

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA

FACULTAD DE CIENCIAS



“Estudio de bacterias psicrótrofas aisladas de la zona de Junín con capacidad PGPR y su uso como potenciales biorremediadoras de metales pesados en una planta forrajera”

Presentado por:

Cinthya Paola Ortiz Ojeda

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE BIÓLOGO

Lima - Perú

2013

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA

FACULTAD DE CIENCIAS

**“ESTUDIO DE BACTERIAS PSICRÓTROFAS AISLADAS DE LA ZONA
DE JUNÍN CON CAPACIDAD PGPR Y SU USO COMO POTENCIALES
BIORREMEDIADORAS DE METALES PESADOS EN UNA PLANTA
FORRAJERA”**

Presentado por:

Cinthy Paola Ortiz Ojeda

Tesis para Optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO

Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:

Mg. Sc. Patricia Moreno Diaz
PRESIDENTE

Blgo. Roberto Ramos Chaupín
MIEMBRO

Blgo. Juan Juscamaita Morales
MIEMBRO

Dra. Doris Zúñiga Dávila
PATROCINADORA

Blga. Katty Ogata Gutierrez
CO-PATROCINADORA

ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN	6
I. INTRODUCCIÓN	8
II. REVISIÓN LITERARIA	11
2.1 El territorio de la Meseta del Bombón	11
2.2 Bacterias psicotolerantes (psicrótrofas)	11
2.3 Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR)	12
2.4 Capacidades promotoras de crecimiento	14
2.4.1 Producción de ácido indolacético (AIA)	14
2.4.2 Solubilización de fosfato	16
2.5 Metales pesados	17
2.5.1 Plomo (Pb)	18
2.5.2 Cadmio (Cd)	18
2.6 Biorremediación	19
2.7 Resistencia microbiana a metales en el medio ambiente	20
2.7.1 Mecanismos microbianos de resistencia a metales	20
2.8 El trébol rojo	22
III. MATERIALES Y MÉTODOS	23
3.1 Materiales	23
3.1.1 Material biológico	23

a. Material vegetal	23
b. Bacterias	23
3.1.2 Medios de cultivo, materiales y equipos de laboratorio	23
a. Medios de cultivo	23
b. Soluciones y reactivos	24
c. Materiales y equipos	25
3.2 Métodos	26
3.2.1 Toma de muestras	26
3.2.2 Lugar de ejecución	27
3.2.3 Recuento de bacterias psicrótrofas	27
3.2.4 Aislamiento y caracterización de bacterias psicrótrofas	28
3.2.5 Conservación de las bacterias aisladas por criopreservación a -80°C	28
3.2.6 Caracterización morfológica y fisiológica	28
a. Caracterización macroscópica	28
b. Caracterización microscópica	29
c. Crecimiento a diferentes temperaturas	29
3.2.7 Caracterización molecular	29
a. Extracción de ADN	30
b. Amplificaciones BOX-PCR	31
c. Amplificación y purificación del gen ARNr 16S para secuenciamiento	32
d. Construcción de los árboles filogenéticos	32
3.2.8 Capacidad promotora del crecimiento vegetal (PGPR)	33

a. Producción de ácido indol acético (AIA)	33
b. Determinación de la solubilización de fosfato bicálcico y tricálcico	34
c. Ensayos de germinación <i>in vitro</i>	34
d. Promoción del crecimiento a nivel de plántulas	35
3.2.9 Ensayo con metales pesados	36
a. Determinación de resistencia a metales pesados	36
b. Prueba de toxicidad a metales pesados: concentración mínima inhibitoria (MIC)	36
3.2.10 Análisis de datos	37
IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES	38
4.1 Aislamiento de bacterias psicrótrofas	38
4.2 Caracterización morfológica	39
4.2.1 Caracterización microscópica	39
4.2.2 Caracterización macroscópica	40
4.3 Caracterización fisiológica	43
4.3.1 Crecimiento a diferentes temperaturas	43
4.4 Caracterización molecular	46
4.4.1 Amplificaciones BOX – PCR	46
4.4.2 Amplificación y secuenciamiento del gen 16S del ARNr y la relación filogenética	48
4.5 Evaluación de las cepas psicrótrofas como promotoras del crecimiento vegetal <i>in vitro</i>	57

4.5.1 Producción de Ácido indolacético	57
4.5.2 Solubilización de fosfatos bicálcico y tricálcico	61
4.5.3 Germinación de semillas	71
4.6 Promoción del crecimiento en plántulas de trébol rojo	80
4.7 Ensayos con metales pesados	83
4.7.1 Ensayo de cepas psicrótrofas con resistencia a metales pesados	83
4.7.2 Ensayo de mínima concentración inhibitoria de metales pesados (MIC)	84
4.8 Análisis integrado de características fenotípicas	91
V. CONCLUSIONES	98
VI. RECOMENDACIONES	100
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101
ANEXO 1: TABLAS	114
ANEXO 2: FIGURAS	122
ANEXO 3: ESTADÍSTICA	124

RESUMEN

El Altiplano es una región caracterizada por encontrarse entre los 3800 hasta los 5200 m.s.n.m. de altitud, temperaturas bajas y con presencia constante de heladas y suelos ácidos con rango de pH 4 y 5. Una de las principales actividades económicas en esta zona después de la minería es la agricultura; donde se pueden encontrar distintos cultivos andinos adaptados a las condiciones climáticas características del lugar. Sin embargo, la productividad se ve limitada debido a las bajas temperaturas y a la presencia de heladas que queman a los cultivos y con ello causan bajos rendimientos. La minería por su parte, a pesar de las ganancias que genera a la población; se vuelve un problema debido a la contaminación que ocasiona a suelos y cultivos, lo cual puede afectar los rendimientos y la calidad de dichos cultivos, arriesgando su potencial exportación. Una alternativa orgánica para mejorar los cultivos andinos, es el uso de inoculantes microbianos con capacidad PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) aislados de zonas altoandinas, que se encuentran adaptadas a condiciones de bajas temperaturas y que además tienen potencial de biorremediar los contaminantes presentes en el suelo. Este estudio tiene como objetivo la evaluación de las características de cepas bacterianas tolerantes a bajas temperaturas y con potencial biorremediador. Con este fin se usaron bacterias psicrótrofas, previamente aisladas de la rizósfera de maca, fueron seleccionadas *in vitro* mediante la cuantificación de la producción de ácido indolacético (AIA), solubilización de fosfato, incremento de la germinación y la resistencia a metales pesados. De un total de 44 cepas psicrótrofas aisladas, el 56.82% produjeron AIA, de donde el 11.36% produjeron las concentraciones más altas de esta fitohormona, con valores entre 12 µg/ml y 16 µg/ml. En cuanto a la solubilización de fosfato, el 22.7% solubilizó el fosfato tricálcico y el 18.18% el fosfato bicálcico evidenciado por la presencia de un halo de solubilización. En cuanto a la germinación, el 11.3% de las bacterias incrementaron el porcentaje de germinación. Finalmente, el 25% de las bacterias aisladas mostraron resistencia a los metales pesados Cd y Pb. La importancia de estudiar a estas bacterias psicrótrofas con capacidad de crecer en presencia de metales pesados, es la de obtener un bioinoculante específico para las zonas altoandinas, para mejorar la producción y el crecimiento de los cultivos, además de tener la capacidad de detoxificar el suelo evitando así la contaminación del agua subterránea y la absorción de los contaminantes por los cultivos.

Palabras clave: Psicrótrofos, solubilizadores de fosfato, PGPR, AIA, metales pesados.

