



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



**“Eficiencia de la remoción de Cr^{6+} por microorganismos
aislados de raíces de plantas tolerantes al ion metálico en
humedales de flujo subsuperficial”**

TESIS

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

PRESENTADO POR:

**Br. Luis Miguel Chapoñan Moreno
Br. Yessica Yesenia Medina Cueva**

**LAMBAYEQUE – PERÚ
2016**

**“Eficiencia de la remoción de Cr⁶⁺ por microorganismos
aislados de raíces de plantas tolerantes al ion metálico en
humedales de flujo subsuperficial”**

TESIS

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

PRESENTADO POR:

**Br. Luis Miguel Chapoñan Moreno
Br. Yessica Yesenia Medina Cueva**

APROBADO POR:

**Msc. Clara Cueva Castillo
PRESIDENTE**

**Dr. Cesar Estela Campos
SECRETARIO**

**Lic. Julio Silva Estela
VOCAL**

**Dra. Carmen Carreño Farfán
PATROCINADORA**

DEDICATORIA

Dedicado en primer lugar a Dios, a mis padres Lucila y Gilberto, a mis hermanos: Jhonny, Betty, Liliana, Orlando y Jenny, por su cariño confianza, y respaldo a cada uno de mis sueños, gracias por estar conmigo siempre.

A mis sobrinitos, a mi familia entera, a mis amigos, aquellos que formaron parte importante en este trayecto, gracias por su amistad, comprensión y ayuda.

Este trabajo está dedicado a todos aquellos que hacen ciencia, y a los que luchan por concientizar al mundo entero que la contaminación es un problema grave, que hay que afrontar desde la raíz.

A los que se esfuerzan por salir adelante día a día: enciende tus sueños, ve por ellos, lucha constantemente, sé agradecido, no te alejes de Dios, nunca dejes de sonreír, lleva un poco de cordura dentro de tu locura, quiere mucho, aún por encima de tus posibilidades, sé feliz; solo así podrás lograr muchas cosas.

Luis Miguel Chapoñan Moreno

DEDICATORIA

El presente trabajo de investigación se lo dedico a:

Dios, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad y brindarme una vida llena de aprendizajes, experiencias y sobre todo felicidad.

A mis padres:

VILMA SUSANA CUEVA QUIROZ y HERMAN ALCIDES MEDINA TERRONES, pilares fundamentales en mi vida, por su apoyo incondicional brindado a lo largo de mi carrera, les agradezco por sus consejos y valores que me han inculcado día a día, por ser un excelente ejemplo de vida a seguir y por la confianza puesta en mí que me permitieron culminar esta etapa de mi vida.

A mis hermanos:

JIMMY y JOSÉ, por brindarme su apoyo para lograr uno de mis más grandes propósitos en mi vida profesional, por preocuparse siempre por mí y ser mi inspiración para ser mejor cada día.

Yessica Yesenia Medina Cueva

AGRADECIMIENTO

A Dios porque su presencia se hizo notoria en cada momento, por bendecirme y guiarme en cada paso que doy. Todo te lo debo a ti.

A mis padres Lucila y Gilberto, por su apoyo y amor incondicional; sus enseñanzas y valores han calado dentro de mí, y me han permitido avanzar en este camino, gracias por ser el motor de mi vida.

Gracias Dra. Carmen Carreño, gracias prima Yessica, por formar un gran equipo, por todo lo vivido; todo mi cariño, admiración y respeto para ustedes, esta investigación es el resultado del esfuerzo conjunto, de un gran equipo, por lo tanto este logro es compartido. Gracias por hacer de este proyecto, un gran trabajo.

Luis Miguel Chapoñan Moreno

AGRADECIMIENTO

De manera muy especial expreso mi mayor agradecimiento:

A la Dra. CARMEN CARREÑO FARFÁN nuestra asesora, por el apoyo y confianza brindada para la realización del presente trabajo de investigación.

A mi amigo y compañero de tesis LUIS MIGUEL por haber logrado nuestro gran objetivo con mucha perseverancia.

A los profesores de la Facultad de Ciencias Biológicas, por la orientación y formación profesional.

A mis amigos y compañeros, por su comprensión, apoyo y amistad que me proporcionaron para obtener mi meta.

A todas las personas que me ayudaron de manera directa e indirecta en la realización del presente trabajo.

Yessica Yesenia Medina Cueva

Índice

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO TEÓRICO.....	4
2.1 Antecedentes de la investigación.....	4
2.2 Base teórica.....	6
2.2.1 Interacciones microbianas con metales pesados.....	10
2.2.1.1 Biotransformación.....	13
2.2.1.2 Biosorción.....	14
2.2.1.3 Bioacumulación, biomineralización y quimiosorción.....	16
2.2.2 Fitorremediación.....	18
2.2.3 Humedales en el tratamiento de aguas residuales.....	20
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
3.1 Material.....	24
3.1.1 Material biológico.....	24
3.1.2 Población y muestra de estudio.....	24
3.2 Métodos.....	24
3.2.1 Variables en estudio.....	24
3.2.2 Tipo de estudio y diseño de contrastación de hipótesis.....	24
3.2.3 Primera fase.....	25
3.2.4 Segunda fase.....	39
3.2.5 Análisis estadístico de los datos.....	42
IV. RESULTADOS.....	43
4.1 Plantas tolerantes al Cr^{6+} desarrolladas en humedales de flujo subsuperficial.....	43
4.2 Microorganismos aislados de raíces de plantas tolerantes al Cr^{6+}	43
4.3 Microorganismos adaptados a 200 ppm Cr^{6+}	43
4.4 Microorganismos tolerantes a 200 ppm Cr^{6+} identificados y seleccionados.....	53
4.5 Eficiencia de la remoción de Cr^{6+} por hongos seleccionados.....	53
V. DISCUSIÓN.....	67
VI. CONCLUSIONES.....	73
VII. RECOMENDACIONES.....	74
VIII. RESUMEN.....	75
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76
IX. ANEXOS.....	82

Índice de tablas

Tabla 1.	Biomasa (mgL^{-1}) de hongos filamentosos cultivados en caldo sales minerales-200 ppm Cr^{6+} durante 5 días.....	52
Tabla 2.	Frecuencia de géneros identificados en hongos filamentosos tolerantes a 200 ppm Cr^{6+}	57
Tabla 3.	Valores de absorbancia (540 nm) de diferentes concentraciones de Cr^{6+}	58
Tabla 4.	Promedios de absorbancia (540 nm) de caldo sales minerales - Cr^{6+} con biomasa viva de hongos filamentosos tolerantes al ion metálico.....	59
Tabla 5.	Promedios de la concentración (ppm) de Cr^{6+} en caldo sales minerales con biomasa viva de hongos filamentosos tolerantes al ion metálico.....	59
Tabla 6.	Promedios de absorbancia (540 nm) de caldo sales minerales - Cr^{6+} con biomasa muerta de hongos filamentosos tolerantes al ion metálico.....	59
Tabla 7.	Promedios de la concentración (ppm) de Cr^{6+} en caldo sales minerales con biomasa muerta de hongos filamentosos tolerantes al ion metálico.....	60
Tabla 8.	Promedios de eficiencia (%) de la remoción de Cr^{6+} por biomasa viva de hongos filamentosos tolerantes al ion metálico.....	60
Tabla 9.	Promedios de eficiencia (%) de la remoción de Cr^{6+} por biomasa muerta de hongos filamentosos tolerantes al ion metálico.....	60
Tabla 10.	Análisis de varianza de los promedios de eficiencia (%) en la remoción de Cr^{6+} por la biomasa viva y muerte de tres géneros de hongos.....	64
Tabla 11.	Prueba de T de student para los promedios de la eficiencia (%) de remoción de Cr^{6+} por biomasa viva y muerte de hongos filamentosos.....	64

Tabla 12.	Prueba múltiple de Tukey ($\alpha=0,05$) para los promedios de la eficiencia (%) de remoción de Cr^{6+} por tres géneros de hongos filamentosos.....	65
Tabla 13.	Prueba múltiple de Tukey ($\alpha = 0,05$) para los promedios de la eficiencia (%) de remoción de Cr^{6+} por hongos filamentosos en diferentes tiempos.....	65
Tabla 14.	Prueba múltiple de Tukey ($\alpha = 0,05$) para los promedios de la eficiencia (%) de remoción de Cr^{6+} por biomasa viva y muerta de tres géneros de hongos filamentosos en diferentes tiempos....	66

Índice de figuras

Figura 1.	Especies de Cr^{6+} dependiendo del pH.....	9
Figura 2.	Mecanismos de interacción entre los metales pesados y microorganismos.....	13
Figura 3.	Procesos de fitorremediación principalmente utilizados en los medios terrestre y acuoso.....	19
Figura 4.	Extracción de plantas de <i>Canna indica</i>	26
Figura 5.	Plantas de <i>Ruellia brittoniana</i>	26
Figura 6.	Diseño de humedal de flujo subsuperficial.....	27
Figura 7.	Vista lateral del recipiente de polipropileno acondicionado para humedal de flujo subsuperficial.....	28
Figura 8.	Recipiente de polipropileno con una capa de grava y tubo de PVC perforado.....	28
Figura 9.	Recipiente de polipropileno con una capa de arenón chino.....	29
Figura 10.	Recipiente de polipropileno con una capa de cáscara de <i>Oryza sativa</i> L.....	29
Figura 11.	Vista lateral de humedal de flujo subsuperficial.....	30
Figura 12.	Riego de plantas con solución de dicromato de potasio.....	32
Figura 13.	Diseño de biorreactor tipo tanque con sistema discontinuo y flujo de aire descendente.....	33
Figura 14.	Modo de operación de biorreactor tanque con sistema discontinuo y flujo de aire descendente.....	34
Figura 15.	Pesaje de muestras de raíces.....	35
Figura 16.	Suspensión de raíces en solución salina esterilizada.....	35
Figura 17.	Biorreactores tipo tanque con aireación en caldo sales minerales.....	37

Figura 18.	Raspado del material adherido a la lámina portaobjetos....	37
Figura 19.	Flujograma para la cuantificación de la biomasa microbiana.....	38
Figura 20.	Muestras de caldo sales minerales con biomasa muerta y viva de hongos filamentosos.....	40
Figura 21.	Filtrado de caldo sales minerales para la cuantificación de Cr ⁶⁺	40
Figura 22.	Coloración rojo-violeta observada en la cuantificación de Cr ⁶⁺	41
Figura 23.	Plantas de <i>Canna indica</i> tolerantes al Cr ⁶⁺ , desarrolladas en humedales de flujo subsuperficial.....	44
Figura 24.	Plantas de <i>Cynodon dactylon</i> L. tolerantes al Cr ⁶⁺ , desarrolladas en humedales de flujo subsuperficial.....	44
Figura 25.	Plantas de <i>Ruellia brittoniana</i> tolerantes al Cr ⁶⁺ , desarrolladas en humedales de flujo subsuperficial.....	45
Figura 26.	Cultivos puros de microorganismos aislados de raíces de plantas tolerantes al Cr ⁶⁺	45
Figura 27.	Colonias de hongos filamentosos y levaduriformes desarrollados en agar sales minerales Cr ⁶⁺	46
Figura 28.	Frecuencia de hongos filamentosos y levaduriformes aislados de raíces de plantas tolerantes al Cr ⁶⁺	46
Figura 29.	Frecuencia de hongos aislados en raíces de plantas tolerantes al Cr ⁶⁺	47
Figura 30.	Película superficial de microorganismos desarrollados en caldo sales minerales-50ppm Cr ⁶⁺	47
Figura 31.	Sedimento de microorganismos desarrollados en caldo sales minerales-50ppm Cr ⁶⁺	48

Figura 32.	Turbidez de microorganismos desarrollados en caldo sales minerales-50ppm Cr ⁶⁺	48
Figura 33.	Aclaramiento del color inicial del caldo sales minerales-50 ppm Cr ⁶⁺ cultivado con microorganismos.....	49
Figura 34.	Frecuencia de aislados de microorganismos con desarrollo en concentraciones crecientes de Cr ⁶⁺	49
Figura 35.	Hongos filamentosos desarrollados en caldo sales minerales-100 ppm Cr ⁶⁺	50
Figura 36.	Hongos filamentosos desarrollados en caldo sales minerales-150 ppm Cr ⁶⁺	50
Figura 37.	Hongos filamentosos desarrollados en caldo sales minerales-200 ppm Cr ⁶⁺	51
Figura 38.	Biomasa de hongos filamentosos desarrollados en caldo sales minerales-200 ppm Cr ⁶⁺	51
Figura 39.	<i>Aspergillus</i> sp. desarrollado en agar sales minerales-Cr ⁶⁺ ...	54
Figura 40.	<i>Fusarium</i> sp. desarrollado en agar sales minerales-Cr ⁶⁺	54
Figura 41.	<i>Trichoderma</i> sp. desarrollado en agar sales minerales-Cr ⁶⁺	55
Figura 42.	<i>Penicillium</i> sp. desarrollado en agar sales minerales-Cr ⁶⁺ ...	55
Figura 43.	<i>Scopulariopsis</i> sp. desarrollado en agar sales minerales-Cr ⁶⁺	56
Figura 44.	<i>Paecilomyces</i> sp. desarrollado en agar sales minerales-Cr ⁶⁺	56
Figura 45.	<i>Scedosporium</i> sp. desarrollado en agar sales minerales-Cr ⁶⁺	57
Figura 46.	Curva patrón para determinar la concentración de Cr ⁶⁺ (mgL ⁻¹) en caldo sales minerales cultivado con hongos filamentosos.....	58

Figura 47.	Eficiencia de la remoción de Cr^{6+} por biomasa viva y muerta de <i>Paecilomyces</i> sp.36A-D en caldo sales minerales durante 120 horas.....	62
Figura 48.	Eficiencia de la remoción de Cr^{6+} por biomasa viva y muerta de <i>Penicillium</i> sp.15A-E en caldo sales minerales durante 120 horas.....	62
Figura 49.	Eficiencia de la remoción de Cr^{6+} por biomasa viva y muerta de <i>Fusarium</i> sp.51P-D en caldo sales minerales durante 120 horas.....	63

I. INTRODUCCIÓN

Las aguas residuales constituyen un problema, cuya magnitud se incrementa día a día. Las opciones más viables para su reutilización, en parte, son las plantas de tratamiento; no obstante, contaminantes como los metales pesados, no son biodegradables y aunque se encuentren en bajas concentraciones, la recalcitrancia y persistencia en los cuerpos de agua, implica que a través de la biomagnificación, su concentración se incrementa hasta ocasionar toxicidad (Burgos & Diez, 2015). El cromo, Cr, es un metal pesado, que reacciona químicamente con valencias II (Cr^{2+}), III (Cr^{3+}) y VI (Cr^{6+}), siendo el Cr hexavalente, Cr^{6+} , de mayor toxicidad y el más difícil de eliminar en los seres vivos (Panigatti *et al.*, 2012). Es un poderoso oxidante de sustancias orgánicas, cancerígeno, desnaturaliza proteínas, precipita ácidos nucleicos, es móvil y tiene largo periodo de resistencia en el agua (Otiniano *et al.*, 2007; Panigatti *et al.*, 2012).

El Cr es utilizado en diversas aplicaciones industriales como la galvanoplastia, curtido de pieles, producción de acero, industria textil, conservación de madera, aluminio amonizado y refrigeración por agua. Las operaciones y procesos de la industria química, especialmente la curtiembre generan efluentes con $0,052 - 3,55 \text{ mgL}^{-1}$ de Cr^{6+} (Mozo, 2012), que son vertidos, inclusive sin tratamiento previo, al sistema de alcantarillado, ignorándose el límite máximo permisible (LMP) de $0,1 \text{ mgL}^{-1}$ de Cr^{6+} reglamentado por el DSN° 010-2010- MINAM para efluentes (Otiniano *et al.*, 2007; Burgos & Diez, 2015).

El Cr puede ser removido de las aguas residuales por reducción seguida de precipitación, intercambio iónico, osmosis inversa y adsorción; sin embargo, en su mayoría las tecnologías son ineficientes para concentraciones mínimas de Cr, son costosas, requieren de energía eléctrica, gran cantidad de reactivos y generan lodos tóxicos (Gutiérrez *et al.*, 2010; Panigatti *et al.*, 2012). La alternativa biológica para la remoción de Cr es la utilización de plantas o la fitorremediación,

en la que a través de diversas tecnologías como es el caso de los humedales artificiales de flujo subsuperficial: HAFSS, plantas y microorganismos participan activamente en la transformación y biosorción de metales pesados, disminuyendo su toxicidad en los efluentes contaminados (Peña *et al.*, 2013; Burgos & Diez, 2015). Las plantas son eficientes en el tratamiento de ambientes contaminados con Cr; no obstante, tienen la desventaja que necesitan mantenimiento a largo plazo, su crecimiento es lento y la biomasa no se puede utilizar como alimento para animales (Peña *et al.*, 2013).

En las raíces y rizósfera de las plantas remediadoras de Cr existen microorganismos que concentran en su estructura el ion metálico o lo reducen a un estado menos tóxico (Cr^{6+} a Cr^{3+}). Especies de enterobacterias, *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Vibrio* así como los hongos *Candida*, *Saccharomyces*, *Paecilomyces*, *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Trichoderma* y *Penicillium* entre otros, han sido reportados como eficientes en la remoción de Cr^{6+} a través de diferentes mecanismos (Vullo, 2003; Guevara, 2010; Gutiérrez *et al.*, 2010); no obstante, en la región Lambayeque no se dispone de microorganismos ni se ha investigado la eficiencia de éstos en la remoción de Cr^{6+} de aguas residuales, con las perspectiva de incrementarlos y utilizarlos para la descontaminación.

Científicamente los microorganismos acumulan Cr^{6+} (biosorción) o a través de reacciones enzimáticas o indirectamente con el metabolito producido disminuyen la toxicidad del Cr^{6+} a Cr^{3+} (biotransformación) y ayudan a precipitarlo a un pH cercano a la neutralidad, principalmente como $\text{Cr}(\text{OH})_3$, lo que favorece una mayor eliminación física y constituye una alternativa para la detoxificación de aguas residuales (Panigatti *et al.*, 2012). La región Lambayeque tiene una diversidad de microorganismos, que no ha sido investigada, para la remoción de metales pesados como el Cr^{6+} . Los microorganismos pueden formar parte de un paquete tecnológico propio, para la biorremediación de ambientes contaminados, desarrollándose las capacidades de la población peruana y disminuyendo la dependencia técnica-económica del país.

El problema planteado fue ¿Cuál es la eficiencia de la remoción de Cr^{6+} contenido en caldo sales minerales por microorganismos aislados de raíces de plantas tolerantes al ion metálico en humedales de flujo subsuperficial?. El objetivo general fue: Determinar la eficiencia de la remoción de Cr^{6+} contenido en caldo sales minerales por microorganismos aislados de raíces de plantas

tolerantes al ion metálico en humedales de flujo subsuperficial. Los objetivos específicos fueron seleccionar plantas tolerantes al Cr^{6+} en humedales de flujo subsuperficial, HAFSS, aislar microorganismos de raíces de plantas tolerantes al Cr^{6+} , adaptar los microorganismos a 200 ppm Cr^{6+} , identificar los microorganismos adaptados a 200 ppm Cr^{6+} , seleccionar los tres microorganismos con la mayor biomasa en el menor tiempo posible y determinar la eficiencia de la remoción de Cr^{6+} por biomasa viva y muerta de los microorganismos seleccionados. La hipótesis planteada fue: Los microorganismos aislados de raíces de plantas tolerantes al ion metálico en HAFSS remueven el Cr^{6+} del caldo sales minerales, con una eficiencia mayor de 60%.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes de la investigación

Se investigaron los efectos de las condiciones de operación sobre la biosorción de Pb^{+2} , Cd^{+2} y Cr^{+3} por biomasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Parte de la biomasa se separó, se lavó tres veces con agua desionizada y posteriormente se filtró y secó a 106 °C por 24 horas. Después, se obtuvieron dos suspensiones con 2 y 5 g L^{-1} de biomasa sin lavar y lavada. Las soluciones de metales se prepararon disolviendo las sales $\text{CrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ y $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ cada una por separado en soluciones stock y se combinaron posteriormente para obtener 50 y 80 ppm de cada metal. El pH fue ajustado a 3 y 5. Las pruebas de biosorción se realizaron, a 30°C, en agitación constante por 24 horas y después se determinaron las concentraciones por espectroscopía de absorción atómica. A pH 5,0 los porcentajes de extracción de Cr^{2+} y Pb^{2+} fueron de 47 y 56 %, respectivamente. A pH 3,0 la retención fue menor para todos los metales. A su vez, la afinidad del Cd^{2+} hacia la levadura fue mínima, concluyéndose que la presencia de co-iones electrolíticos interfiere en su adsorción (Rodríguez *et al.*, 2008).

Se investigó la remoción de cromo total y Cr^{6+} en agua sintética por dos inóculos bacterianos aislados de suelo contaminado con agua residual textil y del ambiente. En los ensayos se utilizó cromato de potasio con células vivas y muertas de los inóculos MI5 y M3. Con células vivas la concentración inicial fue de 10, 50 y 100 mg L^{-1} de Cr VI a pH 6, alcanzándose 98% de remoción para 10 mg L^{-1} con ambos inóculos. Las células muertas previamente autoclavadas a 121°C por 15 minutos se enfrentaron a 2, 10, 20, 35 y 50 mg L^{-1} , pH 2, 150 rpm, 35°C por 2 horas, obteniéndose 40 – 70 % de remoción con MI5 y 20 – 40 % con M3. Se concluyó que el inóculo bacteriano MI5 es promisorio para la remoción de Cr^{6+} de efluentes contaminados (Guevara, 2010).

Los metales pesados contaminan los mantos acuíferos y el suelo, requiriéndose de bacterias con capacidad para tolerarlos y acumularlos, como

una alternativa para la biorremediación. En el presente estudio se aislaron bacterias de suelos contaminados con hidrocarburos, identificándose *Pseudomonas putida*, *P. mendocina*, *Burkholderia cepacia* y *Chromobacterium violaceum*. Para el proceso de biosorción se prepararon soluciones con 50 y 100 ppm de Cr, Pb y As y se agregaron 2 mL del inóculo bacteriano previamente estandarizado a 10^6 cel/mL⁻¹. Después de 7 días, a 25°C, las soluciones se centrifugaron a 1500 rpm durante 30 minutos y el sedimento celular se sometió a una digestión ácida total y parcial, para determinar la concentración de los metales pesados de absorción atómica. La mayor adsorción de As se alcanzó con *P. mendocina*, de Cr con *B. cepacia* y *C. violaceum* y de Pb con *P. putida* y *P. mendocina*. El metal con mayor acumulación (50 – 80 ppm) fue el plomo (Mendoza *et al.*, 2010).

La presencia de metales pesados en los lodos ribereños procedentes de residuos industriales, afecta la calidad de los suelos, habiéndose encontrado mínimas concentraciones de Cr²⁺, Pb²⁺ y Hg²⁺ en vegetales de consumo humano. Con el objetivo de aislar bacterias se colectaron muestras de suelo y lodos y se mezclaron con el agente disgregante pirofosfato de sodio Na₄P₂O₇·10H₂O al 0,1% en una relación 2.5 volumen/peso. Los recipientes se agitaron y luego se cuantificaron los metales y se aislaron las bacterias presentes. Después, éstas se sembraron en matraces con medio de cultivo suplementado con Cr⁺², Pb⁺² y Hg⁺², para seleccionar las tolerantes y transformadoras. En las muestras se encontró más de 0,005 mg de Cr⁶⁺L⁻¹, 0,049 mg de PbL⁻¹ y 0,001 mg de HgL⁻¹, identificándose *Corynebacterium genitalium*, *C. diphteriae*, *Bacillus megaterium*, *Micrococcus sedentarius*, *Aeromonas hydrophila*, *Pantoea agglomerans* y *Pseudomonas* spp. (Soto *et al.*, 2010).

La capacidad de algunos organismos para tolerar y reducir Cr⁶⁺ los hace atractivos en la biotecnología ambiental. Se investigó *Paecilomyces* spp. resistente a Cr⁶⁺ aislado del aire contaminado. El hongo se incubó en medio mínimo Lee modificado con glucosa y otras fuentes de carbono comerciales y de bajo costo como azúcar moscabada y piloncillo o glicerol, en presencia de 50 mgL⁻¹ de Cr⁶⁺. La velocidad y porcentaje de remoción del metal se incrementaron a medida que disminuyó el pH de 7,0 a 4,0 alcanzándose el máximo valor de 96% a pH 4,0, 28°C, 100 rpm, durante 7 días. También se

investigó el efecto de la concentración de la biomasa celular en la remoción de Cr^{6+} en solución determinándose 99,17; 97,95 y 97,25% con 38, 76 y 114 mg de peso seco. Los resultados indicaron que *Paecilomyces* spp. puede utilizarse para descontaminar efluentes con Cr^{6+} (Cárdenas *et al.*, 2011).

Las plantas metalmecánicas producen aguas residuales contaminadas con Cr^{6+} . Con el objetivo de detoxificarlas se investigó en condiciones de laboratorio la bacteria *Escherichia coli* capaz de crecer con 50 mgL^{-1} Cr^{6+} y reducirlo a mayor velocidad con soporte y oxígeno. El nutriente fue caldo nutritivo, el soporte 5% de arena y una concentración inicial de *E. coli* de 10^8 UFC mL^{-1} . Después de 24 horas, el caldo se suplementó con 20, 50, 100 y 200 mgL^{-1} de Cr^{6+} , obteniéndose 98% de remoción de Cr^{6+} con 20 mgL^{-1} después de 48 horas y 100% a los 72 horas con 50, 100 y 200 mgL^{-1} de Cr^{6+} . Se alcanzó 92,6; 49,8 y 30,0 % de remoción a los 5 días. Al finalizar la experiencia no se detectó Cr^{6+} al analizar la biomasa soportada en la arena, lo que descartó la disminución del contaminante por bioadsorción y evidenció la biotransformación (Panigatti *et al.*, 2012).

