

Uso del buchón de agua (*Eichhornia crassipes*) inoculado con *Azospirillum*
brasiliense para tratamiento de aguas contaminadas con Cromo

Sergio Alejandro Diaz Martínez

Universidad El Bosque

Facultad de Ciencias

PROGRAMA DE BIOLOGÍA

Bogotá D.C, 2022

Uso del buchón de agua (*Eichhornia crassipes*) inoculado *Azospirillum brasiliense* para
tratamiento de aguas contaminadas con Cromo

Autor:

Sergio Alejandro Diaz Martínez

Director

M.Sc Juan Pablo Hernández

Codirector:

M.Sc Emerson Eliecer León Ávila

Universidad El Bosque

Facultad de Ciencias

Bogotá D.C, 2022

Página de aprobación

Claudia Contreras

Luis Alonso Leyva Soto

Jurado William Alejandro Andrade

Dedicatoria

Este logro se lo dedico especial mente
A mi mamá Sandra Liliana Martínez Paredes,
La cual siempre
ha sido una ayuda incondicional y motivación
principal para superarme como persona cada día
A mi abuelita, Maria del Carmen P, por ser
tan especial conmigo desde que nací,
por ayudarme a malcriarme en algunos aspectos
y corregirme en otros, a mi abuelito Custodio,
por ser mi referente paterno,
regañarme y corregirme cuando me lo merezco.

Gracias por apoyarme, guiarme incondicionalmente
siempre que los necesito

Agradecimientos:

Agradezco a mi mamá Sandra Martínez,
por el apoyo incondicional
que he recibido por parte de ellos, antes, durante
la realización de mi carrera profesional, por todos
los consejos, guías que me brindan a diario,
gracias por estar ahí para cuando lo necesito.

A mi director de tesis Juan Pablo Hernández
Y Codirector Emerson León, que, gracias a su apoyo
incondicional me enseñaron y tuvieron mucha
paciencia durante este trabajo la realización
de este trabajo de grado.

A mis amigos más cercanos,
Andresh Peña, Geral Nuñez,
Mauren Silva, Valentina Criado,
Andrés Saavedra, Zaira Miranda
Mediante sus consejos, regaños, empujones
me guiado durante todo el tiempo que
los llevamos de amistad.

Nota de salvedad

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

1 Tabla de contenido

1	Tabla de contenido	7
2	Tabla de imágenes	9
3.	Tabla de figuras	10
3	Resumen:	11
4	Abstract	12
5	Introducción:	1
6	Justificación	5
7	Pregunta de investigación	6
8	Objetivos	6
8.1	General	6
9	Materiales y métodos	7
9.1	Selección del material vegetal, limpieza y aclimatación	7
9.2	Prueba de supervivencia de <i>Azospirillum brasiliense</i>	10
9.3	La inoculación de <i>Azospirillum brasiliense</i> y toma de medidas morfométricas	10
9.4	Diseño experimental	12
9.5	Preparación de Cromo	12
9.6	Análisis Estadísticos	14
10	Resultados y discusión	15
10.1	Supervivencia de <i>Azospirillum brasiliense</i> en Cromo	15
10.2	Barrido y Curva de calibración	15

10.3	Clorosis foliar de las plantas de <i>Eichhornia crassipes</i> inoculadas con <i>Azospirillum brasiliense</i> con las dos concentraciones de Cromo transcurridas durante las fases del experimento.	16
11	Conclusiones	26
10	Bibliografía	27
11.	Anexos	34
1.	Tabla de datos a 1000 ppm	34
2.	Análisis estadísticos iniciales para 1000 ppm vs control.	35
3.	Prueba T studen para 1000 ppm y control	35
4.	T studen para correlacionar las variables	36
5.	Estadísticos descriptivos 1000 ppm	37
6.	Estadísticos descriptivos Control	37
7.	Tabla de datos de 100 ppm vs Control	37
8.	Análisis estadísticos iniciales para 100 ppm vs control.	38
9.	Prueba T – studen para 100 ppm vs control	39
10.	Prueba T- studen para correlacionar las variables	40
11.	Estadísticos descriptivos 100 ppm	40
12.	Estadísticos descriptivos Control – 100 ppm	41

2 Tabla de imágenes

Imagen 1 A) mapa zonificación ambiental del humedal Gualí donde el punto muestra la zona de muestreo de las primeras coordenadas. B) mapa zonificación ambiental del humedal Jaboque donde el punto muestra la zona de muestreo de las segundas coordenadas. Fuente: Instituto Distrital de Deporte y Recreación (IDER).....	7
Imagen 2 A) Toma de muestras en el humedal Gualí. B) Toma de muestra humedal Jaboque	8
Imagen 3 A agua limpia de la llave lavado inicial, B: lavado con hipoclorito comercial. C: Lavado para retirar el exceso de hipoclorito	9
Imagen 4 climatación de <i>E. crassipes</i> con luz artificial durante 2 semanas.....	10
Imagen 5. plantas de <i>E. crassipes</i> inoculadas con <i>Azospirillum brasiliense</i> , en el rizoma de la planta a una concentración de 1×10^9 UFC durante 15 días.....	11
Imagen 6 4B. Variables de <i>E. crassipes</i> post-aclimatación. A: altura de la planta (AP), B: Longitud de la Raíz (LR) C: peso fresco (PS).	11
Imagen 7: A) Montaje individual de dicromato de potasio por planta B: Ensayo de bioacumulación de Cr por <i>E. crassipes</i>	12
Imagen 8: preparación de la solución de las 1000 ppm y 100 ppm mediante disoluciones de dicromato de potasio mediante la curva de calibración	14
Imagen 9: fase final de ensayo de bioacumulación de Cr por <i>E. crassipes</i> a las 360 horas.	16
Imagen 10: plantas de <i>E. crassipes</i> después de 360 horas.....	17
Imagen 11: Seguimiento de <i>E. crassipes</i> durante todas las fases experimental. a: 0 horas, b: 24 horas, c: 48 horas, d: 72 horas, e: 96 horas.	Error! Marcador no definido.

3. Tabla de figuras

Figura 1: Curva de calibración del Cr. Fuente: propia.....	15
Figura 2 resultado entre tratamiento 1000ppm de Cromo y el control. Promedios seguidos de letras distintas presentan diferencias estadísticas significativas según la prueba tstudent ($P < 0.05$).....	19
Figura 3: Porcentaje de remoción de <i>Eichhornia crassipes</i> vs el control a lo largo del tiempo.	21
Figura 4: resultado entre tratamiento 1000ppm de Cromo y el control. Promedios seguidos de letras distintas presentan diferencias estadísticas significativas según la prueba tstudent ($P < 0.05$).....	22
Figura 5 Porcentaje de remoción de <i>Eichhornia crassipes</i> vs el control a lo largo del tiempo.	23

3 Resumen:

Alrededor del mundo se han generado muchas investigaciones con el principio de ayudar a la descontaminación de las aguas residuales segregadas por las industrias de curtiembres de una manera eficiente y económica. *Eichhornia crassipes* es una planta acuática que tiene una gran problemática debido a que se encuentra en la lista de las 100 especies más exóticas e invasoras del mundo, pero sus cualidades fisiológicas de absorción de metales pesados, hace que sea altamente utilizada por algunos países como fitorremediador. Con este proyecto se quiso analizar la remoción de Cromo por *Eichhornia crassipes* inoculado con *Azospirillum brasiliense*. La planta fue inoculada en la zona radicular, a la que posteriormente se le realizó un seguimiento a diario tomando medidas morfométricas, y cambios físicos que tuviera la planta. Para evaluar la remoción de Cromo, *E. crassipes* fue sembrada en un sistema hidropónico, en dos concentraciones diferentes, 100 y 1000 ppm de dicromato de potasio, la medición se tomó diariamente, mediante un espectrofotómetro en una longitud de onda de 470 nm durante las 96 horas del experimento. *E. crassipes* tuvo una mayor absorción de Cromo a una concentración de 1000 ppm teniendo un porcentaje de remoción de 26%, en comparación del control que fue del 20%; para la concentración de 100 ppm de Cromo se pudo evidenciar que el control fue mejor que el tratamiento, teniendo un mayor porcentaje de absorción durante las 24 horas el cual se estimó en 48%. Se estimó que la máxima concentración que puede tolerar *E. crassipes*, antes que empiecen su proceso de marchitamiento, es de 1000 ppm Cromo a un máximo de 96 horas.

Palabras clave: Fitorremediación, Bacteria promotora de crecimiento, Absorción, *Azospirillum brasiliense*, bioacumulación

4 Abstract

Around the world, a lot of research has been generated with the principle of helping to decontaminate wastewater from tannery industries in an efficient and economical way. *Eichhornia crassipes* is an aquatic plant that has a great problem because it is on the list of the 100 most exotic and invasive species in the world, but its physiological qualities of absorption of heavy metals, makes it highly used by some countries as a phytoremediator. The aim of this project was to analyze the removal of chromium by *Eichhornia crassipes* inoculated with *Azospirillum brasiliense*. The plant was inoculated in the root zone, which was subsequently monitored daily by taking morphometric measurements and physical changes in the plant. To evaluate the removal of chromium, *E. crassipes* was planted in a hydroponic system, in two different concentrations, 100 and 1000 ppm of potassium dichromate, the measurement was taken daily, using a spectrophotometer at a wavelength of 470 nm during the 96 hours of the experiment. *E. crassipes* had a higher absorption of chromium at a concentration of 1000 ppm having a removal percentage of 26%, compared to the control which was 20%; for the concentration of 100 ppm of chromium it was evident that the control was better than the treatment, having a higher percentage of absorption during the 24 hours which was estimated at 48%. It was estimated that the maximum concentration that *E. crassipes* can tolerate before the wilting process begins is 1000 ppm Chromium for a maximum of 96 hours.

5 **Introducción:**

En la actualidad, el cuidado del agua se ha convertido en una necesidad imperiosa en las políticas del medio ambiente nacional e internacionalmente debido al constante deterioro de las fuentes hídricas, como ríos, lagunas, humedales, etc. El veloz incremento económico e industrial ha traído consigo serios inconvenientes de contaminación ambiental, como la polución del viento, agua y suelo. A partir de la perspectiva ambiental, el área de la minería y las curtiembres continuamente son catalogados como contaminantes, debido a que sus aguas residuales no tratadas eficientemente contienen compuestos orgánicos tóxicos y metales, los cuales son usados en los procesos, y por tanto constituyen la principal causa de contaminación de las fuentes hídricas en el mundo. Dichos contaminantes deterioran significativamente los ecosistemas acuáticos con metales pesados como el mercurio de la minería, el Cromo de las curtiembres y el níquel de la industria de pinturas, entre otros, generando graves impactos, no solo al medio ambiente, sino también sociales y económicos (Zhao *et al.*, 2016).

Mediante la resolución 631/2015 artículo 13 del Ministerio de Medio Ambiente y Desarrollo sostenible: Se estipula el rango permisible del Cromo en los vertimientos puntuales de aguas residuales no domésticas, a cuerpos de agua superficiales de actividades asociadas con fabricación y manufactura de bienes, siendo el valor permisible de 1.00 mg/L y para la presencia de Cromo en aguas residuales domésticas está el valor del vertimiento en 0.05 mg/L. (Ministerio de medio ambiente y desarrollo sostenible 2015)

Uno de los metales pesados que más impacto ocasiona a la naturaleza y a la salud humana es el Cromo, que en su estado de oxidación (VI) es letalmente cancerígeno para el humano (Sidhu,

2016), por tanto, las industrias que utilizan estos metales deben tener un mayor control y procesos de tratamiento eficientes en sus aguas residuales. El Cromo se ha extendido en la industria de las curtiembres, gracias a la alta eficiencia y calidad del cuero obtenido al momento de teñirse. Una vez realizado el lavado de este cuero las aguas residuales quedan con altos niveles de Cromo (Cr) y estas son vertidas al medio ambiente sin pasar por una Planta de Tratamientos de Aguas Residuales (PTAR), causando una problemática ambiental por la contaminación de este químico. La eliminación del Cromo de las aguas residuales es forzosa con el propósito de eludir la contaminación del agua de los ríos (Velarde H *et al* 2013; Onyanchaa D. *et al* 2008) y dar cumplimiento a la resolución 631 de 2015.

