiferina.
K+, KC+,		Xantonas, Sordidona.
K+, PD+, K+		Ácidos úsnicos.
		Compuestos incoloros
PD+, K+		Despidas: ácido alectoriálico, atranorina, ácido baeomicico, ácido barbatólico, cloroatranorina, ácido descarboxithamnólico, ácido emathamnólico, nefroarctina, ácido thamnólico. Depsidonas: ácido constíctico, ácido-fumarprotocetrárico, ácido norstíctico, ácido fisodálico, ácido salazinico, ácido stictico, ácido virénsico.
PD+, K-		Pannarina, ácido psorómico, ácido fumar protocetrárico, ácido protocetrrico, ácido virensico.
PD-,K+, C+		Ácido criptoclorfaeíco, ácido hiascico, ácido hipotamnólico (K+ violeta), ácido meroclorofaeíco, ácido paludósico, ácido ramalinólico, scrobiculina.
PD-, K-,C+	Rojo	Ácido anziáico, ácido 4-O-dimetilbarbático, eritrina, etil orcelinato, ácido gyrofórico, ácido lecanorico, montagnetol, ácido olivetórico, siphulina.
PD-, K-,C+	Verdoso	Ácido didymico, ácido pannarico, ácido profirilico, strepsilina.
PD-, K-,C+	Azuloso	Ácido diploschistesico.
PD-,K-,C- ,KC+		Ácido alectóronico, ácido a-collatólico, ácido glomeliférico, ácido lobárico, ácido 4-O-metilfisódico, ácido microphillinico, ácido physodico, norlobaridona, ácido picroliquénico.

(*) "+": Presencia de reacción de color, "-": Ausencia de reactividad. Ejemplo: K+ significa reacción de color del talo del líquen en presencia del hidróxido de potasio al 10%.

3.5 MUESTREO DE SUELO

Este muestreo tuvo por finalidad vincular los metales depositados al suelo con los bioacumulados en los líquenes de las áreas de colecta. Para ello se realizó el muestreo de suelo superficial (03 cm aprox. de espesor) dentro del perímetro del transecto. Este procedimiento estuvo basado en un estudio realizado por Loppi et al. (1999), ya que, del mismo modo que la presente investigación, su estudio buscó demostrar el grado de contribución del suelo en la composición de metales pesados presentes en una especie de líquen epífito. Se tomaron 4 muestras compuestas por cada transecto y se almacenaron en bolsas ziploc. Luego se procedió a mezclar estas 4 muestras compuestas de suelo para obtener uno representativo de cada transecto. Finalmente se obtuvieron un total de 7 muestras.

3.6 MEDICIÓN DE METALES PESADOS EN LÍQUENES Y SUELOS

El análisis de metales pesados fue efectuado usando la espectrometría de masas con fuente de plasma acoplada inducidamente (ICP-MS), que consiste en una técnica analítica multi-elemental desarrollada en los años ochenta cuya ventaja es su rapidez (muchas veces simultáneo) y su capacidad de cuantificar cualquier elemento químico presente a nivel traza (menor a 100 ppm). Asimismo, permite efectuarse sobre todo tipo de muestra (Díaz ,2006) por su alta temperatura de la fuente de plasma (8000 Kelvin) y su gran sensibilidad (Rusu ,2002). Para el presente estudio, los análisis de ICP-MS[2] fueron llevados a cabo en las instalaciones del laboratorio del Instituto de Corrosión y Protección de la Pontificia Universidad Católica del Perú (ICP-PUCP), cuyos resultados fueron presentados en el Anexo 5. Los metales pesados considerados para el presente estudio fueron: el aluminio (Al), arsénico (As), cadmio (Cd) , cromo (Cr), cobre (Cu), hierro (Fe), manganeso (Mn), níquel (Ni), plomo (Pb) y zinc (Zn). La selección de metales respondió a la definición descrita en el Acápite 2.2 (metales con densidad mayor a 5 g/cm^3), y al rango de elementos analizados por el laboratorio ICP-PUCP, comprendido en su servicio análisis de metales. (Ver Anexo 5). Sin embargo, algunas consideraciones se tomaron en cuenta para la evaluación de este grupo de metales. Como primera consideración, algunos de estos elementos se encuentran

[2] El método utilizado por el laboratorio ICP-PUCP fue ICP-MS mediante EPA 200.8 (1994). Determination of Trace Elements in Water and Wastes by Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometry, Rev. 5.4.

considerados como esenciales (Ver Tabla 4), los cuales en grandes dosis pueden convertirse en tóxicos.

Tabla 4: Metales pesados analizados en el presente estudio, sus densidades y su categoría como esenciales y/o como potencialmente tóxicos.

Elemento	Densidad g/cm^3	Esencial	Potencialmente tóxico
Al	2.7	x	x
As	5.7	-	x
Cd	8.7	-	x
Cr	7.2	x	x
Cu	8.9	x	x
Fe	7.9	x	x
Mn	7.4	x	x
Ni	8.9	x	x
Pb	11.3	-	x
Zn	7.1	x	x

FUENTE: Tabla inspirada del libro de Bautista Zuñiga (1999).

Como segunda consideración, el aluminio fue seleccionado, a pesar de no cumplir con la condición de la densidad, debido a que es un elemento abundante en la corteza terrestre y tiene un rol fisiológico neutral en el líquen, lo que le hace un elemento trazador del aporte del resto de metales provenientes del suelo. En el acápite 3.7.3 se explica con mayor detalle el rol que cumple este elemento en el presente estudio.

La tercera consideración está asociado a la naturaleza química del arsénico, el cuál es un elemento que no es un metal propiamente dicho, sino un metaloide, sin embargo está asociado con depósitos de muchos metales, además de ser un elemento que puede ser muy tóxico.

Finalmente, como cuarta consideración, se debe tomar en cuenta que, si bien, los metales seleccionados pueden estar asociados a la naturaleza geológica del ámbito de estudio, también se sabe que algunos de estos metales podrían estar asociados a las actividades antrópicas, los mismos que estarían siendo transportados por el aire hasta esas zonas. Así, la presencia de plomo podría estar asociado a la combustión de gasolina; el arsénico, cadmio,

zinc y cobre, a la actividad de extracción minera y el cromo, a la quema de residuos sólidos (Wallis ,2016).

3.6.1 Medición de metales en líquenes

Para llevar a cabo el análisis de metales en los líquenes, se seleccionó los líquenes más abundantes y presentes, en lo posible, en los tres sitios de estudio: Aguas arriba y abajo de la laguna de Parón y aguas arriba de Querococha. De esta manera, se escogieron las especies fruticosos *Usnea* sp1 y *Usnea* sp2; y el líquen folioso *Sticta weigelii*, cuyas características morfológicas son presentados en el Anexo 2. De cada especie se tomaron entre tres a cinco ejemplares al azar por cada sitio de muestreo los cuales fueron considerados como réplicas para los análisis estadísticos. Para el caso de la especie *Sticta weigelii*, solamente fueron considerados los sitios de estudio: "Parón arriba" y "Querococha arriba", ya que no fueron observados en "Parón abajo".

Luego estas muestras tuvieron que pasar por un proceso de descomposición por oxidación completa de la matriz orgánica, también conocida como proceso de mineralización. Este procedimiento se efectuó mediante dos vías: la vía seca y la vía húmeda, siguiendo la metodología realizada por Tucker (2003). Es preciso indicar que previo al proceso de digestión, las muestras seleccionadas fueron secadas a 80°C por 24 horas y luego se pulverizaron con ayuda de pilones y morteros. De este modo, por cada líquen, se obtuvo 1000 mg (salvo algunas excepciones donde no fue posible alcanzar esta cantidad) de muestra pulverizada los cuales fueron colocados sobre crisoles de porcelana de 30 mililitros. Una vez preparados los crisoles con las muestras en su interior, fueron colocados al interior de una mufla a una temperatura inicial de 180°C dándose inicio a la digestión por vía seca. Esta temperatura gradualmente fue aumentándose a ritmo de 50°C cada media hora hasta llegar a 500°C, temperatura a la que se logró calcinar y convertirla en ceniza blanca. Una vez obtenida las cenizas, se depositaron sobre tubos de ensayo. Luego se procedió con la digestión húmeda, llamada también digestión ácida, donde ácidos fuertes y agentes oxidantes fueron utilizados para asegurar la total destrucción de la materia orgánica (Chaparro G. et al. ,2016). Para ello, la metodología de Tucker (2003), indicó seguir con los siguientes pasos, los mismos que fueron efectuados en las instalaciones del laboratorio de Servicios de Análisis Químico (LASAQ) de la UNALM:

1. Las cenizas se depositaron en cada tubo y se agregó 0.4 ml de ácido nítrico (HNO_3) con una concentración de 10M. Luego el tubo se colocó en un calentador de tubos a una

temperatura de aproximadamente 100 °C, donde se realizó ciclos de adición y secado de 0.2 ml de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), cada 10-15 minutos; hasta completar 10 adiciones.

2. Después se agregaron 2.5 ml de HNO_3 10M a cada tubo, y se volvió a calentar a 100°C por 15 minutos. Si los residuos no se disolvían completamente se agregaba más peróxido para ayudar a la disolución.
3. Luego, las muestras fueron filtradas con papel filtro Whatman #1 asegurando enjuagar los residuos que se quedaban adheridas a los tubos con el ácido nítrico disuelto.
4. Una vez filtradas las muestras, se enrazó con agua destilada en matraces volumétricos de 100 ml. Finalmente estas muestras pasaron a recipientes de 40 ml para el posterior análisis por ICP-MS.

3.6.2 Medición de metales en las muestras de suelo

Del mismo modo que en los líquenes, los niveles de metales pesados en muestras de suelo fueron analizadas por el método del ICP-MS. Por tanto, las muestras tuvieron que pasar previamente por un proceso de preparación física y química.

Cada una de las muestras compuestas (una por transecto) fueron secadas en una mufla a 80°C por 24 horas. Una vez secadas, las fueron tamizadas con tamiz N°6 (de 3.36 mm de abertura) para homogeneizar las muestras a un solo tamaño de grano.

Con las muestras homogeneizadas se procedió a realizar el proceso de digestión seca y ácida de forma similar al descrito anteriormente para los líquenes. Primero se pesaron 2000 mg de suelo seco y pulverizado correspondiente a cada transecto evaluado. Del mismo modo que en los líquenes, estas muestras fueron calcinadas en la mufla. Luego a cada muestra se le agregó 6 ml de ácido nítrico concentrado y 2 ml de ácido clorhídrico concentrado, combinación muy usada para la extracción de numerosos metales en suelos. Luego, la solución ácida fue calentada a 100 °C por 15 minutos. Después de enfriar, se añadió 2 ml de H_2O_2 a la mezcla digerida y se llevó nuevamente a calentar al bloque de calor a 100ºC aproximadamente hasta que la solución se consuma la mitad. Finalmente, la solución se enrasó a matraces volumétricos de 100 ml enrasándose con agua destilada de los se extrajo 40 ml para los análisis ICP-MS. En total se ejecutaron 7 muestras de suelo, uno por cada transecto. Por temas logísticos y económicos, no fue posible realizar una mayor cantidad de análisis de suelo capaz de conferirle a los análisis una mayor representatividad estadística.

3.6.3 Conversión de mg/L a mg/kg o *ppm*

Es preciso indicar que los resultados de los análisis de metales, realizados por el laboratorio ICP-PUCP fueron mostrados en mg/L (Ver Anexo 5). Por lo que, tanto los resultados para los líquenes como para los suelos, fueron convertidos a unidades mg/kg, ya que esto permite comparar con los resultados de estudios similares en la bibliografía. Para ello, se realizó relaciones de proporcionalidad de volumen y masa, de acuerdo a los pasos seguidos durante la digestión ácida. Como se mencionó en los acápites anteriores, los análisis de metales se hicieron en muestras de 40 mL, el mismo que fue obtenido de un matraz de 100 mL de solución acuosa, finalizada la digestión ácida. Entonces considerando que los valores de los informes de ensayo se muestran la masa de metal presente en 01 litro de solución (o 1000 mL), se hace el cálculo de la masa del metal para 100 mL.

Entonces, se tiene que:

X mg ---------- 1 L (1000 mL)

X/10 mg ---------- 100 mL

X= masa del metal en mg mostrado en los informes de ensayo

De esta manera, se tuvo que la masa del metal analizado, presente en el matraz de 100 mL fue X/10 mg. Lo que significa que esta masa de metal estuvo presente en las muestras sólidas que pasaron por el proceso de digestión ácida. En el caso de los líquenes se utilizó, en su mayoría, 1000 miligramos de talo seco, mientras que en las muestras de suelos, 2000 miligramos. A continuación, se presenta la operación de conversión a mg/kg $_{\text{peso seco}}$ o ppm para el caso de los líquenes. .

$$\frac{X.10^{-1}\ mg_{metal}}{M\ mg_{líquen}} \ x\ \frac{1\ mg_{líquen}}{10^{-3} g_{líquen}} \ x\ \frac{1\ g_{líquen}}{10^{-3} kg_{líquen}} = \frac{X.10^{5}}{M}\ \frac{mg_{metal}}{kg_{líquen}}$$

M= masa en miligramos de la muestra de talos.

Para el caso de las muestras de los suelos la conversión fue de la siguiente manera:

$$\frac{X.10^{-1}\ mg_{metal}}{2000\ mg_{suelo}} \ x\ \frac{1\ mg_{suelo}}{10^{-3} g_{suelo}} \ x\ \frac{1\ g_{suelo}}{10^{-3} kg_{suelo}} = \frac{X.10^{2}}{2}\ \frac{mg_{metal}}{kg_{suelo}}$$

3.7 ANÁLISIS DE DATOS

3.7.1 Análisis de datos para el desarrollo del objetivo 1

Para representar la liquenobiota de cada sitio de estudio, se emplearon gráficos de dispersión colocándose en el eje de las ordenadas, el número de registros de cada especie, y en el eje de las abscisas, el rango (entiéndase como orden) que ocupó cada especie entre las demás especies según el valor de su registro. Asimismo, se elaboraron gráficos de barras para representar la frecuencia de registros según el biotipo del líquen (crustoso, folioso y fruticoso) y su hábito (cortícola, muscícola y saxícola). Para la evaluación de las diferencias de liquenobiota entre los sitios de estudio, se utilizaron los gráficos antes mencionados y otros dos gráficos de frecuencias donde se compararon las distribuciones de las familias taxonómicas a las que pertenecieron las especies colectadas y los valores del índice de Shannon-Wiener[3] calculados por cada sitio de estudio. Finalmente, se hizo una revisión bibliográfica sobre la sensibilidad o tolerancia a los metales pesados a nivel de género de los líquenes identificados, afín de inferir si las diferencias de liquenobiota responden a una supuesta mayor o menor presencia de metales pesados en los sitios de estudio.

3.7.2 Análisis de datos para el desarrollo del objetivo 2

a. Análisis exploratorio de las concentraciones de metales presentes en los líquenes

De forma previa a los análisis estadísticos se realizó un preanálisis de naturaleza exploratoria a los valores de los metales pesados bioacumulados, el cual comprendió el cálculo de estadísticos descriptivos, como son las medidas de tendencia central (media, mediana, moda), las medidas de dispersión (varianza, desviación estándar, boxplots y el coeficiente de variación) y la normalidad de la distribución de los datos. Todo ello permitió la identificación de datos atípicos (outliers) los cuales fueron tratados con diferentes test para verificar si realmente estos outliers se debían a factores externos o a un comportamiento propio de los datos del metal. Es así que dos test de outliers fueron tomados en cuenta para la detección de outliers a nivel significativo: el Test de Grubbs y el test de Rosner o también denominada Prueba de desviación extrema Studentizada (ESD, en siglas en inglés). El primero permitió determinar si los valores externos a los límites superior e inferior del diagrama de cajas fueron realmente outliers (asumiendo que los valores presentan una distribución aproximadamente normal), aunque, este solo permitió detectar tres outliers a lo

[3] $H' = -\sum p_i \ln p_i$, donde p_i es la frecuencia relativa de cada especie.

máximo. En los casos donde existieron cantidades mayores a tres outliers, fue empleado el segundo test.

Una vez que los outliers fueron identificados se procedió a aplicar métodos para disminuir su influencia sobre la data principal. Uno de los métodos que permitió lidiar con estos outliers, sin llegar a la remoción de éstos, fue la Winzorización (Winsorization o Winsorizing en inglés), una técnica atribuida al bioestadístico Charles P. Winsor (1895-1951). Este método consiste en reducir la influencia de los outliers en la data reemplazándolos por el valor más próximo a éstos, perteneciente a la distribución de la data en el boxplot, de tal manera, que no afecte notablemente la precisión del estimador estadístico (Goodson ,2011). Si el outlier fue menor al límite inferior se reemplazó por el valor vecino dentro del intervalo entre el primer cuartil y el límite inferior. Mientras que para el outlier que estuvo por encima de límite máximo se reemplazó por el valor inmediatamente menor, dentro del intervalo entre el tercer cuartil y el límite máximo. Este procedimiento fue realizado tomando en cuenta que los estadísticos descriptivos como la media y la varianza son susceptibles a los outliers, asimismo, para fortalecer las inferencias estadísticas que se puedan obtener de estos datos.

También se realizó una exploración a través de los histogramas en cada metal ya que para algunos análisis estadísticos de tipo paramétrico fue necesario conocer si los datos siguieron una distribución normal, siendo parte de sus supuestos (como sucede en los test de correlación o de regresión). Sin embargo, el tipo de histograma no fue de frecuencias sino de densidad el cual permitió estimar visualmente (curva ajustada a la curva normal) si la data provino de una población con distribución normal. La normalidad, finalmente fue confirmada a través de la utilización del test de Shapiro-Wilks.

b. Aplicación de test estadísticos

Una vez que los resultados fueron analizados con los estadísticos descriptivos se procedió a evaluar los efectos de las variables categóricas (o *factores*): “Sitio de estudio” y el “Tipo de especie”, sobre las concentraciones de metales en los líquenes. En otras palabras, se buscó determinar la existencia de diferencias significativas entre las medias de los grupos de cada factor, el cual se logró del análisis de varianza (ANOVA). Sin embargo, como se trató de dos factores, se empleó una variante del ANOVA denominada ANOVA de dos vías (en inglés, Two-way ANOVA). La particularidad de esta prueba es que permite no solamente evaluar los efectos posibles de cada uno de los dos factores sino también los de su

interacción, de forma significativa (Beckerman et al. ,2017). Su modelo que siguió fue el siguiente: $Y_{ijk} = \mu + \alpha_j + \beta_k + (\alpha\beta)_{jk} + e_{ijk}$. Del mismo modo que el ANOVA, esta variante exigió el cumplimiento de los siguientes supuestos:

1. Los residuos deben ser distribuidas normalmente (desviación de las observaciones con respecto a las medias de los grupos), **2.** Las varianzas entre los grupos deben ser homogéneas y **3.** Las observaciones deben ser independientes (Zaiontz ,2020). Los dos primeros supuestos fueron puestos a prueba a través de los test Shapiro-Wilks y el test de Levene, respectivamente.

De no cumplirse cualquiera de los dos primeros supuestos, se procedió a utilizar la variante no paramétrica del ANOVA, la Prueba de Kruskal Wallis, el cual compara medias pero empleando rangos asignados de menor a mayor a las observaciones. Sin embargo, este último test exigió al menos el cumplimiento del segundo supuesto, a través de la Prueba Bartlett, y el tercer supuesto.

En los casos donde se encontró diferencias significativas en los grupos se procedió a efectuar los análisis post hoc de comparaciones múltiples: para el caso del ANOVA de dos vías fue utilizado la prueba Tukey, mientras que para el de Kruskal Wallis, la prueba de Dunn (1964).

c. Análisis de Componentes Principales

Siendo varios los metales los que se evaluaron, fue pertinente utilizar un análisis multivariado capaz de resumir y explicar toda, o gran parte, de su variabilidad. Como se trató de variables continuas, se empleó el Análisis de Componentes Principales (ACP), que es una técnica estadística de ordenación el cual cambia, re-escala y rota los datos provenientes de múltiples variables en un espacio multidimensional (donde cada variable es representada por una dimensión), para ser visualizadas en gráficos de uno, dos o tres ejes. De este modo, el ACP reduce la dimensión (con una pérdida mínima de información), transformando un conjunto de variables originales en un nuevo conjunto de variables denominadas **componentes.** Sin embargo, antes de llevarse a cabo este análisis, previamente tuvo que probarse que las variables originales en su mayoría se encuentren correlacionadas, ya que, variables incorrelacionadas generarían múltiples componentes lo que sería lo mismo que si se analizaran de forma individual, es decir, no habría sentido realizar el ACP.

Los nuevos componentes fueron representados como ejes ortogonales incorrelacionadas entre sí, siendo cada uno, el resultado de combinaciones lineales de las variables originales.

La varianza de los valores de la componente principal (nueva variable) representó la cantidad de información que lleva incorporada. Es así, que el componente que mayor varianza presentó se le conoció como la **primera componente principal** y fue representado como un eje horizontal. Mientras que la segunda componente principal fue definida de forma perpendicular al primero. El tercer componente también fue perpendicular al segundo y así sucesivamente para el resto de componentes (Matthiopoulos ,2011). Sin embargo, se utilizó el criterio del autovalor superior a la unidad (Aldás y Uriel ,2017), ya que se espera que la varianza de una componente explique más información que la variable misma (varianza igual a la unidad, cuando las variables están estandarizadas).

Principalmente son tres los resultados que son relevantes para el ACP, los mismos que se pueden mostrar gráficamente: 1. La composición de cada componente principal, 2. La proporción de la varianza explicada por cada componente principal, y 3.la ordenación de los resultados del ACP de las variables (originales) y de los individuos (observaciones) dispuestos sobre el plano de las dos componentes principales (Matthiopoulos ,2011).

El primer resultado permitió reconocer cuáles fueron las variables que tienen una mayor contribución en los componentes, y si éstas están actuando correlacionadas positivamente o negativamente entre sí. El segundo resultado fue visualizado a través de un gráfico de barras, donde se indicaron los porcentajes de varianza explicada de cada uno de los componentes. Mientras que para el tercero, se utilizó un gráfico de ordenación que es un gráfico de dispersión de los datos en los ejes de los dos componentes principales. Este gráfico fue representado tanto para las variables como para los individuos (observaciones). Para el caso del gráfico de las variables, se suele utilizar un círculo con centro en la intersección de los ejes de los componentes principales de donde salen unas flechas correspondientes a los autovectores de las variables originales. Estas flechas fueron dibujadas en función a la carga o *loadings* de las variables sobre los componentes principales, es decir, a la influencia de la variable en la generación de la componente (Aldás y Uriel ,2017). La carga de las variables sobre cada uno de los dos ejes, generaron unas coordenadas y los vectores respectivos (autovectores).

Visualmente, para reconocer la calidad de representación de las variables sobre el gráfico de ACP, se utilizó el coseno cuadrado (cos2) de las variables. Este se calcula con el ángulo del triángulo recto formado entre el origen del plano de los componentes, el autovector de la variable y su proyección sobre el componente.

Con respecto al gráfico de dispersión para los individuos (observaciones), sobre los dos ejes de los componentes principales. Se utilizaron como coordenadas los valores obtenidos que presentó cada observación en cada uno de las nuevas variables (los componentes). Siendo dos factores los que se están evaluando en este estudio: tipo de especie (*Usnea* sp1, *Usnea* sp2 y *Sticta weigelii*) y sitio de estudio (Parón arriba y abajo, y Querococha arriba), se buscó agrupar a través de elipses las observaciones en este gráfico de dispersión, con la finalidad de reconocer si se forman elipses separadas o unidas entre las categorías de cada factor, y de esta manera estimar un posible efecto diferenciado sobre los individuos analizados de forma multivariada.

Finalmente, todos estos análisis y gráficos fueron realizados utilizando diversos paquetes estadísticos del software R, entre los cuales estuvieron *factoextra, ade4* y *FactoMineR.*

3.7.3 Análisis de datos para el desarrollo del objetivo 3

Con la finalidad de tener una aproximación sobre la relación entre los metales captados por los líquenes y la disponibilidad de estos elementos en los suelos (materia del objetivo 3) fueron utilizados dos métodos de análisis: a) Análisis comparativo de los rangos de abundancia de metales en líquenes y suelos, b) Análisis de los factores de enriquecimiento, los cuales utilizaron los resultados del contenido metálico de los suelos obtenidos en cada transecto del sitio de estudio (Ver Anexo 7). Sin embargo, para la comprensión de los resultados de estas metodologías fue pertinente realizar un análisis previo de los resultados de metales en los suelos. Para ello se utilizaron gráficas de barras donde se compararon los diferentes valores de los metales presentados en los siete transectos.

a. Análisis comparativo de los rangos de concentraciones de metales

Este método consistió en comparar la posición (rango) que ocupan los metales en líquenes y suelos para determinar si la presencia de un determinado metal es mayor o menor en alguno de los dos componentes (Loppi et al. ,1999). Para ello, en un plano cartesiano, se dispone en el eje de las abscisas los rangos correspondientes a los líquenes, en tanto, en el eje de las ordenadas, los rangos de los suelos. De alguna manera se espera que los rangos de ambos componentes coincidan ya que los niveles de los metales bioacumulados estarían en función de su disponibilidad en el ambiente. Sin embargo, algunos factores podrían hacer que los rangos difieran entre sí, por ejemplo, el rol que cumple un determinado metal en la fisiología del líquen, el tipo de mecanismo por el cual el metal fue captado por el líquen, afinidad por el sustrato del suelo o afinidad entre elementos metálicos. En ese sentido se establece una

diagonal de 45° grados desde el origen de coordenadas que representa la coincidencia de los rangos. Aquellos elementos que estén fuera de esta diagonal indicarían una mayor presencia en alguno de los componentes.

b. Análisis de los Factores de Enriquecimiento

Asimismo, el segundo método consistió en calcular los factores de enriquecimiento en los líquenes. El factor de enriquecimiento (en inglés Enrichment Factors o EF) es un método para determinar qué porción de la concentración de metales corresponde a la composición de metales presente de forma natural, y qué porción corresponde a fuentes antropogénicas. Este método estandariza los valores de las concentraciones de los elementos presentes en los líquenes en función a las concentraciones del suelo. El elemento estandarizador fue asignado al elemento Aluminio, ya que es un elemento principal en la corteza terrestre y tiene una importancia metabólica limitada en los líquenes (Loppi et al. ,1999, Vieira et al. ,2004). Este elemento se usa como un indicador de la contaminación de la muestra por el suelo y el polvo de roca transportada (Gordon et al. ,1995, Loppi et al. ,1999). El factor de enriquecimiento para el elemento X es calculado usando la siguiente fórmula:

EF = (XL/RL)/ (XS/RS), donde XL es el elemento en cuestión en el líquen, RL el elemento de referencia (Aluminio) en el líquen, XS el elemento en cuestión (el elemento que se quiere analizar) en el suelo y el RS el elemento de referencia en el suelo. Si el valor del EF es cercano al 1 significa que proviene de fuentes naturales. Mientras si los valores de EF están en el intervalo de 10-20 indicarían que una parte importante del metal bioacumulado tendría un origen atmosférico. Mientras que valores de EF mayores a 30 terminaría por confirmar la tendencia del elemento metálico a comportarse como atmófilo, sujetos a transporte atmosférico de largo alcance (Loppi et al. ,1999).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 RESULTADOS

4.1.1 Liquenobiota de las áreas de estudio

En las tres áreas de estudio se lograron obtener un total de 33 especies de líquenes identificadas, distribuidas en 11 familias taxonómicas, las mismas que fueron representadas en el album fotográfico mostrados en el Anexo 3 y listadas por cada sitio de estudio en el Anexo 1. La composición liquenobiótica presentó variaciones entre los sitios de estudio. A continuación, se presentaron las características de la liquenobiota encontrada en las microcuencas de Parón y Querococha.

a. Características de la liquenobiota observada en el sitio de estudio de Parón arriba

En este sitio de estudio pudieron identificarse un total de diez especies de líquenes. Como se puede visualizar en la Figura 11, las especies más abundantes fueron dos especies de líquenes fruticosos del género *Usnea*, los cuales fueron denominadas *Usnea* sp1 y *Usnea* sp2. Es preciso indicar que, el término "sp" fue asignado a aquellos registros que no se lograron identificar con certeza su nivel de especie. La *Usnea* sp1 estuvo principalmente presente como epífito de los arbustos que habitan este sitio de estudio. Mientras que la especie *Usnea* sp2 presentó un hábito saxícola, es decir, individuos fueron observados desarrollándose sobre las rocas presentes en este sitio.

Como segundo biotipo dominante estuvieron los líquenes de biotipo folioso, los cuales en su mayoría fueron encontrados pegados a las rocas. En tanto, el biotipo crustoso solo estuvo representado por una especie el cuál fue hallado sobre los musgos que cubrían algunas rocas.

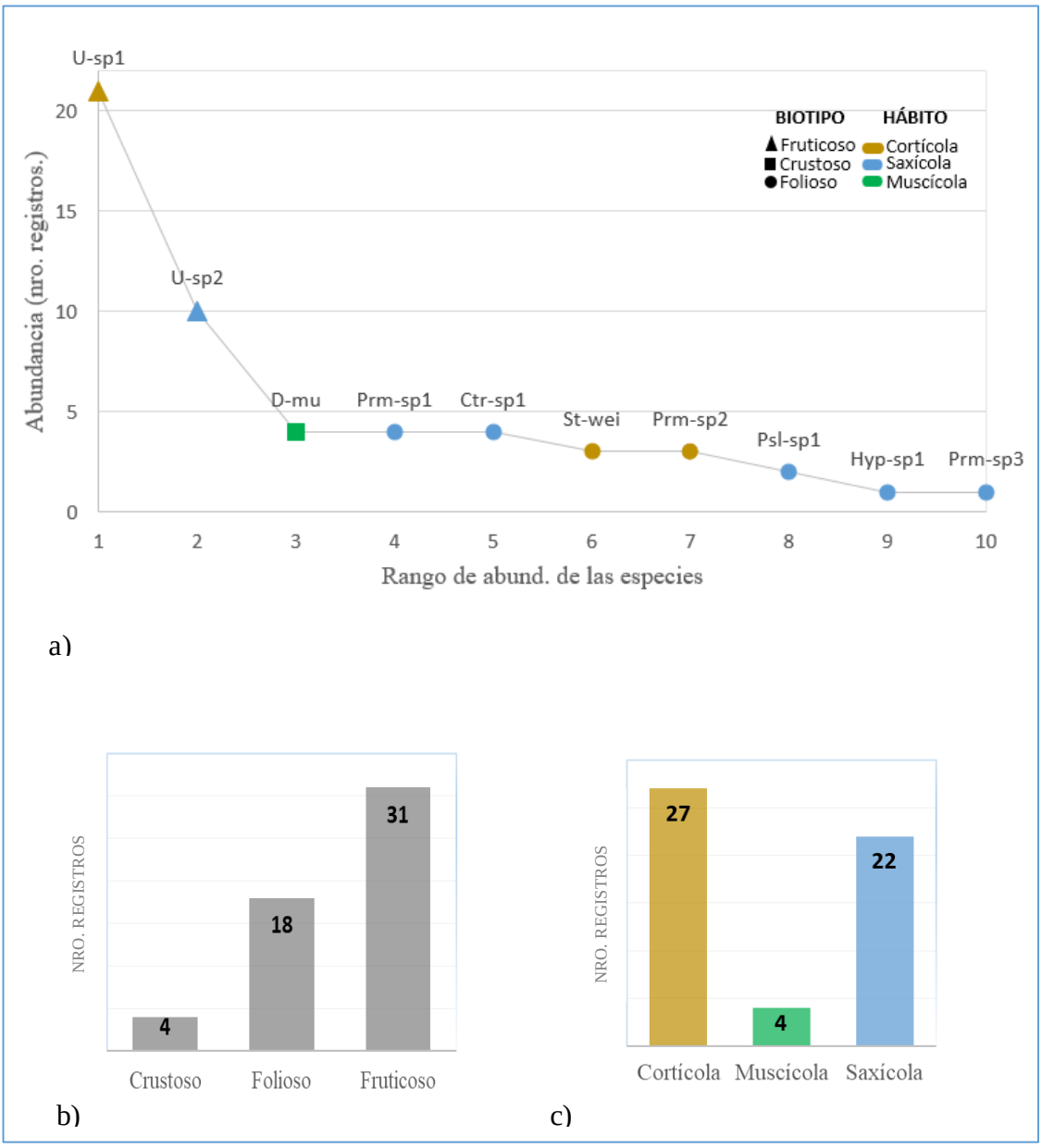


Figura 11: Análisis de la liquenobiota del sitio de estudio Parón arriba. a) Rango por abundancia de los líquenes colectados en este sitio de estudio, b) Abundancia según el biotipo, c) Abundancia según el hábito que presentan las especies de líquenes de este sitio de estudio**.**

b. Características de la liquenobiota observada en el sitio de estudio de Parón abajo

Como puede apreciarse en la Figura 12, en la parte baja de la laguna de Parón, la cantidad de especies encontradas fue mayor que la parte de arriba. Asimismo, la abundancia según el biotipo, dejó de ser fruticoso y pasó a ser de tipo folioso, quienes en su mayoría fueron encontrados sobre los musgos de los árboles o rocas.

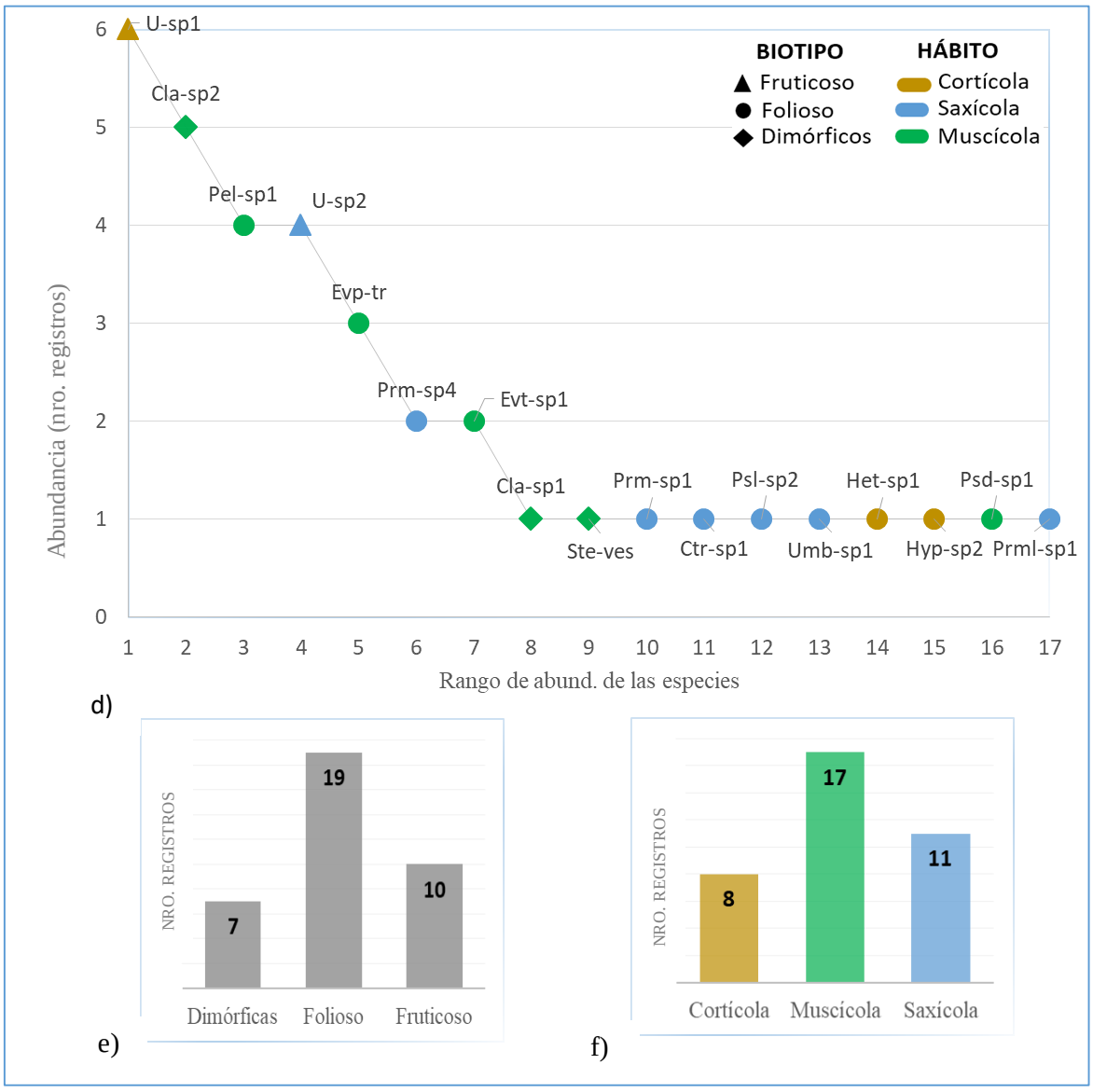


Figura 12: Análisis de la liquenobiota del sitio de estudio Parón abajo. d) Rango por abundancia de los líquenes colectados en este sitio de estudio, e) Abundancia según el biotipo, f) Abundancia según el hábito que presentan las especies de líquenes de este sitio de estudio

c. Características de la liquenobiota observada en Querococha arriba

En lo que respecta a este sitio de estudio, la cantidad de especies encontradas superó a los hallados en los sitios de la microcuenca de Parón (Ver Figura 13). La predominancia en el biotipo estuvo repartida entre los foliosos y fruticosos, aunque el primero fue la más abundante. Una característica propia de este sitio de estudio fue que los tres biotipos fueron encontrados en su mayoría presentando un hábito saxícola.