La tecnología de adsorción por biomasa bacteriana remueve los metales pesados de aguas residuales. Con este objetivo se aislaron cuatro cultivos de bacterias resistentes a metales pesados en efluentes de una planta galvánica. Las bacterias se cultivaron por triplicado en erlenmeyers de 50 mL de capacidad con 0,70; 0,92; 1,05 y 1,09 mg dm^{-3} de Cr^{6+} , alcanzándose 6,0 – 39,6% de remoción a pH 2,9. El tiempo óptimo de adsorción de Cr^{6+} con la bacteria A2-1 fue 68% a los 5 minutos y 90,1% a los 60 minutos, a un pH de 6 unidades y una masa de adsorbente de 0,6 g dm^{-3} ; sin embargo, en una matriz real con 1,16 mg dm^{-3} , la concentración disminuyó a 0,23 mg dm^{-3} , correspondiente a 80,1% de remoción. Con el modelo de adsorción de Langmir se determinó una Q_m o capacidad máxima de adsorción del metal de 0,0155 mg g^{-1} a un pH de 6, con un coeficiente de correlación de 0,98 (Cascaret *et al.*, 2014).

2.2 Base teórica

Los metales pesados constituyen un grupo de 65 elementos con una densidad mayor de 5 gcm^{-3} (Marrero *et al.*, 2012), o un número atómico superior a 20 (excluyendo los metales alcalinos y alcalinos térreos), en mínima concentración pueden dañar a los seres vivos, no son biodegradables, tienden a

acumularse en la cadena alimentaria (Celis *et al.*, 2005) y su presencia en la corteza terrestre es inferior a 0,1%, casi siempre menos de 0,01% (Babel y Dacera, 2006). En los metales pesados se considera el manganeso (Mn) y el hierro (Fe); no obstante, los de interés ambiental son el cromo (Cr), níquel (Ni), cobre (Cu), Zinc (Zn), arsénico (As), selenio (Se), estroncio (Sb), molibdeno (Mo), tecnecio (Tc), cadmio (Cd), mercurio (Hg) y el plomo: Pb (Coyne, 2000).

En los metales pesados se distinguen dos grupos: Oligoelementos o micronutrientes requeridos en pequeñas cantidades por plantas y animales y necesarios para que los organismos completen su ciclo vital. Pasada cierta concentración se vuelven tóxicos, considerándose en este grupo el Co, Cr, Cu, Mo, Mn, Ni y Zn. También se incluyen el As, B y Se, que aunque son metales ligeros o no metales presentan origen y comportamiento similar a los oligoelementos. Un segundo grupo está constituido por los metales pesados Cd, Hg, Pb, Sb y Bi sin función biológica conocida, tóxicos y con la propiedad de biomagnificación (Yagnentkovsky, 2011).

La contaminación del ambiente con metales tóxicos surge como resultado de actividades humanas, principalmente industriales; sin embargo, también contribuyen la agricultura y la eliminación de residuos. Estos contaminantes son descargados en la atmósfera y en los ambientes acuáticos y terrestres, principalmente como solutos o partículas y pueden alcanzar concentraciones elevadas, especialmente cerca del sitio de descarga. Entre los mecanismos moleculares que determinan la toxicidad de los metales pesados se encuentran: a) El desplazamiento de los iones metálicos esenciales de biomoléculas y bloqueo de sus grupos funcionales, b) Modificación de la conformación activa de biomoléculas, especialmente enzimas y polinucleótidos, c) Ruptura de la integridad de biomoléculas y d) Modificación de otros agentes biológicamente activos (Cañizares, 2000).

Los metales pesados después de ser incorporados al suelo pueden seguir cuatro vías. i) Retención, ya sea disueltos en la solución del suelo o bien fijados por el proceso de adsorción, complejación y precipitación; ii) Absorción por las plantas e incorporación en las cadenas tróficas; iii) Volatilización hacia la atmósfera e iv) Inmovilización hacia las aguas superficiales o subterráneas. Los metales pesados no pueden ser degradados, por lo que se busca disminuir su toxicidad a través de distintas transformaciones. El cambio en el estado de

oxidación permite que metales como el uranio (VI), selenio (VI), cromo (VI), molibdeno (VI) y arsénico (V), con alto estado de oxidación, solubles, móviles, reactivos y tóxicos pasen a menor estado, volviéndose insolubles, menos disponibles y menos tóxicos. El cambio de compuesto orgánico a inorgánico o viceversa disminuye la toxicidad, como en el caso del mercurio que es más tóxico en forma de metil mercurio, que cuando se encuentra en un compuesto inorgánico. Asimismo, los metales pesados pueden ser movilizados e inmovilizados para extraerlos desde matrices sólidas o de soluciones respectivamente (Yagnentkovsky, 2011).

El Cr es un elemento químico de número atómico 24, que pertenece al grupo VI B de la tabla periódica, situado entre los grupo II A y III A, dentro de los metales de transición. Sus estados de oxidación varían desde II hasta VI, pero solo el III y el VI alcanzan estabilidad. Las propiedades físicas son: peso atómico 51,996 g mol⁻¹; densidad 7,19 g cm⁻³; punto de fusión 1,875 °C y punto de ebullición 2665 °C, color blanco en las superficies de exfoliación reciente y en estado amorfo es un polvo gris claro resplandeciente y soluble en ácido sulfúrico. En la naturaleza, la concentración promedio de Cr es muy variable. En el océano es de 0,05 ug L⁻¹ y en las aguas continentales de 500 ug L⁻¹ hasta 7,5 mg L⁻¹ a un pH de 12,5. Se encuentra como cromita (FeO Cr₂O₃) o piedra de cromo férrico. La especiación, el grado de adsorción y disolución están fuertemente influenciados por la solución, el potencial redox y el pH. El Cr⁶⁺ predomina bajo condiciones oxidantes y el Cr³⁺ bajo condiciones reductoras. La reducción del Cr⁶⁺ a Cr³⁺ por la materia orgánica es lenta. La precipitación de los hidróxidos de Cr³⁺ y la presencia de minerales insolubles con hierro o sulfatos limitan su concentración en aguas no contaminadas (Adeniji, 2004; Téllez *et al.*, 2004).

El Cr³⁺ se encuentra en forma de óxidos, hidróxidos o sulfatos poco solubles y por lo tanto poco móviles, unidos a la materia orgánica en el suelo y en ambientes acuáticos. Es 100 veces menos tóxico y 1000 veces menos mutagénico que el Cr⁶⁺ y se puede separar precipitándolo como hidróxido, debido a que este metal presenta menor solubilidad teórica (0,08 mg L⁻¹) a un pH de 7,5. La precipitación de Cr³⁺ se considera un mecanismo de detoxificación (Guevara, 2010; Gutiérrez *et al.*, 2010; Cárdenas *et al.*, 2011; Panigatti *et al.*, 2012).

El Cr⁶⁺ o hexavalente se encuentra comúnmente asociado al oxígeno en forma de cromatos (CrO₄²⁻) y dicromatos (Cr₂O₇²⁻). Se comercializa como ácido

crómico (H_2CrO_4) y sus sales ion hidrógeno cromato (HCrO_4^-) y ion cromato (CrO_4^{2-}), dependiendo del pH (Figura 1). A pH menor de 1 predomina el ácido crómico (H_2CrO_4), pH 1- 6 el ion hidrógeno cromato (HCrO_4^-) y a pH > 6 el ion cromato (CrO_4^{2-}). El ion dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$) es un dímero del ion hidrógeno cromato, que se forma cuando la concentración de cromo excede 1 gL^{-1} , según explican Hossain *et al.* (2005), mencionados por Guevara (2010):

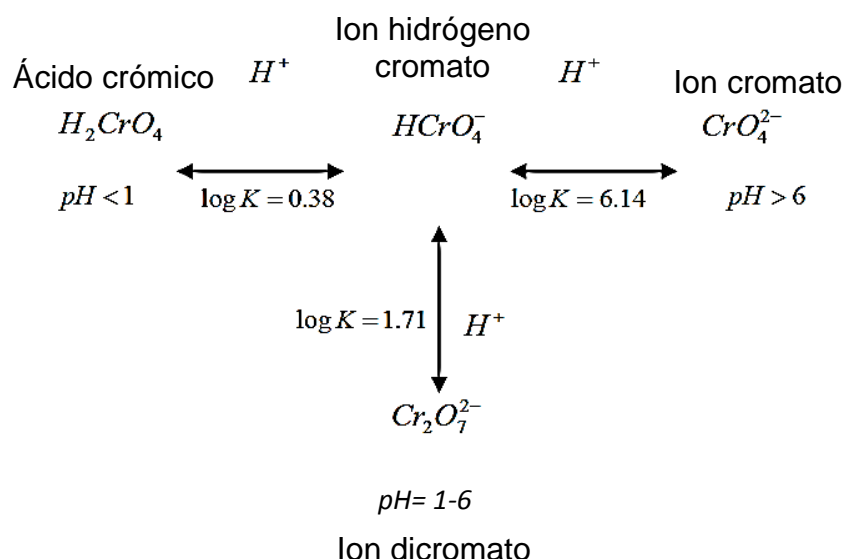


Figura 1. Especies de Cr^{6+} dependiendo del pH (Guevara, 2010).

El Cr^{6+} en presencia de materia orgánica es reducido a Cr^{3+} , transformación que es más rápida en ambientes ácidos; sin embargo, niveles elevados de Cr^{6+} sobrepasan la capacidad reductora del ambiente y persiste como un contaminante. El Cr^{3+} y Cr^{6+} son desnaturalizadores de proteínas, precipitan ácidos nucleicos y tienen acción cancerígena en los pulmones y aparato digestivo. El Cr^{6+} es móvil, con elevado periodo de residencia en las aguas superficiales y subterráneas. Es un poderoso oxidante de sustancias orgánicas. El ácido crómico y los cromatos producen intoxicación aguda por vía digestiva. El envenenamiento agudo por ingesta produce, vértigo, sed intensa, dolor abdominal, vómito, oliguria o anuria. La muerte se produce por uremia. La inhalación de vapores de Cr por largos periodos causa ulceración indolora, hemorragia y perforación del tabique nasal, con secreción nasal fétida. En las muertes por envenenamiento agudo se diagnostica nefritis hemorrágica (Otiniano *et al.*, 2007).

El Cr^{6+} atraviesa fácilmente las membranas biológicas y puede ser llevado activamente al interior de las células mediante el transportador de sulfato, constituyendo un inhibidor competitivo de este ion esencial, por su analogía química. Es mutagénico y carcinogénico en el hombre y mutagénico en bacterias. Produce estrés oxidativo: en el interior de las células se generan intermediarios reducidos de Cr, que en presencia de H_2O_2 funcionan como catalizadores de una reacción tipo Fenton formando Especies Reactivas de Oxígeno (ERO), con peroxidación de lípidos, oxidación de proteínas y daño a los ácidos nucleicos. Por el contrario, el Cr^{3+} es insoluble y con incapacidad para atravesar las membranas biológicas. Constituye un oligoelemento indispensable en procesos biológicos de células superiores, específicamente en el metabolismo de la glucosa, colesterol y ácidos grasos; no obstante, en niveles elevados es tóxico y mutagénico (Guevara, 2010; Gutiérrez *et al.*, 2010).

El Cr se utiliza en el curtido de pieles (dicromato sódico), como mordiente en el teñido de lana (dicromato sódico, trifluoruro de cromo, cloruro crómico), en la galvanoplastia o cromado electrolítico (ácido crómico), colorante de gemas sintéticas (sulfato crómico), colorante de vidrios (ion cromato), así como también en la conservación de madera, cerámica, pirotecnia y plaguicidas. Los efluentes que causan mayor preocupación son los de galvanoplastia con Cr^{6+} y los del curtido de cueros, industria textil, manufactura de colorantes y pigmentos con Cr^{3+} y Cr^{6+} . En este contexto, el Cr causa toxicidad en el medio laboral y en el ambiente (Guevara, 2010; Gutiérrez *et al.*, 2010).

2.2.1 Interacciones microbianas con metales pesados

Los mecanismos por los cuales los organismos interactúan con los metales tóxicos son: 1) Intracelulares: metalotioninas, péptidos de metal gamma-glutamil cisteína, enlazamiento no específico- quelación, compartimentalización en organelos, reacciones redox – transformaciones, 2) En la membrana celular-espacio periplasmático: adsorción- intercambio iónico, reacciones redox-transformaciones, precipitación, difusión y transporte o captación y expulsión, 3) En la pared celular: adsorción, intercambio iónico y unión covalente, atrapamiento de partículas, reacciones redox, precipitación, 4) Con los polisacáridos mucílago o cápsula: intercambio iónico, atrapamiento de partículas, enlazamiento no específico, precipitación y 5) Reacciones

extracelulares: precipitación por productos excretados como el oxalato y sulfuro, formación de complejos y quelación, sideróforos. En la práctica existen tres categorías de procesos biotecnológicos para el tratamiento de efluentes con metales tóxicos: biosorción, precipitación extracelular y captación a través de biopolímeros purificados y otras moléculas especializadas, derivadas de células microbianas (Cañizares, 2000).

Cuando se aplican contaminantes en niveles destructivos para todas las células, éstos seleccionan las pocas células que han desarrollado mecanismos de resistencia para subsistir. Los metales pesados siguen el mismo modelo. La exposición a los metales selecciona y mantiene variantes microbianas capaces de tolerar su efecto nocivo. Se han identificado diferentes mecanismos de resistencia en bacterias y hongos. Algunos sistemas microbianos de tolerancia a metales tienen el potencial para ser utilizados en procesos biotecnológicos como la biorremediación de la contaminación ambiental por metales tóxicos o la recuperación de metales valiosos (Coyne, 2000; Cervantes *et al.*, 2006).

Los mecanismos de resistencia de los microorganismos a los metales pesados son: destoxificación extracelular, permeabilidad alterada, eliminación de agentes contaminantes del entorno celular, destoxificación intracelular y precipitación (Coyne, 2000). Los mecanismos de resistencia de las bacterias con posibles aplicaciones prácticas son: a) componentes celulares que capturan a los iones, neutralizando su toxicidad, b) enzimas que modifican el estado redox de los metales o metaloides, convirtiéndolos en formas menos tóxicas y c) transportadores de la membrana que expulsan las especies nocivas del citoplasma celular (Cervantes *et al.*, 2006).

La exposición a metales pesados selecciona la resistencia que desarrollan los microorganismos para sobrevivir. Uno de los mecanismos es la detoxificación extracelular. Un compuesto orgánico puede quelar y enlazar el metal pesado, de modo que no sea absorbido. Ejemplo el ácido oxálico excretado por *Penicillium* sp. enlaza el cobre y evita su absorción. Los microorganismos pueden presentar una alteración en su permeabilidad, la que significa que el metal pesado no se absorbe. De esta manera *Micrococcus* y *Azotobacter* inmovilizan rápidamente el plomo en la pared celular. Por su parte, el metal pesado puede ser eliminado de la célula y su entorno, por ejemplo las metil

transferasas de *E. coli* y *P.aeruginosa* metilan el mercurio (Hg) para formar metil mercurio (CH₃-Hg) el cual es volátil (Coyne, 2000).

Los sistemas bacterianos de expulsión de iones inorgánicos tóxicos pueden corresponder a cationes y aniones. En los sistemas de expulsión de cationes se han identificado tres tipos: 1) Los facilitadores de difusión (CDF) o proteínas que transportan Zn, K, Cd, Co, Ni e incluso Fe. Funcionan como homodímeros en la membrana interna y expulsan los sustratos al espacio periplasmático, 2) Las ATPasas tipo P constituyen una superfamilia de transportadores de metales energizadas por la hidrólisis del ATP y sus sustratos son H⁺, Na⁺, K⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Cu⁺, Ag⁺, Zn²⁺ y Cd²⁺. Se localizan en la membrana interna y transportan iones fisiológicos como Mg²⁺ hacia el interior celular o funcionan como sistemas de expulsión de metales tóxicos al espacio periplásmico, 3) Los transportadores de la familia RND, que participan en procesos de resistencia, nodulación y división celular bacteriana, se encuentran en la membrana como un multidímero que funciona como una bomba de expulsión de metales desde el citoplasma hasta el exterior de la célula bacteriana (Cervantes *et al.*, 2006).

En los sistemas de expulsión de aniones se encuentran los transportadores que expulsan oxianiones derivados del arsénico (arsenito, AsO₂⁻) y de cromo (CrO₄²⁻) e incluyen sistemas quimiostáticos y relacionados con ATPasas. En la diversidad microbiana, existe resistencia y tolerancia a los metales pesados. Los microorganismos resistentes poseen mecanismos de detoxificación codificados genéticamente, inducidos por la presencia del metal; en cambio, los tolerantes son indiferentes a la presencia o ausencia, facultad que puede ser mediada por plásmidos. La tolerancia a los metales pesados en las biopelículas microbianas está mediada por el desarrollo de subpoblaciones persistentes, asociadas a fenotipos de crecimiento lento, no mutantes, sino células sobrevivientes especializadas de una población genéticamente homogénea. La resistencia y tolerancia se puede utilizar para extraer metales pesados a través de los mecanismos de biotransformación, biomineralización, biosorción, bioacumulación y quimiosorción (Figura 2) mediada por microorganismos (Vullo, 2003; Soto *et al.*, 2010).

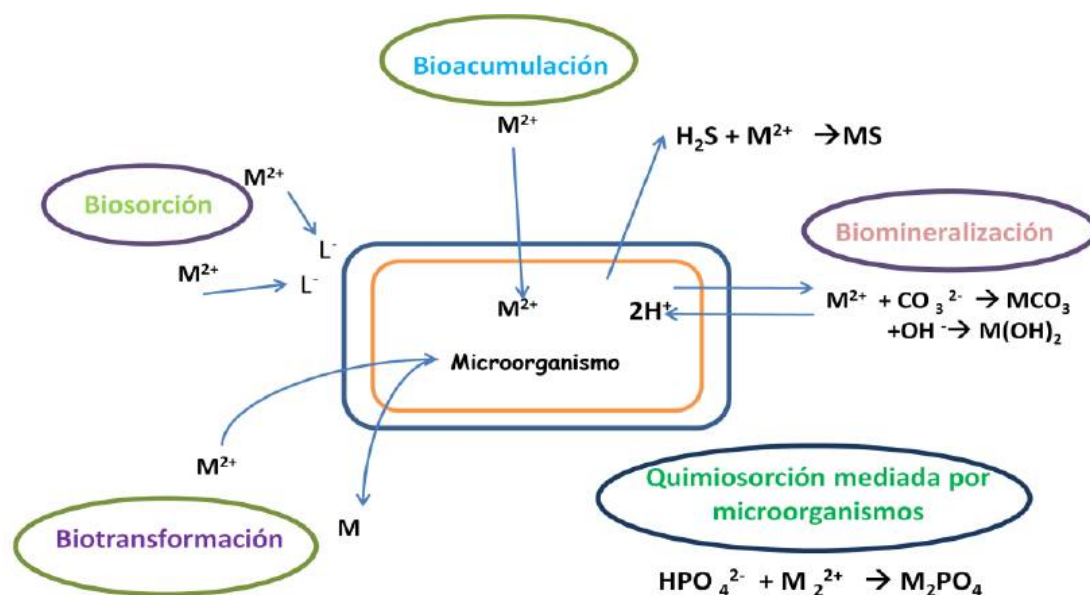


Figura 2. Mecanismos de interacción entre los metales pesados y microorganismos (Vullo, 2003).

2.2.1.1 Biotransformación

La biotransformación corresponde a transformaciones del estado de oxidación de los metales pesados que influyen en la movilidad de los contaminantes. La transformación de los metales puede ser directa mediante cambios en el estado de valencia, cuando actúan como donantes o receptores de electrones, e indirecta, por medio de agentes oxidantes o reductores producidos por los microorganismos, que son responsables de cambios en el pH y potencial redox. Las formas oxidadas de los metales son altamente solubles y por tanto móviles en las aguas subterráneas, en condiciones aerobias. Su reducción enzimática produce formas reducidas insolubles, lo que provoca su precipitación intra o extracelular. Las reducciones de Cr^{6+} a Cr^{3+} y Au^3 a Au^0 conducen a la precipitación de los metales (Vullo, 2003; Soto *et al.*, 2010).

Además de la reducción enzimática directa de metales pesados, algunas bacterias reductoras de metales y las reductoras de sulfatos llevan a cabo la reducción indirecta de especies oxidadas solubles. Esto se produce acoplando la oxidación de compuestos orgánicos a la reducción del Fe^{3+} , Mn^{4+} y SO_4^{2-} . Las formas reducidas Fe^{2+} , Mn^{2+} y H_2S interaccionan químicamente con los metales contaminantes solubles produciendo componentes insolubles que precipitan (Soto *et al.*, 2010).

En la reducción del Cr^{6+} se han descrito tres mecanismos: a) En condiciones aerobias, reducción asociada con cromato reductasas que usan NADH o NADPH como cofactores, b) En anaerobiosis, el Cr^{6+} es usado como aceptor de electrones en la cadena de electrones, c) Reducción por reacciones químicas asociadas con aminoácidos, nucleótidos, azúcares, vitaminas, ácidos grasos o glutatión. Dependiendo del estado de oxidación de un metal y la especie que está conformando, un microorganismo puede realizar dos transformaciones posibles. Una corresponde a la movilización del metal es decir el pasaje de un estado insoluble inicial correspondiente a una fase sólida a un estado soluble final en fase acuosa. Se consideran la lixiviación y biooxidación que pueden ser utilizadas para la recuperación de Cu y As respectivamente. La otra transformación corresponde a la inmovilización del metal, es decir de un estado soluble inicial en fase acuosa a un insoluble final en fase sólida (Soto *et al.*, 2010).

Los hongos transforman el Cr de forma directa e indirecta. En la biotransformación directa o enzimática, el Cr^{6+} es reducido a Cr^{3+} al ser utilizado como fuente de electrones y se desconoce el tipo de sistema que participa en la detoxificación, ya sea intracelular o extracelular. En la reducción del Cr^{6+} por hongos tolerantes como *Aspergillus*, *Penicillium*, *Saccharomyces* y *Candida*, la transformación ocurre con muy poca unión de Cr a la biomasa ($\leq 1,02$ % del Cr total del medio) lo que indica un proceso extracelular. En la biotransformación indirecta, el Cr^{6+} es reducido a Cr^{3+} con metabolitos reductores o grupos funcionales de la superficie celular. La reducción extracelular del Cr^{6+} por células fúngicas podría deberse a la producción y excreción de moléculas reductoras. En las bacterias se han descrito sustancias reductoras como el Fe^{2+} y H_2S acoplado la oxidación de moléculas orgánicas y el hidrógeno a la reducción de ion férrico y sulfato. Es factible que estas moléculas sean similares en los hongos (Gutiérrez *et al.*, 2010).

2.2.1.2 Biosorción

El término biosorción o bioadsorción se utiliza para referirse a la captación de los metales que lleva a cabo una biomasa viva o muerta, a través de mecanismos físico-químicos como la adsorción o el intercambio iónico. Implica una fase sólida o sorbente y una fase líquida o solvente, que normalmente es el

agua y que contiene los iones metálicos disueltos que van a ser sorbidos o sorbato. Debido a la gran afinidad del sorbente por el sorbato, este último es atraído hacia el sólido y enlazado por diversos mecanismos. Este proceso continúa hasta que se establece un equilibrio entre el sorbato disuelto y el sorbato enlazado al sólido. Los sistemas que utilizan células vivas pueden emplear tanto una mezcla de microorganismos como de plantas superiores; no obstante, la biomasa muerta tiene ventajas sobre las células vivas: no se adicionan nutrientes, no es afectada por la toxicidad en condiciones de operación adversos, y se puede obtener como un residuo industrial. La biosorción se utiliza en la biorremediación de metales pesados como el Cd, Cr, Pb, Ni, Zn y Cu (Cañizares 2000; Vullo, 2003).

La bioadsorción o interacción y unión con componentes de la superficie celular es un proceso utilizado para la remoción de metales pesados. Los microorganismos o biosorbentes retienen metales pesados en tiempos relativamente cortos, mediante una interacción físico-química de metal con ligandos de la superficie celular. Esta interacción se produce con grupos funcionales de la pared celular como grupos carboxilo, amino, hidroxilo, fosfato y sulfhidrilo, expuestos hacia el exterior celular. La bioadsorción de iones metálicos usualmente puede modelarse en dos tipos: 1) Modelo Langmuir, en el cual el aumento del consumo del metal por la biomasa alcanza un equilibrio y 2) Modelo de Freundlich, en el cual el aumento del consumo del metal por la biomasa incrementa con el tiempo (Cascaret *et al.*, 2014). Debido a su naturaleza de oxianión el Cr^{6+} no es atrapado por los compuestos aniónicos de las envolturas bacterianas; no obstante, derivados catiónicos de Cr^{3+} se unen fuertemente a lipopolisacáridos de *Salmonella*, pared celular de *B. subtilis* y *E. coli* y polímeros capsulares de *B. licheniformis* (Vullo, 2003; Guevara, 2010).

La biosorción de Cr total varía en función del pH, con el ácido crómico (H_2CrO_4), ion hidrógeno cromato (HCrO_4^-), ion dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$), ion cromato (CrO_4^{2-}) y Cr^{3+} que son las especies dominantes. A pH 2 el HCrO_4^- es la especie dominante. La biosorción del Cr a pH bajo sugiere que la carga negativa del cromato y dicromato se unen por una atracción electrostática a grupos funcionales con carga positiva sobre la superficie de los biosorbentes. Cuando el pH incrementa, las cargas de la superficie pasan a ser negativas y la biosorción disminuye. En condiciones alcalinas, los grupos carboxilo se encuentran

desprotonados y tienen una carga negativa. En baja concentración de Cr predomina el HCrO_4^- con pH menor de 5 mientras que el CrO_4^{2-} incrementa con el pH y predomina a pH mayor de 7 (Sivaprakash *et al.*, 2009, mencionados por Guevara, 2010).

Una disminución en el pH causa la protonación de la superficie del adsorbente lo que induce una fuerte atracción por los iones Cr^{6+} de la solución cargados negativamente, entonces la biosorción aumenta con la acidez. Por el contrario, el incremento de OH^- induce cambios en la superficie de adsorbente, impidiendo la biosorción de los iones Cr^{6+} cargados negativamente. La biosorción disminuye conforme aumenta el pH (Cárdenas *et al.*, 2011).