El Cromo (Cr) es un metal pesado, siendo uno de los más nocivos para el medio ambiente, cuyos efectos y presencia en cuerpos de agua y suelos generan una problemática ambiental grave disminuyendo la calidad de vida de las personas que utilicen estos recursos contaminados; Existen unas pocas alternativas para su remediación, generando una preocupación en la comunidad científica los cuales mediante investigación intensiva han generado ciertos avances en los últimos años. Bajo condiciones oxidantes, neutras y alcalinas, el Cromo está presente como cromato o dicromato, mientras que, a condiciones reductoras, la conversión del Cromo a Cr (III) podría tener lugar. (Padma S.; Dhara B. 2008). El Cromo tiene una forma trivalente la cual tiene actividad biológica registrada a bajas concentraciones, es poco soluble, muy estable y su capacidad para transportar electrones es baja (Pettine *et al.*, 1998). La exposición de plantas a concentraciones de Cromo desde 1 a 250 mg/l, ha mostrado que induce clorosis en rábano (Dube *et al.*, 2005), disminuye la concentración de clorofila en el junco (Gruber *et al.*, 2008) y genera pérdida de la integridad general de la hoja y necrosis en jacinto acuático (Brito-Paiva *et al.*, 2009). La concentración normal de Cromo en plantas está entre 20 y 200 µg/kg de peso seco (PS). La otra forma de Cromo es la hexavalente, esta forma no tiene actividad biológica conocida, es 100 veces

más tóxico que el Cr (III) y se transporta al interior celular como análogo del ión sulfato; genera cáncer, mutaciones y puede causar la muerte.

Estudios recientes sobre el Cromo establecieron que en la Laguna de Sonso, Valle del Cauca Colombia, los niveles de Cromo en sedimentos es de 70 mg/kg y en agua de 88 µg/l, valores de sistemas naturales considerados como mediana y fuertemente contaminados, respectivamente (Peña *et al.*, 2012; Varón-López, 2009; Anderson y Azcárate, 2005; Gischler, 2005). de Peña y colaboradores (2012) evaluaron la contaminación en ecosistemas acuáticos usando buchón de agua denominación local, presentes en la laguna de Sonso, el cual presentó una absorción del 10 % aproximadamente, del cromo presente en la laguna.

En este proyecto se observó la absorción que tiene el buchón de agua como una planta fitorremediador.

El buchón de agua, *Eichhornia crassipes*, es una planta monocotiledónea, perteneciente a la familia de las Pontederiaceae; es una planta acuática perenne de crecimiento herbáceo con un tamaño desde unos pocos centímetros hasta un metro de altura. Las hojas son de color verde brillante aproximadamente de 20 cm de largo y 5 a 15 cm ancho, unidas al pecíolo en estructura esponjosas, las raíces son oscuras y constituyen hábitat para invertebrados. (Gomez- Schouben, 2005).

Los procesos biotecnológicos son la nueva tendencia al mejoramiento de la capacidad de tolerancia/bioacumulación de Cromo por *E. crassipes*, así como la determinación de daños en la estructura íntima de los tejidos de esta planta son importantes en la medida en que disminuyen la biodisponibilidad del Cromo a otros niveles tróficos y favorecen su reducción a la forma menos tóxica Cr (III) (Ksheminska *et al.*, 2005).

Se ha informado ampliamente sobre el uso de PGPR para reducir los efectos nocivos de varios tipos de estrés (Dimkpa et al. 2009; Gururani et al. 2013; Rojas-Tapias et al. 2012; Yang et al. 2009; Yousefi et al. 2017). *Azospirillum* spp es uno de los géneros más representativos del grupo PGPR. (Bashan y de-Bashan 2010). *Azospirillum* se ha convertido en el PGPR de vida libre más estudiado y es un modelo para estudiar la fisiología, la ecología y la genética molecular de las bacterias de la rizosfera asociadas a plantas (Bashan et al. 2004; de-Bashan et al. 2007) En el caso específico de *Azospirillum*, estas bacterias son atraídas a las raíces por varios atrayentes químicos secretados por las raíces, que actúan como fuente de carbono. (Burdman et al. 2000). *Azospirillum* puede colonizar la endodermis y el córtex (la endorizosfera) o la epidermis (el rizoplaneo) de la raíz. En este último caso, las bacterias tienden a formar agregados de unas pocas o decenas de células, aunque también se pueden encontrar células aisladas distribuidas a lo largo de la superficie de la raíz. *Azospirillum* se caracteriza por colonizar zonas de elongación y pelos radiculares. (Assmus et al. 1995; Ramos et al. 2002; Zhu et al. 2002)

Con este proyecto se espera estudiar la utilidad de los microorganismos y evidenciar si mejora la bioacumulación del Cromo a una planta de *Eichhornia crassipes*, donde por referencias bibliográficas se ha demostrado la capacidad de *Azospirillum brasiliense* para formar biopelículas en raíces y superficies abióticas. (Arruebarrena Di Palma et al. 2013; Assmus et al. 1995; Cerqueira 2015), provoca cambios en la estructura de la raíz causados por una combinación de fitohormonas y otras moléculas (Bashan y de-Bashan 2010). Los efectos positivos sobre el sistema de raíces y que además se han implicado, en forma separada, en el desarrollo de biopelículas (Arruebarrena Di Palma et al. 2013; Bianco et al. 2006)

6 Justificación

Se ha visto la necesidad de crear una funcionalidad óptima como fase inicial en el tratamiento de aguas residuales contaminadas con Cromo, las cuales pueden provenir de industrias como las curtiembres; siendo el Cromo uno de sus principales residuos de estas industrias y al no realizar un buen tratamiento de estas aguas mediante la PTAR, las aguas llegan muy contaminadas a los cuerpos de aguas adyacentes a estas industrias. Dado que el Cromo hexavalente no tiene actividad biológica conocida, es 100 veces más tóxico que el Cr (III) y se transporta a las células como un análogo del ion sulfato, el cual puede causar cáncer, mutaciones y las personas que están expuestas a este elemento en medianas cantidades pueden fallecer a causa de envenenamiento (Ksheminska *et al.*, 2005). Este trabajo evaluó la capacidad de *Eichhornia crassipes* para tolerar altas concentraciones de este metal pesado, ya que su actividad ha sido reconocida por trabajos realizados por Gardea-Torresdey *et al.*, 2010; Ebel *et al.*, 2007, en procesos de Fitoextracción - volatilización. La biorremediación es una buena opción para estos cuerpos de agua afectados por Cromo. Al utilizar esta planta puede representar un proceso biotecnológico eficiente para el tratamiento de las aguas residuales contaminadas con Cromo y además es un tratamiento de bajo costo: puede beneficiar a los empresarios, puesto que no requiere de infraestructura sofisticada. En general, es una tecnología económica, simple, sustentable, compatible con el ambiente (Carreño, 2016). Es por este motivo que se hace necesario este tipo de estudios, dar uso eficiente a plantas u otras herramientas al momento de buscar una solución a las problemáticas ambientales tales como la presencia de Cromo en ríos, lagos y otros cuerpos de agua, que afectan la salud de las poblaciones al utilizar estos cuerpos hídricos disminuye drásticamente la calidad de vida teniendo presente que el uso de las plantas como el buchón de agua, beneficia a que una especie invasora y de esta manera darle una mayor utilidad la sociedad. Es fundamental, aportar desde la biología, el uso de plantas como el Buchón de agua, la cual se encuentra

categorizada como planta invasora y darle utilidad ambiental, una funcionalidad a dicha problemática.

7 Pregunta de investigación

¿Cuáles son las ventajas y desventaja del uso de la bacteria promotora de crecimiento *Azospirillum brasiliense* a la hora de ayudar la planta de *Eichhornia crassipes* a obtener una mayor captación de Cromo en aguas contaminadas con este metal pesado?

8 Objetivos

8.1 General

Evaluar la capacidad biorremediadora de *Eichhornia crassipes* inoculado con *Azospirillum brasiliense* en la remoción de Cromo de aguas que contienen cromo como contaminante.

Específicos

- Identificar los cambios morfológicos y físicos de *E. crassipes* inoculado con *Azospirillum brasiliense* asociados a la exposición al Cromo.
- Determinar si *Eichhornia crassipes* inoculado con *Azospirillum brasiliense* tiene ventajas biorremediadora en aguas contaminadas con Cromo.

9 Materiales y métodos

9.1 Selección del material vegetal, limpieza y aclimatación

Se colectaron 9 plantas de *E. crassipes*, las cuales procedían de dos humedales ubicados en la ciudad de Bogotá, Gualí en las coordenadas 4° 43' 36.28'' N, 74° 11' 29.19'' W del humedal Jaboque 4° 43' 32.18'' N, 74° 07' 52.57'' W (Imagen 1), la selección de las plantas se realizó de la siguiente forma: se clasificaron en dos tamaños; tamaño pequeño, teniendo un máximo 15 centímetros desde la base de la raíz hasta el ápice de la hoja y el tamaño grande que el bulbo fuera superior de 15 cm desde la base de la raíz hasta el ápice de la hoja. Otro criterio de selección que se aplicó para los dos tamaños fue que en la misma planta tuviera mínimo 4 y máximo 7 bulbos.

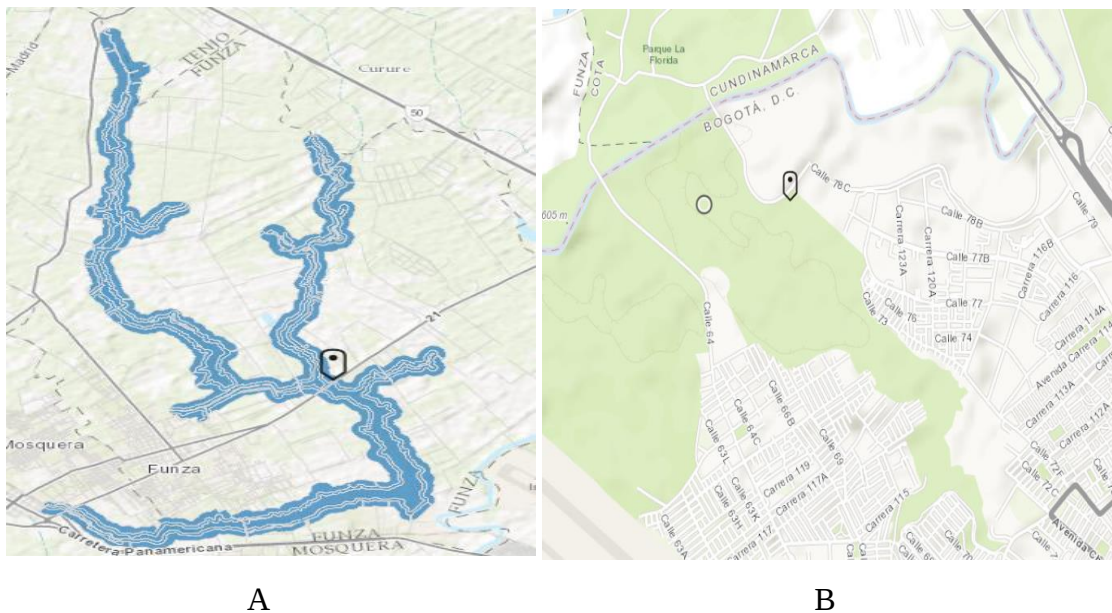


Imagen 1 A) mapa zonificación ambiental del humedal Gualí donde el punto muestra la zona de muestreo de las primeras coordenadas. B) mapa zonificación ambiental del humedal Jaboque donde

el punto muestra la zona de muestreo de las segundas coordenadas. Fuente: Instituto Distrital de Deporte y Recreación (IDER)