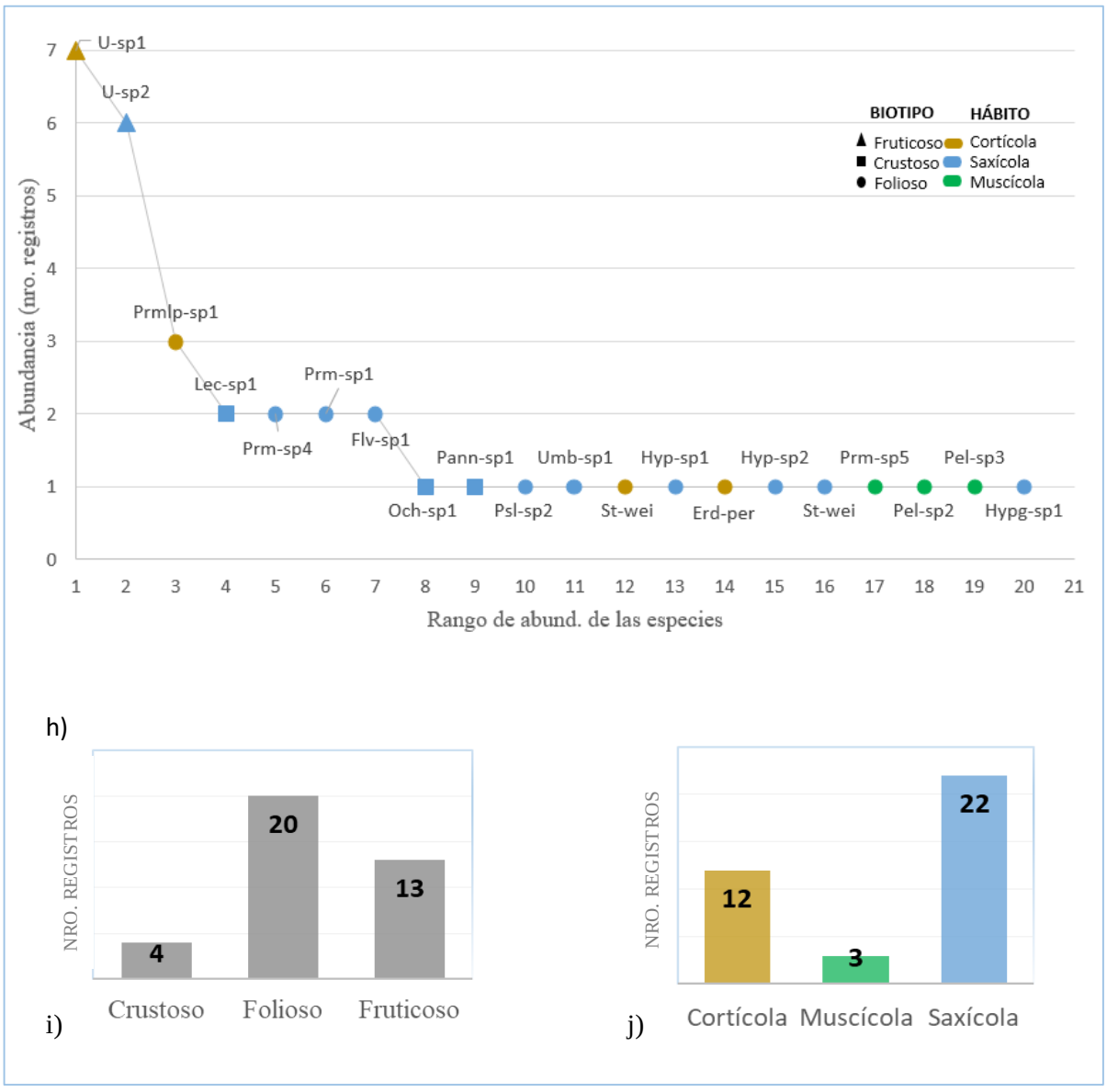


Figura 13: Análisis de la liquenobiota del sitio de estudio Querococha Arriba. d) Rango por abundancia de los líquenes colectados en este sitio de estudio, e) Abundancia según el biotipo de líquen, f) Abundancia según el hábito que presentan las especies de líquenes de este sitio de estudio.

A nivel de familias taxonómicas, la familia Parmelaceae fue la que más registros presentó en los tres sitios de estudio (Ver Figura 14) . En el resto de familias, en su mayoría, estuvieron presente solamente en un sitio, con abundancias muy por debajo a la familia Parmelaceae. Finalmente la Figura 15, mostró los valores del índice de Shannon para los tres sitios. Puede observarse que los sitios de Parón abajo y de Querococha arriba fueron los que mayor índice de diversidad presentaron, es decir, que tanto en abundancia como en número de especie fueron mayores que en Parón arriba.

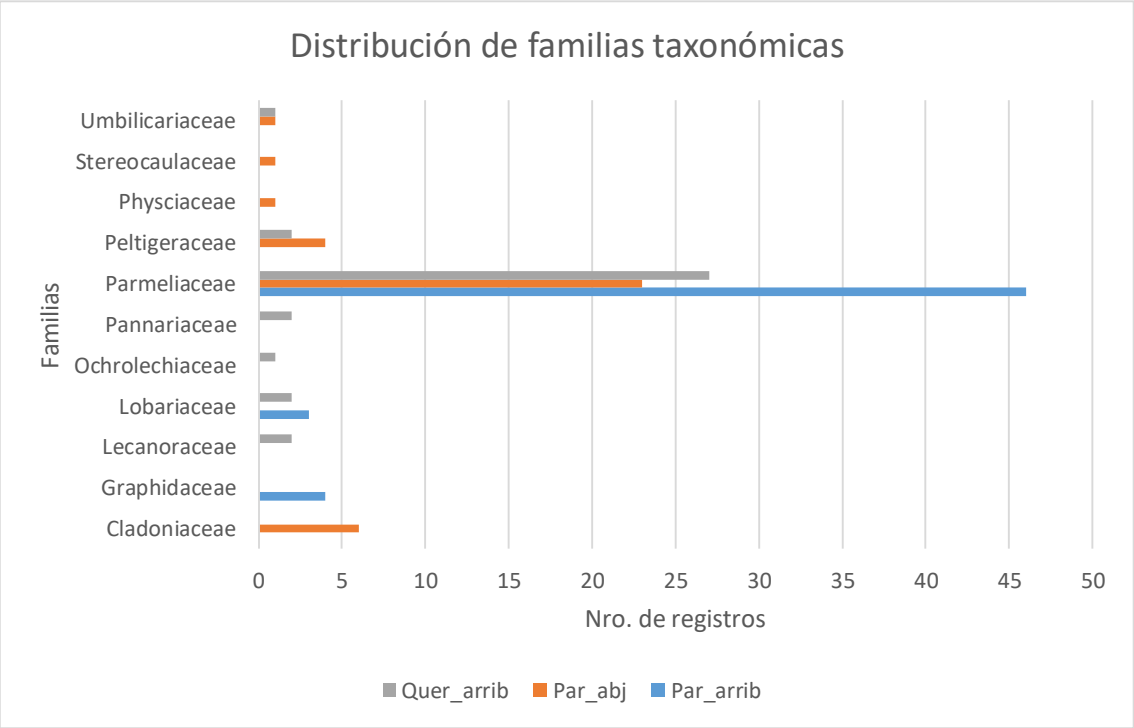


Figura 14: Distribución de las familias taxonómicas de los líquenes presentes en los sitios de estudio

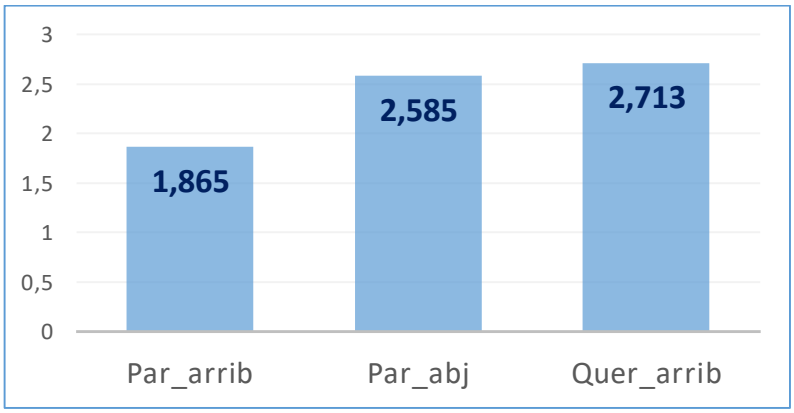


Figura 15: Comparación de los valores del índice de diversidad de Shannon entre los sitios de estudio

4.1.2 Concentración de metales en los líquenes

En total fueron realizados veintisiete (27) análisis de metales aplicados en dos especies de líquenes del género *Usnea* y de la especie *Sticta weigelii,* según lo mencionado en el acápite 3.6.1. El Anexo 5 mostró las concentraciones obtenidas de estos análisis en unidades mg/L. Sin embargo, al tratarse de muestras biológicas con valores de masas conocidas se procedió a transformar estas unidades a mg/kg (Ver Anexo 6); la conversión de unidades puede observarse en el acápite 3.6.3. Respecto a los valores de los metales analizados, todos a excepción del Cd, superaron sus límites de detección. Por tanto, los valores de este último metal no fueron tomados en cuenta en los análisis posteriores.

a. Análisis exploratorio de los resultados de los análisis de metales en los líquenes

Los diagramas boxplots mostrados en el Anexo 8 permitieron identificar a simple vista la presencia de datos atípicos en la mayoría de los metales analizados. Al ser sometidos estos valores a los test de Grubbs y de Rosner (Ver acápite 3.7.2), fue posible observar que los valores de los metales: Al, As, Cu, Ni, Pb, presentaron dos outliers que superaron significativamente sus límites máximos. En tanto, los elementos Mn y Zn presentaron más de tres outliers (4 y 5, respectivamente) que fueron significativas. Solamente los valores de Fe no presentaron ningún outlier significativo.

Luego de aplicarse la winzorización (Acápite 3.7.2), se obtuvo una data más homogénea. Por ejemplo, los valores del coeficiente de variación (Ver Anexo 9), definido como el porcentaje que ocupa la desviación estándar sobre la media, resultaron menores al 80% para todos los metales, indicando que sus medias fueron representativas. Por tanto, esta data sirvió como base para la realización de los análisis estadísticos posteriores.

En lo que respecta a la evaluación de la normalidad de los metales, los histogramas de densidad mostrados en el Anexo 10 y los resultados del test de Shapiro-Wilks (Ver Anexo 11) determinaron que los valores bioacumulados de los metales Al, Cu y el Fe siguieron una distribución normal, mientras que en el resto de metales, no cumplieron con este supuesto.

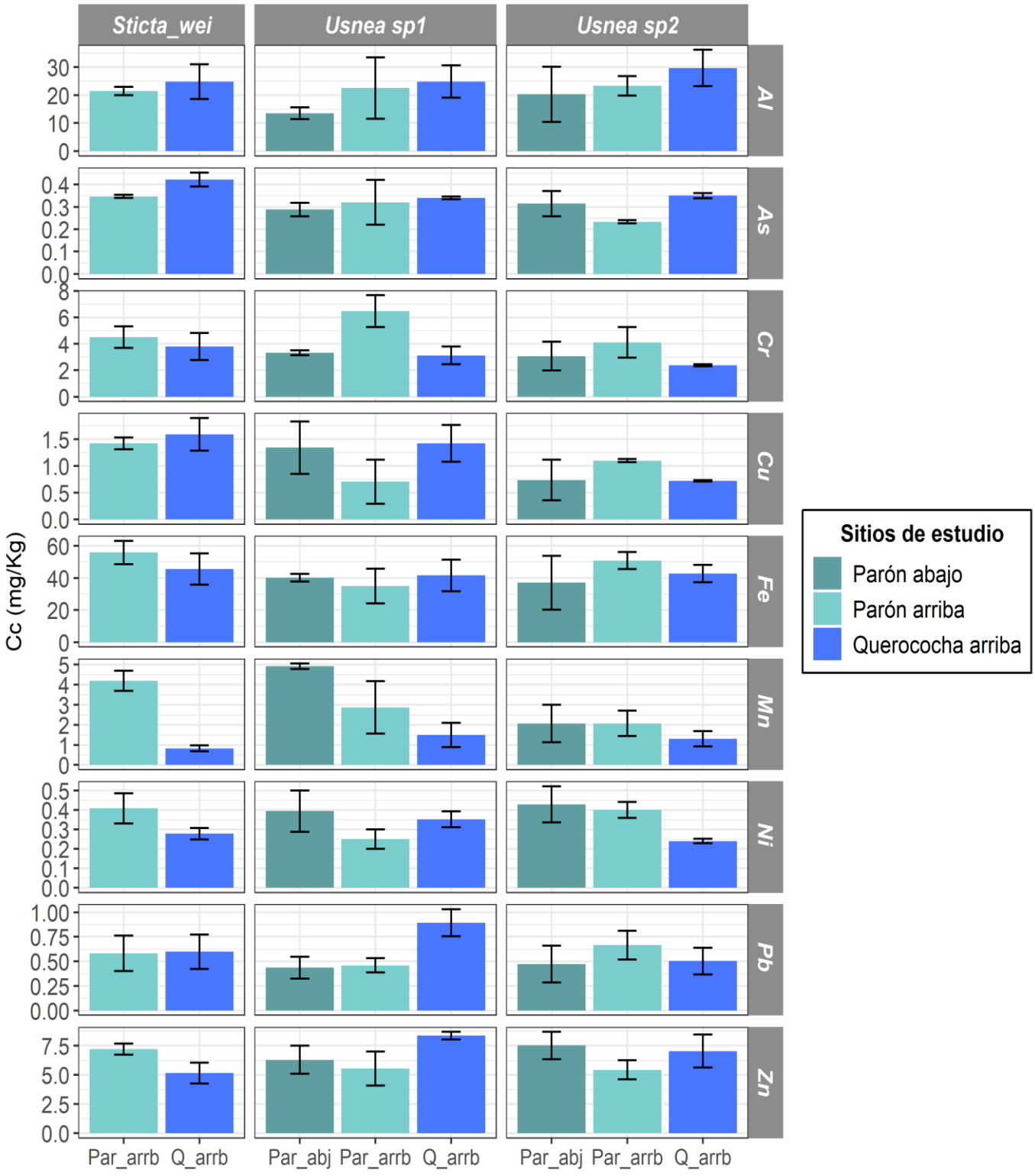


Figura 16: Gráficas de barra de las concentraciones medias bioacumuladas para cada metal, según las especies de líquenes y los sitios de estudio donde se colectaron.

b. Análisis de los estadísticos descriptivos de las concentraciones metálicas bioacumuladas

Con respecto a los valores de los estadísticos descriptivos mostrados en el Anexo 9, pudo observarse que las medias de las concentraciones bioacumuladas fueron los más altos en los metales Fe y Al, con valores respectivos de 44.12 y 20.4 mg/kg. Luego se tuvo metales con valores menores a 10 mg/kg pero mayores a la unidad, como el zinc (6.46 mg/kg), cromo (3.40 mg/kg), manganeso (2.05 mg/kg) y cobre (1.15 mg/kg). Finalmente, las medias de los metales plomo, arsénico y níquel presentaron los siguiente valores: 0.52, 0.34 y 0.31 mg/kg, respectivamente. Por otro lado, en la Figura 16, las medias de las concentraciones bioacumuladas fueron mostradas por especie y por sitio de estudio. En ella, fue posible observar algunas diferencias en algunos metales, aunque, sólo fueron confirmadas a través de la aplicación de las pruebas estadísticas presentados a continuación.

c. Resultados de las Pruebas ANOVA y Kruskal-Wallis

Los resultados de estos test son mostrados en el Anexo 12. Los metales que cumplieron con los supuestos del ANOVA de dos vías, fueron el Al, Cu, Fe, Mn, Ni y Pb. Es preciso notar que hubo algunos metales (como el Mn) que, si bien sus observaciones no siguieron una distribución normal, cumplieron con la normalidad de sus residuos, siendo esta condición, la válida para esta prueba. Por otro lado, aquellos metales que no cumplieron con los supuestos de esta prueba fueron el As, Cr y el Zn. Por tanto, en estos últimos metales se utilizó la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis (Ver Anexo 13).

De las pruebas ANOVA de dos vías realizadas en todos los metales que cumplieron los supuestos, no se encontraron diferencias significativas para ningunos de los factores a excepción del Mn, donde se observaron diferencias significativas para el factor "Sitio de estudio" (valor $p=0.001139 < 0.05$). El posterior análisis con la prueba Tukey, arrojó diferencias significativas entre las distintas zonas de estudio, los cuales fueron representados por la Figura 17. En esta figura puede visualizarse que los valores bioacumulados del manganeso en los dos sitios localizados en la microcuenca Llullán-Parón fueron mayores que en el sitio ubicado aguas arriba de la laguna de Querococha, indistintamente al tipo de especie de líquen evaluado. Sin embargo, la prueba de interacción (valor $p= 0.0454454$) mostró que el factor especie podría estar actuando de forma sinérgica a los sitios de estudio.

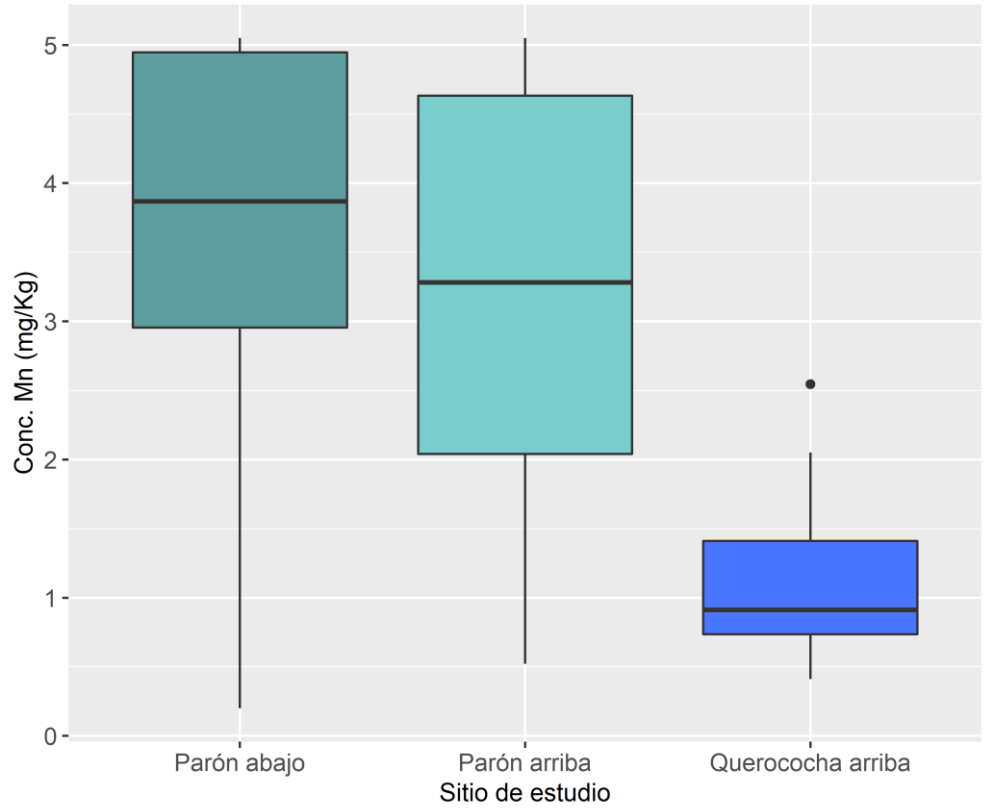


Figura 17: Diagramas de cajas de las concentraciones del manganeso bioacumulados en función al sitio de estudio.

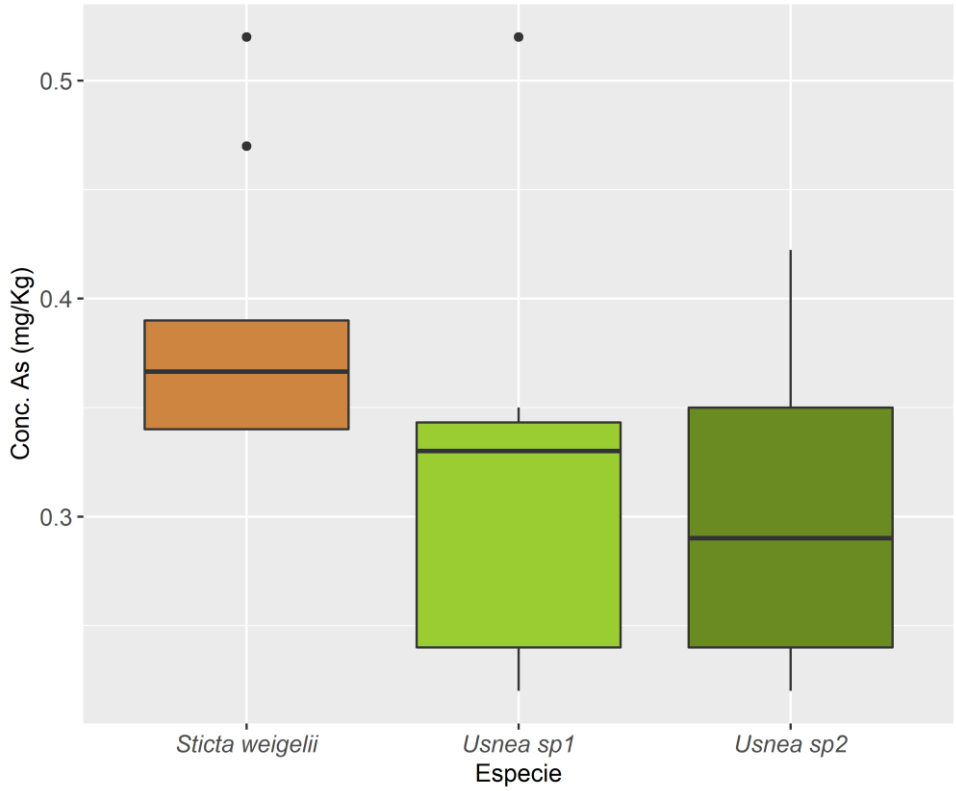


Figura 18: Diagramas de cajas de las concentraciones del arsénico bioacumulados en función a la especie de líquen

En lo que concierne a los metales As, Cr y el Zn, como se mencionó anteriormente, fueron evaluados con la prueba Kruskal-Wallis, donde los factores fueron analizados por separado. Como resultado, ni los sitios de estudio ni el tipo de especie generaron diferencias significativas entre las medias de sus grupos a excepción del metal arsénico, quien mostró diferencias significativas para ambos factores. Aunque, luego de aplicarse el test de comparaciones múltiples, los p-valor (ajustado con la corrección de Bonferroni) no fueron lo suficientemente significativas (Ver valores p en Anexo 13) para afirmar si alguno de estos grupos presentó mayores o menores valores de este metal que los otros grupos. A pesar de ello, algunas tendencias pudieron observarse en las Figuras 18 y 19. A nivel de especie, la Figura 18 mostró que, la especie *Sticta weigelii* presentaría mayores concentraciones de arsénico que las dos especies del género *Usnea*. Mientras que, a nivel del sitio de estudio, al parecer habría una mayor presencia de este metal en el sitio de estudio Querococha arriba (Figura 19).

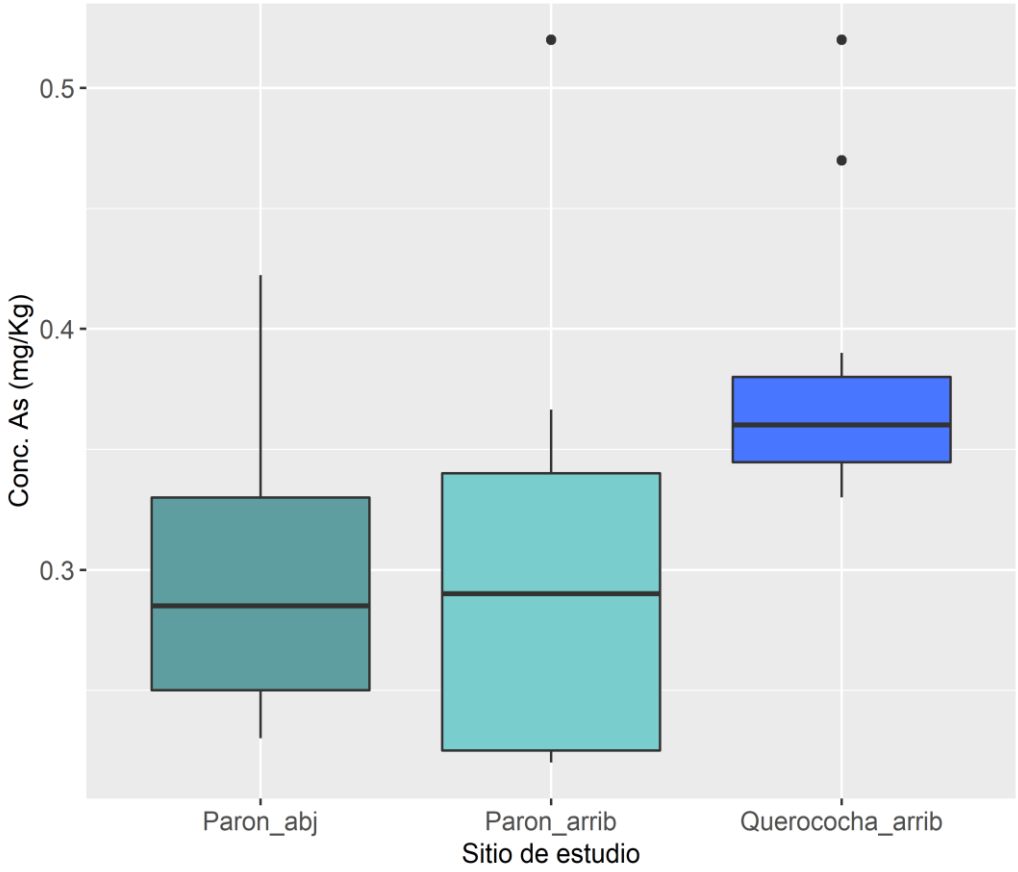


Figura 19: Diagramas de cajas de las concentraciones del arsénico bioacumulados en función al sitio de estudio.

De estos resultados puede concluirse que, en la mayoría de metales analizados en los líquenes, tanto los sitios de estudio como el tipo de especie de líquen, no generaron

variaciones significativas en los valores bioacumulados en los líquenes. Solo en los casos del manganeso y el arsénico, se encontraron diferencias significativas, a nivel del sitio de estudio y el tipo de especie, respectivamente.

d. Análisis de componentes principales de los metales bioacumulados en los líquenes

Como fue mencionado en el acápite 3.7.2, se utilizó el ACP para reconocer patrones que permitan explicar la variación de los nueve metales bioacumulados. En ese sentido, en el Anexo 14 se presentan los coeficientes de correlación y sus respectivas significancias entre los nueve metales. Es preciso indicar que, para la evaluación de las significancias de las correlaciones se utilizó el test de Spearman (no paramétrico), ya que varios de los metales no presentaron una distribución normal. La Figura 20, grafica lo anterior a través de una matriz de correlaciones, coloreados con diferentes tonalidades según el valor del coeficiente de correlación que tuvieron (Ver su leyenda) y se marcaron con aspa las correlaciones que no fueron significativas. A simple vista, es posible observar en esta figura que el metal que más correlaciones significativas presentó fue el aluminio (con 05 metales), mientras que el resto de metales, con a lo más 04 metales (Pb).

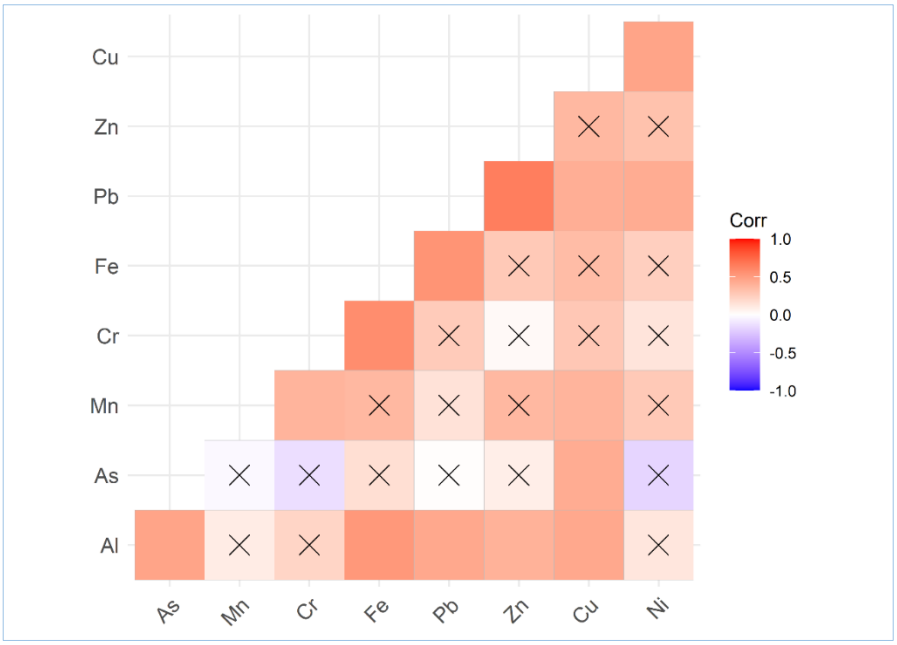


Figura 20: Matriz de correlaciones entre los metales bioacumulados (las variables) y significancia ($p<0.05$). Nota: Las aspas (X) indican correlaciones no significativas.

Comprobada la presencia de correlaciones se llevó a cabo el ACP, aunque con previa estandarización de las observaciones tomando en cuenta la heterogeneidad de las escalas entre las concentraciones de los metales bioacumulados.

En el Anexo 15 puede observarse el valor de las varianzas de los componentes principales (autovalores, eigenvalues en inglés) y el porcentaje sobre la varianza total que representaron. Luego de aplicar el criterio de autovalor superior a la unidad, se escogió los primeros tres componentes, los cuales en conjunto explicaron aproximadamente un 70% de la variabilidad total. El primer, segundo y tercer componente explicaron, respectivamente, 36.86%, 16.57% y 16.26% de la varianza total.

De forma gráfica, la Figura 21, mostró el círculo de correlaciones de las variables con el eje horizontal (primera componente) y el eje vertical (segunda componente), con sus respectivos porcentajes de varianza explicada. En ella, pudo observarse que los autovectores de los metales: Al, Cu, Fe, Pb y Zn estuvieron alineados con la primera componente, mientras que el Cr y el Ni, con la segunda componente. Asimismo, pudo visualizarse que los autovectores adquirieron diferentes colores y tonalidades según el valor de cos2, de modo que, los metales que estuvieron alineados a cualquiera de los dos ejes, fueron los que mayores valores de cos2 presentaron. Lo contrario sucede con los autovectores del As y Mn, quienes presentaron bajos valores de cos2, los mismos que fueron resaltados con color fucsia en la Figura 21.

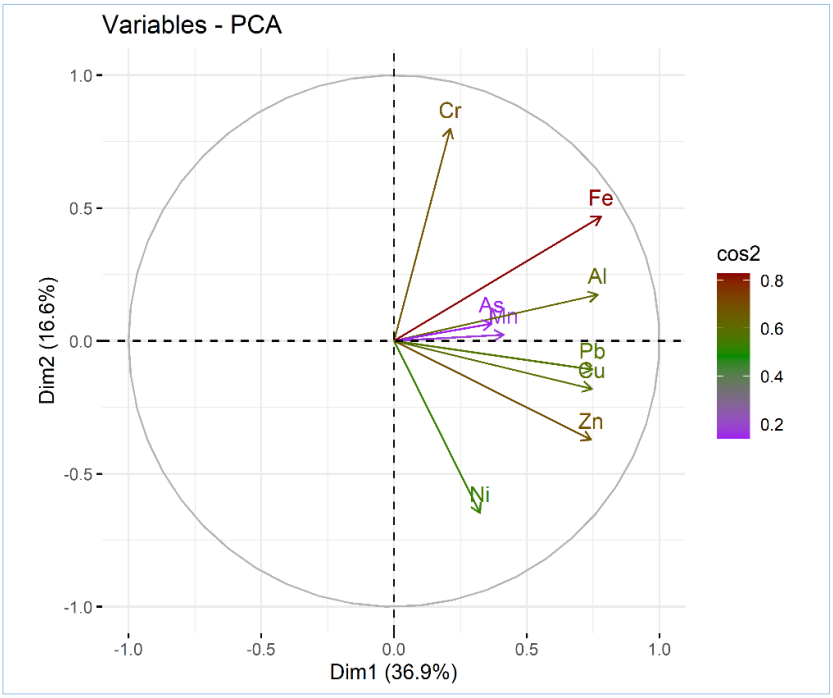


Figura 21: Círculo de correlaciones entre las variables (metales pesados bioacumulados) y los primeros dos componentes principales.

Es preciso indicar que los metales con altos valores cos2 se correlacionaron significativamente con el eje de la primera componente (Ver Anexo 15). Mientras que para el segundo componente, los metales correlacionados a este eje fueron el Ni y Cr. Con

respecto a los elementos As y Mn, sus autovectores estuvieron mayormente correlacionados al tercer componente (valor p <0.001) y cuarto componente (valor p <0.001), respectivamente, explicando ambos un 11.07% de la varianza total. Es por ello, que estos dos metales casi no estuvieron representados por los dos primeros componentes. La Figura 22 permitió fácilmente graficar lo anterior, ya que resaltó mediante círculos, los metales que estuvieron más representados en cada componente tomando en cuenta sus valores cos2.