En los hongos, la biosorción de Cr^{3+} y Cr^{6+} implica que son acomplejados como compuestos de la pared celular (Gutiérrez *et al.*, 2010). La captura de Cr en la superficie de hongos filamentosos y levaduras se ha descrito como resultado de su unión con los componentes de la pared celular. En esta estructura existen predominantemente los polisacáridos glucanos, quitina y quitosana que pueden estar asociados con proteínas y otros compuestos menores como lípidos y melaninas. Los micelios de hongos tratados químicamente muestran alta eficiencia para unir Cr, mencionándose *Mucor*, *Rhizomucor*, *Candida*, *Penicillium* y *Aspergillus*. En hongos vivos es posible que la interacción con el Cr involucre dos o más mecanismos, como sucede con *A. versicolor* con reducción de Cr^{6+} a Cr^{3+} y también unión de ambos iones a la superficie celular (Cervantes *et al.*, 2006; Gutiérrez *et al.*, 2010).

2.2.1.3 Bioacumulación, biomineralización y quimiosorción

La bioacumulación involucra sistemas de transporte e incorporación. A través del sistema de transporte de membrana se internaliza el metal pesado presente en el entorno celular, con gasto de energía. Una vez que se incorpora el metal pesado al citoplasma, éste es secuestrado por proteínas ricas en grupos sulfhidrilos llamados metalotioninas o también puede ser introducido en una vacuola como ocurre en los hongos. Las metalotioninas se unen a los iones metálicos, evitando su interacción con otras proteínas esenciales para los microorganismos. En el caso de los cromatos, son incorporados a la célula a través del transportador de sulfato y también se han descrito determinantes genéticos de resistencia a cromatos presentes en plásmidos que codifican

transportadores de membrana que dirigen el flujo de iones del citoplasma al exterior (Guevara, 2010).

En los hongos la incorporación-bioacumulación implica proteínas transportadoras. Levaduras como *S. cerevisiae* incorporan el Cr^{6+} a las células con un transportador aniónico no específico, un sistema de permeasas que transportan diferentes aniones como sulfatos y fosfatos. Una vez que se inicia la incorporación del Cr, éste puede ser acumulado por las células fúngicas durante el crecimiento, como se ha descrito en *Aspergillus foetidus*, *A. oryzae*, *A. niger* y *Rhizopus nigricans*. Estos dos géneros de hongos acumulan 4,5-13,0 mg de Cr por gramo de biomasa (Gutiérrez *et al.*, 2010).

En la biomineralización los microorganismos precipitan metales y radionucleidos como carbonatos e hidróxidos, mediante mecanismos de resistencia codificados en plásmidos. Este mecanismo aparece por el funcionamiento de una bomba que expulsa el metal tóxico del citoplasma hacia el exterior celular en contra corriente o en flujo de H^+ hacia el interior celular. Se produce una alcalinización sobre la superficie celular externa y por lo tanto la precipitación del metal pesado. Otra forma de precipitar los metales es mediante la formación de sulfuros o fosfatos como metales de alguna actividad enzimática celular. Un ejemplo es la precipitación de sulfuros metálicos con bacterias reductoras de sulfatos o la acumulación de CdS en la pared celular de *Klebsiella planticola* y *Pseudomonas aeruginosa* (Vullo, 2003).

La quimiosorción mediada por microorganismos se describe como las reacciones en las que los microorganismos biomineralizan un metal, formando un depósito primario, que funciona como núcleo de cristalización, con la subsecuente depuración del metal de interés, promoviendo y acelerando así el mecanismo de mineralización. Un ejemplo es el agregado de Fe en un efluente a tratar con bacterias reductoras de sulfato. Estos microorganismos producen sulfuros que precipitan en forma de FeS sobre la superficie celular. Los otros metales contaminantes utilizan el FeS como soporte y cristalizan sobre sus cristales. Luego, aprovechando las propiedades magnéticas del Fe, pueden separarse fácilmente de la fase soluble, descontaminando así el material (Vullo, 2003).

2.2.2 Fitorremediación

La fitorremediación se define como el uso de plantas arbóreas, arbustivas, herbáceas y algas, las mismas que actuando solas o en simbiosis, mediante sus procesos metabólicos (Figura 3) eliminan o transforman contaminantes de suelo, agua y aire (Arias *et al.*, 2010). La fitorremediación comprende procesos dirigidos a liberar el contaminante de la matriz del suelo (fitodescontaminación) o secuestrarlos en dicha matriz (fitoestabilización). La fitodescontaminación reduce la contaminación del suelo a niveles tolerables a través de la acción de las plantas, su microbiota asociada y apropiadas labores agronómicas. Comprende las técnicas de fitoextracción, fitovolatilización, fitodegradación y rizodegradación. En la fitoestabilización las plantas tolerantes al contaminante lo estabilizan mecánicamente e impiden su transporte al agua subterránea o el aire (Marrero *et al.*, 2012).

La fitoextracción es la captación de contaminantes por las raíces de las plantas y su translocación y concentración en el interior, principalmente la parte aérea. El crecimiento de las plantas hiperacumuladoras es lento lleva a una baja producción de biomasa, con sistema radicular poco profundo y la biomasa no se puede utilizar como alimento para los animales; sin embargo puede ser incinerada para recuperar los metales de las cenizas. Las plantas de las familias *Brassicaceae*, *Euphorbiaceae*, *Lamiaceae* o *Scrophulariaceae* son ejemplos de plantas utilizadas en estos procesos para los metales como Ag, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Mn, Mo, Pb, Ni, Zn, metaloides, As y Se, radionucleótidos y no metales como el boro (Arias *et al.*, 2010; Peña *et al.*, 2013).

La captación y transpiración de un contaminante modificado a la atmósfera, se conoce como fitovolatilización. Las plantas captan y modifican los contaminantes o compuestos orgánicos y los liberan a la atmósfera con la transpiración (Arias *et al.*, 2010). La ventaja de este proceso es que los contaminantes pueden ser transformados en formas menos tóxicas e incluso pueden ser sujeto de procesos degradativos más rápidos y efectivos; sin embargo, también puede liberar contaminantes o metabolitos dañinos a la atmósfera o incluso pueden acumularse en la vegetación, en las frutos o en la madera. *Medicago sativa*, *Brassica juncea*, *Brassica napus* y *Arabidopsis thaliana* son utilizadas para modificar contaminantes orgánicos como solventes clorinados (Arias *et al.*, 2010; Cubillos, 2011; Peña *et al.*, 2013).

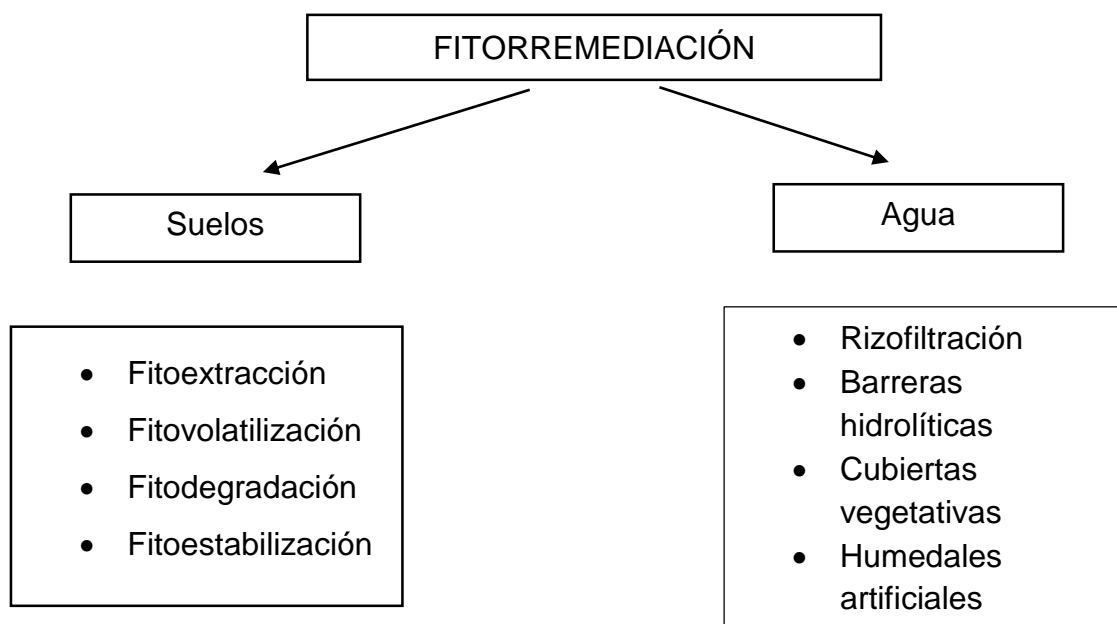


Figura 3. Procesos de fitorremediación principalmente utilizados en los medios terrestre y acuoso (Burgos & Diez, 2015).

La fitodegradación es la transformación de un contaminante mediante compuestos producidos por las plantas. Las plantas captan, almacenan y degradan o metabolizan los compuestos orgánicos, generando subproductos menos tóxicos o no tóxicos (Arias *et al.*, 2010). En la rizodegradación las raíces de las plantas, su microbiota asociada o los productos excretados destruyen el contaminante (González, 2005). Las raíces pueden modificar las condiciones del suelo, al aumentar la entrada del aire y regular el contenido de humedad, propiciando condiciones favorables o no para los microorganismos. Este sistema de bajo costo, tiene la ventaja que la transformación del contaminante ocurre *in situ*; sin embargo, puede tomar un tiempo el desarrollo de una zona radicular extensa. *Morus rubra*, *Mentha spicata*, *Medicago sativa*, *Agropyrum desertorum*, *Oryza sativa* y *Typha latifolia* son algunas de las plantas utilizadas para reducir pesticidas, surfactantes, solventes clorados, pentadichlorofenol e hidrocarburos aromáticos policíclicos (Peña *et al.*, 2013).

La inmovilización de un contaminante del suelo o el agua mediante la absorción, precipitación y acumulación por raíces es definida como fitoestabilización. La planta puede alterar las condiciones del medio, al convertir metales de un estado de oxidación soluble a uno insoluble. Esta estrategia es utilizada en tratamientos de suelo, sedimentos y lodos y es menos disruptiva,

que otras tecnologías, además de tener menor costo; sin embargo, tiene como desventaja que los contaminantes permanecen en el suelo y las plantas necesitan mantenimiento a largo plazo. *Brassica juncea*, *Agrostis capillis* y *Festuca rubra* son usadas para reducir la filtración de As, Cd, Cr, Co, Hg, Pb y Zn en suelos contaminados (Peña *et al.*, 2013).

La rizofiltración consiste en la absorción de los contaminantes dentro de las raíces, mediante procesos bióticos y abióticos. Los exudados de las raíces pueden precipitar algunos metales. Los contaminantes son eliminados luego de ser inmovilizados o acumulados en las plantas. Esta técnica donde el metal es absorbido por el sistema vegetal es comúnmente utilizada con suelos donde el contaminante está en solución o en efluentes líquidos contaminados. Las plantas requieren un soporte y pueden ser usados *in situ* o *ex situ*. *Eichhornia crassipes*, *Hydrocotyle umbellata*, *Lemna minor* y *Azolla pinnata* son plantas acuáticas utilizadas para los contaminantes Pb, Cd, Zn, Cu, Ni, Cr y radionucleótidos (Torres *et al.*, 2010; Peña *et al.*, 2013).

2.2.3 Humedales en el tratamiento de aguas residuales

El tratamiento de aguas residuales comprende procesos físicos, químicos y biológicos, en cuatro etapas. El pretratamiento consiste en el desbaste, eliminación de arena y desengrasado. El tratamiento primario remueve los sólidos suspendidos y DBO. El tratamiento secundario o biológico convierte la materia orgánica fina, coloidal y disuelta en flóculos sedimentables y sólidos inorgánicos. El tratamiento terciario aumenta la calidad del efluente, antes que sea descargado al ambiente receptor. En los tratamientos secundario y terciario de aguas contaminadas con metales pesados, se utilizan los humedales artificiales (Estrada, 2010).

El Cr se puede eliminar del agua mediante reducción (sulfito de sodio, sulfato ferroso, dióxido de azufre), digestión anaerobia de lodos, intercambio iónico, membranas, bentonita y humedales artificiales (Estrada, 2010). El término humedal (wetland, en inglés) se usa para definir áreas con tres componentes típicos: agua (el área está inundada permanentemente o periódicamente, con una profundidad menor de 1m), suelos hídricos y vegetación en la que prevalecen plantas macrófitas. Los humedales son áreas con un suelo saturado de agua y una comunidad viviente (plantas y animales). La definición más

ampliamente conocida de los humedales es: “extensiones de marismas, pantanos, turberas y aguas de régimen natural o artificial, permanentes o temporales, estacionadas o corrientes, dulces, salobres o saladas, incluyendo las extensiones con agua marina, cuya profundidad con marea baja no excede de 6 m (Arias *et al.*, 2010; Estrada, 2010).

Los humedales artificiales o contruïdos son una tecnologïa para el tratamiento de aguas contaminadas. Son sistemas pasivos de depuraci3n con menos de 1m de profundidad, plantas propias de zonas húmedas y los procesos de descontaminaci3n se realizan por componentes fïísicos, quïímicos y biol3gicos. Pueden ser de dos tipos: aerobios con vegetaci3n plantada a poca profundidad y suelos relativamente impermeables-arcilla o escombros de minas y humedales anaerobios, con vegetaci3n plantada a profundidad y mezcla de sustratos permeables como suelo, turba, compost, grava, arena, a menudo cononado con una capa impermeable en el fondo. En la depuraci3n de aguas residuales se consideran humedales que usan macrófitas o plantas que se ven a simple vista, en contraposici3n a las micrófitas o microalgas y por tanto las lagunas no son consideradas como humedales (Estrada, 2010).

En las ecotecnologïas de tratamiento como el caso de los humedales artificiales, plantas y microorganismos participan activamente en la eliminaci3n de contaminantes pat3genos, nutrientes, quïímicos, orgánicos e inorgánicos. Las plantas secuestran los nutrientes y los almacenan en raíces y brotes o para el caso de los metales pesados, los acumulan en otros tejidos. Los mecanismos de transformaci3n o eliminaci3n de contaminantes son: sedimentaci3n, precipitaci3n, transformaci3n quïímica, absorci3n, cambio i3nico en las plantas, biodegradaci3n, ruptura y asimilaci3n de nutrientes (Peña *et al.*, 2013).

Existen dos tipos de humedales artificiales: de flujo superficial o de superficie libre de agua o FWS, "Free Water System" y de flujo subsuperficial o sistemas lecho de vegetaci3n sumergida o SFS, HFSS, "Subsurface Flow System"o VSB, vegetated submerged beds. En los FWS las plantas acuáticas están enraizadas en el fondo del humedal y el flujo de agua se hace a través de las hojas y tallos de las plantas. En los HFSS la lámina de agua no es visible y el flujo atraviesa un lecho relleno con arena, grava o suelo, donde crecen las plantas que solo tienen las raíces y rizomas en contacto con el agua (Alvarez *et al.*, 2004; Arias *et al.*, 2010; Estrada, 2010).

Los humedales de flujo superficial consisten en canales con la superficie del agua expuesta a la atmósfera y el fondo constituido por suelo relativamente impermeable, vegetación emergente y niveles de agua pocos profundos (0,1 - 0,6 m). El tratamiento se produce durante la circulación lenta del agua a través de tallos y raíces de la vegetación. Ese sistema puede ser con macrófitas flotantes y sumergidas. Los sistemas con macrófitas flotantes están formados por grandes lagunas, con bajos niveles de agua y provistos de plantas macrófitas que flotan libremente en la superficie y sus raíces sumergidas tienen buen desarrollo. Los sistemas con macrófitas sumergidas son lagunas con bajo nivel de agua y plantas macrófitas cuyo tejido fotosintético está totalmente sumergido. Estas plantas solo crecen bien en aguas con oxígeno disuelto, por lo cual no se utilizan para aguas residuales con alto contenido de materia orgánica, ya que la descomposición microbiana provoca condiciones anóxicas (Arias *et al.*, 2010).

Los humedales de flujo subsuperficial son sistemas con macrófitas emergentes, que consisten de un filtro biológico relleno de un medio poroso (piedra volcánica, grava) en el cual las plantas se siembran en la superficie del lecho filtrante y las aguas residuales pretratadas atraviesan de forma horizontal o vertical el lecho filtrante. El nivel del agua se mantiene por debajo de la superficie del medio granular. En los humedales de flujo subsuperficial vertical las aguas se distribuyen de manera uniforme e intermitente sobre la superficie del lecho filtrante y luego percolan hacia la zona de recolección (Arias *et al.*, 2010; Estrada, 2010). En los humedales de flujo subsuperficial horizontal las aguas residuales fluyen lentamente desde la zona de distribución en la entrada de la pila, en una trayectoria horizontal a través del lecho filtrante, hasta la superficie de recolección del efluente (Arias *et al.*, 2010).

Los procesos para la depuración de aguas residuales en los humedales son la eliminación de sólidos en suspensión por filtración, a través de los medios sobre las que crecen las raíces, eliminación de materia orgánica por acción de bacterias aerobias favorecidas por la aireación a través de las raíces, eliminación de nitrógeno por absorción directa de las plantas que generan procesos de nitrificación-desnitrificación, eliminación de fósforo por transformación directa realizada por las plantas, fenómenos de adsorción en los componentes del suelo, eliminación de patógenos por adsorción sobre el sustrato, efecto deletéreo de

los antibióticos producidos por las raíces y por acción depredadora de bacterias y protozoos (Arias *et al.*, 2010; Peña *et al.*, 2013).

Los HAFSS están compuestos de un medio filtrante, un tipo de vegetación y microorganismos asociados, cada uno desempeñando funciones que favorecen el tratamiento del agua residual, a través de la captura y fijación de la materia orgánica y su posterior incorporación a los procesos fisiológicos de las plantas y microorganismos. Los procesos aerobios predominan cerca de la rizósfera, en la cual se presenta el crecimiento microbiano más importante de la superficie del medio de soporte. Entre las plantas comúnmente usadas en los HAFSS se encuentran especies de la familia Brassicaceae y plantas acuáticas de los géneros *Typha*, *Juncus*, *Lemna* y *Eichhornia* (Peña *et al.*, 2013).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Material biológico

El material biológico estuvo constituido por plantas de *Canna indica* “achira”, *Cynodon dactylon* L. “grama” y *Ruellia brittoniana* “petunia” y microorganismos tolerantes al Cr^{6+} .

3.1.2 Población y muestra de estudio

En la investigación descriptiva, la población correspondió a los microorganismos de las raíces de plantas tolerantes al Cr^{6+} en el invernadero de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo y se investigaron los microorganismos aislados de 54 unidades de muestreo (Alvitres 2000, anexo 1), colectadas durante mayo - julio de 2015. En la investigación experimental la población y muestra estuvo constituida por 90 unidades experimentales de microorganismos aislados de raíces de plantas tolerantes al Cr^{6+} , correspondientes a un diseño completamente aleatorizado (DCA) con arreglo factorial $2 \times 3 \times 5$.

3.2 Métodos

3.2.1 Variables en estudio

Variable independiente: Microorganismos aislados de raíces de plantas tolerantes al Cr^{6+} .

Variable dependiente: Eficiencia de la remoción de Cr^{6+} .

3.2.2 Tipo de estudio y diseño de contrastación de hipótesis

La investigación se realizó en dos fases, la primera con un estudio descriptivo y la segunda fase con un estudio experimental. La primera fase correspondió a la obtención de plantas tolerantes al Cr^{6+} , aislamiento de microorganismos asociados a las raíces, adaptación e identificación de los microorganismos tolerantes a 200 ppm Cr^{6+} , y selección de los tres microorganismos con la mayor biomasa. En la segunda fase se determinó la eficiencia de la remoción de Cr^{6+} por la biomasa viva y muerta de los microorganismos seleccionados. La hipótesis se contrastó con el diseño de una

sola casilla de Goode y Hatt en la primera fase, y diseño completamente aleatorio (DCA) con arreglo factorial 2 x 3 x 5 en la segunda fase (Hernández *et al.*, 2003).

3.2.3 Primera fase

En la primera fase de la investigación se obtuvieron plantas tolerantes al Cr^{6+} en condiciones de humedales de flujo subsuperficial (HAFSS) y se aislaron microorganismos asociados a las raíces de esas plantas.

a) Selección de plantas tolerantes al Cr^{6+}

En seis campos agrícolas comerciales del distrito de Mochumí, en Lambayeque, se colectaron 18 especímenes de achira, grama y petunia. Con una palana se extrajo la raíz y el suelo adherido, las plantas se depositaron en bolsas de polietileno de 25 x 17 cm (Figuras 4, 5) y se llevaron inmediatamente al invernadero de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, en Lambayeque, donde fueron transplantadas a nueve HAFSS, a razón de tres HAFSS por especie.

Los HAFSS (Burgos & Diez, 2015), estuvieron constituidos por recipientes de polipropileno de 35,4 cm de longitud x 27,6 cm de ancho x 20,5 cm de altura, con una capacidad de 11 L, donde se diferenciaron inicialmente cinco capas: grava, arenón chino, cáscara de *Oryza sativa* L. “arroz”, agua y espacio libre (Figura 6). En el fondo del HAFSS, como medio de soporte se depositó una primera capa de 7,9 cm de grava con un diámetro promedio de 0,25 pulgadas, una segunda capa de 5,5 cm de arenón chino (diámetro promedio 0,031 pulgadas) y una tercera capa de 3,9 cm de cáscaras de arroz, previamente lavadas y deshidratadas. El efluente se colectó a través de un tubo de 2 cm diámetro, perforado (cada 5 cm) en toda su longitud, depositado sobre la grava a 5 cm de la base y conectado en uno de sus extremos hacia un caño de polipropileno para la toma de muestras (Figuras 7 a 11).

En el centro de los HAFSS se realizaron agujeros que llegaron hasta la base del arenón chino, donde se transplantaron 18 especímenes de achira, grama y petunia por humedal y se regaron con 8 L de agua decolorada durante 1 semana.



Figura 4. Extracción de plantas de *Canna indica*.



Figura 5. Plantas de *Ruellia brittoniana*.

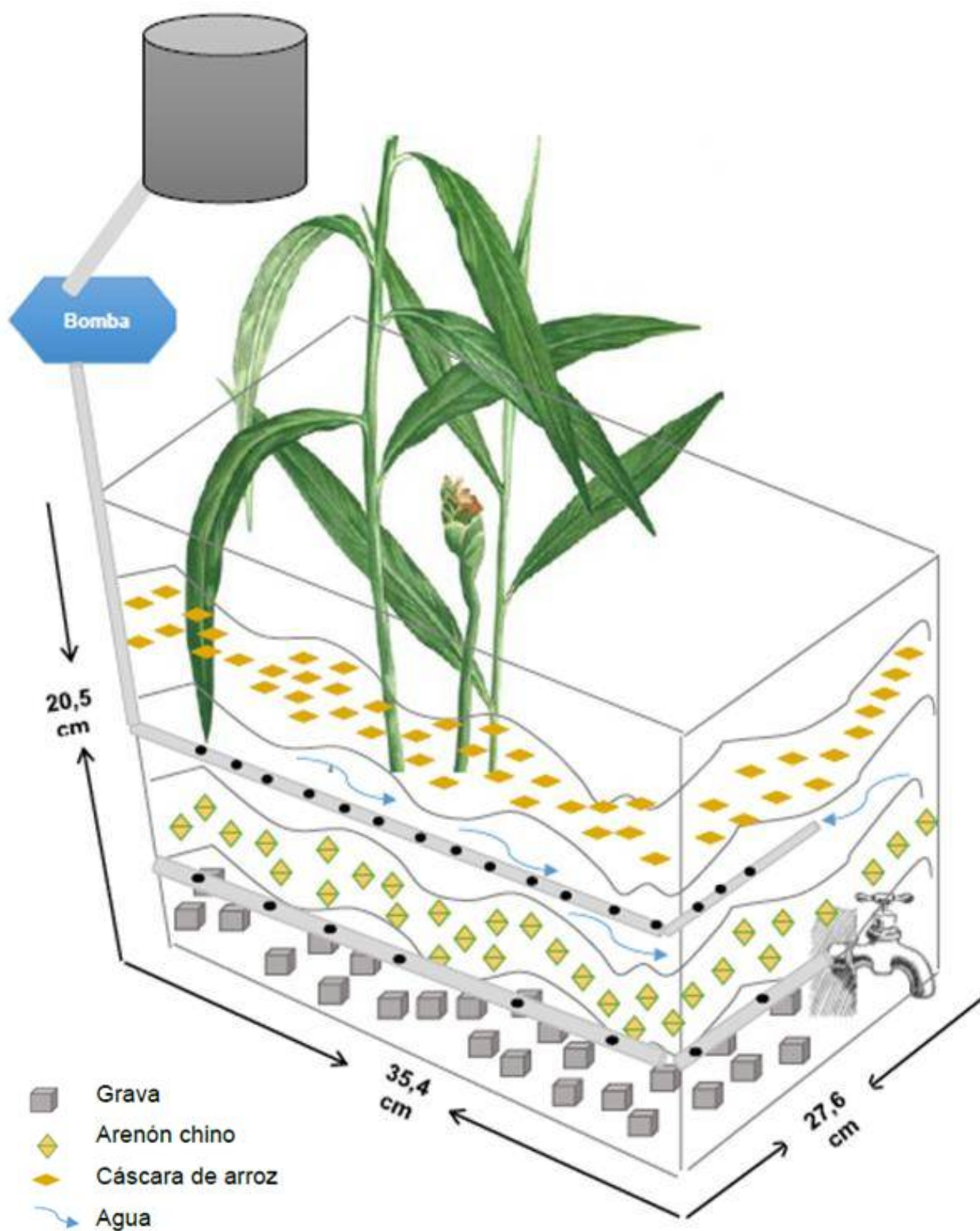


Figura 6. Diseño de humedal de flujo subsuperficial (Burgos & Díez, 2015).



Figura 7. Vista lateral del recipiente de polipropileno acondicionado para humedal de flujo subsuperficial.



Figura 8. Recipiente de polipropileno con una capa de grava y tubo de PVC perforado.



Figura 9. Recipiente de polipropileno con una capa de arenón chino.