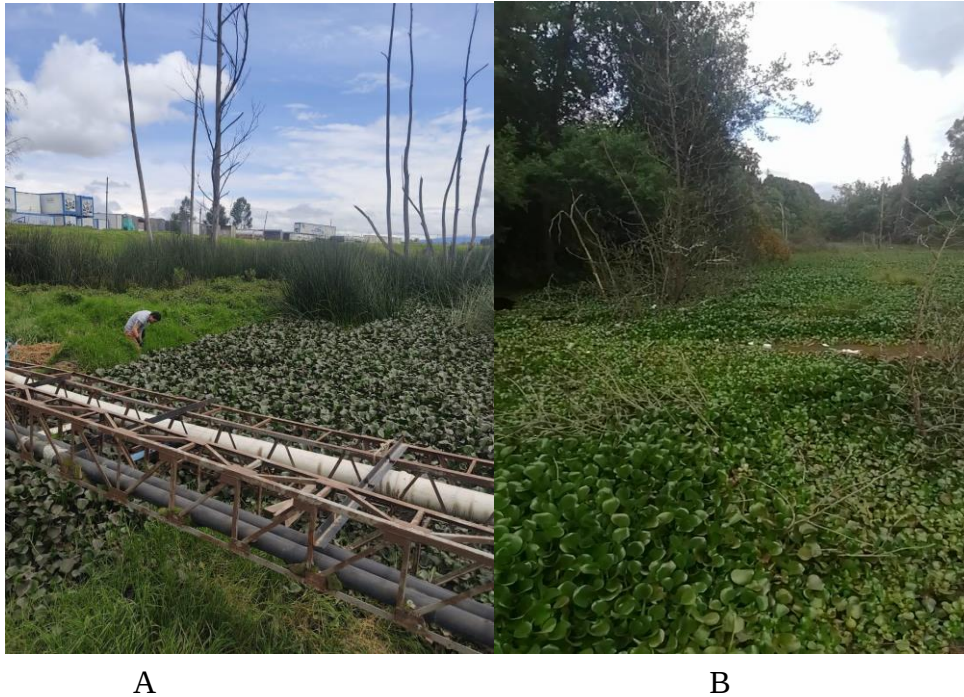


Imagen 2 A) Toma de muestras en el humedal Gualí. B) Toma de muestra humedal Jaboque

Posterior a la toma de muestras, las plantas se llevaron al laboratorio. Se realizó un lavado para retirar residuos del suelo, microorganismos, larvas de insectos y cualquier microbiota asociado a la raíz de la planta de la siguiente forma.

1. Se realizó la higienización de la raíz y de la planta mediante una solución de hipoclorito de sodio al 1.5 %l por 5 min según el método propuesto por Canto (2004) (figura
2. Se lavó con agua abundante hasta eliminar todo el olor a cloro y se dejó la planta sumergida en agua durante 5 minutos.

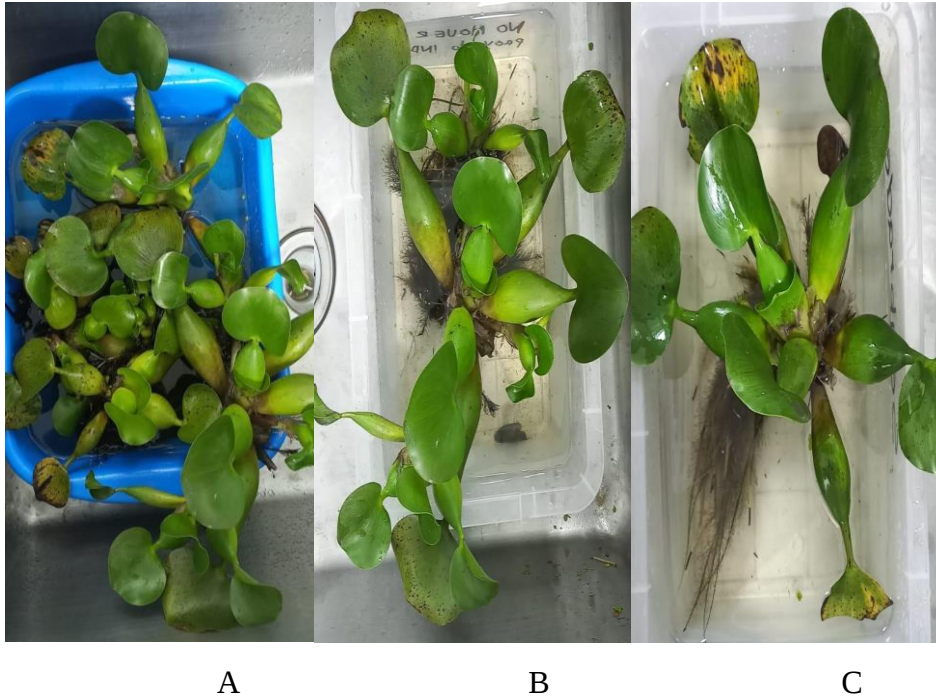


Imagen 3 A agua limpia de la llave lavado inicial, B: lavado con hipoclorito comercial. C: Lavado para retirar el exceso de hipoclorito

Seguido se realizó una aclimatación y estabilización de la planta ([Figura 4](#)); colocando las plantas en contenedores redondos plásticos, los cuales contenían 700 ml de agua y 10 ml de solución Hoagland modificada (Hoagland & Arnon, 1950; Wang & Jia, 2009) por periodos de luz y oscuridad de 12 – 12 horas cada uno durante dos semanas. El agua con la solución Hoagland fue cambiada día de por medio, de acuerdo con la metodología modificada de Montoya Willi *et al* (2015).



Imagen 4 : aclimatación de *E. crassipes* con luz artificial durante 2 semanas.

9.2 Prueba de supervivencia de *Azospirillum brasiliense*

Para determinar la supervivencia de *A. brasiliense*, se cultivó la bacteria usando las mismas concentraciones de Cromo de 100 ppm y 1000 ppm para determinar si *Azospirillum brasiliense* podía sobrevivir a estas concentraciones de Cromo. Se hizo un preparado de las dos concentraciones de Cromo en 50 ml de agua destilada y bacteria, se incubó a 30°C y se realizaron mediciones del crecimiento bacteriano cada hora. Se extrajo un 1 ml y se siembra por extensión en una caja Petri con agar nutritivo con tres repeticiones, este experimento se realizó por 12 horas.

9.3 La inoculación de *Azospirillum brasiliense* y toma de medidas morfométricas

Tres días después de la desinfección y durante el periodo de aclimatación, se escogieron 6 plantas de *E. crassipes* las cuales fueron inoculadas con *Azospirillum brasiliense*, en el rizoma de la planta a una concentración máxima de 11×10^{11} UFC/ml durante 15 minutos (Imagen 5). Para el control se escogieron tres plantas que no fueron inoculadas con *A. brasiliense*. A todas las plantas se les tomaron las variables de altura de la planta (AP), Longitud de la Raíz (LR) y peso fresco (PS) (Imagen 6). Con el propósito de hacer las mediciones constantemente y ver si la planta inoculada y la no inoculada, tienen diferencias al momento de crecer.

El control se realizó, de la siguiente manera, se escogieron inicialmente 3 plantas donde las fueron, no fueron inoculadas con la bacteria, teniendo la concentración de 1000 ppm, esas plantas una vez transcurrido el tiempo fueron desechadas en material peligroso , para el siguiente control, de 100 ppm se colocaron plantas nuevas, donde estas tampoco estaban inoculadas con la bacteria, una vez transcurrido el tiempo del experimento, las plantas fueron desechadas en material peligroso, por su exposición al cromo.



Imagen 5. plantas de *E. crassipes* inoculadas con *Azospirillum brasiliense*, en el rizoma de la planta a una concentración de 11×10^{11} UFC durante 15 días.

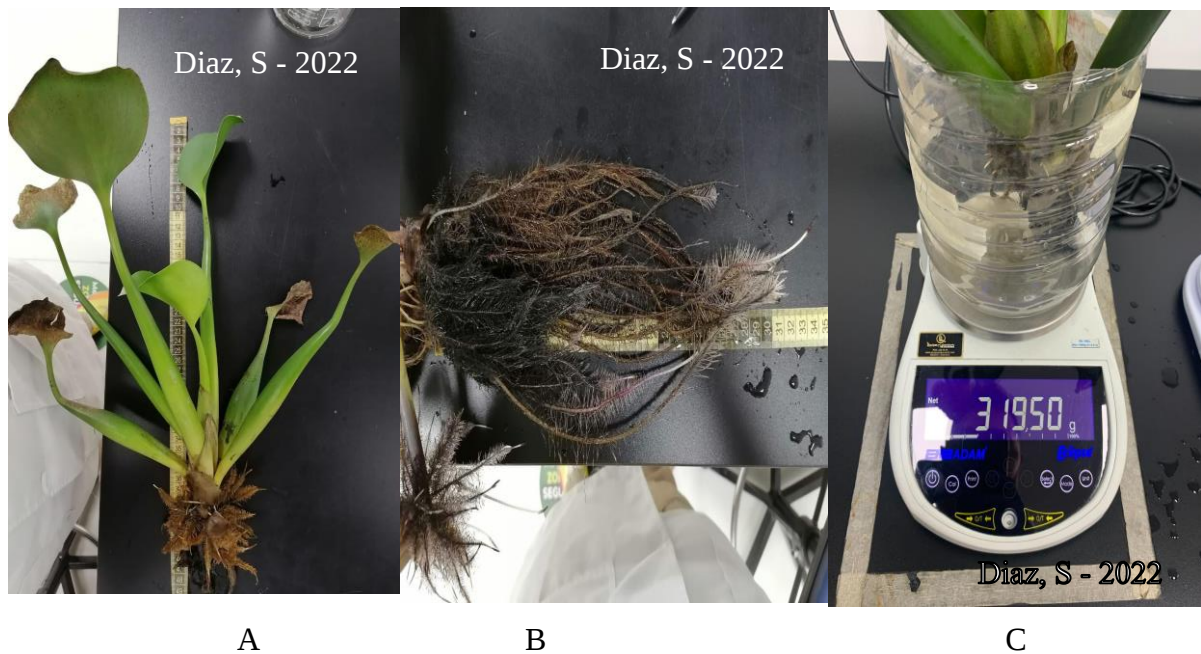


Imagen 6. Variables de *E. crassipes* post-aclimatación. A: altura de la planta (AP), B: Longitud de la Raíz (LR) C: peso fresco (PS).

9.4 Diseño experimental

El diseño propuesto consistió en montar 9 plantas en sistemas independientes en dos concentraciones diferentes de Cromo en 100 ppm y el segundo de 1000 ppm de dicromato de potasio a un volumen mínimo de 500 ml, donde se hizo la medición del volumen en un beaker (Imagen 7^a) para después pasar la planta a unos contenedores redondos plásticos, para tener una homogenización total del experimento, y así mismo logra que todos tuvieran las mismas condiciones, se le realizó una tapa en la parte superior de contenedor cubriendo la raíz con vinipel, para evitar que haya una excesiva evaporación del líquido, por la temperatura que se pueda generar por la luz constante y esto altere los valores de la medición en el equipo. La duración máxima del experimento fue de 96 horas, debido a que durante este tiempo ya se observó que las plantas comenzaron su proceso de marchitamiento.

