



UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE MICROBIOLOGÍA Y
PARASITOLOGÍA



Caracterización de consorcios de bacterias rizosféricas
tolerantes al Cr^{+6} aisladas de malezas y su influencia en la
fitorremediación de suelo contaminado

TESIS
PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN
BIOLOGÍA - MICROBIOLOGÍA - PARASITOLOGÍA

AUTORES :

Bach. Recoba Colchón, Felipe Ernesto

Bach. Vera Flores, Max Salvador

ASESORA:

Dra. Carmen Rosa Carreño Farfán

LAMBAYEQUE - PERÚ
2021

Caracterización de consorcios de bacterias rizosféricas
tolerantes al Cr^{+6} aisladas de malezas y su influencia en la
fitorremediación de suelo contaminado

TESIS

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA –
MICROBIOLOGÍA - PARASITOLOGÍA

APROBADA POR:

Dr. César Estela Campos
PRESIDENTE

Dr. Antero Celso Vásquez García
SECRETARIO

Dra. Gianina Llontop Barandiarán
VOCAL

Dra. Carmen Rosa Carreño Farfán
ASESORA

LAMBAYEQUE. PERÚ

2021

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN	10
II.	MARCO TEÓRICO	12
2.1.	Antecedentes de la investigación	12
2.2.	Base teórica	14
2.2.1.	El metal pesado cromo	16
2.2.2.	Toxicidad del cromo	17
2.2.3.	Interacción de los microorganismos con el cromo	18
2.2.4.	Interacción de las plantas con el cromo	20
2.2.5.	Fitorremediación	21
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
3.1.	Materiales	24
3.1.1.	Material biológico.....	24
3.1.2.	Población y muestra	24
3.2.	Métodos	24
3.2.1.	Variables.....	24
3.2.2.	Tipo de estudio y diseño de contrastación de hipótesis.....	24
3.2.3.	Primera etapa.....	26
3.2.4.	Segunda etapa: Fitorremediación de suelo contaminado con Cr ⁺⁶	35
3.3.	Análisis estadístico de los datos	37
IV.	RESULTADOS	38
4.1.	Malezas tolerantes al Cr ⁺⁶ en la región Lambayeque, 2019.....	38
4.2.	Consortios de bacterias tolerantes al Cr ⁺⁶ , con actividad ACC desaminasa aisladas en la rizósfera de malezas en Lambayeque, 2019	38
4.3.	Características que evidencian <i>in vitro</i> promoción de crecimiento vegetal en los consorcios de bacterias tolerantes al Cr ⁺⁶ y con actividad ACC desaminasa	55
4.4.	Influencia de tres consorcios de bacterias tolerantes al Cr ⁺⁶ en la fitorremediación de suelo contaminado	55
4.5.	Identificación fenotípica del género de las bacterias del consorcio con la mayor influencia en la fitorremediación	61
V.	DISCUSIÓN.....	65
VI.	CONCLUSIONES.....	69
VII.	RECOMENDACIONES.....	70
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
	ANEXOS.....	79

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Malezas colectadas en campos agrícolas de la región Lambayeque, 2018	39
Tabla 2. Número de brotes en malezas adaptadas a condiciones de invernadero en Lambayeque, 2018	42
Tabla 3. Malezas tolerantes al Cr ⁺⁶ en condiciones de invernadero, Lambayeque 2019	42
Tabla 4. Número de brotes y tallos u hojas con clorosis y marchitez en malezas tolerantes al Cr ⁺⁶ en Lambayeque, 2019	45
Tabla 5. Número de cultivos bacterianos obtenidos en la rizósfera de malezas tolerantes al Cr ⁺⁶ en Lambayeque, 2019	52
Tabla 6. Número de cultivos bacterianos con actividad ACC desaminasa obtenidos en la rizósfera de malezas tolerantes al Cr ⁺⁶ en Lambayeque, 2019	54
Tabla 7. Frecuencia de bacterias Gram positivas y Gram negativas en consorcios microbianos tolerantes al Cr ⁺⁶ con actividad ACC desaminasa	54
Tabla 8. Índices de solubilización de fosfato, fósforo soluble e indoles producidos por bacterias con actividad ACC desaminasa aisladas de la rizósfera de malezas tolerantes al Cr ⁺⁶ en Lambayeque, 2019	58
Tabla 9. Prueba de comparaciones múltiples de Tukey de la altura de <i>Cyperus corymbosus</i> , <i>Echinochloa colonum</i> y <i>Sorghum halepense</i> durante la fitorremediación con y sin consorcios de bacterias rizosféricas tolerantes	59
Tabla 10. Índices de efectividad de bacterias tolerantes al Cr ⁺⁶ en la altura de <i>Cyperus corymbosus</i> , <i>Echinochloa colonum</i> y <i>Sorghum halepense</i> durante la fitorremediación de suelo contaminado	59
Tabla 11. Índices de germinación de <i>Raphanus sativus</i> L. en suelo contaminado con Cr ⁺⁶ durante la fitorremediación e inoculación de consorcios de bacterias rizosféricas tolerantes	60
Tabla 12. Niveles de fitotoxicidad de suelo contaminado con Cr ⁺⁶ durante la fitorremediación con malezas e inoculación de consorcios de bacterias rizosféricas tolerantes	62
Tabla 13. Características del suelo fitorremediado con <i>Cyperus corymbosus</i> y el consorcio 1 de bacterias tolerantes al Cr ⁺⁶	62
Tabla 14. Factor de bioconcentración de Cr ⁺⁶ en raíces de <i>Cyperus corymbosus</i> después de fitorremediación con el consorcio 1 de bacterias tolerantes	63
Tabla 15. Características diferenciales del género <i>Pseudomonas</i>	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diseño completamente aleatorio con arreglo factorial para determinar la eficiencia de consorcios de bacterias rizosféricas en la fitorremediación de suelo contaminado con Cr^{+6}	25
Figura 2. Distrito de Reque en la región Lambayeque, 2019	27
Figura 3. Botadero de residuos sólidos municipales en el distrito de Reque, región Lambayeque, 2019.	27
Figura 4. Recolección de malezas en la ciudad de Reque, región Lambayeque, 2018.	29
Figura 5. Adaptación de malezas a condiciones de invernadero en Lambayeque, 2018.	29
Figura 6. Bacterias enriquecidas en caldo nutritivo con Cr^{+6} , Lambayeque 2018.....	31
Figura 7. Caldo NBRIP cultivado con bacterias con actividad ACC desaminasa, Lambayeque 2019.	34
Figura 8. Caldo tripticasa soya suplementado con triptófano cultivado con bacterias con actividad ACC desaminasa, Lambayeque 2019	34
Figura 9. Plantas de <i>Pascalía glauca</i> adaptadas a condiciones de invernadero en Lambayeque, 2018	40
Figura 10. Plantas de <i>Solanum americanum</i> adaptadas a condiciones de invernadero en Lambayeque, 2018	40
Figura 11. Plantas de <i>Chenopodium album</i> adaptadas a condiciones de invernadero en Lambayeque, 2018	41
Figura 12. Plantas de <i>Portulaca oleracea</i> adaptadas a condiciones de invernadero en Lambayeque, 2018	41
Figura 13. Rango de la altura de <i>Cyperus corymbosus</i> tolerante al Cr^{+6} en Lambayeque, 2019.....	43

Figura 14. Rango de la altura de <i>Echinochloa colonum</i> tolerante al Cr^{+6} en Lambayeque, 2019.....	43
Figura 15. Rango de la altura de <i>Sorghum halepense</i> tolerante al Cr^{+6} en Lambayeque, 2019.....	44
Figura 16. Quemadura en hojas de <i>Pascalia glauca</i> no tolerante al Cr^{+6} en Lambayeque, 2019.....	46
Figura 17. Enrollamiento en hojas de <i>Amaranthus viridis</i> no tolerante al Cr^{+6} en Lambayeque, 2019.....	46
Figura 18. Clorosis en hojas de <i>Echinochloa colonum</i> tolerante al Cr^{+6} en Lambayeque, 2019.....	47
Figura 19. Tinte purpúreo en hojas de <i>Sorghum halepense</i> tolerante al Cr^{+6} en Lambayeque, 2019.....	47
Figura 20. Marchitamiento en <i>Amaranthus viridis</i> no tolerante al Cr^{+6} en Lambayeque, 2019.....	48
Figura 21. Muerte total en <i>Lycopersicon pimpinellifolium</i> no tolerante al Cr^{+6} en Lambayeque, 2019.....	48
Figura 22. Plantas de <i>Cyperus corymbosus</i> tolerantes al Cr^{+6} en Lambayeque, 2019.....	49
Figura 23. Plantas de <i>Echinochloa colonum</i> tolerantes al Cr^{+6} en Lambayeque, 2019.....	49
Figura 24. Plantas de <i>Sorghum halepense</i> tolerantes al Cr^{+6} en Lambayeque, 2019.	50
Figura 25. Bacterias rizosféricas de plantas tolerantes al Cr^{+6} aisladas en agar nutritivo con el contaminante, Lambayeque, 2019.....	51
Figura 26. Cultivos bacterianos procedentes de la rizósfera de malezas tolerantes al Cr^{+6} en Lambayeque, 2019.....	52

- Figura 27.** Turbidez desarrollada en medio mínimo de sales por bacterias con actividad ACC desaminasa aisladas de la rizósfera de plantas tolerantes al Cr^{+6} en Lambayeque, 2019.....53
- Figura 28.** Cultivos de bacterias con actividad ACC desaminasa aisladas de la rizósfera de plantas tolerantes al Cr^{+6} en Lambayeque, 2019.53
- Figura 29.** Halos de solubilización de fosfato en agar NBRIP por bacterias tolerantes al Cr^{+6} con actividad ACC desaminasa en Lambayeque, 2019.56
- Figura 30.** Halos de solubilización de fosfato en agar NBRIP por bacterias tolerantes al Cr^{+6} con actividad ACC desaminasa en Lambayeque, 2019.56
- Figura 31.** Coloración observada en la cuantificación de fósforo solubilizado por bacterias tolerantes al Cr^{+6} con actividad ACC desaminasa en Lambayeque, 2019.....57
- Figura 32.** Coloración observada en la cuantificación de indoles producidos por bacterias tolerantes al Cr^{+6} con actividad ACC desaminasa en Lambayeque, 2019.....57

RESUMEN

La presente investigación se realizó con el objetivo de determinar las características de los consorcios de bacterias rizosféricas tolerantes al Cr^{+6} aisladas de malezas y su influencia en la fitorremediación de suelo contaminado. Las malezas previamente adaptadas en condiciones de invernadero se regaron con soluciones de 15, 30, 60, 120 y 240 mg kg^{-1} Cr^{+6} y se seleccionaron las plantas tolerantes después de 60 días. En la rizósfera se aislaron bacterias tolerantes al Cr^{+6} y se les investigaron las características que demuestran *in vitro* promoción de crecimiento en plantas. Tres consorcios microbianos se inocularon en el suelo con Cr^{+6} (564,6 mg kg^{-1}) y se trasplantaron plántulas con similares fenotipos. Después de 60 días, se cuantificó el Cr^{+6} en las raíces y en el suelo con la menor toxicidad en la germinación de semillas de *Raphanus sativus* L. “rabanito”. *Cyperus corymbosus*, *Echinochloa colonum* y *Sorghum halepense* se identificaron como malezas tolerantes al Cr^{+6} . En la rizósfera se seleccionaron tres consorcios de bacterias tolerantes con actividad de la enzima 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) desaminasa, y capacidad para solubilizar fosfatos y producir indoles. Los consorcios de bacterias promovieron el crecimiento de las plantas e incrementaron la fitorremediación del suelo contaminado, destacando el tratamiento *C. corymbosus* con el consorcio 1 con el que se alcanzó 77,55 % de eficiencia en la fitorremediación y un factor de bioconcentración de 2,24.

Palabras clave: bacterias, cromo, malezas, fitorremediación

ABSTRACT

The present investigation was carried out in order to determine the characteristics of the Cr^{+6} - tolerant rhizospheric bacteria consortia isolated from weeds and their influence on the phytoremediation of contaminated soil. Weeds previously adapted in greenhouse conditions were watered with solutions of 15, 30, 60, 120 and 240 mg kg^{-1} Cr^{+6} and tolerant plants were selected after 60 days. In the rhizosphere, bacteria tolerant to Cr^{+6} were isolated and the characteristics that show in vitro growth promotion in plants were investigated. Three microbial consortia were inoculated into the soil with Cr^{+6} (564.6 mg kg^{-1}) and seedlings with similar phenotypes were transplanted. After 60 days, the Cr^{+6} were quantified in the roots and in the soil with the least toxicity in the germination of seeds of *Raphanus sativus* L. "radish". *Cyperus corymbosus*, *Echinochloa colonum* and *Sorghum halepense* were identified as Cr^{+6} tolerant weeds. In the rhizosphere, three tolerant bacteria consortia with activity of the enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylic (ACC) deaminase, and ability to solubilize phosphates, were selected and produce indoles. The bacteria consortia promoted plant growth and increased the phytoremediation of the contaminated soil, highlighting the *C. corymbosus* treatment with consortium 1, which achieved 77.55 % efficiency in phytoremediation and a bioconcentration factor of 2,24.

Keywords: bacteria, chromium, molasses, phytoremediation

I. INTRODUCCIÓN

El cromo (Cr) es un metal pesado con múltiples aplicaciones en la industria (Morales, 2017); sin embargo la disposición inadecuada en el suelo (Morales, 2017) de los residuos contaminados con cromo afecta en forma negativa a los seres vivos y ambiente (Abril, 2016). Los estados de oxidación varían de 2^+ a 6^+ , siendo los más estables el Cr^{+3} y Cr^{+6} (Jobby et al., 2018). El Cr^{+3} es relativamente insoluble, no tóxico y precipita como hidróxido. El Cr^{+6} es más soluble, móvil, tóxico (Murcia et al., 2014) y carcinogénico para los humanos (Jobby et al., 2018).

En el suelo predomina el Cr^{+3} debido a su baja solubilidad y absorción a las partículas (Ahemad, 2015); no obstante, el pH alcalino, bajo contenido de materia orgánica y altas temperaturas favorecen la oxidación del Cr^{+3} a Cr^{+6} (Morales, 2017). La Agencia de Protección del Ambiente de los Estados Unidos (US EPA) ha identificado el Cr^{+6} como uno de los 17 elementos con mayor toxicidad para los humanos (Cheung y Gu, 2007).

En suelos contaminados se han cuantificado $10\,006\text{ mg kg}^{-1}$ de Cr total en Ecuador (Morales, 2017), 575 mg kg^{-1} de Cr total en México (García et al., 2010), 118 mg kg^{-1} de Cr total en Colombia (Cordero, 2015) y 30 mg kg^{-1} de Cr^{+6} en la India (Gupta et al., 2018). En el Perú se reportaron 637 mg kg^{-1} de Cr^{+6} en el suelo aledaño a curtiembres (García, 1993), concentración que supera significativamente los estándares de calidad ambiental (ECA) en Cr^{+6} para suelo que son de $0,4\text{ mg kg}^{-1}$ para suelo agrícola, residencial y parques y $1,4\text{ mg kg}^{-1}$ para suelo comercial, industrial y extractivo (Ministerio del Ambiente, MINAM, 2017).

La concentración de Cr^{+6} puede ser disminuida mediante procesos fisicoquímicos, como la reducción-precipitación, intercambio de iones y ósmosis reversa (Sinha et al., 2018); sin embargo, estos métodos tienen alto costo operacional, consumen energía, producen contaminantes secundarios, solo se pueden aplicar cuando la concentración del metal es alta (Jobby et al., 2018) y por tanto no son viables para su aplicación a escala comercial (Cheung y Gu, 2007).

La biorremediación es un método biológico que usa los sistemas vivos como los microorganismos (Jobby et al., 2018) y plantas (Abril, 2016) para remover o detoxificar los contaminantes como el Cr^{+6} . Las malezas pueden ser utilizadas en la fitorremediación de suelo contaminado con Cr (Kumar et al., 2013); sin embargo, el proceso es muy lento (Ahemad, 2015). Las bacterias rizosféricas tienen potencial para tolerar el Cr y promover el crecimiento de las plantas (Bahadur et al., 2017; Gupta et al., 2017); no obstante, previo a su utilización deben ser aisladas y caracterizadas. En la región Lambayeque no se ha investigado la influencia de estas bacterias en la recuperación de suelo contaminado con Cr^{+6} utilizando malezas de la zona.

En el botadero de residuos en Reque el suelo es contaminado por materiales de diversa procedencia, no solo municipales sino también industriales y no existe alguna entidad que investigue y proponga alternativas para la biorremediación. En este contexto, se planteó el siguiente problema: ¿Cuáles son las características de los consorcios de bacterias rizosféricas tolerantes al Cr^{+6} aisladas de malezas y cuál es su influencia en la fitorremediación de suelo contaminado? La hipótesis planteada fue: Los consorcios de bacterias rizosféricas tolerantes al Cr^{+6} aisladas de malezas, presentan actividad de la enzima 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) desaminasa y promueven el crecimiento en plantas e incrementan la fitorremediación de suelo contaminado.

El objetivo general de la investigación fue: Determinar las características de los consorcios de bacterias rizosféricas tolerantes al Cr^{+6} aisladas de malezas y su influencia en la fitorremediación de suelo contaminado. Los objetivos específicos fueron: Identificar malezas tolerantes al Cr^{+6} en la región Lambayeque, 2019, seleccionar los consorcios de bacterias tolerantes al Cr^{+6} y con actividad ACC desaminasa, aisladas en la rizósfera de las malezas, identificar las características que evidencian *in vitro* promoción de crecimiento vegetal en los consorcios de bacterias tolerantes al Cr^{+6} y con actividad ACC desaminasa, determinar la influencia de tres consorcios de bacterias en la fitorremediación de suelo contaminado con Cr^{+6} e identificar fenotípicamente el género las bacterias del consorcio con la mayor influencia en la fitorremediación.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes de la investigación

En la fitorremediación de suelo contaminado con Cr se ha investigado *Amaranthus viridis* (Liu et al., 2008), *Spartina argentinensis* (Redondo et al, 2011), *Brachiaria mutica* (Mohanty y Patra, 2012), *Miscanthus sinensis* (Sharmin et al., 2012), *Solanum xanthocarpum*, *Spinacia oleracea* y *Tridax procumbens* (Kumar et al., 2013), *Phragmites australis* (Ranieri et al., 2013), *Pteris vittata* (De Oliveira et al., 2014), *Tradescantia pallida* (Sinha et al., 2014), *Leersia hexandra* (Liu et al., 2015), *Medicago sativa* (Abril, 2016), *Helianthus annuus* L. (Bahadur et al., 2017), *Triticum aestivum* L. (Gupta et al., 2017).

Bahadur et al. (2017) investigaron la influencia de rizobacterias tolerantes al Cr^{+6} en la fitorremediación con *Helianthus annuus* L. Las bacterias se aislaron de suelo contaminado, el suelo se acondicionó en macetas de 12 kg y se contaminó con $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$: (20, 30 y 40 ppm). Después de 1 mes se sembraron las semillas inoculadas con las bacterias, incluyendo testigos con agua destilada. Se seleccionaron las bacterias SS1, SS3 y SS6, que incrementaron la longitud radicular de las plantas en 17-33 % (sin Cr^{+6}) y 20-50 % (con Cr^{+6}). Asimismo, aumentaron significativamente la altura, diámetro del tallo y cabeza floral, rendimiento de grano y contenido de aceite en semillas. Se concluyó que las bacterias pueden ser utilizadas para la fitorremediación de suelo con Cr^{+6} .

Gupta et al. (2017) estudiaron el comportamiento de *Klebsiella* CPSB4 aislada de suelo de la rizósfera de *Triticum aestivum* L. En agar Pikovskaya con 50 mgL^{-1} de Cr^{+6} se seleccionó la bacteria con el mayor índice de solubilización (IS), se cuantificó el fósforo soluble, ácido indolacético (AIA), sideróforos y amoníaco (NH_3) y se realizó la caracterización molecular. Se obtuvieron diez aislados de bacterias y se seleccionó CPSB4 por alcanzar un $\text{IS} > 2$. Se cuantificaron 190 mgPL^{-1} y 16 mgmL^{-1} AIA y se detectaron sideróforos, NH_3 y reducción del 95 % de Cr^{+6} en el suelo contaminado con 50 mgkg^{-1} . Se identificó *Klebsiella* sp., en la que se demostró el potencial para la fitorremediación de Cr^{+6} .

Abril (2016) determinó la velocidad de degradación de Cr^{+6} aplicando la fitorremediación en suelo y agua. Se utilizó *Medicago sativa* “alfalfa” en suelo y *Eichhornia crassipes* “lechugón” en agua. La planta piloto para suelo correspondió a un contenedor de vidrio con 25 kg de suelo y para agua un recipiente de vidrio con 30 L de agua. Las especies vegetales fueron trasplantadas al suelo con $0,28 \text{ mg kg}^{-1} \text{ Cr}^{+6}$ y agua con $2 \text{ mg kg}^{-1} \text{ Cr}^{+6}$ y se cuantificó el Cr^{+6} en suelo, agua y tejido vegetal a los 0, 45 y 65 días. En el suelo y agua el Cr^{+6} alcanzó 93 y 99 % de remoción, respectivamente. Respecto al Cr^{+6} en los tejidos vegetales, *E. crassipes* absorbió el 86 % y *M. sativa* el 68 % del metal. Se demostró que la remoción del Cr^{6+} es más rápida en agua que en suelo, destacando *E. crassipes* frente a *M. sativa*.