SUMMARY

The Altiplano is a region characterized by altitudes between 3800 to 5200 m.s.l., low temperatures below 0°C at freezing time and acids soils with a pH ranging from 4 to 5. The agriculture is one of the main economic activities in this region, in which is possible to find different andean crops adapted to this climate conditions. However, the productivity seems to have limits due to the characteristics of the region itself. The mining is also one of the other main economic activities in this region, but unfortunately it cause pollution in soils and crops. The principal problems for the andean crops are the freezing conditions, due to the low temperatures, and soil pollution, due to the mining activity, that affects the yields, quality and also could risk its exportation. An organic alternative to improve the andean crops, is using microbial inoculants with PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) capacity, that are cold adapted and have the ability of bioremediate soil pollutants. The psychrotrophic bacteria, previously isolated of the rhizosphere of an andean crop, were selected *in vitro*, through the quantification of indolacetic acid (IAA) production, phosphate solubilization, increase of germination and heavy metals resistance. From 44 psychrotrophic bacteria isolated, 56.8 % produced IAA; 11.3 % of these produced the highest concentrations of this phytohormone, with values between 12 µg/ml and 16 µg/ml. About the phosphate solubilization capacity, 22.7 % solubilizes tricalcic phosphate and 18.18% solubilizes bicalcic phosphate showed by a solubilization halo. In the germination rate, 11.3 % of the bacteria increase seed germination. Finally in heavy metals resistance assay, the 25 % of the isolated bacteria posses' resistance to Cd and Pb. The importance of studying psychrotrophic bacteria that can growth in presences of heavy metals, is to obtain a specific bioinoculant for the andean zone, to improve crops yields, and so, with capacity of detoxify soil avoiding contamination of underground water and the absorption of the contaminants by this crops.

Key words: Psychrotrophs, phosphate solubilization, PGPR, IAA, heavy metals.

I. INTRODUCCIÓN

El suelo es el hábitat de una gran variedad de organismos, comprendiendo entre ellos a microorganismos, plantas y animales, los cuales, forman una compleja red interactiva. Un nicho ecológico muy especial, la rizósfera, está presente alrededor de las raíces de las plantas que soportan un grupo de microorganismos metabólicamente versátiles (Upadhyay & Srivastava, 2010).

La rizósfera es relativamente rica en nutrientes, debido a la pérdida de más del 40 % de los fotosintatos a través de las raíces. Consecuentemente, dicha región soporta grandes cantidades de poblaciones microbianas activas capaces de ejercer efectos beneficiosos, neutrales o perjudiciales en el crecimiento de las plantas (Nelson, 2004).

Entre los microorganismos rizosféricos que se encuentran asociados a las raíces de las plantas se encuentran las rizobacterias promotoras de crecimiento (PGPR). Estas rizobacterias poseen características tales como tolerancia a condiciones ambientales adversas, capacidad para solubilizar fósforo, producir ácido indolacético (AIA), y la habilidad de colonizar efectivamente las raíces, siendo estas las responsables de promover el crecimiento en plantas (Waranusantigul, 2009).

Por otra parte, el Perú se caracteriza por sus distintos climas y regiones, siendo una de estas, la zona altoandina, la cual se caracteriza por la presencia de bajas temperaturas. En esta zona podemos encontrar organismos adaptados a las condiciones atmosféricas y edáficas de este hábitat. Entre estos se encuentran las bacterias psicrótrofas, las cuales están adaptadas al frío y colonizan las regiones altoandinas, dentro de las cuales muchas de ellas poseen características promotoras del crecimiento vegetal (Mishra *et al.*, 2008).

Otro de los problemas que se presenta en las zonas altoandinas además de las bajas temperaturas, es la presencia de agentes contaminantes tales como metales pesados. Esto es debido a la actividad minera existente en estas zonas y a las actividades cotidianas (uso de colorantes, baterías, etc.) del hombre que también son causantes de contaminación. La acumulación de metales pesados en el suelo genera cambios en su fertilidad y la actividad microbiana. Consecuentemente, el incremento de la concentración de metales en el suelo y su translocación hacia las plantas, puede traer consigo efectos negativos en el crecimiento

de estas; los metales pesados no son degradados biológicamente y persisten en el medioambiente por tiempo indefinido (Labra *et al.*, 2010).

El presente trabajo plantea la importancia del uso de cepas psicrótrofas, con capacidad PGPR, en zonas altoandinas para mejorar el desarrollo de los cultivos que crecen en dichas zonas, así como también de disminuir el nivel de contaminación tanto en los suelos como en los mismos cultivos, haciendo uso de la capacidad biorremediadora de las cepas, potenciada con las características de PGPR. El objetivo principal es evaluar el potencial PGPR y de biorremediación de cepas psicrótrofas aisladas de campos de cultivo de maca a nivel *in vitro*, para ser utilizados posteriormente como bioinoculantes en zonas altoandinas.

Objetivo general

- Evaluar las características PGPR de las cepas psicrótrofas aisladas de campos de cultivo de maca en la meseta del Bombón – Junín, así como también su uso potencial en biorremediación en pruebas *in vitro*.

Objetivos específicos

- Aislar y caracterizar a las bacterias psicrótrofas procedentes de la rizósfera de maca siguiendo criterios morfológicos, fisiológicos y moleculares.
- Evaluar a nivel *in vitro* la capacidad PGPR de las cepas aisladas (producción de ácido indol acético, solubilización de fosfato, aumento de porcentaje de germinación).
- Comprobar que las bacterias psicrótrofas aisladas tengan un efecto favorable en la emergencia y crecimiento en la planta ensayo (trébol rojo) *in vitro* comparando con controles positivos y negativos.
- Evaluar a las cepas psicrótrofas aisladas en su capacidad de resistencia a distintas concentraciones de sales de plomo (Pb) y cadmio (Cd).

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 El territorio de la Meseta del Bombón

El Perú tiene lugares donde se asientan poblaciones humanas en condiciones ambientales y climatológicas adversas. La zona de la Puna sobre los 4000 metros de altura se caracteriza por una baja presión barométrica, grandes heladas, lluvias, vientos, y alta radiación solar y cósmica, donde prácticamente es imposible el crecimiento de planta alguna para el sustento humano. Las poblaciones de Junín, Óndores, Carhuamayo, Huayre, Ulcumayo en el Departamento de Junín y Ninacaca en el Departamento de Pasco en los Andes centrales del Perú, esta zona se ubica en lo que se denomina la “Meseta de Bombón” (Gonzales, G., 2010).

En estos lugares tan inhóspitos donde reside población humana, la alimentación se ha basado en la ganadería y algunas plantas que se han logrado adaptar a este ecosistema y se permite su cultivo.

Según un estudio realizado por INRENA, 2008 para la Reserva Nacional de Junín (ubicada en la Meseta del Bombón), los animales y las plantas en torno al área natural enfrenta serias amenazas: la contaminación por la actividad minera adyacente, la contaminación por aguas residuales y algunas actividades agropecuarias así como por el cambio climático. Para superar estos problemas así como para permitir el cultivo de plantas adaptadas a este ambiente en particular, es necesario implementar mecanismos efectivos y que a la vez sean amigables con el medio ambiente y la biodiversidad. Uno de estos mecanismos es la utilización de la microbiota natural de esta región, la cual posee adaptabilidad que resulta ventajosa para la resolución de dichos problemas.

2.2 Bacterias psicrotolerantes (psicrótrofas):

Las condiciones ambientales adversas son comunes en muchas regiones del país, y la diversidad microbiana en estos lugares es particularmente interesante ya que los microorganismos que habitan en estos, se encuentran bien adaptados a las condiciones atmosféricas y a las características particulares del suelo en dichas regiones.

Los cambios en las condiciones medioambientales, y especialmente cuando se alejan de lo óptimo, pueden causar la inducción de muchas respuestas al estrés. La baja temperatura es el principal factor que limita la productividad de muchas especies de importancia agrícola. A pesar de la capacidad de ciertas plantas a adaptarse al estrés por bajas temperaturas, el crecimiento de la planta y sobre todo la productividad generalmente disminuyen bajo condiciones de congelamiento (Mishra *et al.*, 2008).

Los microorganismos adaptados a bajas temperaturas, (psicrófilos y psicrótrofos), están presentes en casi todas estas áreas y muchos de ellos poseen características para promover el crecimiento de la plantas (Morita, 1975).