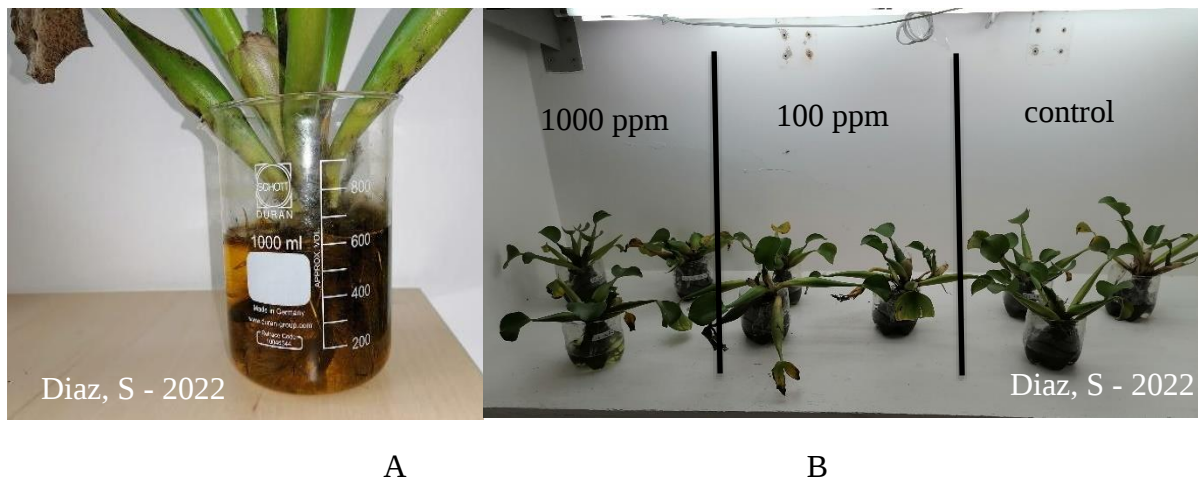


Imagen 7: A) Montaje individual de dicromato de potasio por planta B: Ensayo de bioacumulación de Cr por *E. crassipes*. Cuadrante de la izquierda plantas inoculadas a 1000 ppm de Cromo, cuadrante central, plantas inoculadas a 100 ppm, cuadrante de la derecha, plantas control.

9.5 Preparación de Cromo

Se prepararon 2 soluciones de Cromo a concentraciones de 100mg/L y 1000 mg/L, para un total de 9 unidades experimentales con exposición al metal teniendo 3 de control siendo las plantas que no están inoculada con *A. brasiliense*.

La determinación analítica de la concentración de metal acumulado se llevó a cabo mediante la técnica de Espectrometría, utilizando el espectrofotómetro Thermo scientific modelo GENESYS 10S UV- Vis a una longitud de onda de 470 nm (Imagen 8), reportadas por un barrido de absorbancia que realizo el equipo para determinar cuál era la longitud máxima que tenía las soluciones previamente preparadas. Este barrido el equipo lo realizo automáticamente, midiendo los valores de absorbancias correspondientes a distintas longitudes de onda seleccionadas dentro de un determinado rango de trabajo. Se midió la absorción inicial para 100 ppm de 0.034, para 1000 ppm de 1.375 nm; Se realizó la medida de la absorción cada 24 horas, durante un máximo de 96 horas.

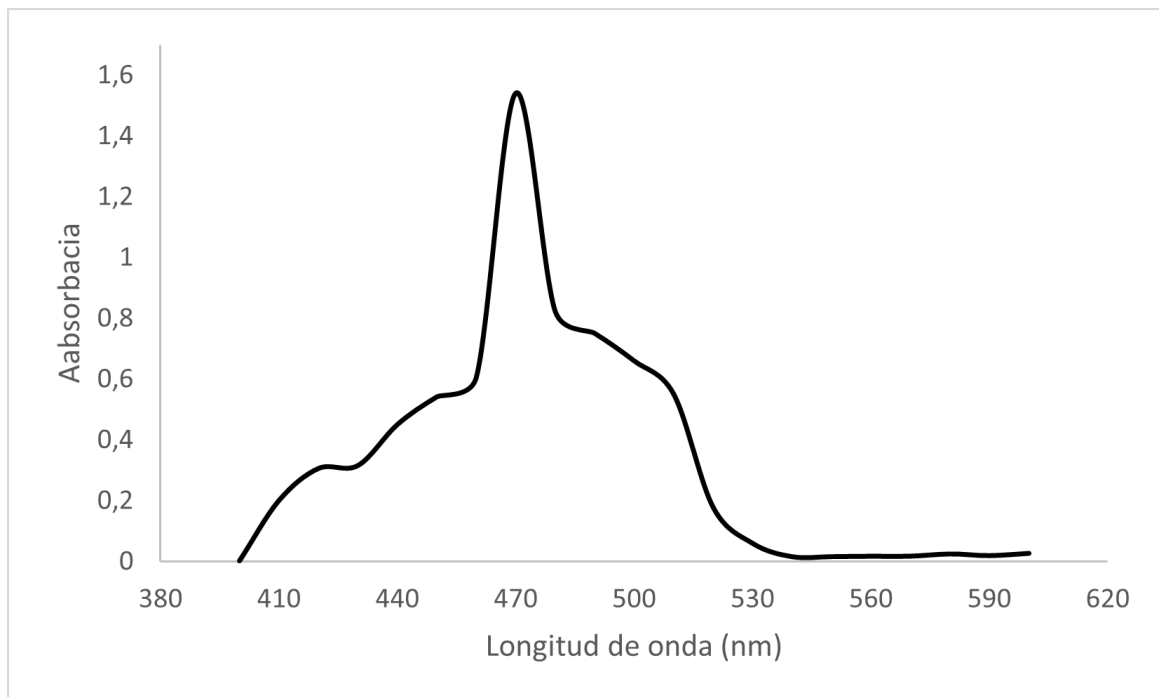


Imagen 7: Curva de longitud de onda del cromo a 2000 ppm. Fuente propia

Se determino la longitud de onda por máxima absorbancia, realizando un barrido en el espectrofotómetro, donde mediante la solución stock de 2000 ppm donde se determinó, que a esta concentración la absorbancia máxima esta en 1.5 a un a longitud de onda de 470 nm. Por este

motivo se utilizó esta longitud de onda para utilizarla en la fase experimental en las dos concentraciones 100 ppm y 1000 ppm.



Imagen 8: preparación de la solución de las 1000 ppm y 100 ppm mediante disoluciones de dicromato de potasio mediante la curva de calibración

Se determinó qué es Cromo mediante la disociación del dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) al momento de entrar en contacto con el agua este se disocia en 2 iones cromato de potasio (K_2CrO_4) formando una coloración naranja de la solución stock, El estado de oxidación del ion cromato es de +6, por lo cual se determinó que esta iba hacer Cromo debido a que solo se encuentra este compuesto en nuestras muestras por qué solo se disolvió en agua destilada.

9.6 Análisis Estadísticos

Se realizó un análisis de varianza (Kruskal – Wallis) de dos vías teniendo como factores: la concentración de Cromo en 1000 PPM y 100 ppm con cinco niveles cada una, 0, 24, 48, 72 y 96 horas, con un total de 9 plantas ($N = 9$) por tratamiento. Posteriormente se realizaron las comparaciones post - hoc mediante la prueba *t* student ($P < 0.05$), con el fin de evaluar las

diferencias significativas entre las concentraciones (100 ppm y 1000 ppm), el Control. Además de las diferencias significativas que hay entre los tiempos. Los análisis estadísticos se probaron a un nivel de significancia de 95% usando los programas estadísticos de RStudio e IBM SPSS, versión 4.2.1.

10 Resultados y discusión

10.1 Supervivencia de *Azospirillum brasiliense* en Cromo

Se realizó la prueba de viabilidad de *Azospirillum brasiliense* a una concentración de 100ppm y 1000 ppm en Agar nutritivo durante 24 horas por triplicado y donde se evidenció el crecimiento bacteriano durante todas las cajas

10.2 Barrido y Curva de calibración

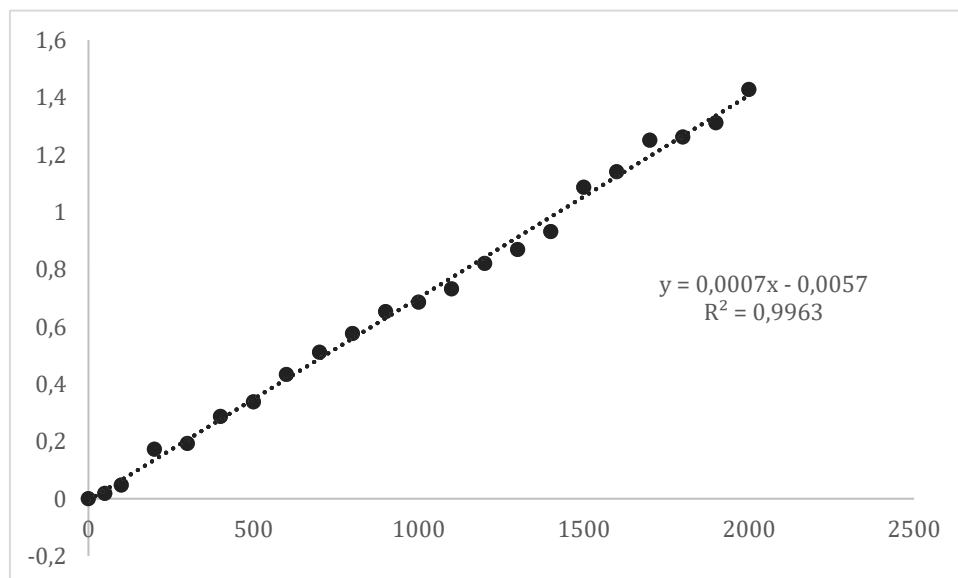


Figura 1: Curva de calibración del Cr. Fuente: propia

Se realizó la curva de calibración a una concentración máxima de 2000 ppm a una longitud de onda de 470 nm usando un espectrofotómetro Thermo Scientific Modelo GENESYS 10S UV- Vis. Donde cada punto que se encuentra en esta grafica son los puntos de la medición de las partes por 15

millón, al llegar a un máximo de 2000 ppm. Según Rodríguez y colaboradores (2002) determinaron que la sensibilidad óptima de Cr (III) y Cromo se encuentra en el rango 373 nm, para una concentración máxima de 0.4 ppm. Se realizó un barrido mediante el equipo para determinar la longitud onda máxima de la muestra de agua contaminada con Cromo, así saber cuál es la longitud de onda más adecuada para poder configurar la curva de calibración, por la concentración tan elevada que se manejó durante el experimento, el equipo arrojó el valor de 470 nm era la longitud de onda óptima para muestras de agua contaminada con Cromo.

10.3 *Clorosis foliar de las plantas de Eichhornia crassipes inoculadas con Azospirillum brasiliense con las dos concentraciones de Cromo transcurridas durante las fases del experimento.*



Imagen 9: fase final de ensayo de bioacumulación de Cr por *E. crassipes* a las 360 horas

Podemos observar que, una vez transcurrido las 96 horas de la fase experimental de los dos tratamientos, se puede ver una disminución del volumen inicial de los 500 ml de Cromo, además se puede ver que las plantas ya tienen un estado de clorosis avanzado, y muchas plantas se encuentran en marchitamiento total. Esto es debido a que las plantas fueron sometidas a un estrés

por anegamiento de nutrientes presentes en cuerpos de agua donde se encuentra este tipo planta. Podemos evidenciar en el círculo rojo (Imagen 9) para el control, que estas plantas son la planta de control, donde se ve claramente que estas ya se encuentran en un estado muy avanzado de necrosis, donde se evidencia que algunas plantas perdieron sus hojas, otras hicieron un plegamiento de estas y una decoloración total de la planta.



Imagen 10: plantas de *E. crassipes* después de 360 horas

Como se ve en las imágenes, se ve un deterioro avanzado de las plantas, ya hasta considerarse que las mismas se encuentran en un estado total de necrosis. El estrés y anegamiento de nutrientes que fue sometida la planta con el fin de mirar cómo era el comportamiento morfológico hasta que la misma llegara a su estado de necrosis o hasta que los 500 ml de volumen inicial, fuera absorbido totalmente por la planta y tener tiempo máximo en horas para mirar la absorción de la misma planta.