Figura 10. Recipiente de polipropileno con una capa de cáscara de *Oryza sativa* L.



Figura 11. Vista lateral de humedal de flujo subsuperficial.

La tolerancia al cromo se determinó regando las plantas con una solución de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$), a pH cercano a la neutralidad para favorecer la normalidad y disponibilidad de cromo hexavalente (Diez, 2008). El riego se realizó con una solución de 25 ppm Cr^{6+} la semana 1 y 50 ppm Cr^{6+} a partir de la semana 2 (Anexo 2). La solución fue recirculada con una bomba monofásica de agua de 0,25 hp (1/4 hp), succión de 1'' y descarga 3/4''. A su vez, la bomba estuvo unida al alimentador, constituido por un balde de plástico de 5 L de capacidad (Figura 12).

La tolerancia al Cr^{6+} se calificó por el aspecto físico y supervivencia de las plantas. Aquellas en las que la coloración y turgencia no se vieron marcadamente afectadas fueron consideradas tolerantes al Cr^{6+} y se seleccionaron para la siguiente fase de la investigación.

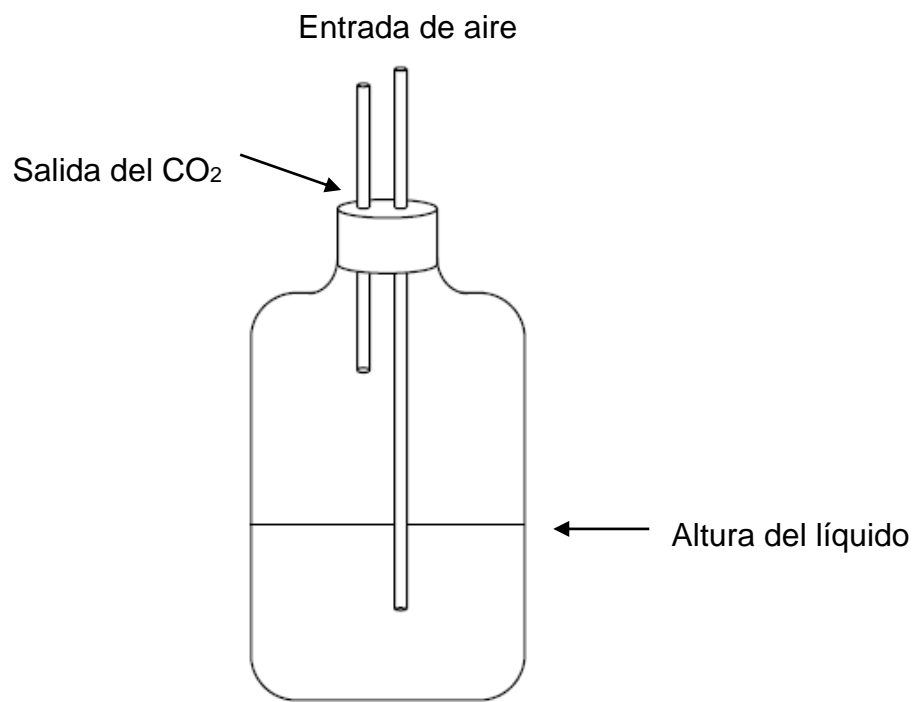
b) Aislamiento de microorganismos asociados a raíces de plantas tolerantes al Cr^{6+}

Se acondicionaron 21 biorreactores tipo tanque con sistema discontinuo y flujo de aire descendente (Hurtado & Guzmán, 2011), constituidos por frascos de 1 L de capacidad y ajustados a la geometría y proporciones de un biorreactor estándar (Figuras 13, 14). El extremo superior de cada biorreactor estuvo cubierto por una tapa de goma que presentó dos orificios. A través del primer orificio ingresó una cánula de plástico llevando aire insuflado (1 vvm) por una compresora de aire Elite 803 de 4 watts y esterilizado por un sistema de burbujeo en cloruro de sodio al 30 %. Por el segundo orificio ingresó una cánula taponada en su extremo superior con algodón para permitir la salida de gases. Los frascos de vidrio se esterilizaron en horno (180 °C por 2 horas), el material de plástico y goma se sumergió en hipoclorito de sodio al 5% durante 30 horas y posteriormente fueron irradiados con luz ultravioleta por 0,5 horas.

En la zona radicular de las plantas tolerantes al Cr^{6+} se tomaron 54 muestras de aproximadamente 20g de raíces. Después (Ramírez & Ugaz, 2014), se cortaron en fragmentos de aproximadamente 5 cm, aleatoriamente se tomaron submuestras de 10g de raíces y se depositaron en frascos de 250 mL de capacidad, conteniendo 90 mL de solución salina esterilizada, NaCl 0,87%, p/v (Figuras 15, 16).



Figura 12. Riego de plantas con solución de dicromato de potasio.



PROPORCIONES

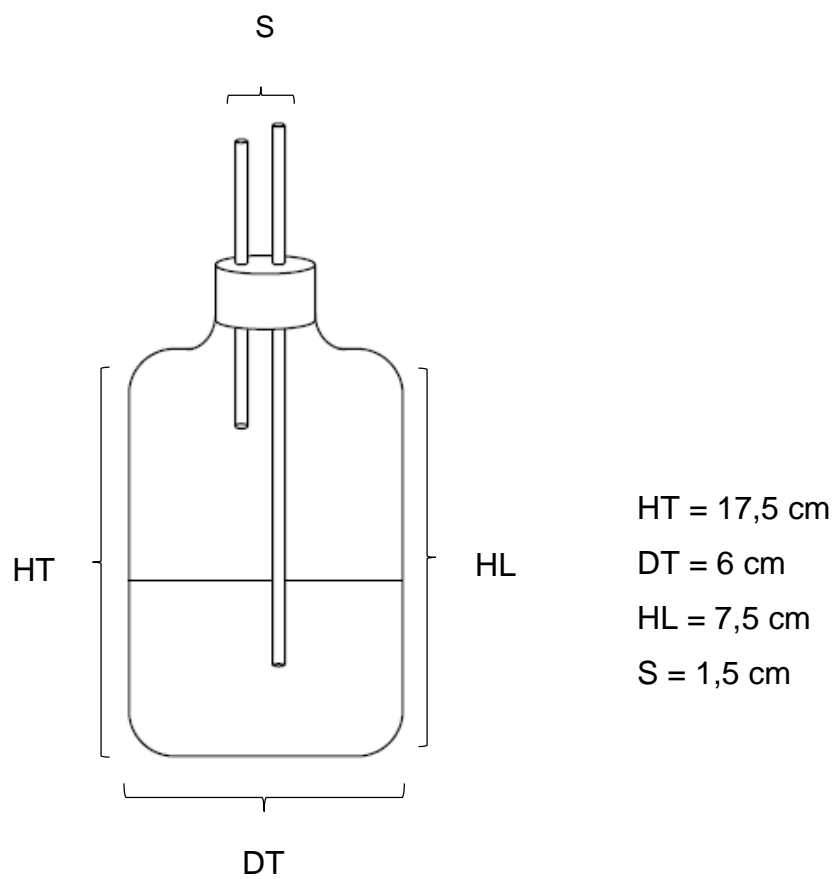


Figura 13. Diseño de biorreactor tipo tanque con sistema discontinuo y flujo de aire descendente (Cerna & Elías, 2015).

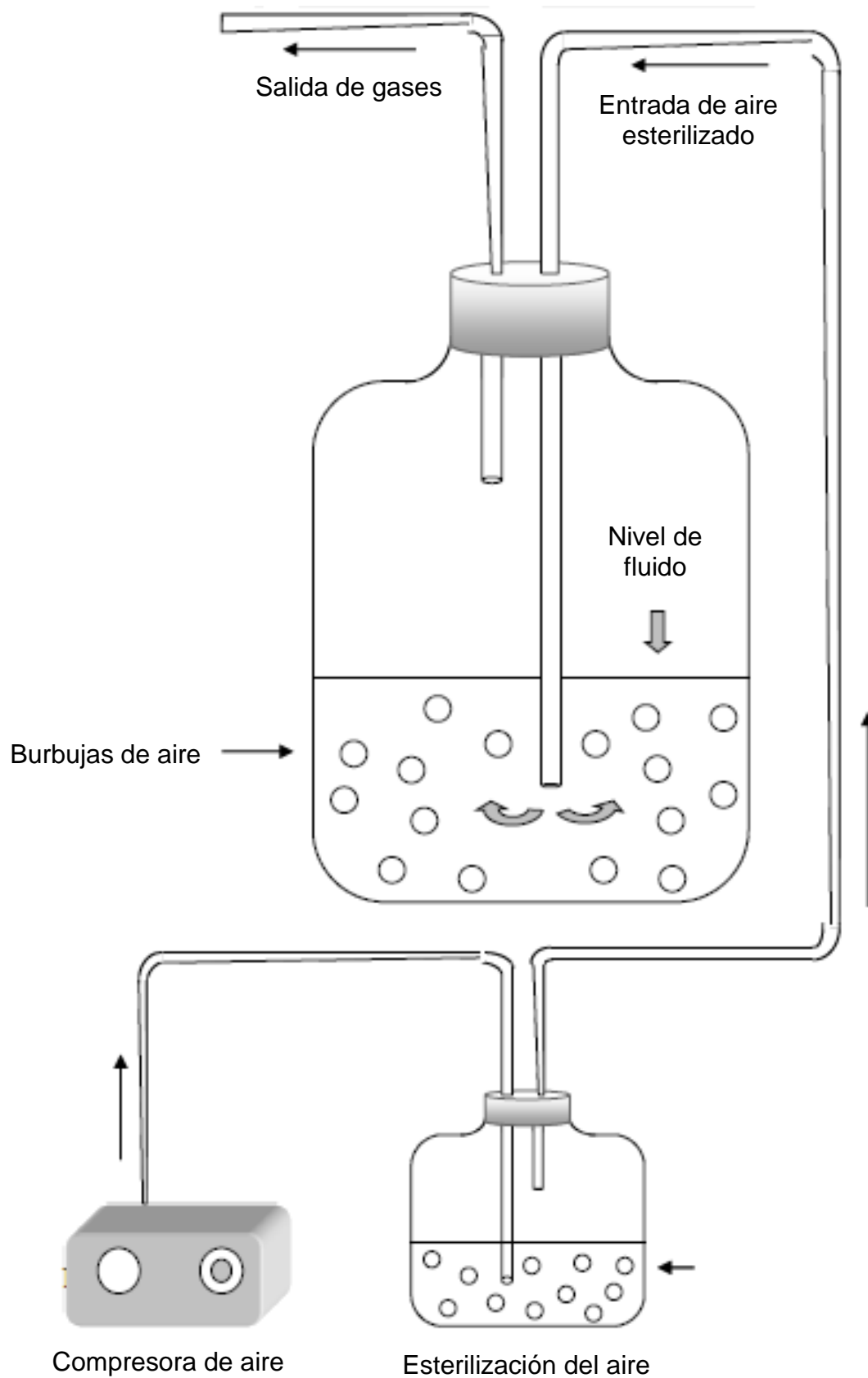


Figura 14. Modo de operación de biorreactor tanque con sistema discontinuo y flujo de aire descendente (Cerna & Elías, 2015).



Figura 15. Pesaje de muestras de raíces.



Figura 16. Suspensión de raíces en solución salina esterilizada.

El contenido de los frascos (10^{-1}) se agitó manualmente durante 10 minutos y se tomaron 10 mL para inocularlos en biorreactores tipo tanque con sistema discontinuo y aireación (1 vvm) conteniendo 90 mL de caldo sales minerales con 0,01% p/v de glucosa y 2,5 mL de una disolución de dicromato de potasio, $K_2Cr_2O_7$ (Figura 17, anexo 3) tal que la concentración final del catión metálico fue de 50 ppm ó 50 mg L^{-1} (Jiang *et al.*, 2004).

Inmediatamente después de la inoculación en cada biorreactor se introdujo una lámina de vidrio de 2,0 cm x 18,5 cm, manteniendo una posición inclinada con ángulo de 45°C (Guevara, 2010). Transcurridas 96 horas de incubación a 30°C , las láminas de vidrio se sacaron de los biorreactores, con un asa bacteriológica se raspó el material adherido (Figuras 18), se depositó en 1 mL de solución salina (NaCl 0,87%, p/v), se homogenizó durante 2 minutos, se tomó una alícuota y se sembró por agotamiento y estría con agar sales minerales – 50 ppm Cr^{6+} . Después de 24–96 horas de incubación a 30°C , se seleccionaron las colonias de microorganismos desarrolladas y para eliminar los contaminantes (Guerrero, 2006), se cultivaron por dos veces consecutivas en el mismo agar, obteniéndose los cultivos puros de microorganismos tolerantes al Cr^{6+} que fueron caracterizados según su morfología macroscópica y microscópica (Barnett & Hunter, 1998).

c) Adaptación de microorganismos a 200 ppm Cr^{6+}

Para la adaptación a 200 ppm de Cr^{6+} (Chambergó & Herrera, 2009), los microorganismos aislados fueron sembrados en tubos de dilución 15 x 150 mm, conteniendo 5 mL de caldo sales minerales, suplementado con 50 ppm de Cr^{6+} . Después de incubar a 30°C durante 3 días, se tomaron alícuotas de los tubos con crecimiento microbiano, denotado por turbidez y el proceso de adaptación se repitió en caldo sales minerales suplementado con 100, 150 y 200 ppm Cr^{6+} . Los cultivos microbianos se centrifugaron a 3000 rpm, durante 10 minutos. El sedimento o biomasa obtenida se lavó con agua destilada dos veces y se deshidrató a 40°C , hasta alcanzar peso constante, el cual se determinó (mgL^{-1}) en una balanza de precisión (Figura 19).



Figura 17. Biorreactores tipo tanque con aireación en caldo sales minerales.



Figura 18. Raspado del material adherido a la lámina portaobjetos.

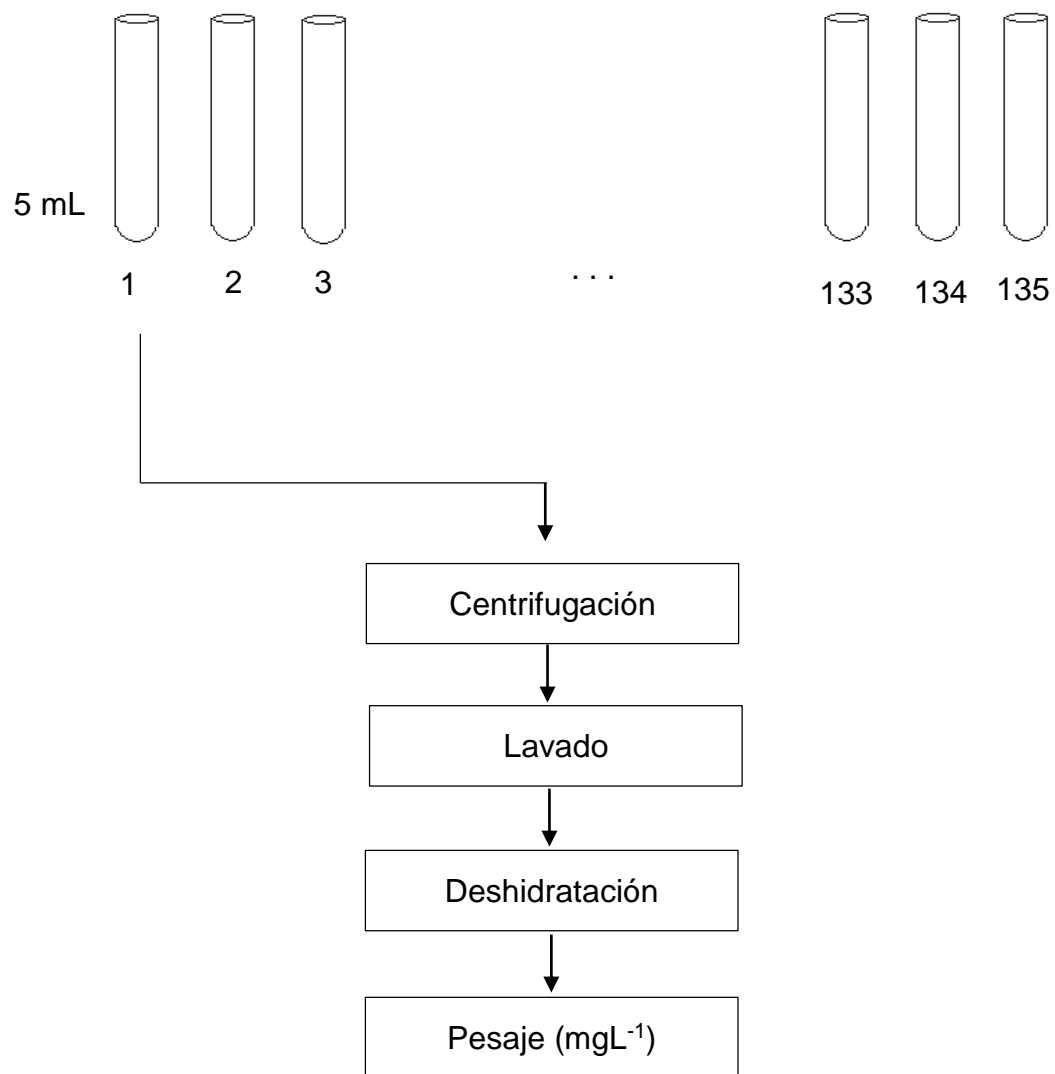


Figura 19. Flujograma para la cuantificación de la biomasa microbiana.

d) Identificación y selección de microorganismos adaptados al Cr⁶⁺

Los microorganismos adaptados a 200 ppm Cr⁶⁺ se identificaron, determinando las características macroscópicas de las colonias desarrolladas en agar sales minerales - Cr⁶⁺ y agar papa dextrosa, a 30°C, por 7 días. Con la técnica de “impresión con cinta transparente” (Labarca *et al.*, 2006), sobre cada colonia de hongo se depositó y se presionó suavemente un fragmento de cinta adhesiva de 6 cm de longitud. Esta cinta se llevó a una lámina portaobjetos conteniendo una gota de azul de lactofenol, se presionó suavemente y se observó con objetivo de 40X, identificándose las características microscópicas del micelio vegetativo y las estructuras reproductivas según la Clave de Barnett & Hunter (1998). Los tres microorganismos que alcanzaron la mayor biomasa en el menor tiempo posible se seleccionaron para siguiente fase de la investigación.

3.2.4 Segunda fase

En la segunda fase de la investigación se determinó la eficiencia de remoción de Cr⁶⁺ por biomasa viva y muerta de los tres microorganismos seleccionados por su mayor tolerancia al ion metálico.

a) Tratamientos

El trabajo de investigación experimental se ejecutó bajo un diseño completamente aleatorio con arreglo factorial 2 x 3 x 5. Los factores fueron tres: el A correspondiente a la biomasa con dos niveles: viva y muerta, el factor B fue el género de los microorganismos tolerantes al ion metálico (M1, M2 y M3) y el factor C el tiempo (24, 48, 72,96 y 120 horas). Los tratamientos fueron 30 con tres repeticiones cada uno, totalizando 90 unidades experimentales. Se incluyeron tres biorreactores con sales minerales – 200 ppm Cr⁶⁺ como testigos.

b) Cinética de la remoción de Cr⁶⁺

Los microorganismos seleccionados fueron cultivados (5%) por triplicado en biorreactores tipo tanque con sistema discontinuo y flujo de aire descendente (1 vvm), conteniendo 94 mL de caldo sales minerales 200 ppm Cr⁶⁺ durante 120 horas. Al inicio del experimento (0 horas) y cada 24 horas hasta por 120 horas se tomaron muestras de 13 mL del caldo cultivado para cuantificar (Rodier & Rodi, 2005) la concentración de Cr⁶⁺ mediante el método colorimétrico de la 1-5 difenilcarbazona (Figuras 20, 21, 22, anexos 4, 5).



Figura 20. Muestras de caldo sales minerales con biomasa muerta y viva de hongos filamentosos.



Figura 21. Filtrado de caldo sales minerales para la cuantificación de Cr^{6+} .



Figura 22. Coloración rojo-violeta observada en la cuantificación de Cr^{6+} .

Para la obtención de biomasa muerta los microorganismos previamente cultivados fueron inactivados en autoclave a 121 °C, por 15 minutos.

c) Eficiencia de la remoción de Cr⁶⁺

La eficiencia de la remoción de Cr⁶⁺ por microorganismos tolerantes al Cr⁶⁺ se calculó mediante la fórmula utilizada por Burgos & Diez (2015):

$$\text{Eficiencia (\%)} = \frac{C_i - C_f}{C_i} \times 100$$

Donde:

E = Eficiencia de la remoción Cr⁶⁺

C_i = Concentración inicial Cr⁶⁺

C_f = Concentración final Cr⁶⁺

3.2.5 Análisis estadístico de los datos

Los datos obtenidos fueron ordenados en tablas y figuras, que permitieron determinar la eficiencia en la remoción del cromo por los microorganismos aislados de raíces de plantas tolerantes al ion metálico. Los valores de la eficiencia de remoción Cr⁶⁺ se sometieron al análisis de varianza para determinar las diferencias entre tratamientos y la prueba múltiple de Tukey para encontrar la significancia ($\alpha=0,05$), utilizando los programas Microsoft Office Word 2013 y Microsoft Office Excel 2013.

IV. RESULTADOS

4.1 Plantas tolerantes al Cr^{6+} desarrollados en humedales de flujo subsuperficial

Las plantas de achira, grama y petunia desarrolladas en condiciones de humedales artificiales de flujo subsuperficial (HAFSS), se consideraron tolerantes a 50 ppm Cr^{6+} , por demostrar aspecto físico normal y supervivencia durante el periodo de 6 meses de duración del experimento (Figuras 23, 24, 25).

4.2 Microorganismos aislados de raíces de plantas tolerantes al Cr^{6+}

En las raíces de plantas tolerantes al Cr^{6+} se obtuvieron 135 aislados (Figura 26) de microorganismos entre los que 95% (128) correspondió a hongos filamentosos y 5% (7) a hongos levaduriformes (Figura 27). El 35% de microorganismos se aislaron de raíces de grama, el 33% de petunia y el 32% de achira (Figuras 28, 29). No se aislaron bacterias en las raíces de plantas tolerantes al Cr^{6+} .

4.3 Microorganismos adaptados a 200 ppm Cr^{6+}

Los aislados de hongos filamentosos y levaduriformes en su totalidad desarrollaron a 50 ppm Cr^{6+} , observándose película superficial (Figura 30), sedimento (Figura 31), turbidez (Figura 32), y aclaramiento del color inicial amarillo acentuado (Figura 33); no obstante, el porcentaje de microorganismos disminuyó conforme aumentó la concentración de Cr^{6+} (Figura 34, anexo 6).

El 69,60% (94) de los microorganismos se adaptaron a 100 ppm Cr^{6+} , correspondiendo en su totalidad a hongos filamentosos (Figura 35). El 50,40% (68) se adaptaron a 150 ppm Cr^{6+} (Figura 36) y el 42,20% (57) a 200 ppm Cr^{6+} (Figura 37). Los hongos filamentosos que desarrollaron a 200 ppm Cr^{6+} se consideraron tolerantes al ion metálico y su biomasa (Figura 38) osciló entre 20 y 140 mgL^{-1} (Tabla 1).



Figura 23. Plantas de *Canna indica* tolerantes al Cr^{6+} , desarrolladas en humedales de flujo subsuperficial.



Figura 24. Plantas de *Cynodon dactylon* L. tolerantes al Cr^{6+} , desarrolladas en humedales de flujo subsuperficial.



Figura 25. Plantas de *Ruellia brittoniana* tolerantes al Cr^{6+} , desarrolladas en humedales de flujo subsuperficial.



Figura 26. Cultivos puros de microorganismos aislados de raíces de plantas tolerantes al Cr^{6+} .

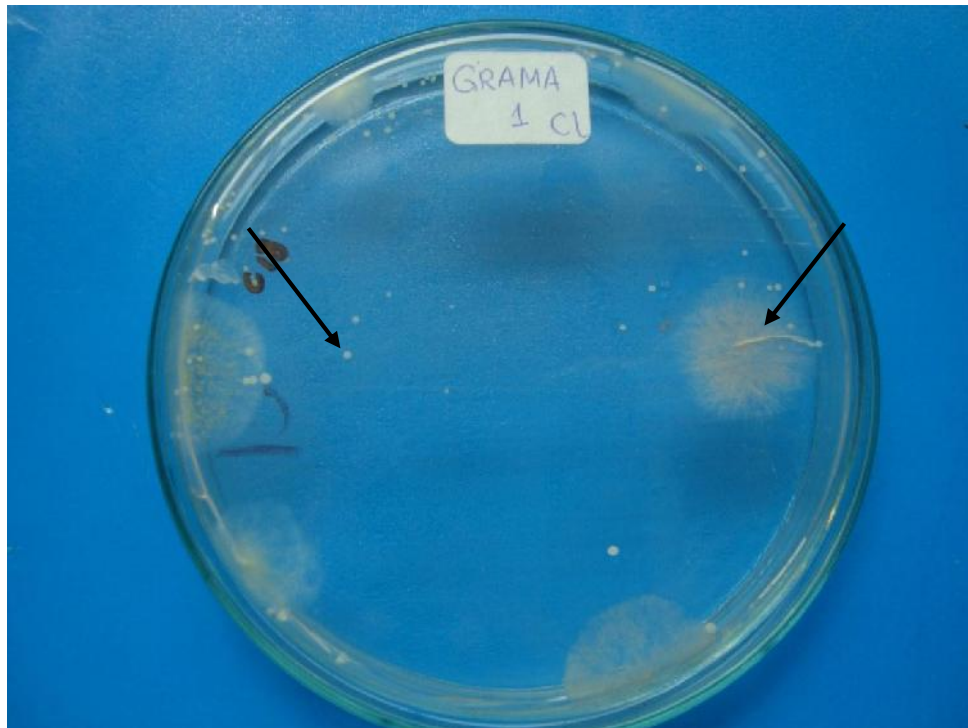


Figura 27. Colonias de hongos filamentosos y levaduriformes desarrollados en agar sales minerales Cr^{6+} .