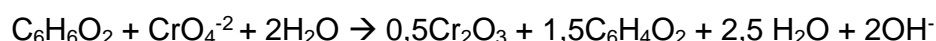
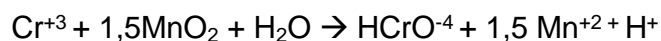
Kumar et al. (2013) investigaron el potencial de acumulación de metales pesados en 20 especies de plantas cultivadas y malezas desarrolladas en un suelo que presentó ($\mu\text{g g}^{-1}$) Cr (74,66), Cu (62,05), Ni (31,04), Pb (41,02) y Cd (19,49). Se encontró una acumulación heterogénea de metales en las raíces y follaje. La concentración de Cr, Cu, Ni, Pb y Cd en los tejidos radiculares fue de 3-67, 3-45, 2-14, 6-58 y $0,3\text{-}3 \mu\text{g g}^{-1}$ y en el follaje fue de 5-125; 2-19; 1-15; 5-44 y $0,2\text{-}3 \mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente. El factor de translocación osciló entre 0,453-1,938; 0,136-3,26; 0,346-2,065; 0,277-3,857 y 0,119-3,314 para el Cr, Cu, Ni, Pb y Cd y todas las malezas presentaron un coeficiente de enriquecimiento mayor de 1, valores que reflejan el potencial para la acumulación de metales pesados.

Sanchez (2008) analizó un suelo con vertimientos de una empresa de cerámicas, con el objetivo de identificar las plantas acumuladoras y microorganismos tolerantes al Fe, Pb, Zn, Cu, Ni, Co, Mn y Cr. La concentración de los metales pesados fue en el orden de $\text{Pb} > \text{Zn} > \text{Fe} > \text{Co} > \text{Cr} > \text{Mn} > \text{Ni} > \text{Cu}$. En *Cynodon dactylon* (L.) Pers, *Cyperus giganteus* L., *Typha dominguensis* (Pers.) Kunth y *Xanthosoma cubense* (Rich) Schottl se cuantificaron en mayor concentración Pb y Zn en las hojas y raíces. El factor de translocación demostró que *C. dactylon* es hiperacumuladora de Pb y Zn. En esta planta se aislaron 36 morfotipos de bacterias, que desarrollaron con 0,5 mM de PbCl_2 y ZnCl_2 . Se evidenció el potencial de plantas y microorganismos para la fitorremediación de suelos contaminados.

2.2 Base teórica

Metal pesado es todo elemento metálico con alta densidad, en comparación con el agua y toxicidad aún en baja concentración (Lenntech, 2004, citado por Jobby et al., 2018). La mayoría de los metales pesados como el arsénico (As), cadmio (Cd), plomo (Pb), mercurio (Hg) y cromo (Cr) son considerados contaminantes ambientales por su toxicidad, no biodegradabilidad, persistencia en la naturaleza y tendencia a la bioacumulación (Jobby et al., 2018).

Las formas del Cr estables en el ambiente son el Cr^{+3} y Cr^{+6} , siendo este último altamente tóxico, mutagénico, soluble y por tanto móvil en el suelo y agua (Gutiérrez et al., 2010). La característica del ciclo del Cr es la oxidación en simultáneo a la reducción. El Cr^{+3} es oxidado a Cr^{+6} en el suelo y sedimentos en forma espontánea por el óxido de manganeso (MnO_2) y el Cr^{+6} es reducido a Cr^{+3} por diferentes compuestos carbonados del suelo (Jobby et al., 2018):



La fitorremediación del suelo contaminado con Cr está basada en la fitoextracción, utilizando plantas hiperacumuladoras para extraer el contaminante a través de las raíces y translocarlo a otras partes (Sinha et al., 2018); sin embargo, el proceso es lento y requiere aumentar la biomasa y crecimiento radicular. Las bacterias promotoras de crecimiento en plantas (Plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR) pueden incrementar la remediación del suelo contaminado, tanto como el crecimiento de las plantas. En forma directa aumentan la acumulación de metales pesados por las plantas (fitoextracción) o mitigan el efecto tóxico de los metales pesados en las plantas mediante la fitoestabilización en suelos muy contaminados, donde no funciona la fitoextracción (Ahemad, 2015).

Las plantas inoculadas con bacterias promotoras de crecimiento en plantas reductoras del Cr^{+6} se adaptan mejor a los suelos contaminados con el metal pesado y a la vez, estas bacterias inducen cambios en el metabolismo de las plantas que las hacen más tolerantes al estrés. Las bacterias incrementan la reducción del Cr^{+6} en el suelo rizosférico y también promueven el crecimiento vegetal (Sinha et al., 2018). Las PGPR producen sideróforos, ácidos orgánicos, biosurfactantes, ácido indolacético (AIA) y presentan actividad ACC desaminasa (Ahemad 2015).

Los sideróforos disminuyen la inhibición de la síntesis de clorofila debido a la deficiencia de hierro inducida por los metales pesados y disminuyen la formación de radicales libres en la rizósfera. Los ácidos orgánicos solubilizan y movilizan los metales de las fuentes inorgánicas. Los biosurfactantes aceleran la disponibilidad de los metales disminuyendo su adherencia a las partículas del suelo. El AIA incrementa el crecimiento vegetal, promueve la absorción de nutrientes y metales mediante la proliferación de raíces y la actividad ACC desaminasa disminuye los niveles del etileno producidos en las plantas con estrés por metales (Ahemad, 2015).

El Decreto Supremo N° 011-2017-MINAM publicado el 2 de diciembre de 2017 aprobó los Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para suelo, que constituyen un referente obligatorio para el diseño y aplicación de los instrumentos de gestión ambiental y son aplicables para aquellos parámetros asociados a las actividades productivas, extractivas y de servicios. Según el ECA los niveles permisibles de Cr total son de: 400 mg kg⁻¹ para suelo de uso agrícola, residencial y parques y 1000 mg kg⁻¹ en suelo comercial, industrial o extractivo y en cuanto a Cr⁺⁶ son 0,4 mg kg⁻¹ en suelo de uso agrícola, residencial y parques y 1,4 mg kg⁻¹ en suelo comercial, industrial o extractivo (Ministerio del Ambiente, MINAM, 2017).

Los parámetros principales para evaluar el potencial de las plantas para remediar un metal en particular son el factor de bioconcentración: (FBC o BCF) y translocación: TF (Sinha et al., 2018). El factor de bioconcentración determina el grado de acumulación de metales pesados en las plantas desarrolladas en un suelo contaminado o la eficiencia de la planta para acumular el metal (Covarrubias y Peña, 2017):

$$BCF = \frac{\text{Concentración del metal en raíces o follaje}}{\text{Concentración del metal en el sitio contaminado}}$$

El factor de translocación o tasa de movilización del metal determina la translocación del metal desde la raíz hasta el follaje de la planta o la eficiencia de la planta para transportar el metal desde la raíz a la parte aérea:

$$TF = \frac{\text{Concentración del metal en el follaje}}{\text{Concentración del metal en las raíces}}$$

(Covarrubias y Peña, 2017).

2.2.1 El metal pesado cromo

El Cr es un elemento químico de número atómico 24 y peso atómico 51,9996 g/mol, densidad 7,19 g/cm³, punto de fusión 1,857 °C y punto de ebullición 2665 °C (Martínez, 2009). Es un metal perteneciente al grupo VI-B de transición de la tabla periódica, con un rango de oxidación de Cr⁺² a Cr⁺⁶. Constituye el 0,037 % de las rocas y ocupa el 21vo lugar de abundancia en la naturaleza. Las formas más estables y comunes en el ambiente son la trivalente (Cr⁺³) y hexavalente (Cr⁺⁶). Los estados intermedios de oxidación no son estables y no se presentan naturalmente (Sinha et al., 2018).

El Cr⁺³ predomina en condiciones reductoras (Jobby et al., 2018). Es la forma más común en la naturaleza y forma complejos con la materia orgánica del suelo y agua. Forma óxidos (Cr₂O₃), hidróxidos [Cr(OH)₃] o sulfatos [Cr₂(SO₄)₃·12H₂O] (Sinha et al., 2018) poco solubles, por lo cual es poco móvil y se encuentra unido a la materia orgánica en el suelo y el agua. Se oxida a Cr⁺⁶ en ambientes oxigenados y en condiciones anóxicas solo se encuentra Cr⁺³. Es predominante a pH menor de 6. Precipita a pH neutro o básico y es soluble en medio ácido (Sinha et al., 2018; Gutiérrez y Cervantes, 2008).

El Cr⁺⁶ es dominante en condiciones oxidantes. En solución acuosa puede formar dicromatos (Cr₂O₇⁻²), ácido crómico (H₂CrO₄) ion cromato (CrO₄⁻²) e ion hidrógeno cromato (HCrO₄⁻). Cuando el pH de la solución es mayor de 7, solo se encuentra ion cromato independientemente de la concentración de Cr⁺⁶ y en un rango de pH de 1 a 6 predomina el ion hidrógeno cromato (Jobby et al., 2018). Se reduce a Cr⁺³ en suelos ácidos con elevada proporción de materia orgánica. Es predominante a pH mayor de 7 (Sinha et al., 2018).

El Cr⁺⁶ es considerado la forma más tóxica del Cr y usualmente se encuentra asociado al oxígeno en forma de oxianiones hidrosolubles hidrocromatos (HCrO₄⁻), cromatos (CrO₄⁻²) y dicromatos (Cr₂O₇⁻²), que debido a su gran solubilidad son muy móviles en el suelo y agua (Gutiérrez y Cervantes, 2008). El Cr⁺⁶ es un fuerte agente oxidante y en presencia de materia orgánica es reducido a Cr⁺³, sobre todo en ambientes ácidos (Gutiérrez et al., 2010); sin embargo, el proceso es lento y niveles elevados de Cr⁺⁶ sobrepasan la capacidad reductora del ambiente, por lo que persiste en el ambiente (Gutiérrez y Cervantes, 2008).

La tasa de $\text{Cr}^{+6} / \text{Cr}^{+3}$ depende del pH, concentración de oxígeno disuelto,

presencia de agentes reductores y factores ambientales. Los compuestos de Cr divalentes (2+) son el óxido cromoso (CrO) e hidróxido cromoso $[\text{Cr}(\text{OH})_2]$, tetravalente (4+) tetróxido crómico (CrO₂), pentavalente (5+) pentóxido crómico (Cr₂O₅), trivalentes (3+): óxido crómico (Cr₂O₃), hidróxido crómico (Cr₂O₃·xH₂O), cromitos (Cr₂O₄)₂ y hexavalentes (6+): anhídrido crómico (CrO₃), cromatos (CrO₄²⁻) y dicromatos (Cr₂O₇²⁻) (Sinha et al., 2018).

Las actividades en las que se usa cromo son el refinado de cromo (cromato), artes gráficas (ácido crómico, dicromato de sodio), metalurgia (óxido crómico, cromatos), pinturas, gomas, vidrios, porcelana (óxido verde cromo, hidróxido de cromo, cromato de plomo), motores diésel, calderas, sistemas de aire acondicionado, tintes para madera, carpintería, minería (dicromatos, alcalinos), producción de cemento, industria de construcción, lavanderías, limpiadores, industria textil (cromatos) e industria del cuero y calzado que usa sulfato de cromo y aluminato de cromo (Martínez, 2009).

2.2.2 Toxicidad del cromo

La toxicidad del Cr⁺⁶ se debe a su fácil difusión a través de la membrana celular y reducción en el interior de las células con producción de radicales libres y especies reactivas de oxígeno (ERO). El Cr⁺⁶ como un oxianión (cromato o dicromato) es transportado en forma activa al interior de las células mediante el transportador de sulfato (Ahemad, 2015). El Cr⁺⁶ presenta analogía química con el sulfato, por lo que es un inhibidor competitivo del transporte de este ion esencial en las bacterias (Ramírez et al., 2009).

El Cr⁺⁶ en el interior de las células reacciona espontáneamente con reductores intracelulares (ascorbato y glutatión) y genera los intermediarios Cr⁺⁵ o Cr⁺⁴, radicales libres y finalmente Cr⁺³. El Cr⁺⁵ regenera a Cr⁺⁶ (Cheung y Gu, 2007). Los intermediarios reducidos de Cr en presencia de H₂O₂ funcionan como catalizadores de una reacción tipo Fenton, formándose ERO que producen peroxidación de lípidos, oxidación de proteínas y ácidos nucleicos (Gutiérrez et al., 2010).

El Cr^{+3} es relativamente inocuo y constituye un oligoelemento indispensable para el metabolismo de la glucosa, colesterol y ácidos grasos (Gutiérrez y Cervantes, 2008). La insolubilidad del Cr^{+3} extracelular e impermeabilidad a la membrana celular lo hacen 10 a 100 veces menos tóxico que el Cr^{+6} , no obstante, el Cr^{+3} intracelular resultante de la reducción del Cr^{+6} forma complejos con los ácidos nucleicos con potencial mutagénico (Jobby et al., 2018).

La exposición al Cr^{+6} en los humanos causa irritación nasal y ulceración, irritación de la piel, perforación del tímpano y carcinoma de pulmón. Este metal se acumula en la placenta, afectando el desarrollo del feto. En el suelo el Cr altera la estructura de la comunidad microbiana, reduce la actividad metabólica y como consecuencia se acumula en la materia orgánica (Cheung y Gu, 2007).

El Cr está asociado a la disminución del crecimiento vegetal y cambios en la morfología de la planta. El rango de la toxicidad para las plantas es $0,5\text{-}5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ en las soluciones de nutrientes y $5\text{-}100 \text{ mg kg}^{-1}$ en el suelo. En su mayoría el Cr se acumula en las raíces y en mínima cantidad se transloca al follaje. Los síntomas de toxicidad por Cr en las plantas son reducción de la germinación de las semillas, crecimiento y rendimiento, inhibición de la actividad enzimática y fotosíntesis, desbalance oxidativo y mutagénesis (Bahadur et al., 2017).

2.2.3 Interacción de los microorganismos con el cromo

Los microorganismos pueden movilizar o inmovilizar un metal. La movilización es el pasaje de un estado insoluble inicial, correspondiente a una fase sólida a un estado soluble final en fase acuosa. Ejemplo: los metales asociados a suelos (sulfuros u óxidos metálicos) que pueden ser recuperados mediante la biolixiviación y biooxidación. La inmovilización del metal es el pasaje de un estado soluble inicial en fase acuosa a una insoluble final en fase sólida. Los procesos de inmovilización son la biotransformación, biosorción, bioacumulación, biomineralización y quimiosorción (Soto et al., 2010).

Los microorganismos pueden ser tolerantes y resistentes a los metales pesados. Los tolerantes son indiferentes a la presencia o ausencia de los contaminantes. Los microorganismos resistentes tienen mecanismos de detoxificación inducidos por el metal. La tolerancia y resistencia de los microorganismos a los metales se atribuye a los mecanismos de biotransformación, biosorción, bioacumulación, biomineralización y quimiosorción (Martínez, 2009).

Los microorganismos de sitios contaminados con cromato muestran resistencia al ion, debido a que tienen mecanismos que les permiten removerlo o detoxificarlo, es decir sistemas de transporte e incorporación (bioacumulación), interacción y unión a componentes de la superficie celular (biosorción) y transformación química (reducción). El fenotipo de resistencia a los cromatos en las bacterias se explica por la alteración en el transportador de sulfatos que también es utilizado por el Cr^{+6} , así como también por determinantes genéticos presentes en plásmidos los cuales codifican transportadores de membrana que dirigen el flujo de los iones cromato desde el citoplasma al exterior (Gutiérrez y Cervantes, 2008).

En las bacterias y hongos se observa la biosorción y biotransformación del Cr, con mayor eficiencia la biosorción en los hongos y la biotransformación en las bacterias. El oxianión Cr^{+6} no es atrapado por los componentes aniónicos de las envolturas bacterianas, pero los derivados catiónicos de Cr^{+3} sí se unen a los lipopolisacáridos de *Salmonella* spp., pared celular de *B. subtilis* y *E. coli* y polímeros de la cápsula de *B. licheniformis* (Gutiérrez y Cervantes, 2008). La biomasa de *B. circulans*, *B. megaterium* y *B. coagulans* absorbe 32-39 mg Cr g^{-1} y se alcanza la mayor absorción con la biomasa muerta (Jobby et al., 2018). En *Aspergillus*, *Trichoderma* y *Fusarium*, el Cr^{+6} se une a la superficie celular formando enlaces químicos con la quitina y el quitosano (Jobby et al., 2018).

El Cr^{+6} es reducido de manera biótica y abiótica. La reducción del Cr^{+6} puede ocurrir en aerobiosis y anaerobiosis y puede estar asociada a la fracción soluble o a la membrana celular (Ramírez et al., 2009). Bacterias de los géneros *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Cupriavidus*, *Pseudomonas* y *Ochrobacterium* destacan por la biotransformación o reducción del Cr^{+6} a Cr^{+3} (Jobby et al., 2018).

En aerobiosis la reducción del Cr^{+6} es catalizada por enzimas solubles, a excepción de *Pseudomonas maltophilia* y *Bacillus megaterium* que utilizan reductasas asociadas a la membrana. El Cr^{+6} es reducido a intermediarios temporales de Cr^{+5} y Cr^{+4} antes del producto estable Cr^{+3} . La Cr^{+6} reductasa ChR de *P. putida* adiciona un electrón al Cr^{+6} y forma Cr^{+5} y luego dos electrones más para formar Cr^{+3} ; sin embargo, una parte del Cr^{+5} se reduce en forma espontánea y genera ERO. La enzima YieF de *E. coli* cataliza la reducción directa del Cr^{+6} a Cr^{+3} , adicionando cuatro electrones, tres para la reducción y uno para ser transferido al oxígeno (Cheung y Gu, 2007).

La reducción del Cr^{+6} en anaerobiosis es catalizada por enzimas solubles y asociadas a la membrana. El Cr^{+6} sirve como aceptor terminal de electrones de una cadena de transporte que frecuentemente involucra citocromos b y c. Las bacterias reductoras de sulfatos generan H_2S que reducen el Cr^{+6} en ambientes anóxicos. En ausencia de oxígeno el Cr^{+6} es un oxidante de la cadena respiratoria (Cheung y Gu, 2007).

En la biotransformación del cromo por los hongos se consideran cinco procesos. La biotransformación directa o enzimática del Cr^{+6} a Cr^{+3} implica enzimas y una fuente de electrones. En la biotransformación indirecta o no enzimática los reductores más potentes son el glutatión y la cisteína. La incorporación y bioacumulación del Cr^{+6} requiere un transportador aniónico no específico o permeasas que transportan sulfatos y fosfatos. En la biosorción el Cr^{+3} y Cr^{+6} son acomplejados por los polisacáridos, glucanos, quitina y quitosano de la pared celular. En la inmovilización se forman complejos de Cr^{+3} como hidróxidos o con moléculas orgánicas (Gutiérrez et al., 2010).

2.2.4 Interacción de las plantas con el cromo

Las plantas remueven el Cr mediante la biosorción y biotransformación. Las plantas hiperacumuladoras absorben el Cr, lo acumulan en las raíces y translocan muy poco al follaje (Jobby et al., 2018). El Cr^{+3} ingresa a las células vegetales por difusión pasiva en la pared celular. El Cr^{+6} se transporta en forma activa mediante los acarreadores de sulfato de las plantas. Después, el Cr^{+6} es reducido a Cr^{+3} en las raíces de las plantas, con formación de intermediarios de Cr inestables (Cr^{+5}) y generación de ERO (Sinha et al., 2018).

Las plantas tolerantes al Cr pueden ser categorizadas con base a su capacidad para sobrevivir en concentraciones que generalmente son inhibitorias o letales a la mayoría de plantas, mediante mecanismos de tolerancia, detoxificación y evasión. Los mecanismos de tolerancia son el incremento de la actividad enzimática antioxidante y la alteración del metabolismo celular. Los mecanismos de detoxificación son biotransformación con reductores, compartimentación diferencial, quelación y los mecanismos de evasión son inmovilización en la pared celular – alteración en la membrana (Sinha et al., 2018).

El incremento de la actividad de las enzimas antioxidantes como la catalasa, peroxidasa, superóxido dismutasa y ascorbato peroxidasa protege a las plantas de las ERO generadas por el Cr. La alteración del metabolismo celular se refiere a los cambios en la expresión de los genes que alteran el metabolismo de respuesta al estrés oxidativo causado por el Cr. La biotransformación con reductores se refiere a la reducción del Cr^{+6} a Cr^{+3} mediante procesos químicos o enzimáticos. La reducción química es mediada por la cisteína, glutatión, sulfito y tiosulfato presentes en las células vegetales (Sinha et al., 2018).

En la compartimentación diferencial las plantas adoptan diferentes mecanismos para almacenar los iones de Cr en organelos inactivos metabólicamente (vacuolas, plastidios) y evita la toxicidad por el Cr. Las plantas hiperacumuladoras son tolerantes a través de la quelación con ligandos de alta afinidad disponibles y mediante la biotransformación con reductores. Los mecanismos de evasión ayudan a las plantas a restringir la entrada de los iones de Cr en el tejido radicular. La pared celular presenta sitios y secreta carbohidratos extracelulares como calosa y mucílago, que reducen la translocación del Cr hacia el citosol (Sinha et al., 2018).

2.2.5 Fitorremediación

La fitorremediación es la utilización de plantas y microorganismos rizosféricos para remediar suelo y agua contaminados, mediante la remoción, transformación, degradación o estabilización de contaminantes orgánicos e inorgánicos (Peralta y Volke, 2012). Las estrategias o técnicas de la fitorremediación son la rizofiltración, para contaminantes inorgánicos; fitodegradación y rizodegradación para contaminantes orgánicos; fitoextracción, fitoestabilización y fitovolatilización para orgánicos e inorgánicos (Peralta y Volke, 2012). Thangavel y Subbhuraam (2004) no consideran a la rizodegradación, pero si a la fitoinmovilización junto a las otras cinco estrategias mencionadas.