Una vez transcurrido las 96 horas, se determinó que las plantas ya se encontraban en su absorción máxima tolerable por ellas. Ya que, al continuar con la medición de la absorbancia del equipo, esta no variaba. Mediante los resultados de Zayed y Terry en el 2003, determina *E. crassipes* capta del 10 al 25 % del cromo biodisponible para ser translocable a la parte aérea de la planta. Por esto se determinó dejar la medición de absorbancia durante las 96 horas, además que a esta hora ya la planta ya tenía un proceso de clorosis avanzado en la mayoría de sus estructuras vegetativas de la planta.



Imagen 11 : Proceso de clorosis o muerte de la hoja de *E. crassipes* a lo largo del tiempo. a) 0 horas, b) 24 horas, c) 48 horas, d) 72 horas, e) 96 horas

Podemos evidenciar que la planta (Imagen 12) a lo largo del tiempo va generando un marchitamiento; inicialmente se ve que este proceso inicia en las hojas, cuya fase inicial empieza a las 24 horas, donde esta estructura genera un plegamiento de la hoja o una ruptura de esta, y una

fase temprana de decoloración donde se realizó esta modificación. Posterior a esto se puede ver un deterioro marcado de las hojas, hasta llegar un estado avanzado de descoloramiento de la hoja, una necrosis ya marcada, y una posible muerte de la estructura vegetativa. El bulbo se ve poco afectado por estos cambios, ya que el proceso de marchitamiento es más lento por el tipo de parénquima aerífero que esta planta posee, ya que al tener los grandes espacios intercelulares que están vacíos, con la finalidad de que pueda realizar una circulación de gases para que la planta tenga una flotabilidad, es un poco más difícil que esta se degrade rápidamente.

10.4 *E. crassipes* en concentración de 1000 ppm

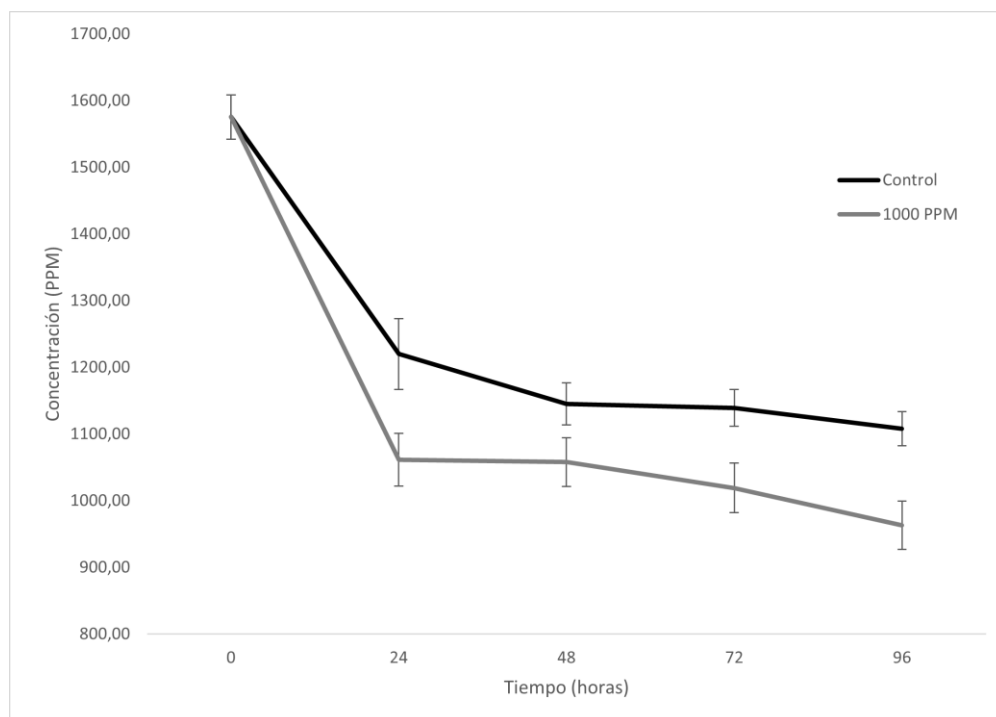


Figura 2 resultado entre tratamiento 1000ppm de Cromo y el control. Promedios seguidos de letras distintas presentan diferencias estadísticas significativas según la prueba t-student ($P < 0.05$) fuente propia

Se observó con el tiempo una mayor absorción de Cromo en las primeras 24 h, con un valor inicial 514 ppm siendo superior el tratamiento, al control el cual fue tuvo una absorción inicial de 355

ppm. Con el paso del tiempo del experimento, se puede observar que las plantas inoculadas con *A. brasiliense* mantiene la absorción hasta 96 horas con una diferencia significativa realizada entre los tiempos; el grupo control mantiene la absorción constante determinada por las diferencias significativas arrojadas por el t-studen donde se puede evidenciar que una vez transcurrido las 48 horas no hay diferencias significativas marcadas entre los tiempos; a lo largo del tiempo, se puede ver que el tratamiento es superior al control, lo cual es positivo, ya que lo descrito por

Mesa Olga (2011), que afirmaron que las plantas de *E. crassipes* absorbían más en concentraciones superiores a 1.5 mg/l de Cromo. Además, según lo informado por Zhou y colaboradores (2020), la absorción y acumulación de metales pesados tales como: (Pb), Zn, Cd y Mn en *E. crassipes* a concentraciones de 1 mg/L, 2 mg/L, 0,02 mg/L y 0,2 mg/L, respectivamente, *E. crassipes* eliminó Pb y Mn del agua, con alta eficiencia en el primer ocho días la tasa de eliminación alcanzó el 79,5%. Siendo la raíz el órgano con mayor acumulación de elementos químicos Pb, Zn, Cd y Mn. Cromo es metal acumulado que perturba la morfología de los bulbos y las hojas más que las raíces de las plantas. (Rani, 2015).

	Control mg/L	1000 mg/L
0	1.575	1.575
24	1.219	1.061
48	1.145	1.057
72	1.138	1.019
96	1.108	0.963

Tabla 1 Valores de absorción de la planta al tratamiento de 1000 ppm y en control respecto transformados en unidades mg/L,

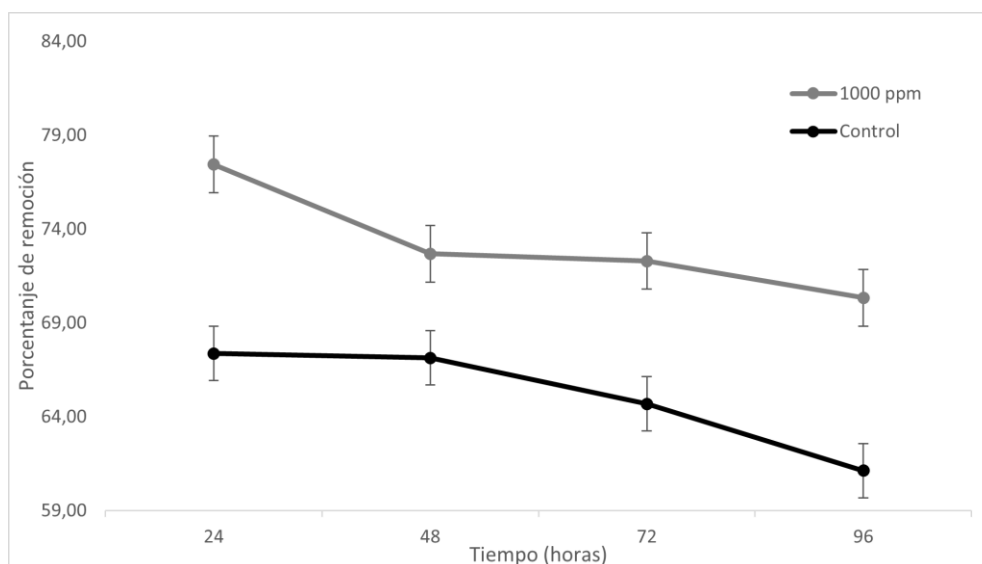


Figura 3: Porcentaje de remoción de *Eichhornia crassipes* vs el control a lo largo del tiempo fuente propia.

Se puede observar las plantas que se encuentran inoculada con *Azospirillum brasiliense*, a una concentración de 1000 ppm de Cromo tuvieron el porcentaje de remoción de un 75% frente a la concentración inicial que se encontraba en las dos concentraciones, no se realizaron los estudios fisiológicos en la planta para determinar para corroborar el porcentaje de remoción. Las primeras 24 horas, el grupo control su porcentaje de remoción fue de 67%, habiendo una diferencia aproximada de 5%, entre los tratamientos, mantienen una constante del porcentaje de absorción a lo largo del tiempo. Según Poma, y colaboradores (2014), nos dice que la planta de *E. crassipes* tiene una mayor absorción durante las primeras 24 horas de cadmio (II), mercurio (II) y mantienen una estabilización constante hasta finalizar el experimento. Estos valores muestran que hay una mayor estabilidad entre ambos tratamientos; sin embargo, se debe tener en cuenta otros factores como la solubilidad del ion metálico, lo cual genera una energía entre los enlaces entre el ion metálico y la accesibilidad del metal al nucleófilo, siendo este último factor más favorable para el Cromo.

10.5 *E. crassipes* en concentración de 100 ppm Cromo

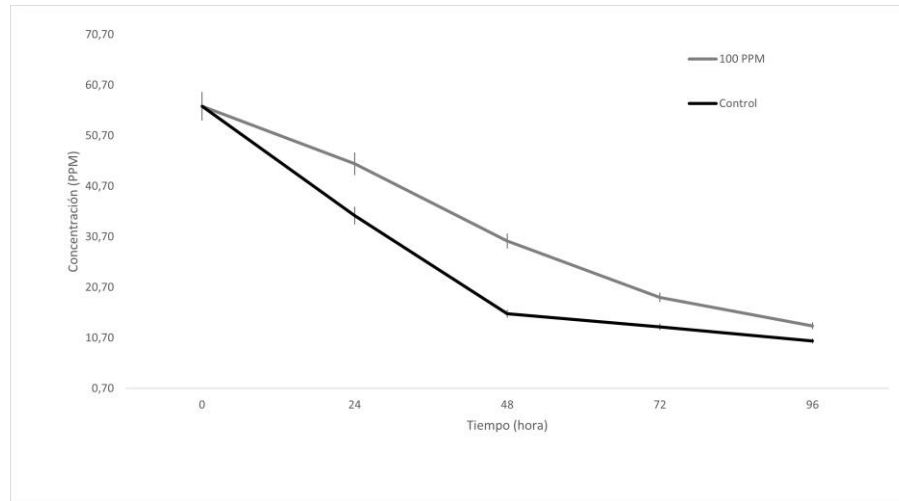


Figura 4: resultado entre tratamiento 100 ppm de Cromo y el control. Promedios seguidos de letras distintas presentan diferencias estadísticas significativas según la prueba tstudent ($P < 0.05$)
Fuente propia

E. crassipes al ser inoculada con *A. brasiliense*, se puede observar una menor absorción de Cr durante toda la fase del experimento, pero se mantiene constante durante las 96 horas de experimento, pero con respecto al control, se puede ver que durante las primeras 48 horas una absorción constante significativamente validada por la prueba estadística tstudent; además Mesa Olga (2011), afirmaron que las plantas de *E. crassipes* absorbían más en concentraciones superiores a 1.5 mg/l de Cromo. Por este motivo, se puede ver que pese a que *A. brasiliense*, ayuda a la planta a generar una mayor bioacumulación de este metal, generando una biopelícula frente a condiciones de estrés como lo propone Salcedo, F., 2017, siendo causada por las diferentes concentraciones de cromo utilizadas en este experimento, se puede ver que a concentraciones bajas del Cromo no ayuda a la planta. Por lo contrario, hace que el tratamiento tenga una menor bioacumulación en la planta, también lo podemos comprar con los resultados de Medina Lonida (2019) donde

encontraron que la máxima cantidad de Cromo es absorbido en las primeras 48 horas de exposición, luego disminuyó a 1,28 mg/l por debajo del máximo admisible. Puede que *A. brasiliense* necesite más concentración de cromo, para que sea activada su función de protección y bioacumulación propuesto por Salcedo, F., 2017