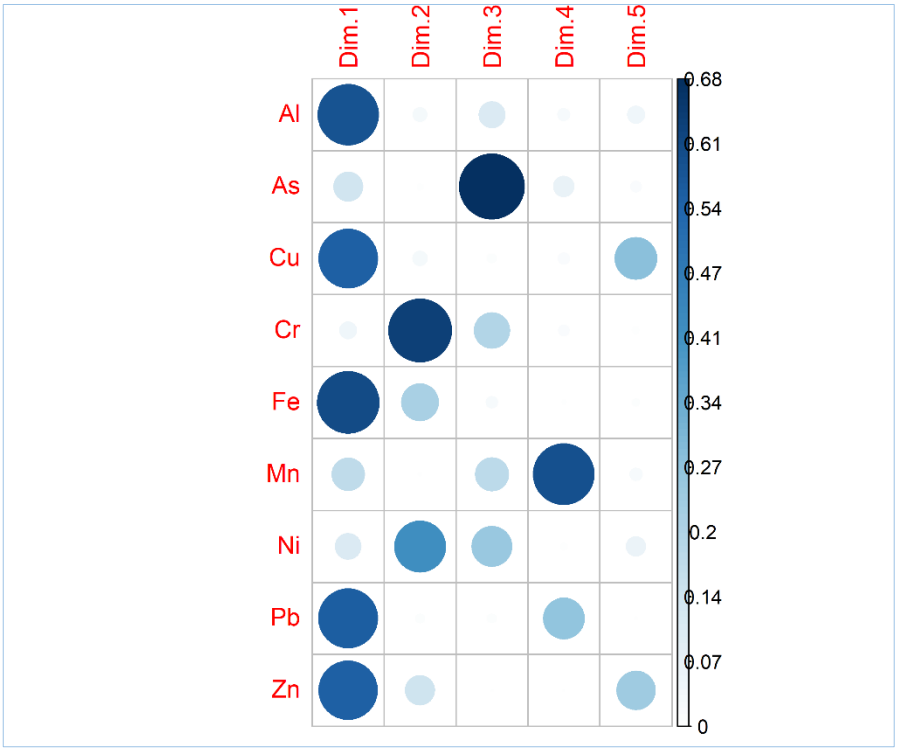


Figura 22: Gráfica del paquete corrplot indicando mediante gradiente de color azul, los valores de Cos2 de cada metal en cada componente principal

Particular atención presentó el comportamiento del níquel ya que este metal estuvo no solamente correlacionado a una sola componente (componente 2), como sucedió con el resto de metales, sino también a la componente 3 y de forma significativa en ambos casos (Ver Anexo 15). De forma tenue, se pudo visualizar este hecho en la Figura 22.

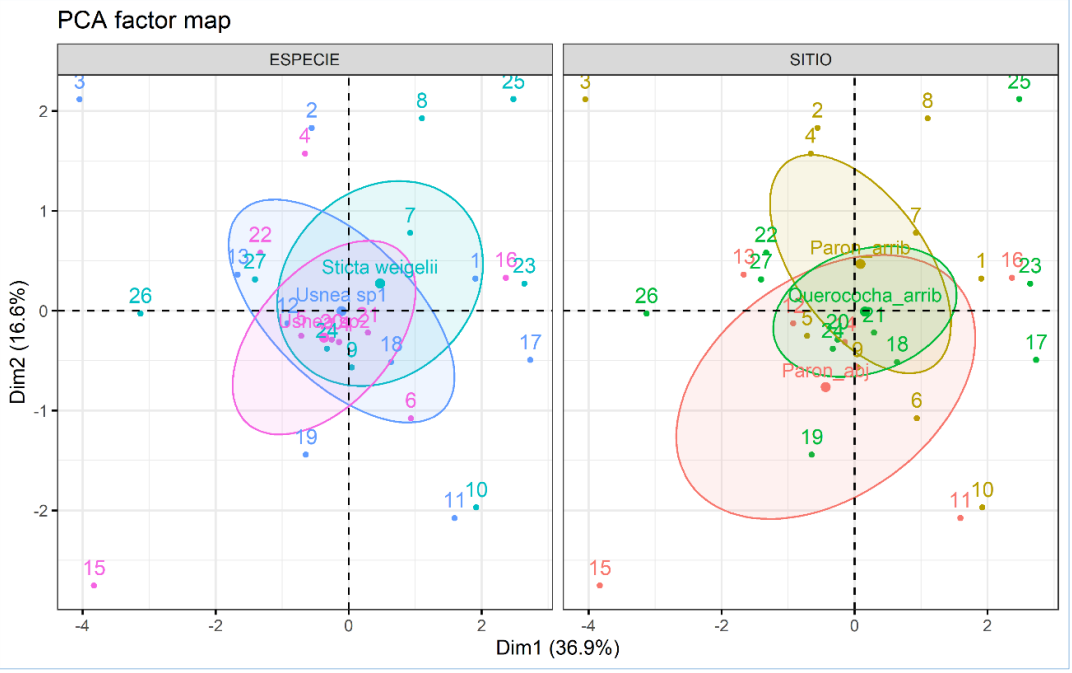


Figura 23: Plot de los primeros dos componentes principales para los individuos ($N_{líquenes}$=27), agrupados en elipses según el tipo de especie (izquierda) y los sitios de estudio (derecha).

A nivel de individuos, estos se dispusieron sobre los ejes de los primeros dos componentes principales como puede observarse en la Figura 23. Los números presentados de forma dispersa y coloreada representaron cada observación ordenada según la matriz de datos mostrados en Anexo 6 (Columna" Nro."). Dos gráficos de dispersión son mostrados en esta figura, cada uno evaluado de acuerdo a los factores de estudio: "Tipo de especie" y "Sitio de estudio". Las elipses agruparon a los individuos de una misma categoría y fueron mostradas de diferentes colores. La finalidad fue observar si estas elipses se traslapaban o se separaban por efecto de alguno de los dos factores sobre los líquenes individuos (Observaciones). Sin embargo, en ambos casos las elipses estuvieron superpuestas, es decir, que no hubo efecto alguno de los factores. Considerando que el plano de la 1-2 componente, estuvo bien representada para todos los metales (a excepción del Mn y As), el resultado fue el mismo al obtenido en los análisis de diferencias de medias, descritas anteriormente. En resumen, de acuerdo a las figuras 21-23, es posible ver un comportamiento agrupado en cinco de los nueve metales evaluados: Al, Cu, Fe, Pb y Zn, mientras que para los metales Cr, Ni, Mn y As, el comportamiento fue sobretodo de forma específica. Por otro lado, al igual que los resultados de diferencias de medias, este modelo de ACP, evidenció la ausencia de algún efecto diferenciador de los factores especie y sitio de estudio sobre los líquenes analizados.

4.1.3 Relación suelo-líquen en la bioacumulación de metales

a. Concentración de metales en los suelos de los sitios de estudio

Los resultados de análisis de laboratorio de los suelos pueden apreciarse en el Anexo 5 los cuales estuvieron en unidades mg/L por lo que también fueron convertidos en mg/kg como en los líquenes (Ver acápite 3.6.3) y presentados en el Anexo 7. Las gráficas de barras presentes en la Figura 24 muestra las comparaciones entre las concentraciones de cada metal por transecto y sitio de estudio. En ella puede apreciarse que las mayores concentraciones fueron observadas en los metales Al y Fe, siendo el transecto 7 (en Querococha arriba), el que presentó los mayores valores sobre el resto de transectos. El Mn, por su parte, fue el metal que presentó las mayores concentraciones después del Al y el Fe. Aunque a diferencia de estos últimos, las mayores cantidades de Mn estuvieron en los sitios de estudio de la microcuenca Llullán-Parón. Luego, por debajo del Mn, estuvieron los metales Cr y Zn, cuyos valores máximos fueron cercanos al 15 mg/kg. El transecto que presentó el mayor valor de Cr fue el transecto 7, mientras que para el Zn, los transectos 2 y 3 (Parón arriba) mostraron ser abundantes en ese sector. Por otro lado, el Pb y el Cu presentaron valores máximos cercanos a 4 mg/kg pero con diferentes distribuciones entre los transectos. Por ejemplo, el Cu estuvo de forma más abundante en los suelos de Querococha arriba, mientras que, el Pb, existió una gran variabilidad entre las cantidades presentes en los siete transectos, incluso dentro de transectos de un mismo sitio de estudio, como sucedió en Querococha arriba. Finalmente, los metales Ni, As y Cd, se caracterizaron por presentar valores cercanos a la unidad o a nivel de decimales. El Ni de alguna forma presentó valores similares entre los transectos. En contraste, los metales As y Cd, presentaron los valores más altos en el sitio de Querococha arriba. En resumen, la mayoría de metales, con excepción del Mn y el Zn, tendieron a ser más abundantes en el sitio de estudio de Querococha arriba.

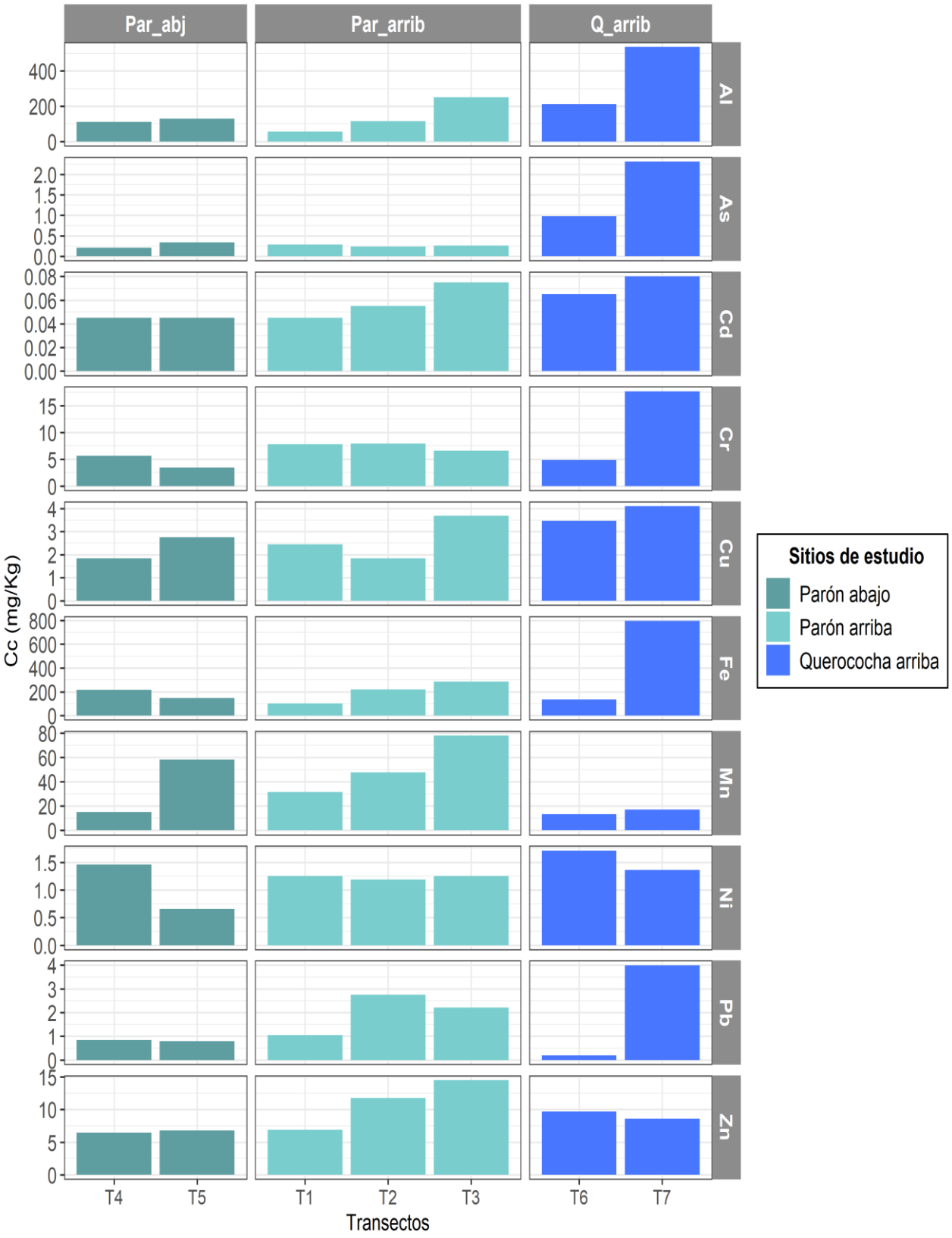


Figura 24: Concentraciones de los metales presentes en las muestras compuestas de suelo obtenidas en cada transecto.

Es preciso reiterar que estos datos fueron puntuales, por lo que no se puede saber con certeza si estos resultados reflejan la composición metálica de los suelos presentes en los sitios de estudio. Para que esto suceda, algún test estadístico tendría que aplicarse, sin embargo, en este caso no fue posible realizarlo por la limitada cantidad de análisis de suelo efectuados.

b. Análisis de los rangos de elementos metálicos en los líquenes y en los suelos

Para la determinación de estos rangos, se promediaron las concentraciones de los diez metales en cada uno de los componentes y se ordenaron de mayor a menor asignando la primera posición al metal con la mayor concentración media hasta completar la posición décima. Es preciso indicar que para los rangos de los líquenes se tomaron en cuenta en su conjunto los valores de las tres especies de líquenes analizadas. Adicionalmente, las comparaciones de estos rangos fueron realizados para cada uno de los sitios de estudio afín de evaluar aspectos particulares en la relación suelo-líquen de cada lugar.

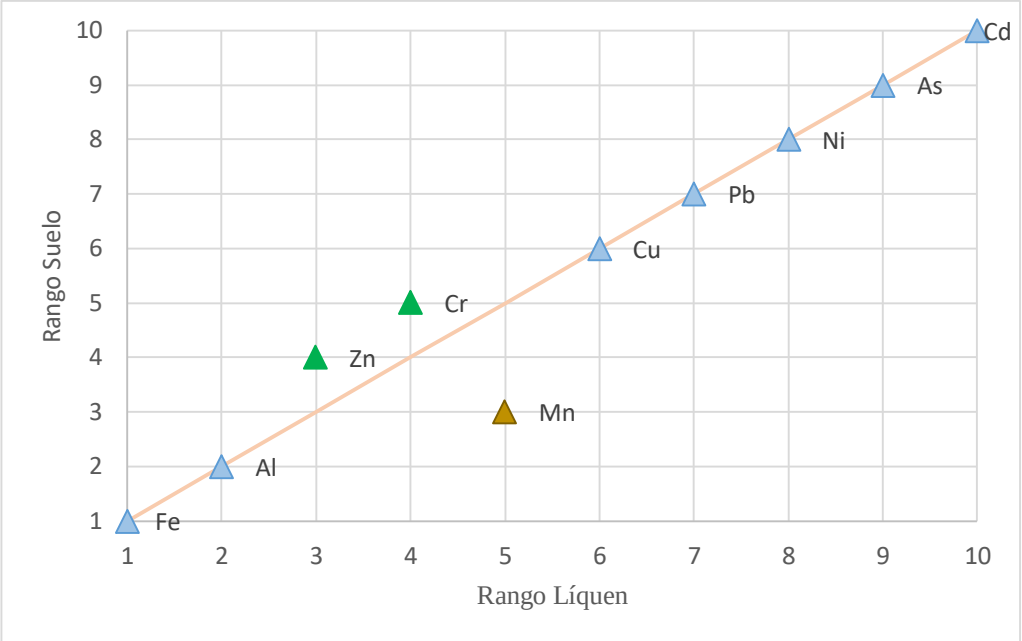


Figura 25: Comparación de rangos de abundancia entre los metales presentes en los suelos y en los líquenes (*Usnea* y *Sticta*) en Parón arriba.

En ese sentido, se presentan la comparación de rangos para el sitio de Parón arriba en la Figura 25. La diagonal coloreada de color rojo es la diagonal referencial sobre el cual se colocaron aquellos elementos que tuvieron el mismo rango de concentración tanto en los líquenes y en los suelos. De esta manera, pudo observarse en esta figura, que los elementos metálicos Fe, Al, Cu, Pb, Ni, As y Cd se ubicaron sobre esta diagonal indicando que presentaron el mismo orden de clasificación tanto en los suelos y líquenes. En tanto los

elementos Zn, Cr y Mn estuvieron fuera de la diagonal. Por un lado, estuvieron el Zn y Cr que tuvieron rangos más altos en los líquenes que en los suelos, mientras que el Mn presentó un mayor rango a nivel de los suelos.

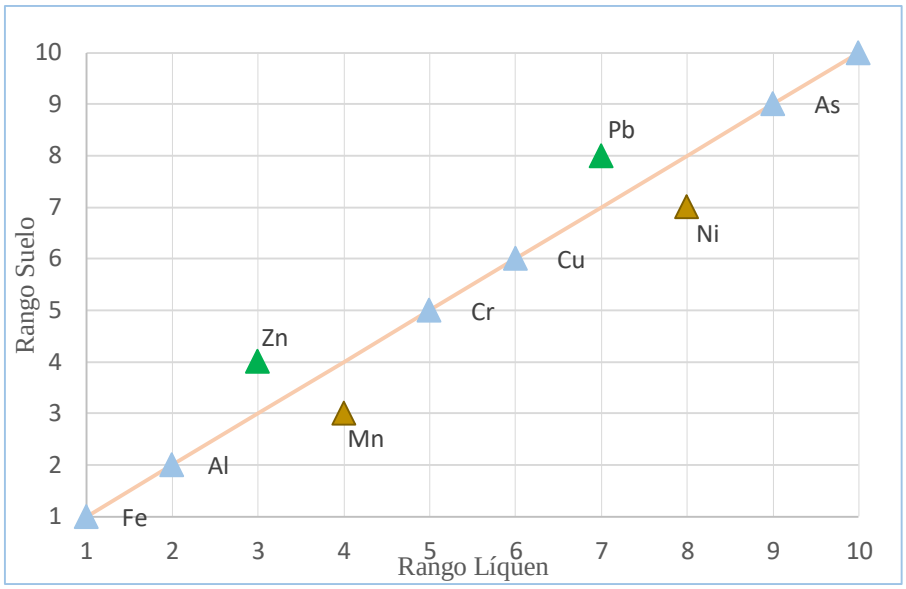


Figura 26: Comparación de rangos de abundancia entre los metales presentes en los suelos y en los líquenes (*Usnea* y *Sticta*) en Parón abajo.

En la Figura 26 se presentan los rangos correspondientes para el sitio de estudio de Parón abajo. A diferencia de su similar ubicada aguas arriba de la laguna de Parón, este sitio presentó cuatro elementos fuera de la línea referencial. El Pb presentó un mayor rango en los líquenes y el Ni por el contrario tuvo un mayor rango en los suelos. Mientras tanto, el Zn y el Mn mantuvieron estar más presentes, de forma respectiva, en los líquenes y los suelos, aunque el Mn escaló un rango más en los líquenes del que tuvo en Parón arriba.

Los rangos de metales para el sitio de estudio de Querococha arriba son mostrados en la Figura 27. Puede observarse para este sitio que son tres los metales los que están fuera de la diagonal. Como sucedió en los sitios de la microcuenca de Parón, el rango del zinc fue mayor en los líquenes, en tanto el Mn, estuvo más abundante en los suelos. El tercer metal fuera de la línea referencial fue el Cu que presentó un rango mayor en los líquenes que en los suelos.

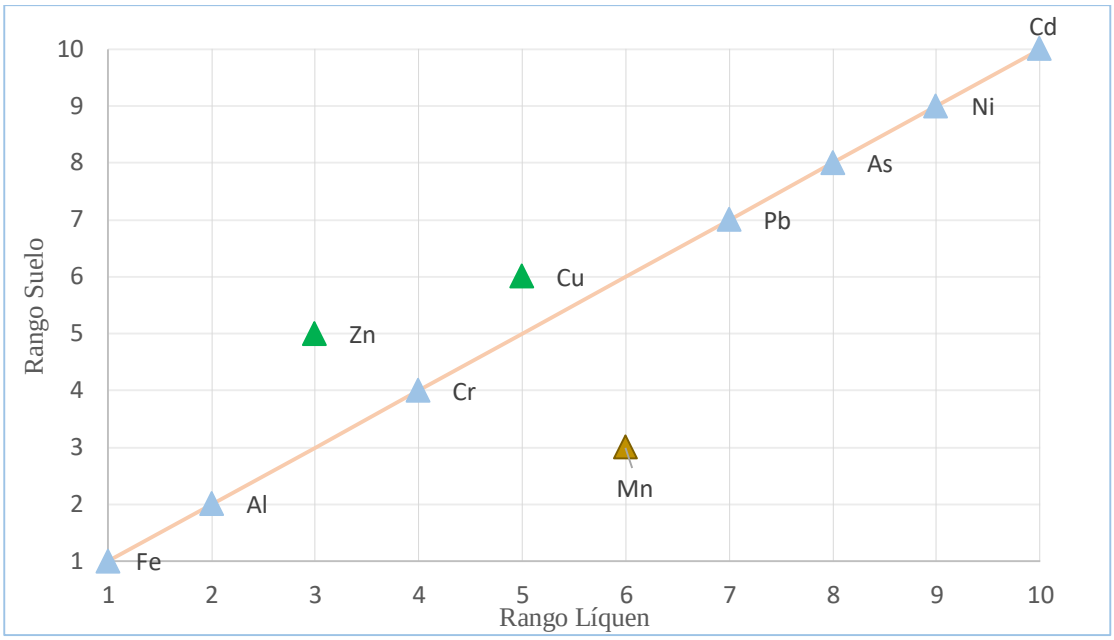


Figura 27: Comparación de rangos de abundancia entre los metales presentes en los suelos y en los líquenes (*Usnea* y *Sticta*) en Querococha arriba**.**

En resumen, pudo observarse que la mayoría de los elementos (entre 6 o 7) del total analizado, presentaron los mismos rangos tanto a nivel de los líquenes y los suelos suponiendo que estos elementos fueron bioacumulados según la disponibilidad en el suelo. Aunque también fue posible observar que algunos elementos tendieron a estar más presentes en los líquenes que en los suelos o viceversa. Por ejemplo, el zinc estuvo más asociado a los líquenes ocupando altos rangos de abundancia, mientras que el manganeso estuvo más ligado a los suelos.

c. Cálculo del Factor de Enriquecimiento

La Tabla 5 muestra el promedio de los factores de enriquecimientos (FEs) de cada metal por transecto, los cuales fueron obtenidos aplicando la fórmula del acápite 3.7.3. Cada valor de la tabla fue coloreado en función a los intervalos establecidos por Loppi et al. (1999) para la determinación de la fuente de origen del metal (Ver acápite 3.7.3). De esta manera, aquellos valores que estuvieron en el intervalo de 1 al 10, fueron marcados en color verde, indicando que éstos estarían asociados a una contaminación natural de los suelos. En tanto, los elementos que tuvieron FEs dentro del intervalo 10 a 20, fueron marcados en color amarillo, indicando que una fracción notable de lo bioacumulado sería de origen atmosférico. Finalmente, los elementos con valores de FEs superiores a 20, fueron marcados en color anaranjado y vinculados a procesos atmosféricos de largo alcance.

Tabla 5: Promedios de los Factores de Enriquecimiento por transecto

Transecto	Sitio	As	Cu	Cr	Fe	Mn	Ni	Pb	Zn
1	P.arriba	2.70	1.20	1.75	1.45	0.30	0.59	1.06	2.11
2	P.arriba	9.51	2.95	6.83	1.19	0.31	2.17	1.55	3.53
3	P.arriba	7.83	2.51	3.52	1.39	0.36	3.24	3.68	3.99
4	P.abajo	11.40	3.30	3.63	0.97	1.06	3.50	3.72	9.73
5	P.abajo	10.37	3.59	10.53	3.06	0.94	5.08	4.80	8.58
6	Q.arriba	2.70	3.23	5.27	2.58	0.78	1.31	26.27	5.39
7	Q.arriba	5.67	6.95	3.92	1.15	1.04	4.95	2.31	12.79

De esta manera, puede observarse que en los transectos en Parón arriba, todos los valores medios del FEs fueron menores a diez, indicando que el contenido metálico bioacumulado provendría del aporte del suelo. De forma similar sucedió en Parón abajo, aunque, con la salvedad que los elementos As y Cr presentaron valores entre 10-20. Aquello implicaría, que las cantidades bioacumuladas de estos elementos podrían tener origen en las partículas que se encuentran suspendidas en la atmósfera, según lo establecido por esta metodología para este intervalo. Por otro lado, en Querococha arriba, sus valores medios de FEs, en la mayoría de metales, fueron menores a diez, siendo las excepciones los metales Pb y Zn. En el caso del Pb, el valor medio del FEs, a nivel del transecto 6, superó a veinte, poniendo en evidencia que la principal fuente de este metal en ese lugar sería la atmósfera. Mientras que, para el caso del Zn, su valor de FE en el transecto 7 solo permitió conjeturar sobre el probable origen atmosférico en la bioacumulación de este metal.

4.2 DISCUSIÓN

4.2.1 Discusión sobre los resultados obtenidos para el logro del objetivo 1

Treinta y tres especies de líquenes, distribuidas en 11 familias y 23 géneros fueron reconocidos de las muestras obtenidas en los tres sitios de estudio. Aunque solo a ocho especies fue posible reconocerles su nombre científico completo, mientras que al resto de especies se limitó a asignarle la denominación de "sp.". Esto debido a que en muchos casos, para llegar a reconocer el nombre de la especie usando las claves taxonómicas, era necesario aplicar pruebas adicionales más avanzadas como el uso del reactivo parafenilendiamina (abreviado como PD o P) o la identificación de metabolitos secundarios a través de la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC, en inglés), los cuales no fueron posibles

realizarlos para el presente estudio. En la siguiente Tabla 6, la lista taxonómica del presente estudio, fue contrastado con los registros obtenidos en diferentes estudios realizados en el departamento de Ancash, entre los que estuvieron el estudio realizado por Mejía y Ángeles (2014), en varios sitios de la cuenca alta, media y baja del río Santa; el de Ramírez y Cano (2005) en la localidad de Pueblo Libre, provincia de Huaylas; de Valdivia y Ramírez (2018) en el Pasivo Ambiental Minero Santo Toribio, localizado en la provincia de Huaraz y el estudio reciente de Ramírez y Valencia (2020) en la ladera noreste del glaciar Pastoruri, provincia de Recuay, entre los 4400 y 4700 m de altitud. La mayoría de los géneros registrados en el presente estudio fueron encontrados en los sitios antes mencionados, a excepción de los géneros: *Cetrelia*, *Erioderma*, *Hypogymnia*, *Parmelia* y *Parmelinopsis*, considerados como nuevos registros para el departamento de Ancash. De hecho, algunos de estos géneros como *Cetrelia*, *Hypogymnia* y *Parmelinopsis* no tienen registro hasta el momento en territorio peruano según la lista de especies y hongos liquenícolas del Perú elaborado por Ramos (2014). Por otro lado, las Figuras 11-13 mostraron las diferencias entre la liquenobiota de los sitios en términos de abundancia (Nro. de registros) y su distribución a nivel de biotipos y hábitos. De acuerdo a ello, el sitio de Parón arriba se caracterizó por presentar una menor riqueza de especies, aunque con un alto registro de algunas especies como las pertenecientes al género *Usnea*. Siendo el sitio de mayor altitud (4200-4264 m.s.n.m.), la cobertura vegetal se caracterizó por ser un matorral, en su punto más alto, y con relictos de árboles *Polylepis* en su parte baja. De algún modo esta característica propia de una región altoandina sumada a factores ambiental de humedad y temperatura estaría condicionando que solo algunas pocas especies la habiten.

Tabla 6: Otros registros en el departamento de Ancash de la liquenobiota obtenida en el presente estudio, y la condición de tolerancia a metales pesados según referencia bibliográfica para los géneros de los líquenes registrados en los sitios de estudio.

Biotipo	Familia	Hábito	Especie	Género	PA	PABJ	QA	Otros registros en Ancash	S/T	Ref. Tole. a metales pesados
Folioso	Parmeliaceae	Saxícola	*Cetrelia sp1*	*Cetrelia*	X	X		**Nuevo registro**	S	Web de NCR* (EEUU)
Dimórficas	Cladoniaceae	Muscícola	*Cladonia ramuloso*	*Cladonia*		X		*Cladonia coccifera* (Catac)[a]	T	(Nash III ,1996, Chettri et al. ,1997, Bouziane ,2006, Brodo et al. ,2001)
Dimórficas	Cladoniaceae	Muscícola	*Cladonia rappi*			X		*Cladonia chlorophaea* [b] (Pueblo libre), *Cladonia pulviniformis* (Pampas, Pallasca)		
Crustoso	Graphidaceae	Muscícola	*Diploschistes muscorum*	*Diploschistes*	X			*Diploschistes diacapsis* [a] (Cuenca alta río Santa)	T	(Bačkor y Loppi ,2009, Cuny ,1999)
Folioso	Pannariaceae	Cortícola	*Erioderma peruvianum*	*Erioderma*			X	**Nuevo registro**	-	-
Folioso	Parmeliaceae	Muscícola	*Everniastrum sp1*	*Everniastrum*		X		*Everniastrum spp* (Cuenca media río Santa)[a]	-	-
Folioso	Parmeliaceae	Muscícola	*Everniopsis trulla*	*Everniopsis*		X		*Everniopsis spp.* (P. Libre)[b]	-	-
Folioso	Parmeliaceae	Saxícola	*Flavopunctelia* sp1	*Flavopunctelia*			X	*Flavopunctelia flavenior* [c] (P. A. Santo Toribio)	T	(Pereira et al. ,2018)
Folioso	Physciaceae	Cortícola	*Heterodermia* sp1	*Heterodermia*		X		*Heterodermia podocarpa*[b] (P. Libre). *Heterodermia spp.* (cuenca media río Santa)[a]	T	(Mejía y Ángeles ,2014, Díaz ,2006, Gunathilaka et al. ,2011)
Folioso	Parmeliaceae	Saxícola	*Hypogymnia* sp1	*Hypogymnia*			X	**Nuevo registro**	T	(Vitarana ,2013)
Folioso	Parmeliaceae	Saxícola	*Hypotrachyna* sp1	*Hypotrachyna*	X		X	*Hypotrachyna cf. erythrodes* [d] (N. Pastoruri). *Hypotrachyna osorioi* (Pampas, Pallasca)[e]	-	-
Folioso	Parmeliaceae	Cortícola	*Hypotrachyna* sp2			X	X			
Crustoso	Lecanoraceae	Saxícola	*Lecanora* sp1	*Lecanora*			X	*L. albescens, L. dispersa, L. garovaglii* (N. Pastoruri) [d], *Lecanora spp.* (Cuenca media del río Santa, P.A. Santo Toribio y Pampas, Pallasca)[a ,c y e]	T	(Richardson y Nieboer ,1981, Garty ,2001, Bačkor y Loppi ,2009, Brodo et al. ,2001)
Crustoso	Ochrolechiaceae	Saxícola	*Ochrolechia* sp1	*Ochrolechia*			X	*Ochrolechia spp.*(P.Libre) [b]	S	(Vitarana ,2013)
Crustoso	Pannariaceae	Saxícola	*Parmeliella sp1*	*Parmeliella*			X	Género observado cuenca media río Santa [a]	-	-
Folioso	Parmeliaceae	Saxícola	*Parmelia* sp1	*Parmelia*		X		**Nuevo registro**	T	(VonArb ,1990)
Folioso	Parmeliaceae	Cortícola	*Parmelinopsis sp1*	*Parmelinopsis*			X	**Nuevo registro**	-	-

Continuación…

Folioso	Parmeliaceae	Saxícola	*Parmotrema* sp1	*Parmotrema*	X	X	X	*Parmotrema spp*. cortícolas y saxícolas (cuenca del río Santa) [a]	T	-	(Gordon et al. ,1995, Walther et al. ,1990)
Folioso	Parmeliaceae	Cortícola	*Parmotrema* sp2		X		X				
Folioso	Parmeliaceae	Saxícola	*Parmotrema* sp3		X	X					
Folioso	Parmeliaceae	Saxícola	*Parmotrema* sp4				X				
Folioso	Parmeliaceae	Muscícola	*Parmotrema* sp5				X				
Folioso	Peltigeraceae	Muscícola	*Peltigera soredians*	*Peltigera*		X		*Peltigera collina* (Cuenca alta del río Santa)[a]	S	-	(Nash ,2008, Nash III ,1996)
Folioso	Peltigeraceae	Muscícola	*Peltigera* sp2				X	*P.austroamericana* (P. Libre)[b]			
Folioso	Peltigeraceae	Muscícola	*Peltigera* sp3				X				
Folioso	Parmeliaceae	Muscícola	*Pseudevernia*	*Pseudevernia*		X		Visto en Pueblo Libre [b]	T	-	(Bari et al. ,2001, Yildiz et al. ,2008)
Folioso	Parmeliaceae	Saxícola	*Psiloparmelia* sp1	*Psiloparmelia*	X			*Psiloparmelia distincta (P. Libre)*[b],*P. norstictica* (N. Pastoruri y P.A. Santo Toribio)[c y d]	S	-	(Ramírez-Morán et al. ,2016)
Folioso	Parmeliaceae	Saxícola	*Psiloparmelia* sp2			X	X				
Dimórficas	Stereocaulaceae	Muscícola	*Stereocaulon vesuvianum*	*Stereocaulon*		X		*Stereocaulon spp*. (Cuenca del río Santa)[a] *Stereocaulon andinum* (N. Pastoruri)[d] *Stereocaulon ramulosum, Stereocaulon strictum* (Pampas, Pallasca)[e]	T	-	(Jones et al. ,1982, Brodo et al. ,2001)
Folioso	Lobariaceae	Cortícola	*Sticta weigelii*	*Sticta*	X		X	*Sticta fuliginosa* (P. Libre) [b]	T	-	(Bajpai et al. ,2019)
Folioso	Umbilicariaceae	Saxícola	*Umbilicaria* sp1	*Umbilicaria*		X	X	*Umbilicaria dichroa* (P. Libre)[b], *U. vellea* y *U. nylanderiana*(N.Pastoruri)[d], *Umbilicaria africana* (Pampas, Pallasca)[e]	S T	-	(Díaz ,2006, Tuominen y Jaakkola ,1973, Sigal y Johnston ,1986)
Fruticoso	Parmeliaceae	Cortícola	*Usnea* sp1	*Usnea*	X	X	X	*Usnea spp.* (cuenca alta del río Santa)[a], *Usnea spp*. (Pueblo Libre)[b],*Usnea durietzii* (N.Pastoruri)[d]	T	-	(Carreras et al. ,2005, Vitarana ,2013, Conti et al. ,2009)
Fruticoso	Parmeliaceae	Saxícola	*Usnea* sp2		X	X	X				

(PA) Parón arriba, **(PABJ)** Parón abajo, **(QA)** Quererocha arriba. **(X)** Presencia en el sitio de estudio. **(S)** Sensible o **(T)** Tolerante a los metales pesados.

[a] Mejía y Ángeles (2014), [b] Ramírez y Cano (2005), [c] Valdivia y Ramírez (2018), [d] Ramírez y Valencia (2020), [e] Castillo Rodríguez (2011). (*) NCR: National Central Region, EEUU.

La predominancia de las especies del género *Usnea* (*Usnea* sp1 y *Usnea* sp2), puede explicarse por la capacidad de este género para habitar distintos ambientes ya que han sido observados en zonas templadas, bosques tropicales, costas de Europa, Asia y América hasta las regiones polares. De hecho un grupo de *Usneas* denominada Neuropogon se caracteriza por habitar regiones polares (Antártida y Ártico) y regiones alpinas o regiones altoandinas (Laguna-Defior ,2017). Este sitio de estudio, también se caracterizó por la presencia de superficies rocosas correspondientes a las morrenas de los glaciares adyacentes. Esto explica que las especies saxícolas tengan casi la misma abundancia de los cortícolas presentes en los arbustos.