La fitodegradación o fitotransformación implica la absorción, metabolización y transformación de los contaminantes orgánicos. Las reacciones enzimáticas de las plantas metabolizan los contaminantes, alcanzando su transformación o mineralización (Peralta y Volke, 2012). La rizodegradación o fitoestimulación o biodegradación rizosférica mejorada es la estrategia en la que los

exudados de las raíces estimulan el crecimiento de los microorganismos capaces de degradar los contaminantes orgánicos. Las plantas liberan azúcares, aminoácidos, compuestos alifáticos y aromáticos y enzimas y los transportan desde las partes superiores hasta las raíces, favoreciendo a los microorganismos que mineralizan los contaminantes (Núñez et al., 2004).

La fitoextracción o fitoacumulación es la absorción de metales pesados o sustancias tóxicas a partir de suelos contaminados (Méndez et al., 2016). Una vez completado el desarrollo vegetativo de las plantas se cortan y se incineran y trasladan las cenizas a un vertedero de seguridad (Delgadillo et al., 2011). Es una tecnología de largo plazo, que puede requerir de varios ciclos de cultivo para reducir la concentración de los contaminantes a niveles aceptables (Ruíz, 2013); no obstante, es una de las pocas opciones para tratar sitios contaminados con metales y metaloides, utilizando plantas hiperacumuladoras (Peralta y Volke, 2012). El mecanismo de la fitoextracción es la hiperacumulación (Delgadillo et al., 2011).

La fitoestabilización permite inmovilizar contaminantes en el suelo a través de su absorción y acumulación en las raíces o bien, por precipitación en la rizósfera. Se reduce su movilidad y se evita su migración a las aguas subterráneas o al aire (Delgadillo et al., 2011). Es una estrategia en las plantas que desarrollan un sistema radicular denso para reducir la biodisponibilidad principalmente de los metales, pero también otros contaminantes orgánicos mediante su acumulación en las raíces, incorporación a la lignina o humus por precipitación en la rizósfera (Peralta y Volke, 2012) es decir por secuestro, lignificación e humidificación (Vidal, 2009).

La fitovolatilización comprende la absorción de sustancias tóxicas y su liberación en formas no tóxicas. Las plantas llevan a cabo la absorción, translocación y transformación de los contaminantes volátiles (orgánicos y metales – metaloides) a formas menos tóxicas que son liberadas a la atmósfera (Peralta y Volke, 2012). La fitoinmovilización provoca la sujeción y reducción de la biodisponibilidad de los contaminantes mediante la producción de compuestos químicos en la interfase suelo – raíz, los que inactivan las sustancias tóxicas por procesos de absorción, adsorción o precipitación (Carpena y Bernal, 2007).

La respuesta fisiológica de las plantas a los metales pesados las clasifica en excluyentes, indicadoras y acumuladoras. En las excluyentes el metal acumulado es menor respecto a la concentración en el suelo. Las plantas indicadoras son aquellas en las que la acumulación de metales en el tejido aéreo guarda una relación lineal respecto a la concentración del suelo. En las plantas acumuladoras la concentración del metal en la parte aérea es mayor que la del suelo (Covarrubias y Peña, 2017).

La fitoextracción y la fitovolatilización son las alternativas aplicables en la biorremediación de metales y metaloides (Peralta y Volke, 2012). En la fitoestabilización se usan especies vegetales excluyentes que acumulan los metales en la raíz y evitan que éstos se transfieran a la parte aérea. En la fitoextracción se requieren plantas acumuladoras en las que el metal sea llevado desde la raíz hacia la parte aérea (Covarrubias y Peña, 2017).

La fitorremediación de Cr en suelo se basa en la fitoextracción, método en el que una planta hiperacumuladora se utiliza para extraer el contaminante mediante las raíces y luego translocarlo a otras partes de la planta. Las plantas deben tomar cantidades significativas de Cr con un factor de translocación elevado, tal que el contaminante se acumule en la parte aérea y por tanto deben ser capaces de producir abundante biomasa (Sinha et al., 2018).

Las plantas hiperacumuladoras son capaces de tolerar, tomar y acumular en sus tejidos aéreos, elementos no esenciales para los cultivos alcanzando elevadas concentraciones que resultan tóxicas para la mayoría de plantas. Se considera que las plantas acumuladoras e hiperacumuladoras toleran 10-100 veces más los valores de un determinado elemento (0,1 y 1 ppm) en los tejidos vegetales en base a la materia seca. En condiciones experimentales los valores de absorción son diez veces mejores a las alcanzadas por las mismas plantas utilizadas como testigo (Sánchez, 2008).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3.1.1 Material biológico

Suelo, malezas y bacterias rizosféricas de malezas.

3.1.2 Población y muestra

La población y muestra de estudio estuvieron constituidas por 36 unidades experimentales, correspondientes a tres especies de malezas con y sin consorcios de bacterias rizosféricas tolerantes al Cr^{+6} .

3.2 Métodos

3.2.1 Variables

- **Variable independiente**

Malezas con consorcios de bacterias tolerantes al Cr^{+6}

- **Variable dependiente**

Fitorremediación de suelo contaminado con Cr^{+6}

3.2.2 Tipo de estudio y diseño de contrastación de hipótesis

La investigación se realizó en dos etapas. En la primera etapa descriptiva, la hipótesis se contrastó con el diseño de una sola casilla de Goode y Hatt y en la segunda etapa explicativa con el diseño experimental completamente aleatorio, DCA (Hernández et al., 2014), con seis tratamientos correspondientes a tres especies de malezas con y sin consorcios de bacterias rizosféricas tolerantes al Cr^{+6} . A cada tratamiento le correspondieron seis repeticiones, con un total de 36 unidades experimentales (Figura 1).

Figura 1

Diseño completamente aleatorio con arreglo factorial para determinar la eficiencia de consorcios de bacterias rizosféricas en la fitorremediación de suelo contaminado con Cr^{+6} .



Donde:

A = Malezas (A_1 , A_2 , A_3)

B = Consorcios de bacterias (B_1 , B_2 , B_3)

Fuente: Autoría propia

3.2.3 Primera etapa

En la primera etapa de la investigación se colectaron y adaptaron en condiciones de invernadero 14 especies de malezas en la región Lambayeque, se determinó la tolerancia de las malezas al Cr^{+6} , así como también la actividad ACC desaminasa en los consorcios de bacterias aislados de las malezas tolerantes al Cr^{+6} y se identificaron las características que evidencian *in vitro* promoción de crecimiento vegetal.

a. Muestreo y caracterización del suelo contaminado en el botadero de residuos

En el botadero de residuos municipales de Reque en la provincia de Chiclayo se colectaron 120 kg de suelo (Figuras 2,3). El distrito de Reque tiene una superficie de 47,03 km² y se ubica entre los paralelos 06°52'00" latitud sur y 79°49'27" longitud oeste. Reque limita por el norte con el distrito de Monsefú, por el sur con Ciudad Eten y Lagunas, por el este con Zaña y Tumbán y por el oeste con Monsefú y Ciudad Eten (Municipalidad Distrital de Reque, 2013).

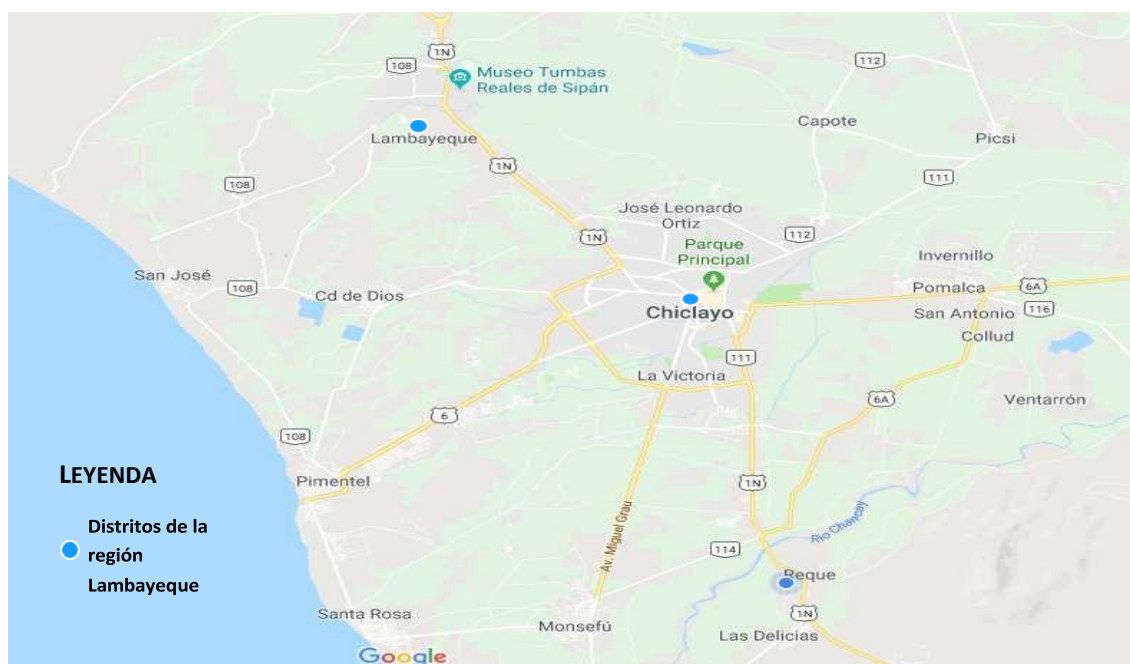
El suelo experimental estuvo constituido por tres muestras de suelo no probabilísticas y por conveniencia (Hernández et al., 2014), cada una compuesta por 40 kg de suelo, totalizando 120 kg de suelo. En la parte central del botadero se delimitaron tres áreas de 1 m² cada una, se retiraron los residuos incluyendo los 2 cm de suelo superficial y se colectó el suelo (40 kg) hasta una profundidad de 15 cm, depositándolo en un saco de polietileno, donde se mezclaron las tres muestras correspondientes.

El suelo experimental se llevó al invernadero de la Facultad de Ciencias Biológicas, se depositó sobre un saco de polietileno, se homogenizó mediante el método del "cuarteo" (León, 2016), que consistió en formar un "montón", aplanarlo lo más homogéneo posible, dividirlo en cuatro cuadrantes iguales y aleatoriamente de uno de ellos extraer 2 kg para la cuantificación de Cr^{+6} en el National Sanitation Foundation INASSA S.A.C. en Lima (Anexo A).

Figura 2

Distrito de Reque en la región Lambayeque, 2019

(<https://www.google.com/maps/place/Reque/@-6.8650512,-80.9380714,8z/>).

**Figura 3**

Botadero de residuos sólidos municipales en el distrito de Reque, región Lambayeque, 2019.



Fuente: Autoría propia

b. Selección, colección y adaptación de malezas

La selección de malezas se realizó con base a una revisión de artículos científicos y trabajos de investigación disponibles en INTERNET (Burgos y Diez, 2015). Con la información obtenida y la asesoría de un especialista se determinó la disponibilidad y factibilidad de 14 especies de malezas para ser colectadas y adaptadas. Las malezas se colectaron en tres campos agrícolas cultivados de los distritos de Chiclayo, Lambayeque y Reque en la región Lambayeque. Esta región (Figura 4) se ubica en el norte de la costa peruana, entre las coordenadas geográficas 5°28'36" y 7°14'37" de latitud sur y 79°41'30" y 80°37'23" de longitud oeste del Meridiano de Greenwich, a una altura de 18 msnm (Municipalidad Provincial de Lambayeque, 1999).

En los campos agrícolas se realizó una inspección visual para seleccionar seis especímenes de cada maleza (Figura 4). Las malezas seleccionadas debían tener similitud en el fenotipo, en lo correspondiente al tamaño, vigor, estado de prefloración o inicio de floración, ausencia de daño por insectos plaga y enfermedades (León, 2016). Con una palana se extrajo la raíz y suelo radicular circundante de los seis especímenes (en promedio 3 kg por planta), se depositaron individualmente en bolsas de polietileno transparentes de 4 kg de capacidad y se llevaron inmediatamente al invernadero de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, en Lambayeque.

En el invernadero, se ubicaron 42 macetas de polipropileno de 10kg de capacidad, incluyendo un plato colector de 20cm de diámetro. En cada maceta se depositaron 0,500 kg de grava y 1,5 kg de suelo experimental y sobre éste el suelo radicular con dos especímenes de cada maleza (Figura 5). Las plantas se regaron con agua potable decolorada (24 horas) tres veces por semana. Las malezas se consideraron adaptadas a las condiciones de invernadero al observarse la persistencia del color verde y el desarrollo de las hojas o la aparición de brotes después de 45 a 60 días.

Figura 4

Recolección de malezas en la ciudad de Reque, región Lambayeque, 2018.



Fuente: Autoría propia

Figura 5

Adaptación de malezas a condiciones de invernadero en Lambayeque, 2018.



Fuente: Autoría propia

c. Determinación de la tolerancia de malezas al Cr⁺⁶

La tolerancia al Cr⁺⁶ de las malezas previamente adaptadas en condiciones de invernadero se determinó regando las plantas con una solución de dicromato de potasio (K₂Cr₂O₇), con pH 7 para favorecer la disponibilidad del Cr⁺⁶ (Diez, 2008). El riego se realizó durante 5 semanas con soluciones de 15, 30, 60, 120 y 240 ppm de Cr⁺⁶ (Anexo B) cada semana, en forma secuencial.

La tolerancia al Cr⁺⁶ se calificó por el aspecto físico y supervivencia de las plantas, considerando la coloración, turgencia, número de plantas marchitas y muertas registradas en la semana (Burgos y Diez, 2015). Las plantas en las que la coloración y turgencia no se vieron afectadas fueron consideradas tolerantes al Cr⁺⁶ y se seleccionaron tres especies de malezas para la fitorremediación de suelo contaminado. Las malezas con 50% o más de las plantas muy afectadas o muertas se descartaron como tolerantes al Cr⁺⁶.

d. Actividad ACC desaminasa en consorcios de bacterias rizosféricas tolerantes al Cr⁺⁶

Las raíces de cada especie de maleza seleccionada se deshidrataron bajo sombra durante 72 horas. Después las raíces se golpearon suavemente contra la mano para desprender el suelo rizosférico, el cual fue colectado en un papel Krat (Vardharajula et al., 2011). Se pesó 1 g del suelo rizosférico, se depositó en 90 mL de caldo nutritivo con 200 mg L⁻¹ Cr⁺⁶ (Figura 6) y se incubó a 30 °C, 120 rpm, durante 5 días para el enriquecimiento de los microorganismos (Gupta et al., 2017).

Las bacterias se aislaron en agar nutritivo con 200 mg L⁻¹ Cr⁺⁶ y después de la incubación a 30 °C hasta por 3 días las colonias bacterianas desarrolladas se agruparon según sus características morfológicas, se seleccionó una representante de cada morfotipo, se cultivaron en caldo y agar nutritivo con 200 mg L⁻¹ Cr⁺⁶ y constituyeron los cultivos puros de bacterias tolerantes al Cr⁺⁶, a las que se les determinó la actividad ACC desaminasa (Ramirez, 2015).

Figura 6

Bacterias enriquecidas en caldo nutritivo con Cr^{+6} , Lambayeque 2018.



Fuente: Autoría propia

La actividad ACC desaminasa se determinó de forma cualitativa por la utilización del ACC como fuente de nitrógeno (Penrose y Glick, 2003; Ramírez, 2009) en el medio mínimo Dworkin y Foster (DF) a un pH de 7,2. Después de la esterilización del medio en autoclave se agregó como fuente de nitrógeno una solución de ACC (0,5 M) previamente esterilizada (filtración en membrana de 0.2 μm), en cantidad suficiente (Anexo C), para alcanzar 3,0 Mm ACC (Siddiquee et al., 2011). Las bacterias cultivadas en 1 mL de medio mínimo DF por 24 horas se inocularon en 2 mL del mismo medio, se incubaron a 30 °C por 24 horas y la turbidez por el crecimiento bacteriano denotó la utilización del ACC como fuente de nitrógeno y por lo tanto la positividad para la actividad ACC desaminasa (Angulo et al., 2014).

e. Identificación de las características que evidencian promoción de crecimiento en plantas en bacterias con actividad ACC desaminasa

Las características que evidencian promoción de crecimiento en plantas fueron investigadas en cada una de las bacterias tolerantes al Cr^{+6} , determinándose la solubilización de fosfatos en medios sólido y líquido y la producción de indoles (Gupta et al., 2017). Para la segunda etapa de la investigación se seleccionaron cinco cultivos bacterianos de cada una de las tres malezas tolerantes al Cr^{+6} investigadas.

e.1. Determinación del índice de solubilización de fosfato en medio sólido

Para la determinación del índice de solubilización de fosfato en medio sólido (Lara et al. 2011), las bacterias cultivadas en agar tripticosa soya (TSA) durante 24 horas, se sembraron por triplicado, mediante la técnica de puntura superficial en agar NBRIP con 1 g L^{-1} P inorgánico correspondiente a 5 g L^{-1} de fosfato tricálcico (Anexo D). Las placas de Petri se incubaron a 30 °C y después de 96 horas y cada 24 horas se midió el diámetro de la colonia bacteriana y diámetro de colonia más halo de solubilización. Con los valores obtenidos, se calculó el índice de solubilización de fosfato (Álvarez, 2012).

$$\text{Índice de solubilización} = \frac{\text{Diámetro colonia} - \text{Diámetro colonia con halo}}{\text{Diámetro colonia}}$$

e.2. Cuantificación de fosfato solubilizado en medio líquido

La cuantificación de fosfato solubilizado en medio líquido por las bacterias investigadas se realizó con el método colorimétrico: Técnica del molibdato (Escobar et al., 2011). El inóculo (5 %: 0,25 mL) de cada cultivo bacteriano se sembró por triplicado en 5 mL de caldo National Botanical Research Institute's phosphate NBRIP y se incubaron a 30°C, con agitación (150 rpm), durante 96 horas (Figura 7). Después, los caldos fueron centrifugados a 3000 rpm por 5 minutos y en el sobrenadante se cuantificó el fósforo soluble (Rodier y Rodi, 2005), considerándose una coloración azul positiva a la solubilización del fosfato. La absorbancia se leyó en espectrofotómetro de luz visible (Model Tenso Med NV-203) a 690 nm y las concentraciones de fósforo soluble se calcularon con la ecuación de la curva de calibración, obtenida previamente con diluciones sucesivas de una solución de 10 ppm de fósforo (Anexo E).

e.3. Cuantificación de indoles producidos *in vitro*

La cuantificación de indoles producidos *in vitro* se realizó según el método colorimétrico: Técnica de Salkowski (García et al., 2010). El inóculo (5 %: 0,25 mL) de cada cultivo bacteriano fue sembrado por triplicado en 5mL de caldo tripticasa soya suplementado con triptófano (Anexo F). Después de la incubación a 30 °C, por 72 horas (Figura 8), con agitación manual diaria por 5 minutos, los cultivos se centrifugaron a 3000 rpm, durante 5 minutos. A continuación, 0,4 mL de cada sobrenadante se depositaron en tubos, se agregaron 1,6 mL de reactivo de Salkowski modificado, se mezclaron y se dejaron en reposo durante 30 minutos en oscuridad.

La reacción se consideró positiva a la producción de indoles por la aparición de una coloración grosella, leyéndose la absorbancia en espectrofotómetro de luz visible (Model Tenso Med NV-203) a 530 nm. Las concentraciones de indoles se calcularon con la ecuación de la curva de calibración obtenida previamente con diluciones sucesivas de una solución de 100 ppm de ácido indolacético (Anexo G).

Figura 7

Caldo NBRIP cultivado con bacterias con actividad ACC desaminasa, Lambayeque 2019.



Fuente: Autoría propia

Figura 8

Caldo tripticasa soya suplementado con triptófano cultivado con bacterias con actividad ACC desaminasa, Lambayeque 2019.



Fuente: Autoría propia

3.2.4 Segunda etapa: Fitorremediación de suelo contaminado con Cr^{+6}

La influencia de los consorcios de bacterias en la remediación de suelo contaminado con Cr^{+6} se determinó en un ensayo bajo un diseño completamente aleatorio con arreglo factorial $3 \times 4 \times 3$. El suelo previamente utilizado para determinar la tolerancia de las malezas (154 kg) al Cr^{+6} se mezcló con suelo del botadero de residuos municipales (80 kg). Este suelo (234 kg) se homogenizó mediante el método del “cuarteo” (León, 2016) y se tomó una muestra representativa de 1 kg para determinar la concentración de Cr^{+6} en el laboratorio Certificaciones del Perú, CERPER SAC en Lima (Anexo H) . El suelo se mezcló con humus en la proporción 3:1 (v/v) y se distribuyó en 36 macetas de polipropileno de 10 kg de capacidad en las que previamente se depositaron 0,500 kg de grava. Sobre la grava se colocaron 6 kg de la mezcla del suelo y humus y cada maceta se colocó sobre un plato colector del lixiviado (20 cm de diámetro).