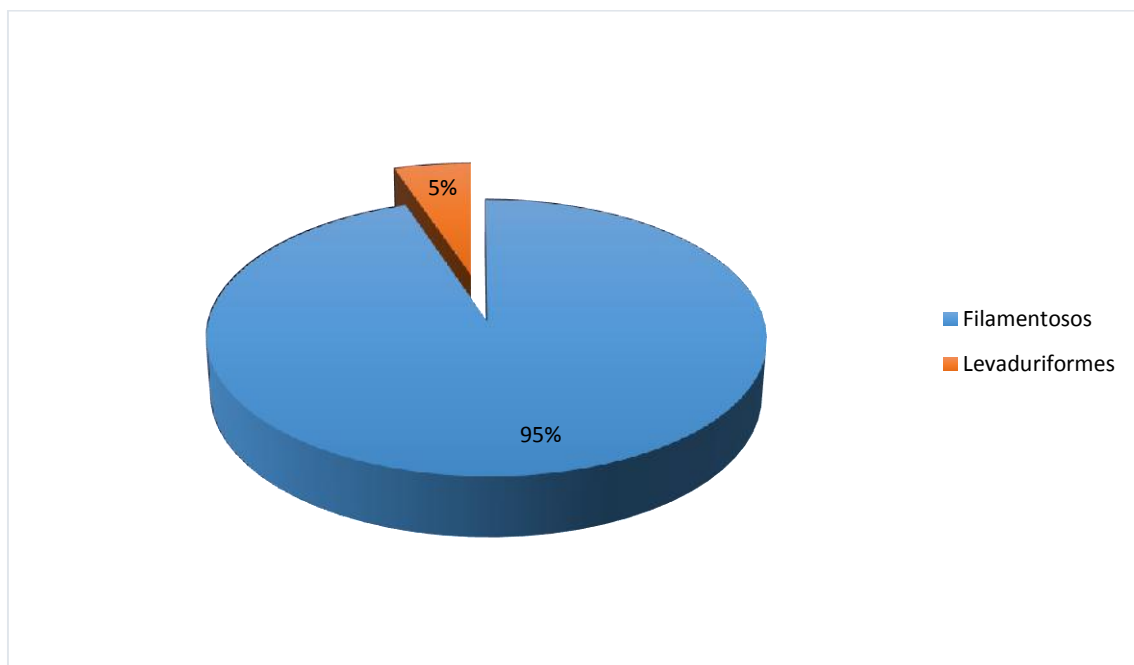


Figura 28. Frecuencia de hongos filamentosos y levaduriformes aislados de raíces de plantas tolerantes al Cr^{6+} .

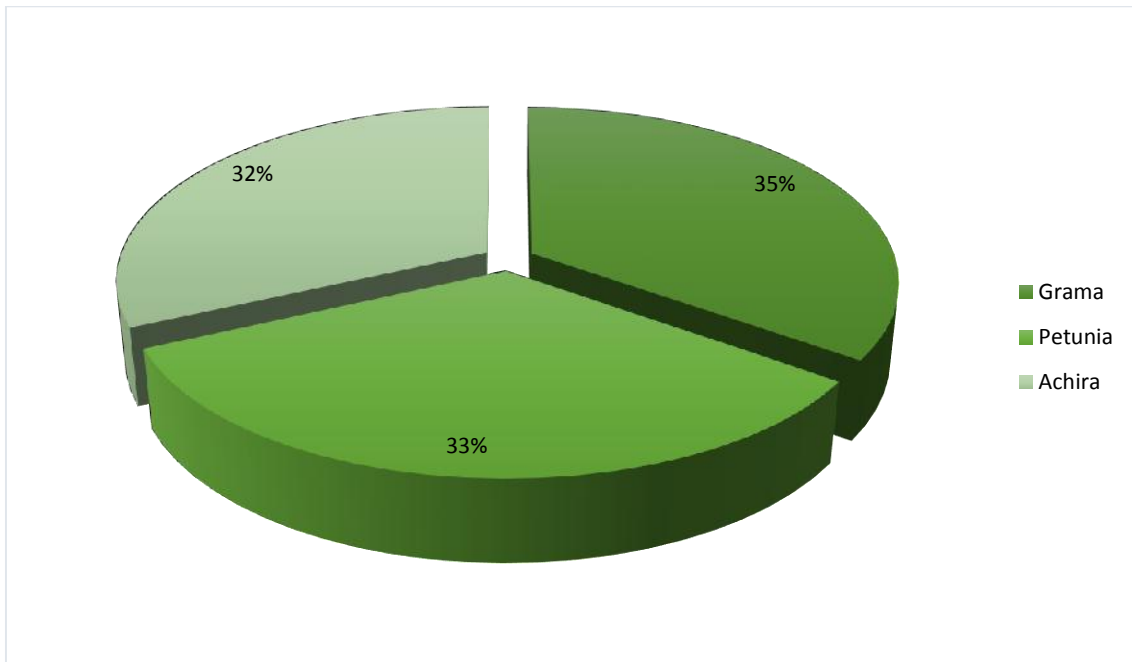


Figura 29. Frecuencia de hongos aislados en raíces de plantas tolerantes al Cr^{6+} .

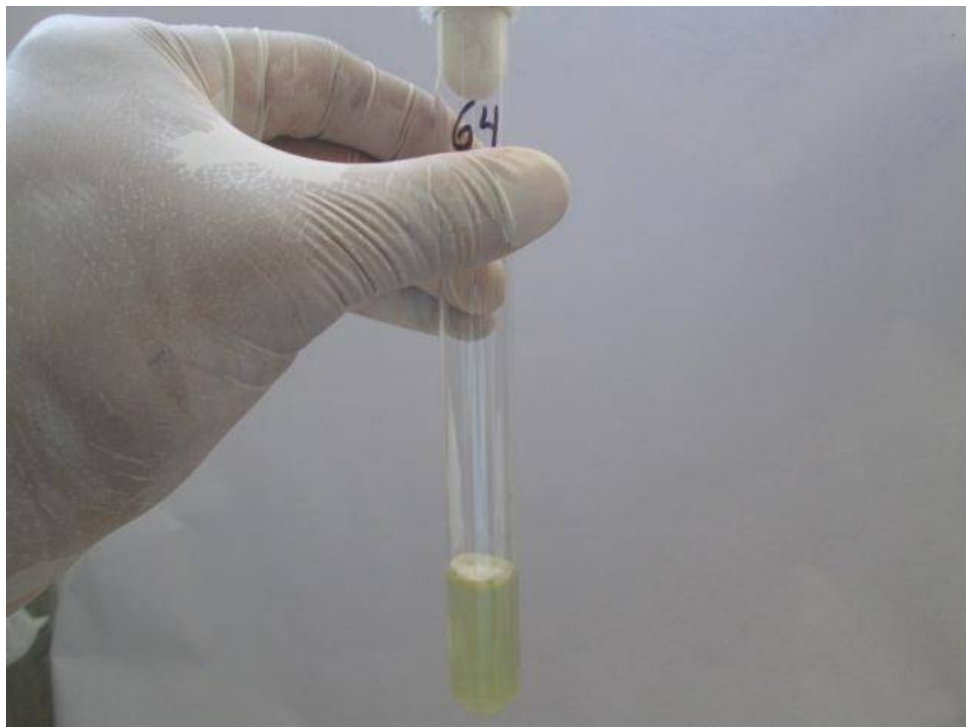


Figura 30. Película superficial de microorganismos desarrollados en caldo sales minerales-50ppm Cr^{6+} .

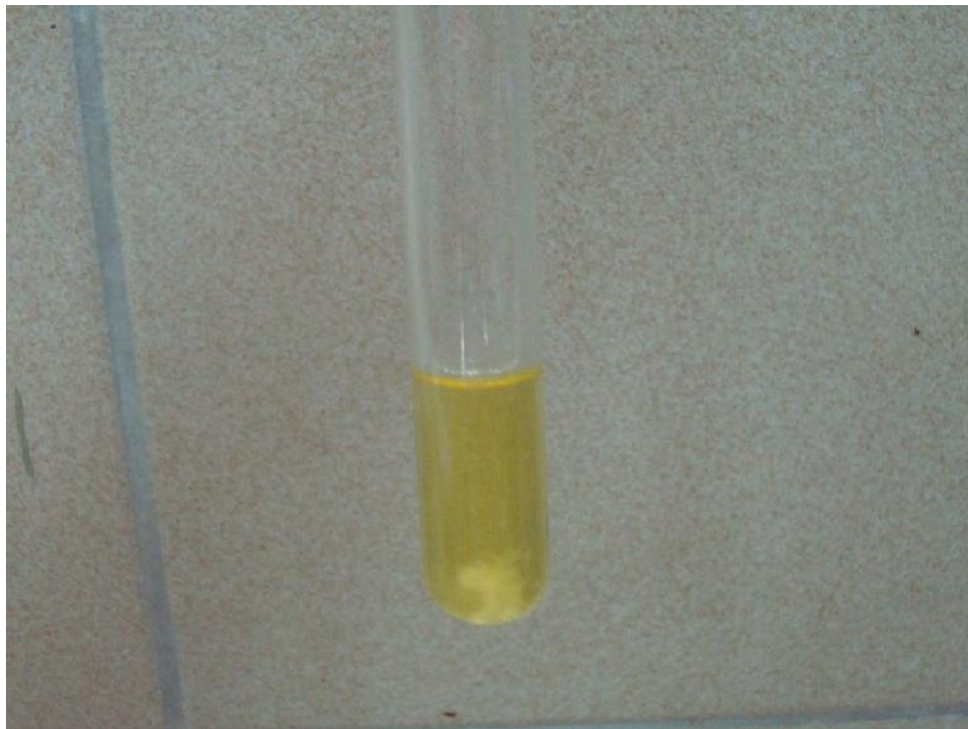


Figura 31. Sedimento de microorganismos desarrollados en caldo sales minerales-50ppm Cr^{6+} .

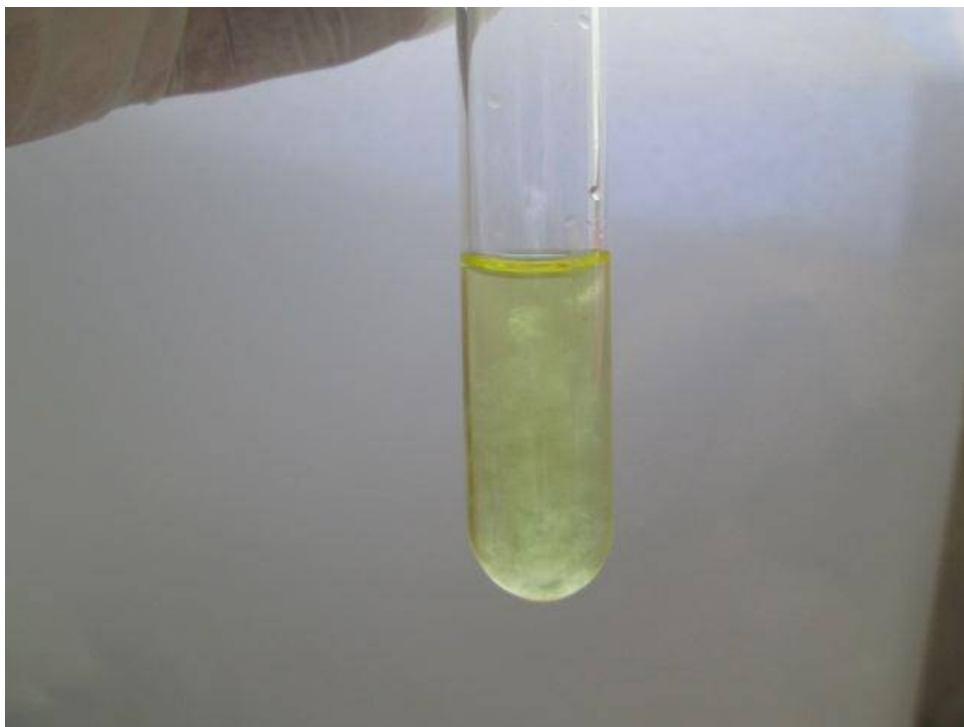


Figura 32. Turbidez de microorganismos desarrollados en caldo sales minerales-50ppm Cr^{6+} .

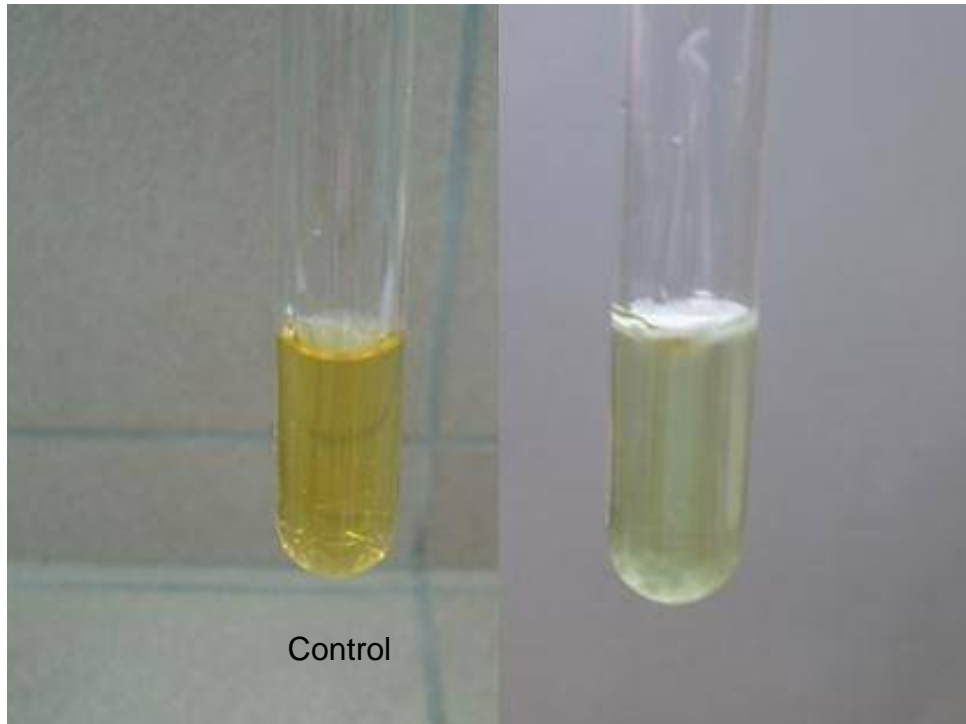


Figura 33. Aclaramiento del color inicial del caldo sales minerales-50 ppm Cr^{6+} cultivado con microorganismos.

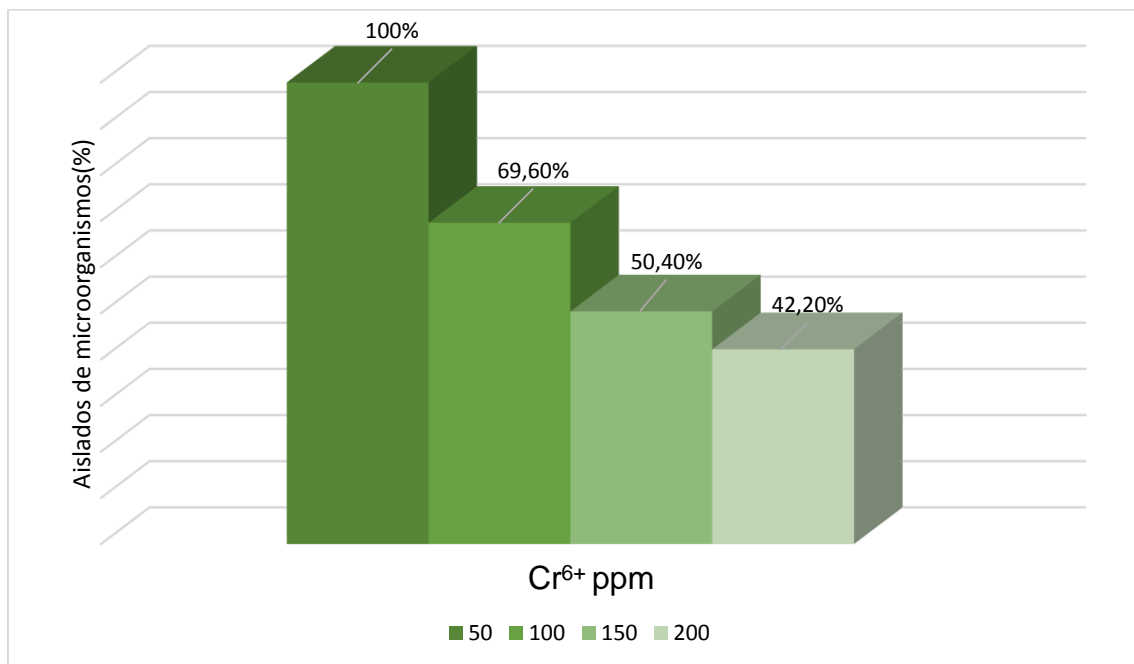


Figura 34. Frecuencia de aislados de microorganismos con desarrollo en concentraciones crecientes de Cr^{6+} .

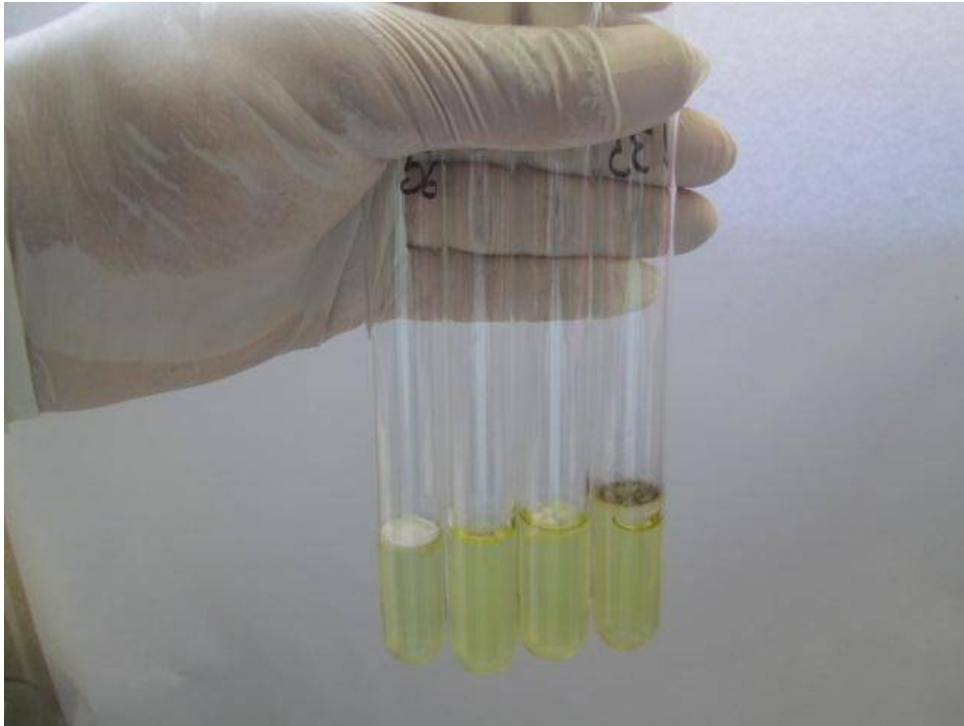


Figura 35. Hongos filamentosos desarrollados en caldo sales minerales-100 ppm Cr^{6+} .



Figura 36. Hongos filamentosos desarrollados en caldo sales minerales-150 ppm Cr^{6+} .



Figura 37. Hongos filamentosos desarrollados en caldo sales minerales-200 ppm Cr^{6+} .

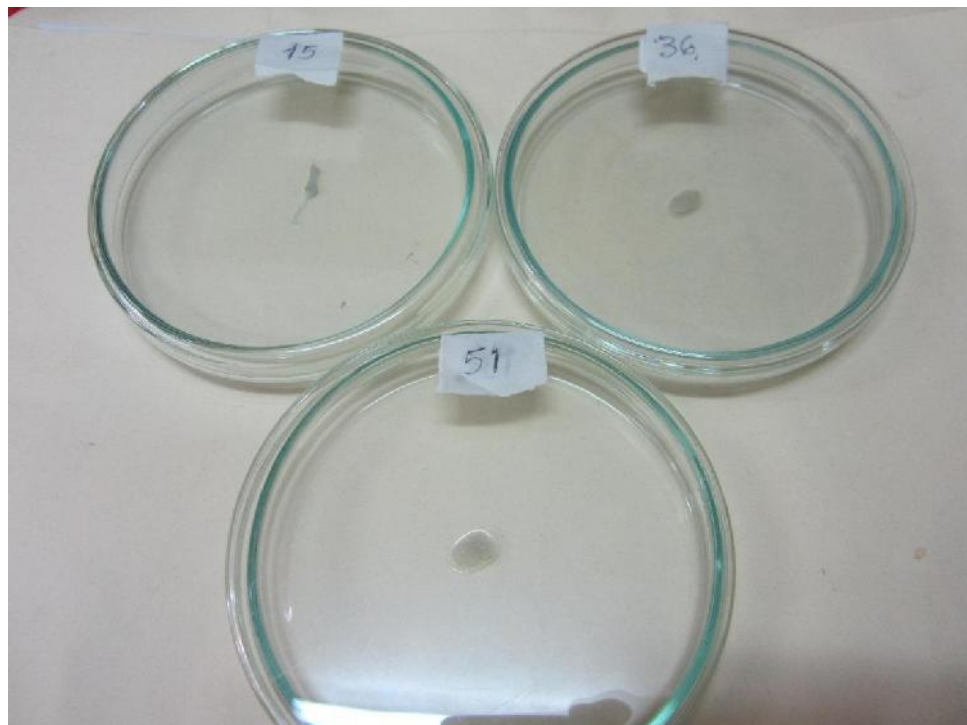


Figura 38. Biomasa de hongos filamentosos desarrollados en caldo sales minerales-200 ppm Cr^{6+} .

Tabla 1. Biomasa (mgL^{-1}) de hongos filamentosos cultivados en caldo sales minerales-200 ppm Cr^{6+} durante 5 días

Hongo filamentosos	Biomasa	Hongo filamentosos	Biomasa
código	(mgL^{-1})	código	(mgL^{-1})
36A-D	140	78G-E	72
15A-E	137	23A-E	71
51P-D	135	95P-E	70
86G-D	131	21A-D	68
57G-E	127	117A-D	67
116G-E	125	135A-E	66
14A-D	121	22A-D	65
103G-E	119	6P-D	64
4A-E	115	123P-D	62
102A-E	113	1A-D	61
125G-D	106	129G-E	59
97A-D	104	92P-D	58
3A-D	102	84A-E	55
71A-D	100	82G-E	52
62G-E	99	126G-D	50
54P-E	97	72A-E	47
70G-E	96	114P-E	44
50G-E	95	110P-D	43
45G-E	91	41P-D	41
69G-D	88	33P-D	38
53P-D	83	105G-E	35
83G-D	82	30P-E	33
48A-D	80	28G-D	28
59A-D	79	100A-E	27
32P-E	78	132A-D	26
124P-E	77	12G-D	25
49A-D	76	111P-D	21
42P-D	75	7P-E	20
64A-E	73		

4.4 Microorganismos tolerantes a 200 ppm Cr⁶⁺ identificados y seleccionados

En los microorganismos tolerantes a 200 ppm Cr⁶⁺ se identificaron siete géneros de hongos filamentosos (Figuras 39 a 45, tabla 2), predominando *Aspergillus* (29,63%), seguido de *Fusarium* (23,70%), *Trichoderma* (17,78%), *Penicillium* (11,85%), *Scopulariopsis* (7,41%), *Paecilomyces* (5,93%) y *Scedosporium* (3,70%). Los hongos *Paecilomyces* sp.36A-D, *Penicillium* sp.15A-E y *Fusarium* sp.51P-D se seleccionaron porque alcanzaron la mayor biomasa, correspondiente a 140, 137 y 135 mg L⁻¹, respectivamente.

4.5 Eficiencia de la remoción de Cr⁶⁺ por hongos seleccionados

Con los valores de absorbancia obtenidos con diferentes concentraciones de Cr⁶⁺, se obtuvo la ecuación $y = 0,764x + 0,0066$ (Tabla 3, figura 46) y debido a que R² fue mayor de 0,9 se aceptó como patrón de referencia para el cálculo de la concentración de Cr⁶⁺.

La absorbancia del caldo sales minerales - Cr⁶⁺ con la biomasa viva de tres hongos filamentosos tolerantes de ion metálico (Tabla 4, anexo 7) osciló entre 1,535 a las 0 horas y 0,186 (*Paecilomyces* sp.36A-D); 0,207 (*Penicillium* sp.15A-E) y 0,223 (*Fusarium* sp.51P-D) a las 120 horas, valores correspondientes a una concentración inicial de Cr⁶⁺ de 200,05 ppm (Tabla 5, anexo 8) y concentraciones finales de 23,53 ppm (*Paecilomyces* sp.36A-D); 26,19 ppm (*Penicillium* sp.15A-E) y 28,28 ppm (*Fusarium* sp.51P-D).

La absorbancia del caldo sales minerales - Cr⁶⁺ con la biomasa muerta de tres hongos filamentosos tolerantes de ion metálico (Tabla 6, anexo 7) osciló entre 1,535 a las 0 horas y 0,420 (*Paecilomyces* sp.36A-D); 0,445 (*Penicillium* sp.15A-E) y 0,454 (*Fusarium* sp.51P-D) a las 120 horas, valores correspondientes a una concentración inicial de Cr⁶⁺ de 200,05 ppm (Tabla 7, anexo 8) y concentraciones finales de 54,07 ppm (*Paecilomyces* sp.36A-D); 57,43 ppm (*Penicillium* sp.15A-E) y 58,60 ppm (*Fusarium* sp.51P-D).

La eficiencia de la remoción de Cr⁶⁺ fue de 21,20 - 88,24 % (24 – 120 horas) con la biomasa viva de tres hongos filamentosos (Tabla 8) y de 11,17 - 72,97% (24 – 120 horas) con la biomasa muerta (Tabla 9).