En contraste al sitio de Parón arriba, los sitios de Parón abajo y de Querococha arriba, ambos con altitudes similares (3980-4089 y 4038-4105 m.s.n.m., respectivamente), presentaron una mayor diversidad de especies de líquenes (Ver Figura 15). Vale precisar que ambos sitios tienen en común, además de la altitud, la presencia de bosques de *Polylepis*, el cual sería un factor clave en este aumento de la diversidad de líquenes. Ramos et al. (2013), en su estudio de la diversidad de líquenes en Tuctumpaya, Arequipa, encontró una mayor diversidad de tipos morfológicos de líquenes, así como en especies, en bosque de *Polylepis* (Bosque de "Queñua") que en zonas del matorral. Los autores sugieren que este bosque ofrece una mayor cantidad de microhábitats tales como lugares húmedos, cortezas de árboles, lugares sombreados y expuestos, debajo y sobre las rocas de las laderas del bosque que hace posible el desarrollo de diferentes formas de líquenes. Esto aplicaría para el presente estudio ya que muchos de los géneros encontrados en los bosques de *Polylepis* en Tuctumpaya coinciden con los encontrados en los sitios de Parón abajo y Querococha arriba. Los géneros que coincidieron con el estudio de Ramos et al.(2013) fueron: *Cladonia*, *Diploschistes*, *Everniastrum*, *Hypotrachyna*, *Parmotrema*, *Peltigera*, *Psiloparmelia*, *Umbilicaria* y *Usnea*. A nivel de especie, la especie *Everniopsis trulla* estuvo presente en ambas investigaciones. Las diferencias de la liquenobiota en los tres sitios de estudio, también se reflejó en las distintas distribuciones a nivel de familias taxonómicas como mostró la Figura 14 aunque con la salvedad de la familia Parmeliaceae que estuvo presente en los tres sitios de estudio. Y es que esta familia es la más grande y diversa de los hongos formadores de líquenes, incluyendo 79 géneros y 2726 especies a nivel mundial (Thell et al. ,2012) .Esto explicaría la alta presencia de sus especies en los sitios de estudio en comparación a las otras familias. Por otra parte, la Tabla 6 también incluyó información bibliográfica sobre la capacidad de tolerancia a los metales pesados de los géneros observados en el presente estudio. Esto se

realizó afín de demostrar si la presencia o ausencia de los géneros de los sitios de estudio podría también estar siendo afectado por la disponibilidad de metales en sus ambientes. Sin embargo, se descarta que este factor determine las diferencias entre la liquenobiota de los tres sitios de estudio, ya que en todos los sitios existen tanto géneros sensibles como tolerantes en igual proporción. Por tanto, la liquenobiota de los tres sitios de estudio, estaría siendo determinada por las condiciones ambientales, principalmente por temperaturas y humedad relativa propias de cada sitio.

4.2.2 Discusión sobre los resultados obtenidos para el logro del objetivo 2

a. De los resultados obtenidos de metales en los líquenes

Tomando en cuenta que los sitios de estudio se localizaron dentro de un Área Natural Protegida (Parque Nacional Huascarán), las concentraciones de metales bioacumuladas en estos sitios fueron comparados con algunos valores correspondientes a concentraciones *background* de áreas naturales de diferentes localidades del planeta entre ellos, países de Europa y América del Norte, así como sitios en el Ártico y la Antártida. Estos valores fueron organizados en la Tabla 7 inspirado en otras tablas comparativas presentadas por Nash (1989) y Nieboer et al. (1978). Complementariamente, se incluyó a esta tabla, valores registrados en zonas con alta presencia de metales tales como ciudades o fundiciones metálicas con la finalidad de hacer contraste con los valores *background* de los sitios naturales. De la Tabla 7, también puede observarse que en general los valores de los metales bioacumulados obtenidos en el presente estudio estuvieron dentro de los intervalos de valores mínimos y máximos registrados en las áreas naturales de acuerdo a la bibliografía consultada. Asimismo, puede observarse claramente el gran contraste que tiene con los valores presentados en sitios impactados. Por tanto, de acuerdo a los valores bioacumulados obtenidos en este estudio, se puede inferir que no existiría alguna actividad antrópica que esté alterando los niveles de metales en las microcuencas de Parón y Querococha. Incluso, estos valores podrían emplearse como línea base o *background* para posibles estudios de biomonitoreo de metales pesados (en mediano o largo plazo) en estos lugares. Es preciso indicar que los valores puestos en la Tabla 7, correspondieron a valores registradas en diversas especies de líquenes de los géneros *Cladonia*, *Parmelia*, *Acarospora*, *Lecanora,* y, en particular del género *Usnea*, objeto del presente estudio, incluyendo valores obtenidos en los estudios de Zvěřina et al. (2014) y Conti et al. (2009), correspondientes a las especies *Usnea antártica* y *Usnea barbata*, respectivamente.

Tabla 7: Comparación entre los intervalos de concentraciones de metales bioacumulados (en ppm) obtenidos en áreas naturales, áreas de actividad antrópica y en el presente estudio

Metal	Presente estudio	Valores *background* en Áreas Naturales (en ppm)	Ubic. Áreas Naturales	Valores elevados (en ppm)	Ubic. Áreas impactadas
Al	4.83-92.72	1.76-410[c] 100-800[b]	Finlandia, Alemania y Rusia. Oeste de North Dakota	1300-1900[a] 740-3700[b]	Mina de carbón de Ohio, EEUU Oeste de North Dakota
As	0.0033-4.8	0.60-1.5[b] 0.26-0.44[b] 0.9-2.3[d] 0.04-2.49[e]	Parque Nacional Theodore Roosevelt, EEUU. Ártico James Ross Island, Antártida Tierra del Fuego, Argentina	2.6-8.0[b]	Oeste de North Dakota
Cd	<0.01	1-30[a] 0.03-0.05[d] 0.02-1.53[e]	Paso de Lehigh, Pensilvania, EEUU James Ross Island, Antártida Tierra del Fuego, Argentina	30-330[a]	Fundición de Zn/Cd, Pensilvania, EEUU
Cr	1.07-20.12	0-10[a] 0.34-13[b] 1.5-2.3[b] 1.9-4.6[d]	Ontario, Canadá Costa norte de California, EEUU Ártico James Ross Island, Antártida	25-130[a]	Zona urbana/industrial North Lincolnshire, Inglaterra
Cu	0.01-6.93	1-50[a] 1.3-10[b] 6.2-8.5[b] 1.8-6.7[d] 0.83-8.83[e]	Ontario, Canadá Costa norte de California, EEUU Ártico James Ross Island, Antártida Tierra del Fuego, Argentina	15-250[a]	Fundición metálica en Sudbury, Ontario, Canadá

Continuación…

Fe	5.6-75.25	50-1600[a] 360-1900[b] 50-3560[b] 1800-6400[d]	Ontario, Canadá Costa norte de California, EEUU Ártico James Ross Island, Antártida	1600-5000[a] 4875-14400[b]	Fundición de Fe/Cu/Ni, Ontario Canadá Escorias minerales en las Montañas de Harz, Alemania
Mn	0.2-11.21	10-130[a] 40-330[b] 30-85[b] 43-656[e]	Finlandia Costa norte de California, EEUU Ártico Tierra del Fuego, Argentina	350-5000[a]	Zona urbana/industrial North Lincolnshire, Inglaterra
Ni	0.15-1.77	0-5[a] 3.4-26[b] 2.5-2.9[b] 0.23-2.54[e]	Canadá (Mackenzie Valley, norte de Ontario y New Brunswick) Costa norte de California, EEUU Ártico Tierra del Fuego, Argentina	10-300[a]	Fundiciones en Sudbury, norte de Ontario, Canadá
Pb	0.12-4.22	5 ± 5 [a] 0.9-3[d] 0.2-19.3[e]	Ártico James Ross Island, Antártida Tierra del Fuego, Argentina	100-12000[a]	Zona urbana/industrial North Lincolnshire, Inglaterra
Zn	2.88-15.79	9.1-40[b] 16-25[b] 12-27[d] 17.22-153.9[e]	Costa norte de California, EEUU Ártico James Ross Island, Antártida Tierra del Fuego, Argentina	1000-25000[a]	Fábrica de Zinc, Pensilvania, EEUU

[a] Basado en información presente en Nieboer et al. (1978), [b] Basado en información presente en Nash (1989), [c] Basado en información presente en Tuominen y Jaakkola (1973), [d] Basado en información presente en Zvěřina et al. (2014), [e] Basado en información presente en Conti et al. (2009).

A nivel local también pudo observarse el contraste entre los valores de metales bioacumulados en zonas con presencia de actividad antrópica y zonas prístinas como los sitios de estudio. En el estudio realizado por Mejía y Ángeles (2014), se registraron valores de bioacumulación de metales en líquenes a lo largo de la cuenca del río Santa en tres puntos de monitoreo. Dos de estos puntos, se localizaron aproximadamente en la parte baja de las subcuencas en estudio (Yanayacu y Llullán-Parón). De modo que, en la siguiente Tabla 8, se realizó las comparaciones de las concentraciones bioacumuladas obtenidas en las parte altas (presente estudio) y bajas de estas subcuenca.

Tabla 8: Comparación entre los valores bioacumulados en las partes bajas y altas de las subcuencas en estudio.

Subcuenca	**Yanayacu**		**Llullán Parón**	
Metal	Parte Baja* (Cátac)	Parte Alta (Querococha arriba)	Parte Baja* (Cañasbamba, localidad próxima a esta subcuenca)	Parte Alta (Laguna de Parón)
Al	891.83-2553.76	6.72-92.72	566.37-730.35	4.83-48.62
As	10.08-28.15	0.33-0.52	11.79-14.93	0.0033-4.8
Cd	0.26-0.64	<0.01	0.17-0.21	<0.01
Cr	1.00-4.47	1.8-7.67	1.92-2.54	1.07-20.12
Cu	5.43-39.82	0.7-6.93	3.86-8.95	0.013-3.8
Fe	1333.33-1991.04	21.73-74.53	1009.29-1289.85	5.6-75.25
Mn	16.12-63.84	0.41-2.55	37.35-83.73	0.2-11.21
Ni	0.61-3.60	0.2-0.40	0.57-0.86	0.15-1.77
Pb	0.23-8.37	0.26-1.62	0.17-1.54	0.12-4.22
Zn	40.37-204.70	3.05-15.79	52.22-103.12	2.88-14.69

(*) Datos obtenidos del estudio de Mejía y Ángeles (2014)

De la tabla anterior puede observarse que en general las concentraciones bioacumuladas de los metales, a excepción del cromo, fueron mayores en la parte baja con respecto a la parte alta en ambas subcuencas. Vale precisar que la parte baja se caracteriza por la presencia de una vía principal de tránsito que recorre la cuenca del río Santa, por lo que Mejía y Ángeles (2014) atribuyeron que los valores registrados en esta parte respondieron principalmente a la emisión de gases del parque automotor presente en esta vía. Por otro lado, la similitud entre los valores de cromo registrados en la parte alta y baja tanto en la subcuenca de Llullán Parón y Yanayacu, podría responder a un transporte atmosférico de partículas provenientes del tránsito vehicular en la parte baja, aunque también puede deberse a factores naturales

asociados a la geología de la Cordillera Blanca. Esto podría deducirse ya que existen estudios que han hallado alta presencia de cromo en afluentes del río Santa, como el realizado por Loayza Muro (2014) en la quebrada de río Shallap, el cual forma parte de la subcuenca del río Quillcay, perteneciente a esta misma cadena montañosa. Sin embargo, para saber si la presencia de este elemento en la parte altas de estas subcuencas, se debió a factores naturales o a factores antrópicos, fue necesario realizar el análisis del factor de enriquecimiento el cual se abordó en el acápite 3.7.3.

b. De los resultados obtenidos de las pruebas ANOVA y Kruskal-Wallis

Como puede apreciarse en los Anexos 12 y 13, para los metales bioacumulados del manganeso y arsénico se encontraron diferencias significativas para un factor (sitio de estudio, a un α=0.05) y dos factores (sitio de estudio y tipo de especie, a un α=0.05), respectivamente. Para el caso del manganeso, los valores bioacumulados fueron superiores significativamente en el sector de Parón (Anexo 12, p valor<0.05). Es preciso indicar que a nivel de suelo este elemento también resultó mayor para este sector (Ver Figura 24), lo que haría suponer que la bioacumulación del Mn estaría asociado al contenido de este elemento en los suelos, que pudo haber ingresado a los líquenes en forma particulada (partículas aerosol), tomando en cuenta, además, que en la mayoría de casos los líquenes fueron colectados por encima de un metro de altura. Bodenlos y Ericksen (1955), en su estudio geológico de la Cordillera Blanca, observaron que entre los minerales más abundantes presentes en esta cadena montañosa, se encontraban minerales que contienen al Mn como la rodocrosita ($MnCO_3$), la rodonita ($MnSiO_3$) y óxidos de manganeso. En ese sentido podría inferirse que en la parte alta de la subcuenca de Parón existirían una mayor presencia de estos minerales que en la parte alta de la subcuenca de Querococha. Aunque, un estudio realizado por Guittard et al.(2017) en el río Santa y sus tributarios, podría confirmar esta suposición, debido, a que en dicho estudio, tanto el agua, los sedimentos suspendidos y los sedimentos de lecho de río, presentaron altos valores de manganeso, en particular, en el sector donde las aguas abajo de la subcuenca de Llullán Parón desembocan al río Santa. Por tanto, en base a lo anterior, pudo sugerirse que la presencia de un mayor contenido de Mn en las tres especies de líquenes en Parón estaría ligado a una mayor disponibilidad en el ambiente de ese sitio que en Querococha. Sin embargo, no es sino con los resultados del acápite 4.1.3 que se evaluó el aporte del suelo sobre la bioacumulación en los líquenes, el mismo que se discutió en el siguiente acápite.

En cuanto al arsénico, de acuerdo a los resultados de la prueba de Kruskal-Wallis, la especie foliosa *Sticta weigelii* registró valores significativamente superiores que las especies fruticosas del género *Usnea* (aunque a un p valor <0.1, ver Anexo 13). La captación del arsénico por algún organismo depende de varios factores como la biodisponibilidad de este metal (el mismo que depende de sus formas químicas y de las condiciones ambientales del lugar donde está presente), de las características propias del organismo y de la presencia de otros organismos como las micorrizas o bacterias acidófilas (Bajpai et al. ,2009). La especie *Sticta weigelii* es un líquen folioso que se caracteriza por tener una superficie inferior tomentoso[4]. Como es mencionado en la revisión de Garty (2001), esta característica podría determinar una mayor eficiencia en la captura de partículas del suelo (posiblemente con contenido de arsénico), respecto a otras formas del líquen (fruticosas o crustosas) que normalmente presentan superficies lisas. Del mismo modo, Bajpai et al. (2009), llegó a esta misma explicación, ya que, en su estudio encontró que los líquenes foliosos *Parmotrema praesorediosum* (Nyl.) Hale y *Parmotrema praesorediosum* (Nyl.) Hale, ambos, con rizinas en su corteza inferior, presentaron las mayores concentraciones de arsénico que las otras especies crustosas o escamosas, a pesar que todos estos líquenes estuvieron bajo las mismas condiciones (mismo sustrato y mismos lugares de exposición). Sin embargo, es posible que la acumulación del arsénico en el *Sticta weigelii* no se limite solamente a sus características de su corteza inferior, ya que, de ser así, hubiera presentado una mayor bioacumulación en el resto de metales, lo cual no ocurrió. Las paredes celulares contienen un gran número de polisacáridos y proteínas, el cual comprende también la presencia de grupos funcionales como el grupo carboxilo, hidroxilo, sulfato, fosfato y grupos amino, todos ellos capaces de acomplejar a los iones metálicos. Por tanto, podría suponerse que habría una mayor presencia de estos grupos en *Sticta weigelii*, en comparación a las *Usneas*. De hecho, en un estudio realizado por Bajpai et al. (2019), donde fueron utilizados líquenes del género *Usnea* y *Sticta* como biofiltros para remover el arsénico del agua, se comprobó que la eficiencia del filtrado estuvo directamente ligado a la presencia de los elementos C, H, O, N, los cuales conforman estas biomoléculas en las paredes celulares. Incluso, mostró que el *Sticta* sp utilizado acumuló una mayor cantidad de arsénico que el líquen del género *Usnea* (*Usnea longissima*), al presentar un mayor porcentaje de estos cuatro elementos (94.7%) que este último (79.2%).

[4] **Tomentoso**, característica morfológica que refiere a la presencia de un conjunto de hifas cortas denominadas rizinas, con aspecto de pelos, los cuales se encuentran densamente dispuestas, ya sea en la corteza superior o inferior del talo (Büdel y Scheidegger ,2008).

Por otro lado, en lo que respecta a las diferencias de los niveles bioacumulados del arsénico mostradas entre los sitios de estudio, donde el sector de Querococha obtuvo los mayores valores de arsénico bioacumulados. Posiblemente esta mayor incidencia se deba a una mayor presencia de este metal en sus suelos, como puede observarse en la Figura 24, del mismo modo que con el manganeso. En el estudio realizado por Bodenlos y Ericksen (1955), se mencionó que en algunos sitios de la Cordillera Blanca se registraron cantidades menores de minerales de arsénico como el arsenopirita (FeAsS), proustita (Ag_3AsS_3) y el rejalgar (AsS), siendo el más común el primero. Por tanto, podría suponerse que exista una mayor presencia de estos minerales en el sector de Querococha que en Parón el cual explique una mayor captación de arsénico en las tres especies de líquenes colectados en dicho sector. Sin embargo, el aporte del suelo se analizó con los resultados del acápite 4.1.3.

En resumen, la variabilidad de los valores de bioacumulación del arsénico estaría explicado; a nivel de especie, por las características morfológicas de la corteza inferior y un mayor contenido de biomoléculas ligados a la captación de iones de arsénico en la *Sticta weigelii*, mientras que a nivel de los sitios de estudio, se explicaría por una mayor presencia de minerales que contienen arsénico en el sector de Querococha, aunque este último se evaluó a más profundidad en el siguiente acápite.

c. De los resultados de las correlaciones entre los metales bioacumulados

En lo que se refiere a la absorción de metales en líquenes, tres mecanismos han sido propuestos por Richardson (1995): (i) Captura de partículas que contienen metales, (ii) Acumulación intracelular y (iii) Absorción intracelular mediante un proceso de intercambio, todos ellos descritos en el Acápite 2.7.1. Estos mecanismos sumados a la naturaleza química de los metales, su disponibilidad en el ambiente y su rol biológico en los líquenes, determinan de alguna manera las cantidades bioacumuladas sobre estos organismos simbióticos. Por tanto, para estimar qué mecanismos pudieron estar implicados en la captura de los metales en estudio, se procedió a explicar las relaciones entre ellas, mediante los análisis de correlaciones (Los coeficientes de correlación son mostrados en el Anexo 14) y el análisis de componentes principales mostrados en las Figuras 20, 21, respectivamente. De estos análisis de correlación, pueden observarse que el metal que más se correlacionó con el resto de metales, de forma significativa (α=0.05), fue el Aluminio, quien estuvo correlacionado a los metales As, Fe, Pb, Zn y Cu. Este metal junto al hierro (Fe) son de los principales elementos que componen la corteza terrestre. De hecho, de acuerdo a Bodenlos y Ericksen (1955), el batolito de la Cordillera Blanca está compuesta por rocas que son

básicamente granodiorita de tipo metaluminoso ($Na_2O+K_2O < Al_2O_3 < CaO + Na_2O+K_2O$), es decir, con un contenido medio de óxido de aluminio. Mientras que el hierro está presente formando parte de minerales abundantes en esta zona como la pirita (FeS) y la calcopirita ($CuFeS_2$). Guevara et al. (1995), menciona que una fuerte correlación entre ambos elementos litofílicos bioacumulados indicaría que estos metales habrían entrado en forma de material particulado detrítico que quedó atrapado en los tejidos de los líquenes. Por ejemplo Loppi et al.(1999), determinó una correlación de Fe/Al bioacumulado con valor del coeficiente de 0.92, mientras que para el presente estudio la correlación entre ambos elementos fue de 0.53. Aunque este valor no fue alto como se esperaría, fue uno de los coeficientes más altos obtenidos (Ver Anexo 14). Por otro lado, entre las correlaciones más importantes observadas en la Figura 20, estuvieron la del cromo con el hierro ($r=0.58$, $p<0.01$) y la del zinc con el plomo ($r=0.65$, p valor<0.001). En el caso del cromo, es posible que partículas de cromita ($FeCr_2O_4$) hayan ingresado a los líquenes provenientes del suelo. Aunque no se tenga información sobre la presencia de este mineral en los sitios de estudio, se tiene información que en la Cordillera Oriental de los Andes centrales peruanos fueron hallados rocas con alto grado de cromita obtenido a partir de material transportado y depositado por los glaciares (Castroviejo et al. ,2010). En cuanto a la correlación entre el zinc y el plomo, Bodenlos y Ericksen (1955), en su estudio geológico en la Cordillera Blanca, determinó que entre los minerales más abundantes encontrados en esta cadena de montañas, estuvieron la galena (PbS) y la esfalerita (ZnS). En cierto modo, esto explicaría su alta correlación entre estos dos metales, sumado a que ambos también estuvieron correlacionados significativamente al aluminio. Por tanto en base a este análisis de correlaciones, podría suponerse que el contenido de metales bioacumulados estaría en función de las características geológicas de los sitios de estudio. Sin embargo, esto último se analizó a mayor profundidad en el acápite 4.2.3.

d. De los resultados del Análisis de Componentes Principales (ACP)

En lo que respecta al diagrama de componentes principales de la Figura 21, de algún modo, este gráfico reflejó las correlaciones entre los metales, discutidas anteriormente, pero de forma de resumida a través de un plano de dos ejes.

En ese sentido, las correlaciones presentes entre los metales Fe, Pb, Cu y Zn con el aluminio estuvieron representados por el componente 1 (eje horizontal). Por tanto, podría afirmarse que el 36.9% de la variabilidad total estaría explicado por una presencia de partículas al interior del talo de los líquenes que ingresaron junto al “Al”. Mientras que el 16.57%, que

corresponde a la variabilidad explicada por el segundo componente, está explicada por la variabilidad del cromo y en menor medida por el níquel. Tomando en cuenta, que casi no existió correlación entre el cromo y el aluminio, mientras que sí con el hierro, podría suponerse que se trataría de alguna clase de partícula con alta presencia de óxidos de hierro, como la cromita, captadas por estos líquenes. Por el contrario, el níquel no presentó correlación con ninguno de los elementos litofílicos Al y Fe. Como pudo observarse en la Figura 22, la variación del Ni estuvo repartida entre los componentes 2 y 3, lo que volvió difícil la interpretación sobre su procedencia. En cuanto a los componentes 3 y 4, estos estarían explicando las variaciones de los elementos As y Mn con un porcentaje de la varianza total del 16.27% y 11.07%, respectivamente (Ver Anexo 15). Para el caso del arsénico, esto podría explicarse por la influencia de los factores, "tipo de especie" y "sitio de estudio" analizados anteriormente, aunque, con mayor peso en el primer factor, ya que, casi no existió correlación entre el arsénico y el hierro (r=0.17) que pudiera sugerir su procedencia por la disponibilidad de arsenopirita (FeAsS) en los sitios de estudio. Por otro lado, en el caso del manganeso, el factor "sitio de estudio" estaría explicando su variabilidad a nivel del componente 4, ya que la casi ausencia de correlaciones con el resto de metales, permitiría afirmar que la principal fuente de variación fue el grado de disponibilidad de sus minerales ($MnCO_3$, $MnSiO_3$ y óxidos de manganeso) en los sitios de estudio.

Finalmente, la Figura 23, permitió visualizar y ratificar, la ausencia de algún efecto de los factores: "Especie" o "Sitio de estudio" sobre los valores bioacumulados de los metales Fe, Al, Pb, Cu, Zn, Cr y Ni (Anexos 12 y 13). Aunque esto contrasta con algunos estudios donde se ha encontrado que el biotipo de líquen repercute sobre la capacidad de bioacumulación del líquen. Pues, se ha observado que los líquenes foliosos presentaron una mayor capacidad de bioacumulación que los fruticosos. Rivera et al. (2018), sugieren que esto se debe a que los líquenes foliosos presentan una mayor superficie expuesta a la atmósfera. Por otro lado, el biotipo también influiría en la manera que el líquen capta las partículas con contenido metálico. Por ejemplo, Monaci et al. (2012), quien cita a Bosserman y Hagner (1981), encontró que los líquenes foliosos del género *Parmelia* acumularon metales provenientes, principalmente, de la deposición seca atmosférica, mientras que, las *Usneas* fueron más dependientes de la deposición húmeda atmosférica. Por tanto, para el presente estudio se infiere, que la similitud entre los valores bioacumulados de las especies del género *Usnea* y *Sticta weigelii*, podría deberse a una mayor bioacumulación de metales por deposición húmeda en las *Usneas* (biotipo fruticoso), capaz de compensar la falta de superficie de

exposición con respecto a la *Sticta* (biotipo folioso). Además que en los sitios de estudio estarían sucediendo deposiciones atmosféricas tanto secas como húmedas.

4.2.3 Discusión sobre los resultados obtenidos para el logro del objetivo 3

a. De los resultados de metales en los suelos de los sitios de estudio

Con la finalidad de estimar si algún metal presente en los suelos de los sitios de estudio pudiera provenir de las actividades antrópicas y no del aporte natural, se compararon sus valores con los Estándares de Calidad Ambiental de Suelos (ECAs de suelo) vigente en el país (Ministerio del Ambiente -MINAM ,2017), asimismo con valores referenciales encontrados en suelos con características similares a los del estudio en distintos puntos del planeta. Estas comparaciones fueron presentadas en la Tabla 9 donde pudo observarse que en general los resultados de los suelos estuvieron por debajo de los valores de los ECAs, mientras que, con respecto a los valores encontrados en algunos países, estuvieron dentro de sus rangos o se mantuvieron por debajo de ellos. Por tanto, puede concluirse que en general no habría algún aporte externo al natural presente en los suelos de los sitios de estudio.

b. De los resultados del análisis de rangos de abundancia de metales en líquenes y suelos

Para poder estimar el grado de aporte de estos suelos a los líquenes se utilizaron los análisis de rangos mostrados en las Figuras 25, 26 y 27, basado en el estudio de Loppi et al. (1999). Aunque este mismo autor, mencionó que este método no es tan preciso, pues los elementos más abundantes (Al, Fe) y los de concentraciones muy bajas (Cd, As) siempre tendrán el mismo rango por su propia naturaleza, los elementos intermedios (Zn, Mn, Cr, Cu, Pb, Ni) de alguna forma podrían proporcionar información sobre el grado de afinidad que tiene alguno de estos elementos a estar más presente en los suelos o a ser bioacumulado por los líquenes. Por ejemplo, en las tres figuras pudo observarse que el Zn presentó mayor rango en eje de líquenes. Este elemento es considerado como un micronutriente que presenta un rol importante en la activación de enzimas asociados al ciclo de Calvin durante la fotosíntesis, el cual es llevado a cabo por el fotobionte (alga o cianobacteria). De modo que, este metal es incorporado lentamente a nivel intracelular (Richardson et al. ,1985) , donde usualmente se han reportado altas concentraciones. Incluso, bajo condiciones de toxicidad del zinc sobre su tasa fotosintética, los líquenes han evidenciado alta capacidad de bioacumulación de este metal (Brown y Beckett ,1983). Por tanto, este atributo, estaría explicando la afinidad del zinc hacia estos simbiontes.

Por otro lado, los elementos que mostraron un mayor rango en solo una de las tres figuras como el Cr (Fig. 25), el Pb (Fig. 26) y el Cu (Fig. 27), sería un reflejo del comportamiento muy variable o anómalo que tienen estos elementos como metales fronterizos con carácter de clase B (Ver acápite 2.7.1), pues se ha observado que alteran el sistema o induce efectos inhibitorios a nivel extracelular en los líquenes (Nieboer y Richardson ,1980).

Con respecto a los elementos que mostraron mayores rangos en los suelos, el manganeso presentó un mayor rango en los suelos de los tres sitios de estudio, mientras que el níquel, solamente en Parón abajo. En el caso del manganeso, si bien es considerado como un micronutriente esencial por participar en procesos como la fotosíntesis o constituyendo enzimas importantes para la respiración celular, su requerimiento en los líquenes es muy baja (Hauck y Paul ,2005). Por tanto, eso puede explicar el hecho que este metal haya presentado un menor rango en los líquenes respecto a los suelos.

En cambio, el níquel (metal fronterizo con carácter B) es un metal que tiende a generar toxicidad en el líquen (a nivel de membranas celulares) y su absorción se encuentra estrictamente asociado a procesos fisicoquímicos (variaciones de pH y temperatura), por lo que aún muerto todavía es capaz de acumular este metal (Nieboer et al. ,1976) . Por tanto, de forma similar al Cu y Pb, su comportamiento es muy variable, lo que explicaría que los rangos de abundancia en el suelo no coincidan con el del líquen.

Tabla 9: Concentraciones en mg/kg de metales en los suelos de los sitios de estudio contrastados con los ECAs para suelos del Perú y valores encontrados en suelos similares a nivel mundial.

Sitios	***Parón arriba***			***Parón abajo***		***Querococha arriba***		***ECA Suelo*** [b]	***Rangos nivel mundial*** [a]	***Países Referencia*** [a]	***Tipo de suelo, composición en minerales***
Transecto	**T-1**	**T-2**	**T-3**	**T-4**	**T-5**	**T-6**	**T-7**				
Al	55.55	114.265	250.435	110.485	130.2	212.015	535.735	---	---	---	---
As	0.285	0.24	0.26	0.215	0.345	0.98	2.31	50	1.0-2.6 5.0-8.2	--- Gran Bretaña	Dioritas, granito Suelos sobre roca máfica
Cd	0.045	0.055	0.075	0.045	0.045	0.065	0.08	1.4	0.49-0.61 0.04-0.80	Gran Bretaña Polonia	SSSG*
Cu	2.445	1.835	3.685	1.835	2.75	3.46	4.105	---	3-14	Dinamarca, Polonia	SSSG*
Cr	7.795	7.94	6.56	5.645	3.43	4.84	17.675	---	10-150	Polonia, EEUU	SSSG*
Fe	101.775	219.605	285.78	215.735	147.735	135.525	796.625	---	---	---	SSSG*
Mn	31.6	47.625	77.86	15.14	58.23	13.445	17.13	---	284-680	Polonia	SSSG*
Ni	1.25	1.19	1.255	1.46	0.66	1.715	1.365	---	2.4-50	Irlanda, Polonia	SSSG*
Pb	1.045	2.755	2.21	0.835	0.79	0.2	3.995	70	7-30	Dinamarca, Polonia, EEUU	SSSG*
Zn	6.915	11.74	14.5	6.48	6.78	9.66	8.57	---	19-22	Polonia	SSSG*

(*) SSSG= "Suelo formado sobre sedimento glaciar"

([a]) Valores mencionados en el libro de Kabata-Pendias y Pendias (2001), ([b]) Valores ECAs según el MINAM (2017).

c. De los resultados de los factores de enriquecimiento (FEs)

Con la finalidad de evaluar si fuentes atmosféricas, estarían aportando metales, además del suelo, a los líquenes, se normalizaron los resultados de metales con el aluminio (elemento principal en la corteza terrestre) y se siguió la fórmula del acápite 3.7.3 para el cálculo de los factores de enriquecimientos (EF: Enrichment Factor en inglés). Con ello, se buscó descartar toda influencia del suelo o de las rocas que podrían también estar en forma suspendida en el aire. Como consecuencia, se obtuvo los resultados de la Tabla 5 (Ver acápite 4.1.3), donde los valores FEs fueron cercanos a la unidad indicando que en general los sitios de estudio no demostraron aporte posible de metales provenientes de la atmósfera, y por el contrario, este estaría atribuido principalmente a los suelos, tal como se ha venido discutiendo en los resultados anteriores.

Sin embargo, algunos sitios mostraron valores de FEs que superaron significativamente la unidad (FEs >10). El sitio de Parón abajo mostró por ejemplo valores mayores a 10 en el arsénico y el cromo, del mismo modo el sitio de Querococha arriba para los elementos zinc y plomo, siendo este último el que presentó el mayor valor FE. De acuerdo a Loppi et al. (1999), valores de FE en el intervalo de 10 y 20 indicaría que una cantidad sustancial del metal sería de origen atmosférico, mientras que un valor mayor a 30 significaría una clara tendencia a que el elemento se comporte como atmofílico sujeto a un transporte atmosférico de largo alcance. En ese sentido, una parte del contenido bioacumulado de los metales As y Cr en el sitio de Parón abajo, así como del Zn en Querococha arriba, tendría un origen atmosférico, mientras que para el caso del Pb en este último sitio, debido a su cercanía al valor de 30 (FE_{Pb}=26.27, ver Tabla 5), estaría existiendo un aporte netamente atmosférico ligado a actividades antrópicas. Aquello, no es novedad en sitios prístinos como los sitios de estudio, ya que, Bergamaschi et al. (2005), encontraron en las parte altas del Himalaya (Parque Nacional de Sagarmantha, Nepal) y en los Alpes (Parque Nacional Gran Paradiso, Italia), valores de FEs de diversos metales que fueron mayores a 10, entre los cuales estuvieron el Pb, Cu, Zn, Cd, Sb y el Br (Ver Figura 28), llegando a la conclusión que estos

elementos no solo derivarían del suelo local sino de otras fuentes naturales y/o antrópicas, transportados por fenómenos atmosféricos de largo alcance.

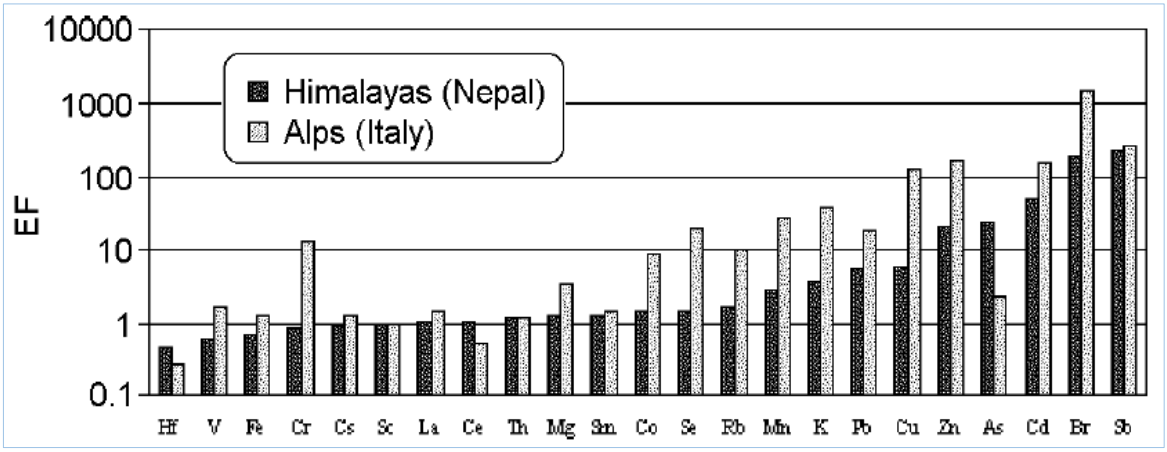


Figura 28: Comparación entre los FEs de varios metales en los líquenes (*Usnea* sp) del Himalaya y los Alpes. Fuente: Imagen extraída del artículo de Bergamaschi et al. (2005)

Las actividades antrópicas a las que se les podría atribuir los valores altos de FEs en los metales As y Cr, en Parón, sería la combustión de carbón para el caso del arsénico (Kabata-Pendias y Pendias ,2001), mientras que para el cromo, podría asociarse a un alto tráfico vehicular (en la parte baja de la subcuenca), ya que este metal está presente como componente de la gasolina sin plomo, de anticongelantes y de autopartes (Pereira et al. ,2018). Por otro lado, las actividades antrópicas a las que se les podría atribuir los valores altos de FEs en los metales Zn y Pb, en Querococha arriba, sería la combustión de gasolina y la combustión de combustibles con plomo, respectivamente, como es mencionado por Tucker (2003) y Wallis (2016). Es preciso indicar que cerca al sitio de muestreo (T6), aguas arriba de la laguna Querococha, se encuentra la carretera Cátac-Chavín-San Marcos (Ruta departamental AN-110), el cual es muy transitada por toda clase de vehículo motorizado. Es posible que el Pb en esta parte, proveniente de este tránsito, haya influenciado su alto valor de FE.

V. CONCLUSIONES

- 33 especies de líquenes fueron identificados en los sitios de estudio de las partes altas de las subcuencas de Parón y Yanayacu, de los cuales 5 especies pertenecientes a los géneros *Cetrelia*, *Erioderma*, *Hypogymnia*, *Parmelia* y *Parmelinopsis*, fueron considerados nuevos registros para el departamento de Ancash.

- Las diferencias de la estructura liquenobiótica entre los sitios de estudio, estuvo marcado, por una predominancia de pocas especies de biotipo fruticoso con hábitos cortícolas arbustivas y saxícolas en el sitio de Parón arriba.

- En Parón abajo y Querococha arriba, las diferencias de la estructura liquenobiótica se caracterizaron por una mayor cantidad de especies propias de los bosques *Polylepis* peruanos, como la especie *Everniopsis trulla*, o las especies pertenecientes a los géneros *Cladonia* y *Peltigera*.