Las bacterias constituyentes de los consorcios fueron cultivadas en 500 mL de caldo nutritivo con Cr^{+6} (200 mg kg^{-1}) por 48 horas. El caldo cultivado fue centrifugado a 3000 rpm durante 10 minutos, la biomasa obtenida se enjuagó por dos veces consecutivas con agua destilada esterilizada, se resuspendió en solución salina (NaCl 0,85 % p/v) y su concentración se estandarizó por turbidimetría a 10^8 células mL^{-1} (Li et al., 2016). Esta suspensión bacteriana se inoculó (10 %) en el suelo contaminado con Cr^{+6} según el tratamiento correspondiente. A los testigos se les aplicó agua destilada. Inmediatamente después de la inoculación bacteriana se trasplantaron plántulas de las malezas con similar fenotipo provenientes de un almácigo de 30 días y se realizaron riegos con agua previamente decolorada (24 horas) según los requerimientos de las plantas.

Durante la biorremediación se registraron las temperaturas máxima (24°C), mínima (18°C) y media (21°C), datos obtenidos por la estación meteorológica de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, ubicado en el fundo “El Ciénago” en Lambayeque (Anexo I). Cada 10 días en un periodo de 60 días (Li et al., 2016) se midió la altura de las plantas y con los valores obtenidos se calcularon (García et al., 2010) los índices de efectividad de la inoculación (IEI) en porcentaje:

$$\text{IEI (\%)} = \frac{\text{Tratamiento con inoculación} - \text{Control sin inoculación}}{\text{Control sin inoculación}} \times 100$$

Asimismo, cada 10 días, durante 60 días se investigó la fitotoxicidad de los contaminantes del suelo determinando el índice de germinación de semillas de rabanito (Lakhal et al. 2017).

Los índices de germinación (GI) se calcularon al multiplicar el porcentaje de la germinación relativa de las semillas (RSG) por el porcentaje del crecimiento relativo de las raíces (RRG) y dividir el resultado entre 100 (Lakhal et al., 2017):

$$RSG\% = \frac{\text{Numero de semillas germinadas en el suelo investigado} \times 100}{\text{Número de semillas germinadas en el testigo}}$$

$$RRG\% = \frac{\text{Promedio de longitud de raíces en el suelo investigado} \times 100}{\text{Promedio de longitud de raíces en el testigo}}$$

$$GI\% = \frac{RSG \times RRG}{100}$$

A los 60 días en las raíces y en el suelo del tratamiento con el que se alcanzó la menor toxicidad se determinó la concentración de Cr^{+6} en el laboratorio Certificaciones del Perú, CERPER SAC en Lima, mediante espectrofotometría de absorción atómica.

Con los valores de la concentración de Cr^{+6} en las raíces y suelo se calculó el factor de bioconcentración, BCF (Sinha et al., 2018):

$$BCF = \frac{\text{Concentración del metal en raíces}}{\text{Concentración del metal en el suelo contaminado}}$$

a. Identificación fenotípica del género de las bacterias del consorcio con la mayor influencia en la fitorremediación

La identificación fenotípica del género de las bacterias con la mayor influencia en la fitorremediación se realizó mediante las pruebas de catalasa, oxidasa, fermentación de carbohidratos en agar hierro – triple azúcar, descarboxilación de la lisina, utilización del citrato como fuente de carbono y energía, producción de indol, acidez de la lactosa, manitol, ornitina y sorbitol y acetoina en la prueba de Voges – Proskauer (Noreen et al., 2012; Holt et al., 1994).

3.3 Análisis estadístico de los datos

Los valores de altura de las plantas obtenidos en la investigación fueron ordenados en tablas para las pruebas de normalidad (Shapiro-Wilk) y homogeneidad de varianzas (Levene). En caso de cumplirse la normalidad y homocedasticidad se realizó el análisis de varianza para determinar las diferencias entre los tratamientos y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey para establecer la significancia entre ellos: $p=0,05$ (Hernández et al., 2014). Se utilizaron los programas Microsoft Office Word y Excel versión 2013.

IV. RESULTADOS

4.1 Malezas tolerantes al Cr^{+6} en la región Lambayeque, 2019

El 85,71 % de especies de malezas trasplantadas se adaptaron a las condiciones de invernadero (Tabla 1, figuras 9 a 12), con la aparición de brotes después de 60 - 75 días del trasplante (Tabla 2). El 25 % de las especies de malezas adaptadas evidenciaron tolerancia al Cr^{+6} (Tabla 3) al desarrollarse incrementando la altura en un suelo contaminado con $240 \text{ mg Cr}^{+6} \text{ kg}^{-1}$ durante 35 días (Figuras 13 a 15). En las hojas de las malezas no tolerantes se observaron: quemaduras, enrollamientos, clorosis, tinte bronceado o purpúreo, marchitamientos, ausencia de brotes y muerte total (Tabla 4, figuras 16 a 21). En las malezas tolerantes al Cr^{+6} de los géneros *Cyperus*, *Echinochloa* y *Sorghum* también se observó clorosis, marchitamiento y tinte bronceado o purpúreo; sin embargo, las plantas brotaron y se recuperaron hasta observar el fenotipo normal (Figuras 22 a 24).

4.2 Consorcios de bacterias tolerantes al Cr^{+6} , con actividad ACC desaminasa aisladas en la rizósfera de malezas en Lambayeque, 2019

En la rizósfera de tres malezas tolerantes al Cr^{+6} se obtuvieron 91 bacterias que desarrollaron en medio de cultivo sólido con Cr^{+6} (200 mg kg^{-1}), por lo que se consideraron tolerantes a este contaminante (Figuras 25, 26). Las bacterias tolerantes al Cr^{+6} agrupadas en tres consorcios (Tabla 5) se aislaron de *Cyperus corymbosus* y *Sorghum halepense* y *Echinochloa colonum*.

El 30,77 % de bacterias tolerantes al Cr^{+6} presentaron actividad ACC desaminasa, por cuanto desarrollaron turbidez en el medio de cultivo, como consecuencia del crecimiento utilizando el ACC como fuente de nitrógeno (Figuras 27, 28). El 10,99 % de las bacterias tolerantes al Cr^{+6} , con actividad ACC desaminasa correspondió al consorcio bacteriano obtenido de la rizósfera de *Cyperus corymbosus* y el 9,89 % a *Echinochloa colonum* y *Sorghum halepense* respectivamente (Tabla 6). El 78,57 % de estas bacterias fueron Gram negativas y el 21,43 % Gram positivas (Tabla 7).

Tabla 1*Malezas colectadas en campos agrícolas de la región Lambayeque, 2018*

Distrito	Malezas		
	Nombre científico	Nombre común	Clase
Chiclayo	<i>Physalis angulata</i> L.	Mullaca	Dicotiledónea
Chiclayo	<i>Amaranthus viridis</i> L.	Bledo	Dicotiledónea
Chiclayo	<i>Eclipta alba</i> L.	Florcita	Dicotiledónea
Lambayeque	<i>Bidens pilosa</i> L.	Amor seco	Dicotiledónea
Lambayeque	<i>Portulaca oleracea</i> L.	Verdolaga	Dicotiledónea
Lambayeque	<i>Chenopodium album</i> L.	Cenizo	Dicotiledónea
Lambayeque	<i>Solanum pimpinellifolium</i> L.	Tomatillo	Dicotiledónea
Lambayeque	<i>Solanum americanum</i> MILL.	Hierba mora	Dicotiledónea
Lambayeque	<i>Setaria verticillata</i> L.	Cepillo	Monocotiledónea
Lambayeque	<i>Sorghum halepense</i> L.	Sorgo de Alepo	Monocotiledónea
Reque	<i>Echinochloa colonum</i> L.	Moco de pavo	Monocotiledónea
Reque	<i>Cyperus corymbosus</i> L.	Junco	Monocotiledónea
Reque	<i>Pascalía glauca</i> ORTEGA	Sunchillo	Dicotiledónea
Reque	<i>Sonchus oleraceus</i> L.	Cerraja	Dicotiledónea

Figura 9

Plantas de Pascalia glauca adaptadas a condiciones de invernadero en Lambayeque, 2018.



Fuente: Autoría propia

Figura 10

Plantas de Solanum americanum adaptadas a condiciones de invernadero en Lambayeque, 2018.



Fuente: Autoría propia

Figura 11

Plantas de Chenopodium album adaptadas a condiciones de invernadero en Lambayeque, 2018.



Fuente: Autoría propia

Figura 12

Plantas de Portulaca oleracea adaptadas a condiciones de invernadero en Lambayeque, 2018.



Fuente: Autoría propia

Tabla 2

Número de brotes en malezas adaptadas a condiciones de invernadero en Lambayeque, 2018

Malezas	Número de brotes
<i>Bidens pilosa</i>	40
<i>Chenopodium album</i>	30
<i>Echinochloa colonum</i>	13
<i>Sorghum halepense</i>	10
<i>Cyperus corymbosus</i>	8
<i>Pascalia glauca</i>	6
<i>Portulaca oleracea</i>	5
<i>Solanum pimpinellifolium</i>	4
<i>Amaranthus viridis</i>	2
<i>Eclipta alba</i>	2
<i>Setaria verticillata</i>	1
<i>Solanum americanum</i>	1

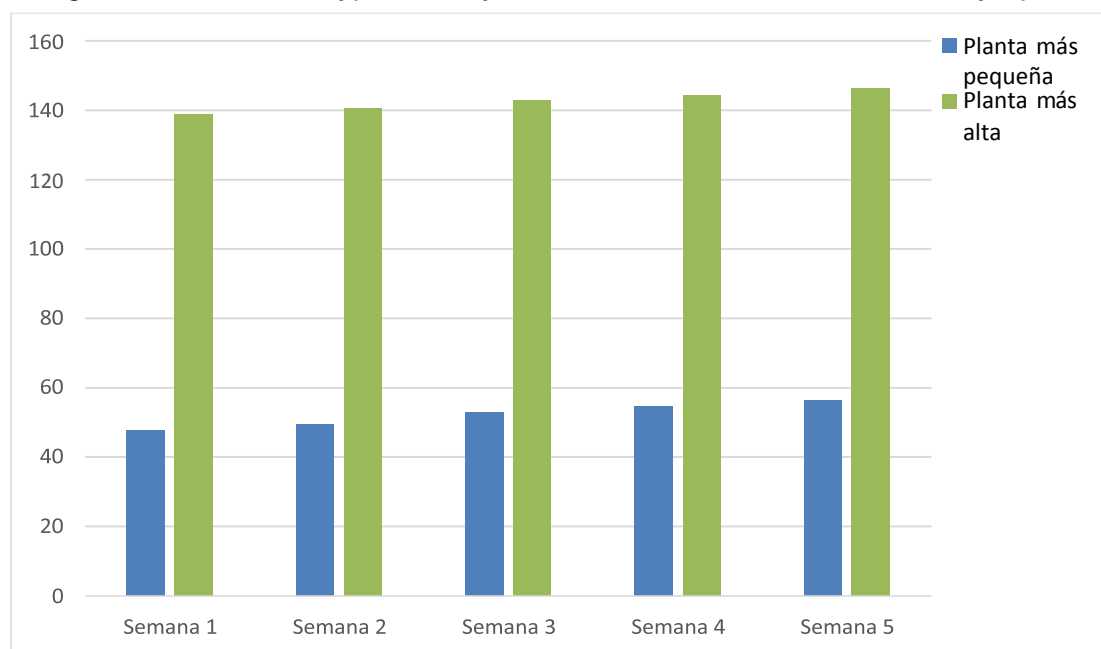
Tabla 3

Malezas tolerantes al Cr⁺⁶ en condiciones de invernadero, Lambayeque 2019

Nombre científico	Nombre común	Clase	Familia
<i>Cyperus corymbosus</i>	Junco	Monocotiledónea	Cyperaceae
<i>Echinochloa colonum</i>	Moco de pavo	Monocotiledónea	Poaceae
<i>Sorghum halepense</i>	Sorgo de Alepo	Monocotiledónea	Poaceae

Figura 13

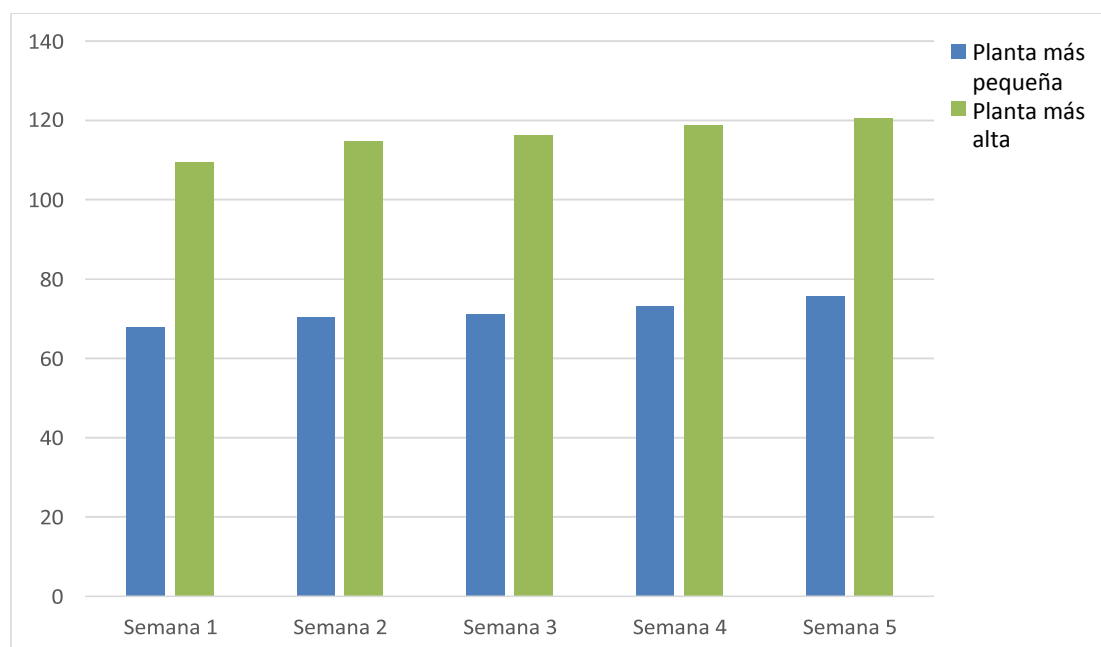
*Rango de la altura de *Cyperus corymbosus* tolerante al Cr^{+6} en Lambayeque, 2019.*



Fuente: Autoría propia

Figura 14

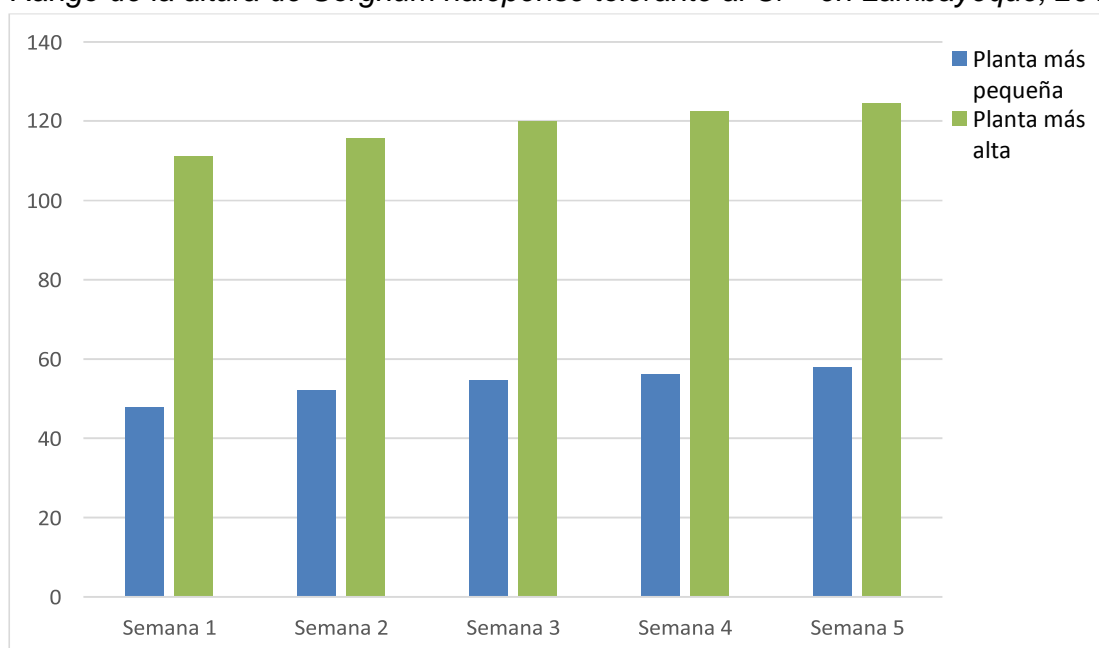
*Rango de la altura de *Echinochloa colonum* tolerante al Cr^{+6} en Lambayeque, 2019.*



Fuente: Autoría propia

Figura 15

Rango de la altura de Sorghum halepense tolerante al Cr⁶⁺ en Lambayeque, 2019.



Fuente: Autoría propia

Tabla 4

Número de brotes y tallos u hojas con clorosis y marchitez en malezas tolerantes al Cr^{+6} en Lambayeque, 2019

Características	Malezas*		
	<i>C. corymbosus</i>	<i>E. colonum</i>	<i>S. halepense</i>
Brotes			
Semana 1	2	6	3
Semana 2	5	12	6
Semana 3	9	16	10
Semana 4	12	25	14
Semana 5	16	34	20
Tallos u hojas con clorosis			
Semana 1	0	7	0
Semana 2	0	11	0
Semana 3	1	35	7
Semana 4	3	51	13
Semana 5	6	65	19
Tallos u hojas con marchitez			
Semana 1	0	8	0
Semana 2	0	17	0
Semana 3	0	32	3
Semana 4	0	50	5
Semana 5	2	63	8

*Promedio de seis plantas

Figura 16

*Quemadura en hojas de *Pascalia glauca* no tolerante al Cr^{+6} en Lambayeque, 2019.*



Fuente: Autoría propia

Figura 17

*Enrollamiento en hojas de *Amaranthus viridis* no tolerante al Cr^{+6} en Lambayeque, 2019.*



Fuente: Autoría propia

Figura 18

Clorosis en hojas de *Echinochloa colonum* tolerante al Cr^{+6} en Lambayeque, 2019.



Fuente: Autoría propia

Figura 19

Tinte purpúreo en hojas de *Sorghum halepense* tolerante al Cr^{+6} en Lambayeque, 2019.



Fuente: Autoría propia

Figura 20

Marchitamiento en Amaranthus viridis no tolerante al Cr⁺⁶ en Lambayeque, 2019.



Fuente: Autoría propia

Figura 21

Muerte total en Solanum pimpinellifolium no tolerante al Cr⁺⁶ en Lambayeque, 2019.

Fuente: Autoría propia



Figura 22

Plantas de Cyperus corymbosus tolerantes al Cr⁺⁶ en Lambayeque, 2019.



Fuente: Autoría propia

Figura 23

Plantas de Echinochloa colonum tolerantes al Cr⁺⁶ en Lambayeque, 2019.



Fuente: Autoría propia

Figura 24

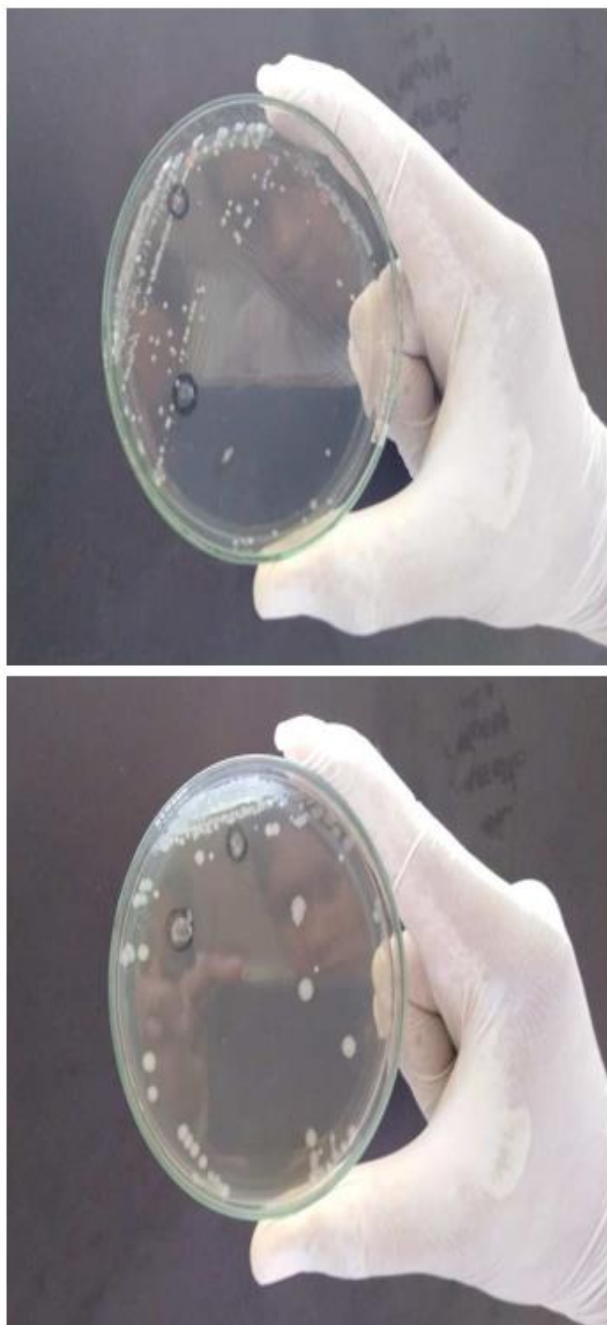
Plantas de Sorghum halepense tolerantes al Cr⁺⁶ en Lambayeque, 2019.



Fuente: Autoría propia

Figura 25

Bacterias rizosféricas de plantas tolerantes al Cr^{+6} aisladas en agar nutritivo con el contaminante, Lambayeque, 2019.