Basándose en el rango de temperaturas en las cuales pueden crecer, los microorganismos se clasifican como: psicrótrofos (0 - 30°C, óptimo ~ 22 - 25°C) y psicrófilos (0 - 20°C, óptimo ~ < 15°C). Los psicrófilos y los psicrótrofos tienen la habilidad de crecer a bajas temperaturas y se los puede encontrar en hábitats naturales como el fondo del mar, regiones andinas, glaciares, etc. Los psicrótrofos (también conocidos como psicrófilos facultativos) son más versátiles que los psicrófilos por su habilidad para crecer no solo a bajas temperaturas, sino también en temperaturas donde normalmente habitan los mesófilos, es por ello que podemos encontrar mayor cantidad de microorganismos psicrótrofos en comparación con microorganismos psicrófilos (Malay, 2006).

En los agro-ecosistemas que se encuentran a elevadas altitudes, donde las condiciones de frío son usualmente transitorias en la naturaleza, los microorganismos psicrotolerantes son extremadamente importantes ya que ellos sobreviven y mantienen su funcionalidad en condiciones de bajas temperaturas, mientras crecen óptimamente a temperaturas más cálidas (Mishra *et al.*, 2009).

2.3 Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR)

En el suelo encontramos gran cantidad de bacterias, entre las cuales tenemos a las llamadas de vida libre, las cuales no dependen estrictamente de los exudados de las raíces para su supervivencia (Tilak *et al.* 2005). Las bacterias de vida libre que poseen características beneficiosas para el crecimiento y desarrollo de las plantas se las conoce como Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR) (Kloepper *et al.* 1980). Las PGPR se encuentran en la rizósfera de las plantas, que es una región del suelo ubicada

alrededor de la raíz y bajo la influencia de esta. Siendo un sitio con complejas interacciones entre la planta y los microorganismos asociados a esta (Sylvia *et al.*, 1998).

Según Kloepper *et al.* (1991), las bacterias dentro de las denominadas PGPR (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*), o rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, pueden mejorar la germinación de semillas a través de la producción y liberación de algunas sustancias reguladoras del crecimiento vegetal como auxinas, citoquininas o giberelinas cuando se encuentran asociadas a las plantas.

Las PGPR mejoran el crecimiento vegetal por medio de mecanismos directos e indirectos. Los mecanismos directos involucran la síntesis de sustancias por parte de la bacteria o facilitan la absorción de nutrientes presentes en el suelo. Por otra parte, los mecanismos indirectos o de biocontrol ocurren cuando estas previenen o reducen los efectos dañinos de los patógenos hacia las plantas, por medio de la producción de sustancias inhibitorias o sustancias que incrementen la resistencia natural del hospedero (Príncipe *et al.*, 2007).

Dentro de los mecanismos directos se tienen: 1) fijación de nitrógeno, 2) solubilización de fósforo, 3) producción de sideróforos, 4) producción de fitohormonas y 5) disminución de la concentración de etileno (Glick, 1995; Nelson, 2004). Respecto a los mecanismos indirectos, se incluye: 1) producción de antibióticos, 2) disminución del hierro de la rizósfera, 3) síntesis de metabolitos antifúngicos, 4) producción de enzimas líticas para la pared de hongos 5) competencia por sitios en las raíces y 6) resistencia sistémica inducida (ISR) (Glick, 1995).

Han sido reportados numerosos estudios en donde se evidencia aumentos significativos en el crecimiento y rendimiento de cultivos agrónomicamente importantes en respuesta a la inoculación con PGPR (Chen *et al.*, 1994; Amara & Dahdoh, 1997; Biswas *et al.*, 2000a, b; Hilali *et al.*, 2001; Asghar *et al.*, 2002; Khalid *et al.*, 2004).

Varios estudios también han demostrado que la habilidad promotora de crecimiento de algunas bacterias puede ser sumamente específica a ciertas especies de plantas, genotipos, tipos de suelo y condiciones ambientales (Nowak, 1998; Khalid *et al.*, 2004).

Debido al incremento de costos en los pesticidas y fertilizantes químicos, especialmente para las regiones con menos recursos económicos, y la exigencia de los consumidores y países destino de exportación por alimentos libres de estas sustancias, nos ha llevado a la búsqueda de sustitutos para estos productos (Compant *et al.*, 2005).

La aplicación de PGPRs como inoculantes a los cultivos recientemente se ha vuelto una práctica muy utilizada, ya que reduce sustancialmente el uso de fertilizantes químicos y pesticidas, los cuales a menudo contaminan el medio ambiente. Además, la aplicación de PGPRs incrementa el rendimiento y la producción de los cultivos y con ello contribuye a la alimentación de la población mundial que se encuentra en continuo crecimiento (Bloemberg & Lugtenberg, 2001).

2.4 Capacidades promotoras de crecimiento

2.4.1 Producción de ácido indolacético (AIA)

Numerosas bacterias asociadas a plantas producen auxinas y compuestos indólicos relacionados.

El nombre auxina se deriva del griego *auxein*, que significa aumento o incremento, designando cualquier compuesto constituido por el grupo auxínico, y a menudo se usa como sinónimo al ácido indolacético (AIA). Químicamente son llamados ácido 3 indol - acético, y son derivados del triptófano. Su estructura química básica, se compone de un grupo indol, por lo que es fácil encontrar en las plantas otros compuestos con estructura similar (Celis & Gallardo, 2008).

Existen tres grupos auxínicos (Rojas & Ramirez, 1993; Celis & Gallardo, 2008):

- Derivados del indol como ácido indol propiónico (IPA), ácido indol butírico (IBA) y el ácido 3 - indol acético (AIA).
- Derivados del naftaleno, como ácido naftalen acético (NAA), ácido naftoxiacético (Noxa o BNOA), ácido naftilpropiónico (NPA).
- Derivados fenoxi, usados como herbicidas selectivos y algunas veces como reguladores del crecimiento vegetal.

Las auxinas son responsables de la división, extensión, y diferenciación de las células y tejidos vegetales. Estas fitohormonas estimulan la germinación de semillas y tubérculos; incrementan la formación de raíces; controlan los procesos de crecimiento vegetal,

tropismo, florecencia, y fructificación de las plantas; también afectan a la fotosíntesis, formación de pigmentos, biosíntesis de varios metabolitos, y dan resistencias hacia los factores de estrés (Dörffling, 1982; Tsavkelova *et al.*, 2006).

Además de las plantas, los microorganismos incluyendo bacterias y hongos son capaces de sintetizar AIA (Kaper & Veldstra, 1958; Gruen, 1959; Perley & Stowe, 1966; Libbert *et al.*, 1970; Arshad & Frankenberger, 1991; Costacurta & Vanderleyden, 1995; Spaepen, S. *et al.* 2007).

Se han identificado diferentes vías bacterianas para sintetizar AIA, encontrándose una gran similitud entre las vías de biosíntesis de AIA en plantas y bacterias.

Las bacterias benéficas tales como las PGPR, sintetizan AIA por la vía del ácido indolpirúvico y se cree que el AIA secretado es estrictamente regulado por las señales reguladoras de las plantas. Diferencias en la producción de AIA por diferentes cepas de bacterias pueden ser atribuidas a los varios caminos de biosíntesis, la locación de los genes involucrados, las secuencias regulatorias, y la presencia de enzimas para convertir el AIA libre en sus formas conjugadas. También es dependiente de las condiciones ambientales (Patten & Glick, 1996).

El L-triptófano (L-TRP), es un aminoácido que sirve como un precursor fisiológico para la biosíntesis de auxinas en las plantas y en las bacterias (Frankenberger & Arshad, 1995; Khalid *et al.*, 2004). La identificación de intermediarios ha llevado a la identificación de cinco diferentes vías usando triptófano como precursor para la producción de AIA (Kameneva *et al.*, 1999; Costacurta & Vanderleyden, 1995; Patten & Glick, 1996; Tsavkelova *et al.*, 2006; Spaepen *et al.*, 2007), siendo éstas:

- Vía del indol-3-acetamida (IAM): Es la vía mejor caracterizada en bacterias; se lleva a cabo en bacterias patógenas.
- Vía del indol-3-piruvato (IPyA): Aún no ha sido identificado en plantas.
- Vía de la triptamina (TAM): Ha sido identificada en *Bacillus cereus* por la identificación de la actividad triptófano descarboxilasa y en *Azospirillum* por la detección de la conversión de la triptamina exógena en AIA (Perley & Stowe, 1966).