- Una misma proporcionalidad de géneros tolerantes y sensibles a metales pesados en los sitios de estudio indicaría que no habría ningún efecto perjudicial de éstos capaz de generar diferencias en las estructuras liquenobióticas en función a sus capacidades de tolerancia.

- Los contenidos de metales pesados bioacumulados en los líquenes fruticosos del género *Usnea* y en la especie foliosa *Sticta weigelii* estuvieron de acuerdo a valores registrados en líquenes de sitios prístinos.

- Las diferencias significativas halladas para el manganeso, sería evidencia de la capacidad de los líquenes *Usnea* y *Sticta weigelii*, de reflejar la disponibilidad de este elemento en los suelos de los sitios de Parón. Mientras que en el caso del arsénico, las diferencias significativas observadas entre ambas, respondería al biotipo de talo.

- Por otro lado, las diferencias encontradas en el análisis multivariado, caracterizado por un comportamiento asociativo de los metales Al, Fe, Cu, Pb y Zn, e individual de los metales As, Mn, Cr y Ni, permitió deducir que estos metales estuvieron sujetos a diferentes mecanismos de bioacumulación.

- La relación del contenido metálico de los líquenes y del suelo, analizados mediante los análisis de rangos de abundancia y de los factores de enriquecimiento, terminaron por confirmar el origen edáfico/geológico de los metales bioacumulados, aunque para algunos elementos como el arsénico, cromo, plomo, níquel y zinc, no resultó claro este origen, ya que una parte de sus contenidos podrían estar siendo sujetos a un transporte atmosférico de partículas asociados a actividades antrópicas o el resultado de procesos diferenciados de naturaleza fisiológica o química de estos elementos al interior de los líquenes.

- Los líquenes de las especies del género *Usnea* y *Sticta weigelii*, tienen la capacidad de reflejar la presencia de metales pesados en las zonas altoandinas de la Cordillera Blanca, la cual estaría en un nivel bastante bajo, como sucede en otros sitios prístinos del planeta, y sujeto principalmente a una contaminación natural, aunque con ciertos rastros de influencia antrópica.

VI. RECOMENDACIONES

- Se recomienda la ejecución de estudios de bioindicación mediante líquenes en otras Cordilleras tomando en cuenta que el Perú cuenta con un total de veintiún (21) cordilleras, agrupadas en tres cordilleras principales: Occidental, Central y Oriental.

- Para una mejor identificación a nivel de especie de los líquenes se recomienda utilizar la prueba de color con la Parafenilendiamina (PD), ya que el tipo de coloración obtenida luego de su aplicación, es exigido como carácter de identificación en claves taxonómicas de diversos géneros. Sin embargo, se debe tomar mucho cuidado en su manipulación por ser volátil y altamente tóxico al ser humano.

- Respecto a las mediciones de las concentraciones de metales pesados en líquenes, se recomienda utilizar un material de referencia estándar, el cual consiste en un material certificado que sirve para comprobar la calidad de las mediciones analíticas. Para los líquenes se utilizan el material IAEA-336 que corresponde al líquen epífito *Evernai prunasti* (L.) Ach., del Organismo Internacional de Energía Atómica, y el material CRM-482, correspondiente al líquen *Pseudevernia furfuracea*, de la Comisión de la Oficina Comunitaria de Referencia de la Unión Europea (Standards, Measurements and Testing Programme). Estas muestras referenciales deben analizarse junto a las del estudio para el control analítico, donde deberá verificarse que sus resultados concuerden.

- Se recomienda realizar un análisis de microfotografía de barrido electrónico de la superficie del líquen para determinar la concentración de elementos químicos y metales pesados presentes. De esta manera, se cuantificaría los metales captados por el mecanismo de atrapamiento de partículas a nivel extracelular, lo que a su vez permitiría estimar las cantidades metálicas captadas a nivel intracelular a través de la diferencia entre las cantidades totales del metal y lo captado en la superficie.

- Un análisis por Difracción de rayos X de los suelos para determinación de su composición mineralógica, es recomendable, ya que permitiría reforzar la idea sobre el posible origen edáfico/geológico de algunos metales bioacumulados en los líquenes estudiados.

- Tomando en cuenta que el presente estudio fue realizado durante la época de estiaje, se recomienda realizarse también en época húmeda afín de evaluar el comportamiento de la bioacumulación de metales en esas condiciones.
- Finalmente, para la relación entre los resultados de metales de los líquenes y suelos, se recomienda que el número de mediciones sean la misma para ambos, para así poder aplicar un análisis de correlaciones por metal que permita dar una mejor visualización de su relación.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Agnan, Y.; Séjalon-Delmas, N.; Claustres, A. & Probst, A. (2013). Large scale atmospheric contribution of trace elements registered in foliose lichens in remote French areas. *E3S Web of Conferences* (1): 29001-p.1 - 29001-p.4. DOI: https://doi.org/10.1051/e3sconf/20130129001.

Aldás, J. & Uriel, E. (2017). Análisis multivariante aplicado con R. Segunda Ed. Madrid, Ediciones Paraninfo, S.A. 1-677 p.

Alfaro Sanchez, G. & Cervantes Borja, J.F. (1987). Efectos fisico-quimicos inmediatos en los suelos afectados por la erupcion del volcan Chichon (Chiapas, 1982). *Invest. Geog* [online], n.17, pp. 75-86. ISSN 2448-7279.

Armstrong, R. (2004). Lichens, Lichenometry and global warming. Microbiologist 151(2):32-35. DOI: https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.06.041.

Bačkor, M. & Loppi, S. (2009). Interactions of lichens with heavy metals. *Biologia Plantarum*. 53(2):214-222. DOI: https://doi.org/10.1007/s10535-009-0042-y.

Bajpai, R.; Shukla, V.; Pandey, U. & Upreti, D.K. (2019). Do Lichens have the Ability to Remove Arsenic from Water? International Journal of Plant and Environment 5(1):47-49. DOI: https://doi.org/10.18811/ijpen.v5i01.8.

Bajpai, R.; Upreti, D.K. & Dwivedi, S.K. (2009). Arsenic accumulation in lichens of Mandav monuments , Dhar district , Madhya Pradesh , India. Environmental Monitoring and Assessment 159:437-442. DOI: https://doi.org/10.1007/s10661-008-0641-7.

Barbante, C.; Boutron, C.; Morel, C.; Ferrari, C.; Jaffrezo, J.L.; Cozzi, G. & Cescon, P. (2003). Seasonal variations of heavy metals in central Greenland snow deposited from 1991 to 1995. Journal of Environmental Monitoring 5:328-335. DOI: https://doi.org/10.1039/b210460a.

Bari, A.; Rosso, A.; Minciardi, M.R.; Troiani, F. & Piervittori, R. (2001). Analysis of heavy metals in atmospheric particulates in relation to their bioaccumulation in explanted *Pseudevernia furfuracea* thalli. Environmental Monitoring and Assessment 69(3):205-220. DOI: https://doi.org/10.1023/A:1010757924363.

Barreno, E. & Pérez-Ortega, S. (2003). Biología de los líquenes. Líquenes de la Reserva Natural Integral de Muniellos, Asturias :1096.

Barreno, E. & Pérez, S. (2003). Los líquenes y el medio. Consejería de Medio Ambiente, Ordenación del Terrtorio e Infraestructura del Principado de Asturias 1(1):84-90.

Bautista Zuñiga, F. (1999). Introducción al estudio de la contaminación del suelo por metales pesados. Ediciones. Mérida, Yucatán, México, s.e. 109 p.

Beckerman, A.P.; Childs, D.Z. & Petchey, O.L. (2017). Getting Started with R An Introduction for Biologists. Second Edi. Oxford, Oxford University Press. 1-231 p. DOI: https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198787839.001.0001.

Bergamaschi, L.; Rizzio, E.; Giaveri, G.; Giordani, L.; Profumo, A. & Gallorini, M. (2005). INAA for the determination of trace elements and evaluation of their enrichment factors in lichens of high altitude areas. Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry 263(3):721-724. DOI: https://doi.org/10.1007/s10967-005-0648-2.

Bodenlos, A.J. & Ericksen, G.E. (1955). Lead-zinc deposits of Cordillera Blanca and northern Cordillera Huayhuash. U.S. Geological Survey Bulletin 1017:166. DOI: https://doi.org/https://doi.org/10.3133/b1017.

Bouziane, M. (2006). Etude physico-chimique de l'accumulation de métaux lourds par les lichens. Impacts sur les voies de biosynthèse et interprétation du mécanisme de tolérance chez *Diploschistes muscorum*. s.l., Université des Sciences et Technologies de Lille. 1-185 p.

Brodo, I.M.; Sharnoff, S.D. & Sharnoff, S.; Canadian Museum of Nature. (2001). Lichens of North America. ilustrada. Laurie-Bourque, S; Raven, P (eds.). s.l., Yale University Press / New Heaven and London. 795 p.

Brown, D.H. & Beckett, R.P. (1983). Differential sensitivity of lichens to heavy metals. Annals of Botany 52(1):51-57. DOI: https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a086551.

Büdel, B. & Scheidegger, C. (2008). Thallus morphology and anatomy. s.l., s.e. p. 40-68

DOI: https://doi.org/10.1017/CBO9780511790478.005.

Bury, J.T.; Mark, B.G.; McKenzie, J.M.; French, A; Baraer, M.; Huh, K.I.; Zapata Luyo, M.A. & Gómez López, R.J. (2011). Glacier recession and human vulnerability in the Yanamarey watershed of the Cordillera Blanca, Peru. Climatic Change 105(1):179-206. DOI: https://doi.org/10.1007/s10584-010-9870-1.

Cáceres, M.E.S.; Lücking, R. & Rambold, G. (2008). Efficiency of sampling methods for accurate estimation of species richness of corticolous microlichens in the Atlantic rainforest of northeastern Brazil. Biodivers Conserv 17(6):1285-1301. DOI: https://doi.org/10.1007/s10531-008-9342-3.

Carreras, H.A.; Wannaz, E.D.; Perez, C.A.; & Pignata, M.L. (2005). The role of urban air pollutants on the performance of heavy metal accumulation in *Usnea amblyoclada*. Environmental Research 97(1):50-57. DOI: https://doi.org/10.1016/j.envres.2004.05.009.

Castillo Rodríguez, L.F. (2011). Uso de líquenes como bioindicadores en presencia de metales pesados en una zona de Pasivos Ambientales Mineros en abandono. s.l., Universidad Nacional Agraria La Molina. 1-110 p.

Castro Mandujano, O.N. (2010). Aislamiento del ácido úsnico de *Flavoparmelia caperata* y su determinación cuantitativa por espectroscopía UV, en diez líquenes (en línea). Revista de la Sociedad Química del Perú 76(4):389-399. Disponible en file:///scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2010000400009&lang=pt.

Castroviejo, R.; Pereira, E.; Rodrigues, J.F. & Acosta, J. (2010). Pre-andean serpentinite-chromite orebodies in the Eastern Cordillera of Central Peru, Tarma province. Smart Science for Exploration and Mining, Vol 1 and 2 (January):927-929.

Cecconi, E. (2019). Biomonitoring of environmental pollutants with lichens: Data interpretation, methodological aspects and applications. s.l., Universita Degli Studi Di Trieste. 221 p.

Chaparro de Valencia, M.; Aguirre Ceballos, J. (2002). Hongos liquenizados (en línea). Primera. Echeverri Perico, M (ed.). s.l., Editorial El Malpensante S.A. 212 p. Disponible en Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá.

Chaparro, A.L.; García, J.J.; Cardona, Y.; Bustamante, J.J. & Peláez, M. (2016). Desarrollo y validación de un método ambientalmente amigable para determinación de metales

pesados en pastos. Rev. Cienc. Agr. 33(2):3-15. DOI: http://dx.doi.org/10.22267/rcia.163302.48.

Chettri, M.K.; Sawidis, T.; Zachariadis, G.A. & Stratis, J.A. (1997). Uptake of heavy metals by living and dead *Cladonia* thalli. Environmental and Experimental Botany 37(1):39-52. DOI: https://doi.org/10.1016/S0098-8472(96)01023-4.

Conti, M.E.; Finoia, M.G.; Bocca, B.; Mele, G.; Alimonti, A. & Pino, A. (2012). Atmospheric background trace elements deposition in Tierra del Fuego region (Patagonia , Argentina), using transplanted *Usnea barbata* lichens. Environmental Monitoring and Assessment 184:527-538. DOI: https://doi.org/10.1007/s10661-011-1985-y.

Conti, M.E.; Pino, A.; Botrè, F.; Bocca, B. & Alimonti, A. (2009). Lichen *Usnea barbata* as biomonitor of airborne elements deposition in the Province of Tierra del Fuego (southern Patagonia, Argentina). Ecotoxicology and Environmental Safety 72(4):1082-1089. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2008.12.004.

Conti, M.E. & Tudino, M.B. (2016). Lichens as Biomonitors of Heavy-Metal Pollution (en línea). *In de la Guardia, M; Armenta, S (eds.)*. s.l., Comprehensive Analytical Chemistry, Elsevier, vol.73. p. 117-145 DOI: https://doi.org/10.1016/bs.coac.2016.02.005.

Correia, A.; Freydier, R.; Delmas, R.J.; Simões, J.C.; Taupin, J.D.; Dupré, B. & Artaxo, P. (2003). Trace elements in South America aerosol during 20th century inferred from a Nevado Illimani ice core, Eastern Bolivian Andes (6350 m asl). Atmospheric Chemistry and Physics 3(5):1337-1352. DOI: https://doi.org/https://doi.org/10.5194/acp-3-1337-2003.

Cuny, D. (1999). Les impacts communautaires, physiologiques et cellulaires des éléments traces métalliques sur la symbiose lichénique; mise en évidence de mécanismes de tolérance chez *Diploschistes muscorum* (Scop.) R.Sant. Acta Botanica Gallica 146(3):293-294. DOI: https://doi.org/10.1080/12538078.1999.10515400.

Darnajoux, R.; Lutzoni, F.; Miadlikowska, J. & Bellenger, J. (2015). Determination of elemental baseline using peltigeralean lichens from Northeastern Canada (Québec): Initial data collection for long term monitoring of the impact of global climate change on boreal and sub-arctic area in Canada (en línea). Science of the Total Environment 533:1-7. DOI: https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.06.030.

Díaz, E. (2006). Uso de líquenes como bioindicadores de presencia de metales pesados en áreas cercanas a empresas mineras en zonas de altura en Perú. s.l., Universidad Nacional de Ingeniería - UNI. 1-157 p.

Ferrari, C.P.; Clotteau, T.; Thompson, L.G.; Barbante, C.; Cozzi, G.; Cescon, P.; Hong, S.; Maurice-Bourgoin, L.; Francou, B. & Boutron, C.F. (2001). Heavy metals in ancient tropical ice: Initial results. *Atmospheric Environment*. 35(33):5809-5815. DOI: https://doi.org/10.1016/S1352-2310(01)00347-8.

Fortner, S.K.; Mark, B.G.; McKenzie, J.M.; Bury, J.; Trierweiler, A.; Baraer, M.; Burns, P.J. & Munk, L.A. (2011). Elevated stream trace and minor element concentrations in the foreland of receding tropical glaciers (en línea). Applied Geochemistry 26(11):1792-1801. DOI: https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2011.06.003.

Friedl, T. & Büdel, B. (2008). Photobionts. s.l., Cambridge University Press. p. 9-26 DOI: https://doi.org/https://doi.org/10.1017/CBO9780511790478.003.

Gabrielli, P.; Cozzi, G.; Torcini, S. & Cescon, P. (2006). Source and origin of atmospheric trace elements entrapped in winter snow of the Italian Eastern Alps. Atmospheric Chemistry and Physics Discussions :8781-8815.

Garty, J. (2001). Biomonitoring Atmospheric Heavy Metals with Lichens: Theory and Application. Critical Reviews in Plant Sciences 20(4):309-371. DOI: https://doi.org/10.1080/20013591099254.

Giordani, P.; Benesperi, R.; Bianchi, E.; Brunialti, G.; Cecconi, E.; Contardo, T.; Nuzzo, L. Di; Fortuna, L.; Frati, L.; Loppi, S.; Monaci, F.; Munzi, S.; Nascimbene, J.; Paoli, L.; Ravera, S.; Tretiach, M. & Vannini, A. (2019). Guidelines for the use of lichens as bioaccumulators. Roma, s.e.

Goodson, D.Z. (2011). Estimation. Hoboken, New Jersey, John Wiley & Sons, Inc. p. 111-130 DOI: https://doi.org/10.1002/9781118135204.ch8.

Gordon, C.A.; Herrera, R. & Hutchinson, T.C. (1995). The use of a common epiphytic lichen as a bioindicator of atmospheric inputs to two Venezuelan cloud forests. Journal of Tropical Ecology 11(1):1-26. DOI: https://doi.org/10.1017/S026646740000835X.

Grigholm, B.; Mayewski, P.A.; Kurbatov, A.V.; Casassa, G.; Staeding, A.C.; Handley, M.; Sneed, S.B.; Introne, D.S. (2009). Chemical composition of fresh snow from Glaciar Marinelli , Tierra del Fuego , Chile. Journal of Glaciology 55(193):769-

776. DOI: https://doi.org/10.3189/002214309790152546.

Guevara, S.R.; Arribére, M.A.; Calvelo, S. & Ross, G.R. (1995). Elemental composition of lichens at Nahuel Huapi National Park, Patagonia, Argentina. Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry Articles 198(2):437-448. DOI: https://doi.org/10.1007/BF02036560.

Guittard, A.; Baraer, M.; McKenzie, J.M.; Mark, B.G.; Wigmore, O.; Fernandez, A.; Rapre, A.C.; Walsh, E.; Bury, J.; Carey, M.; French, A. & Young, K.R. (2017). Trace-metal contamination in the glacierized Rio Santa watershed, Peru. Environmental Monitoring and Assessment 189(12). DOI: https://doi.org/10.1007/s10661-017-6353-0.

Gunathilaka, P.A.D.H.N.; Ranundeniya, R.M.N.S.; Najim, M.M.M. & Seneviratne, S. (2011). A determination of air pollution in Colombo and Kurunegala, Sri Lanka, using energy dispersive X-ray fluorescence spectrometry on *Heterodermia speciosa*. Turkish Journal of Botany 35(4):439-446. DOI: https://doi.org/10.3906/bot-1006-15.

Hauck, M. & Paul, A. (2005). Manganese as a site factor for epiphytic lichens. The Lichenologist 37(5):409-423. DOI: https://doi.org/10.1017/S0024282905014933.

Herzig, R.; Urech, M.; Liebendorfer, L.; Ammann, K.; Guecheva, M. & Landolt, W. (1989). Lichens as Biological Indicators of Air-Pollution in Switzerland - Passive Biomonitoring as a Part of an Integrated Measuring System for Monitoring Air-Pollution. Element Concentration Cadasters in Ecosystems 35(14):317-332\r448.

Honegger, R. (2008). Mycobionts. s.l., s.e. p. 27-39 DOI:

https://doi.org/https://doi.org/10.1017/CBO9780511790478.004

Illana-Esteban, C. (2012). Líquenes Usados En Medicina Tradicional. Bol. Soc. Micol. Madrid 36:163-174.

INGEMMET. (1995). Carta Geológica Nacional (en línea, sitio web). Consultado 28 oct. 2020. Disponible en https://www.ingemmet.gob.pe/carta-geologica-nacional.

INRENA. (1994). Guía Explicativa del Mapa Ecológico del Perú. Lima, s.e.

Jaworowski, Z.; Bysiek, M. & Kownacka, L. (1981). Flow of metals into the global atmosphere. Geochimica et Cosmochimica Acta 45(11):2185-2199. DOI:

https://doi.org/10.1016/0016-7037(81)90071-5.

Jones, D.; Wilson, M.J. & Laundon, J.R. (1982). Observations on the Location and form of Lead in *Stereocaulon Vesuvianum*. The Lichenologist 14(3):281-286. DOI: https://doi.org/10.1017/S0024282982000516.

Kabata-Pendias, A. & Pendias, H. (2001). Trace Elements in Soils and Plants. Third. Boca Raton, Florida, CRC Press LLC, vol.2. 331 p. DOI: https://doi.org/10.1136/bmj.2.4640.1355-a.

Laguna-Defior, C. (2017). Ecofisiología y diversidad molecular de los líquenes neuropogonoides del género *Usnea* en Tierra del Fuego y la Antártida marítima. s.l., Universidad Complutense de Madrid. 1-263 p.

Loayza Muro, R. (2014). Calidad de agua en cabeceras de cuencas altoandinas en el contexto de cambio climático: Una aproximación para evaluar la calidad del agua y potencial remediación en la subcuenca de Quillcay. Lima, s.e.

Loppi, S.; Pirintsos, S.A. & De Dominicis, V. (1999). Soil contribution to the elemental composition of epiphytic lichens (Tuscany, Central Italy). Environmental Monitoring and Assessment 58:121-131. DOI: https://doi.org/https://doi.org/10.1023/A:1006047431210.

Matthiopoulos, J. (2011). How to measure similarity (Multivariate methods). s.l., s.e. p. 425-440.

Mejía, M.D. & Ángeles, G.M. (2014). Comunidades de líquenes como bioindicadores de la contaminación partes alta , media y baja de la cuenca del Santa-Ancash, 2012-2014. s.l., Universidad Nacional Santiago Antúnez De Mayolo. 1-139 p.

Mercado-Díaz, J.A.; Gould, W.A.; González, G. & Lücking, R. (2015). Lichens in Puerto Rico: An Ecosystem Approach (en línea). San Juan, Puerto Rico, s.e. Disponible en https://data.fs.usda.gov/research/pubs/iitf/IITF_GTR_46.pdf.

Ministerio del Ambiente -MINAM. (2017). Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para Suelo (en línea). *El Peruano*. . Perú, s.e. 12-15. p. Recuperado de http://www.minam.gob.pe/wp-content/uploads/2017/12/DS_011-2017-MINAM.pdf.

Monaci, F.; Fantozzi, F.; Figueroa, R.; Parra, O. & Bargagli, R. (2012). Baseline element composition of foliose and fruticose lichens along the steep climatic gradient of SW

Patagonia (Aisén Region, Chile). Journal of Environmental Monitoring 14(9):2309-2316. DOI: https://doi.org/10.1039/c2em30246b.

Moreno, E.; Sánchez, Á. & Hernández, J. (2007). Guía Ilustrada de Hongos Liquenizados de Venezuela. Caracas, s.e.

Nash III, T. (1996). Introduction. Cambridge, s.e. p. 1-7._____. (1996). Nutrients , elemental accumulation , and mineral cycling (en línea). s.l., Cambridge University Press. p. 234-251. Disponible en https://doi.org/10.1017/CBO9780511790478.013.

Nash III, T.H. & Gries, C. (1995). The use of lichens in atmospheric deposition studies with an emphasis on the Arctic. The Science of the Total Environment 160-161:729-736. DOI: https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0048-9697(95)04406-Q.

Nash, T.H. (1989). Metal Tolerance in Lichens. *In Shaw, J (ed.)*. Florida, United States, CRC Press. p. 268.

Nash, T.H. (2008). Lichen sensitivity to air pollution. Lichen Biology, Second Edition . DOI: https://doi.org/10.1017/CBO9780511790478.016.

Nieboer, E.; Puckett, K.J. & Grace, B. (1976). The uptake of nickel by *Umbilicaria muhlenbergii* : a physicochemical process . Canadian Journal of Botany 54(8):724-733. DOI: https://doi.org/10.1139/b76-078.

Nieboer, E. & Richardson, D.H.S. (1980). The replacement of the nondescript term «Heavy Metals» by a biologically and chemically significant classification of Metal Ions. Environmental Pollution 1:3-26. DOI: https://doi.org/10.1016/0143-148X(80)90017-8.

Nieboer, E.; Richardson, D.H.S. & Tomassini, F.D. (1978). Mineral Uptake and Release by Lichens : An Overview (en línea). Bryologist 81(2):226-246. DOI: https://doi.org/10.2307/3242185.

Nimis, P.L.; Scheidegger, C. & Wolseley, P.A. (2002). Monitoring with Lichens - Monitoring Lichens. Volumen 7. Nimis, PL; Scheidegger, C; Wolseley, PA (eds.). Wales, United Kingdon, Springer Science & Business Media, 2012. 1-408 p. DOI: https://doi.org/10.1007/978-94-010-0423-7.

Oksanen, I. (2006). Ecological and biotechnological aspects of lichens. Applied Microbiology and Biotechnology 73(4):723-734. DOI: https://doi.org/10.1007/s00253-006-0611-3

Pereira, I.; Tapia, J.; Errázuriz, I. & Basualto, S. (2018). Comparative study of the presence of heavy metals utilizing epiphytic corticolous lichens in Talca city, Maule Region, Chile. Gayana. Botánica 75(1):494-500. DOI: https://doi.org/10.4067/s0717-66432018000100494.

Poblet, A.; Andradeb, S.; Scagliola, M.; Vodopivezd, C.; Curtosid, A.; Puccib, A. & Marcovecchioa, J. (1997). The use of epilithic Antarctic lichens (*Usnea aurantiacoatra* and *U. antartica*) to determine deposition patterns of heavy metals in the Shetland Islands , Antarctica. The Science of the Total Environment 207:187-194.

Pomas; W. & Alcántara; G.H. (2012). Estudio de suelos y capacidad de uso mayor de las tierras departamento de Cajamarca. (en línea). s.l., s.e. Disponible en http://geoservidorperu.minam.gob.pe/geoservidor/Archivos/Mapa/Cajamarca/Memoria_Descriptiva_Suelos_CUM.pdf.

Ramírez-Morán, N.A.; León-Gómez, M. & Lücking, R. (2016). Uso de biotipos de líquenes como bioindicadores de perturbación en fragmentos de bosque Altoandino (Reserva Biológica “Encenilo”, Colombia). Caldasia 38(1):31-52. DOI: https://doi.org/10.15446/caldasia.v38n1.57821.

Ramírez, Á. & Cano, A. (2005). Líquenes de Pueblo Libre, una localidad andina en la Cordillera Negra (Huaylas, Ancash, Perú). Revista Peruana de Biologia 12(3):383-396.

Ramírez, Á. & Valencia, N. (2020). Liquenobiota saxícola del nevado Pastoruri (Áncash , Perú). Revista peruana de biología 27(2):543-552. DOI: https://doi.org/http://dx.doi.org/10.15381/rpb.v27i4.19205

Ramos Aranibar, D.F. (2012). Diversidad y Distribución de Líquenes en El Parque Nacional Cerros De Amotape Tumbes-Perú Setiembre – Diciembre, 2009. s.l., Universidad Nacional de San Agustín Arequipa. 1-124 p.

Ramos, D. (2014). Lista de especies de líquenes y hongos liquenícolas del Perú – Checklist of lichens and lichenicolous fungi of Peru. Glalia 6(2):1-49.

Ramos, D.; Ramírez, Á.; Quipuscoa, V.; Durand, K. & Huallpa, J. (2013). Diversity of lichens in Tuctumpamya, Pocsi District, Arequipa, Peru. Arnaldoa : revista del Herbario HAO 20(1):129-154.

Richardson, D.H.S. (1995). Metal uptake in lichens. Symbiosis 18(2):119-127.

Richardson, D.H.S.; Kiang, S.; Ahmadjianb, V. & Nieboer, E. (1985). Lead and uranium uptake by lichens. Lichen Physiology and Cell Biology :227-246.

Richardson, D.H.S. & Nieboer, E. (1981). Lichens and pollution monitoring. Endeavour 5(3):127-133. DOI: https://doi.org/10.1016/0160-9327(81)90045-4.

Riget, F.; Asmund, G. & Aastrup, P. (2000). The use of lichen (*Cetraria nivalis*) and moss (Rhacomitrium lanuginosum) as monitors for atmospheric deposition in Greenland. The Science of the Total Environment 245:137-148.

Rivera, M.; Catan, S.; Fonzo, C.; Dopchiz, L. & Arribere, M. (2018). Lichen as biomonitor of atmospheric elemental composition from Potter Peninsula, 25 de Mayo (King George) Island, Antarctica. Annals of Marine Science 2(1):009-015. DOI: https://doi.org/10.17352/ams.000009.

Rusu, A.M. (2002). Sample preparation of lichens for elemental analysis. 3400 Cluj-Napoca, Romania, s.e.

Seaward, M.R.D. (1993). Lichens and Sulphur Dioxide Air Pollution: Field Studies (en línea, sitio web). Recuperado de www.jstor.org/stable/envirevi.1.2.732.

SERNANP. (2011). Parque Nacional Huascarán, Plan Maestro 2010-2015. s.l., s.e.

Shotyk, W.; Zheng, J.; Krachler, M.; Zdanowicz, C.; Koerner, R. & Fisher, D. (2005). Predominance of industrial Pb in recent snow (1994 – 2004) and ice (1842 – 1996) from Devon Island , Arctic Canada. Geophysical Research Letters 32:1-4. DOI: https://doi.org/10.1029/2005GL023860.

Shukla, V.; Patel, D.K.; Upreti, D.K.; Yunus, M. & Prasad, S. (2013). A comparison of metallic contents in lichen *Pyxine subcinerea*, its substratum and soil. International Journal of Environmental Science and Technology 10(1):37-46. DOI: https://doi.org/10.1007/s13762-012-0075-1.

Sigal, L.L. & Johnston, W. (1986). Effects of simulated acidic rain on one species each of *Pseudoparmelia*, *Usnea*, and *Umbilicaria*. Water Air & Soil Pollution 27:315-322.

Signoret, J. (2018). Etude de la qualité de l'air en Lorraine-Nord par les lichens : contribution en tant que bioindicateurs écologiques , bioaccumulateurs d ' éléments chimiques et biomarqueurs du stress oxydant. s.l., Université de Metz. 1-150 p.

Sipman, H. (2005). Identification Key and Literature Guide to the Genera of Lichenized Fungi (Lichens) in the Neotropics (en línea, sitio web). Consultado 7 oct. 2019. Disponible en https://archive.bgbm.org/sipman/keys/neokeyA.htm.

Spribille, T.; Tuovinen, V.; Resl, P.; Vanderpool, D.; Wolinski, H.; Aime, M.C.; Schneider, K.; Stabentheimer, E.; Toome-Heller, M.; Thor, G.; Mayrhofer, H.; Johannesson, H. & McCutcheon, J.P. (2016). Basidiomycete yeasts in the cortex of ascomycete macrolichens. *Science*. 353(6298):488-492. DOI: https://doi.org/10.1126/science.aaf8287.

Thell, A.; Crespo, A.; Divakar, P.K.; Kärnefelt, I.; Leavitt, S.D.; Lumbsch, H.T. & Seaward, M.R.D. (2012). A review of the lichen family Parmeliaceae - history, phylogeny and current taxonomy. Nordic Journal of Botany 30(6):641-664. DOI: https://doi.org/10.1111/j.1756-1051.2012.00008.x.

Tucker, J.A. (2003). Digestion of Epiphytic Lichens for Analysis by ICP-MS, as applied to monitoring atmospheric heavy metals. s.l., University of Newfoundland. DOI: https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004.

Tuominen, Y. & Jaakkola, T. (1973). Absorption and Accumulation of Mineral Elements and Radioactive Nuclides (en línea). s.l., ACADEMIC PRESS, INC. 185-223 p. DOI: https://doi.org/10.1016/b978-0-12-044950-7.50011-8.

Untiveros, M. (2011). Balance hídrico de la laguna Parón, herramienta para la gestión integrada de los recursos hídricos (GIRH) en la cuenca del río Santa. s.l., Pontificia Universidad Católica del Perú. 1-101 p.

Valdivia, D. & Ramírez, Á. (2018). Uso de líquenes como bioindicadores de contaminación atmosférica en el pasivo ambiental minero Santo Toribio, Áncash, Perú. The Biologist 16(1):77-95.

Vieira, B.J.; Freitas, M.C.; Rodrigues, A.F.; Pacheco, A.M.G.; Soares, P.M. & Correia, N. (2004). Element-Enrichment Factors in Lichens from Terceira , Santa Maria and Madeira Islands (Azores and Madeira Archipelagoes). Journal of Atmospheric Chemistry 49:231-249.

Vitarana, M.C. (2013). Lichens as a biomonitoring tool for detecting heavy metal air pollution associated with industrial activities in Collie, southwestern Australia (en línea). s.l., Edith Cowan University. 202 p. DOI: https://doi.org/10.1057/978-1-

349-95988-4_335.

von Arb, C., Mueller, C., Ammann, K., & Brunold, C. (1990). Lichen physiology and air pollution: II. Statistical analysis of the correlation between SO2, NO2, NO and O3, and chlorophyll content, net photosynthesis, sulphate uptake and protein synthesis of Parmelia sulcata Taylor. New Phytologist, 115(3), 431-437. DOI: https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1990.tb00468.x.

Wallis, L.K. (2016). Spatial Variability of Snow Chemistry of High Altitude Glaciers in the Peruvian Andes. s.l., Western Washington University. 1-52 p.

Walther, D.A.; Ramelow, G.J. & Beck, J.N. (1990). Temporal changes in metal levels of the lichens (en línea). Water Air & Soil Pollution 53:189-200. Disponible en http://medcontent.metapress.com/index/A65RM03P4874243N.pdf.

Węgrzyn, M.; Wietrzyk, P.; Lisowska, M.; Klimek, B. & Nicia, P. (2016). What influences heavy metals accumulation in arctic lichen *Cetrariella delisei* in Svalbard? DOI: https://doi.org/10.1016/j.polar.2016.10.002.

Wilson, J.J., Reyes, L. & Garayar, J. (1967). Geología de los Cuadrángulos de Mollebamba, Tayabamba, Huaylas, Pomabamba, Carhuaz y Huari (en línea). Lima-Perú, s.e. Disponible en https://repositorio.ingemmet.gob.pe/handle/20.500.12544/133.

Wolff, E.W. & Suttie, E.D. (1994). Antarctic snow record of southern hemisphere lead pollution. Geophysical Research Letters 21(9):781-784. DOI: https://doi.org/10.1029/94GL00656.

Wolff, E.W.; Suttie, E.D. & Peel, D.A. (1999). Antarctic snow record of cadmium, copper, and zinc content during the twentieth century. Atmospheric Environment 33(10):1535-1541. DOI: https://doi.org/10.1016/S1352-2310(98)00276-3.

Yildiz, A.; Aksoy, A.; Tug, G.N.; Islek, C. & Demirezen, D. (2008). Biomonitoring of heavy metals by *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf in Ankara (Turkey). Journal of Atmospheric Chemistry 60(1):71-81. DOI: https://doi.org/10.1007/s10874-008-9109-y.

Zaiontz, C. (2020). Testing Two Factor ANOVA Assumptions (en línea, sitio web). Consultado 15 ene. 2021. Disponible en https://www.real-statistics.com/two-way-anova/testing-two-factor-anova-assumptions/.

Zvěřina, O.; Láska, K.; Červenka, R.; Kuta, J.; Coufalík, P. & Komárek, J. (2014). Analysis

of mercury and other heavy metals accumulated in lichen *Usnea antarctica* from James Ross Island, Antarctica. Environmental Monitoring and Assessment 186(12):9089-9100. DOI: https://doi.org/10.1007/s10661-014-4068-z.