	100 mg/L	Control mg/L
0	0.0565	0.0565
24	0.0451	0.0348
48	0.0298	0.0154
72	0.0187	0.0128
96	0.0130	0.0101

Tabla 2 Valores de absorción de la planta al tratamiento de 100 ppm y en control respectivo transformados en unidades mg/L. fuente propia

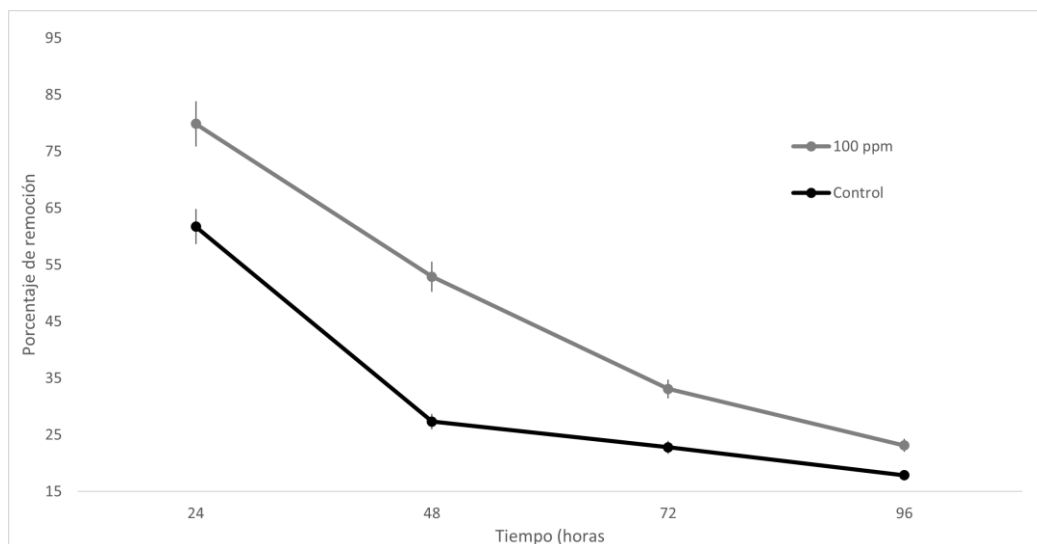


Figura 5 Porcentaje de remoción de *Eichhornia crassipes* vs el control a lo largo del tiempo. Fuente propia

Se puede observar claramente que el tratamiento de 100 ppm de Cromo, Tiene 80% de absorción de Cromo, siendo mayor que al control (62%), teniendo una diferencia aproximada de 18%, los

tratamientos no mantienen una constante a lo largo del tiempo como lo hace a 1000 ppm, después de las 48 horas, adquiere la constante de disminución de 52% para el cromo a 100 ppm y una de 27% para el control, durante lo restante de la fase experimental; A comparación del cromo si mantiene una disminución de la reducción del porcentaje de absorción hasta llegar a las 72 horas ya después adquiere una constante de un 33% lo restante de la fase experimental, finalizando en un 23% para el cromo a 100 ppm y 18% para el control. Según los resultados de Medina Garcia, Leonida *et al*, se 2019 Se encontró que, en el primer día de exposición, después de 48 horas, la absorción máxima de Cromo disminuyó a 1,28 mg/l, que está por debajo de la cantidad máxima de efluente que se puede descargar al cauce, y se mantuvo constante en la solución residual. por el resto del período de prueba.

La inoculación de plantas con PGPR como *A. brasiliense*, brinda protección al estrés biótico y mejora la tolerancia al estrés abiótico como la sequía, la salinidad y la toxicidad de metales pesados (Dimkpa et al. 2009). Además, como lo dice Salcedo, F., 2017 que se requiere haya un nivel fuerte de estrés para que *A. brasiliense* active sus mecanismos de protección y tolerancia a la raíz. Por este motivo, se evidencio que *A. brasiliense* ayuda a *E. crassipes* que tenga una mayor absorción de Cromo durante toda la fase experimental a 1000 ppm frente a su contra parte de control. Pero para 100 ppm, se determinó que *A. brasiliense* no ayuda a la planta de *E. crassipes* a absorción de Cromo. A lo largo de la fase experimental.

Azospirillum, otra bacteria del suelo proteobacteria del subgrupo alfa, coloniza y promueve el crecimiento de las raíces de muchos cultivos económicamente importantes como el trigo, el arroz y el maíz. *Azospirillum* spp. son bacterias fijadoras de nitrógeno que convierten el nitrógeno, y algunas de ellas tienen muchas propiedades beneficiosas para las plantas, como la producción de hormonas vegetales como auxinas, citoquininas, giberelinas y otros reguladores del crecimiento

vegetal como el ácido abscísico y el ácido nítrico. ácido. óxido, ACC desaminasa activa, fijación asociativa de nitrógeno y control de plantas y bacterias parásitas (Combes-Meynet et al., 2011; Puente et al. 2019)

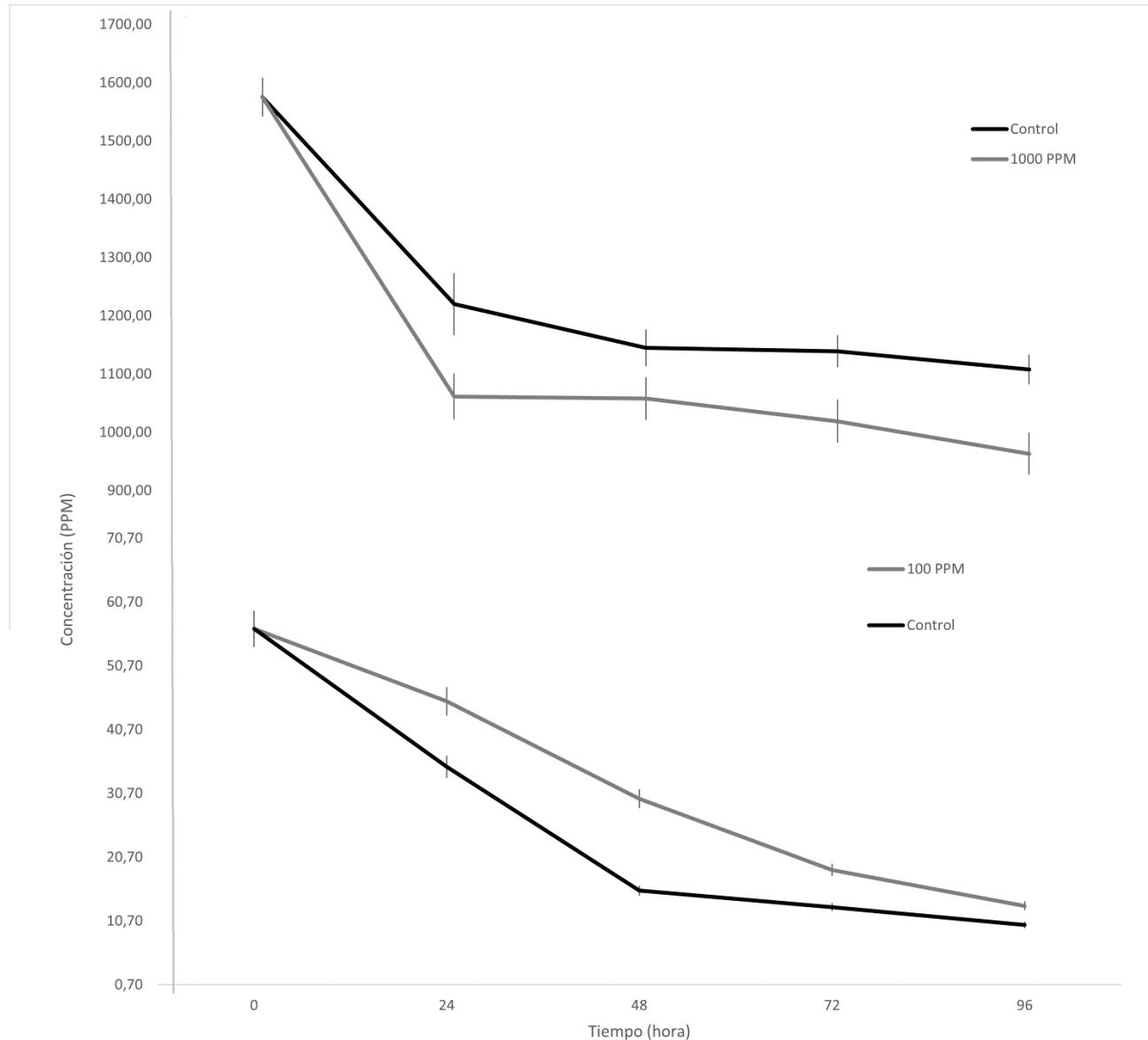


Figura 6: diferentes concentraciones de las dos concentraciones de los tratamientos fuente propia

Podemos observar que la absorbancia de los dos tratamientos podemos comprobar que el tratamiento de 1000 ppm es más eficiente que su contraparte de 100 ppm, donde es más eficiente.

Por este motivo se sugiere que las plantas inoculadas con la bacteria y fueron sometidas a la concentración más alta, generó un mayor estrés, lo que suponemos que la bacteria pudo generar una biopelícula, pero requerimos realizar más estudio para determinar como la bacteria genera la bioprotección en la planta.

11 Conclusiones

- El crecimiento de la planta *Eichhornia crassipes* inoculado con *Azospirillum brasiliense* en los tratamientos de control y en las dos concentraciones de cromo, no presentaron diferencias significativas referente al crecimiento, pero si al momento de la absorción. Por esto se cree por literatura que la bacteria pudo generar una biopelícula para ayudar a realizar una absorción de Cromo en los diferentes tratamientos. puesto que la planta al estar a las 1000 ppm tiene un mayor pudiendo activar la protección de la planta como es descrito en bibliografía.
- La máxima concentración tolerable por las plantas de *Eichhornia crassipes* fue a 1000 ppm, pese que las plantas en ambos tratamientos, empezaban su proceso de marchitamiento similar, las plantas que estaban en tratamiento de 100 ppm empezaban su proceso rápidamente, que su contraparte de 1000 ppm, además las plantas que eran de control siendo las plantas siendo iguales bajo las dos concentraciones de cromo trabajadas sin ser inoculadas con la bacteria, su proceso de marchitamiento a las 96 horas casi total, por esto se puede corroborar que *Azospirillum brasiliense* generó una ayuda en la protección y bioacumulación a las 1000 ppm de Cromo
- *Eichhornia crassipes* inoculada con *Azospirillum brasiliense* realizaron eliminaciones importantes de Cromo a 1000 ppm, pero se sugiere que este proceso sea tomado como una

fase inicial, ya que requiere ser extraído constantemente para controlar la población y además debe complementarse mediante una PTAR, para poder remover todo el cromo presente en los cuerpos hídricos para así mismo poder ayudar a que se cumpla la norma 631 de 2015.

- Se estableció que la concentración máxima de Cromo que es +6 debido a la electronegatividad del ion cromato de potasio, y se disocian en agua destilada, siendo la máxima tolerancia de la planta *Eichhornia crassipes* es de 1.5mg/L, después de 96 horas, la planta empieza con su proceso de marchitamiento, donde las hojas empiezan a ponerse amarillas, el bulbos o tallos pierden su rigidez estructural.