Fuente: Autoría propia

Figura 26

Cultivos bacterianos procedentes de la rizósfera de malezas tolerantes al Cr⁺⁶ en Lambayeque, 2019.



Fuente: Autoría propia

Tabla 5

Número de cultivos bacterianos obtenidos en la rizósfera de malezas tolerantes al Cr⁺⁶ en Lambayeque, 2019

Malezas	Cultivos bacterianos/planta						Total
	r1	r2	r3	r4	r5	r6	
<i>Cyperus corymbosus</i>	8	5	5	7	4	2	31
<i>Sorghum halepense</i>	7	5	4	8	5	2	31
<i>Echinochloa colonum</i>	4	5	7	5	4	4	29
Total	19	15	16	20	13	8	91

Figura 27

Turbidez desarrollada en medio mínimo de sales por bacterias con actividad ACC desaminasa aisladas de la rizósfera de plantas tolerantes al Cr^{+6} en Lambayeque, 2019.



Fuente: Autoría propia

Figura 28

Cultivos de bacterias con actividad ACC desaminasa aisladas de la rizósfera de plantas tolerantes al Cr^{+6} en Lambayeque, 2019.



Fuente: Autoría propia

Tabla 6

Número de cultivos bacterianos con actividad ACC desaminasa obtenidos en la rizósfera de malezas tolerantes al Cr⁺⁶ en Lambayeque, 2019

Maleza de procedencia	Cultivos bacterianos	Cultivos con actividad ACC desaminasa	
		(N°)	(%)
<i>Cyperus corymbosus</i>	31	10	10,99
<i>Sorghum halepense</i>	31	9	9,89
<i>Echinochloa colonum</i>	29	9	9,89
Total	91	28	30,77

Tabla 7

Frecuencia de bacterias Gram positivas y Gram negativas en consorcios microbianos tolerantes al Cr⁺⁶ con actividad ACC desaminasa

Maleza de procedencia	Cultivos de bacterias			
	Gram positivas		Gram negativas	
	(N°)	(%)	(N°)	(%)
<i>Cyperus corymbosus</i>	2	7,14	8	28,57
<i>Echinochloa colonum</i>	2	7,14	7	25
<i>Sorghum halepense</i>	2	7,14	7	25
Total	6	21,43	22	78,57

4.3 Características que evidencian *in vitro* promoción de crecimiento vegetal en los consorcios de bacterias tolerantes al Cr^{+6} y con actividad ACC desaminasa

Las bacterias de los consorcios aislados de malezas tolerantes al Cr^{+6} presentaron además de la actividad ACC desaminasa, dos a tres características que evidencian *in vitro* promoción de crecimiento vegetal: solubilización de fosfato en medio sólido y líquido y producción de indoles (Figuras 29 a 32). Las bacterias del consorcio 1 de *C. corymbosus* presentaron un rango de IS de 1,0 a 3,80; 0,61 a 1,38 ppm de fósforo soluble y 2,24 a 137,35 ppm de indoles. Con las bacterias del consorcio 2 de *E. colonum* el IS fue de 1,0 a 1,94; 0,20 a 10,46 ppm de fósforo soluble y 0,02 a 61,57 ppm de indoles. Respecto a las bacterias del consorcio 3 el IS fue de 1,0 a 2,2; 0,23 a 4,1 ppm de fósforo soluble y 0,91 a 53,57 ppm de indoles (Tabla 8).

Las cinco bacterias con actividad ACC desaminasa de cada uno de los tres consorcios de bacterias tolerantes al Cr^{+6} que alcanzaron los mayores valores en las características investigadas se seleccionaron para la fase explicativa de la investigación. Los códigos de las bacterias seleccionadas fueron: 1, 3, 13, 15 y 31 (consorcio 1); 28, 30, 24, 23 y 21 (consorcio 2) y 42, 56, 36, CCJ y 34 en el consorcio 3 (Tabla 8).

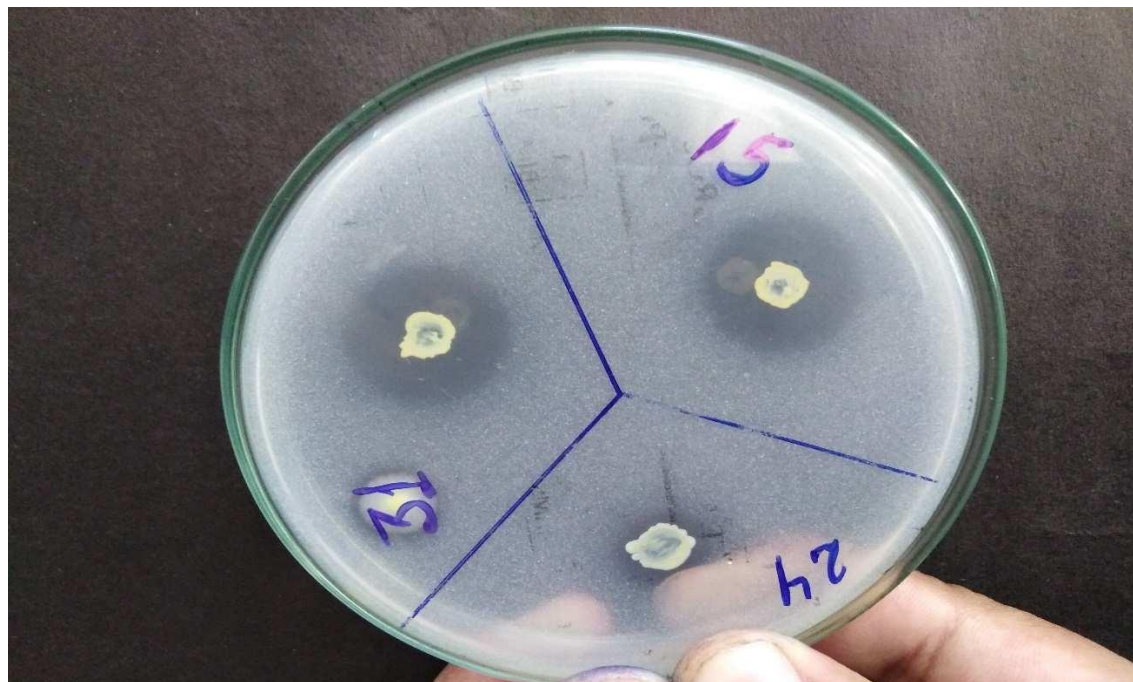
4.4 Influencia de tres consorcios de bacterias tolerantes al Cr^{+6} en la fitorremediación de suelo contaminado

La inoculación de los consorcios de bacterias tolerantes al Cr^{+6} incrementó la altura de las malezas durante la fitorremediación de suelo contaminado, alcanzando índices de efectividad de 11,5 – 20,5 % con el consorcio bacteriano 2, 8,8 – 17,5 % con el consorcio 1 y 6,1 – 14,5 % con el consorcio 3 (Tablas 9, 10). El análisis de varianza de los promedios de la altura de las malezas demostró alta significancia (Anexo J) y según la prueba de comparaciones múltiples de Tukey los mayores valores se alcanzaron con el tratamiento 4 *Cyperus corymbosus* + consorcio bacteriano 1, diferenciándose estadísticamente de los demás tratamientos (Tabla 9).

En el suelo contaminado con Cr^{+6} se incrementó el índice de germinación de las semillas de rabanito conforme transcurrió el tiempo de fitorremediación en las malezas inoculadas y no inoculadas con bacterias (Tabla 11). Los índices de germinación fueron de 82,17 – 90,00 % en el suelo fitorremediado con malezas y bacterias y 69,33 – 72,00 % en el suelo con malezas y sin bacterias.

Figura 29

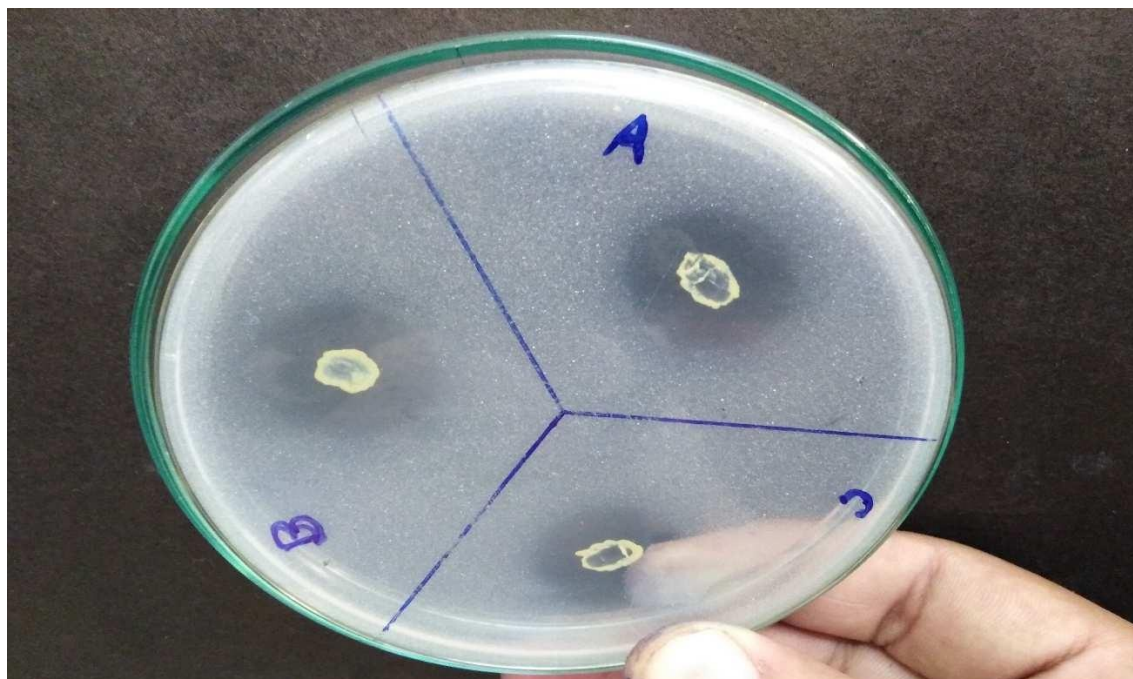
Halos de solubilización de fosfato en agar NBRIP por bacterias tolerantes al Cr^{+6} con actividad ACC desaminasa en Lambayeque, 2019.



Fuente: Autoría propia

Figura 30

Halos de solubilización de fosfato en agar NBRIP por bacterias tolerantes al Cr^{+6} con actividad ACC desaminasa en Lambayeque, 2019.



Fuente: Autoría propia

Figura 31

Coloración observada en la cuantificación de fósforo solubilizado por bacterias tolerantes al Cr^{+6} con actividad ACC desaminasa en Lambayeque, 2019.



Fuente: Autoría propia

Figura 32

Coloración observada en la cuantificación de indoles producidos por bacterias tolerantes al Cr^{+6} con actividad ACC desaminasa en Lambayeque, 2019.



Fuente: Autoría propia

Tabla 8

Índices de solubilización de fosfato, fósforo soluble e indoles producidos por bacterias con actividad ACC desaminasa aisladas de la rizósfera de malezas tolerantes al Cr⁺⁶ en Lambayeque, 2019

Consortio N°	Código de bacteria	Maleza	IS*	Fósforo soluble (ppm)	Indoles (ppm)
1	1	<i>Cyperus corymbosus</i>	3,08	0,88	55,35
1	3	<i>C. corymbosus</i>	2,40	1,38	137,35
1	13	<i>C. corymbosus</i>	3,30	0,72	115,80
1	15	<i>C. corymbosus</i>	3,10	0,61	86,24
1	31	<i>C. corymbosus</i>	3,44	1,27	76,68
1	8	<i>C. corymbosus</i>	1,85	0,75	2,24
1	SHA	<i>C. corymbosus</i>	1,00	0,81	0
1	17	<i>C. corymbosus</i>	2,28	1,14	2,68
1	4	<i>C. corymbosus</i>	1,00	1,14	24,46
1	11	<i>C. corymbosus</i>	3,80	1,14	68,46
2	28	<i>Echinochloa colonum</i>	1,94	0,20	35,57
2	ECB	<i>E. colonum</i>	1,00	0,26	0,02
2	30	<i>E. colonum</i>	1,67	0	61,57
2	24	<i>E. colonum</i>	1,62	0,78	40,02
2	18	<i>E. colonum</i>	1,00	0	16,68
2	37	<i>E. colonum</i>	1,00	10,46	16,46
2	23	<i>E. colonum</i>	1,00	0	24,68
2	21	<i>E. colonum</i>	1,00	0	21,80
2	ECC	<i>E. colonum</i>	1,00	0,83	4,91
3	6	<i>Sorghum halepense</i>	1,72	0	2,46
3	CCA	<i>S. halepense</i>	2,04	0	0,91
3	42	<i>S. halepense</i>	1,98	0	12,91
3	56	<i>S. halepense</i>	2,20	0,76	49,35
3	36	<i>S. halepense</i>	1,00	0	53,57
3	35	<i>S. halepense</i>	1,86	0,82	0
3	CCJ	<i>S. halepense</i>	1,00	4,10	6,02
3	34	<i>S. halepense</i>	1,00	0,23	13,80
3	2	<i>S. halepense</i>	1,75	0	2,02

* Índice de solubilización

Tabla 9

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey de la altura de *Cyperus corymbosus*, *Echinochloa colonum* y *Sorghum halepense* durante la fitorremediación con y sin consorcios de bacterias rizosféricas tolerantes

Tratamientos	Altura* (cm/días)						
	0	10	20	30	40	50	60
<i>Cyperus corymbosus</i> (T1)	47,0±0,9	58,2±1,3 b	68,5±1,4 b	79,0±1,3 c	92,5±1,0 c	102,8±0,8 c	113,2±1,0 d
<i>Echinochloa colonum</i> (T2)	27,7±1,2	36,2±1,0 f	48,5±0,8 e	62,5±1,0 f	72,7±1,2 e	85,3±1,0 e	101,5±1,8 e
<i>Sorghum halepense</i> (T3)	41,8±0,8	52,8±0,8 d	63,7±0,8 c	75,7±0,8 d	86,3±1,0 d	99,2±1,5 d	112,2±1,5 d
<i>C. corymbosus</i> + consorcio 1 (T4)	49,8±1,0	63,3±0,8 a	78,0±1,4 a	90,5±1,9 a	103,8±1,3 a	116,8±0,8 a	133,0±0,9 a
<i>E. colonum</i> + consorcio 2 (T5)	29,7±0,8	41,5±1,0 e	55,5±1,0 d	69,7±0,8 e	86,8±0,8 d	102,8±0,8 c	117,0±0,9 c
<i>S. halepense</i> + consorcio 3 (T6)	45,0±0,9	56,0±0,9 c	68,2±1,3 b	84,2±1,2 b	98,5±1,6 b	113,2±1,3 b	128,5±1,4 b

*Promedio de seis repeticiones

Tabla 10

Índices de efectividad de bacterias tolerantes al Cr⁺⁶ en la altura de *Cyperus corymbosus*, *Echinochloa colonum* y *Sorghum halepense* durante la fitorremediación de suelo contaminado

Tratamientos	IE*/días					
	10	20	30	40	50	60
<i>C. corymbosus</i> + consorcio 1	8,8	13,9	14,6	12,2	13,6	17,5
<i>E. colonum</i> + consorcio 2	14,6	14,4	11,5	19,4	20,5	15,3
<i>S. halepense</i> + consorcio 3	6,1	7,1	11,2	14,1	14,1	14,5

*Promedio de seis repeticiones

Tabla 11

Índices de germinación de Raphanus sativus L. en suelo contaminado con Cr⁺⁶ durante la fitorremediación e inoculación de consorcios de bacterias rizosféricas tolerantes

Tratamientos	Índice de germinación %*/días						
	0	10	20	30	40	50	60
<i>Cyperus corymbosus</i> (T1)	0	1,578	8,013	38,111	44,110	52,000	69,330
<i>Echinochloa colonum</i> (T2)	0	1,745	5,578	34,473	42,110	53,330	72,000
<i>Sorghum halepense</i> (T3)	0	0,715	7,315	33,450	43,407	61,670	72,000
<i>C. corymbosus</i> + consorcio 1 (T4)	0	1,427	10,225	46,170	65,330	85,170	90,000
<i>E. colonum</i> + consorcio 2 (T5)	0	2,783	7,711	41,541	63,830	75,000	82,170
<i>S. halepense</i> + consorcio 3 (T6)	0	2,065	10,087	44,170	64,000	76,330	84,000

*Promedio de seis repeticiones

Los niveles de fitotoxicidad del suelo contaminado con Cr^{+6} disminuyeron conforme transcurrió el proceso de fitorremediación con y sin consorcios de bacterias tolerantes al Cr^{+6} (Tabla 12). En los tratamientos con bacterias el nivel de fitotoxicidad fue severo hasta los 30 días, (T4, T5, T6), moderado hasta los 50 días en T5 y T6 y bajo a los 50 días en T4 y 60 días (T5, T6). En los tratamientos sin bacterias tolerantes al Cr^{+6} el nivel de fitotoxicidad fue severo hasta los 40 días y moderado a los 60 días.

El suelo fitorremediado con *C. corymbosus* más el consorcio 1 de bacterias tolerantes al Cr^{+6} presentó $564,6 \text{ mg kg}^{-1}$ de Cr^{+6} al inicio del proceso y $126,7 \text{ mg kg}^{-1}$ después de 60 días, disminución correspondiente a 77,55 % de eficiencia en la fitorremediación (Tabla 13, anexo K). En las raíces de *C. corymbosus* se cuantificaron $284,3 \text{ mg kg}^{-1}$ de Cr^{+6} y en el suelo $126,7 \text{ mg kg}^{-1}$, obteniéndose un factor de bioconcentración de 2,24 (Tabla 14).

4.5 Identificación fenotípica del género de las bacterias del consorcio en la mayor influencia en la fitorremediación

Las bacterias del consorcio 1 se identificaron fenotípicamente en el género *Pseudomonas* (Tabla 15).

Tabla 12

Niveles de fitotoxicidad de suelo contaminado con Cr⁺⁶ durante la fitorremediación con malezas e inoculación de consorcios de bacterias rizosféricas tolerantes

Tratamientos	Niveles de fitotoxicidad/días						
	0	10	20	30	40	50	60
<i>Cyperus corymbosus</i> (T1)	Severo	Severo	Severo	Severo	Severo	Moderado	Moderado
<i>Echinochloa colonum</i> (T2)	Severo	Severo	Severo	Severo	Severo	Moderado	Moderado
<i>Sorghum halepense</i> (T3)	Severo	Severo	Severo	Severo	Severo	Moderado	Moderado
<i>C. corymbosus</i> + consorcio 1 (T4)	Severo	Severo	Severo	Severo	Moderado	Bajo	Bajo
<i>E. colonum</i> + consorcio 2 (T5)	Severo	Severo	Severo	Severo	Moderado	Moderado	Bajo
<i>S. halepense</i> + consorcio 3 (T6)	Severo	Severo	Severo	Severo	Moderado	Moderado	Bajo

*Promedio de seis repeticiones

Fitotoxicidad baja: IG ≥ 80 %

Fitotoxicidad moderada: 80 % > IG > 50 %

Fitotoxicidad severa: IG ≤ 50 %

Tabla 13

*Características del suelo fitorremediado con *Cyperus corymbosus* y el consorcio 1 de bacterias tolerantes al Cr⁺⁶*

Características	Días						
	0	10	20	30	40	50	60
Índice de germinación de <i>R. sativus</i>	0	1,427	10,225	46,170	65,330	85,170	90,000
Niveles de fitotoxicidad	Severo	Severo	Severo	Severo	Moderado	Bajo	Bajo
Cr ⁺⁶ (mgkg ⁻¹)	564,6	ND	ND	ND	ND	ND	126,7
Eficiencia de la fitorremediación (%)	-	-	-	-	-	-	77,55

Tabla 14

*Factor de bioconcentración de Cr^{+6} en raíces de *Cyperus corymbosus* después de fitorremediación con el consorcio 1 de bacterias tolerantes*

	Cr^{+6} (mg kg^{-1})
Raíces	284,3
Suelo	126,7
Factor de bioconcentración (BCF)	2,24

Tabla 15*Características diferenciales del género Pseudomonas*

Características	<i>Código de cultivos de Pseudomonas spp.</i>				
	<i>CC-1</i>	<i>CC-2</i>	<i>CC-3</i>	<i>CC-4</i>	<i>CC-5</i>
Tinción de Gram	-	-	-	-	-
Prueba de catalasa	+	+	+	+	+
Prueba de oxidasa	+	+	+	+	+
Agar Hierro-Triple Azúcar (TSI)	K/K	K/K	K/K	K/K	K/K
Descarboxilación de lisina	-	-	-	-	-
Utilización de citrato como fuente de carbono y energía	+	+	+	+	+
Producción de indol	-	-	-	-	-
Acidez en lactosa	-	-	-	-	-
Acidez en manitol	-	-	-	-	-
Acidez en ornitina	-	-	-	-	-
Acidez en sorbitol	-	-	-	-	-
Prueba de Voges – Proskauer	-	-	-	-	-

V. DISCUSIÓN

La utilización de plantas para la remediación del suelo con cromo requiere investigar la capacidad de éstas para desarrollarse en ambientes contaminados, como se demostró en malezas de los géneros *Cyperus*, *Datura*, *Solanum*, *Sida*, *Euphorbia*, y *Tridax* (Kumar et al., 2013), plantas de *Medicago sativa*, *Eichhornia crassipes* (Abril, 2016) y *Helianthus annuus* (Bahadur et al., 2017).