VIII. ANEXOS

Anexo 1: Registro taxonómico para las especies de líquenes registrados por sitio de estudio

Lista taxonómica para el sitio de Parón de arriba				
Biotipo	Familia	Hábito	Especie	Nro. de registros
Crustoso	Graphidaceae	Muscícola	*Diploschistes muscorum*	4
Folioso	Lobariaceae	Cortícola	*Sticta weigelii*	3
Folioso	Parmeliaceae	Saxícola	*Cetrelia* sp1	4
Folioso	Parmeliaceae	Saxícola	*Hypotrachyna* sp1	1
Folioso	Parmeliaceae	Saxícola	*Parmotrema* sp1	4
Folioso	Parmeliaceae	Cortícola	*Parmotrema* sp2	3
Folioso	Parmeliaceae	Saxícola	*Parmotrema* sp3	1
Folioso	Parmeliaceae	Saxícola	*Psiloparmelia* sp1	2
Fruticoso	Parmeliaceae	Cortícola	*Usnea* sp1	21
Fruticoso	Parmeliaceae	Saxícola	*Usnea* sp2	8
Total de registros				51
Nro. de especies				10

Lista taxonómica para el sitio de Parón abajo				
Biotipo	Familia	Hábito	Especie	Nro. de registros
Dimórficas	Cladoniaceae	Muscícola	*Cladonia ramuloso*	1
Dimórficas	Cladoniaceae	Muscícola	*Cladonia rappi*	4
Folioso	Parmeliaceae	Saxícola	*Cetrelia sp1*	1
Folioso	Parmeliaceae	Muscícola	*Everniastrum sp1*	1
Folioso	Parmeliaceae	Muscícola	*Everniopsis trulla*	5
Folioso	Parmeliaceae	Cortícola	*Hypotrachyna* sp2	1
Folioso	Parmeliaceae	Saxícola	*Parmelia* sp1	1
Folioso	Parmeliaceae	Saxícola	*Parmotrema* sp1	1
Folioso	Parmeliaceae	Saxícola	*Parmotrema* sp3	1
Folioso	Parmeliaceae	Muscícola	*Pseudevernia*	1
Folioso	Parmeliaceae	Saxícola	*Psiloparmelia* sp2	1
Fruticoso	Parmeliaceae	Cortícola	*Usnea* sp1	4
Fruticoso	Parmeliaceae	Saxícola	*Usnea* sp2	1
Folioso	Peltigeraceae	Muscícola	*Peltigera soredians*	4
Folioso	Physciaceae	Cortícola	*Heterodermia* sp1	1
Dimórficas	Stereocaulaceae	Muscícola	*Stereocaulon vesuvianum*	1
Folioso	Umbilicariaceae	Saxícola	*Umbilicaria* sp1	1
Total de registros				30
Nro. de especies				17

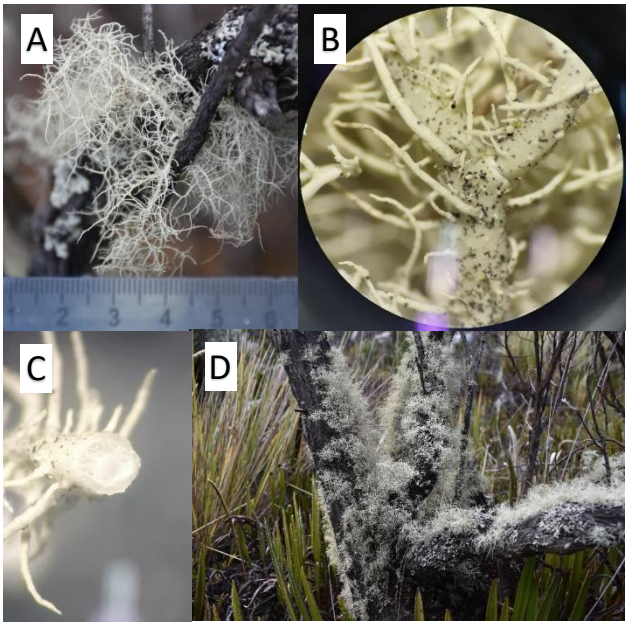
Lista taxonómica para el sitio de Querococha arriba				
Biotipo	Familia	Hábito	Especie	Nro. de registros
Crustoso	Lecanoraceae	Saxícola	*Lecanora* sp1	2
Folioso	Lobariaceae	Cortícola	*Sticta weigelii*	2
Crustoso	Ochrolechiaceae	Saxícola	*Ochrolechia* sp1	1
Folioso	Pannariaceae	Cortícola	*Erioderma peruvianum*	1
Crustoso	Pannariaceae	Saxícola	*Parmeliella sp1*	1
Folioso	Parmeliaceae	Saxícola	*Flavopunctelia* sp1	2
Folioso	Parmeliaceae	Saxícola	*Hypogymnia* sp1	1
Folioso	Parmeliaceae	Saxícola	*Hypotrachyna* sp1	1
Folioso	Parmeliaceae	Cortícola	*Hypotrachyna* sp2	1
Folioso	Parmeliaceae	Cortícola	*Parmelinopsis sp1*	3
Folioso	Parmeliaceae	Saxícola	*Parmotrema* sp1	2
Folioso	Parmeliaceae	Cortícola	*Parmotrema* sp2	1
Folioso	Parmeliaceae	Saxícola	*Parmotrema* sp4	1
Folioso	Parmeliaceae	Muscícola	*Parmotrema* sp5	1
Folioso	Parmeliaceae	Saxícola	*Psiloparmelia* sp2	1
Fruticoso	Parmeliaceae	Cortícola	*Usnea* sp1	7
Folioso	Peltigeraceae	Muscícola	*Peltigera* sp2	1
Folioso	Peltigeraceae	Muscícola	*Peltigera* sp3	1
Folioso	Umbilicariaceae	Saxícola	*Umbilicaria* sp1	1
Fruticoso	Parmeliaceae	Saxícola	*Usnea* sp2	6
Total de registros				37
Nro. de especies				20

Anexo 2: Fichas de caracteres taxonómicos de los líquenes seleccionados para el estudio de biomonitoreo de metales pesados.

***Usnea* sp1**

Talo fruticoso, cortícola de corteza de arbustos. **Base** color negro de 1-2 mm. **Ramificación** dicótoma, anisotómica y muy densamente ramificado. **Ramas principales** cilíndricas, de color amarillo muy claro. **Ramas secundarias** constreñidas en los puntos de inserción con ramificaciones de 2-4 cm de largo, también de color amarillo muy claro, cilíndricas, delgadas (aprox. 0.5 mm de diámetro). **Papilas** con protuberancias coraloides, frecuentemente coloreados de negro. **Fibrillas** frecuentes, irregularmente repartidas a lo largo de todo el talo. **Soralios** con apariencia harinosa blanquecina, situados sobre las ramas laterales, terminales y las fibrillas, llegando a cubrir la totalidad de sus ápices. **Isidiomorfos** ausentes. **Apotecios** ausentes. **Características de su sección transversal: Eje central** sólido, denso, delgado (%A=22.8, <30%), **Córtex:** denso y grueso (%C=12.28, >10%), **Médula** heterogénea con una capa delgada y densa contigua al córtex y otra más ancha laxa en contacto con el eje central. Ambas capas de color blanco y sin pigmentación. Moderadamente gruesa (M=%26.3, 23-28%). La relación entre el "% del grosor del eje central / % del grosor de la médula" o relación A/M fue de 0.86, (<1.3).

Reacciones químicas: K+ (color amarillo tenue), C-, KC-, I-.

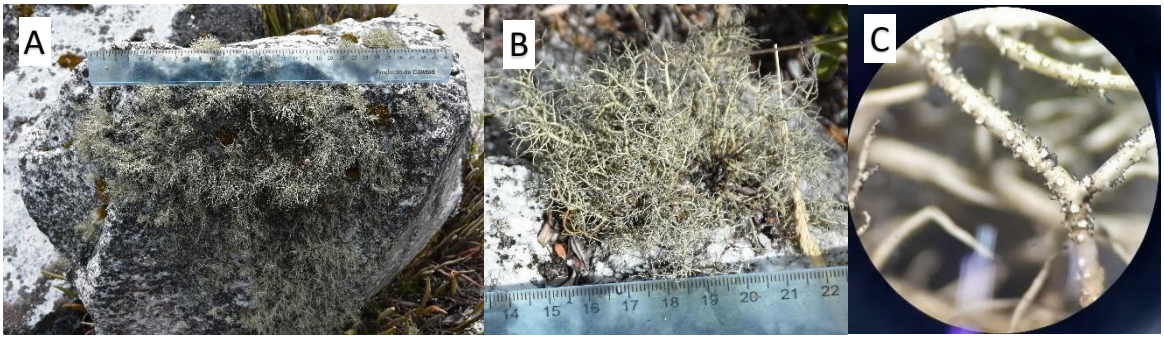


Figura**—*Usnea* sp1.** A, Aspecto general del talo. B, Detalle de ramas primarias, ramas secundarias constreñidas en los puntos de inserción; y múltiples fibrillas insertas en ambas ramas; C, Detalle corte transversal, donde se diferencia el eje central, la médula y la corteza; D, Vista de su hábito cortícola en arbustos.

***Usnea* sp2**

Talo fruticoso, saxícola. **Ramificación** dicótoma, anisotómica y muy densamente ramificado. **Ramas principales** cilíndricas, de color amarillo verdoso. **Ramas secundarias** no constreñidas en los puntos de inserción, con ramificaciones de 4-6 cm de largo, también de colores amarillo verdoso y cilíndricos de aprox. 1 mm de diámetro. **Papilas** ausentes. **Fibrillas** frecuentes, repartidas a lo largo de todo el talo con puntas negras. **Soralios** punctiformes color blanco. **Isidiomorfos** frecuentemente

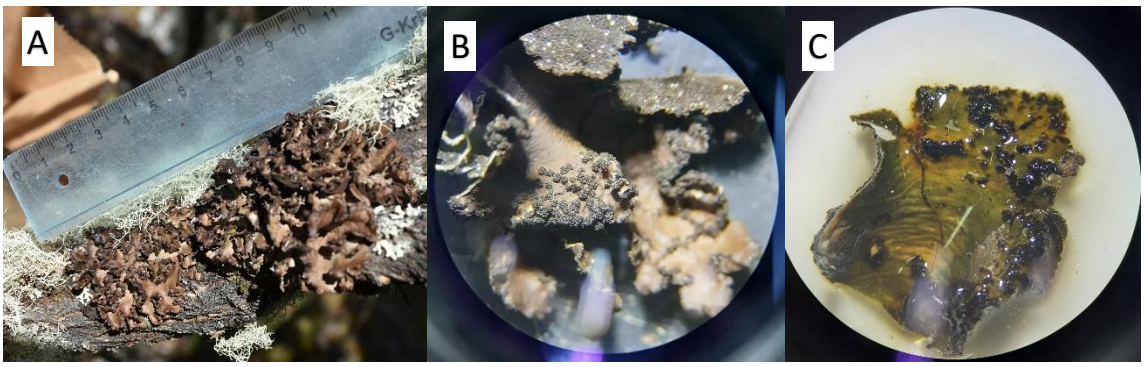
con puntas negras originados desde los soralios. **Apotecios** ausentes. **Reacciones químicas:** K+ (color amarillo naranja tenue), C-.



Figura—***Usnea* sp2.** A, Hábito saxícola. B, Aspecto general del talo; C, Detalle de una rama secundaria, con numerosos soralios punctiformes del cual emergen isidiomorfos de color negro.

Sticta aff. *weigelii* (Ach.) Vain

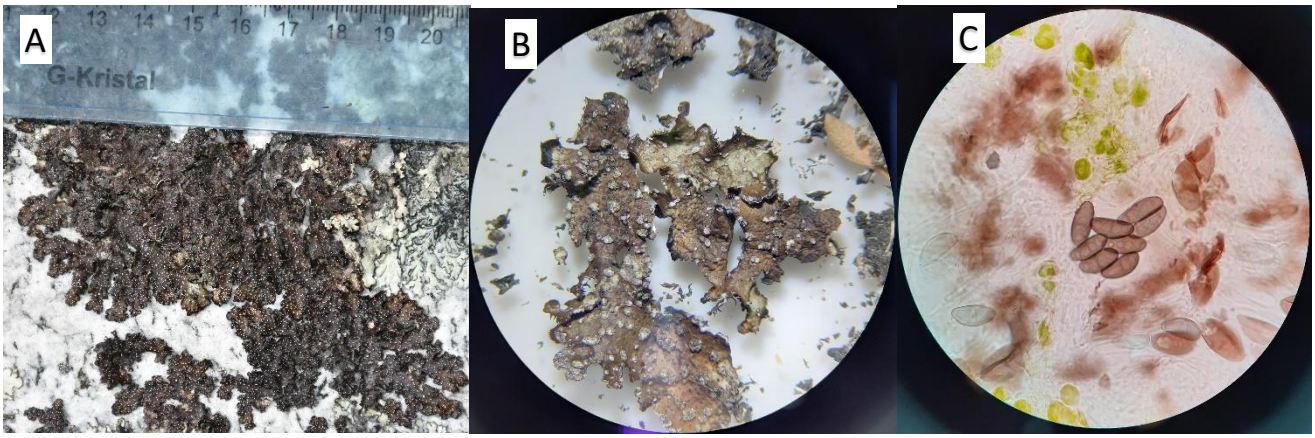
Talo folioso, cortícola. También observado con hábito saxícola**. Fotobionte primario** Cianobacteria. **Pedúnculo** ausente. **Características del Talo** irregular, hasta 10 cm de longitud, medianamente ramificado, ramificación anisotómica o politómica. **Lóbulos** ascendentes, coriáceos, con los ápices involutos (doblados hacia adelante mostrando la corteza inferior). **Superficie superior** lisa, de color verde oscuro al humedecerse en agua; superficie glabra (lampiña), sin papilas. **Cilios** ausentes. **Apotecios** no observados. **Propágulos vegetativos** presentes, abundantes, en forma de isidios, principalmente marginales, coraloides, verticales de 0.2-2 mm de largo y 0.2-2 mm de ancho, de color marrón negruzco. **Médula** compacta, de color blanco. **Superficie inferior** lisa, marrón oscuro. **Tomento principal** denso hasta el margen, pubescente. **Cifelas** abundantes, 41-60 por cm^2 en los márgenes, dispersa, redondeadas, de color beige. **Reacciones químicas:** K+ (color amarillo en la superficie superior y coloración roja en la médula), C-.



Figura— ***Sticta* aff. *weigelii*.** A, Vista dorsal del talo, sobre corteza de arbusto. B, Al centro de la imagen, detalle isidios laminares y marginales; en la parte de arriba de la imagen, vista de la superficie inferior cubierta de tomento negro con presencia de cifelas; C, Coloración verde, amarillento con pigmentación roja en la médula, luego de aplicarse KOH.

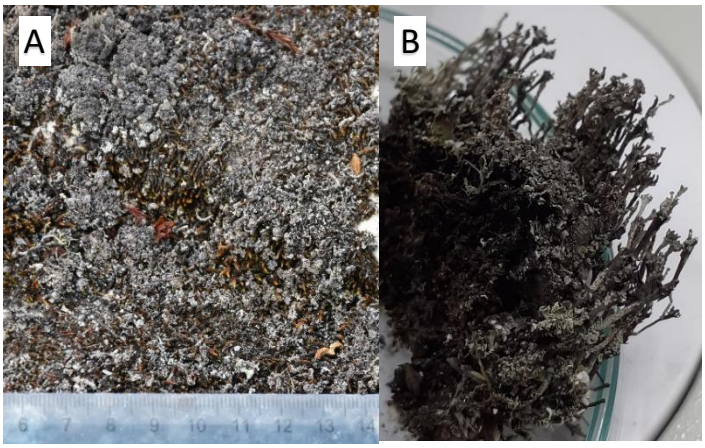
Anexo 3: Álbum de fotos de las especies de líquenes registrados en los sitios de estudio (Excepto *Usnea* sp1, *Usnea* sp2 y *Sticta weigelii*, mostradas en el Anexo anterior)

***Cetrelia* sp1**



Figura—***Cetrelia* sp1.** A, Hábito saxícola. B, Vista dorsal del talo, detalle pseudocifelas y soredios en su superficie superior. C, Vista en el microscopio (100X) de sus ascosporas.

Cladonia ramuloso

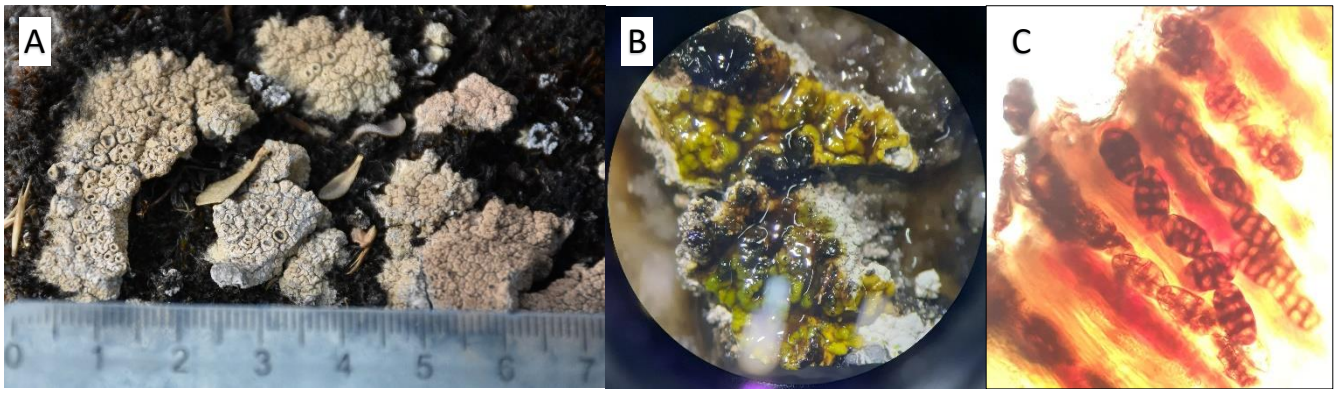


Figura—***Cladonia ramuloso***. A, Hábito Muscícola. B, Aspecto general del talo.

Cladonia rappi

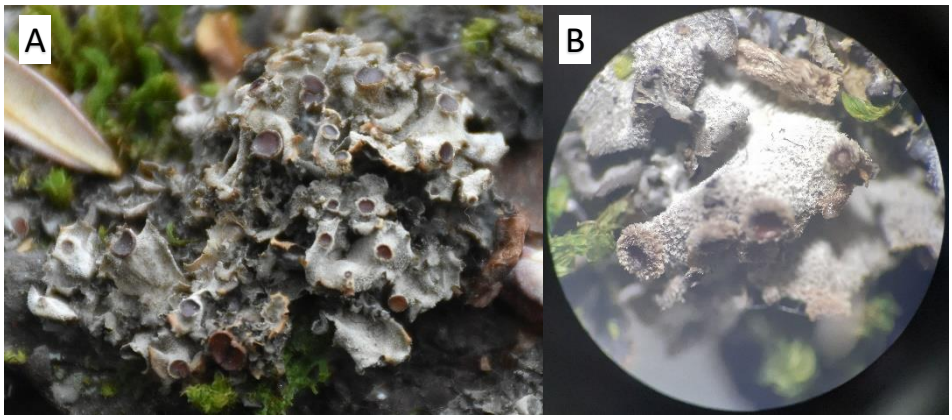
Figura—***Cladonia rappi.*** Hábito muscícola y aspecto general del talo

Diploschistes muscorum



Figura— ***Diploschistes muscorum***. A, Hábito Muscícola. B, Reacción K+ (amarillo intenso).C, Vista microscópica 100X de sus ascosporas semimuriformes.

Erioderma peruvianum



Figura— ***Erioderma peruvianum***. A, Hábito cortícola. B, Detalle apotecios laminares y marginales.

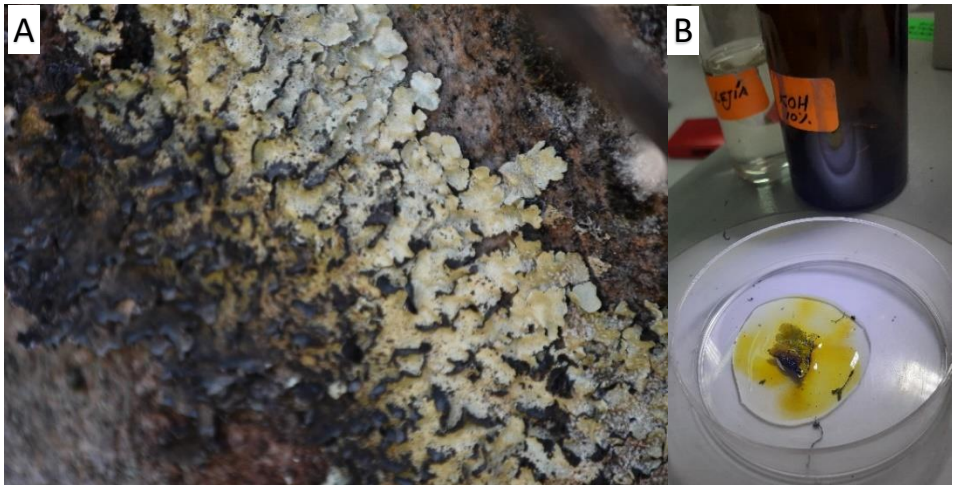
***Everniastrum* sp1**

Figura—***Everniastrum* sp1.** Hábito muscícola y aspecto general del talo color blanco

Everniopsis trulla

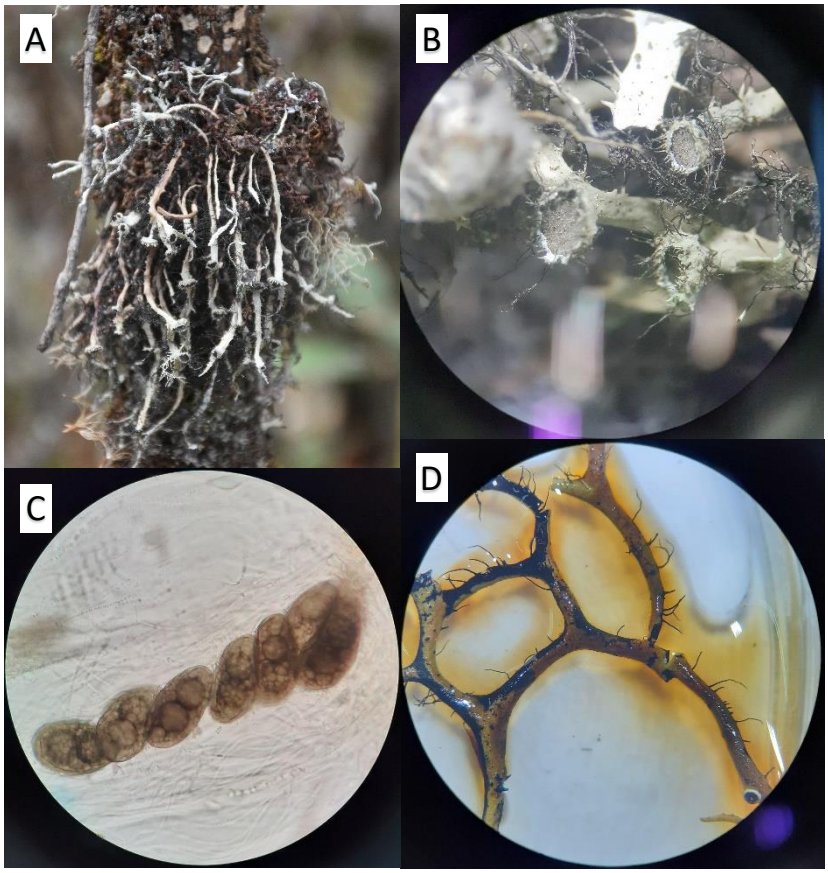
Figura—***Everniopsis trulla.*** Hábito muscícola y aspecto general del talo

***Flavopunctelia* sp1**



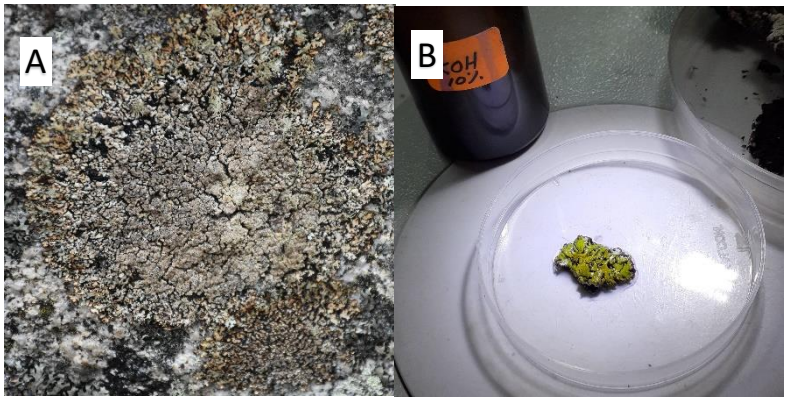
Figura— ***Flavopunctelia* sp1**. A, Hábito saxícola y aspecto general del talo. B, Reacción KC+ (amarillo anaranjado).

Heterodermia fertilis



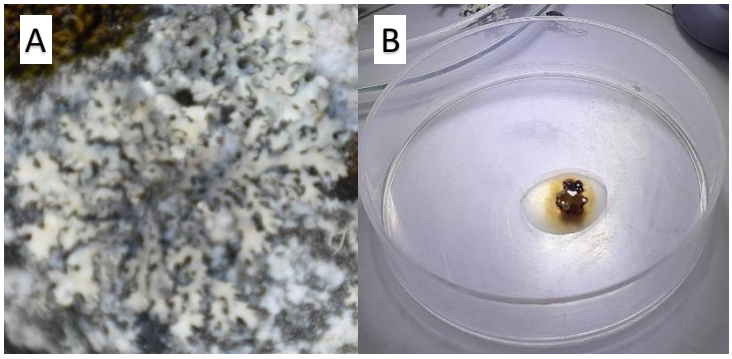
Figura—***Heterodermia fertilis***. A, Vista general del talo y su hábito cortícola. B, Vista de sus apotecios. C, Vista al microscopio (100X) de sus ascosporas simples. D, Reacción K+ amarillo anaranjado en el talo.

***Hypogymnia* sp1**



Figura—***Hypogymnia* sp1.** A, Vista general del talo y su hábito saxícola. B, Reacción K+ (amarillo verdoso).

***Hypotrachyna* sp1**

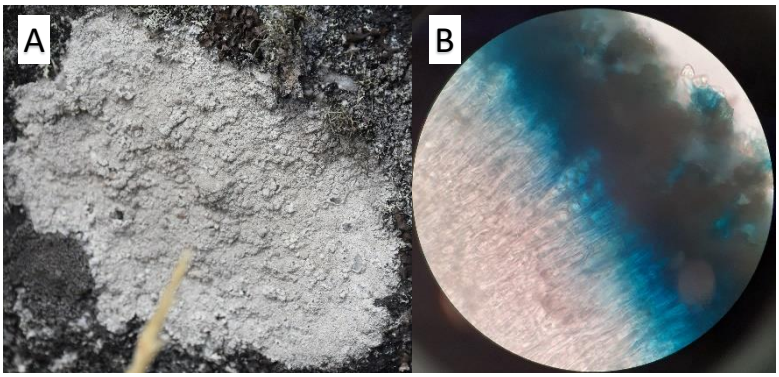


Figura—***Hypotrachyna* sp1.** A, Vista general del talo y su hábito saxícola. B, Reacción K+ (amarillo anaranjado).

***Hypotrachyna* sp2**

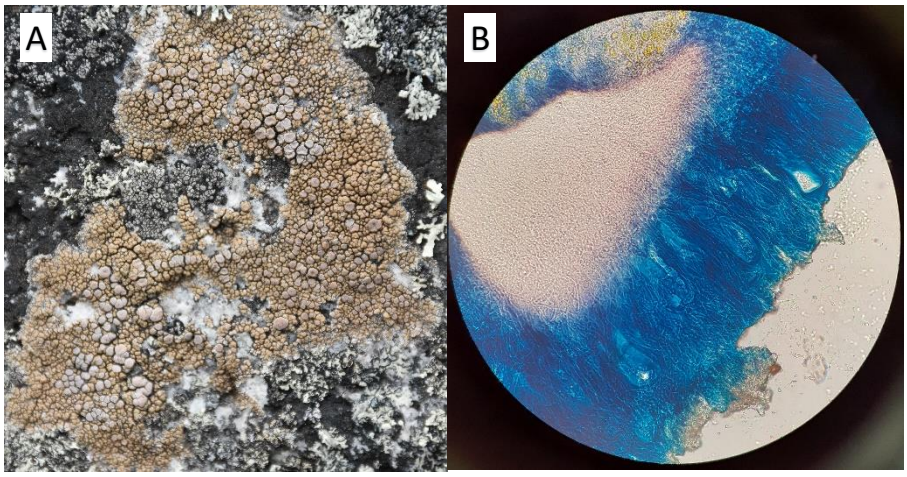
Figura— ***Hypotrachyna* sp2.** Hábito cortícola y aspecto general del talo.

***Lecanora* sp1**



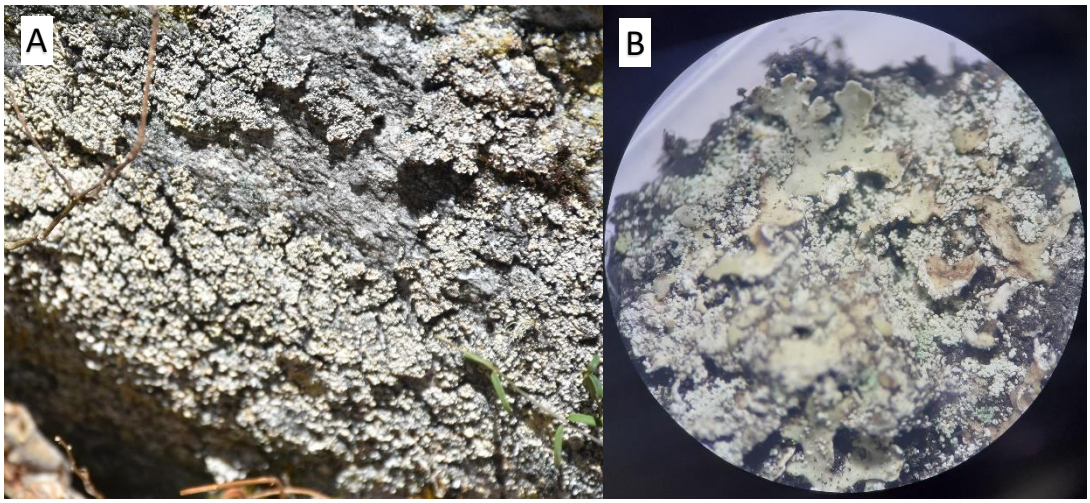
Figura— ***Lecanora* sp1**. A, Hábito saxícola y forma general de talo crustoso. B, Reacción al lugol, coloración azul de los ascos (sacos que contienen a las ascosporas), vista 100X.

***Ochrolechia* sp1**



Figura—***Ochrolechia* sp1.** A, Vista general del talo crustoso y de hábito saxícola. B, Reacción al lugol, coloración azul de los ascos. Vista 100X.

***Parmeliella* sp1**

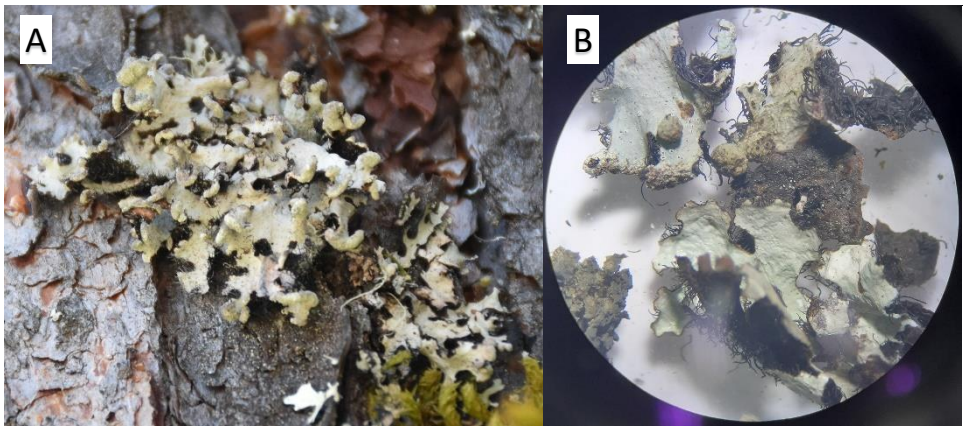


Figura— ***Parmeliella* sp1**. A, Hábito saxícola. B, Vista general de su talo semicrustoso.

***Parmelia* sp1**

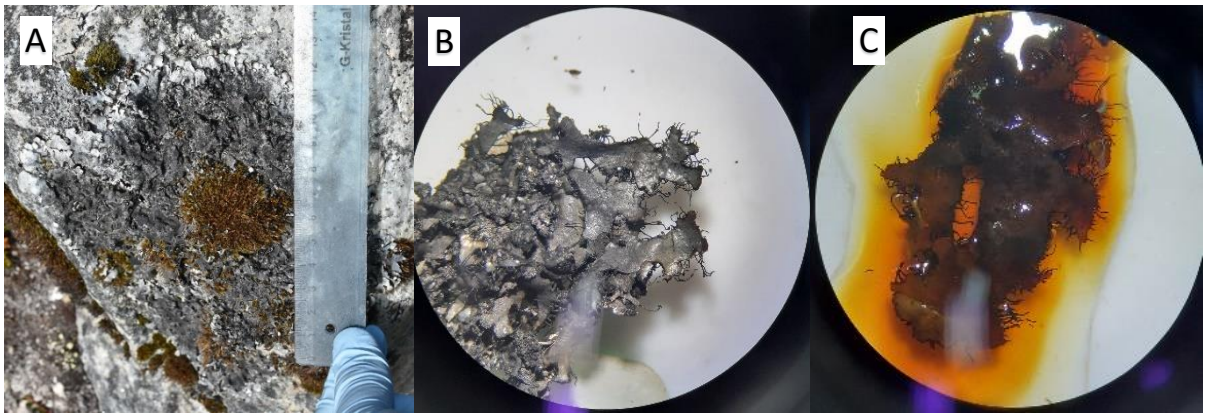
Figura—***Parmelia* sp1.** A, Hábito saxícola. Vista general del talo crustoso y de sus apotecios característicos de este género.

***Parmelinopsis* sp1**



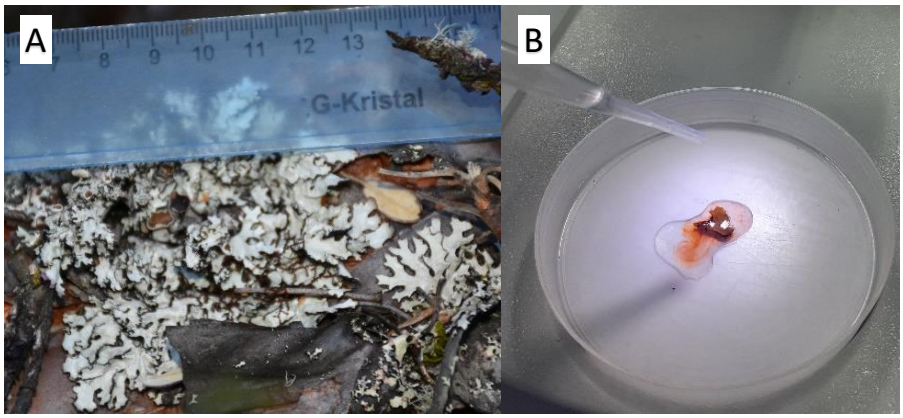
Figura—***Parmelinopsis* sp1.** A, Vista general del talo folioso. B, Detalle superficie superior, con presencia de soredia capitata laminar y en los márgenes del talo. Superficie inferior con presencia de cilios largos negros.

***Parmotrema* sp1**



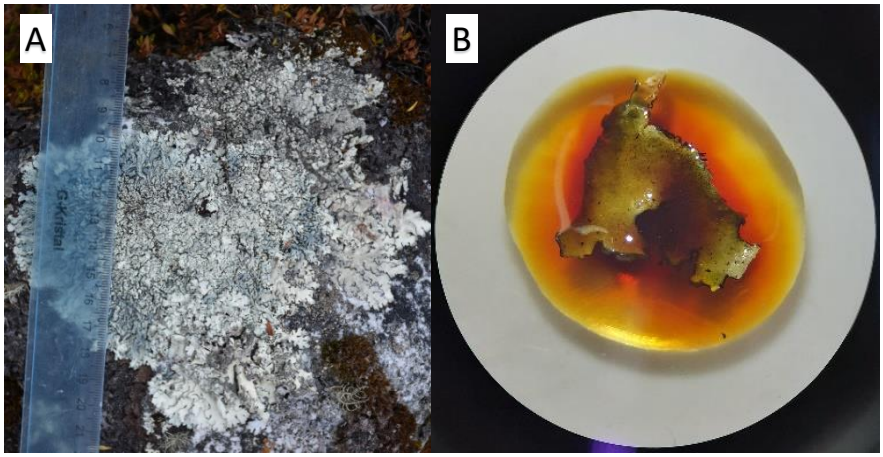
Figura— ***Parmotrema* sp1**. A, Hábito saxícola. B, Vista general de la superficie superior del talo folioso. C, Reacción K+ (amarillo anaranjado).