- Vía del triptófano-cadena oxidasa (TSO): Sólo ha sido demostrada en *Pseudomonas fluorescens* CHA0 (Oberhansli *et al.*, 1991).
- Vía del indol-3-acetonitrilo (IAN): Esta vía ha sido estudiada recientemente de forma intensiva en plantas. El último paso de esta vía es la conversión de IAN en AIA (Bartling *et al.*, 1992).

En la rizósfera, el triptófano puede originarse de dos fuentes: ser liberado por la degradación de raíces y microorganismos, y a partir de los exudados de la raíz. Los exudados de la raíz son una fuente natural de TRP para la microfauna de la rizósfera, lo cual puede aumentar la biosíntesis de auxinas en ésta (Kravchenko *et al.* 1991; Martens & Frankenberger 1994; Khalid *et al.*, 2004). El AIA es producido entre la fase exponencial tardía y la fase estacionaria (Spaepen *et al.*, 2007).

Se ha demostrado para varias bacterias PGPR, que el aumento de la proliferación de la raíz está relacionado con la biosíntesis bacteriana de AIA. Este incremento de la raíz aumenta la absorción de minerales por la planta y la exudación de las raíces, lo cual a su vez estimula la colonización bacteriana y con ello se amplifica el efecto de la inoculación (Dobbelaere *et al.*, 1999; Lambrecht *et al.*, 2000; Steenhoudt & Vanderleyden, 2000; Spaepen *et al.*, 2007).

Generalmente, los microorganismos aislados de la rizósfera de varios cultivos han revelado tener mayor potencial para la producción de auxinas que los que están en el suelo libre de raíces (Sarwar & Kremer, 1995 a, b; Arshad & Frankenberger 1998, Khalid *et al.*, 2004).

2.4.2 Solubilización de fosfato

El fósforo (P) es un macronutriente muy importante para el desarrollo y crecimiento biológico. Su principal función fisiológica es intervenir en procesos de acumulación y liberación de energía durante el metabolismo celular (Coyne, 2000; Bobadilla & Rincón, 2008). El P disponible en el suelo es fácilmente convertido en complejos insolubles, como fosfatos de Fe, Al o Mn en suelos ácidos y fosfatos de Ca o Mg en suelos alcalinos (Torriani - Gorini *et al.* 1994, Paredes & Espinosa, 2010). El contenido promedio de fósforo en el suelo es de 0.05%, y sólo el 0.1% del fósforo total está disponible para las plantas, esto se debe a su baja solubilidad y a la fijación química.

La mayoría de los nutrientes esenciales para las plantas, incluyendo el fósforo, permanecen de forma insoluble en el suelo (Abd-Alla, 1994; Yadav & Dadarwal, 1997; Nautiyal, 1999). Una gran cantidad de fosfatos inorgánicos aplicados al suelo como fertilizantes son rápidamente inmovilizados luego de su aplicación limitando así su disponibilidad para las plantas (Yadav & Dadarwal, 1997; Nautiyal, 1999).

Los microorganismos presentes en el suelo ofrecen un sistema de rescate biológico capaz de solubilizar el fósforo inorgánico insoluble presente en el suelo y convertirlo en fósforo disponible para las plantas. Los microorganismos solubilizadores de fosfato no solo asimilan el fósforo que necesitan, sino también gran parte de éste fosfato soluble es liberado en exceso para sus propios requerimientos (Tilak *et al.*, 2005). El P disponible es absorbido por la planta en forma de H_2PO_4^- en suelos ácidos, y como HPO_4^{2-} en suelos alcalinos.

El principal mecanismo microbiológico por el cual los compuestos fosfatados son movilizados es la disminución del pH del medio por la liberación de ácidos orgánicos (Alexander, 1980; Fernández *et al.* 2005). Se han descrito otros posibles mecanismos que incluyen la eliminación de protones afuera de la célula y su intercambio con cationes unidos al fósforo o la producción de ácidos inorgánicos como el ácido sulfhídrico, el ácido nítrico o el ácido carbónico (Rodríguez & Fraga, 1999; Fernández *et al.* 2005).

La adición de fosfato al suelo mediante medios biológicos es una alternativa viable, las bacterias solubilizadoras de fosfato, hongos y actinomicetos han sido reportados como organismos que cuentan con una conversión activa del fosfato insoluble en iones primarios y secundarios de ortofosfato soluble (Alam *et al.*, 2002).

2.5 Metales pesados

Algunos metales pesados, tales como el plomo (Pb) y el cadmio (Cd), han sido considerados dentro de las 20 primeras sustancias peligrosas, obteniendo el segundo y séptimo puesto respectivamente. Dicha lista es provista anualmente por la ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) del 2001 (ATSDR 2011; Kamnev, 2003).

2.5.1 Plomo (Pb)

El plomo es un elemento que se encuentra naturalmente en pequeñas cantidades en la corteza terrestre. Tiene algunos usos beneficiosos, pero puede llegar a ser tóxico para humanos y animales si se está expuesto a cantidades superiores a las recomendables.

Se puede encontrar plomo en cualquier parte de nuestro medio ambiente (aire, suelo, agua, etc.). Nos vemos expuestos a este metal generalmente por la actividad humana, incluyendo el uso de combustibles fósiles, instalaciones industriales, minería, etc. El plomo y compuestos de plomo se han usado en una gran variedad de productos incluyendo pinturas, cerámicas, tuberías, soldaduras, gasolina, baterías y cosméticos.

El plomo también puede ser emitido al medio ambiente a partir de fuentes industriales y sitios contaminados. Los niveles naturales de plomo en el suelo varían entre 50 a 400 ppm, la minería, fundiciones y otras actividades han aumentado significativamente los niveles de plomo en el medio ambiente, especialmente en los lugares cercanos a sitios donde se realizan actividades de minería y fundición (EPA, 2012a).

Cuando el plomo es liberado al aire puede viajar grandes distancias antes de asentarse en el suelo, donde usualmente se adhiere a las partículas de suelo, es ahí donde puede moverse del suelo hacia el agua subterránea dependiendo del tipo de compuesto y de las características del suelo.

2.5.2 Cadmio (Cd)

El cadmio, en su forma más pura, es un metal suave y plateado que se encuentra naturalmente en la superficie terrestre. Sin embargo, las formas más comunes de cadmio se encuentran en combinación con otros metales.

La fuente más común de exposición al cadmio es principalmente a través de los alimentos, especialmente mariscos y vísceras. Los cigarrillos son otra fuente de exposición al cadmio. Se pueden encontrar trazas de cadmio en plantas de tabaco.

Respirar aire contaminado con cadmio producto de la quema de combustible fósil como el aceite y el carbón, o la quema de desechos municipales son otra fuente de exposición y es la fuente más importante de liberación de cadmio.

La exposición al cadmio puede causar una serie de efectos nocivos a la salud. Consumir alimentos o beber agua con elevados niveles de cadmio puede irritar severamente el estómago y causar vómitos y diarrea. Respirar altas dosis de cadmio puede irritar y dañar los pulmones y con ello causar la muerte. Sin embargo, la preocupación más grande es la exposición a bajas dosis de cadmio por un largo período de tiempo, esto puede causar daño renal, formación de cálculos renales, afectar el sistema óseo y cáncer (EPA, 2012b).