10 Bibliografía

- ANDERSON, K. & S. E. AZCÁRATE. 2005. Strategic Environmental Assessment Pre-Study of Sonso Lagoon, (Colombia). TRITA-LWR Master Thesis. Sveriges Största Tekniska Universitet. Estocolmo.
- Apha-Awwa-Wef. 2012. "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater". 22th Edition. USA, 3-67 y 3-68, method 3500-Cr B
- Arruebarrena Di Palma A, Pereyra CM, Moreno Ramirez L, Xiqui Vazquez ML, Baca BE, Pereyra MA, Lamattina L, Creus CM (2013) Denitrification-derived nitric oxide modulates biofilm formation in *Azospirillum brasilense*. FEMS microbiology letters 338 (1):77-85. doi:10.1111/1574-6968.12030
- Assmus B, Hutzler P, Kirchhof G, Amann R, Lawrence JR, Hartmann A (1995) In Situ Localization of *Azospirillum brasilense* in the Rhizosphere of Wheat with Fluorescently

Labeled, rRNATargeted Oligonucleotide Probes and Scanning Confocal Laser Microscopy.

Applied and environmental microbiology 61 (3):1013-1019

- Bashan Y, de-Bashan LE. 2010. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth-a critical assessment. En: Sparks DL, editor. Advances in Agronomy. Estados Unidos, Academic Press. P. 77-136. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(10\)08002-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(10)08002-8)
- Bashan Y, Holguin G, De-Bashan LE (2004) *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). Canadian journal of microbiology 50 (8):521-577
- Benites Ricardo, Calero Victor, Peña Enrique, Martin Jaime, 2011. Evaluación de la cinética de la acumulación de Cromo en el buchón de agua (*Eichhornia crassipes*) Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustriail Vol. 9 No. 2 (66 – 73) Julio – Diciembre 2011
- Bianco C, Imperlini E, Calogero R, Senatore B, Amoresano A, Carpentieri A, Pucci P, Defez R (2006) Indole-3-acetic acid improves *Escherichia coli*'s defences to stress. Arch Microbiol 185 (5):373-382. doi:10.1007/s00203-006-0103
- BRITO-PAIVA, L., J. GONCALVES DE OLIVEIRA, R. A. AZEVEDO, D. RODRIGUES-RIBEIRO, M. GOMES DA SILVA & A. P. VITÓRIA. 2009. Ecophysiological Responses of Water Hyacinth Exposed to Cr+3 and Cr+6 Environmental and Experimental Botany, 65: 403–409.
- Burdman S, Okon Y, Jurkevitch E (2000) Surface characteristics of *Azospirillum brasilense* in relation to cell aggregation and attachment to plant roots. Critical reviews in microbiology 26 (2):91-110
- Camelo M, Vera SP, Bonilla RR. 2011. Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. Ciencia & Tecnología Agropecuaria 12: 159-166.

- Canto Martín, J.C.; Medina Peralta, S.; Morales Avelino, D. Efecto de la inoculación con *Azospirillum* sp. en plantas de Chile habanero (*Capsicum chinense jacquin*) Tropical and Subtropical Agroecosystems, vol. 4, núm. 1, 2004, pp. 21-27 Universidad Autónoma de Yucatán Mérida, Yucatán, México
- Carreño Uriel 2016 Diseño y evaluación de un biosistema de tratamiento a escala
- Cerqueira FD (2015) Biofilm formation by *Azospirillum brasilense*: microbial socialization in the rhizosphere
- Cortes G. “*Lineamientos para el control de calidad analítica*”. Ed. Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales IDEAM. Colombia, p.11, 1999.
- De-Bashan LE, Holguin G, Glick BR, Bashan Y, Ferrera-Cerrato R, Alarcón R (2007) Bacterias promotoras de crecimiento en plantas para propósitos agrícolas y ambientales. Microbiología agrícola. Hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico, plantamicroorganismo. México: Editorial Trillas:170-224
- Dimkpa C, Weinand T, Asch F (2009) Plant–rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. Plant, cell & environment 32 (12):1682-1694
- DUBE, B. K., P. SINHA, R. GOPAL & C. CHATTERJEE. 2005. Chromium Phytotoxicity Alters Metabolism in Radish. Journal of Vegetable Crop Production, 10(2): 61–71.
- EBEL, M., M. W. H. EVANGELOU & A. SCHAEF FER. 2007. Cyanide Phytoremediation by Water Hyacinths (*Eichhornia crassipes*). Chemosphere, 66: 816–823.
- Fukami, Josiane; Cerezini, Paula & Hungria, Mariangela. *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. AMB Expr. 8:73, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0608-1>.
- GARDEA-TORRESDEY, J. L., G. DE LA ROSA, J. R. PERALTA-VIDEA, M. MONTES, G. CRUZ JIMENEZ & I. CANO-AGUILERA. 2010. Differential Uptake and Transport of

- Trivalent and Hexavalent Chromium by Tumbleweed (*Salsola kali*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 48: 225–232.
- GISCHLER, CH. 2005. Pathways of Heavy Metals and Implications for Stakeholders, Sonso Lagoon, Colombia. TRITA-LWR Master Thesis. Sveriges Största Tekniska Universitet. Estocolmo.
 - GOMEZ-SCHOUBEN, C. Aprovechamiento del buchón de agua *Eichhornia crassipes* como enmienda orgánica en el Ecoparque Lago de las Garzas. Tesis de Maestría en Biología]. Cali (Colombia) Universidad del Valle. 2005 o 116
 - GRUBER, H., A. WIESSNER, P. KUSCHK, M. KAESTNER & K. J. APPENROTH. 2008. Physiological Responses of *Juncus effusus* (Rush) to Chromium and Relevance for Wastewater Treatment in Constructed Wetlands. *International Journal of Phytoremediation*, 10(2): 79–90.
 - Gururani MA, Upadhyaya CP, Baskar V, Venkatesh J, Nookaraju A, Park SW (2013) Plant growthpromoting rhizobacteria enhance abiotic stress tolerance in *Solanum tuberosum* through inducing changes in the expression of ROS-scavenging enzymes and improved photosynthetic performance. *Journal of Plant Growth Regulation* 32 (2):245-258
 - HOAGLAND, D. R. & H. I. ARNON. 1950. The Water Culture Method for Growing Plants Without Soil. California Agricultural Experimental Station Circular.
 - KSHEMINSKA, H., D. FEDOROVYCH, L., BABYAK, D., YANOVYCH, P. KASZYCKI & H. KOLOCZEK. 2005. Chromium (III) and (VI) Tolerance and Bioaccumulation in Yeast: A Survey of Cellular Chromium Content in Selected Strains of Representative Genera. *Process Biochemistry*, 40: 1565–1572.
 - Licea-Herrera JI, Quiroz-Velásquez JDC, Hernández-Mendoza JL. 2020. Impacto de *Azospirillum Brasilense*, una rizobacteria que estimula la producción del Ácido Indol-3-

Acético como el mecanismo de mejora del crecimiento de las plantas en los cultivos agrícolas.

Revista Boliviana de Química 37: 34-39.

- Medina Garcia Leonida, Ferreira Francisco Paulo, Kurita Oyamada Hajime Guillermo, Rodríguez Bonet Sergio, Galeano Edgar Fidel, Viera Mariza R.. Fitorremediación de Cromo en efluente de curtiembre empleando *Eichhornia crassipes*. Rep. cient. FACEN [Internet]. 2019 June [cited 2022 Nov 07] ; 10(1): 25-36. Available from: http://scielo.iics.una.py/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2222-145X2019000100025&lng=en. <https://doi.org/10.18004/rcfacen.2019.10.1.25>.
- Montoya-Palomino, W., Peña-Salamanca, E. J., & Torres-Rodríguez, G. A. (2015). Variaciones ultraestructurales inducidas por Cromo en hojas de jacinto acuático (*Eichhornia crassipes*). *Limnetica*, 34(1), 85-94.
- Oliveira, I.; Fontes, J. R. A.; Pereira, B. F. F. & Muñiz, A. W. Inoculation with increases maize yield. Chem. Biol. Technol. Agric. 5:6, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40538-018-0118-z>.
- Onyanchaa D.; Mavurab J.; Ngilac C. (2008). Studies of chromium removal from tannery wastewaters by algae biosorbents, *Spirogyra condensata* and *Rhizoclonium hieroglyphicum*
- Padma S.; Dhara B. (2008). Phyto-remediation of chrome-VI of tannery effluent by *Trichoderma* species. Padmapriya, G., & Murugesan, A. G. (2015). Biosorption of copper ions using rhizoplane bacterial isolates isolated from *Eichhornia crassipes* ((Mart.) Solms) with kinetic studies. *Desalination and Water Treatment*, 53(13), 3513-3520.
- PEÑA-SALAMANCA, E., J.R. CANTERA & E. MUÑOZ. 2012. Evaluación de la contaminación en ecosistemas acuáticos: un estudio de caso en la laguna de Sonso, cuenca alta del Río Cauca. Programa Editorial Universidad del Valle.
- PETTINE, M., L. D'OTTONE, L. CAMPANELLA, F. J. MILLERO & R. PASSINO. 1998. The Reduction of Chromium (VI) by Iron (II) in Aqueous Solutions. *Geochimica et*

- Cosmochimica Acta, 62(9):1509–1519. piloto de aguas de curtiembres a través de la *Eichhornia crassipes* DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v18n2.52271
- Poma Llantoy, Víctor Raúl, & Valderrama Negrón, Ana C.. (2014). Study of physicochemical parameters for cadmium (ii) and mercury (ii) phytoremediation using the specie *Eichhornia Crassipes* (water hyacinth). *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 80(3), 164-173. Recuperado en 07 de noviembre de 2022, de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2014000300003&lng=es&tlng=en
 - R. Lora y H. Bonilla. “Remediación de un suelo de la cuenca alta del río Bogotá contaminado con los metales pesados cadmio y Cromo”. *Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient.* 13 (2), pp. 61-70, 2010
 - Ramos HJ, Roncato-Maccari LD, Souza EM, Soares-Ramos JR, Hungria M, Pedrosa FO (2002) Monitoring *Azospirillum*-wheat interactions using the *gfp* and *gusA* genes constitutively expressed from a new broad-host range vector. *Journal of Biotechnology* 97 (3):243-252
 - Rani, S. S. (2015). Comparative study of surface modified carbonized *Eichhornia crassipes* for adsorption of dye safranin. *Separation Science and Technology*, 2436-2447
 - Rodríguez, C., Gómez, H., & Reátegui, S. (2002). ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD ESPECTROFOTOMÉTRICA DEL CROMO (III) Y DEL CROMO. *Revista Peruana de Química e Ingeniería Química*, 5(1), 29-36.
 - Rojas-Tapias D, Moreno-Galván A, Pardo-Díaz S, Obando M, Rivera D, Bonilla R (2012) Effect of inoculation with plant growth-promoting bacteria (PGPB) on amelioration of saline stress in maize (*Zea mays*). *Applied Soil Ecology* 61:264-272.
 - Salcedo, M. F. (2017). Formación de biopelícula por *Azospirillum brasilense*: regulación por óxido nítrico y auxinas, interacción con *Pseudomonas protegens*.