***Parmotrema* sp2**



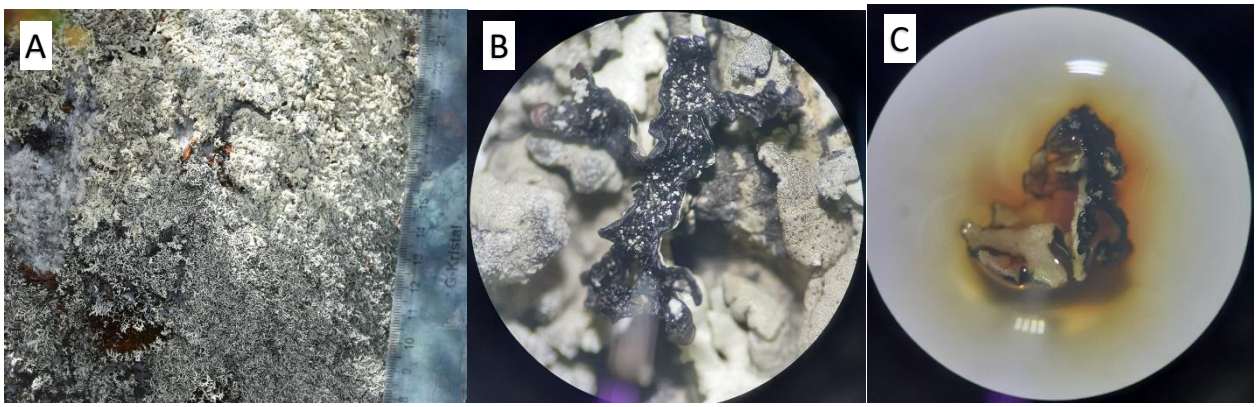
Figura—***Parmotrema* sp2.** A, Vista general del talo y su hábito cortícola. B, Reacción KC+ (rojo anaranjado).

***Parmotrema* sp3**



Figura—***Parmotrema* sp3.** A, Vista general del talo y su hábito saxícola. B, Reacción K+ (amarillo anaranjado).

***Parmotrema* sp4**



Figura— ***Parmotrema* sp4**. A, Hábito saxícola. B, Vista general de la superficie superior e inferior (aspecto negruzco) del talo folioso. C, Reacción KC+ (anaranjado).

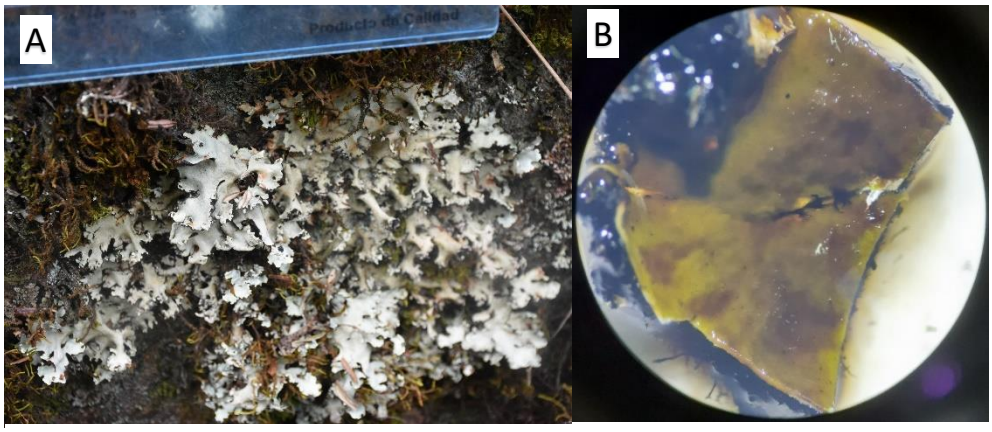
***Parmotrema* sp5**

Figura—***Parmotrema* sp5.** A, Hábito muscícola. Vista general del talo.

***Peltigera* sp3**

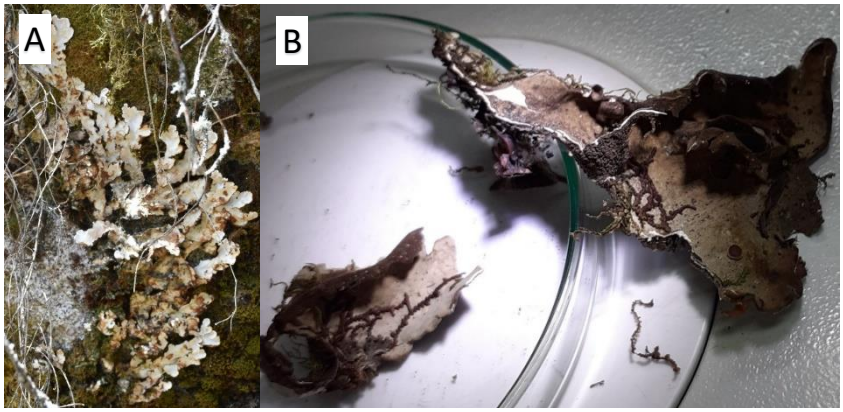
Figura—***Peltigera* sp3.** A, Hábito muscícola. Vista general del talo.

Peltigera soredians



Figura—***Peltigera soredians*.** A, Vista general del talo y su hábito muscícola. B, Reacción K+ (amarillo).

***Peltigera* sp2**



Figura—***Peltigera* sp2.** A, Hábito muscícola. B, Vista general del talo y superficie inferior con tomento en forma de vena

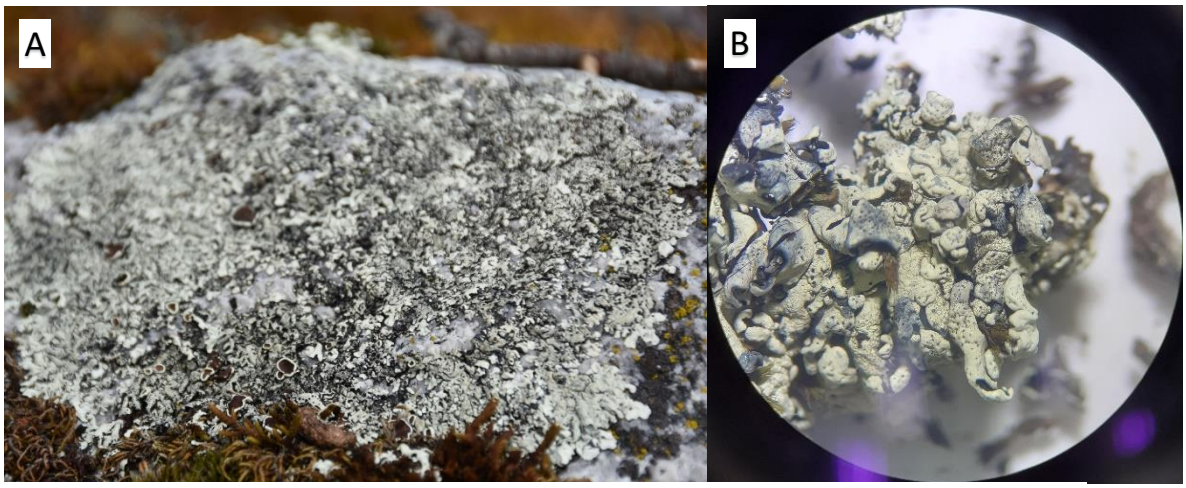
***Pseudevernia* sp1**

Figura—***Pseudevernia* sp1.** Vista general del talo y su hábito muscícola.

***Psiloparmelia* sp1**

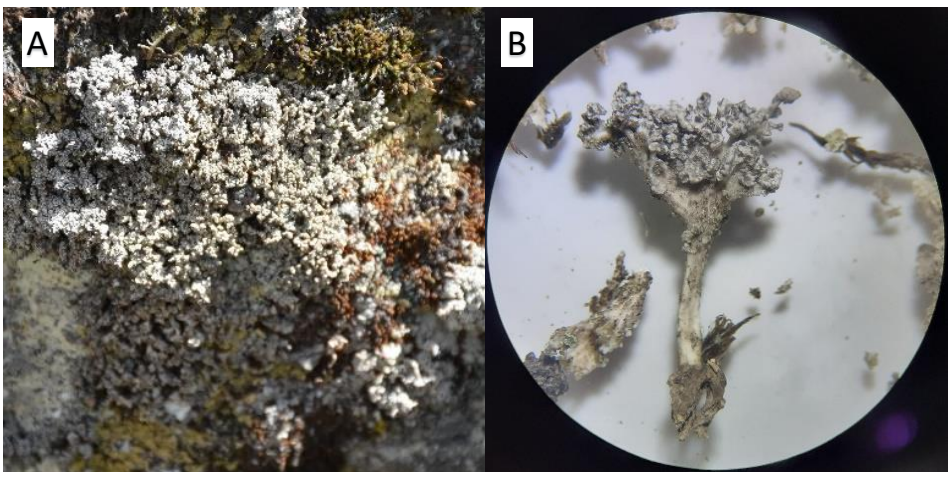
Figura—***Psiloparmelia* sp1.** Vista general del talo y su hábito saxícola.

***Psiloparmelia* sp2**



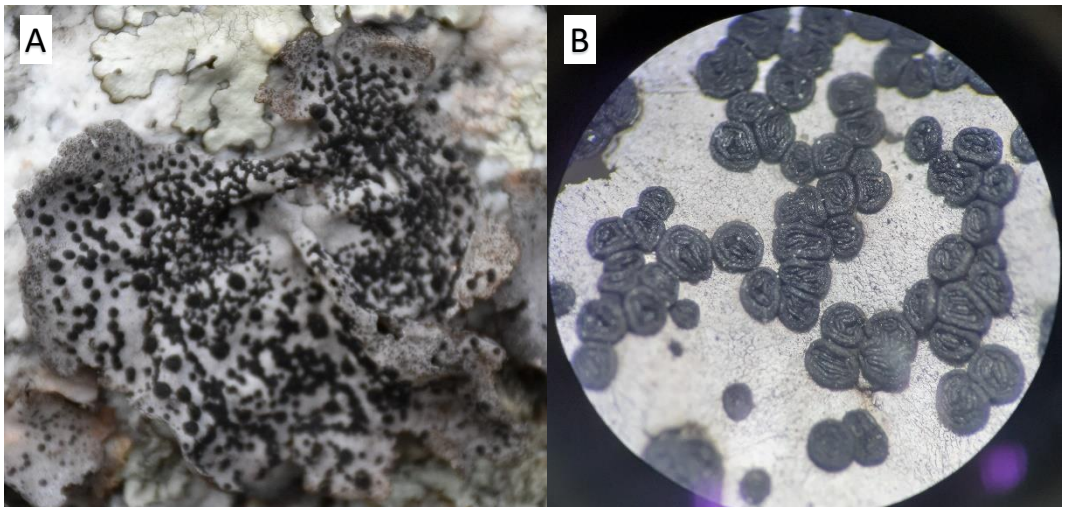
Figura— ***Psiloparmelia* sp2**. A, Hábito saxícola. B, Vista general de su talo folioso.

Stereocaulon vesuvianum



Figura— ***Stereocaulon vesuvianum***. A, Hábito muscícola. B, Vista general de su talo folioso.

***Umbilicaria* sp1**



Figura— ***Umbilicaria* sp1**. A, Vista general de su talo folioso y su hábito saxícola. B, Detalle apotecios lecidíneos y girosos (estructuras negruzcas).

Anexo 4: Permiso de colecta por el SERNANP

REPUBLICA DEL PERU

RESOLUCION JEFATURAL DEL PARQUE NACIONAL HUASCARAN N° 013-2019-SERNANP-JEF

Huaraz, 11 de junio del 2019

VISTO:

El Informe N° 37-2019-SERNANP-PNH/MSP de fecha 10 de junio del 2019, que evalúa la solicitud presentada por la señora María Gisella Orjeda Fernández para realizar la investigación científica que incluye el ingreso a ámbitos de acceso restringido y colecta de muestras biológicas en el marco del proyecto de investigación científica titulada "Aporte social, económico y ambiental en la conservación y pérdida de la biodiversidad marina - lacustre por el retroceso glaciar " PANT-BIOGLACIAR, jurisdicción del Parque Nacional Huascarán, por el periodo de dos (02) años.

CONSIDERANDO:

Que, según lo previsto en los incisos g) e i) del artículo 2° de la Ley N° 26834, Ley de Áreas Naturales Protegidas, unos de sus principales objetivos de protección es servir de sustento y proporcionar medios y oportunidades para el desarrollo de la investigación científica;

Que, en concordancia con ello, en el artículo 29° de la precitada Ley, se establece que el Estado reconoce la importancia de las Áreas Naturales Protegidas para el desarrollo de la investigación científica básica y aplicada, siempre que no afecte los objetivos de conservación, se respete la zonificación y las condiciones establecidas en el Plan Maestro;

Que, mediante la Resolución Presidencial N° 099-2017-SERNANP, publicado el 18 de abril de 2017, se modifica el proceso GAN-01-10-Otorgamiento de Certificado de Procedencia, asimismo deja sin efecto la Resolución Presidencial N° 250-2013-SERNANP que aprobó el Certificado de Procedencia de los recursos naturales renovables forestales, flora y/o fauna silvestre provenientes de las Áreas Naturales Protegidas de administración nacional;

Que, a través del documento del visto, la señora María Gisella Orjeda Fernández solicita autorización para realizar investigación científica que incluye el ingreso a ámbitos de acceso restringido y colecta de muestras biológicas en el marco del proyecto de investigación científica titulada "Aporte social, económico y ambiental en la conservación y pérdida de la biodiversidad marina - lacustre por el retroceso glaciar" PANT-BIOGLACIAR, en el ámbito de Parque Nacional Huascarán, por el periodo de dos (02) años;

Que, mediante Informe N° 37-2019-SERNANP-PNH/MSP de fecha 10 de junio del 2019, se evalúa la solicitud presentada, concluyendo que el expediente cumple con los requisitos establecidos en el artículo 18° de las Disposiciones Complementarias al Reglamento de la Ley de Áreas Naturales Protegidas en materia de investigación, y que el Plan de Investigación se encuentra conforme a los criterios establecidos en el artículo 23° de las Disposiciones Complementarias en mención;

En uso de las atribuciones conferidas por el numeral 2.1 del artículo 2° del Decreto Supremo N° 010-2015-MINAM, el artículo 14° de las Disposiciones Complementarias al Reglamento de la Ley de Áreas Naturales Protegidas en materia de investigación, aprobadas por Resolución Presidencial Nº 287-2015-SERNANP, y el artículo 27° del Reglamento de Organización y Funciones del SERNANP, aprobado mediante Decreto Supremo Nº 006-2008-MINAM.

SE RESUELVE:

Artículo 1°.- Autorizar el desarrollo de la investigación científica titulada "Aporte social, económico y ambiental en la conservación y pérdida de

la biodiversidad marina - lacustre por el retroceso glaciar" PANT-BIOGLACIAR a favor de la señora María Gisella Orjeda Fernández, a ser realizada en el ámbito de la quebrada de Parón - Parque Nacional Huascaran; por el periodo de dos (02) años, contado a partir de la fecha de emisión de la presente Resolución.

Artículo 2º.- Autorizar el ingreso a la quebrada Parón, jurisdicción del Parque Nacional Huascaran a las siguientes personas, integrantes del equipo de investigación:

Apellidos y Nombres	Documento de identidad	País de Procedencia	Cargo	Institución
María Gisella Orjeda Fernández	10839204	Peruana	Responsable	INAIGEM
Milena Esther Arias Schreiber	07594727	Peruana	Colaboradora	Universidad de Gothemburg
Edwin Aníbal Loarte Cadenas	44909386	Peruano	Responsable	INAIGEM
Katy Damacia Medina Marcos	44752984	Peruana	Colaboradora	INAIGEM
Luzmila Dávila Roller	41301352	Peruana	Colaboradora	INAIGEM
Rodrigo Alberto Narro Pérez	AB864316	Canadiense	Colaborador	Universidad McMaster
Carolyn Eyles	AB996619	Canadiense	Colaborador	Universidad McMaster
Yurio Samuel Hooker Mantilla	17826447	Peruano	Asistente	Universidad Peruana Cayetano Heredia
Ibeth Celia Rojas Macedo	43319663	Peruana	Tesista	INAIGEM
Fiorella Yesenia Quiñonez Collas	72537880	Peruana	Tesista	INAIGEM
José Antonio Arroyo Sánchez	46713619	Peruano	Tesista	INAIGEM
Christian German García Rojas	43171427	Peruano	Tesista	INAIGEM

Lihan Del Rocío Hoyos Zarzosa	70765697	Peruana	Tesista	INAIGEM
Karla Pamela Córdova Morales	70902069	Peruana	Tesista	INAIGEM

Artículo 3°.- Incluye el ingreso a ámbitos de acceso restringido y colecta de muestras biológicas. Los impactos en la zona silvestre, solo se generará por el transito e instalación de las parcelas de muestreo. La investigación contempla colecta de muestras biológicas de ejemplares de líquenes.

Artículo 4°.- Los integrantes del equipo de investigación son responsables de conocer y cumplir las disposiciones contenidas en la Ley Nº 26834, Ley de Áreas Naturales Protegidas, y su Reglamento, aprobado mediante Decreto Supremo Nº 038-2001-AG, modificado por Decreto Supremo N° 010-2015-MINAM, así como en la Resolución Presidencial N° 287-2015-SERNANP. Asimismo, los investigadores deberán cumplir con las normas que la Jefatura y su personal dispongan durante el desarrollo de la investigación.

Artículo 5°.- La señora María Gisella Orjeda Fernández, autorizado en el artículo 1° de la presente Resolución, en su calidad de investigadora principal asume las siguientes obligaciones y compromisos:

a. Presentar copia de la presente autorización al personal del ANP que lo solicite.
b. Entregar una vez publicado los resultados de la investigación, una copia digital del informe o la publicación al SERNANP y autorizar su registro en la biblioteca digital del SERNANP.
c. Entregar a la jefatura del ANP un informe final de la investigación.

El incumplimiento injustificado de estas obligaciones y compromisos producirá el ingreso del investigador en la lista de investigadores inhabilitados para próximas autorizaciones emitidas por el SERNANP.

Artículo 6º.- La autorización a la que se refiere el Artículo 1° caducará automáticamente al vencer el plazo concedido, por el incumplimiento injustificado de los compromisos adquiridos o por cualquier daño al patrimonio natural, sin perjuicio de las responsabilidades administrativas, civiles o penales que pudieran originarse.

Artículo 7º.- El SERNANP se abstiene de toda responsabilidad por los accidentes o daños que puedan sufrir los integrantes del equipo de investigación durante el desarrollo del proyecto de investigación científica.

Artículo 8º.- Regístrese la presente Resolución en el Módulo de Seguimiento a las autorizaciones de investigación del SERNANP, en el archivo de autorizaciones de la jefatura del Parque Nacional Huascarán y publíquese en la página web del SERNANP (www.sernanp.gob.pe).

Regístrese y comuníquese.

Blgo. Willian Martinez Finquin
Jefe del Parque Nacional Huascarán
Servicio Nacional de Áreas Naturales Protegidas por el Estado
SERNANP

AUTORIZACION DE INGRESO AL ANP- Nº 070 - 2019-SERNANP-PNH/J.

La Jefatura del Parque Nacional Huascarán, mediante **Resolución Jefatural del Parque Nacional Huascarán N° 013-2019-SERNANP-JEF,** de fecha 11 de junio de 2019, otorga la autorización de ingreso al interior del Área Natural Protegida- PNH, con el único propósito de realizar el proyecto Investigación científica titulada **"Aporte social, económico y ambiental en la conservación y perdida de la biodiversidad marina- lacustre por el retroceso glaciar" PANT_BIOGLACIAR, en el Parque Nacional Huascarán- Ancash, por un periodo de dos años (02) contados a partir de la fecha de emisión de la presente Resolución.**

Responsable del estudio: **Sra. Gisella Orjeda Fernández**
Investigadora

Comprometiéndose a cumplir lo siguiente:

1. Cumplir con la normatividad de las Áreas Naturales Protegidas por el Estado.
2. Cumplir con lo establecido en el Reglamento de Uso Turístico y Recreativo del Parque Nacional Huascarán.
3. Mantener limpia el área de uso y **RETIRAR LA BASURA FUERA DEL ÁREA NATURAL PROTEGIDA** y disponer en lugares adecuados y autorizados para tal fin.
4. No alterar bajo ninguna circunstancia los ecosistemas del Parque Nacional Huascarán.
5. No extraer especies de flora y fauna ni producir incendios.
6. Difundir la importancia del Parque Nacional Huascarán.
7. **Promocionar las actividades de conservación realizadas por el personal del Servicio Nacional de Áreas Naturales Protegidas- SERNANP**
8. Acatar las disposiciones del Guardaparque.
9. La presente autorización no se responsabiliza de ningún accidente que pueda suscitarse, referente al objetivo del presente documento.
10. **Presentar a esta Jefatura un informe detallado de los trabajos realizados dentro del ANP- PNH.**

La Jefatura del Parque Nacional Huascarán se reserva el derecho de dejar sin efecto la presente autorización en los casos que se transgredan las normas contenidas en la Ley Nº 26834 - Ley de Áreas Naturales Protegidas; D.S. Nº 038-2001-AG – Reglamento de Áreas Naturales Protegidas; D.L. Nº 1013, modificado por D.L. N° 1039 - Ley de Creación, Organización y Funciones del Ministerio del Ambiente y el SERNANP; D.S. Nº 006-2008-MINAM – Reglamento de Organización y Funciones del SERNANP; D.L. Nº 1079 – Establece Medidas que Garanticen el Patrimonio de las Áreas Naturales Protegidas, y su Reglamento según D.S. N° 008-2008-MINAM; R.J. Nº 196-2006-INRENA - Reglamento de Uso Turístico y Recreativo del PNH.

Huaraz, 11 de junio de 2019

Atentamente

MINISTERIO DEL AMBIENTE
Parque Nacional Huascarán

Blgo. William Martínez Finquin
Jefe del Parque Nacional Huascarán
SERNANP- MINAM
WMF/pss
c.c. archivo

CUT: 015806-2019 **TUPA: 008-2019**

Calle Diecisiete Nº 355, Urb. El Palomar- San Isidro, Lima 27
Apartado Postal 4452
Teléfono 01-2259453
LIMA – PERÚ

Jr. Federico Sal y Rosas Nº 555
Telefono:043 – 422086
e-mail: pnhuascaran@sernanp.gob.pe
HUARAZ-ANCASH

Anexo 5: Informes de ensayo de metales pesados en las muestras de líquenes y suelos

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ

INSTITUTO DE CORROSIÓN Y PROTECCIÓN

INFORME DE ENSAYO ICP/INF-319/2019

SOLICITANTE:	**INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN GLACIARES Y ECOSISTEMAS DE MONTAÑA.** **Atención: Dra. Luzmila Dávila Roller**
DOMICILIO:	**Jr. Juan Bautista Mejía 887 – Huaraz - Ancash**
TELÉFONO:	**043-221766 anexo 123**
SERVICIO SOLICITADO:	**Análisis químico en veintisiete (27) muestras acuosas.**
REFERENCIA:	**ICP/PRE-115/2019.**
MUESTREO:	**Realizado por el solicitante.**
FECHA DE EMISIÓN:	**2019-12-18.**

1. **DESCRIPCIÓN DE LAS MUESTRAS**

Fueron recibidos 27 (veintisiete) frascos de plástico con muestras acuosas para la determinación de los ítems establecidos en la referencia.

Código solicitante	Fecha	Código ICP PUCP 2019AQ	Observaciones según el solicitante
U1_T1	2019-07-18	1250	Aguas arriba de la Laguna de Parón
U1_T2	2019-07-18	1251	
U1_T224	2019-07-18	1252	
U2_T1	2019-07-18	1253	
U2_T233	2019-07-18	1254	
U2_T3	2019-07-18	1255	
Sticta_T114	2019-07-18	1256	
Sticta_T1142	2019-07-18	1257	
Sticta_T234	2019-07-18	1258	
Sticta_T2342	2019-07-18	1259	
U1_T424	2019-07-19	1260	Aguas debajo de la Laguna de Parón, Caraz - Ancash.
U1-T523	2019-07-19	1261	
U1_T524	2019-07-19	1262	
U2_T422	2019-07-19	1263	
U2_T431	2019-07-19	1264	
U2_T434	2019-07-19	1265	
U1_T613	2019-08-28	1266	Aguas arriba de la Laguna de Querococha, Recuay - Ancash
U1_623	2019-08-28	1267	
U1_T721	2019-08-28	1268	
U2_T632	2019-08-28	1269	
U2_T644	2019-08-28	1270	
U2_723	2019-08-28	1271	
Sticta_T612	2019-08-28	1272	
Sticta_T6122	2019-08-28	1273	
Sticta_T6123	2019-08-28	1274	
Sticta_T713	2019-08-28	1275	
Sticta_T7132	2019-08-28	1276	

AB - 75356

2. **FECHA DE RECEPCIÓN DE LAS MUESTRAS:** 2019-12-09.

3. **FECHA DE EJECUCIÓN DE ENSAYOS:** 2019-12-11 a 2019-12-18.

4. **MÉTODO DE ENSAYO**

4.1. Determinación de metales totales: Método por ICP-MS mediante EPA 200.8 (1994). Determination of Trace Elements in Water and Wastes by Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometry, Rev. 5.4.

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ · Instituto de Corrosión y Protección · DIRECCIÓN · ICP-PUCP

AV. UNIVERSITARIA 1801 - LIMA 32 - SAN MIGUEL- APARTADO POSTAL 1761 - LIMA 100
TELÉFONOS: DIRECTO (0051-1) 626 2510, 626 2000 anexos 2510 - 3077 ... Email: icp@pucp.edu.pe

LOS RESULTADOS DEL PRESENTE INFORME NO DEBEN SER UTILIZADOS COMO UNA CERTIFICACIÓN DE CONFORMIDAD CON NORMAS DE PRODUCTO O CERTIFICADO DEL SISTEMA DE CALIDAD DEL SOLICITANTE
PROHIBIDA LA REPRODUCCIÓN PARCIAL O TOTAL SIN LA AUTORIZACIÓN ESCRITA DEL ICP

INFORME DE ENSAYO ICP/INF-319/2019

ANÁLISIS DE MUESTRAS ACUOSAS								
Códigos de muestras		Parámetros						
		Hierro	Litio	Magnesio	Manganeso	Níquel	Plomo	Zinc
Código Cliente	Código PUCP 2019AQ	RESULTADOS (mg/L)						
U1_T1	1250	0,4272	0,0025	0,4377	0,0505	0,0031	0,0051	0,0788
U1_T2	1251	0,4844	0,0067	0,3922	0,0303	0,0029	0,0055	0,0585
U1_T224	1252	0,1353	<0,0001	0,0961	0,0052	0,0015	0,0032	0,0288
U2_T1	1253	0,6111	<0,0001	0,1644	0,0171	0,0035	0,0052	0,0399
U2_T233	1254	0,4434	0,0545	5,6292	0,0120	0,0037	0,0052	0,0544
U2_T3	1255	0,4692	0,0532	5,7575	0,0329	0,0048	0,0096	0,0682
Sticta_T114	1256	0,5863	0,0969	9,4004	0,0984	0,0025	0,0039	0,0786
Sticta_T1142	1257	0,7525	0,0892	9,1941	0,0983	0,0032	0,0045	0,0646
Sticta_T234	1258	0,4189	0,0974	9,5278	0,0314	0,0043	0,0034	0,0583
Sticta_T2342	1259	0,4412	0,0971	9,5063	0,0327	0,0177	0,0422	0,0813
U1_T424	1260	0,4139	0,0706	7,1312	0,0804	0,0060	0,0065	0,1469
U1-T523	1261	0,3787	0,0863	8,6823	0,0405	0,0029	0,0033	0,0466
U1_T524	1262	0,3541	0,0851	8,8161	0,1121	0,0025	0,0028	0,0485
U2_T422	1263	0,4278	0,0701	7,0917	0,0310	0,0028	0,0054	0,0867
U2_T431	1264	0,0560	0,0707	7,0224	0,0020	0,0082	0,0012	0,0517
U2_T434	1265	0,3717	0,0698	7,1007	0,0172	0,0024	0,0045	0,0798
U1_T613	1266	0,5071	0,0827	7,6941	0,0225	0,0035	0,0143	0,1396
U1_623	1267	0,4366	0,0925	9,5846	0,0151	0,0039	0,0064	0,0770
U1_T721	1268	0,2367	0,0966	9,3426	0,0044	0,0027	0,0092	0,1327
U2_T632	1269	0,3189	0,0988	9,4387	0,0104	0,0026	0,0032	0,0821
U2_T644	1270	0,4857	0,1000	9,4230	0,0205	0,0022	0,0077	0,1361
U2_723	1271	0,4773	0,0980	8,9285	0,0081	0,0024	0,0042	0,0420
Sticta_T612	1272	0,6181	0,0991	10,1574	0,0131	0,0030	0,0090	0,0807
Sticta_T6122	1273	0,3660	0,0982	9,6859	0,0091	0,0031	0,0045	0,0456
Sticta_T6123	1274	0,7453	0,0996	9,4858	0,0069	0,0036	0,0112	0,0619
Sticta_T713	1275	0,2173	0,1020	9,6161	0,0041	0,0020	0,0026	0,0305
Sticta_T7132	1276	0,3281	0,1024	9,7829	0,0078	0,0022	0,0026	0,0390

Los resultados obtenidos son aplicables únicamente a la(s) muestra(s) ensayada(s).

AB - 75358

6. **OBSERVACIONES**

6.1. Los resultados reportados para las muestras codificadas como 2019AQ1251, 2019AQ1252, 2019AQ1259 y 2019AQ1269 son promedios de dos réplicas.

EL PRESENTE INFORME DE ENSAYO CONSTA DE 03 (TRES) PÁGINAS DE TEXTO.

Ing. Ilse Eliana Acosta Sullcahuamán.
Jefe (e) del Laboratorio de Análisis Químico.

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ
Instituto de Corrosión y Protección
Prof. ISABEL DÍAZ TANG
Directora

INFORME DE ENSAYO ICP/INF-320/2019

SOLICITANTE:	**INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN GLACIARES Y ECOSISTEMAS DE MONTAÑA. Atención: Dra. Luzmila Dávila Roller**
DOMICILIO:	**Jr. Juan Bautista Mejía 887 – Huaraz - Ancash**
TELÉFONO:	**043-221766 anexo 123**
SERVICIO SOLICITADO:	**Análisis químico en siete (07) muestras acuosas.**
REFERENCIA:	**ICP/PRE-115/2019.**
MUESTREO:	**Realizado por el solicitante.**
FECHA DE EMISIÓN:	**2019-12-18.**

1. DESCRIPCIÓN DE LAS MUESTRAS

Fueron recibidos 07 (siete) frascos de plástico con muestras acuosas para la determinación de los ítems establecidos en la referencia.

Código solicitante	Fecha	Código ICP- PUCP 2019AQ	Observaciones según el solicitante
S-1	2019-08-26	1277	Aguas arriba de la Laguna de Parón, Caraz - Ancash.
S-2	2019-08-26	1278	
S-3	2019-08-26	1279	
S-4	2019-08-26	1280	Aguas abajo de la Laguna de Parón, Caraz - Ancash.
S-5	2019-08-26	1281	
S-6	2019-08-26	1282	Aguas arriba de la Laguna de Querococha, Recuay - Ancash.
S-7	2019-08-26	1283	

2. FECHA DE RECEPCIÓN DE LAS MUESTRAS: 2019-12-09.

3. FECHA DE EJECUCIÓN DE ENSAYOS: 2019-12-11 a 2019-12-18.

4. MÉTODO DE ENSAYO

4.1. Determinación de metales totales: Método por ICP-MS mediante EPA 200.8 (1994). Determination of Trace Elements in Water and Wastes by Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometry, Rev. 5.4.

5. RESULTADOS

ANÁLISIS DE MUESTRAS ACUOSAS

Códigos de muestras		Parámetros							
		Aluminio	Arsénico	Berilio	Boro	Cadmio	Cobalto	Cobre	Cromo
Código Cliente	Código ICP-PUCP 2019AQ	RESULTADOS (mg/L)							
S-1	1277	1,1110	0,0057	<0,00003	0,229	0,0009	<0,0001	0,0489	0,1559
S-2	1278	2,2853	0,0048	<0,00003	0,225	0,0011	<0,0001	0,0367	0,1588
S-3	1279	5,0087	0,0052	0,00093	0,235	0,0015	<0,0001	0,0737	0,1312
S-4	1280	2,2097	0,0043	<0,00003	0,258	0,0009	<0,0001	0,0367	0,1129
S-5	1281	2,6040	0,0069	<0,00003	0,228	0,0009	<0,0001	0,0550	0,0686
S-6	1282	4,2403	0,0196	<0,00003	0,239	0,0013	<0,0001	0,0692	0,0968
S-7	1283	10,7147	0,0462	0,00083	0,231	0,0016	<0,0001	0,0821	0,3535

AB - 75359

LOS RESULTADOS DEL PRESENTE INFORME NO DEBENSER UTILIZADOS COMO UNA CERTIFICACIÓN DE CONFORMIDAD CON NORMAS DE PRODUCTO O CERTIFICADO DEL SISTEMA DE CALIDAD DEL SOLICITANTE.
PROHIBIDA LA REPRODUCCIÓN PARCIAL O TOTAL SIN LA AUTORIZACIÓN ESCRITA DEL ICP-PUCP

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ Instituto de Corrosión y Protección DIRECCIÓN ICP-PUCP

INFORME DE ENSAYO ICP/INF-320/2019

ANÁLISIS DE MUESTRAS ACUOSAS								
Códigos de muestras		Parámetros						
		Hierro	Litio	Magnesio	Manganeso	Níquel	Plomo	Zinc
Código Cliente	Código ICP-PUCP 2019AQ	RESULTADOS (mg/L)						
S-1	1277	2,0355	0,1506	10,7761	0,6320	0,0250	0,0209	0,1383
S-2	1278	4,3921	0,1384	10,4849	0,9525	0,0238	0,0551	0,2348
S-3	1279	5,7156	0,2058	11,2356	1,5572	0,0251	0,0442	0,2900
S-4	1280	4,3147	0,4707	10,4628	0,3028	0,0292	0,0167	0,1296
S-5	1281	2,9547	0,1886	10,6489	1,1646	0,0132	0,0158	0,1356
S-6	1282	2,7105	0,3215	11,8427	0,2689	0,0343	0,0040	0,1932
S-7	1283	15,9325	0,2293	11,6672	0,3426	0,0273	0,0799	0,1714

Los resultados obtenidos son aplicables únicamente a la(s) muestra(s) ensayada(s).

6. OBSERVACIONES

6.1. Los resultados reportados para la muestra codificada como 2019AQ1279 son promedios de dos réplicas.

EL PRESENTE INFORME DE ENSAYO CONSTA DE 02 (DOS) PÁGINAS DE TEXTO

Ing. Ilse Eliana Acosta Sullcahuamán.
Jefe (e) del Laboratorio de Análisis Químico.