2.6 Biorremediación

Debido a la industrialización global y al incremento de la población en el siglo XX, la contaminación de suelo, agua y aire se ha ido incrementando debido a las grandes cantidades liberadas de contaminantes orgánicos e inorgánicos (metales pesados) liberados, los cuales tienen efectos nocivos y en algunos casos hasta fatales en las poblaciones y los ecosistemas. A diferencia de los contaminantes orgánicos, los metales pesados no son biodegradables, y por ello permanecen en el ambiente indefinidamente (Karami & Shamsuddin, 2010).

La acumulación de metales pesados en el suelo causa cambios en la actividad microbiana y en la fertilidad de este. Consecuentemente, el aumento en la concentración de los metales en el suelo y su translocación a los órganos de las plantas, puede tener efectos indeseables en el crecimiento de las mismas (Ahmed *et al.*, 2008; Labra *et al.*, 2010).

La acumulación de metales pesados en el suelo y su adsorción por las rizobacterias y las plantas es un tema de interés actual (Labra *et al.*, 2010). Para sobrevivir en ambientes contaminados con estos metales, las rizobacterias promotoras de crecimiento han desarrollado varios mecanismos por los cuales pueden inmovilizarlos, movilizarlos, o transformarlos, volviéndolos inactivos y permitiendo así que las plantas que habitan en esos ambientes contaminados puedan tolerar la adsorción y toma de estos iones (Nies, 1999; Labra *et al.*, 2010).

Para solucionar el problema de la contaminación del suelo con metales, una de las metodologías que se están usando actualmente es el tratamiento de los suelos con microorganismos (biorremediación), entre los cuales encontramos a las rizobacterias. Biorremediación es el uso de organismos vivos para el manejo de suelos contaminados. Se define como la eliminación, atenuación o transformación de sustancias contaminantes

mediante el uso de procesos biológicos (Pal *et al.*, 2010). El uso de la biorremediación está adquiriendo gran importancia ya que comparado con métodos químicos, el método biológico tiene un costo mucho menor, además de tener como ventaja adicional la alteración de la composición de la microbiota en el suelo. En los avances más importantes en biorremediación, se está dando énfasis en la utilización de microbiota originaria del suelo a tratar (Kamnev, 2003).

Las rizobacterias promotoras del crecimiento, las cuales se encuentran en la parte radicular de las plantas, pueden contribuir en la reducción de la fitotoxicidad de los metales presentes en el suelo por medio de los mecanismos de bioadsorción y bioacumulación, ya sea por metabolismo-independiente pasivo o por un metabolismo-dependiente activo (Ledin *et al.*, 1996; Khan *et al.*, 2007; Ma *et al.*, 2011). Estas bacterias pueden causar además del crecimiento de la planta la tolerancia a metales; también pueden reducir la adsorción del metal o su translocación a las partes aéreas de la planta mediante la disminución de la biodisponibilidad del metal en la región radicular de la planta (Ma *et al.*, 2011).

2.7 Resistencia microbiana a metales en el medio ambiente

Los metales en altas concentraciones son tóxicos para los microorganismos. La toxicidad resulta de una alteración en la estructura conformacional de los ácidos nucleicos y proteínas e interfieren con la fosforilación oxidativa y balance osmótico (Poole & Gadd, 1989). Las bacterias se han adaptado a los metales a través de una variedad de sistemas de resistencia mediado por material genético cromosomal, transposones y material genético plasmídico.

2.7.1 Mecanismos microbianos de resistencia a metales

Los mecanismos que son generalmente propuestos para la resistencia a metales pesados en las bacterias son 6: (1) la exclusión del metal por una barrera permeable, (2) exclusión por transporte activo del metal desde el interior de la célula hacia afuera, (3) por el secuestro físico intracelular del metal por medio de la unión de polímeros para prevenir el daño del material celular sensible a los metales, (4) secuestro extracelular, (5) detoxificación

enzimática del metal a una forma menos tóxica y (6) reducción de la sensibilidad a los metales por la célula objetivo (Rouch *et al.*, 1995) (Fig. 1).

Por medio de estos mecanismos se puede evitar la translocación de los metales pesados a las partes de interés agroindustrial para el consumo humano o animal, siendo esto de gran importancia en cuanto a sanidad alimentaria se refiere.

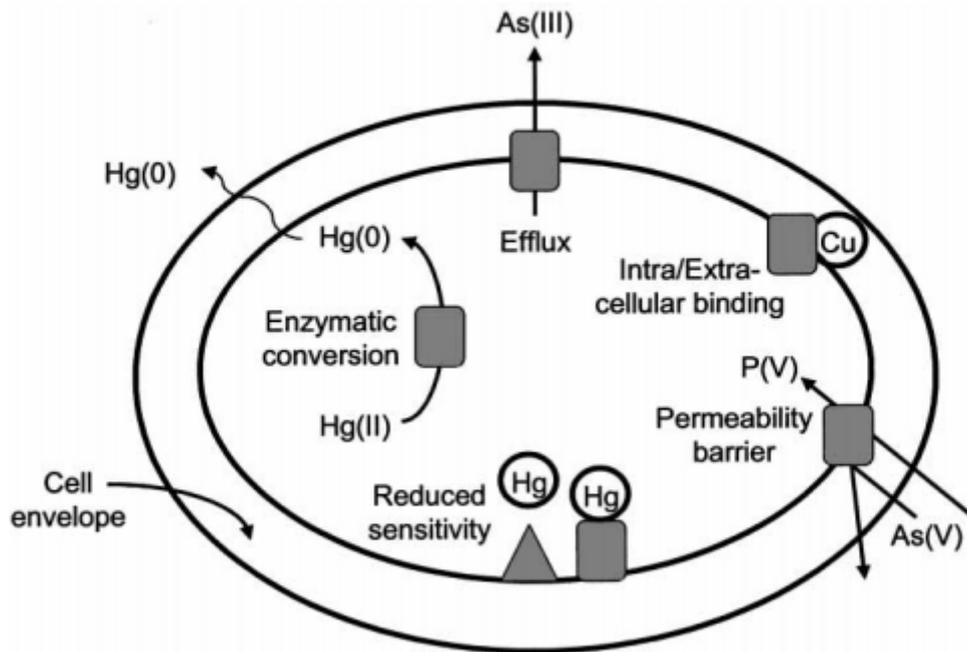


Fig. 1. Ejemplo esquemático del mecanismo de resistencia a metales en un microorganismo acidófilico. Los mecanismos de resistencia (en sentido horario, empezando desde la parte superior) incluyen: flujo del metal tóxico fuera de la célula, ejemplo, As (III) fluye a través de la proteína ArsB; unión intra/extracelular del metal reduciendo su toxicidad; exclusión del metal por medio de una barrera permeable, en este caso la expresión de la proteína de transporte específica para fosfato pero no para As (V); la alteración de un componente celular para disminuir su sensibilidad a la toxicidad del metal, por ejemplo la citocromo oxidasa c menos sensible en algunas cepas resistentes al mercurio; y finalmente la conversión del metal a una forma menos tóxica, se pone como ejemplo la reducción de Hg (II) a Hg (0), el cual luego se volatiliza fuera de la célula (Dopson *et al.*, 2003).

2.8 El trébol rojo

El trébol rojo (*Trifolium pratense* L.) es una planta leguminosa nativa de Europa, oeste de Asia y noroeste de África. Es una herbácea perenne de 10-60 cm de altura (puede alcanzar hasta los 110 cm) y pilosidad variable, tiene tallos erectos o ascendentes, su sistema radicular consta de una raíz pivotante, presenta hojas trifoliadas con folíolos ovalados (Frame, 1998).

Tiene la capacidad de crecer en una amplia variedad de suelos y de condiciones ambientales, tiene una alta productividad, fija nitrógeno, cuenta con especies ricas en proteínas y minerales, y además es resistente a bajas temperaturas, estas son algunas características positivas que tiene el trébol rojo.