La sintomatología observada en las plantas desarrolladas en suelo con Cr^{+6} es explicada por la toxicidad asociada con la rápida difusión del contaminante a través de la membrana citoplasmática y posterior reducción a Cr^{+3} en el interior de las células, con producción de especies reactivas al oxígeno, ROS (Ahemad, 2015). En las plantas, la exposición al Cr^{+6} altera el ADN, los cromosomas, la mitosis, los tejidos y la actividad enzimática; inhibe el transporte de electrones, desorganiza los cloroplastos, disminuye la clorofila y reduce la actividad fotosintética y absorción de agua y nutrientes. En consecuencia, disminuye la germinación de las semillas, el crecimiento de las raíces y la biomasa (Sinha et al., 2018; Ahemad, 2015).

El Cr^{+6} afecta la absorción del fierro, azufre y manganeso, al competir por los acarreadores durante el transporte, que son los mismos para estos nutrientes y el contaminante (Shanker et al., 2005). La clorosis observada es consecuencia del bajo contenido de fierro en las plantas afectadas por los metales pesados (Sinha et al., 2018). El Cr^{+6} reduce el tamaño de las hojas, causa quemado de los bordes y disminuye la capacidad de las plantas para expulsar el agua en el suelo, ocasionando marchitez (Shanker et al., 2005). Como consecuencia de la reducción en la absorción de los nutrientes y fotosíntesis se observa clorosis y necrosis foliar (Jobby et al., 2018).

En la presente investigación, tres de las malezas investigadas de los géneros *Cyperus*, *Echinochloa* y *Sorghum* demostraron ser tolerantes al Cr^{+6} , capacidad reportada previamente en *C. rotundus* por Kumar et al. (2013). La tolerancia de las plantas al Cr^{+6} está asociada a la acumulación del metal en las vacuolas, adhesión a ligandos orgánicos y actividad de las enzimas antioxidantes para estabilizar a las especies reactivas de oxígeno (ROS) producidas y acumuladas (Jobby et al., 2018).

Kumar et al. (2013), analizaron el contenido de Cr en las raíces y el follaje de malezas desarrolladas en el suelo contaminado con Cr ($\text{Cr} = 74 \mu\text{g g}^{-1}$) y determinaron un rango de 35 - 609 en el factor de bioconcentración en las raíces y

49 – 1130 en el follaje demostrando la absorción y acumulación del metal en los tejidos vegetales. Se concluyó que las malezas que pueden desarrollar en ambientes contaminados con metales pesados, pueden ser utilizadas para la remediación de suelos impactados.

Las bacterias tolerantes al Cr^{+6} desarrollaron en medios de cultivo con este contaminante y fueron aisladas de la rizósfera de las malezas, así como también fueron obtenidas de la rizósfera *T. aestivum* (Gupta et al., 2018), de suelos contaminados en áreas periurbanas (Bahadur et al., 2017) y agrícolas (Gupta et al., 2017). Las bacterias y hongos pueden remover el Cr^{+6} , en su mayoría por biosorción, biotransformación o por ambos mecanismos juntos, lo que significa que el metal es adsorbido en la superficie microbiana o es reducido a Cr^{+3} con menor toxicidad. Después de la adsorción el Cr^{+6} precipita en la superficie microbiana o se transforma a Cr^{+3} , en una reacción espontánea o catalizada por la cromato reductasa (Jobby et al., 2018).

En aerobiosis la resistencia al Cr^{+6} en *P. aeruginosa* y *A. eutrophus* se atribuye a la mínima entrada y máxima salida del contaminante a través de la membrana celular. En otras bacterias la resistencia al Cr^{+6} es consecuencia de la reducción a Cr^{+3} ($\text{Cr}^{+6} \rightarrow \text{Cr}^{+5} \rightarrow \text{Cr}^{+4} \rightarrow \text{Cr}^{+3}$), catalizada por enzimas solubles o por reductasas asociadas a la membrana citoplasmática. En anaerobiosis la reducción del Cr^{+6} está asociada a citocromos de los sistemas de transporte de electrones (Cheung y Gu, 2007).

La reducción del Cr^{+6} fue reportada previamente por Gupta et al. (2017), quienes demostraron que la bacteria tolerante *Klebsiella* sp. CPSB4 redujo el Cr^{+6} a Cr^{+3} en medio de cultivo líquido y en el suelo. En el suelo con 50 mg $\text{Cr}^{+6} \text{ kg}^{-1}$ la reducción fue de 95 % y en suelo con 250 mg $\text{Cr}^{+6} \text{ kg}^{-1}$ fue de 78 %, después de 1 semana de incubación. Las investigaciones concluyeron que *Klebsiella* sp. CPSB4 podría ser utilizada sola o en consorcio con otros microorganismos para la fitorremediación de suelo contaminado con Cr^{+6} .

En condiciones abióticas desfavorables las plantas sintetizan altos niveles de etileno generándose el estrés por etileno que induce una muerte prematura, este puede ser disminuido por los microorganismos con actividad 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) desaminasa, que convierte el precursor (ACC) del etileno hasta amonio y α -cetobutirato (Tolba et al., 2019)

La utilización biotecnológica de bacterias para la remediación de ambientes contaminados con Cr^{+6} requiere la investigación de las capacidades para promover el crecimiento en las plantas como son la actividad ACC desaminasa y la producción de ácido indolacético y solubilización de fosfatos, entre otros (Gupta et al., 2018; Bahadur et al., 2017; Gupta et al., 2017).

Gupta et al. (2017) aislaron bacterias solubilizadoras de fosfatos en suelos agrícolas contaminados con Cr^{+6} . *Klebsiella* sp. CPSB4 produjo AIA y solubilizó fosfatos. En el proceso de solubilización de fosfato tricálcico, esta bacteria disminuyó el pH del caldo de cultivo y se detectaron grupos funcionales de ácidos orgánicos, cuya producción está asociada a la solubilización de fosfatos precipitados como los fosfatos de calcio en suelos alcalinos y fosfatos de hierro y aluminio en suelos ácidos.

Li et al. (2016) concluyeron que además de la actividad ACC desaminasa, la producción de ácido indolacético y de sideróforos favorece en las plantas el incremento de la resistencia a los metales pesados. Los investigadores determinaron que la proporción de bacterias con estas capacidades encontradas en el interior de las raíces, en la rizósfera y en suelo fue mayor en plantas de *S. sudanense* inoculadas con *Enterobacter* sp. K3-2 tolerante al cobre, en comparación con el testigo, ambos desarrollados en un suelo con este contaminante.

La fitorremediación es una alternativa para descontaminar el suelo contaminado con metales pesados como el Cr^{+6} ; sin embargo, el proceso es lento. La inoculación de bacterias promotoras de crecimiento vegetal con resistencia al Cr^{+6} reduce el tiempo de remediación porque estos microorganismos mejoran la absorción por modificación de la arquitectura de la raíz, secreción de moléculas secuestrantes de metales y disminución de la toxicidad inducida por el metal, así como también incrementan la biodisponibilidad del metal en el suelo, mediante la producción de metabolitos primarios y secundarios, sideróforos, ácidos orgánicos y surfactantes (Ahemad, 2015).

El Cr^{+6} afectó en forma negativa los parámetros vegetativos de las plantas, coincidiendo con los reportes de Sinha et al. (2018) y Ahemad (2015). Al respecto, Gupta et al. (2018) observaron que el Cr^{+6} redujo la altura, longitud radicular y peso de la biomasa de girasol y tomate; no obstante, la inoculación de *Pseudomonas* sp. CPBS21 disminuyó el efecto negativo del metal. El análisis foliar demostró

incremento en el contenido de clorofila, proteínas totales solubles, nitrógeno, fósforo y hierro, actividad superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), guayacol peroxidasa (GPOD) y disminución del malondialdehído (MDA) formado durante la peroxidación de lípidos y que puede reaccionar con los grupos amino de las proteínas, causando su ruptura.

En la presente investigación, la capacidad de promoción de crecimiento en plantas por las bacterias tolerantes al Cr^{+6} se hizo evidente al incrementar la altura de las malezas desarrolladas en el suelo contaminado con Cr^{+6} , coincidiendo con los reportes de Bahadur et al. (2017) en girasol y Gupta et al. (2018) en tomate y girasol. Por su parte, Li et al. (2016) demostraron que *Enterobacter* sp. K3-2 aumentó en forma significativa el peso de la biomasa (34,6 %) y el cobre acumulado (49 – 95 %) por las raíces de *Sorghum sudanense* desarrollada en un suelo con baja fertilidad y $2297 \text{ mg Cu kg}^{-1}$.

El incremento en el índice de germinación de las semillas de rabanito y la disminución de la fitotoxicidad en el suelo fitorremediado con y sin bacterias evidenció la reducción del Cr^{+6} en mayor grado en los tratamientos con bacterias. Según Sinha et al. (2018) la fitorremediación de suelo contaminado con Cr^{+6} está basada en la fitoextracción o mecanismo por el cual las plantas extraen el contaminante mediante las raíces y lo translocan a otras partes.

La disminución del Cr^{+6} en el suelo después de 60 días de fitorremediación y el factor de bioconcentración mayor de 1, verificaron la extracción del metal del suelo por las raíces de *C. corymbosus*, coincidiendo con Kumar et al. (2013). El factor de bioconcentración determina el nivel de metales acumulados en las raíces o en el follaje respecto a la concentración en el suelo y cuando es mayor que 1 evidencia la capacidad de las plantas para extraer y transportar los metales desde el suelo hacia el tejido vegetal. Estas plantas adaptadas a elevadas concentraciones de los metales son hiperacumuladoras y pueden ser utilizadas para la extracción de estos contaminantes (Kumar et al., 2013).

VI. CONCLUSIONES

6.1 En la región Lambayeque, 2019 se identificaron a *Cyperus corymbosus*, *Echinochloa colonum* y *Sorghum halepense* como malezas tolerantes al Cr^{+6} , en condiciones de invernadero.

6.2 En la rizósfera de las malezas tolerantes al Cr^{+6} se seleccionaron tres consorcios de bacterias tolerantes al metal pesado y con actividad ACC desaminasa.

6.3 Las bacterias de los consorcios aisladas de la rizósfera de malezas tolerantes al Cr^{+6} , solubilizaron *in vitro* fosfato tricálcico en medios sólido y líquido y produjeron índoles.

6.4 Los consorcios de bacterias tolerantes al Cr^{+6} con actividad ACC desaminasa promovieron el crecimiento de las plantas e incrementaron la fitorremediación del suelo contaminado, destacando el tratamiento *Cyperus corymbosus* con el consorcio bacteriano 1 con el que se alcanzó 77,55 % de eficiencia en la fitorremediación y un factor de bioconcentración de 2,24.

VII. RECOMENDACIONES

7.1 Identificar a nivel molecular el consorcio 1 de bacterias aisladas de *Cyperus corymbosus*.

7.2 Determinar la influencia del consorcio 1 de bacterias aisladas de *Cyperus corymbosus* en la fitorremediación de suelo contaminado con Cr^{+6} en condiciones de campo.

7.3 Determinar el factor de translocación del Cr^{+6} en *Cyperus corymbosus* durante la fitorremediación de suelo contaminado.

VIII. REFERENCIAS

- Abril, E. (2016). *Análisis comparativo de la velocidad de degradación de cromo VI aplicando fitorremediación en medios físicos diferentes: suelo y agua* [tesis de pregrado, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo]. Repositorio institucional. <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/4892>
- Ahemad, M. (2015). Enhancing phytoremediation of chromium-stressed soils through plant-growth-promoting bacteria. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2015.02.001>
- Álvarez, P. (2012). *Selección y evaluación de microorganismos solubilizadores de fosfatos en suelos calcáreos del Valle del Mantaro*. [tesis de maestría, Universidad Nacional Agraria La Molina]. Recuperado de: https://www.researchgate.net/publication/334307366_Seleccion_y_evaluacion_de_microorganismos_solubilizadores_de_fosfatos_en_suelos_calcareos_del_valle_del_Mantaro
- Angulo, V., Sanfuentes, E., Rodríguez, F., y Sossa, K. (2014). Caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento en plántulas de *Eucalyptus nitens*. *Revista argentina de Microbiología*, 46(4),338-347. [http://doi.10.1016/S0325-7541\(14\)70093-8](http://doi.10.1016/S0325-7541(14)70093-8)
- Bahadur, A., Ahmad, R., Afzal, A., Feng, H., Suthar, V., Batool, A., Khan, A. y Mahmood-ul-Hassan, M. (2017). The influences of Cr-tolerant rhizobacteria in phytoremediation and attenuation of Cr (VI) stress in agronomic sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Chemosphere*, 179, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.03.102>
- Burgos, M. y Diez, S. (2015). *Eficiencia de la remoción de cromo hexavalente, Cr⁶⁺, por las plantas en humedales artificiales de flujo superficial, 2014* [tesis de pregrado, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo]. Repositorio institucional. <http://repositorio.unprg.edu.pe/bitstream/handle/UNPRG/820/BC-TES-3632.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

- Carpena, R. y Bernal, M. (2007). Claves de la fitorremediación: fitotecnologías para la recuperación de suelos. *Ecosistemas*, 16 (2), 1-3. https://www.researchgate.net/publication/39439864_Claves_de_la_fitorremediacion_fitotecnologias_para_la_recuperacion_de_suelos
- Cheung, K. y Gu, J. (2007). Mechanism of hexavalent chromium detoxification by microorganisms and bioremediation application potential: A review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 59, 8-15. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2006.05.002>
- Cordero, J. (2015). *Fitorremediación in situ para la recuperación de suelos contaminados por metales pesados (plomo y cadmio) y evaluación de selenio en la finca Furatena Alta en el municipio de Útica (Cundinamarca)* [tesis de pregrado, Universidad Libre]. Repositorio institucional. [https://repository.unilibre.edu.co/bitstream/handle/10901/7958/Fitorremediacion%20in%20situ%20para%20la%20remocion%20de%20metales%20pesados%20\(plomo%20y%20cadmio\)%20y%20evaluacion%20de%20sel.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repository.unilibre.edu.co/bitstream/handle/10901/7958/Fitorremediacion%20in%20situ%20para%20la%20remocion%20de%20metales%20pesados%20(plomo%20y%20cadmio)%20y%20evaluacion%20de%20sel.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Covarrubias, S. y Peña, J. (2017). Contaminación ambiental por metales pesados en México: Problemática y estrategias de fitorremediación. *Revista Internacional Contaminación Ambiental*, 33, 7-21. <https://doi.org/10.20937/RICA.2017.33.esp01.01>
- Delgadillo, A., González, C., Prieto, F., Villagómez, J. y Acevedo, O. (2011). *Fitorremediación: Una alternativa para eliminar la contaminación. Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 14(2), 597-612. <http://www.scielo.org.mx/pdf/tsa/v14n2/v14n2a2.pdf>
- De Oliveira, L., Ma, L., Santos, J., Guilherme, L. y Lessl, J. (2014). Effects of arsenate, chromate, and sulfate on arsenic and chromium uptake and translocation by arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. *Environmental Pollution*, 184, 187-192. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.08.025>
- Diez, F. (2008). *Fitocorrección de suelos contaminados con metales pesados: Evaluación de plantas tolerantes y optimización del proceso mediante prácticas agronómicas* [tesis de doctorado, Universidad de Santiago de Compostela]. Repositorio institucional. <http://hdl.handle.net/10347/2540>

- Escobar, C., Horna, Y., Carreño, C., y Mendoza, G. (2011). Caracterización de cepas nativas de *Azotobacter* spp. Y su efecto en el desarrollo de *Lycopersicum sculentum* MILL. "tomate" en Lambayeque. *Scientia Agropecuaria*, 2(1), 39-49. <http://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2011.01.05>
- García, M. (1993). Guía técnica para minimización de residuos en curtiembres. Resumen ejecutivo. Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Medio Ambiente CEPIS, Lima-Perú.
- García, F., Muñoz, H., Carreño, C., y Mendoza, G. (2010). Caracterización de cepas nativas de *Azospirillum* spp. Y su efecto en el desarrollo de *Oryza sativa* L. "arroz" en Lambayeque. *Scientia Agropecuaria*, 1, 107-116. <http://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2010.02.01>
- Gupta, P., Kumar, V., Usmani, Z., Rani, R. y Chandra, A. (2017). Phosphate solubilization and chromium (VI) remediation potential of *Klebsiella* sp. strain CPSB4 isolated from the chromium contaminated agricultural soil. *Chemosphere* (2017), <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.10.164>
- Gupta, P., Rani, R., Chandra, A. y Kumar, V. (2018). Potential applications of *Pseudomonas* sp. (strain CPSB21) to ameliorate Cr⁶⁺ stress and phytoremediation of tannery effluent contaminated agricultural soils. *Scientific Reports* (2018), <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23322-5>
- Gutiérrez, F. y Cervantes, C. (2008). Interacciones microbianas con el cromo: mecanismos y potencial biotecnológico. Ide@s CONCYTEG, 37, 21-36. <https://sices.guanajuato.gob.mx/resources/ideas/ebooks/37/descargas.pdf>
- Gutiérrez, J., Espino, A., Coreño, A., Acevedo, F., Reyna, G., Fernández, F., Tomasini, A., Wrobel, K. y Wrobel, K. (2010). Mecanismos de interacción con cromo y aplicaciones biotecnológicas en hongos. *Revista latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal*, 1(1), 47-63. <http://www.solabiaa.org/ojs3/index.php/RELBAA/article/view/15/14>
- Hernández, R., Fernández, C. y Baptista, M. (2014). *Metodología de la Investigación*. (6ta ed.). México: McGraw-Hill/ Interamericana Editores S.A. de C.V.
- Holt, J., Krieg, N., Sneath, P., Staley, J., y Williams, S. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. (9th ed.). Lippincott Williams & Wilkins.

- Jobby, R., Jha, P., Kumar, A. y Desai, N. (2018). Biosorption and biotransformation of hexavalent chromium [Cr (VI)]: A comprehensive review. *Chemosphere*, 207, 255-266. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.05.050>
- Kumar, N., Bauddh, K., Kumar, S., Dwivedi, N., Singh, D. y Barman, S. (2013). Accumulation of metals in weed species grown on the soil contaminated with industrial waste and their phytoremediation potential. *Ecological Engineering*, 61, 491-495. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2013.10.004>
- Lakhal, D., Boutaleb, N., Bahlaouan, B., Taiek, T., Fathi, A., Mekouar, M., Abouakil, N., Lazar, S., El antri, S. (2017). Mixture Experimental Design in the Development of a Bio Fertilizer from Fish Waste, Molasses and Scum. *International Journal of Engineering Research & Technology (IJERT)*, 6(6), 588-594.
<https://www.ijert.org/mixture-experimental-design-in-the-development-of-a-bio-fertilizer-from-fish-waste-molasses-and-scum>
- Lara, C., Esquivel, L., y Peñata, N. (2011). Bacterias nativas solubilizadoras de fosfatos para incrementar los cultivos en el departamento de Córdoba-Colombia. *Biotecnología en el Sector agropecuario y agroindustrial*, 9(2). http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-35612011000200013
- León, S. (2016). *Evaluación del potencial fitorremediador de dos especies vegetales Paspalum millegrana L. y Bidens pilosa L. para remediar suelos contaminados por hidrocarburos provenientes de la lavadora y lubricadora Marifer, Cantón Zamora* [tesis de pregrado, Universidad Nacional de Loja]. Repositorio institucional.
<https://dspace.unl.edu.ec/jspui/handle/123456789/17608>
- Li, Y., Wang, Q., Wang, L., He, L., Sheng, X. (2016). Increased growth and root Cu accumulation of Sorghum sudanense by endophytic Enterobacter sp. K3-2: Implications for Sorghum Sudanense biomass production and phytostabilization. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 124, 163-168. <https://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.10.012>
- Liu, D., Zou, J., Wang, M. y Jiang, W. (2008). Hexavalent chromium uptake and its effects on mineral uptake, antioxidant defence system and photosynthesis in *Amaranthus viridis* L. *Bioresource Technology*, 99(7), 2628-2636. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.04.045>

- Liu, J., Zhang, X., You, S., Wu, Q. y Zhou, K. (2015). Function of *Leersia hexandra* Swartz in constructed wetlands for Cr (VI) decontamination: A comparative study of planted and unplanted mesocosms. *Ecological Engineering*. 81, 70-75. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2015.04.025>
- Martínez, M. (2009). *Aislamiento de cepas nativas bacterianas a partir de biopelícula obtenida de un sitio de vertimiento de aguas residuales con alto contenido de cromo* [tesis de maestría, Universidad Nacional de Colombia]. Repositorio institucional. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/69971>
- Méndez, A., Amachi, F. Vera, Z. y Espinosa, R. (2016). Fitorremediación al plomo asimilable, una biotecnología promisorio. *Revista Ciencia y Tecnología – Para el Desarrollo – UJCM*, 2 (4), 73-77. <https://revistas.ujcm.edu.pe/index.php/rctd/article/view/58/55>
- Ministerio del Ambiente (2017). Decreto Supremo N° 011-2017-MINAM del 2 de diciembre de 2017 por el cual se aprueban los estándares de calidad ambiental (ECA) para suelo. Lima: Ministerio del Ambiente de Perú. <https://sinia.minam.gob.pe/download/file/fid/64487>
- Mohanty, M. y Patra, H. (2012). Phytoremediation potential of Paragrass – An *in situ* approach for chromium contaminated soil. *International Journal Of Phytoremediation*. 14(8), 796-805. <https://doi.org/10.1080/15226514.2011.619595>
- Morales, A. (2017). *Evaluación de los efectos producidos por el cromo hexavalente en el recurso suelo en la etapa de curtido de la empresa curtipiel Castro, provincia de Tungurahua* [tesis de pregrado, Universidad Técnica de Cotopaxi]. Repositorio institucional. <http://repositorio.utc.edu.ec/handle/27000/4234>
- Municipalidad distrital de Reque (2013). Geografía de la ciudad de Reque. <https://munireque.gob.pe/?p=65&ref=1>
- Municipalidad Provincial de Lambayeque (1999). Conociendo Lambayeque. <http://proyectos.inei.gob.pe/web/biblioineipub/bancopub/Est/Lib0267/cap1.htm>
- Murcia, F., Zornoza, R., Acosta, J., Faz, A., Martínez, S., González, V., Rosales, R. y Gómez, M. (2014). *Caracterización del contenido de cromo, su disponibilidad y sus interacciones con las propiedades del suelo para evaluar el potencial uso de la fitoextracción*. Congreso Nacional del Medio Ambiente, CONAMA 2014, Madrid, España.