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ
Instituto de Corrosión y Protección
Prof. ISABEL DIAZ TANG
Directora

AB - 75360

LOS RESULTADOS DEL PRESENTE INFORME NO DEBENSER UTILIZADOS COMO UNA CERTIFICACIÓN DE CONFORMIDAD CON NORMAS DE PRODUCTO O CERTIFICADO DEL SISTEMA DE CALIDAD DEL SOLICITANTE
PROHIBIDA LA REPRODUCCION PARCIAL O TOTAL SIN LA AUTORIZACION ESCRITA DEL ICP PUCP

Anexo 6: Tabla de resultados de las concentraciones de metales bioacumulados transformados a mg/kg peso seco del líquen (ppm)

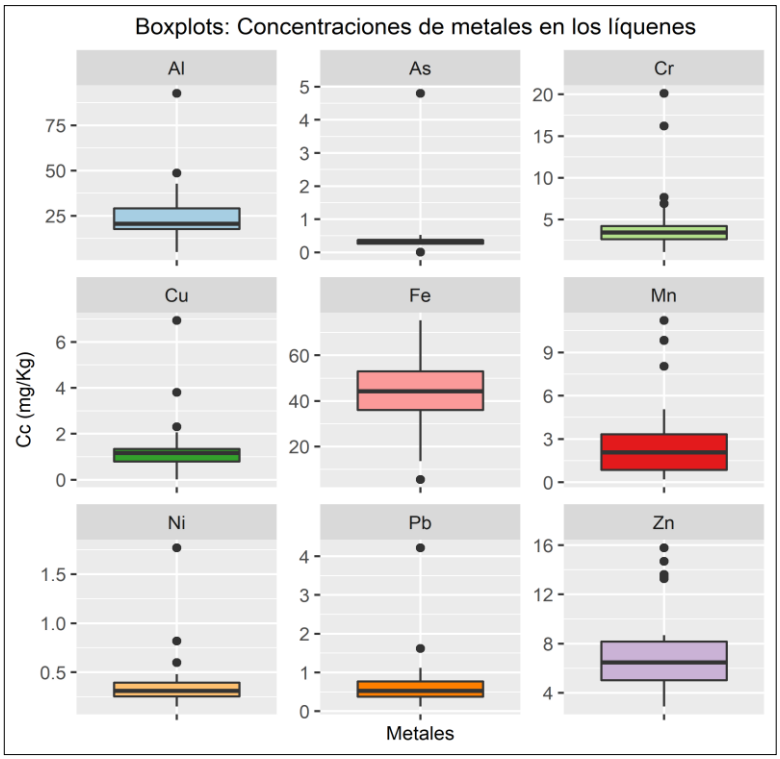
Nro.	COD	ESPECIE	ZONA	Al	As	Cu	Cr	Fe	Mn	Ni	Pb	Zn
1	U1_T1	*Usnea* sp1	Paron_arrib	48,620	4,800	1,430	4,060	42,720	5,050	0,310	0,510	7,880
2	U1_T2	*Usnea* sp1	Paron_arrib	19,880	0,220	0,670	20,120	48,440	3,030	0,290	0,550	5,850
3	U1_T224	*Usnea* sp1	Paron_arrib	5,070	0,003	0,013	16,190	13,530	0,520	0,150	0,320	2,880
4	U2_T1	*Usnea* sp2	Paron_arrib	17,630	0,003	1,050	6,400	61,110	1,710	0,350	0,520	3,990
5	U2_T233	*Usnea* sp2	Paron_arrib	22,730	0,240	1,150	3,180	44,340	1,200	0,370	0,520	5,440
6	U2_T3	*Usnea* sp2	Paron_arrib	29,540	0,240	1,090	2,720	46,920	3,290	0,480	0,960	6,820
7	Sticta_T114	*Sticta weigelii*	Paron_arrib	25,810	0,340	1,360	4,320	58,630	9,840	0,250	0,390	7,860
8	Sticta_T1142	*Sticta weigelii*	Paron_arrib	19,330	0,340	1,270	6,890	75,250	9,830	0,320	0,450	6,460
9	Sticta_T234	*Sticta weigelii*	Paron_arrib	20,356	0,366	1,304	3,545	45,140	3,384	0,463	0,366	6,282
10	Sticta_T2342	*Sticta weigelii*	Paron_arrib	20,220	0,340	1,740	3,260	44,120	3,270	1,770	4,220	8,130
11	U1_T424	*Usnea* sp1	Paron_abj	17,560	0,240	3,800	3,600	41,390	8,040	0,600	0,650	14,690
12	U1-T523	*Usnea* sp1	Paron_abj	10,515	0,343	0,984	2,986	43,330	4,634	0,332	0,378	5,332
13	U1_T524	*Usnea* sp1	Paron_abj	12,550	0,280	0,730	3,400	35,410	11,210	0,250	0,280	4,850
14	U2_T422	*Usnea* sp2	Paron_abj	17,590	0,290	0,910	3,330	42,780	3,100	0,280	0,540	8,670
15	U2_T431	*Usnea* sp2	Paron_abj	4,830	0,230	0,013	1,070	5,600	0,200	0,820	0,120	5,170
16	U2_T434	*Usnea* sp2	Paron_abj	38,412	0,422	1,284	4,814	62,787	2,905	0,405	0,760	13,480
17	U1_T613	*Usnea* sp1	Querococha_arrib	32,330	0,339	2,059	4,005	57,364	2,545	0,396	1,618	15,792
18	U1_623	*Usnea* sp1	Querococha_arrib	28,590	0,350	1,310	3,550	43,660	1,510	0,390	0,640	7,700
19	U1_T721	*Usnea* sp1	Querococha_arrib	13,590	0,330	0,890	1,800	23,670	0,440	0,270	0,920	13,270
20	U2_T632	*Usnea* sp2	Querococha_arrib	92,720	0,330	0,740	2,410	31,890	1,040	0,260	0,320	8,210
21	U2_T644	*Usnea* sp2	Querococha_arrib	22,750	0,370	0,700	2,210	48,570	2,050	0,220	0,770	13,610
22	U2_723	*Usnea* sp2	Querococha_arrib	23,540	0,350	0,720	2,500	47,730	0,810	0,240	0,420	4,200
23	Sticta_T612	*Sticta weigelii*	Querococha_arrib	33,620	0,470	6,930	4,120	61,810	1,310	0,300	0,900	8,070
24	Sticta_T6122	*Sticta weigelii*	Querococha_arrib	20,400	0,370	2,310	2,810	36,600	0,910	0,310	0,450	4,560
25	Sticta_T6123	*Sticta weigelii*	Querococha_arrib	42,640	0,360	1,260	7,670	74,530	0,690	0,360	1,120	6,190
26	Sticta_T713	*Sticta weigelii*	Querococha_arrib	6,770	0,390	0,830	2,000	21,730	0,410	0,200	0,260	3,050
27	Sticta_T7132	*Sticta weigelii*	Querococha_arrib	20,580	0,520	1,230	2,380	32,810	0,780	0,220	0,260	3,900

Anexo 7: Tabla de resultados de las concentraciones de metales en los suelos de los sitios de estudio transformados a mg/kg

COD	Transecto	Zona	Al	As	Cd	Cu	Cr	Fe	Mn	Ni	Pb	Zn
S-1	1	Paron_arrib	55.550	0.285	0.045	2.445	7.795	101.775	31.600	1.250	1.045	6.915
S-2	2	Paron_arrib	114.265	0.240	0.055	1.835	7.940	219.605	47.625	1.190	2.755	11.740
S-3	3	Paron_arrib	250.435	0.260	0.075	3.685	6.560	285.780	77.860	1.255	2.210	14.500
S-4	4	Paron_abj	110.485	0.215	0.045	1.835	5.645	215.735	15.140	1.460	0.835	6.480
S-5	5	Paron_abj	130.200	0.345	0.045	2.750	3.430	147.735	58.230	0.660	0.790	6.780
S-6	6	Querococha_arrib	212.015	0.980	0.065	3.460	4.840	135.525	13.445	1.715	0.200	9.660
S-7	7	Querococha_arrib	535.735	2.310	0.080	4.105	17.675	796.625	17.130	1.365	3.995	8.570

Anexo 8: Análisis exploratorio de los datos (Salidas del software R)

Boxplots



Test de grubbs y de rosner para la determinación de datos atípicos a un nivel de significación α=0.05 (outliers en inglés) en el software R

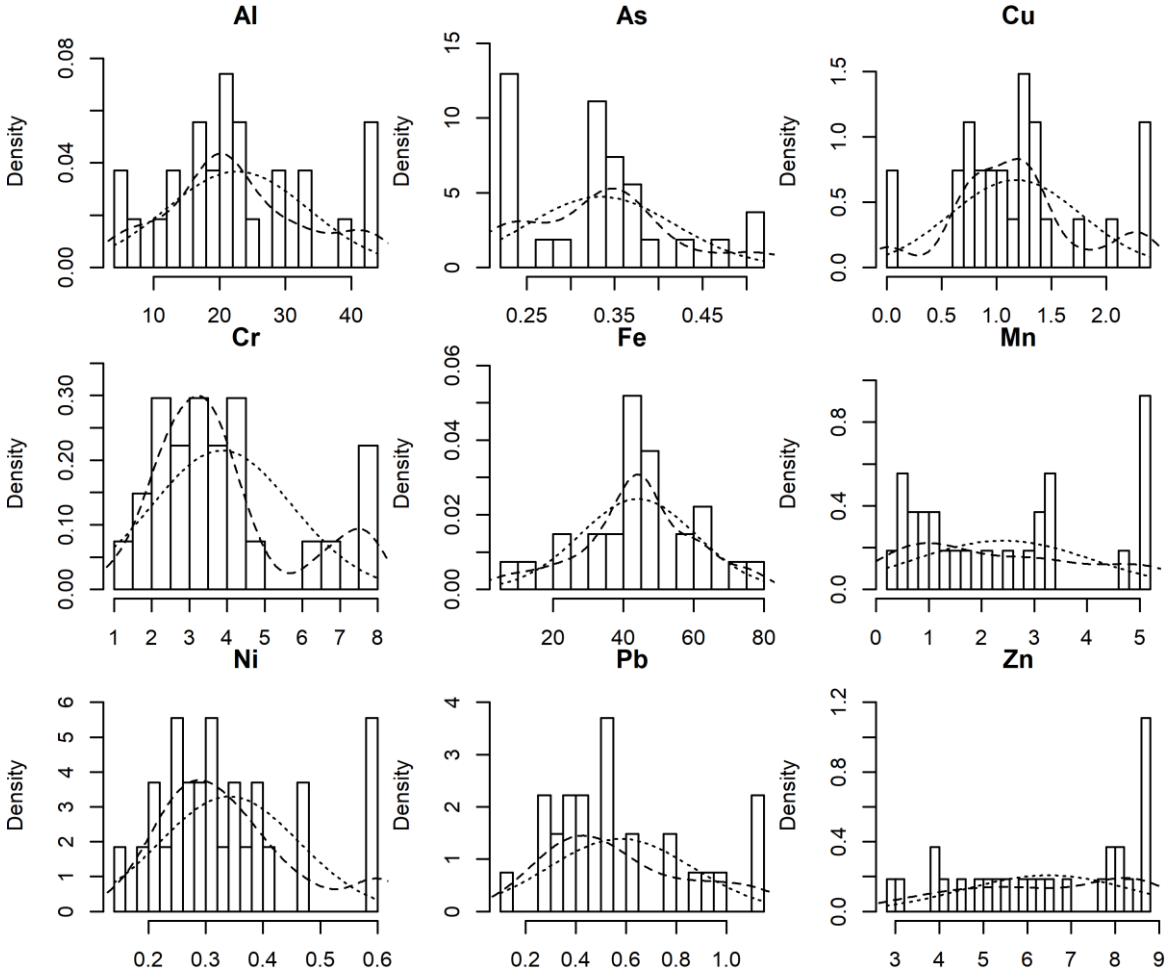
```
Grubbs test for Al
Data:  datos$Al
U = 0.2865, p-value < 2.2e-16
Alternative hypothesis: highest values 48.62, 92.72 are outliers

Grubbs test for As
Data:  datos$As
G = 5.505458, U = 0.011683, p-value = 0.001248
Alternative hypothesis: 0.003333333 and 4.8 are outliers

Grubbs test for Cr
Data:  datos$Cr
U = 0.12655, p-value < 2.2e-16
Alternative hypothesis: highest values 16.19, 20.12 are outliers

Grubbs test for Cu
Data:  datos$Cu
U = 0.14215, p-value < 2.2e-16
Alternative hypothesis: highest values 3.8, 6.93 are outliers

Grubbs test for Fe
Data:  datos$Fe
G = 2.34045, U = 0.78122, p-value = 0.1874
Alternative hypothesis: lowest value 5.6 is an outlier
```

```
Rosner's Test for Mn
datos$Mn
$alpha
[1] 0.05
$all.stats
  i   Mean.i     SD.i Value Obs.Num    R.i+1 lambda.i+1 Outlier
1 0 3.100302 3.130351 11.21      13 2.590667   2.858923    TRUE
2 1 2.788390 2.731153  9.84       7 2.581917   2.840774    TRUE
3 2 2.506326 2.369649  9.83       8 3.090616   2.821681    TRUE
4 3 2.201173 1.852080  8.04      11 3.152578   2.801551    TRUE

Grubbs test for Ni
Data:  datos$Ni
U = 0.096638, p-value < 2.2e-16
Alternative hypothesis: highest values 0.82, 1.77 are outliers

Grubbs test for Pb
Data:  datos$Pb
U = 0.098432, p-value < 2.2e-16
Alternative hypothesis: highest values 1.617647059, 4.22 are outliers

Rosner's Test for Zn
datos$Zn
$alpha
[1] 0.05
$all.stats
  i   Mean.i     SD.i    Value Obs.Num    R.i+1 lambda.i+1 Outlier
1 0 7.493916 3.640387 15.79186      17 2.279411   2.858923    TRUE
2 1 7.174764 3.304898 14.69000      11 2.273969   2.840774    TRUE
3 2 6.874155 2.988317 13.61000      21 2.254060   2.821681    TRUE
4 3 6.593494 2.695074 13.47973      16 2.555119   2.801551    TRUE
5 4 6.294093 2.311796 13.27000      19 3.017527   2.780277    TRUE
```

Anexo 9: Tabla con las estadísticas descriptivas de la data winzorizada de metales en líquenes

	Al	As	Cu	Cr	Fe	Mn	Ni	Pb	Zn
median	20.40	0.34	1.15	3.40	44.12	2.05	0.31	0.52	6.46
mean	22.67	0.33	1.17	3.87	44.14	2.41	0.34	0.58	6.48
SE.mean	2.09	0.02	0.11	0.36	3.17	0.33	0.02	0.06	0.37
CI.mean.0.95	4.31	0.03	0.24	0.73	6.51	0.68	0.05	0.11	0.76
var	118.50	0.01	0.36	3.44	271.20	2.93	0.01	0.08	3.70
std.dev	10.89	0.08	0.60	1.86	16.47	1.71	0.12	0.29	1.92
coef.var	0.48	0.25	0.51	0.48	0.37	0.71	0.35	0.50	0.30

Anexo 10: Histogramas múltiples de densidad de los valores bioacumulados de metales con ajustes a la curva normal (data post winzorización)



Anexo 11: Pruebas de normalidad de los valores de los metales post winzorización (Salidas del software R)

Para los valores de aluminio

```
        Shapiro-Wilk normality test

data:  datos$Al
W = 0.94648, p-value = 0.1759 (Cumple la normalidad)
```

Para los valores de arsénico

```
        Shapiro-Wilk normality test

data:  datos$As
W = 0.91468, p-value = 0.02944 (No cumple la normalidad)
```

Para los valores de cobre

```
	Shapiro-Wilk normality test

data:  datos$Cu
W = 0.93164, p-value = 0.07583 (Cumple la normalidad)
```

Para los valores de cromo

```
	Shapiro-Wilk normality test

data:  datos$Cr
W = 0.87527, p-value = 0.003803 (No cumple la normalidad)
```

Para los valores de hierro

```
	Shapiro-Wilk normality test

data:  datos$Fe
W = 0.96616, p-value = 0.5043 (Cumple la normalidad)
```

Para los valores de manganeso

```
	Shapiro-Wilk normality test

data:  datos$Mn
W = 0.88407, p-value = 0.00589 (No cumple la normalidad)
```

Para los valores de níquel

```
	Shapiro-Wilk normality test

data:  datos$Ni
W = 0.91199, p-value = 0.02542 (No cumple la normalidad)
```

Para los valores de plomo

```
	Shapiro-Wilk normality test

data:  datos$Pb
W = 0.92362, p-value = 0.0483 (No cumple la normalidad)
```

Para los valores de zinc

```
	Shapiro-Wilk normality test

data:  datos$Zn
W = 0.90183, p-value = 0.01473 (No cumple la normalidad)
```

Anexo 12: Salidas del software R de los resultados del análisis de varianzas de dos vías (Two-way ANOVA) para la evaluación del efecto de los sitios de estudio y/o el tipo de especie de líquen sobre los valores de los metales pesados bioacumulados

Prueba ANOVA de dos vías para los valores de aluminio

```
Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
      Df F value Pr(>F)
group  7  0.8403  0.568
      19
Shapiro-Wilk normality test

data:  residuals(object = facdca_m)
W = 0.95887, p-value = 0.3482

Anova Table (Type II tests)

Response: Al
               Sum Sq Df F value Pr(>F)
Especie         96.15  2  0.3482 0.7104
Sitio          347.11  2  1.2569 0.3072
Especie:Sitio   28.96  3  0.0699 0.9753
Residuals     2623.64 19
```

Prueba ANOVA de dos vías para los valores de cobre

```
Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
      Df F value Pr(>F)
group  7  0.9316 0.5052
      19

Shapiro-Wilk normality test

data:  residuals(object = facdca_m)
W = 0.94472, p-value = 0.1593

Anova Table (Type II tests)

Response: Cu
              Sum Sq Df F value  Pr(>F)
Especie       1.7929  2  2.8390 0.08341 .
Sitio         0.1612  2  0.2552 0.77735
Especie:Sitio 1.0983  3  1.1594 0.35111
Residuals     5.9994 19
---
Signif. codes:  0 ‘***’ 0.001 ‘**’ 0.01 ‘*’ 0.05 ‘.’ 0.1 ‘ ’ 1
```

Prueba ANOVA de dos vías para los valores de hierro

```
Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
      Df F value Pr(>F)
group  7  0.6932 0.6771
      19
Shapiro-Wilk normality test
```

```
data:  residuals(object = facdca_m)
W = 0.9893, p-value = 0.9913

Anova Table (Type II tests)

Response: Fe
             Sum Sq Df F value Pr(>F)
Especie       414.1  2  0.6685 0.5241
Zona          181.5  2  0.2931 0.7493
Especie:Zona  412.8  3  0.4443 0.7241
Residuals    5883.9 19
```

Prueba ANOVA de dos vías para los valores de manganeso

```
Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
      Df F value Pr(>F)
group  7  1.1264 0.3877
      19

Shapiro-Wilk normality test

data:  residuals(object = facdca_m)
W = 0.97673, p-value = 0.7823


Anova Table (Type II tests)

Response: Mn
              Sum Sq Df F value    Pr(>F)
Especie       8.6483  2  3.3475 0.0568342 .
Zona         31.5696  2 12.2196 0.0003875 ***
Especie:Zona 12.5227  3  3.2314 0.0454454 *
Residuals    24.5435 19
---
Signif. codes:  0 ‘***’ 0.001 ‘**’ 0.01 ‘*’ 0.05 ‘.’ 0.1 ‘ ’ 1


Prueba Post-Hoc Tukey evaluando el factor “Sitio” como factor

Study: facdca_m ~ c("Sitio")

HSD Test for Mn

Mean Square Error:  1.291766

Sitio,  means

                        Mn       std  r  Min      Max
Parón abajo       3.489879 1.8704857  6 0.20 5.050000
Parón arriba      3.155362 1.6236342 10 0.52 5.050000
Querococha arriba 1.135932 0.6704657 11 0.41 2.545249

Alpha: 0.05 ; DF Error: 19
Critical Value of Studentized Range: 3.592739

Groups according to probability of means differences and alpha level(
0.05 )
```

```
Treatments with the same letter are not significantly different.

                        Mn groups
Parón abajo       3.489879      a
Parón arriba      3.155362      a
Querococha arriba 1.135932      b

Study: facdca_m ~ c("Especie")

HSD Test for Mn

Mean Square Error:  1.291766

Especie,  means

                 Mn      std r  Min  Max
Sticta_wei 2.317069 1.891571 9 0.41 5.05
Usnea sp1  3.092124 1.947192 9 0.44 5.05
Usnea sp2  1.811712 1.099948 9 0.20 3.29

Alpha: 0.05 ; DF Error: 19
Critical Value of Studentized Range: 3.592739

Minimun Significant Difference: 1.36112

Treatments with the same letter are not significantly different.

                 Mn groups
Usnea sp1  3.092124      a
Sticta_wei 2.317069      a
Usnea sp2  1.811712      a
```

Prueba ANOVA de dos vías para los valores de níquel

```
Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
      Df F value Pr(>F)
group  7  1.0006 0.4609
      19
Shapiro-Wilk normality test

data:  residuals(object = facdca_m)
W = 0.96156, p-value = 0.4008

Anova Table (Type II tests)

Response: Ni
               Sum Sq Df F value  Pr(>F)
Especie       0.007077  2  0.2741 0.76319
Sitio         0.067739  2  2.6239 0.09858 .
Especie:Sitio 0.064822  3  1.6739 0.20627
Residuals     0.245252 19
---
Signif. codes:  0 ‘***’ 0.001 ‘**’ 0.01 ‘*’ 0.05 ‘.’ 0.1 ‘ ’ 1
```

Prueba ANOVA de dos vías para los valores de plomo

```
Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
      Df F value Pr(>F)
group  7   0.348 0.9209
      19
Shapiro-Wilk normality test

data:  residuals(object = facdca_m)
W = 0.92797, p-value = 0.06165

Anova Table (Type II tests)

Response: Pb
              Sum Sq Df F value Pr(>F)
Especie       0.02093  2  0.1186 0.8888
Sitio         0.16153  2  0.9152 0.4174
Especie:Sitio 0.30165  3  1.1395 0.3585
Residuals     1.67659 19
```

Anexo 13: Salidas del software R de los resultados del test no paramétrico Kruskal-Wallis aplicados a las variables sitios de estudio y/o el tipo de especie de líquen

Test Kruskal-Wallis para los valores de arsénico

```
Bartlett test of homogeneity of variances (para el factor Especie)

data:  As by Especie
Bartlett's K-squared = 1.1682, df = 2, p-value = 0.5576


Kruskal-Wallis rank sum test (para el factor Especie)

data:  As by Especie
Kruskal-Wallis chi-squared = 6.9147, df = 2, p-value = 0.03151

             Comparison        Z  P.unadj      P.adj
1 Sticta_wei - Usnea sp1 2.277289 0.022769 0.06830701
2 Sticta_wei - Usnea sp2 2.277289 0.022769 0.06830701
3  Usnea sp1 - Usnea sp2 0.000000 1.000000 1.00000000

Bartlett test of homogeneity of variances (para el factor Sitio)

data:  As by Sitio de estudio
Bartlett's K-squared = 1.9571, df = 2, p-value = 0.3759


Kruskal-Wallis rank sum test (para el factor Sitio)

data:  As by Sitio de estudio
Kruskal-Wallis chi-squared = 6.2565, df = 2, p-value = 0.0438

                     Comparison          Z    P.unadj      P.adj
1        Paron_abj - Paron_arrib  0.1263627 0.89944481 1.00000000
2   Paron_abj - Querococha_arrib -1.8475344 0.06466973 0.19400920
3 Paron_arrib - Querococha_arrib -2.2953546 0.02171281 0.06513843
```

Test Kruskal-Wallis para los valores de cromo

Bartlett test of homogeneity of variances (para el factor Especie)

```
data:  Cr by Especie
Bartlett's K-squared = 0.54145, df = 2, p-value = 0.7628
```

Kruskal-Wallis rank sum test (para el factor Especie)

```
data:  Cr by Especie
Kruskal-Wallis chi-squared = 2.6946, df = 2, p-value = 0.2599
```

Bartlett test of homogeneity of variances (para el factor Sitio)

```
data:  Cr by Sitio
Bartlett's K-squared = 1.2523, df = 2, p-value = 0.5347
```

Kruskal-Wallis rank sum test (para el factor Sitio)

```
data:  Cr by Sitio
Kruskal-Wallis chi-squared = 5.4342, df = 2, p-value = 0.06606
```

Test Kruskal-Wallis para los valores de zinc

Bartlett test of homogeneity of variances(para el factor Especie)

```
data:  Zn by Especie
Bartlett's K-squared = 0.092629, df = 2, p-value = 0.9547
```

Kruskal-Wallis rank sum test(para el factor Especie)

```
data:  Zn by Especie
Kruskal-Wallis chi-squared = 1.0705, df = 2, p-value = 0.5855
```

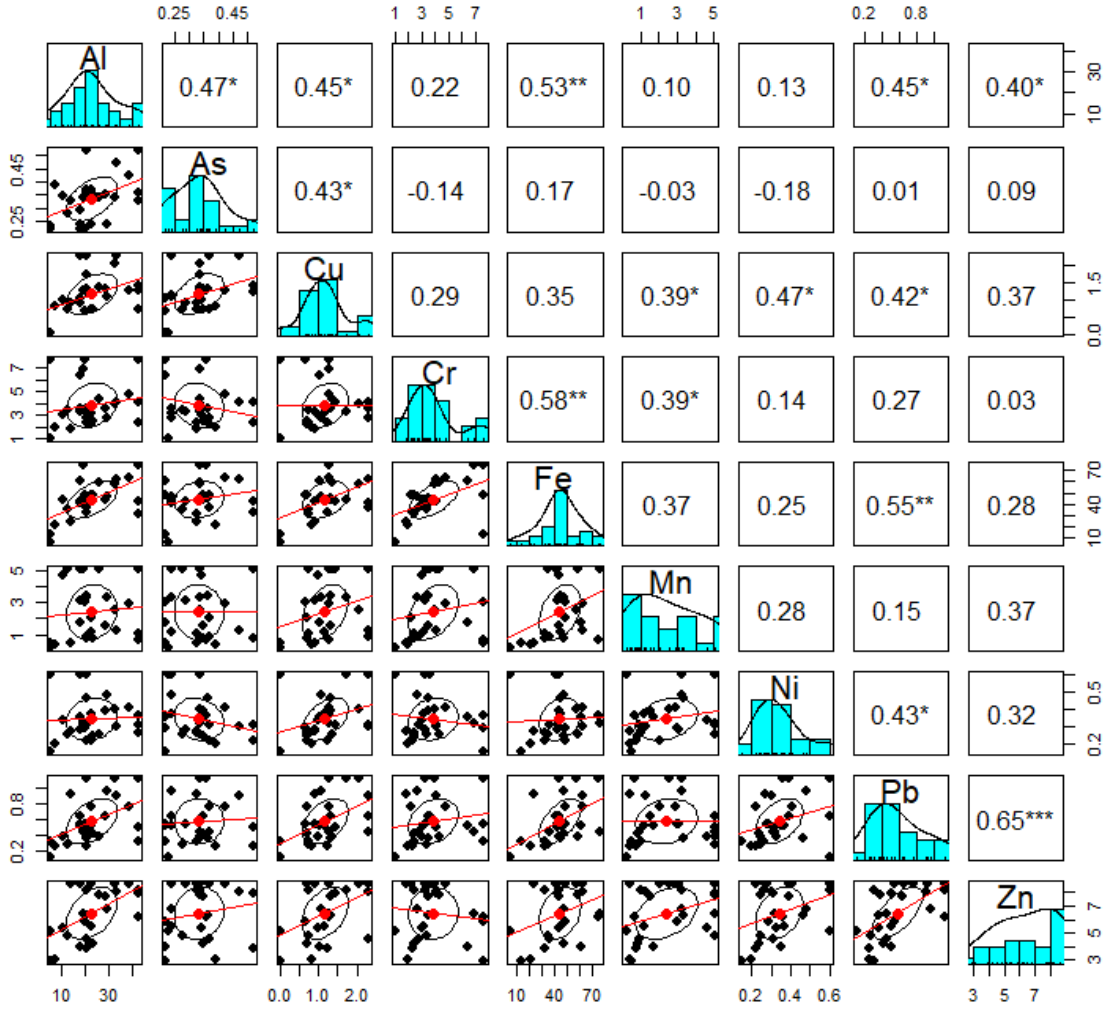
Bartlett test of homogeneity of variances (para el factor Sitio)

```
data:  Zn by Sitio
Bartlett's K-squared = 0.57136, df = 2, p-value = 0.7515
```

Kruskal-Wallis rank sum test(para el factor Sitio)

```
data:  Zn by Sitio
Kruskal-Wallis chi-squared = 0.9689, df = 2, p-value = 0.616
```

Anexo 14: Análisis de correlación de los metales bioacumulados con sus coeficientes de correlación de Spearman

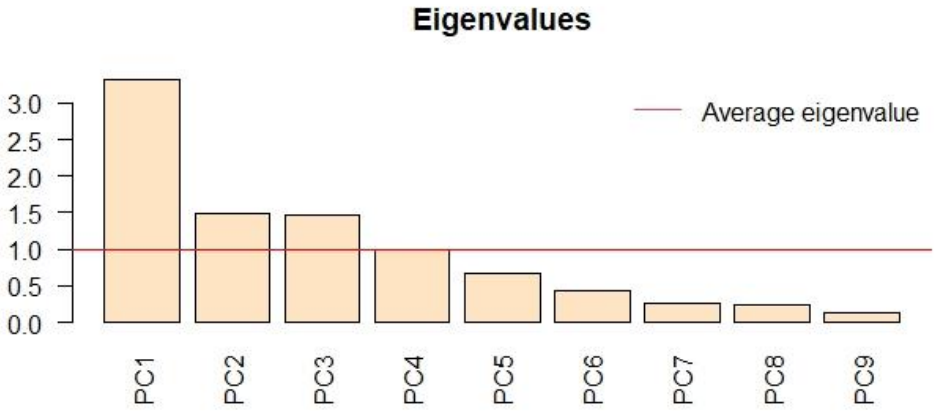


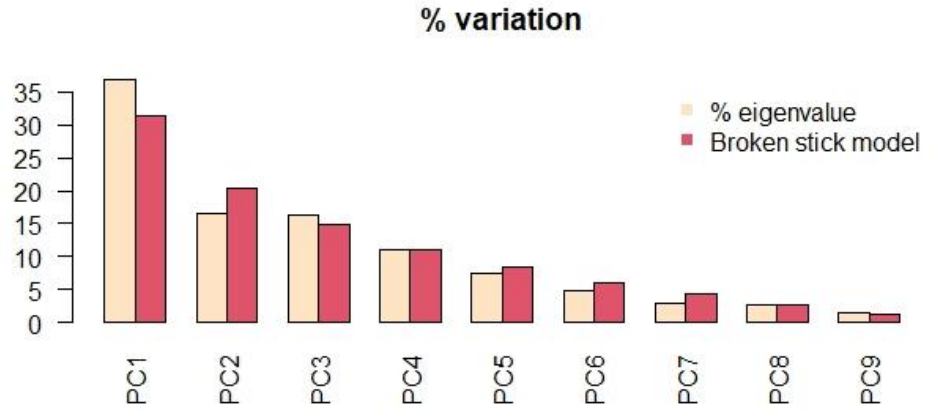
Códigos de significancia: 0 ‘***’ 0.001 ‘**’ 0.01 ‘*’ 0.05 ‘.’ 0.1 ‘ ’ 1

Anexo 15: Salidas del software R del análisis de componentes principales aplicado a los metales bioacumulados

Varianzas (autovalores) de los componentes principales y aplicación del criterio del autovalor >1

	eigenvalue	variance.percent	cumulative.variance.percent
Dim.1	**3.3172490**	**36.858322**	**36.85832**
Dim.2	**1.4915492**	**16.572769**	**53.43109**
Dim.3	**1.4641039**	**16.267821**	**69.69891**
Dim.4	0.9969409	11.077122	80.77603
Dim.5	0.6749252	7.499169	88.27520
Dim.6	0.4245258	4.716953	92.99216
Dim.7	0.2522595	2.802883	95.79504
Dim.8	0.2380465	2.644961	98.44000
Dim.9	0.1404000	1.560000	100.00000





Correlaciones de las variables y los componentes principales (loadings, en inglés)

Coeficientes de correlación de las variables con los componentes principales (04 primeros)

	Dim.1	Dim.2	Dim.3	Dim.4
Al	**0.7670676**	0.17372986	-0.32852882	-0.150833820
As	0.3678545	0.06515027	**-0.82300344**	0.257843560
Cu	**0.7451957**	-0.18047408	-0.10746959	0.139103958
Cr	0.2117460	**0.79742576**	0.44840860	-0.133154600
Fe	**0.7799539**	0.46789181	0.14468055	0.042533009
Mn	0.4132784	0.02374604	0.42103924	**0.771413256**
Ni	0.3237883	**-0.64748442**	0.50636175	-0.075640461
Pb	**0.7475730**	-0.10807213	0.10705402	-0.517662474
Zn	**0.7419940**	-0.37183542	0.01219851	0.006584732

Significancia de las correlaciones de las variables con los componentes principales (p < 0.01)

Con el componente N°1

	correlation	p.value
Fe	0.7799539	1.615289e-06
Al	0.7670676	3.049193e-06
Pb	0.7475730	7.416156e-06
Cu	0.7451957	8.220432e-06
Zn	0.7419940	9.426788e-06

Con el componente N°2

	correlation	p.value
Cr	0.7974258	6.361790e-07
Ni	-0.6474844	2.613904e-04

Con el componente N°3

	correlation	p.value
Ni	0.5063617	7.037366e-03
As	-0.8230034	1.365391e-07

Con el componente N°4

	correlation	p.value
Mn	0.7714133	2.472329e-06
Pb	-0.5176625	5.683021e-03

Cosenos al cuadrado (cos2) de los componentes (cuatro primeros) con las variables

Cos2 variables

	Dim.1	Dim.2	Dim.3	Dim.4
Al	0.58839273	0.0301820628	0.1079311887	2.275084e-02
As	0.13531691	0.0042445581	0.6773346640	6.648330e-02
Cu	0.55531668	0.0325708922	0.0115497121	1.934991e-02
Cr	0.04483635	0.6358878503	0.2010702682	1.773015e-02
Fe	0.60832803	0.2189227466	0.0209324611	1.809057e-03
Mn	0.17079905	0.0005638745	0.1772740432	5.950784e-01
Ni	0.10483883	0.4192360699	0.2564022204	5.721479e-03
Pb	0.55886532	0.0116795847	0.0114605626	2.679744e-01
Zn	0.55055507	0.1382615809	0.0001488037	4.335869e-05

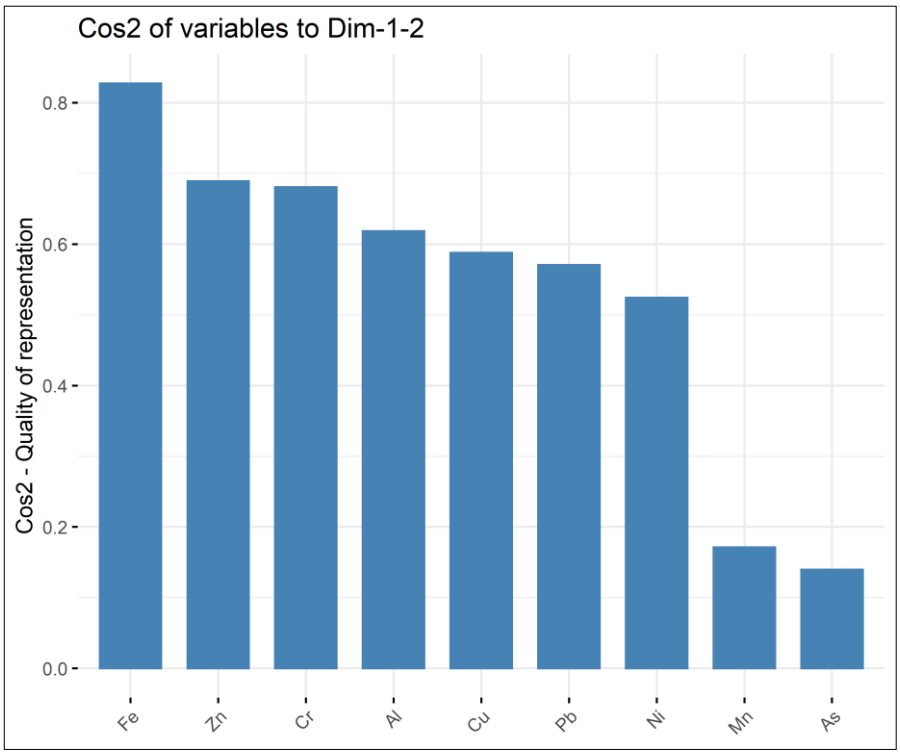



Gráfico de barras con los valores de la suma de cosenos al cuadrado (cos2) de los primeros dos componentes