La temperatura óptima de crecimiento es de 20 - 25 °C, con límites máximos de 7 - 40 °C. En cuanto a la tolerancia de la planta a bajas temperaturas, se sabe que ésta incrementa con la edad del trébol, una buena resistencia a bajas temperaturas es una característica reconocida en el trébol rojo. El pH óptimo del suelo para el desarrollo de la planta y la formación de nódulos en las raíces está entre los valores de 6.0-6.5, pero el trébol rojo también tiene la capacidad de crecer a niveles de pH más bajos de 5.0-6.0. El alto valor nutritivo y un consumo voluntario por parte del ganado, son grandes ventajas para su uso como planta forrajera (Frame, 1998).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3.1.1 Material Biológico

a. Material vegetal

- Semillas de *Trifolium pratense*.

b. Bacterias

- Cepas de diferentes géneros de bacterias psicrotomas asiladas de campos de cultivo de maca de la Comunidad Campesina San Pedro de Cajas de la meseta del Bombón – Junín.
- Cepa de *Escherichia coli* ATCC 35218.

3.1.2 Medios de cultivo, materiales y equipos de laboratorio

a. Medios de cultivo

- Agar nutritivo
- Caldo nutritivo
- Levadura Manitol Caldo (LMC) (Vincent, 1970) suplementado con L – triptófano
- Medio *National Botanical Research Institute's Phosphate* (NBRIP)
- Agar agua 0,5%
- Agarosa 1%
- Agar Plate Count (PC)

b. Soluciones y reactivos

- Reactivo de Salkowski (Gordon & Weber, 1951)
- Solución salina al 0.85%
- Alcohol al 70%
- Lejía al 3%
- Solución de KOH al 3%
- Cristal violeta al 0.5%
- Glicerol
- Agua MiliQ
- Buffer de PCR + KCl 10X
- Buffer TBE
- Dimetilsulfóxido (DMSO) 100%
- *Loading dye* 6X
- MgCl₂ 25 mM
- Solución de dNTP 25 mM
- Solución de 100 pmol/μl del *primer* BOX A1R
- Solución de 10 pmol/μl de los *primers* rD1 y fD1
- *Taq* polimerasa 5 unidades
- Solución nutritiva SNDB (Broughton & Dilworth, 1971)
- Solución stock de cloruro de cobalto (CoCl₂.6H₂O) al 0.1 M
- Solución stock de cloruro de cadmio (CdCl₂) al 0.1 M
- Solución stock de acetato de plomo trihidratado (Pb(CH₃COO)₂.3H₂O) al 0.1 M

- Solución de cloruro de mercurio (HgCl_2) al 0.1 M

c. Materiales y equipos

- Agitador mecánico orbital (MRC)
- Autoclave (*Barnstead*)
- Baguetas
- Balanza analítica (*Sartorius*)
- Balanza digital (*OHAUS Scout ProSP202*)
- Equipo de baño maría (*Memmert*)
- Beakers (*PIREX*)
- Bolsas de papel
- Bolsas de polietileno
- Bolsas herméticas
- Cámara de fotoperíodo
- Cámara de electroforesis (*Cleaver Scientific Ltd.*)
- Cámara digital (*Sony Lumix*)
- Congeladora de -20°C (*Whirlpool*)
- Criocajas de polipropileno de 81 casilleros
- Espectrofotómetro (*Genesys 6 – Thermo Electron* ®)
- Estufa eléctrica
- Fotodocumentador de geles de electroforesis (*Cleaver Scientific Ltd.*)
- Fuente de poder (*Cleaver Scientific Ltd.*)

- Horno microondas (*Sharp*)
- Cámara de frío 5°C - 7°C (*General Electric*)
- Cámara de frío de 12 – 14°C
- Kit de extracción de DNA (*AxyPrep*)
- Matraces
- Microcentrífuga (*Sigma*)
- Micropipetas automáticas de 1000, 100 y 10 µl (*NichipetEX Nichiryod*®)
- Microscopio (*Leica DM750*)
- Placas petri de vidrio y desechables 90 x 15”
- Potenciómetro (*Hanna*)
- Probetas
- Sistema de posicionamiento global (*GPS Garmin Etrex Vista*)
- Termociclador modelo *Eppendorf*® *Mastercycler*® *ep Systems*, Alemania
- Tubos de ensayo 25 x 250 mm (*PYREX*)
- Ultracongeladora de -80°C (*Sanyo*)
- Vórtex (*Gemmy UM – 300*)
- Estereoscopio (*Leica*).

3.2 Métodos

3.2.1 Toma de muestras

Los muestreos se llevaron a cabo en coordinación con la empresa Ecoandino S.A.C. y la Asociación de Productores Ecológicos Alto Andinos. Los terrenos muestreados

pertenecen al distrito de San Pedro de Cajas, provincia de Tarma, Departamento de Junín; que se encuentra a 4100 m.s.n.m., con una humedad promedio de 55.17% y temperaturas ambientales entre 9 y 10°C. Los suelos se caracterizaron en cuanto a textura como moderadamente gruesa, franco arenosos, ácidos (pH 4 – 5) y no salinos (Anexo 1 - Cuadro 1). Además se encontró la presencia de metales tales como B, Fe, Mn, Cu y Zn, así como también se mostró la presencia de Cr (13.86 – 18.87 ppm), Pb (33.92 – 56.41 ppm) y Cd (1.43 – 1.98 ppm) (Anexo 2 - Fig. 1).

Las bacterias con las que se trabajó fueron aisladas a partir del sexto muestreo realizado en marzo del 2010 del Proyecto Perú Biodiverso GTZ-CONCYTEC 2010. Se tomaron porciones de suelo de aproximadamente 1 Kg, circundantes a la rizósfera de las plantas de maca; asimismo, se tomaron muestras de suelo de los campos en igual cantidad pero de las zonas que no presentaban cultivo. Las muestras fueron colectadas en bolsas de cierre hermético y colocadas en un *cooler* con *gel packs* que mantenían la temperatura a 4°C aproximadamente, hasta que fueran procesadas en el laboratorio.

3.2.2 Lugar de ejecución

El presente trabajo de investigación se ejecutó en el Laboratorio de Ecología Microbiana y Biotecnología “Marino Tabusso” (LEMYB), perteneciente al Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM).

3.2.3 Recuento de bacterias psicrotóficas

Para cada muestra se pesaron 10 g de suelo y se procedió a diluir con 90 ml de agua peptonada 0.1%. Se agitó por 2 minutos hasta homogenizar obteniéndose con ello la dilución 10^{-1} , luego se realizaron diluciones sucesivas hasta llegar a 10^{-6} . Se transfirieron alícuotas de 1 ml de las diluciones realizadas a placas petri estériles y se incorporó luego el medio de cultivo Agar Plate Count (PC), licuado y previamente temperado. Se realizó la homogenización respectiva de las placas haciendo movimientos circulares y de arriba abajo.

La incubación se realizó a 6°C por aproximadamente una semana. El recuento de colonias se produjo en placas que contenían entre 30 - 300 colonias y se reportó como UFC/g de suelo seco (APHA, 1998).

3.2.4 Aislamiento y caracterización de bacterias psicrótrofas

Se reactivaron las cepas aisladas de la rizósfera de maca de trabajos en el Proyecto Perú Biodiverso GTZ - CONCYTEC 2009. Después del período de incubación, se eligieron las colonias que presentaron crecimiento a bajas temperaturas, realizándose reaislamientos de las colonias en placas petri con agar nutritivo (AN) y siendo incubadas entre 5 y 7°C, hasta obtener colonias aisladas.

3.2.5 Conservación de las bacterias aisladas por criopreservación a -80°C

Las cepas aisladas se sembraron y conservaron mediante criopreservación a -80 °C. Las cepas puras y aisladas se sembraron en caldo casoy para luego ser incubadas a 22 °C con una agitación de 150 rpm, una vez llegada a la concentración de biomasa adecuada (10^8 ufc/ml aprox.) se procedió a tomar una alícuota de 1.5 ml del cultivo y mezclarlo con 0.5 ml de glicerol puro en tubos *eppendorf* de 1.5 ml secos y estériles.