- <http://www.conama2014.conama.org/conama2014/download/files/conama2014/CT%202014/1896711835.pdf>
- Noreen, S., Ali, B., y Hasnain, S. (2012). Growth promotion of *Vigna mungo* (L.) by *Pseudomonas* spp. exhibiting auxin production and ACC-deaminase activity. *Annals of Microbiology*, 62, 411-417. <http://doi.org/10.1007/s13213-011-0277-7>
- Núñez, R., Meas, Y., Ortega, R. y Olguín, E. (2004). Fitorremediación: Fundamentos y aplicaciones. *Ciencia*, 55 (3), 69-83. http://www.revistaciencia.amc.edu.mx/images/revista/55_3/Fitorremediacion.pdf
- Penrose, D., y Glick, B. (2003). Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiologia Plantarum*, 118, 10-15. <http://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2003.00086>
- Peralta, M. y Volke, T. (2012). La defensa antioxidante en las Plantas: Una herramienta clave en la fitorremediación, Chihuahua, México. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 11, (1), 75-88. https://www.researchgate.net/publication/262471826_La_defensa_antioxidante_en_las_plantas_Una_herramienta_clave_para_la_fitorremediacion
- Ramírez, M., Riveros, H., Campos, J. y Cervantes, C. (2009). Reducción bacteriana de cromo hexavalente: Mecanismos y explicaciones. *REB*, 28(3), 73-79. <https://www.medigraphic.com/pdfs/revedubio/reb-2009/reb093b.pdf>
- Ranieri, E., Fratino, U., Petruzzelli, D. y Carraro, A. (2013). A comparison between *Phragmites australis* and *Helianthus annuus* in chromium phytoextraction. *Water, Air & Soil Pollution*, 224(3), 1-9. <https://doi.org/10.1007/s11270-013-1465-9>
- Redondo, S., Mateos, E., Vecino, I. y Feldman, S. (2011). Accumulation and tolerance characteristics of chromium in a cordgrass Cr-hyperaccumulator, *Spartina argentinensis*. *Journal Of Hazardous Materials*. 185(2-3), 862-869. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.09.101>
- Rodier, J., y Rodi, L. (2005). *Análisis de las aguas*. Barcelona, España: Edición Omega, S.A
- Ruíz, D. (2013). *Fitorremediación de suelos contaminados con plomo en actividades industriales* [tesis de pregrado, Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro"]. Repositorio institucional.

<http://alertaplomo.org/sites/default/files/fitorremediacion.pdf>

Sánchez, S. (2008). *Especies vegetales y microorganismos rizosféricos tolerantes a metales pesados de un ecosistema contaminado* [tesis de maestría, Universidad Agraria de La Habana].

Shanker, A., Cervantes, C., Loza-Tavera, H., Avudainayagam, S. (2005). Chromium toxicity in plants. *Environment International*. 31, 739-753. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2005.02.003>

Sharmin, S., Alam, I., Kim, K., Kim, Y., Kim, P., Bahk, J. y Lee, B. (2012). Chromium- induced physiological and proteomic alterations in roots of *Miscanthus sinensis*. *Plant Science*. 187, 113-126. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.02.002>

Siddikee, M., Glick, B., Chauhan, S., Yim, W., y Sa, T. (2011). Enhancement of growth and salt tolerance of red pepper seedlings (*Capsicum annuum* L.) by regulating stress ethylene synthesis with halotolerant bacteria containing 1-aminociclopropane-1-carboxylic acid deaminase activity. *Plant Physiology and Biochemistry*. 49, 427-34. <http://doi.org/10.1016/j.plaphy.2011.01.015>

Sinha, V., Pakshirajan, K. y Chaturvedi, R. (2018). Chromium tolerance, bioaccumulation and localization in plants: An overview. *Journal Of Environmental Management*, 206, 715-730. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.10.033>

Sinha, V., Pakshirajan, K. y Chaturvedi, R. (2014). Chromium (VI) Accumulation and tolerance by *Tradescantia pallida*: Biochemical and antioxidant study. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 173(8), 2297-2306. <https://doi.org/10.1007/s12010-014- 1035-7>

Soto, C., Gutiérrez, S., Rey, A. y González, E. (2010). Biotransformación de metales pesados presentes en lodos ribereños de los ríos Bogotá y Tunjuelo. *NOVA- Publicación Científica en Ciencias Biomédica*, 8(14), 195-205. <https://revistas.unicolmayor.edu.co/index.php/nova/article/view/161/32>

Thangavel, P. y Subbhuraam, C. (2004). Phytoextraction – Role of hyperaccumulators in metal contaminated soils. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 70 (1), 109-130. https://www.researchgate.net/publication/284396760_Phytoextraction_Role_of_Hyperaccumulators_in_Metal_Contaminated_Soils

- Tolba, S., Ibrahim, M., Amer, E. y Ahmed, D. (2019). First insights into salt tolerance improvement of Stevia by plant growth-promoting *Streptomyces* species. *Archives of Microbiology*, 1-12. <https://doi.org/10.1007/s00203-019-016996-y>
- Vardharajula, S., Ali, S., Grover, M., Reddy, G., y Bandi, V. (2011) Drought-tolerant plant growth promoting *Bacillus* spp.: Effect on growth, osmolytes, and antioxidant status of maize under drought stress. *Journal of Plant Interactions*, 6(1), 1-14. <http://doi:10.1080/17429145.2010.535178>.
- Vidal, M. (2009). *Evaluación de los mecanismos de adsorción y acumulación intracelular de plomo (Pb^{+2}), en sistemas continuos de fitorremediación con *Salvinia mínima** [tesis de maestría, Instituto de Ecología, A.C]. Repositorio institucional. <https://repositorio.uca.edu.ar/handle/123456789/5753>

Anexo A

Cuantificación de Cr⁺⁶ en el suelo experimental obtenido en el botadero de residuos



Información General

Matriz: Suelo

Solicitud de Análisis: Cotización N° 41064 (Jul-040)

Muestreado por: Cliente

Procedencia: Lambayeque

Identificación de Laboratorio: S-0001621923
 Tipo de Muestra: Suelo
 Identificación de Muestra: Muestra 2
 Fecha y Hora de Muestreo: 2019-07-03 11:00
 Fecha de Recepción de la Muestra: 2019-07-04
 Fecha de Inicio de análisis: 2019-07-08

Análisis	Resultado	Unidad
Química		
Cromo Hexavalente. Suelo. EPA 3060A, Revisión 1 (1996)/ EPA 7196A, Revisión 1 (1992). Alkaline Digestion For Hexavalent Chromium / Chromium, Hexavalent (Colorimetric).		
Cromo Hexavalente	N.C.(<0,28)	mg/Kg

Notas de Ensayo:

N.C.: Significa que el resultado es No Cuantificable y es menor al Límite de Cuantificación Indicado en el paréntesis.

Anexo B

Preparación de una solución de dicromato de potasio a diferentes concentraciones

Cantidad de cromo Cr_2 necesaria para preparar 3000 mL de dicromato de potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) a 10 000 ppm

$$\text{ppm} = \frac{\text{Masa del soluto (mg)}}{\text{Volumen de la solución (L)}} \quad 10000 = \frac{\text{Cantidad de cromo (mg)}}{3}$$

Cantidad de cromo: 30000 mg

El peso molecular del $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ es 294,18 mg y contiene 104 mg de cromo (Cr_2); entonces:

$$294,18 \text{ mg } \text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 \rightarrow 104 \text{ mg } \text{Cr}_2$$

$$X \text{ mg } \text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 \rightarrow 30000 \text{ mg } \text{Cr}_2$$

$$X \text{ mg } \text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 = 84,8 \text{ g}$$

Para preparar una solución de 10000 ppm de cromo, se debe pesar 84,8 g de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ y diluir en agua destilada hasta completar 3L.

- Concentración a 15 ppm, para una maceta que contiene 6000 g

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$10000 \text{ ppm} \times V_1 = 15 \text{ ppm} \times 6000$$

$$V_1 = \frac{15 \times 6000}{10000}$$

$$V_1 = 9 \text{ ml}$$

- Concentración a 30 ppm, para una maceta que contiene 6000 g

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$10000 \text{ ppm} \times V_1 = 30 \text{ ppm} \times 6000$$

$$V_1 = \frac{30 \times 6000}{10000}$$

$$V_1 = 18 \text{ ml}$$

- Concentración a 60 ppm, para una maceta que contiene 6000 g

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$10000 \text{ ppm} \times V_1 = 60 \text{ ppm} \times 6000$$

$$V_1 = \frac{60 \times 6000}{10000}$$

$$V_1 = 36 \text{ ml}$$

- Concentración a 120 ppm, para una maceta que contiene 6000 g

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$10000 \text{ ppm} \times V_1 = 120 \text{ ppm} \times 6000$$

$$V_1 = \frac{120 \times 6000}{10000}$$

$$V_1 = 72 \text{ ml}$$

- Concentración a 240 ppm, para una maceta que contiene 6000 g

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$10000 \text{ ppm} \times V_1 = 240 \text{ ppm} \times 6000$$

$$V_1 = \frac{240 \times 6000}{10000}$$

$$V_1 = 144 \text{ ml}$$

Anexo C

Preparación de una solución 0,5M de ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico ACC

Disolver 0,1 g de ACC en 2 mL de agua destilada para obtener una solución 0,5 M

Fórmula: $C_4H_7NO_2$

Masa molar: 101,1 g/mol

Cálculo de la Molaridad de la solución de ACC

$$X = 1000 \text{ mL} \times \frac{\text{g de soluto}}{\text{mL de disolución}} \times \frac{1 \text{ mol}}{\text{masa molar del soluto g}}$$

$$X = 1000 \text{ mL} \times \frac{0,1 \text{ g}}{2 \text{ mL}} \times \frac{1 \text{ mol}}{101,1 \text{ g}}$$

$$X = \frac{100}{202,2}$$

$$X = 0,5 \text{ M}$$

¿Cuánto de esta solución 0,5 M se requiere para que el medio mínimo Dworkin & Foster tenga 3,0 mM ACC?

Donde 1 M = 1000 mM

Donde 1 mol = 1000 mM

Entonces: $0,5 \text{ M} \times 1000 = 500 \text{ mM}$

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$500 \text{ mM} \times V_1 = 3 \text{ mM} \times 1000 \text{ mL}$$

$$V_1 = \frac{3000}{500}$$

$$V_1 = 6 \text{ mL}$$

$$6 \text{ mL} \rightarrow 1000 \text{ mL}$$

$$2 \text{ mL} \rightarrow X$$

$$X = 333,3 \text{ mL}$$

Para preparar el medio minio Dworkin & Foster con 3,0 mM ACC, los 2 mL de la solución ACC 0,5 M llevarlos a 333,3 mL de medio de cultivo.

Anexo D

Medio de cultivo National Botanical Research Institute, NBRIP (en Alvarado y Valderrama, 2014)

Componentes	gL ⁻¹
Glucosa	10,0
Ca ₃ (PO ₂)	5,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,1
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5
KCl	0,2
MgCl ₂ .H ₂ O	5,0
Agar Agar	15,0
Agua destilada	1000 mL

Solución de antimicótico

Disolver una cápsula de 150 mg de Fluconazol en 10 mL de alcohol al 95 %.
 Agregar 2 mL de solución de antibiótico por litro de medio de cultivo para tener 45 mg de Fluconazol por litro.

Anexo E

Cuantificación de fósforo solubilizado *in vitro*

a. Reactivos (en Rodier y Rodi, 2005)

- Solución de ácido sulfúrico 5 N

Ácido sulfúrico (d= 1,84)	14 ml
Agua destilada hasta enrase	100 ml
- Solución de molibdato amónico 4%

	20 ml
--	-------
- Solución de ácido ascórbico

Ácido ascórbico	1,76 ml
Agua destilada hasta enrase	100 ml
- Solución de amético (Preparar al momento de uso)

Tartrato doble de antimonio y potasio	0,0274 g
Agua destilada hasta enrase	100 ml
- Reactivo para determinación de ortofosfatos

Ácido sulfúrico 5 N	40 ml
Solución de Molibdato amónico	12 ml
Solución de ácido ascórbico	24 ml
Solución de emético	4 ml
- Solución madre de 0,2 mgL⁻¹ de fósforo

Fosfato monopotásico previamente desecado en estufa a 100 °C	877 g
Agua destilada hasta enrase	100 ml
- Solución hija de 2 mgL⁻¹ de fósforo

Diluir 1 ml de solución madre en 99 ml de agua destilada (1/100)	
--	--

b. Método colorimétrico del Molibdato para cuantificar fósforo soluble (en Rodier y Rodi, 2005)

b.1. Fundamento

En medio ácido y en presencia de molibdato amónico, los ortofosfatos forman un complejo fosfomolibdico que, reducido por el ácido ascórbico, desarrolla una coloración azul susceptible de una determinación colorimétrica y cuya aparición se acelera utilizando el catalizador emético, tartrato doble de antimonio y potasio.

b.2. Limpieza de los recipientes de vidrio

Para la limpieza del material de vidrio no utilizar detergente que contenga fosfato. Lavados con ácido clorhídrico diluido y enjugados cuidadosamente con agua destilada.

b.3. Preparación de la curva de calibración

Colocar en una serie de matraces aforados de 25 mL:

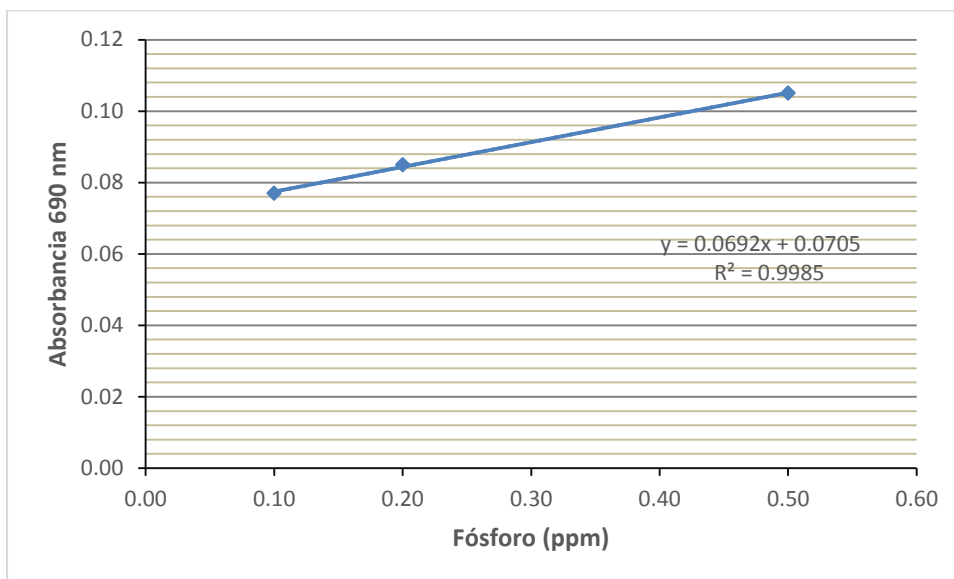
Numero de matraces	T	I	II	III
Solución salina de fósforo de 2 mgL^{-1}	0	1	2	5
Agua bidestilada (mL)	20	19	18	15
Reactivo indicador	4	4	4	4
Agua destilada hasta enrase (mL)	25	25	25	25
Correspondencia de fósforo en mgL^{-1}	0	0,1	0,2	0,5

Esperar 20 minutos y efectuar las lecturas en el espectrofotómetro a la longitud de onda de 690 nm en cubetas de 10 cm. Construir la curva de calibración. Los datos de la absorbancia corregida se analizara mediante regresión lineal con el programa Microsoft Excel 2013 para obtener la ecuación de la recta y el coeficiente (R^2) que deberá ser mayor a 0.9 para demostrar una dispersión homogénea de los valores sobre la recta.

b.4. Procedimiento para cuantificar fosfatos en la muestra

Introducir 20 mL de la muestra a analizar en un matraz aforado de 25 mL. Añadir 4ml de reactivo indicador, completar el volumen a 25 mL con agua destilada. Esperar 20 minutos y efectuar la lectura en el espectrofotómetro de luz visible con una longitud de onda de 690 nm. Tener en cuenta el valor leído para el testigo. Obtener los resultados en la curva de calibración. Para una muestra de 20 mL, la curva indica el contenido de fósforo expresado en miligramos por litro

N° de tubo	Fósforo soluble (ppm)	Absorbancia
1	0,1	0,077
2	0,2	0,085
3	0,5	0,105



En la ecuación obtenida:

$$y = 0,0692x + 0,071$$

Dónde:

y: representa la absorbancia captada (variable dependiente)

x: cantidad de fosforo en ppm (variable independiente)

Despejar “x” para obtener la cantidad de fósforo (ppm) producido por cada bacteria nativa.

$$x = \frac{y - 0,071}{0,0692}$$

ANEXO F**Caldo Trypticase Soya suplementado con triptófano. (en García y Muñoz, 2010)**

Componentes	gL ⁻¹
Peptona de caseína	17,0
Peptona de harina de soya	3,0
D(+) glucosa (dextrosa)	2,5
Cloruro de sodio	5,0
Fosfato dipotásico	2,5
Triptófano	0,01
Agua destilada csp	1000 mL

Disolver por calentamiento y ajustar a pH 7,3

ANEXO G

Procedimiento para elaborar la curva de calibración para cuantificar indoles

a. Reactivos

- **Reactivo de Salkowski (en García y Muñoz, 2010)**

Componentes	gL ⁻¹
H ₂ SO ₄ concentrado	150 mL
Agua destilada	250 mL
FeCl ₃ 0,5 M en Agua destilada	7,5 mL

Al momento de la preparación, verter el ácido sulfúrico concentrado en un balón con 250 mL de agua destilada y simultáneamente enfriar con chorro de agua constante. Finalmente agregar el cloruro férrico al 0,5 M.

Utilizar 4mL del reactivo para 1 mL de la muestra investigada.

b. Método colorimétrico de Salkowski para cuantificar indoles (en Matilla, 2007)

b.1. Fundamento de la reacción de Salkowski

Mediante la reacción de Salkowski se detectan grupos indol presentes en el medio de cultivo y la concentración de indol es directamente proporcional a la intensidad de color rojo producido. A su vez, el cambio de color es el resultado de una reacción oxidativa con el ácido sulfúrico, donde por medio de una transaminación un grupo amino es sustituido por el cloro previamente del FeCl₃, originando un compuesto visible de color rosado del indolacético. Otras coloraciones indican la presencia de productos intermedios de la síntesis del ácido indolacético, que pueden ser generados a partir del triptófano.

b.2 Preparación de diluciones a partir de una solución madre de AIA

Para obtener una curva patrón de ácido indolacético, preparar una solución madre de 100 ppm, para lo cual se pesan 10 mg de ácido indolacético y se disuelven con unas gotas de NaOH en un matraz aforado a 100 mL. A continuación, enrasar con agua bidestilada y agitar hasta homogenizar. Posteriormente se realizan las siguientes diluciones:

Nº de tubo	Solución patrón (100 µgmL ⁻¹)	H2O bidestilada [µL]*	Concentración AIA (mgL ⁻¹)
1	0	1000	0
2	20	980	2
3	40	960	4
4	60	940	6
5	80	920	8
6	100	900	10
7	150	850	15
8	200	800	20
9	300	700	30
10	400	600	40
11	500	500	50
12	600	400	60

*1000 µL = 1 mL

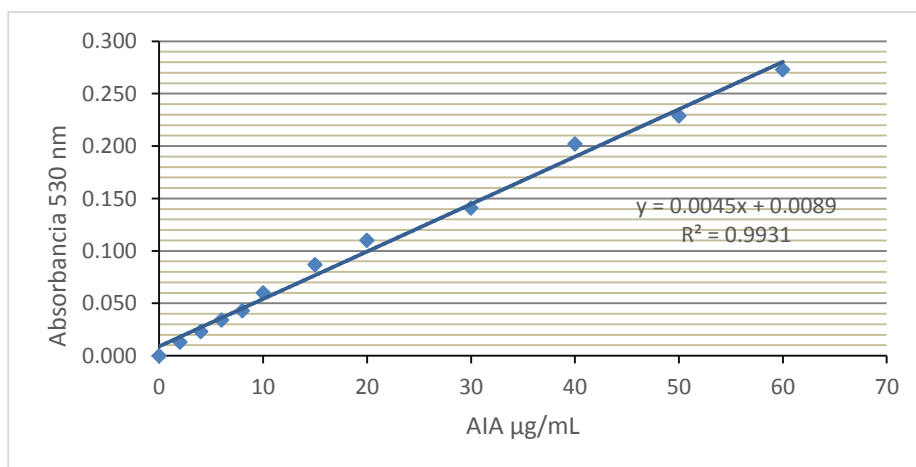
b.3. Procedimiento para la cuantificación de AIA por colorimetría

Obtenidas las concentraciones parciales de AIA extraer de cada tubo 0,4 mL de solución, verter en tubos de 13 x 75 mm y agregar 1,6 mL de reactivo de Salkowski (1:4). Dejar en reposo en oscuridad por 30 minutos. Observar la presencia de una coloración rojiza en los tubos. A continuación, leer la absorbancia de cada dilución en espectrofotómetro a 530 nm.