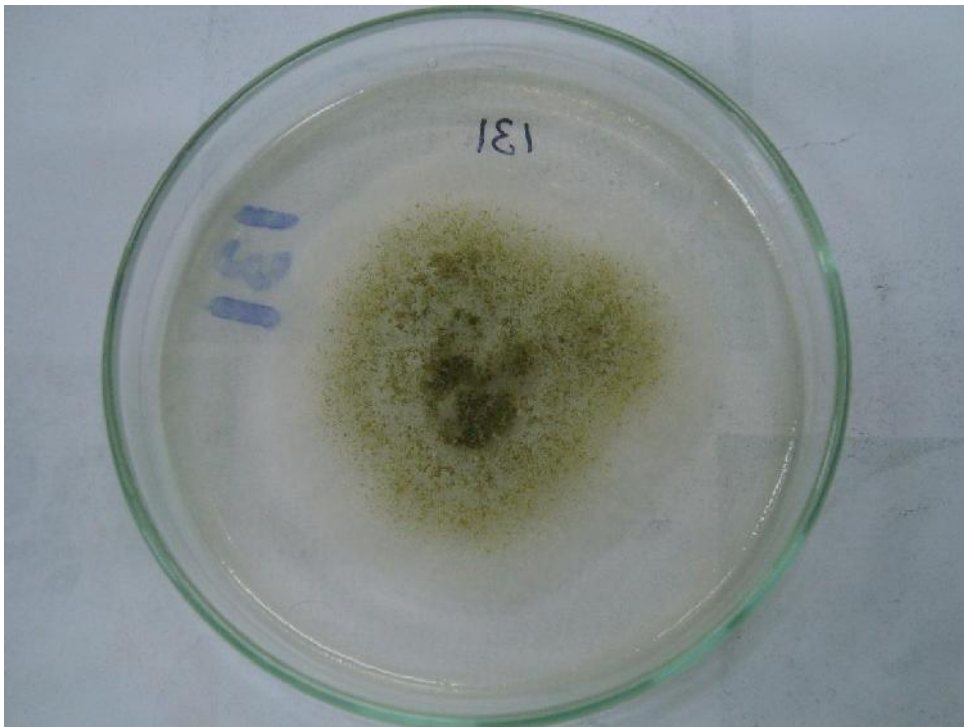


Figura 39. *Aspergillus* sp. desarrollado en agar sales minerales- Cr^{6+} .



Figura 40. *Fusarium* sp. desarrollado en agar sales minerales- Cr^{6+} .



Figura 41. *Trichoderma* sp. desarrollado en agar sales minerales- Cr^{6+} .

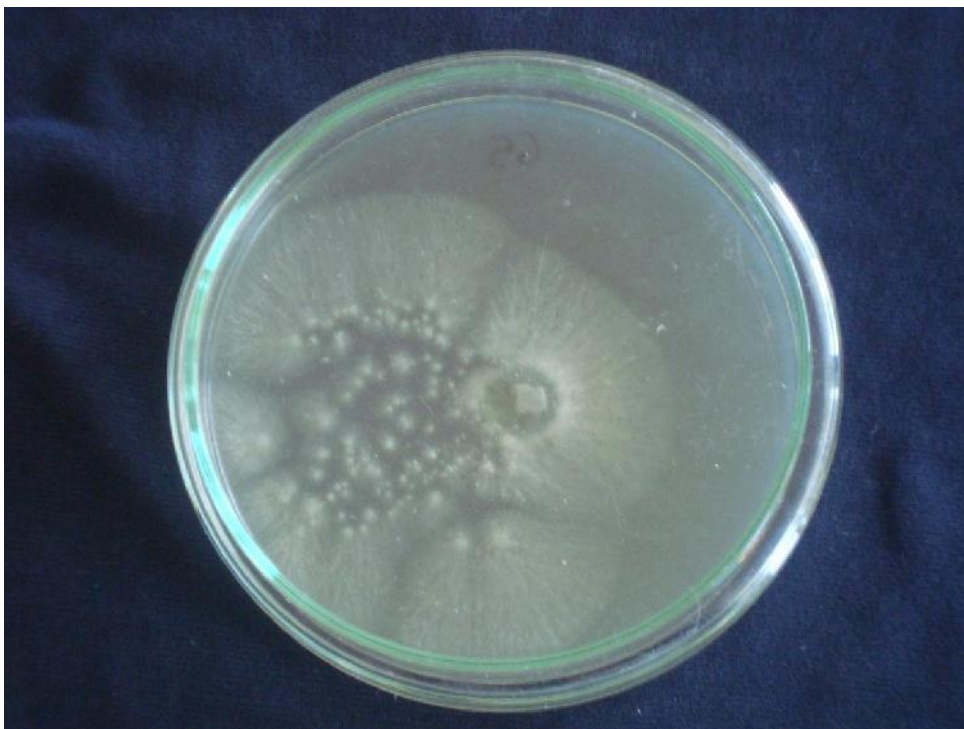


Figura 42. *Penicillium* sp. desarrollado en agar sales minerales- Cr^{6+} .

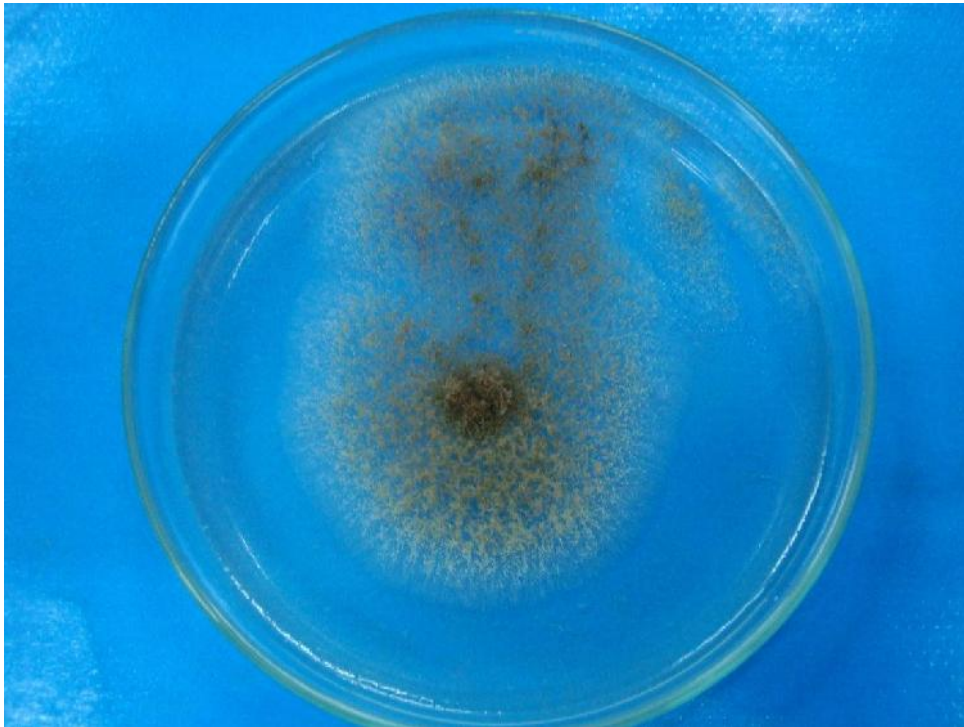


Figura 43. *Scopulariopsis* sp. desarrollado en agar sales minerales- Cr^{6+} .



Figura 44. *Paecilomyces* sp. desarrollado en agar sales minerales- Cr^{6+} .



Figura 45. *Scedosporium* sp. desarrollado en agar sales minerales-
 Cr^{6+} .

Tabla 2. Frecuencia de géneros identificados en hongos filamentosos tolerantes
a 200 ppm Cr^{6+}

Género	Frecuencia (%)
<i>Aspergillus</i>	29,63
<i>Fusarium</i>	23,70
<i>Trichoderma</i>	17,78
<i>Penicillium</i>	11,85
<i>Scopulariopsis</i>	7,41
<i>Paecilomyces</i>	5,93
<i>Scedosporium</i>	3,70

Tabla 3. Valores de absorbancia (540 nm) de diferentes concentraciones de Cr^{6+}

Cr^{6+} (mgL^{-1})	Absorbancia (540 nm)
0	0,00620
0,04	0,03760
0,06	0,05300
0,08	0,06640
0,10	0,08440
0,20	0,15800
0,30	0,23640
0,40	0,31000

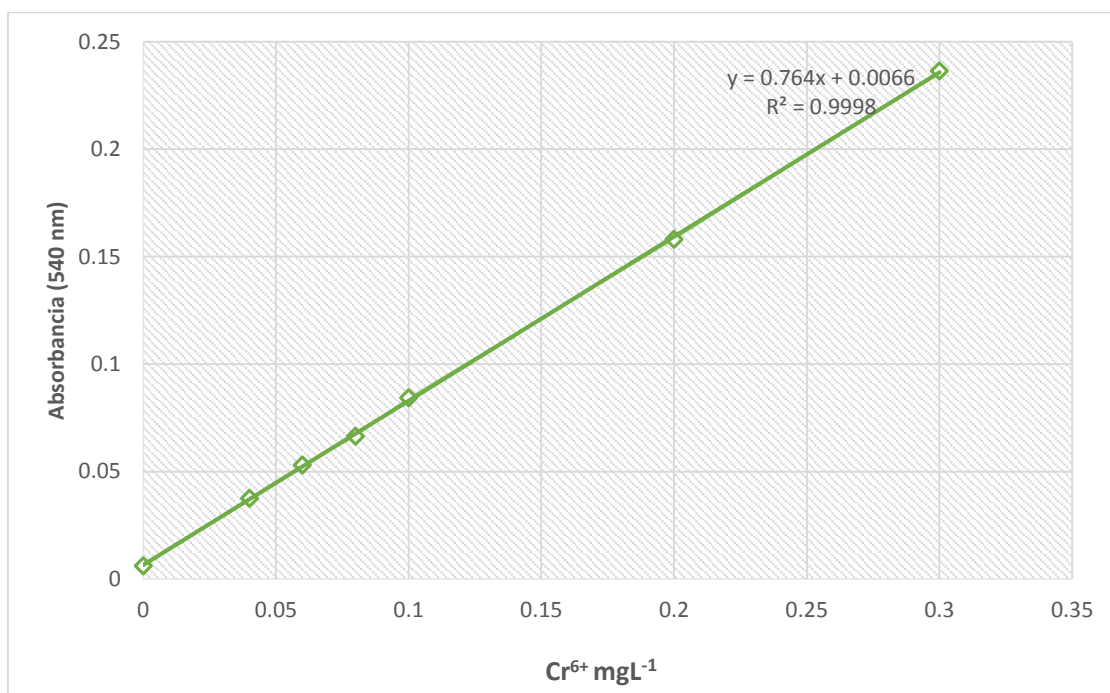


Figura 46. Curva patrón para determinar la concentración de Cr^{6+} (mgL^{-1}) en caldo sales minerales cultivado con hongos filamentosos.

Tabla 4. Promedios de absorbancia (540 nm) de caldo sales minerales-Cr⁶⁺ con biomasa viva de hongos filamentosos tolerantes al ion metálico

Hongo	Absorbancia*/horas					
	0	24	48	72	96	120
<i>Paecilomyces</i> sp.36A-D	1,535	1,195	0,989	0,389	0,258	0,186
<i>Penicillium</i> sp.15A-E	1,535	1,208	1,012	0,403	0,295	0,207
<i>Fusarium</i> sp.51P-D	1,535	1,211	1,015	0,423	0,312	0,223

*Promedio tres repeticiones, dilución 10⁻²

Tabla 5. Promedios de la concentración (ppm) de Cr⁶⁺ en caldo sales minerales con biomasa viva de hongos filamentosos tolerantes al ion metálico

Hongo	Cr ⁶⁺ *(ppm/horas)					
	0	24	48	72	96	120
<i>Paecilomyces</i> sp.36A-D	200,05	155,55	128,59	50,10	32,86	23,53
<i>Penicillium</i> sp.15A-E	200,05	157,25	131,60	51,93	37,79	26,19
<i>Fusarium</i> sp.51P-D	200,05	157,64	131,99	54,46	39,97	28,28

*Promedio tres repeticiones

Tabla 6. Promedios de absorbancia (540 nm) de caldo sales minerales-Cr⁶⁺ con biomasa muerta de hongos filamentosos tolerantes al ion metálico

Hongo	Absorbancia*/horas					
	0	24	48	72	96	120
<i>Paecilomyces</i> sp.36A-D	1,535	1,342	1,130	0,842	0,566	0,420
<i>Penicillium</i> sp.15A-E	1,535	1,349	1,127	0,857	0,586	0,445
<i>Fusarium</i> sp.51P-D	1,535	1,364	1,124	0,867	0,604	0,454

*Promedio tres repeticiones, dilución 10⁻²

Tabla 7. Promedios de la concentración (ppm) de Cr⁶⁺ en caldo sales minerales con biomasa muerta de hongos filamentosos tolerantes al ion metálico

Hongo	Cr ⁶⁺ *(ppm/horas)					
	0	24	48	72	96	120
<i>Paecilomyces</i> sp.36A-D	200,05	174,84	147,00	109,34	73,22	54,07
<i>Penicillium</i> sp.15A-E	200,05	175,71	146,65	111,27	75,84	57,43
<i>Fusarium</i> sp.51P-D	200,05	177,71	146,40	112,66	78,24	58,60

*Promedio tres repeticiones

Tabla 8. Promedios de eficiencia (%) de la remoción de Cr⁶⁺ por biomasa viva de hongos filamentosos tolerantes al ion metálico

Hongo	Eficiencia *(%)				
	24	48	72	96	120
<i>Paecilomyces</i> sp.36A-D	22,24	35,72	74,96	83,57	88,24
<i>Penicillium</i> sp.15A-E	21,39	34,22	74,04	81,10	86,91
<i>Fusarium</i> sp.51P-D	21,20	34,02	72,78	80,02	85,86

*Promedio tres repeticiones

Tabla 9. Promedios de eficiencia (%) de la remoción de Cr⁶⁺ por biomasa muerta de hongos filamentosos tolerantes al ion metálico

Hongo	Eficiencia* (%)				
	24	48	72	96	120
<i>Paecilomyces</i> sp.36A-D	12,60	26,52	45,34	63,40	72,97
<i>Penicillium</i> sp.15A-E	12,17	26,69	44,38	62,09	71,30
<i>Fusarium</i> sp.51P-D	11,17	26,87	43,68	60,89	70,70

*Promedio tres repeticiones

La eficiencia de remoción de Cr^{6+} por *Paecilomyces* sp.36A-D (Figura 47, anexos 9,10) fue de 22,24 - 88,24% con la biomasa viva y 12,60 - 72,97% con la biomasa muerta; con *Penicillium* sp.15A-E (Figura 48) fue de 21,39 - 86,91% con la biomasa viva y 12,17 - 71,30% con la biomasa muerta y con *Fusarium* sp.51P-D (Figura 49) fue de 21,20 - 85,86% con la biomasa viva y 11,17 - 70,70% con la biomasa muerta a las 24 - 120 horas.

La prueba F del análisis de varianza del factorial 2 x 3 x 5 (Tabla 10) demostró alta significancia entre los tratamientos, tipo de biomasa (Factor A), género de hongo (Factor B) y tiempo (Factor C), así como en la interacción B x C y significancia con A x B y A x C, evidenciando que existió efecto de las variables de estudio en la eficiencia de remoción de Cr^{6+} .

La prueba T de student para el factor A: Tipo de biomasa demostró que el valor mayor de eficiencia en la remoción de Cr^{6+} se alcanzó con la biomasa viva de los hongos filamentosos (Tabla 11). La prueba de Tukey demostró con diferencias significativas, que el mayor valor en la eficiencia correspondió para el factor B a *Paecilomyces* sp.36A-D (Tabla 12) y para el factor C a las 120 horas (Tabla 13). En cuanto a la interacción A x B x C la mayor eficiencia (88,24%) en la remoción de Cr^{6+} se alcanzó con la biomasa viva de *Paecilomyces* sp.36A-D a las 120 horas, diferenciándose significativamente de los demás tratamientos (Tabla 14).

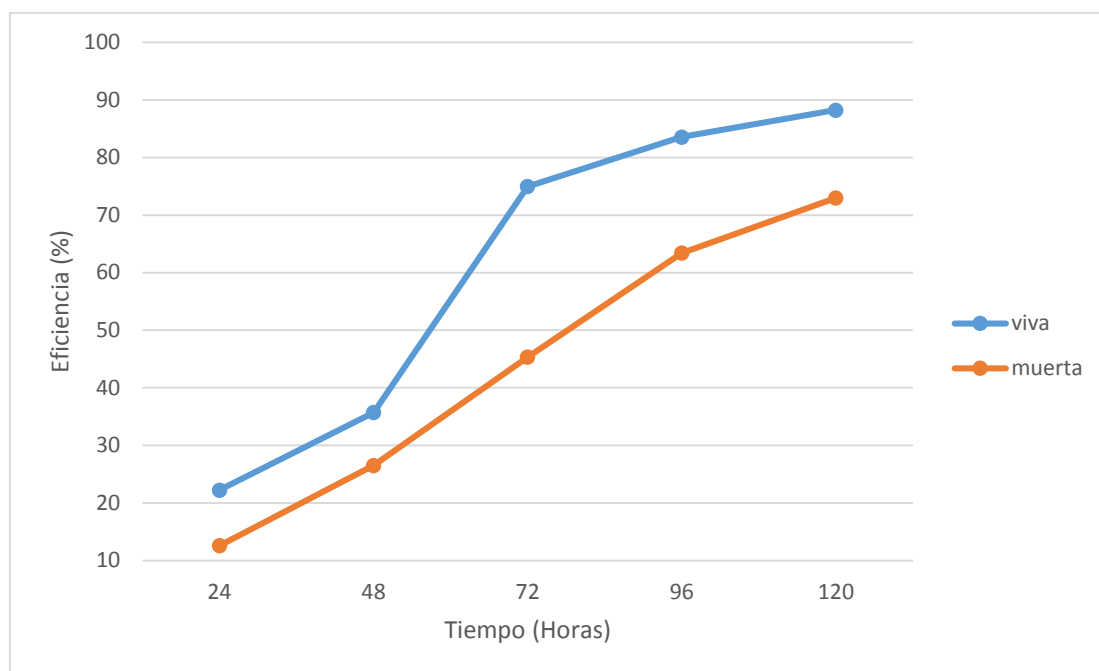


Figura 47. Eficiencia de la remoción de Cr^{6+} por biomasa viva y muerta de *Paecilomyces* sp.36A-D en caldo sales minerales durante 120 horas.

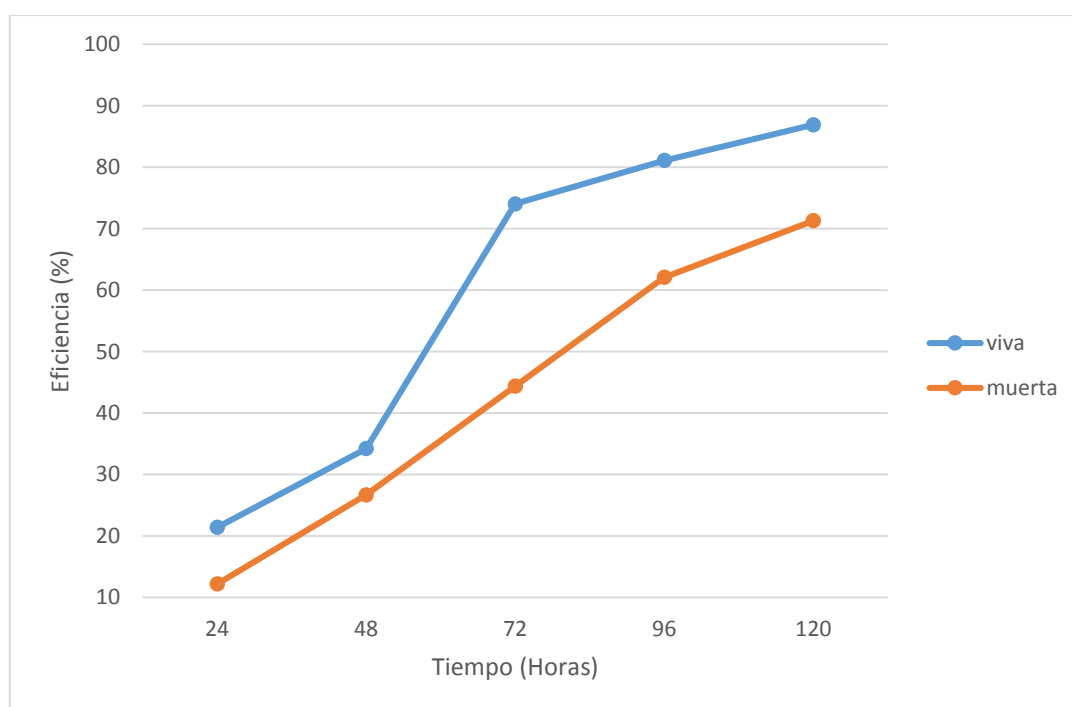


Figura 48. Eficiencia de la remoción de Cr^{6+} por biomasa viva y muerta de *Penicillium* sp.15A-E en caldo sales minerales durante 120 horas.

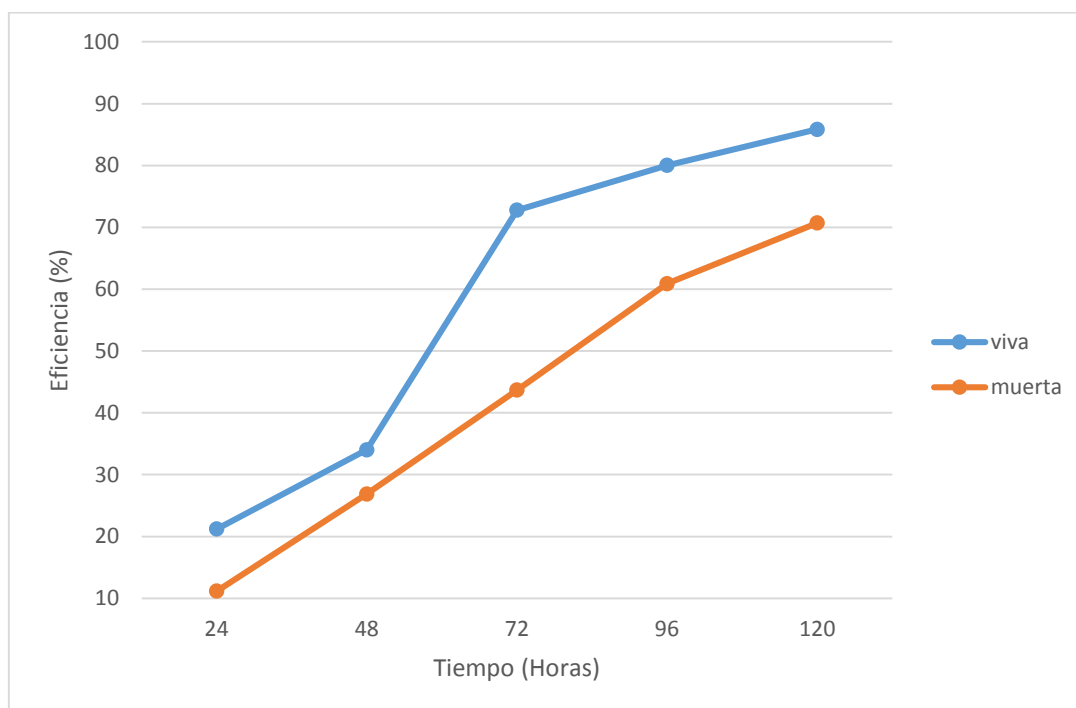


Figura 49. Eficiencia de la remoción de Cr^{6+} por biomasa viva y muerta de *Fusarium* sp.51P-D en caldo sales minerales durante 120 horas.