- Severiche Sierra Carlos Alberto, González García Humberto 2013 – VERIFICACIÓN ANALÍTICA PARA LAS DETERMINACIONES DE CROMO HEXAVALENTE EN AGUAS POR ESPECTROFOTOMETRÍA Ing. USBMed, Vol. 4, No. 1, Enero-Junio 2013
- Sidhu, G. P. S. (2016). Heavy metal toxicity in soils: Sources, remediation technologies and challenges. *Advances in Plants & Agriculture Research*, 5(1), 1-2.
- VARÓN-LÓPEZ, A. 2009. Dinámica y Distribución de la Contaminación por Cromo, Plomo y Mercurio, en Especies Representativas de la Laguna de Sonso. (Cali-Colombia). Tesis de grado en Química. Universidad del Valle, Colombia.
- Velarde H; Zavaleta A; Aguilar Q.(2013). Estudio de la absorción del ión Cromo VI con jacinto de agua (*Eichhornia crassipes*). Universidad Nacional de Trujillo. 2 encuentro de investigadores.
- Yang J, Kloepper JW, Ryu C-M (2009) Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends in plant science* 14 (1):1-4
- Yang J, Kloepper JW, Ryu C-M (2009) Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends in plant science* 14 (1):1-4
- ZAYED, A. M. & N. TERRY. 2003. Chromium in the Environment: Factors Affecting Biological Remediation. *Plant and Soil*, 249: 139–156.
- Zhao, L., Cao, X., Zheng, W., Scott, J. W., Sharma, B. K., & Chen, X. (2016). Copyrolysis of biomass with phosphate fertilizers to improve biochar carbon retention, slow nutrient release, and stabilize heavy metals in soil. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 4(3), 1630-1636
- Zhu G-Y, Dobbelaere S, Vanderleyden J (2002) Use of green fluorescent protein to visualize rice root colonization by *Azospirillum irakense* and *A. brasilense*. *Functional plant biology* 29 (11):1279-1285

11. Anexos

1. Tabla de datos a 1000 ppm

Tiempo	Repeticiones	Control	CromoMAs
0	1	1377	1377
0	2	1377	1377
0	3	1377	1377
0	4	1377	1377
0	5	1377	1377
0	6	1377	1377
0	7	1972	1972
0	8	1972	1972
0	9	1972	1972
24	1	963	963
24	2	814	814
24	3	923	923
24	4	953	851
24	5	824	787
24	6	1599	1823
24	7	1687	1927
24	8	1378	1808
24	9	943	866
48	1	1029	1029
48	2	851	851
48	3	1035	1035
48	4	1059	888
48	5	871	692
48	6	1583	1310
48	7	1642	1695
48	8	1190	1508
48	9	1045	962
72	1	1079	1079
72	2	861	861
72	3	1101	1101
72	4	1079	733
72	5	1488	1252
72	6	1561	1634
72	7	1140	1491
72	8	821	719
72	9	1121	772

96	1	1039	1039
96	2	800	800
96	3	1141	1141
96	4	1415	1195
96	5	1460	1532
96	6	1108	1358
96	7	1069	662
96	8	790	606
96	9	1151	730

2. Análisis estadísticos iniciales para 1000 ppm vs control.

Shapiro wilk				
Cr	W =	0.93007	p-value =	0.009434
Control	W =	0.92152	p-value =	0.004763

Tabla 1: análisis Shapiro wilk realizado por el software Rstudio Donde se rechaza la hipótesis nula siendo valores inferiores inferiores a $p = 0.05$

Kruskal-Wallis rank sum test							
data: CromoMAs by Tiempo							
Cr	Kruskal-Wallis	chi-squared =	11.331,00	df =	4	p-value =	0.02309
Control	Kruskal-Wallis	chi-squared =	96.525	df =	4	p-value =	0.04671

Tabla 2: Resultados de la prueba Kruskal – Wallis realizado por el software R estudio donde no se rechaza hipótesis alternativa

3. Prueba T studen para 1000 ppm y control

→ Prueba T

[Conjunto_de_datos0]

Estadísticos de grupo

	repeticiones	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
Cr	1,00	5	1097,4000	161,76155	72,34197
	2,00	5	940,6000	245,25762	109,68254
control	1,00	5	1097,4000	161,76155	72,34197
	2,00	5	940,6000	245,25762	109,68254

Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
									Inferior	Superior
Cr	Se han asumido varianzas iguales	,603	,460	1,193	8	,267	156,80000	131,39110	-146,18841	459,78841
	No se han asumido varianzas iguales			1,193	6,926	,272	156,80000	131,39110	-154,56153	468,16153
control	Se han asumido varianzas iguales	,603	,460	1,193	8	,267	156,80000	131,39110	-146,18841	459,78841
	No se han asumido varianzas iguales			1,193	6,926	,272	156,80000	131,39110	-154,56153	468,16153

4. T studen para correlacionar las variables

→ Prueba T

[Conjunto_de_datos0]

Estadísticos de muestras relacionadas

		Media	N	Desviación típ.	Error típ. de la media
Par 1	T1000	1575,3465 ^a	9	297,81155	99,27052
	C1000	1575,3465 ^a	9	297,81155	99,27052
Par 2	T1001	1096,5035	9	356,63497	118,87832
	C1001	1219,9663	9	478,53911	159,51304
Par 3	T1002	1107,7138	9	329,05144	109,68381
	C1002	1145,0269	9	284,14214	94,71405
Par 4	T1003	1071,5243	9	335,11208	111,70403
	C1003	1138,9757	9	246,58438	82,19479
Par 5	T1004	1006,8909	9	326,44342	108,81447
	C1004	1108,1015	9	230,09957	76,69986

a. No se puede calcular la correlación y T porque el error típico de la diferencia es 0.

Correlaciones de muestras relacionadas

	N	Correlación	Sig.
Par 2 T1001 y C1001	9	,980	,000
Par 3 T1002 y C1002	9	,855	,003
Par 4 T1003 y C1003	9	,749	,020
Par 5 T1004 y C1004	9	,728	,026

Prueba de muestras relacionadas

		Diferencias relacionadas					t	gl	Sig. (bilateral)
		Media	Desviación típ.	Error típ. de la media	95% Intervalo de confianza para la diferencia				
					Inferior	Superior			
Par 2	T1001 - C1001	-123,46284	147,09826	49,03275	-236,53258	-10,39311	-2,518	8	,036
Par 3	T1002 - C1002	-37,31309	170,94212	56,98071	-168,71083	94,08466	-,655	8	,531
Par 4	T1003 - C1003	-67,45147	222,22524	74,07508	-238,26890	103,36597	-,911	8	,389
Par 5	T1004 - C1004	-101,21059	223,88069	74,62690	-273,30052	70,87935	-1,356	8	,212

5. *Estadísticos descriptivos 1000 ppm*

Tiempo	Repeticiones	promedio	desviacion_estandar	varianza	mediana	rango_intercuartil
<dbl>	<int>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<dbl>
0	9	1575.	298.	88692.	1377.	596.
24	9	1121.	339.	115112.	953.	455.
48	9	1145.	284.	80737.	1045.	161.
72	9	1139.	247.	60804.	1101.	60.4
96	9	1108.	230.	52946.	1108.	112.

6. *Estadísticos descriptivos Control*

Tratamientos	Repeticiones	promedio	desviacion_estandar	varianza	mediana	rango_intercuartil
<dbl>	<int>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<dbl>
0	6	56.5	5.50e-15	3.03e-29	56.5	7.11e-15
24	6	34.9	3.54e+ 0	1.26e+ 1	33.1	4.97e+ 0
48	6	15.4	1.07e+ 0	1.15e+ 0	15.4	1.08e+ 0
72	6	12.9	1.68e+ 0	2.81e+ 0	13.4	2.16e+ 0
96	6	10.1	2.00e+ 0	4.00e+ 0	10.8	2.69e+ 0

7. *Tabla de datos de 100 ppm vs Control*

Tratamientos	Repeticiones	CromoMenos	Control
0	1	57	57
0	2	57	57
0	3	57	57
0	4	57	57
0	5	57	57
0	6	57	57
24	1	44	32

24	2	42	33
24	3	32	39
24	4	39	33
24	5	53	34
24	6	61	40
48	1	37	16
48	2	31	14
48	3	22	15
48	4	29	17
48	5	27	15
48	6	34	16
72	1	25	13
72	2	14	10
72	3	13	14
72	4	18	14
72	5	17	11
72	6	26	15
96	1	15	11
96	2	11	8
96	3	10	12
96	4	14	12
96	5	13	7
96	6	16	11

8. *Análisis estadísticos iniciales para 100 ppm vs control.*

Shapiro Wilk			
W =	0.8915	p-value =	0.005235
W =	0.79061	p-value =	0,00004442

Tabla 3: análisis Shapiro wilk realizado por el software Rstudio

Donde se rechaza la hipótesis nula siendo valores inferiores inferiores a $p= 0.05$

Kruskal-Wallis rank sum test							
data: CromoMenos by Tratamientos							
Cr	Kruskal-Wallis	chi-squared =	25.83	df =	4	p-value =	0,00003425
Control	Kruskal-Wallis	chi-squared =	26.963	df =	4	p-value =	0,00002023

Tabla 4:

→ Prueba T

[Conjunto_de_datos0]

Estadísticos de grupo

	repeticiones	N	Media	Desviación tip.	Error tip. de la media
Cr	1,00	5	35,6000	16,33401	7,30479
	2,00	5	31,0000	19,27434	8,61974
control	1,00	5	25,8000	19,30544	8,63366
	2,00	5	24,4000	20,74367	9,27685

Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error tip. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
									Inferior	Superior
Cr	Se han asumido varianzas iguales	,158	,701	,407	8	,695	4,60000	11,29867	-21,45479	30,65479
	No se han asumido varianzas iguales			,407	7,790	,695	4,60000	11,29867	-21,57731	30,77731
control	Se han asumido varianzas iguales	,063	,808	,110	8	,915	1,40000	12,67281	-27,82354	30,62354
	No se han asumido varianzas iguales			,110	7,959	,915	1,40000	12,67281	-27,84974	30,64974

10. Prueba T- studen para correlacionar las variables

Prueba T

[Conjunto_de_datos0]

Estadísticos de muestras relacionadas

		Media	N	Desviación típ.	Error típ. de la media
Par 1	t1	56,5015 ^a	6	,00000	,00000
	C1	56,5015 ^a	6	,00000	,00000
Par 2	t2	45,1304	6	10,46607	4,27276
	c2	34,8840	6	3,54321	1,44651
Par 3	t3	29,8855	6	5,19981	2,12281
	c3	15,4490	6	1,07456	,43869
Par 4	t4	18,7018	6	5,76583	2,35389
	c4	12,8914	6	1,67656	,68445
Par 5	t5	13,0787	6	2,26690	,92546
	c5	10,1005	6	2,00048	,81669

a. No se puede calcular la correlación y T porque el error típico de la diferencia es 0.

Correlaciones de muestras relacionadas

		N	Correlación	Sig.
Par 2	t2 y c2	6	,225	,668
Par 3	t3 y c3	6	,316	,542
Par 4	t4 y c4	6	,484	,331
Par 5	t5 y c5	6	,232	,658

Prueba de muestras relacionadas

		Diferencias relacionadas					t	gl	Sig. (bilateral)
		Media	Desviación típ.	Error típ. de la media	95% Intervalo de confianza para la diferencia				
					Inferior	Superior			
Par 2	t2 - c2	10,24637	10,26623	4,19117	-,52738	21,02012	2,445	5	,058
Par 3	t3 - c3	14,43652	4,96640	2,02752	9,22460	19,64843	7,120	5	,001
Par 4	t4 - c4	5,81035	5,16770	2,10970	,38719	11,23351	2,754	5	,040
Par 5	t5 - c5	2,97822	2,65257	1,08291	,19451	5,76192	2,750	5	,040

11. Estadísticos descriptivos 100 ppm

Tratamientos	Repeticiones	promedio	desviacion_estandar	varianza	mediana	rango_intercuartil
<dbl>	<int>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<dbl>
0	6	56.5	0	0	56.5	0
24	6	45.1	10.5	110.	42.8	10.6
48	6	29.9	5.20	27.0	29.7	6.37
72	6	18.7	5.77	33.2	17.1	8.90
96	6	13.1	2.27	5.14	13.2	3.09

12. Estadísticos descriptivos Control – 100 ppm

Tratamientos	Repeticiones	promedio	desviacion_estandar	varianza	mediana	rango_intercuartil
<dbl>	<int>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<dbl>
0	6	56.5	5.50e-15	3.03e-29	56.5	7.11e-15
24	6	34.9	3.54e+ 0	1.26e+ 1	33.1	4.97e+ 0
48	6	15.4	1.07e+ 0	1.15e+ 0	15.4	1.08e+ 0
72	6	12.9	1.68e+ 0	2.81e+ 0	13.4	2.16e+ 0
96	6	10.1	2.00e+ 0	4.00e+ 0	10.8	2.69e+ 0