3.2.6 Caracterización morfológica y fisiológica

a. Caracterización macroscópica

Las características de crecimiento a nivel macroscópico se observaron luego de 7 días de incubación de las cepas crecidas en agar nutritivo (AN) a una temperatura de 6°C aproximadamente. Se tuvo en cuenta el tamaño de la colonia (entre 2 a 6 mm), forma (circular y ovalada), color (crema, blanca, translúcida, amarillenta, tornasolada), textura (cremosa, mucosa y acuosa) y borde (regular e irregular) (Bergey *et al.*, 2000).

b. Caracterización microscópica

Las cepas psicrótrofas aisladas se sembraron en agar nutritivo, a partir de las cuales se extrajo una colonia aislada con un asa de *Kolle* y se procedió a fijarla en un portaobjeto previamente preparado con una gota de agua. Se realizó una tinción gram para determinar la forma de la bacteria y su coloración gram (Bergey *et al.*, 2000). Para la identificación de las bacterias se utilizó un microscopio óptico utilizando el objetivo de 100X.

Además de la tinción gram se usó el método de Hidróxido de Potasio (KOH) para confirmar la característica de Gram positiva o Gram negativa de la cepa según sea el caso. Para realizar este ensayo, se colocó una gota de KOH al 3% en una lámina porta objeto, luego se tomó una muestra de la cepa sospechosa con un asa de *Kolle* y se hizo una suspensión. Se mezcló continuamente durante 60 segundos, luego lentamente se levantó el asa de *Kolle* de la lámina porta objeto. Los microorganismos Gram negativos presentan un hilo delgado a medida que se aleja el asa de *Kolle*, siendo este un resultado positivo; de diferente forma reaccionan los microorganismos Gram positivos, los cuales no presentan ningún cambio en la suspensión, siendo este un resultado negativo para esta prueba (Health Protection Agency, 2010).

c. Crecimiento a diferentes temperaturas

Se sembraron las cepas en agar nutritivo (AN) y se incubaron a temperaturas de 6°C, 12°C, 22°C y 28°C, por 7 días. Se evaluó el nivel de crecimiento de las cepas a estas temperaturas en orden de determinar su capacidad adaptativa.

3.2.7 Caracterización molecular

Los ensayos de caracterización molecular se realizaron para las cepas más promisorias en cuanto a capacidad PGPR. Se llevaron a cabo en el área de análisis molecular a una temperatura controlada de 21 °C.

a. Extracción de ADN

Para esta prueba se utilizará el kit de extracción *AxyPrep™ Bacterial Genomic DNA Miniprep Kit*, cuyo protocolo se detalla a continuación:

- Se colocaron alícuotas de caldo casoy con las cepas crecidas a una concentración aproximada de $10^8 - 10^9$ ufc/ml (incubadas a 22 °C) en tubos para microcentrífuga de 2 ml y centrifugaron a 12000 g durante 30 segundos.
- Se descartó el sobrenadante cuidando de no perturbar el *pellet*, y se resuspendió y homogenizó con 150 μ l de *buffer* S conteniendo la *RNAsa A*.
- Se agregó 20 μ l de lisozima y se mezcló bien. Se esperó cinco minutos a temperatura ambiente antes de continuar con el procedimiento.
- En el caso de las cepas gram positivas, se las incubó a 37 °C por 30 minutos (luego de haber adicionado la lisozima).
- Se incorporaron 30 μ l de EDTA 0.25 M (pH=8). Se mezcló bien y seguidamente se incubó en hielo por 5 minutos.
- Se añadieron 450 μ l de *buffer* G–A y homogenizó en *vortex* por 15 segundos y se llevó a un baño de agua a 65 °C por 10 minutos.
- Se agregaron 400 μ l de *buffer* G–B, seguido de 1 ml de *buffer* DV (previamente enfriado a 4°C), se homogenizó vigorosamente y centrifugó a 12000 g por dos minutos.
- Después de la formación de dos fases, se extrajo y descartó la fase superior (color azul). Se transfirió la fase inferior al interior de una columna de filtración colocada en un tubo para microcentrífuga de 2 ml y se centrifugó a 12000 g por 1 minuto.
- Se descartó la columna de filtración y luego se adicionó al filtrado 400 μ l de *buffer* BV.
- Se colocó una columna *Miniprep* en otro tubo para microcentrífuga de 2 ml y se transfirió el filtrado anterior, se centrifugó a 12000 g por 1 minuto.
- Se descartó el filtrado del tubo, se añadieron 500 μ L de *buffer* W1 a la misma columna y se centrifugó a 12000 g por 1 minuto. Se descartó el filtrado y se agregaron 700 μ l de *buffer* W2, se procede a centrifugar a 12000 g por 1 minuto. Se repitió este paso para remover completamente las sales, eliminando problemas potenciales en subsecuentes reacciones enzimáticas.

- Se descartó el filtrado y colocó nuevamente la columna *Miniprep* en el tubo de microcentrífuga de 2 ml. Se centrifugó a 12000 g por 1 minuto.
- Se transfirió la columna *Miniprep* a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml limpio. Para eluir el DNA, se agregó 150 µl de eluyente (previamente calentado a 65 °C para aumentar la eficiencia de la elución), teniendo cuidado de verterlo al centro de la membrana.
- Se dejó reposar por 1 minuto a temperatura ambiente, y luego se centrifugó a 12000 g por 1 minuto.
- Las muestras de ADN fueron almacenadas a -20°C.

b. Amplificaciones BOX - PCR

El análisis de los perfiles de bandas BOX se realizó de acuerdo a Versalovic *et al.*, 1991.

Se empleó el primer BOX A1R (5' – CTACGGCAAGGCGACGCTGACG - 3') para la amplificación BOX. Las reacciones de amplificación (PCR), se realizaron en tubos de PCR de polipropileno de 200 µl y en un termociclador modelo *Eppendorf® Mastercycler® ep Systems*, Alemania. Cada 25 µl del volumen total de reacción PCR contuvo lo siguiente: *buffer* de PCR al 1X, DMSO al 10 %, 7.5 mM MgCl₂, 1.25 mM de dNTPs (*Fermentas*), 20 pmol de cada oligonucleótido, 2 U de *Taq* polimerasa (*Fermentas*) y 5 µl de lisado. Los ciclos de amplificación fueron: desnaturalización inicial a 95°C por 3 minutos; 25 ciclos de desnaturalización a 93°C por 45 segundos, *annealing* a 53°C por 1 minuto, extensión a 65°C por 8 minutos y una extensión final a 65°C por 16 minutos. La comprobación de la amplificación se realizó mediante electroforesis, cargando 5 µl del amplificado en gel de agarosa al 1.5 % de 15 cm en *buffer* Tris-Borato-EDTA (TBE) 1X a 80 voltios durante 3 horas. Los productos de la amplificación fueron mezclados en la proporción 5:1 (producto: *buffer*) con el *buffer* de carga para electroforesis 6X *Loading Dye Solution* (*Fermentas*). Un marcador de 1Kb plus (*Fermentas*) fue incluido como referencia de pesos moleculares y cargado a ambos extremos de cada gel. Luego, los geles fueron teñidos con una solución de bromuro de etidio de 0.5 µg/ml durante 10 minutos y enjuagados con agua destilada durante

el mismo tiempo. Los perfiles de bandas fueron visualizados bajo luz ultravioleta del fotodocumentador de geles, e inmediatamente fotografiados.

c. Amplificación y purificación del gen ARNr 16S para secuenciamiento

Se empleó el método descrito por Weisburg *et al.*, (1991) para amplificar un fragmento de 1500 pares de bases (pb) usando los oligonucleótidos fD1 (5' – CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG – 3') y rD1 (5' – CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC – 3').