Una vez obtenida la absorbancia en todas las concentraciones de ácido indolacético, corregir los valores y mediante regresión lineal en el programa Microsoft Excel 2007, obtener la ecuación de la recta y el coeficiente (R^2) que deberá ser mayor a 0,9 para demostrar una dispersión homogénea de los valores sobre la recta.

N° de tubo	AIA (µg/mL)	Absorbancia
1	0	0,000
2	2	0,013
3	4	0,023
4	6	0,034
5	8	0,043
6	10	0,060
7	10	0,087
8	20	0,110
9	30	0,141
10	40	0,202
11	50	0,229
12	60	0,273

Obtenida la absorbancia de las doce concentraciones de ácido indol acético, introducir los datos en el programa Microsoft Office Excel 2013 y construir la curva patrón de calibración



En la ecuación obtenida:

$$y = 0,0045x + 0,0089$$

Dónde:

y: representa la absorbancia captada (variable dependiente)

x: cantidad de ácido indolacético en ppm (variable independiente)

Despejar "x" para obtener la cantidad de ácido indolacético en (ppm) producido por cada bacteria nativa.

$$x = \frac{y - 0,0089}{0,0045}$$

ANEXO H

Concentración inicial de Cr⁺⁶ durante la fitorremediación del suelo contaminado



**LABORATORIO DE ENSAYO ACREDITADO POR EL
ORGANISMO PERUANO DE ACREDITACIÓN INACAL - DA
CON REGISTRO N° LE 003**



INFORME DE ENSAYO N° 1-16683/19

Pág. 1/1

Solicitante : RECOBA COLCHÓN, FELIPE ERNESTO

Domicilio legal : Prof. Miguel Grau S/N - Reque - Chiclayo - Lambayeque

Producto declarado : **SUELOS**

Cantidad de Muestras para el Ensayo : 1 muestra x 250 g
Muestra proporcionada por el solicitante

Identificación de la muestra : **MUESTRA: N° 001**
PUNTO DE MUESTREO: UNIVERSIDAD NACIONAL "PEDRO RUIZ GALLO" - LAMBAYEQUE
FECHA Y HORA DE MUESTREO: 2019-10-17 / 11:35

Forma de presentación : En pote de plástico cerrado y refrigerado

Fecha de recepción : 2019 - 10 - 18

Fecha de inicio de ensayo : 2019 - 11 - 04

Fecha de término del ensayo : 2019 - 11 - 04

Ensayo realizado en : Laboratorio Ambiental

Identificado con : H/S 19012067 (EXMA-16515-2019)

Validez del documento : Este documento es válido solo para las muestras descritas

Ensayo	LD	Unidad	Resultado
Cromo Hexavalente	0,4	mg/kg	564,6

LD: Límite de detección

MÉTODO

Cromo Hexavalente: EPA Method 7196A, Revision 1 1992. (Preparación de muestra EPA: Method 3060A, Alkaline Digestion for Hexavalent Chromium 1996) Chromium, Hexavalent (Colorimetric).

OBSERVACIONES

Prohibida la reproducción total o parcial de este informe, sin la autorización escrita de CERPER S.A.
Los resultados de los ensayos no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de la calidad de la entidad que lo produce.

Callao, 05 de noviembre de 2019
AM

CERTIFICACIONES DEL PERU S.A.
ING. ROSA PALOMINO LOO
C.I.P. 40302
COORDINADOR DE LABORATORIOS

"Los ensayos acreditados del presente informe, al estar en el marco de la acreditación del INACAL-DA, se encuentran dentro del ámbito de reconocimiento mutuo de los miembros firmantes de IAAC e ILAC"

AREQUIPA
Calle Teniente Rodríguez N° 1415
Miraflores - Arequipa
T. (054) 265572

CALLAO
Oficina Principal
Av. Santa Rosa 601, La Perla - Callao
T. (511) 319 9000
info@cerper.com - www.cerper.com

PIURA
Urb. Angamos A - 2 - Piura
T. (073) 322 908 / 9975 63161

"EL USO INDEBIDO DE ESTE INFORME DE ENSAYO CONSTITUYE DELITO SANCIONADO CONFORME A LA LEY, POR UNA AUTORIDAD COMPETENTE"

ANEXO I

**Temperaturas mínima, media y máxima durante la fitorremediación del suelo
contaminado con Cr⁺⁶**

Fecha	Temperatura mínima (°C)	Temperatura media (°C)	Temperatura máxima (°C)
15/01/2020	19	22	25
16/01/2020	18	22	25
17/01/2020	18	23	26
18/01/2020	18	22	25
19/01/2020	17	22	25
20/01/2020	19	22	25
21/01/2020	18	23	26
22/01/2020	18	21	24
23/01/2020	18	22	24
24/01/2020	18	22	25
25/01/2020	18	22	24
26/01/2020	18	21	24
27/01/2020	17	22	26
28/01/2020	19	21	25
29/01/2020	18	22	25
30/01/2020	19	22	24
31/01/2020	17	23	25
01/02/2020	18	23	24
02/02/2020	18	22	25
03/02/2020	18	21	24
04/02/2020	18	22	24
05/02/2020	18	22	24
06/02/2020	18	23	25
07/02/2020	19	21	24
08/02/2020	18	21	24
09/02/2020	18	21	24
10/02/2020	19	21	24
11/02/2020	19	21	25
12/02/2020	20	21	25

13/02/2020	19	21	24
14/02/2020	18	22	25
15/02/2020	19	22	25
16/02/2020	19	21	24
17/02/2020	20	21	25
18/02/2020	18	21	25
19/02/2020	19	22	26
20/02/2020	17	22	26
21/02/2020	18	22	26
22/02/2020	19	21	26
23/02/2020	19	22	26
24/02/2020	19	21	25
25/02/2020	18	21	26
26/02/2020	18	22	27
27/02/2020	19	20	26
28/02/2020	19	20	25
29/02/2020	18	21	26
01/03/2020	18	23	27
02/03/2020	18	21	26
03/03/2020	18	21	25
04/03/2020	18	22	25
05/03/2020	17	22	25
06/03/2020	17	20	24
07/03/2020	17	20	25
08/03/2020	18	21	27
09/03/2020	19	21	28
10/03/2020	18	22	26
11/03/2020	18	21	26
12/03/2020	18	20	25
13/03/2020	18	20	26
14/03/2020	20	23	27
15/03/2020	21	23	27

ANEXO J

**Análisis de varianza de los promedios de la altura de las malezas
tolerantes al Cr⁺⁶**

Pruebas de normalidad

		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
TRATAMIENTOS		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Altura 0 días	<i>Sorghum halepense</i> sin consorcio 3	,254	6	,200 [*]	,866	6	,212
	<i>Sorghum halepense</i> +consorcio 3	,202	6	,200 [*]	,853	6	,167
	<i>Cyperus corymbosus</i> sin consorcio 1	,202	6	,200 [*]	,853	6	,167
	<i>Cyperus corymbosus</i> +consorcio 1	,302	6	,094	,775	6	,035
	<i>Echinochloa colonum</i> sin consorcio 2	,209	6	,200 [*]	,907	6	,415
	<i>Echinochloa colonum</i> +consorcio 2	,293	6	,117	,822	6	,091

*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

Prueba de homogeneidad de varianzas

		Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Altura 0 días	Se basa en la media	,718	5	30	,615
	Se basa en la mediana	,681	5	30	,641
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	,681	5	29,142	,642
	Se basa en la media recortada	,709	5	30	,621

ANOVA

Altura 0 días

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	2596,667	5	519,333	591,646	,000
Dentro de grupos	26,333	30	,878		
Total	2623,000	35			

Altura 0 días

HSD Tukey^a

		Subconjunto para alfa = 0.05					
TRATAMIENTOS	N	1	2	3	4	5	6
<i>Echinochloa colonum</i> sin consorcio 2	6	27,667					
<i>Echinochloa colonum</i> +consorcio 2	6		29,667				
<i>Sorghum halepense</i> sin consorcio 3	6			41,833			
<i>Sorghum halepense</i> +consorcio 3	6				45,000		
<i>Cyperus corymbosus</i> sin consorcio 1	6					47,000	
<i>Cyperus corymbosus</i> +consorcio 1	6						49,833
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 6,000.

Pruebas de normalidad

		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	TRATAMIENTOS	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Altura 10 días	<i>Sorghum halepense</i> sin consorcio 3	,254	6	,200*	,866	6	,212
	<i>Sorghum halepense</i> +consorcio 3	,202	6	,200*	,853	6	,167
	<i>Cyperus corymbosus</i> sin consorcio 1	,310	6	,074	,805	6	,065
	<i>Cyperus corymbosus</i> +consorcio 1	,293	6	,117	,822	6	,091
	<i>Echinochloa colonum</i> sin consorcio 2	,302	6	,094	,775	6	,035
	<i>Echinochloa colonum</i> +consorcio 2	,183	6	,200*	,960	6	,820

*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

Prueba de homogeneidad de varianzas

		Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Altura 10 días	Se basa en la media	1,472	5	30	,228
	Se basa en la mediana	1,302	5	30	,289
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	1,302	5	28,622	,291
	Se basa en la media recortada	1,459	5	30	,232

ANOVA

Altura 10 días

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	3248,667	5	649,733	664,500	,000
Dentro de grupos	29,333	30	,978		
Total	3278,000	35			

Altura 10 días

HSD Tukey^a

		Subconjunto para alfa = 0.05					
TRATAMIENTOS	N	1	2	3	4	5	6
<i>Echinochloa colonum</i> sin consorcio 2	6	36,167					
<i>Echinochloa colonum</i> +consorcio 2	6		41,500				
<i>Sorghum halepense</i> sin consorcio 3	6			52,833			
<i>Sorghum halepense</i> +consorcio 3	6				56,000		
<i>Cyperus corymbosus</i> sin consorcio 1	6					58,167	
<i>Cyperus corymbosus</i> +consorcio 1	6						63,333
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 6,000.

Pruebas de normalidad

		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	TRATAMIENTOS	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Altura 20 días	<i>Sorghum halepense</i> sin consorcio 3	,293	6	,117	,822	6	,091
	<i>Sorghum halepense</i> +consorcio 3	,283	6	,143	,921	6	,514
	<i>Cyperus corymbosus</i> sin consorcio 1	,195	6	,200*	,861	6	,191
	<i>Cyperus corymbosus</i> +consorcio 1	,167	6	,200*	,982	6	,960
	<i>Echinochloa colonum</i> sin consorcio 2	,392	6	,004	,701	6	,006
	<i>Echinochloa colonum</i> +consorcio 2	,183	6	,200*	,960	6	,820

*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

Prueba de homogeneidad de varianzas

		Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Altura 20 días	Se basa en la media	,556	5	30	,733
	Se basa en la mediana	,632	5	30	,677
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	,632	5	22,439	,678
	Se basa en la media recortada	,575	5	30	,719

ANOVA

Altura 20 días

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	3274,556	5	654,911	483,131	,000
Dentro de grupos	40,667	30	1,356		
Total	3315,222	35			

Altura 20 días

HSD Tukey^a

		Subconjunto para alfa = 0.05				
TRATAMIENTOS	N	1	2	3	4	5
<i>Echinochloa colonum</i> sin consorcio 2	6	48,500				
<i>Echinochloa colonum</i> +consorcio 2	6		55,500			
<i>Sorghum halepense</i> sin consorcio 3	6			63,667		
<i>Sorghum halepense</i> +consorcio 3	6				68,167	
<i>Cyperus corymbosus</i> sin consorcio 1	6				68,500	
<i>Cyperus corymbosus</i> +consorcio 1	6					78,000
Sig.		1,000	1,000	1,000	,996	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 6,000.

Pruebas de normalidad

		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	TRATAMIENTOS	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Altura 30 días	<i>Sorghum halepense</i> sin consorcio 3	,293	6	,117	,822	6	,091
	<i>Sorghum halepense</i> +consorcio 3	,223	6	,200 [*]	,908	6	,421
	<i>Cyperus corymbosus</i> sin consorcio 1	,285	6	,138	,831	6	,110
	<i>Cyperus corymbosus</i> +consorcio 1	,122	6	,200 [*]	,982	6	,961
	<i>Echinochloa colonum</i> sin consorcio 2	,183	6	,200 [*]	,960	6	,820
	<i>Echinochloa colonum</i> +consorcio 2	,293	6	,117	,822	6	,091

*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

Prueba de homogeneidad de varianzas

		Estadístico de Levene		Sig.	
		gl1	gl2		
Altura 30 días	Se basa en la media	1,604	5	30	,189
	Se basa en la mediana	1,313	5	30	,285
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	1,313	5	22,535	,294
	Se basa en la media recortada	1,582	5	30	,195

ANOVA

Altura 30 días

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	3020,250	5	604,050	407,225	,000
Dentro de grupos	44,500	30	1,483		
Total	3064,750	35			

Altura 30 días

HSD Tukey^a

		Subconjunto para alfa = 0.05					
TRATAMIENTOS	N	1	2	3	4	5	6
<i>Echinochloa colonum</i> sin consorcio 2	6	62,500					
<i>Echinochloa colonum</i> +consorcio 2	6		69,667				
<i>Sorghum halepense</i> sin consorcio 3	6			75,667			
<i>Sorghum halepense</i> +consorcio 3	6				79,000		
<i>Cyperus corymbosus</i> sin consorcio 1	6					84,167	
<i>Cyperus corymbosus</i> +consorcio 1	6						90,500
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 6,000.

Pruebas de normalidad

		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	TRATAMIENTOS	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Altura 40 días	<i>Sorghum halepense</i> sin consorcio 3	,293	6	,117	,915	6	,473
	<i>Sorghum halepense</i> +consorcio 3	,214	6	,200 [*]	,951	6	,752
	<i>Cyperus corymbosus</i> sin consorcio 1	,183	6	,200 [*]	,960	6	,820
	<i>Cyperus corymbosus</i> +consorcio 1	,401	6	,003	,702	6	,007
	<i>Echinochloa colonum</i> sin consorcio 2	,209	6	,200 [*]	,907	6	,415
	<i>Echinochloa colonum</i> +consorcio 2	,293	6	,117	,822	6	,091

*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

Prueba de homogeneidad de varianzas

		Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Altura 40 días	Se basa en la media	,597	5	30	,703
	Se basa en la mediana	,323	5	30	,895
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	,323	5	18,316	,893
	Se basa en la media recortada	,556	5	30	,733

ANOVA

Altura 40 días

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	3568,917	5	713,783	488,521	,000
Dentro de grupos	43,833	30	1,461		
Total	3612,750	35			

Altura 40 días

HSD Tukey^a

TRATAMIENTOS	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	4	5
<i>Echinochloa colonum</i> sin consorcio 2	6	72,667				
<i>Echinochloa colonum</i> +consorcio 2	6		86,333			
<i>Sorghum halepense</i> sin consorcio 3	6		86,667			
<i>Sorghum halepense</i> +consorcio 3	6			92,500		
<i>Cyperus corymbosus</i> sin consorcio 1	6				98,500	
<i>Cyperus corymbosus</i> +consorcio 1	6					103,833
Sig.		1,000	,997	1,000	1,000	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 6,000.

Pruebas de normalidad

	TRATAMIENTOS	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Altura 50 días	<i>Sorghum halepense</i> sin consorcio 3	,214	6	,200*	,958	6	,804
	<i>Sorghum halepense</i> +consorcio 3	,283	6	,143	,921	6	,514
	<i>Cyperus corymbosus</i> sin consorcio 1	,254	6	,200*	,866	6	,212
	<i>Cyperus corymbosus</i> +consorcio 1	,254	6	,200*	,866	6	,212
	<i>Echinochloa colonum</i> sin consorcio 2	,293	6	,117	,915	6	,473
	<i>Echinochloa colonum</i> +consorcio 2	,254	6	,200*	,866	6	,212

*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

Prueba de homogeneidad de varianzas

		Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Altura 50 días	Se basa en la media	,969	5	30	,452
	Se basa en la mediana	,802	5	30	,557
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	,802	5	24,459	,559
	Se basa en la media recortada	,961	5	30	,457

ANOVA

Altura 50 días

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	3724,806	5	744,961	667,129	,000
Dentro de grupos	33,500	30	1,117		
Total	3758,306	35			

Altura 50 días

HSD Tukey^a

TRATAMIENTOS	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	4	5
<i>Echinochloa colonum</i> sin consorcio 2	6	85,333				
<i>Echinochloa colonum</i> +consorcio 2	6		99,167			
<i>Sorghum halepense</i> sin consorcio 3	6			102,833		
<i>Sorghum halepense</i> +consorcio 3	6			102,833		
<i>Cyperus corymbosus</i> sin consorcio 1	6				113,167	
<i>Cyperus corymbosus</i> +consorcio 1	6					116,833
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 6,000.

Pruebas de normalidad

		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	TRATAMIENTOS	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Altura 60 días	<i>Sorghum halepense</i> sin consorcio 3	,214	6	,200*	,958	6	,804
	<i>Sorghum halepense</i> +consorcio 3	,195	6	,200*	,861	6	,191
	<i>Cyperus corymbosus</i> sin consorcio 1	,302	6	,094	,775	6	,035
	<i>Cyperus corymbosus</i> +consorcio 1	,202	6	,200*	,853	6	,167
	<i>Echinochloa colonum</i> sin consorcio 2	,278	6	,161	,920	6	,505
	<i>Echinochloa colonum</i> +consorcio 2	,202	6	,200*	,853	6	,167

*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

Prueba de homogeneidad de varianzas

		Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Altura 60 días	Se basa en la media	1,219	5	30	,324
	Se basa en la mediana	,648	5	30	,665
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	,648	5	15,909	,667
	Se basa en la media recortada	1,219	5	30	,325

ANOVA

Altura 60 días

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	3988,222	5	797,644	491,699	,000
Dentro de grupos	48,667	30	1,622		
Total	4036,889	35			

Altura 60 días

HSD Tukey^a

		Subconjunto para alfa = 0.05				
TRATAMIENTOS	N	1	2	3	4	5
<i>Echinochloa colonum</i> sin consorcio 2	6	101,500				
<i>Echinochloa colonum</i> +consorcio 2	6		112,167			
<i>Sorghum halepense</i> sin consorcio 3	6		113,167			
<i>Sorghum halepense</i> +consorcio 3	6			117,000		
<i>Cyperus corymbosus</i> sin consorcio 1	6				128,500	
<i>Cyperus corymbosus</i> +consorcio 1	6					133,000
Sig.		1,000	,750	1,000	1,000	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 6,000.

ANEXO K

Concentración final de Cr⁺⁶ después de 60 días de fitorremediación del suelo contaminado



LABORATORIO DE ENSAYO ACREDITADO POR EL
ORGANISMO PERUANO DE ACREDITACIÓN INACAL - DA
CON REGISTRO N° LE 003



INFORME DE ENSAYO N° 1-17657/20

Pág. 1/1

Solicitante : RECOBA COLCHÓN, FELIPE ERNESTO
Domicilio legal : Prol. Miguel Grau S/N - Reque - Chiclayo - Lambayeque
Producto declarado : SUELOS
Cantidad de Muestras para el Ensayo : 1 muestra x 250 g
Muestra proporcionada por el solicitante

Identificación de la muestra : MUESTRA: N° 001
PUNTO DE MUESTREO: UNIVERSIDAD NACIONAL "PEDRO RUIZ GALLO" - LAMBAYEQUE
FECHA Y HORA DE MUESTREO: 2019-08-19 / 11:20

Forma de presentación : En pote de plástico cerrado y refrigerado

Fecha de recepción : 2020 - 08 - 24
Fecha de Inicio de ensayo : 2020 - 09 - 08
Fecha de término del ensayo : 2020 - 09 - 08
Ensayo realizado en : Laboratorio Ambiental
Identificado con : H/S 19834003 (EXMA-17825-2020)
Validez del documento : Este documento es válido solo para las muestras descritas

Ensayo	LD	Unidad	Resultado
Cromo Hexavalente	0,4	mg/kg	125,7

LD: Límite de detección

MÉTODO

Cromo Hexavalente: EPA Method 7196A, Revision 1 1992. (Preparación de muestra EPA: Method 3060A, Alkaline Digestion for Hexavalent Chromium 1996) Chromium, Hexavalent (Colorimetric).

OBSERVACIONES

Prohibida la reproducción total o parcial de este informe, sin la autorización escrita de CERPER S.A.
Los resultados de los ensayos no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de la calidad de la entidad que lo produce.

Callao, 09 de septiembre de 2020
AM

CERTIFICACIONES DEL PERU S.A.

ING. ROSA PALOMINO LOO
C.I.P. 40302
COORDINADOR DE LABORATORIOS

"Los ensayos acreditados del presente informe, al estar en el marco de la acreditación del INACAL-DA, se encuentran dentro del ámbito de reconocimiento mutuo de los miembros firmantes de IAAC e ILAC"

AREQUIPA
Calle Teniente Rodríguez N° 1415
Miraflores - Arequipa
T. (054) 265572

CALLAO
Oficina Principal
Av. Santa Rosa 601, La Perla - Callao
T. (511) 319 9000
info@cerper.com - www.cerper.com

PIURA
Urb. Angamos A - 2 - Piura
I. (073) 322 908 / 9975 63161

"EL USO INDEBIDO DE ESTE INFORME DE ENSAYO CONSTITUYE DELITO SANCIONADO CONFORME A LA LEY, POR LA AUTORIDAD COMPETENTE"