Tabla 10. Análisis de varianza de los promedios de eficiencia (%) en la remoción de Cr^{6+} por la biomasa viva y muerta de tres géneros de hongos

Ho: $\mu A_1 = \mu A_2$ (Factor A = Biomasa)

Ho: $\mu B_1 = \mu B_2 = \mu B_3$ (Factor B = Género de hongo)

Ho: $\mu C_1 = \mu C_2 = \mu C_3 = \mu C_4 = \mu C_5$ (Factor C = Tiempo)

Ho: No hay efecto de la interacción

Fuente de variación	SC	GL	CM	F	p	Sig.
Biomasa (A)	6023,261	1	6023,261	15292,468	0,000	**
Género (B)	53,476	2	26,738	67,886	0,000	**
Tiempo (C)	51891,853	4	12972,963	32937,078	0,000	**
A x B	2,127	2	1,064	2,701	0,075	*
B x C	11,248	8	1,406	3,570	0,002	**
A x C	1333,330	4	333,332	846,298	0,000	*
Error	23,632	60	,394			
Total	59342,652	89				

* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$

Tabla 11. Prueba de T de student para los promedios de la eficiencia (%) de remoción de Cr^{6+} por biomasa viva y muerta de hongos filamentosos

Biomasa	Eficiencia (%)	Significancia
Viva	59,455	a
Muerta	43,093	b

Tabla 12. Prueba múltiple de Tukey ($\alpha=0,05$) para los promedios de la eficiencia (%) de remoción de Cr^{6+} por tres géneros de hongos filamentosos

Género	Eficiencia (%)	Significancia
<i>Paecilomyces</i> sp.36A-D	52,2807	a
<i>Penicillium</i> sp.15A-E	51,1333	b
<i>Fusarium</i> sp.51P-D	50,4083	c

Tabla 13. Prueba múltiple de Tukey ($\alpha = 0,05$) para los promedios de la eficiencia (%) de remoción de Cr^{6+} por hongos filamentosos en diferentes tiempos

Tiempo (horas)	Eficiencia (%)	Significancia
120	79,0039	a
96	71,5733	b
72	58,8850	c
48	30,3844	d
24	16,5239	e

Tabla 14. Prueba múltiple de Tukey ($\alpha = 0,05$) para los promedios de la eficiencia (%) de remoción de Cr^{6+} por biomasa viva y muerta de tres géneros de hongos filamentosos en diferentes tiempos

Tratamientos			Eficiencia (%)	Significancia
Biomasa	Género	Tiempo		
Viva	<i>Paecilomyces</i> sp.36A-D	120 horas	88,24	a
Viva	<i>Penicillium</i> sp.15A-E	120 horas	86,91	b
Viva	<i>Fusarium</i> sp.51P-D	120 horas	85,86	b
Viva	<i>Paecilomyces</i> sp.36A-D	96 horas	83,57	bc
Viva	<i>Penicillium</i> sp.15A-E	96 horas	81,10	bc
Viva	<i>Fusarium</i> sp.51P-D	96 horas	80,02	bc
Viva	<i>Paecilomyces</i> sp.36A-D	72horas	74,96	c
Viva	<i>Penicillium</i> sp.15A-E	72horas	74,04	c
Muerta	<i>Paecilomyces</i> sp.36A-D	120 horas	72,97	c
Viva	<i>Fusarium</i> sp.51P-D	72 horas	72,78	c
Muerta	<i>Penicillium</i> sp.15A-E	120 horas	71,30	c
Muerta	<i>Fusarium</i> sp.51P-D	120 horas	70,70	c
Muerta	<i>Paecilomyces</i> sp.36A-D	96 horas	63,40	d
Muerta	<i>Penicillium</i> sp.15A-E	96 horas	62,09	d
Muerta	<i>Fusarium</i> sp.51P-D	96 horas	60,89	d
Muerta	<i>Paecilomyces</i> sp.36A-D	72 horas	45,34	e
Muerta	<i>Penicillium</i> sp.15A-E	72 horas	44,38	e
Muerta	<i>Fusarium</i> sp.51P-D	72 horas	43,68	e
Viva	<i>Paecilomyces</i> sp.36A-D	48 horas	35,72	e
Viva	<i>Penicillium</i> sp.15A-E	48 horas	34,22	e
Viva	<i>Fusarium</i> sp.51P-D	48 horas	34,02	e
Muerta	<i>Fusarium</i> sp.51P-D	48 horas	26,87	f
Muerta	<i>Penicillium</i> sp.15A-E	48 horas	26,69	f
Muerta	<i>Paecilomyces</i> sp.36A-D	48 horas	26,52	f
Viva	<i>Paecilomyces</i> sp.36A-D	24 horas	22,24	f
Viva	<i>Penicillium</i> sp.15A-E	24 horas	21,39	f
Viva	<i>Fusarium</i> sp.51P-D	24 horas	21,20	f
Muerta	<i>Paecilomyces</i> sp.36A-D	24 horas	12,60	g
Muerta	<i>Penicillium</i> sp.15A-E	24 horas	12,17	g
Muerta	<i>Fusarium</i> sp.51P-D	24 horas	11,17	g

V. DISCUSIÓN

En la investigación de la eficiencia de remoción de Cr^{6+} por microorganismos aislados de plantas tolerantes al ion metálico se utilizó una solución de dicromato de potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), coincidiendo con Diez (2008) y Guevara (2010). El Cr es un metal utilizado en diferentes actividades industriales (Guevara, 2010; Gutiérrez *et al.*, 2010; Mozo, 2012) y aunque puede existir en diferentes estados de oxidación, solo los estados +3 y +6 se encuentran estables en el ambiente (Adeniji, 2004; Téllez *et al.*, 2004). El Cr^{6+} en forma de oxianiones hidrosolubles presenta la mayor toxicidad del metal para todos los seres vivos (Otiniano *et al.*, 2007). El Cr^{3+} se encuentra como óxidos, hidróxidos y sulfatos, menos móviles que forman precipitados insolubles e inertes (Guevara, 2010; Gutiérrez *et al.*, 2010; Panigatti *et al.*, 2012).

La solución de dicromato de potasio se mantuvo a pH 4, coincidiendo con Burgos & Diez (2015). Dependiendo del pH y la concentración, las especies de Cr^{6+} se encuentran como ácido crómico, H_2CrO_4 (pH<1), ion hidrógeno cromato, HCrO_4^- (pH 1-6) y ion cromato, CrO_4^{2-} (pH>6). El ion dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$) es un dímero del HCrO_4^- , el cual se forma cuando la concentración de Cr^{6+} excede a 1 gL^{-1} (Hossain *et al.*, 2005, mencionados por Guevara, 2010).

El Cr^{6+} puede ser removido de las aguas utilizando plantas, en el proceso de fitorremediación (Quezada & Varela, 2009; Estrada, 2010; Cubillos, 2011), en el cual se requieren plantas tolerantes que pueden sobrevivir en los ambientes contaminados (González, 2005; Albarracín *et al.*, 2008). En este contexto, se seleccionaron plantas de achira, grama y petunia tolerantes a 50 ppm Cr^{6+} . La tolerancia de las tres especies fue demostrada por Burgos & Diez (2015) y la de achira por Núñez (2002) y Mallia & Auxilia (2009). La raíz constituye el tejido de entrada principal de los metales pesados en la planta. El Cr independientemente de su estado de oxidación en la solución se almacena en mayor proporción en la raíz, en un 90% del total y el 10% restante se distribuye en tallo y hojas (Torres *et al.*, 2010). El Cr tiene pobre traslocación desde las raíces hacia la parte aérea y es retenido en las vacuolas y paredes celulares radicales (Diez, 2008).

Las plantas tolerantes al Cr^{6+} se seleccionaron en humedales artificiales de flujo subsuperficial, HAFSS, coincidiendo con Durán *et al.* (2009) y Burgos & Diez (2015). El término humedal se usa para definir áreas que se caracterizan por tener un suelo saturado con agua y una comunidad viviente adaptada a la vida acuática o a un suelo saturado. Para el tratamiento de aguas residuales se han desarrollado dos tipos de humedales artificiales: de flujo superficial, HAFS y de flujo subsuperficial, HAFSS. En los HAFS la superficie del agua está expuesta a la atmósfera y el fondo está constituido por suelo relativamente impermeable y vegetación emergente. Los HAFSS consisten de un filtro biológico relleno de un medio poroso en el que las plantas macrófitas se siembran en la superficie del lecho filtrante y las aguas contaminadas atraviesan de forma horizontal o vertical el lodo, manteniéndose el nivel de lecho por debajo del medio granular (Arias *et al.*, 2010).

Las plantas disminuyen o eliminan los metales de los ambientes contaminados mediante mecanismos directos e indirectos. En los directos las plantas modifican el ambiente a través de la absorción y acumulación (Peña *et al.*, 2013). En los mecanismos indirectos los diversos microorganismos rizosféricos actúan sobre los contaminantes (González, 2005). La transformación o degradación del contaminante es facilitada por la actividad microbiana de la rizósfera y se denomina rizodegradación. Asimismo, las raíces al modificar las condiciones del suelo o del agua, aumentan la entrada del aire y regulan el contenido de humedad, proporcionando condiciones favorables para los microorganismos (Arias *et al.*, 2010; Peña *et al.*, 2013). En este contexto, para acelerar e incrementar la descontaminación de un ambiente los microorganismos rizosféricos pueden ser aislados y caracterizados, para luego ser reintroducidos (Cerna & Elías, 2015).

Los microorganismos de las raíces de las plantas tolerantes al Cr^{6+} se enriquecieron en caldo sales minerales – 50 ppm Cr^{6+} coincidiendo con Rodríguez *et al.* (2008), Soto *et al.* (2010) y López (2011). Las técnicas de enriquecimiento permiten incrementar los microorganismos investigados y disminuir la biota contaminante no deseada, que se encuentra en una muestra biológica (Madigan *et al.*, 2004; Guerrero, 2006). De esta manera, se aislaron hongos filamentosos y levaduras que desarrollaron en agar sales minerales - Cr^{6+} , coincidiendo con Guevara (2010), Soto *et al.* (2010) y López (2011). En la

presente investigación, no se aislaron bacterias; no obstante, existen reportes de bacterias tolerantes al Cr^{6+} , identificándose los géneros *Pseudomonas alcaligenes* (Moraga *et al.*, 2003), *Corynebacterium*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Aeromonas*, *Pantoca* (Soto *et al.*, 2010), *Chromobacterium* y *Burkholderia* (Mendoza *et al.*, 2010).

La glucosa se utilizó como fuente de carbono y energía en el medio sales minerales - Cr^{6+} utilizado para el enriquecimiento y aislamiento de los microorganismos, por cuanto el Cr^{6+} en presencia de materia orgánica es reducido a Cr^{3+} , menos tóxico para los seres vivos (Guevara, 2010).

Todos los hongos filamentosos y levaduras se adaptaron a 100 ppm Cr^{6+} ; sin embargo, el porcentaje de microorganismos disminuyó conforme aumentó la concentración de Cr^{6+} , resultado explicado por la presión selectiva ejercida sobre los microorganismos que habitan un ambiente, conforme aumenta la concentración del contaminante. Si la descarga del contaminante es de carácter permanente, como sucede habitualmente con los metales pesados, se seleccionarán aquellos fenotipos que puedan sobrellevar dicho estrés (Moraga *et al.*, 2003).

En los microorganismos tolerantes a 200 ppm Cr^{6+} se identificaron siete géneros de hongos filamentosos predominando *Aspergillus*, *Fusarium*, *Trichoderma* y *Penicillium*, reportados previamente por Guevara (2010) y Soto *et al.* (2010). También se identificaron *Paecilomyces*, *Scopulariopsis* y *Scedosporium*, el primer género considerado muy eficiente para la remoción de Cr^{6+} (Cárdenas *et al.*, 2011). Este es el primer reporte de *Scopulariopsis* y *Scedosporium* como tolerantes al Cr^{6+} .

Los mecanismos de interacción entre los microorganismos y los metales pesados son la biosorción, biotransformación, bioacumulación, biomineralización y quimiosorción (Vullo, 2003). Con el Cr se han descrito los mecanismos de biosorción (Cervantes *et al.*, 2006; Gutiérrez *et al.*, 2010; Cárdenas *et al.*, 2011); biotransformación (Gutiérrez *et al.*, 2010; Soto *et al.*, 2010) y biacumulación (Guevara, 2010; Gutiérrez *et al.*, 2010).

Los hongos tolerantes al Cr^{6+} se seleccionaron con base a la biomasa formada, por cuanto ésta es indispensable para la biosorción o bioadsorción, término utilizado para referirse a la captación de los metales que lleva a cabo una biomasa viva o muerta, a través de mecanismos físico-químicos como la

adsorción o el intercambio iónico. Implica una fase sólida, biomasa o sorbente y una fase líquida o solvente que contiene los iones metálicos disueltos que van a ser sorbidas o sorbato. La biosorción se utiliza en la biorremediación de metales pesados como el Cr entre otros (Cañizares, 2000; Vullo, 2003), habiéndose determinado que 1 g de biomasa fúngica es capaz de remover 1000 ppm Cr^{6+} , después de 3 horas de incubación a 60 °C (Cárdenas *et al.*, 2011).

En la determinación de la eficiencia de remoción de Cr^{6+} la concentración inicial fue de 200 ppm dentro del rango 50 - 200 ppm de investigaciones realizadas por Guevara (2010), Cárdenas *et al.* (2011) y Panigatti *et al.* (2012). En la naturaleza la concentración promedio de Cr es muy variable. En el océano es de 0,00005 ppm y en las aguas continentales de 0,5 ppm hasta 7,5 ppm; no obstante, los procesos industriales que utilizan el ion metálico como la galvanoplastia, curtido de pieles e industria textil pueden generar efluentes contaminados con distintas concentraciones de Cr^{6+} que deberían ser tratados antes de ser vertidos al sistema de alcantarillado (Otiniano *et al.*, 2007; Guevara, 2010; Gutiérrez *et al.*, 2010).

La biomasa viva de los hongos investigados superó a la biomasa muerta en la eficiencia de la remoción de Cr^{6+} . De igual manera, Guevara (2010) y López (2011) demostraron la superioridad de las células viables. Éstas presentan una mayor variedad de mecanismos para la acumulación de metales como el transporte, formación de complejos extracelulares y la precipitación. Las células pueden saturarse; no obstante, el sistema se autorestablece, los metales se depositan con un estado químico alterado y menos sensible a la desorción espontánea y se pueden emplear dos o más microorganismos de manera sinérgica (Cañizares, 2000); no obstante, la biomasa muerta tiene las ventajas de no estar sujeta a las limitaciones de toxicidad, no necesitan nutrientes, se comporta como un intercambiador de iones y los metales pueden ser liberados fácilmente y recuperados (Cañizares, 2000; Rodríguez *et al.*, 2008).

El mayor valor (88,24%) en la eficiencia de la remoción de una concentración inicial de 200 ppm Cr^{6+} , correspondió a *Paecilomyces* sp.36A-D, superando 30% determinado con este mismo género de hongo por Panigatti *et al.* (2012). Para concentraciones iniciales de Cr^{6+} menores se han reportado mayores valores en la eficiencia de remoción, mencionándose 92,6 – 99,0% para 50 ppm Cr^{6+} (Cárdenas *et al.*, 2011; Panigatti *et al.*, 2012),

95% para 20 ppm Cr^{6+} (Panigatti *et al.*, 2012) y 98% para 10 ppm Cr^{6+} (Guevara, 2010). Concentraciones de Cr^{6+} mayores de 50 ppm (Cárdenas *et al.*, 2011) o 100 ppm (Guevara, 2010) resultan inhibitorios y letales para los microorganismos (Guevara, 2010; Panigatti *et al.*, 2012) o disminuyen el porcentaje de remoción, porque se incrementa el número de iones que compiten por los grupos funcionales dispensables en la superficie de la biomasa fúngica (Cárdenas *et al.*, 2011).

Conforme transcurrió el tiempo, la concentración de Cr^{6+} disminuyó en el caldo cultivado con *Paecilomyces*, *Penicillium* y *Fusarium spp.* coincidiendo con Cárdenas *et al.* (2011). Los organismos presentan respuesta variada a los iones tóxicos de un metal como resultado de diferentes mecanismos intrínsecos y extrínsecos. Los microorganismos resistentes se caracterizan por poseer mecanismos de detoxificación codificados genéticamente e inducidos por la presencia del metal, en cambio, los tolerantes son indiferentes a la presencia o ausencia del metal (Yagnentkovsky, 2011). Los mecanismos intrínsecos confieren a un organismo la capacidad para vivir frente a la toxicidad de los metales (tolerancia). Los mecanismos inducidos como los de detoxificación se desarrollan en respuesta a la presencia del metal y confieren la resistencia o habilidad de vivir con los metales tóxicos, modificándolos (Labrenz *et al.*, 2000).

En la presente investigación, la disminución de la concentración de Cr^{6+} , además de la biomasa desarrollada por los hongos evidenció procesos adaptativos que finalmente se expresaron como mecanismos de resistencia (Moraga *et al.*, 2003) como la biotransformación. Este término se refiere a las transformaciones del estado de oxidación de los metales pesados. Las formas oxidadas son solubles y móviles y las reducidas son insolubles y precipitan (Soto *et al.*, 2010). Los hongos transforman el Cr de dos maneras. En la biotransformación directa o enzimática el Cr^{6+} es reducido a Cr^{3+} al ser utilizado como fuente de electrones. En la biotransformación indirecta el Cr^{6+} es reducido con metabolitos reductores o grupos funcionales de la superficie celular (Gutiérrez *et al.*, 2010). El Cr^{3+} precipita como hidróxidos y puede ser separado de los efluentes (Guevara, 2010).

La mayor eficiencia de remoción del Cr^{6+} correspondió a 120 horas considerándose un proceso rápido en los hongos investigados. De manera similar Panigatti *et al.* (2012), determinaron 5 días como tiempo óptimo para el

proceso de remoción de Cr^{6+} ; no obstante, Cárdenas *et al.* (2011) reportaron un periodo de 168 horas. En un bioproceso de remediación de lugares contaminados con Cr^{6+} , *Paecilomyces* sp.36A-D es considerado promisorio debido a que se demostró su resistencia a elevadas concentraciones del metal tóxico.

VI. CONCLUSIONES

- En humedales de flujo subsuperficial, HAFSS se seleccionaron plantas de *Canna indica* “achira”, *Cynodon dactylon* L. “grama” y *Ruellia brittoniana* “petunia” tolerantes a 50 ppm Cr⁶⁺.
- En las raíces de las plantas tolerantes al Cr⁶⁺ se obtuvieron 135 aislados de microorganismos, entre los que 95% correspondió a hongos filamentosos y 5% a hongos levaduriformes.
- El 42,20% de hongos filamentosos se adaptaron a 200 ppm Cr⁶⁺, identificándose *Aspergillus* (29,63%), *Fusarium* (23,70%), *Trichoderma* (17,78%), *Penicillium* (11,85%), *Scopulariopsis* (7,41%), *Paecilomyces* (5,93%) y *Scedosporium* (3,70%).
- La eficiencia promedio de remoción de Cr⁶⁺ por la biomasa viva de tres hongos filamentosos fue de 59,45% y la eficiencia promedio de la biomasa muerta fue 43,09%; alcanzándose 88,24% con la biomasa viva de *Paecilomyces* sp.36A-D a las 120 horas.

VII. RECOMENDACIONES

- Investigar el mecanismo de remoción de cromo por *Paecilomyces* sp.36A-D, *Penicillium* sp.15A-E y *Fusarium* sp.51P-D.
- Caracterizar a nivel molecular *Paecilomyces* sp.36A-D, *Penicillium* sp.15A-E y *Fusarium* sp.51P-D.
- Determinar la eficiencia de remoción de Cr⁶⁺ por *Paecilomyces* sp.36A-D, *Penicillium* sp.15A-E y *Fusarium* sp.51P-D en humedales de flujo subsuperficial.

VIII. RESUMEN

Los microorganismos pueden ser utilizados para la remoción de Cr^{6+} en efluentes contaminados, como parte de una tecnología amigable con el ambiente y de bajo costo. El objetivo de la presente investigación fue determinar la eficiencia de la remoción de Cr^{6+} por microorganismos aislados de raíces de plantas tolerantes al ion metálico en humedales de flujo subsuperficial, HAFSS. Se colectaron plantas de *Canna indica* “achira”, *Cynodon dactylon* L. “grama” y *Ruellia brittoniana* “petunia”, se acondicionaron en HAFSS y se regaron con una solución de 50 ppm Cr^{6+} de dicromato de potasio para seleccionar las tolerantes. Los microorganismos se aislaron en caldo sales minerales con 0,01% p/v glucosa y 50 ppm Cr^{6+} y después se adaptaron a 100,150 y 200 ppm Cr^{6+} . Con los tres microorganismos que alcanzaron la mayor biomasa se determinó la eficiencia de remoción del metal, bajo un diseño completamente aleatorizado con arreglo factorial 2 x 3 x 5. Los factores fueron A (Biomasa viva y muerta), B (Género de microorganismo: 1, 2, 3) y C (Tiempo: 24, 48, 72, 96,120 horas). La concentración de Cr^{6+} se determinó por el método colorimétrico de la 1-5 difenilcarbazida. En las raíces de las plantas tolerantes se obtuvieron 135 aislados de microorganismos, entre los que 95% correspondió a hongos filamentosos y 5% a hongos levaduriformes. El 42,2% de los hongos filamentosos se adaptaron a 200 ppm Cr^{6+} , identificándose *Aspergillus* (29,63%), *Fusarium* (23,70%), *Trichoderma* (17,78%), *Penicillium* (11,85%), *Scopulariopsis* (7,41%), *Paecilomyces* (5,93%) y *Scedosporium* (3,70%). La eficiencia promedio de remoción de Cr^{6+} por la biomasa viva de tres hongos filamentosos fue de 59,45% y la eficiencia promedio de la biomasa muerta fue 43,09%; alcanzándose 88,29% con la biomasa viva de *Paecilomyces* sp.36A-D a las 120 horas, hongo que se consideró promisorio para la remoción de Cr^{6+} .

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adeniji, A. (2004). Bioremediation of Arsenic, Chromium, Lead, and Mercury. Recuperado de:
http://www.cluin.org/download/studentpapers/bio_of_metals_paper.pdf
- Albarracín, S., Larenas, G., Quiroga, M. & de Viana, M. (2008). *Reducción del boro en sustratos por acción de especies nativas. Avances en Energías Renovables y Medio Ambiente*, 12(1), 15-20.
- Alvarez, S., Maldonado, M., Gerth, A. & Kusch, P (2004). Caracterización de agua residual de curtiduría y estudio del lirio acuático en la recuperación de cromo. *Información Tecnológica*, 15(3), 75-80.
- Alvitres, V. (2000). *Método Científico. Planificación de la Investigación*. 2da ed. Perú: Editorial Ciencia.
- Arias, S., Betancur, F., Gómez, G., Salazar, J. & Hernández, M. (2010). Fitorremediación con humedales artificiales para el tratamiento de aguas residuales porcinas. *Informador Técnico (Colombia)*, 74, 12 – 22.
- Babel, S., & Dacera, D. (2006). La eliminación de metales pesados de los lodos contaminados. *Waste Management*, 26, 988-1004.
- Barnett, H. & Hunter, B. (1998). *Illustrated Genera of Imperfect Fungy*. 4ta ed. Estados Unidos: American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN.
- Burgos, M., & Diez, S. (2015). *Eficiencia de la remoción de cromo hexavalente, Cr⁶⁺, por plantas en humedales artificiales de flujo subsuperficial, 2014*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Perú.
- Cañizares, R. (2000). Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 42, 131-143.
- Cárdenas, J., Martínez, V. & Acosta, I. (2011). Remoción de cromo (VI) por una cepa de *Paecilomyces* sp. resistente a cromato. *Información Tecnológica*, 22(4), 43-50.

- Cascaret, D., Calzado, O. & Pérez, R. (2014). Determinación de la capacidad de adsorción de cromo (VI) por biomasa bacteriana. *Revista Cubana de Química*, XXVI (3), 215-224.
- Cerna, L., & Elías, L. (2015). *Eficiencia de la remoción de plomo en agua residual sintética por bacterias aisladas del Dren 4000 en Lambayeque, 2013*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Perú.
- Cervantes, C., Espino, A., Acevedo, F., León, I., Rivera, M., Ávila, M., et al. (2006). Interacciones microbianas con metales pesados. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 48(2), 203-210.
- Celis, J., Junod, J. & Sandoval, M. (2005). Recientes aplicaciones de la depuración de aguas residuales con plantas acuáticas. *Theoria*, 14(1), 17-25.
- Coyne, M. (2000). *Microbiología del Suelo: Un Enfoque Exploratorio*. España: Editorial Paraninfo.
- Cubillos, J. (2011). *Evaluación de la fitorremediación como alternativa de tratamiento de aguas contaminadas con hidrocarburos*. (Tesis de Maestría). Universidad Tecnológica de Pereira, Colombia.
- Chambergó, C. & Herrera, P. (2009). *Efecto de la concentración de sustrato, agitación y tiempo en la degradación fotocatalítica, biodegradación y "Proceso Acoplado" de cianuro en laboratorio. Dren 4000, Lambayeque*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Perú.
- Diez, J. (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, España.
- Durán, J., García, A. & López, J. (2009). Propuesta de clasificación genético-geológica de humedales. Aplicación a los humedales españoles incluidos en el Convenio de Ramsar. *Instituto Geológico y Minero de España*, 120 (3), 335-346.
- Estrada, G. (2010). *Humedales artificiales de flujo subsuperficial (HAFSS) para remoción de metales pesados en aguas residuales*. (Tesis de Tecnólogo). Universidad Tecnológica de Pereira, Colombia.

- González, M. (2005). Recuperación de suelos contaminados con metales pesados utilizando plantas y microorganismos rizosféricos. *Terra Latinoamericana*, 23 (1), 29 – 37.
- Guerrero, G. (2006). *Capacidad degradativa de policlorobifenilo (PCB) por bacterias aisladas de aguas residuales del Dren 4000 de Lambayeque. Abril – Junio 2004.* (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Perú.
- Guevara, S. (2010). *Biorremoción de cromo (cromo total y cromo VI) en agua sintética por dos inóculos bacterianos nativos compuestos, a escala de laboratorio.* (Tesis de Ingeniería). Escuela Politécnica del Ejército, Ecuador.
- Gutiérrez, F., Espino, A., Coreño, A., Acevedo, F., Reyna, G., Fernández, F. et al. (2010). Mecanismos de interacción con cromo y aplicaciones biotecnológicas en hongos. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal*, 1(1), 47-63.
- Hernández, R., Fernández, C. & Baptista, P. (2003). *Metodología de la Investigación.* México: Mc Graw, Hill Interamericana Editores S.A.
- Hurtado, A. & Guzmán, C. (2011). *Producción de polihidroxialcanoatos por bacterias halófilas nativas en diferentes concentraciones de almidón contenido en cáscaras de Solanum tuberosum.* (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Perú.
- Jiang, H., Tay, J. & Tay, S. (2004). Changes in structure, activity and metabolism of aerobic granules as a microbial response to high phenol loading. *Applied Microbiology & Biotechnonology*, 63, 602-608.
- Labarca, M., Sanabria, N. & Arcia, A. (2006). Patogenicidad de *Pestalotiopsis palmatarum* Cooke sobre plantas de vivero de palma aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ)*, 23, 417 – 424.
- Labrenz, M., Tindall, B., Lawson, P., Collins, M., Human & Hirsh, P. (2000). *Staleyia guttiformis* gen. nov., sp. nov. and *Sulfitobacter brevis* sp. nov., alpha-3-Proteobacteria from hypersaline, heliothermal and meromictic

antarctic Ekho Lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50, 303 - 313.

- López M. (2011). *Biorremediación de metales pesados con aislados microbianos procedentes de procesos de compostaje*. (Tesis de Maestría). Universidad de Almería, España.
- Madigan, M., Martinko, J. & Parker, J. (2004). Brock. *Biología de los Microorganismos*. 10 ed. Madrid: Pearson Educación, S.A.
- Mallia, M. & Auxilia, D. (2009). Fitorremediación de Aguas Residuales Contaminadas de Cromo con Especies de la Familia Cannaceae. Recuperado de:
<http://www.bvsde.paho.org/bvsAIDIS/PuertoRico29/reyna.pdf>
- Marrero, J., Amores, I. & Coto, O. (2012). Fitorremediación, una tecnología que involucra a plantas y microorganismos en el saneamiento ambiental. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 46 (3), 52 – 61.
- Mendoza, J., Perea, Y., Petrelín, C., Silveti, A., Martínez, M., Pérez, G., Espinosa, B., & Arriola J. (2010). Biosorción de cromo, arsénico y plomo de soluciones acuosas por cultivos bacterianos en suspensión. *Revista Latinoamericana el Ambiente y las Ciencias*, 1(2), 67-73.
- Moraga, R., Merino, C. & Mondaca M. (2003). Resistencia a metales pesados en bacterias aisladas de la bahía de Iquique. *Investigaciones Marinas*, 31(1),91-95.
- Mostacero, L., Mejía, F. & Gamarra, O. (2002). Taxonomía de las fanerógamas útiles del Perú. Perú: Editorial Normas Legales S.A.C.
- Mozo, R. (2012). *Determinación del nivel de cromo hexavalente en los pozos tubulares y efluentes de drenaje de las lagunas de oxidación, del distrito de Moche, en el periodo Enero – Agosto del 2010*. (Tesis de Maestría). Universidad Nacional de Trujillo, Perú.
- Núñez, F. (2002). Evaluación a escala piloto de la fitorremediación de cuerpos de agua empleando *Canna glauca*. México. *Boletín del Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental*, 28, 1-8.
- Otiniano, M., Tuesta, L., Robles, H., Luján, M. & Chávez, M. (2007). Biorremediación de cromo VI de aguas residuales de curtiembres por

Pseudomonas sp. y su efecto sobre el ciclo celular de *Allium cepa*. *Revista Médica Vallejana*, 4 (1), 32 - 42.

Panigatti, M., Griffo, C., Boglione, R., Gentinetta, F. & Cassina, D. (2012). Uso de *Escherichia coli* para biorremediación de efluentes contaminados por cromo (VI). *Avances en Ciencias e Ingeniería*, 3(2), 11-24.

Peña, E., Madera, C., Sánchez, J. & Medina, J. (2013). Bioprospección de plantas nativas para su uso en procesos de biorremediación: caso *Heliconia psittacorum* (Heliconiaceae). *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 37(145), 469-481.

Quezada, R., & Varela, E. (2009). *Remediación natural para completar la depuración del cromo (VI) en efluentes de curtiembres*. Universidad Tecnológica Nacional, Argentina.

Ramírez, L. & Ugaz, J. (2014). *Bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno en Oryza sativa L. "arroz", Lambayeque*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Perú.

Rodier, J. & Rodi, L. (2005). *Análisis de Aguas*. España: Ediciones Omega.

Rodríguez, M., Miranda, R., Olivas, R. & Sosa, C. (2008). Efectos de las condiciones de operación sobre la biosorción de Pb^{2+} , Cd^{2+} y Cr^{3+} en solución por *Saccharomyces cerevisiae* residual. *Información Tecnológica*, 19(6), 47-55.

Soto, C., Gutiérrez, S., Rey, A. & González, E. (2010). Biotransformación de metales pesados presentes en lodos ribereños de los ríos Bogotá y Tunjuelo. *Nova-Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*, 8(14), 195-205.

Téllez, J., Carvajal, R. & Gaitán, A. (2004). Aspectos toxicológicos relacionados con la utilización de cromo en el proceso productivo de curtiembres. *Revista de la Facultad de Medicina Universidad Nacional de Colombia*, 52(1), 50-61.

Torres, D., Cumana, A., Torrealba, O. & Posada, D. (2010). Uso del Vetiver para la fitorremediación de cromo en lodos residuales de tenería. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 1(2), 175-188.

- Yagnentkovsky, N. (2011). *Aplicación de técnicas de biorremediación para el tratamiento de residuos industriales con alto contenido de metales pesados*. (Tesis Doctoral). Universidad Nacional de la Plata, Argentina.
- Vullo, D. (2003). Microorganismos y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente. *Química Viva*, 3(2), 47-56.

ANEXO 1

Cálculo del número de muestras para el aislamiento de microorganismos asociados a raíces de plantas tolerantes al Cr⁶⁺ (Alvitres, 2000)

$$n = \frac{Z^2 (p \cdot q)}{t^2}$$

Donde:

n = Tamaño de muestra

z = 1,96 ($\alpha = 0,05$), valor estándar

p = Prevalencia de microorganismos en raíces de plantas tolerantes al Cr⁶⁺ (0,90)

q = Ausencia (0,10)

t = Error permitido (8%)

$$n = \frac{(1.96)^2 (0,90 \times 0,10)}{(0,08)^2}$$

$$n = 54,02 \text{ muestras}$$

ANEXO 2

Preparación de agua sintética a diferentes concentraciones de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) a partir de una solución madre

Para preparar una solución solución madre de dicromato de potasio, pesar 2,83 g de ($K_2Cr_2O_7$) y diluir en 15 000 mL de agua declorada.

Luego:

$$1 \text{ ppm} = 1 \text{ mgL}^{-1}$$

- Para una solución de 25 ppm:

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

$$2830 \text{ mgL} \times V_1 = 25 \text{ ppm} \times 15\,000 \text{ mL}$$

$$2830 \text{ mgL} \times V_1 = 25 \text{ mgL}^{-1} \times 15\,000 \text{ mL}$$

$$V_1 = \frac{25 \text{ ppm} \times 15\,000 \text{ mL}}{2830 \text{ mgL}}$$

$$V_1 = 132,51 \text{ mL}$$

Para obtener una concentración de 25 ppm de dicromato de potasio, tomar 132,51 mL de la solución madre y aforar a 15 000 mL con agua declorada.

- Para una solución de 50 ppm:

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

$$2830 \text{ mgL} \times V_1 = 50 \text{ ppm} \times 15\,000 \text{ mL}$$

$$2830 \text{ mgL} \times V_1 = 50 \text{ mgL}^{-1} \times 15\,000 \text{ mL}$$

$$V_1 = \frac{50 \text{ ppm} \times 15\,000 \text{ mL}}{2830 \text{ mgL}}$$

$$V_1 = 265,02 \text{ mL}$$

Para obtener una concentración de 50 ppm de dicromato de potasio, tomar 265,02 mL de la solución madre y aforar a 15 000 mL con agua declorada.

ANEXO 3

Preparación de caldo sales minerales con diferentes concentraciones de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$)

Componentes	Concentraciones (g L^{-1})
EDTA sódico	0,0014
Sulfato ferroso, $FeSO_4$	0,001
Sulfato de calcio, $CaSO_4 \cdot H_2O$	0,14
Cloruro de sodio, $NaCl$	0,1
Fosfato monoácido de potasio, K_2HPO_4	1,0
Sulfato de magnesio heptahidratado, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,4
Fosfato diácido de potasio, KH_2PO_4	2,0
Sulfato de amonio, $(NH_4)_2SO_4$	4,0
Glucosa	5,0

La fuente de Cr^{6+} fue el dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) en las concentraciones 50 ppm (0,05 g), 100 ppm (0,1 g), 150 ppm (0,15 g) y 200 ppm (0,2 g) para 1 L de agua destilada.

ANEXO 4

Obtención de la curva de calibración para la cuantificación de Cr^{6+}

Para la cuantificación de Cr^{6+} por el método de difenilcarbazida se trabajó una curva con estándares de 0 - 0,04 - 0,06 - 0,08 - 0,1 - 0,2 - 0,3 - 0,4 mg L^{-1} de Cr^{6+} a partir de una solución de 500 mg L^{-1} de Cr^{6+} (previa adición de HNO_3 concentrado para ajustar el $\text{pH} < 2$). Las diluciones se realizaron en balones de 50 mL donde se colocó la solución ácida de difenilcarbazida, se agitó, se dejó reposar por 5-10 min, se observó la aparición de una coloración rojo-violeta y la absorbancia se leyó en espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm.

Soluciones	Blanco	I	II	III	IV	V	VI	VII
Solución patrón (500 mg L^{-1} Cr^{6+})	0	4	6	8	10	20	30	40
Agua bidestilada (mL)	50	46	44	42	40	30	20	10
Ácido sulfúrico 1:1 (mL)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Solución de difenilcarbazida (mL)	1	1	1	1	1	1	1	1

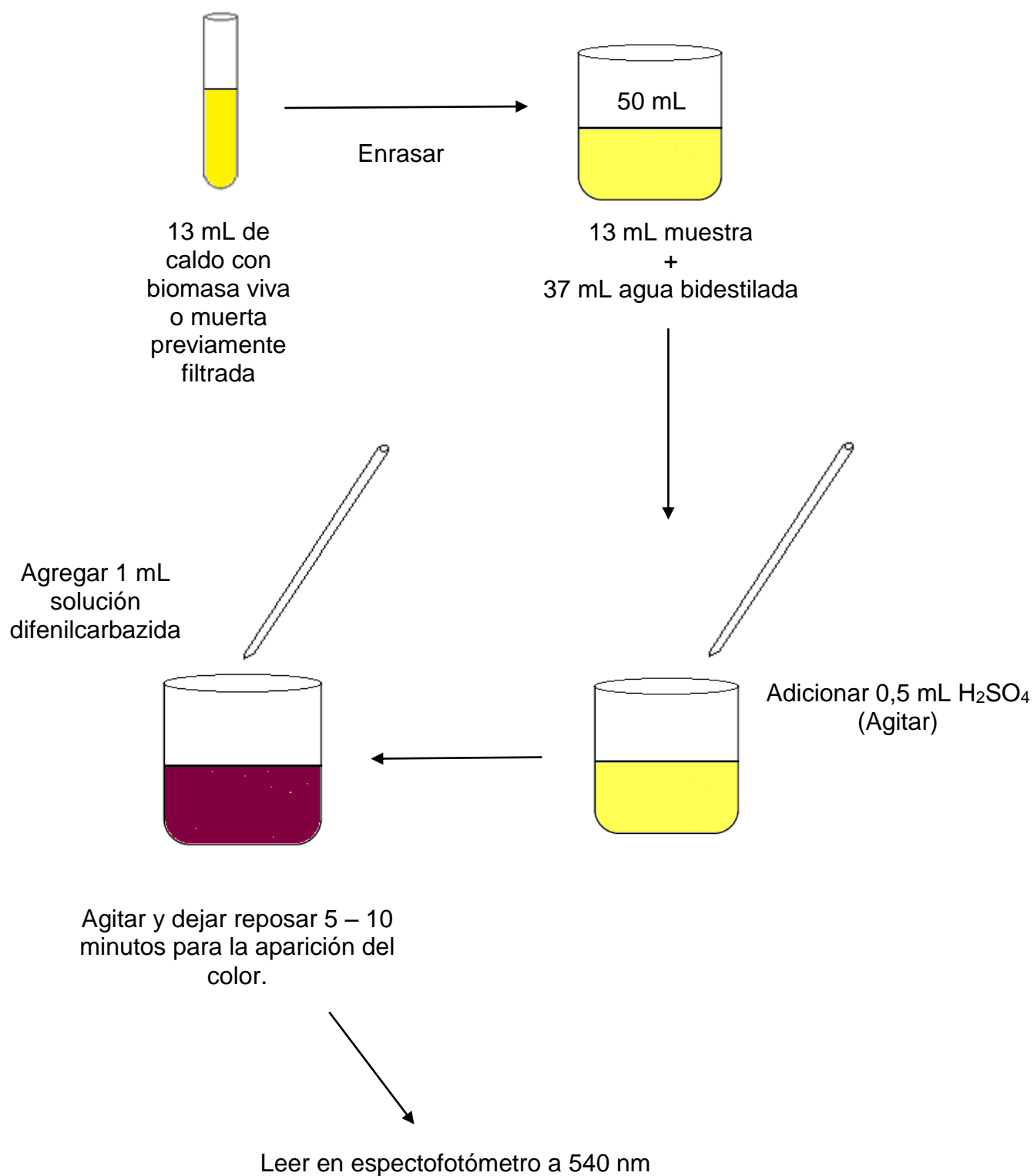
La solución patrón de 500 $\text{mg Cr}^{6+} \text{ L}^{-1}$ se preparó pesando 141,45 mg de dicromato de potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), disolviendo y enrasando con agua en un matraz aforado de 100 mL, previa adición de HNO_3 concentrado para ajustar el $\text{pH} < 2$ (2-5 mL).



Coloración observada en obtención de la curva de calibración para la cuantificación de Cr^{6+} .

ANEXO 5

Determinación de cromo hexavalente en muestras



ANEXO 6

**Biomasa de hongos filamentosos en concentraciones crecientes de Cr⁶⁺,
calificada según escala convencional***

Hongo filamentososo Código	50	100	150	200
1A-D	+++	+++	+++	++
2A-E	+	-	-	-
3A-D	+++	+++	+++	+++
4A-E	+++	+++	+++	+++
5A-D	+++	+++	++	-
6P-D	+++	+++	+++	++
7P-E	+++	++	++	+
8P-D	+	-	-	-
9P-D	+	-	-	-
10P-D	+	-	-	-
11G-E	++	++	-	-
12G-D	+++	++	++	+
13G-E	+	-	-	-
14A-D	+++	+++	+++	+++
15A-E	+++	+++	+++	+++
16A-D	+	-	-	-
17P-D	+++	++	++	-
18G-D	+	-	-	-
19A-E	+	-	-	-
20A-D	+	-	-	-
21A-D	+++	+++	+++	++
22A-D	+++	+++	++	++
23A-E	+++	+++	++	++
24A-E	+++	++	-	-
25A-E	+	-	-	-
26G-E	+	-	-	-
27G-D	++	++	-	-
28G-D	+++	+++	++	+
29G-D	+	-	-	-
30P-E	+++	+++	++	+
31P-D	+	-	-	-
32P-E	+++	+++	+++	++
33P-D	+++	+++	++	+
34A-D	+++	++	++	-
35P-E	+	-	-	-
36A-D	+++	+++	+++	+++
37A-D	+	-	-	-
38G-E	++	-	-	-
39G-D	++	+	-	-
40G-E	++	+	-	-
41P-D	++	++	++	+
42P-D	+++	+++	+++	++
43P-D	+++	++	-	-
44G-E	++	+	-	-

...continuación

Hongo filamentososo Código	50	100	150	200
45G-E	+++	+++	+++	++
46A-E	+++	++	-	-
47A-E	+++	++	-	-
48A-D	+++	+++	+++	++
49A-D	+++	+++	++	++
50G-E	+++	+++	+++	++
51P-D	+++	+++	+++	+++
52P-E	+	-	-	-
53P-D	+++	+++	+++	++
54P-E	+++	+++	+++	++
55G-D	++	+	-	-
56G-E	+++	++	-	-
57G-E	+++	+++	+++	+++
58P-D	+++	++	-	-
59A-D	+++	+++	+++	++
60G-D	+	-	-	-
61G-E	+++	+++	++	-
62G-E	+++	+++	+++	++
63A-D	++	++	-	-
64A-E	+++	+++	+++	++
65P-E	+	-	-	-
66P-D	+++	+	-	-
67P-D	+++	++	-	-
68G-E	++	-	-	-
69G-D	+++	+++	+++	++
70G-E	+++	+++	++	++
71A-D	+++	+++	+++	++
72A-E	+++	+++	++	+
73P-D	++	-	-	-
74P-D	++	-	-	-
75P-D	+++	+++	++	-
76P-D	++	-	-	-
77P-D	++	+	-	-
78G-E	+++	+++	+++	++
79P-E	++	-	-	-
80G-D	+	-	-	-
81G-D	++	++	-	-
82G-E	+++	++	+	+
83G-D	+++	+++	++	++
84A-E	+++	+++	++	+
85G-D	++	-	-	-
86G-D	+++	+++	+++	+++
87G-D	+++	++	++	-
88A-D	+	-	-	-
89A-E	+++	++	-	-
90A-E	+	-	-	-
91P-E	++	-	-	-
92P-D	+++	+++	+	+

...continuación

Hongo filamentososo Código	50	100	150	200
93P-D	+	-	-	-
94P-E	+++	++	-	-
95P-E	+++	+++	+++	++
96A-E	++	-	-	-
97A-D	+++	+++	+++	+++
98A-E	++	++	-	-
99A-D	+	-	-	-
100A-E	+++	+++	++	+
101A-E	+++	+++	++	-
102A-E	+++	+++	+++	+++
103G-E	+++	+++	+++	+++
104G-E	+++	++	-	-
105G-E	+++	++	+	+
106G-E	++	-	-	-
107G-E	+++	++	-	-
108G-E	+++	+++	++	-
109G-E	+++	++	-	-
110P-D	+++	++	++	+
111P-D	+++	+++	++	+
112P-D	+++	++	-	-
113P-D	+++	+++	++	-
114P-E	+++	++	++	+
115G-D	++	++	-	-
116G-E	+++	+++	+++	+++
117A-D	+++	+++	+++	++
118P-E	+	-	-	-
119P-E	+		-	-
120P-E	++	++	+	-
121G-D	+	-	-	-
122G-E	+	-	-	-
123P-D	+++	+++	++	++
124P-E	+++	+++	+++	++
125G-D	+++	+++	+++	+++
126G-D	++	++	+	+
127P-D	+++	+++	+	-
128P-E	+	-	-	-
129G-E	+++	++	+	+
130G-E	++	++	-	-
131G-D	+	-	-	-
132A-E	++	++	+	+
133A-D	+	-	-	-
134A-D	+	-	-	-
135A-E	+++	+++	++	++

- No creció , + Escaso, ++ Regular , +++ Abundante

ANEXO 7

Absorbancia (540 nm) de caldo sales minerales-Cr⁶⁺ con biomasa viva y muerta de hongos filamentosos tolerantes al ion metálico

Género	Cr ⁶⁺ (ppm / horas)						
	Biomasa	0	24	48	72	96	120
<i>Penicillium</i> sp.15A-E	Viva	1,535	1,218	1,019	0,409	0,307	0,214
		1,535	1,207	1,002	0,405	0,294	0,205
		1,535	1,199	1,015	0,396	0,285	0,201
	Muerta	1,535	1,339	1,117	0,857	0,591	0,443
		1,535	1,351	1,141	0,848	0,580	0,437
		1,535	1,357	1,123	0,865	0,587	0,456
<i>Paecilomyces</i> sp.36A-D	Viva	1,535	1,193	0,983	0,379	0,253	0,181
		1,535	1,201	0,993	0,397	0,265	0,199
		1,535	1,191	0,991	0,392	0,255	0,179
	Muerta	1,535	1,339	1,113	0,840	0,557	0,420
		1,535	1,341	1,135	0,835	0,565	0,411
		1,535	1,347	1,141	0,851	0,576	0,428
<i>Fusarium</i> sp.51P-D	Viva	1,535	1,220	1,017	0,430	0,316	0,231
		1,535	1,197	1,027	0,417	0,308	0,216
		1,535	1,216	1,001	0,421	0,312	0,221
	Muerta	1,535	1,375	1,109	0,871	0,605	0,464
		1,535	1,363	1,137	0,863	0,611	0,459
		1,535	1,355	1,127	0,868	0,597	0,440

ANEXO 8

Concentración (ppm) de Cr⁶⁺ en caldo sales minerales con biomasa viva y muerta de hongos filamentosos tolerantes al ion metálico

Género	Cr ⁶⁺ (ppm / horas)						
	Biomasa	0	24	48	72	96	120
<i>Penicillium</i> sp.15A-E	Viva	200,05	158,56	132,51	52,67	39,32	27,15
		200,05	157,12	130,29	52,15	37,62	25,97
		200,05	156,07	131,99	50,97	36,44	25,45
	Muerta	200,05	174,40	145,34	111,31	76,49	57,12
		200,05	175,97	148,48	110,13	75,05	56,34
		200,05	176,75	146,13	112,36	75,97	58,82
<i>Paecilomyces</i> sp.36A-D	Viva	200,05	155,29	127,80	48,74	32,25	22,83
		200,05	156,34	129,11	51,10	33,82	25,18
		200,05	155,03	128,85	50,45	32,51	22,57
	Muerta	200,05	174,40	144,82	109,08	72,04	54,11
		200,05	174,66	147,70	108,43	73,09	52,93
		200,05	175,45	148,48	110,52	74,53	55,16
<i>Fusarium</i> sp.51P-D	Viva	200,05	158,82	132,25	55,42	40,50	29,37
		200,05	155,81	133,56	53,72	39,45	27,41
		200,05	158,30	130,16	54,24	39,97	28,06
	Muerta	200,05	179,11	144,29	113,14	78,32	59,87
		200,05	177,54	147,96	112,09	79,11	59,21
		200,05	176,49	146,95	112,75	77,28	56,73

ANEXO 9

Eficiencia (%) de la remoción de Cr⁶⁺ por hongos filamentosos tolerantes al ion metálico

Género	Cr ⁶⁺ (ppm / horas)					
	Biomasa	24	48	72	96	120
<i>Penicillium</i> sp.15A-E		20,74	33,76	73,67	80,34	86,43
	Viva	21,46	34,87	73,93	81,19	87,02
		21,98	34,02	74,52	81,78	87,28
		12,82	27,35	44,36	61,76	71,45
	Muerta	12,04	25,78	44,95	62,48	71,84
		11,65	26,95	43,83	62,02	70,60
<i>Paecilomyces</i> sp.36A-D		22,37	36,12	75,64	83,88	88,59
	Viva	21,85	35,46	74,46	83,09	87,41
		22,50	35,59	74,78	83,75	88,72
		12,82	27,61	45,47	63,99	72,95
	Muerta	12,69	26,17	45,80	63,46	73,54
		12,30	25,78	44,75	62,74	72,43
<i>Fusarium</i> sp.51P-D		20,61	33,89	72,30	79,76	85,32
	Viva	22,11	33,24	73,15	80,28	86,30
		20,87	34,94	72,89	80,02	85,97
		10,47	27,87	43,44	60,85	70,07
	Muerta	11,25	26,04	43,97	60,45	70,40
		11,78	26,69	43,64	61,37	71,64

ANEXO 10

Promedios de eficiencia (%) de la remoción de Cr⁶⁺ por hongos filamentosos tolerantes al ion metálico

Género	Cr ⁶⁺ (ppm / horas)					
	Biomasa	24	48	72	96	120
<i>Penicillium</i> sp.15A-E	Viva	21,39	34,22	74,04	81,10	86,91
	Muerta	12,17	26,69	44,38	62,09	71,30
<i>Paecilomyces</i> sp.36A-D	Viva	22,24	35,72	74,96	83,57	88,24
	Muerta	12,60	26,52	45,34	63,40	72,97
<i>Fusarium</i> sp.51P-D	Viva	21,20	34,02	72,78	80,02	85,86
	Muerta	11,17	26,87	43,68	60,89	70,70

ANEXO 11

Taxonomía de *Canna indica*

Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Liliopsida
Orden:	Zingiberales
Familia:	Cannaceae
Género:	<i>Canna</i>
Especie:	<i>Canna indica</i>
Nombre común:	“achira”

Planta herbácea perenne, de rizoma carnoso y ramificado de hasta 20 x 15 cm, con los tallos que pueden alcanzar 1-3 m de altura y forman una macolla compacta, estando envueltos por las vainas de las hojas; hojas de color verde o verde violáceo, con peciolo corto y lámina de ovada a elíptica, de 30-60 x 10-20 cm, con la base obtusa o estrechamente cuneada y el ápice de cortamente acuminado a agudo; nervadura central prominente. Inflorescencia en racimo terminal con 6-20 cincinos de 1-2 flores. Flores sobre pedicelos de 0,2-1 cm de largo, con los sépalos estrechamente triangulares, de 1-1,7 cm de largo y los pétalos erectos, de 4-6,5 cm de longitud. Tubo de 1,5-2 cm de largo. Estaminodios 3-4, de estrechamente abovados a espatulados, de 4,5-7,5 cm de largo y de 0,3-0,5 cm de anchura en la parte libre; labelo reflejo, estrechamente oblongo parecido a los otros estaminodios, normalmente de rojizo a anaranjado. Cápsula de elipsoide a globosa, verrucosa, de 1,5-3 cm de longitud (Mostacero *et al.*, 2002).

ANEXO 12

Taxonomía de *Cynodon dactylon* L.

Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Liliopsida
Orden:	Poales
Familia:	Poaceae
Género:	<i>Cynodon</i>
Especie:	<i>Cynodon dactylon</i> L.
Nombre común:	“grama”

Hábito y forma de vida: Hierba perenne. Tamaño: 10 a 30 cm de alto, pero puede tener más de largo, ya que crece con estolones. Tallo: Delgados, glabros, erectos o decumbentes. Hojas: Vainas de 1.5 a 7 cm de largo, generalmente más cortas que los entrenudos, vilosas en el ápice, las inferiores usualmente quilladas, los bordes membranosos, lígulas membranosas, cilioladas, de 0.2 a 0.3 mm de largo, a veces vilosas en el dorso, láminas de 0.5 a 6.5 cm de largo por 1 a 3.5 mm de ancho, aplanadas, en ocasiones dobladas, escabriúsculas (poco ásperas), generalmente vilosas detrás de la lígula y en los márgenes inferiores, ocasionalmente en ambas superficies. Espiguilla/Flores: Espiguillas de 2 a 2.8 mm de largo, adpresas en el raquis e imbricadas, verde violáceas, glumas de 1 a 2.3 mm de largo, glabras, la primera falcada (en forma de hoz), la segunda lanceolada; lema de 2 a 2.6 mm de largo, fuertemente doblada y aquillada, sin arista u ocasionalmente con un corto mucrón, pálea glabra tan larga o un poco más corta que la lema; raquilla prolongada, desnuda o llevando una segunda flor masculina o rudimentaria. Frutos y semillas: Cariópsis de perfil fusiforme a elíptico, de 0.9 a 1.5 mm de largo y 0.5 a 0.7 mm de ancho, cuerpo translúcido de color ambarino o cremoso, de textura estriada extremadamente fina. Raíz: Estolones y rizomas (Mostacero *et al.*, 2002).

ANEXO 13

Taxonomía de *Ruellia brittoniana*

Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Lamiales
Familia:	Acanthaceae
Género:	<i>Ruellia</i>
Especie:	<i>Ruellia brittoniana</i>
Nombre común:	“petunia”

Ruellia brittoniana es una planta perenne caracterizada por hojas de color verde oscuro, opuestas, lanceoladas, de hasta 30 cm de largo y no más anchas de 2 cm. Las flores son de color azul-violeta, en forma de trompeta y de cerca de 3-5 cm de diámetro. Existen numerosas variedades que se distinguen por los colores de las flores que varían del blanco, al rosa, a muchas tonalidades de azul, tal como variedades enanas. Es una planta muy llamativa y sus flores son muy rebuscadas por las mariposas porque a su alrededor siempre está presente una nube de mariposas (Mostacero *et al.*, 2002).