Las reacciones de amplificación se realizaron en tubos de PCR de polipropileno de 200 µl y en un termociclador modelo *Eppendorf*® *ep Systems*, Alemania. Cada 25 µl del volumen total de reacción PCR contuvo: *Buffer* de reacción 1X (*Fermentas*), 200 µM de dNTPs (*Fermentas*), 1.5 mM MgCl₂, 5 pmol de cada oligonucleótido y 1 unidad de Taq-polimerasa recombinante (*Fermentas*). Los ciclos de amplificación a usar fueron: una desnaturalización inicial (94°C, 3 minutos); seguido por 35 ciclos de desnaturalización (94°C, 45 segundos), *annealing* (57°C, 1 minuto) y extensión (72°C, 2 minutos), y finalmente con una sola extensión final (72°C, 5 minutos).

Los productos de la amplificación obtenidos fueron examinados empleando geles de electroforesis de agarosa al 1% de 7 x 15 cm en *buffer* Tris-Borato-EDTA (TBE) 1X por 1 hora a 80v, tratados de la misma manera que los geles de BOX-PCR (apartado b, subtítulo 4.2.7).

Luego, los productos de PCR fueron purificados con el *kit* PCR *Cleanup* de *Axyprep*TM y se procedió de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Posteriormente, estos productos fueron enviados a secuenciar a *Macrogen Inc.* (Seoul, Corea) de acuerdo a las especificaciones de la compañía.

d. Construcción de los árboles filogenéticos

Para la construcción de los árboles filogenéticos, los resultados de las cepas secuenciadas fueron examinados y editados con el programa de alineamiento de

secuencias *Bioedit* (Hall, 1999), posteriormente, las secuencias obtenidas fueron comparadas con la base de datos del *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), usando los programas BLASTN (Altschul *et al.*, 1997) y EzTaxon (Chun, J. *et al.*, 2007), así se identificaron las secuencias contrastando con las más similares. Para el análisis filogenético las secuencias fueron alineadas usando el software ClustalX2 (Thompson *et al.*, 1997). Las distancias fueron calculadas de acuerdo al modelo de dos parámetros de Kimura (Kimura, 1980). Los árboles filogenéticos del ARNr 16S fueron deducidos usando *the neighbour-joining analysis* (Saitou, N.J. & Nei, 1987) y la máxima probabilidad (Rogers, M.L.; & Swofford, 1998). El programa MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011) fue usado para todos los análisis.

3.2.8 Capacidad promotora del crecimiento vegetal (PGPR)

a. Producción de ácido indol acético (AIA)

Por medio de este ensayo, se determina la capacidad de producir AIA o alguno de sus precursores (Bric *et al.*, 1991). La aparición del color rosa a fucsia, es debida a una reacción oxidativa causada por el ácido, y una transaminación que lleva a la sustitución del grupo amino por el Cl del FeCl₃, presente en el reactivo de *Salkowski* (Gordon & Weber, 1951). Para la realización de la prueba, se sembraron las cepas en tubos de ensayo conteniendo 5 ml de caldo levadura manitol (LMC) con 5 mM de L-Triptófano y se colocaron sin agitación orbital a tres rangos de temperatura distintos, siendo estos: 5-7°C, 12-14°C y 22-24°C. El tiempo de incubación fue de 28, 19 y 11 días respectivamente. Al término del período de incubación en cada temperatura, se tomaron alícuotas de 500 µl y fueron colocadas en un tubo *ependorf* de polipropileno de 1.5 ml de capacidad para luego ser centrifugadas a 12000 rpm por 5 minutos. Terminado el ciclo de centrifugación, se colectó 250 µl de cada sobrenadante y se colocaron en un tubo de ensayo (por duplicado), a cada uno de los cuales se le agregó 1 ml del reactivo de *Salkowski* (1:4) (Gordon & Weber, 1951). Seguidamente, los tubos se incubaron por 30 minutos en condiciones de oscuridad y a temperatura ambiente. Finalizados los 30 minutos, se observó el viraje de color de amarillo translúcido a diferentes

tonalidades de rosa y en algunos casos fucsia encendido para las reacciones positivas. Finalmente se procedió a medir la absorbancia en el espectrofotómetro (*Genesys 6 – Thermo Electron Corp.*) a 530 nm. El nivel producido de AIA en µg/ml de cada cepa, fue estimado por una curva estándar (Glick, 1995).

b. Determinación de la solubilización de fosfato bicálcico y tricálcico

Todas las cepas aisladas se sembraron en el medio LMC sin agitación orbital a los rangos de temperaturas de: 5-7°C, 12-14°C y 22-24°C durante 28, 19 y 11 días respectivamente. Luego se colocaron 5 µl de $10^7 - 10^8$ ufc/ml de cada una de las cepas (Alikhani *et al.*, 2006) en el medio basal NBRIP modificado con fosfato bicálcico (CaHPO_4) y fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) (Nautiyal, 1999). Seguidamente las placas fueron incubadas a las temperaturas 5-7°C, 12-14°C y 22-24°C por un período de 36 (5-7°C y 12-14°C) y 8 días aproximadamente. Se pudo identificar como positivas, para la solubilización de fosfato, las cepas que mostraron la presencia de un halo translúcido alrededor de la colonia, cuyo diámetro fue calculado restando el diámetro de la colonia. Los resultados fueron expresados como eficiencia de solubilización (E) (Nguyen *et al.*, 1992).

$$E = \frac{\text{Diámetro de solubilización (S)}}{\text{Diámetro de crecimiento (G)}} \times 100$$

c. Ensayos de germinación *in vitro*

Se seleccionó las cepas que mostraron mejores resultados en las pruebas PGPR y algunas otras carentes de estas características. Dichas cepas se sembraron en placas con agar nutritivo y se incubaron durante 5 a 7 días a una temperatura de 5 - 7°C. Luego se procedió a colectar la biomasa con el fin de ser usadas como inóculo en el ensayo de germinación.

Para la realización de este ensayo primero se procedió a la desinfección de las semillas de trébol (*Trifolium pratense*), la cual se realizó embebiendo en alcohol al 70 % y se dejando reposar por un lapso de 3 minutos, luego se enjuagó con agua destilada estéril (seis veces), seguidamente se continuó con la desinfección sumergiendo las semillas en hipoclorito de sodio al 3 % por espacio de 3 minutos y luego finalmente se procedió a enjuagar nuevamente con agua destilada estéril (seis veces) (Zúñiga D., 2009).

Una vez culminada la desinfección de las semillas, se inoculó con las suspensiones microbianas que se obtuvieron por cosecha de las bacterias sembradas en placas petri con agar nutritivo y suspendiendo en 5 ml de solución salina por un periodo de 15 minutos (Ogata & Zúñiga, 2008). Finalmente, se colocaron las semillas inoculadas en placas petri con agar agua al 0.5%, 4 repeticiones por cada tratamiento, en condiciones de oscuridad. La temperatura de germinación fue de $12 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Se usaron como control a las semillas embebidas en solución salina sin inóculo. Se usaron un total de 21 tratamientos, 20 representados por las cepas aisladas e inoculadas en caldo nutritivo, un control sin inocular.

d. Promoción del crecimiento a nivel de plántulas

Como soporte para este ensayo se utilizó arena previamente lavada y tratada en autoclave para eliminar la carga microbiana que pudiera estar presente (121°C a 15 lb por 15 minutos). Se realizó un ensayo preliminar escogiéndose 5 cepas como tratamientos (LMTK14, LMTK24, LMTK25, LMTK28, LMTK32) y dos controles (N+ y N-), luego se realizó un segundo ensayo con sólo 4 tratamientos, usando las cepas que dieron mejores resultados en el ensayo previo (N+, N-, LMTK14 y LMTK32). Se colocaron las semillas de trébol previamente desinfectadas e inoculadas con las cepas y dos controles sin cepa (caldo sin inocular), en macetas conteniendo la arena estéril humedecida con agua destilada estéril. Durante la realización del ensayo las plántulas fueron regadas con soluciones nutritivas con (control N+) y sin KNO_3 (para los tratamientos y el control N-).

3.2.9 Ensayo con metales pesados

a. Determinación de resistencia a metales pesados

Este ensayo se realizó para determinar qué cepas bacterianas tienen capacidad de resistencia a una determinada concentración de metales pesados, siendo estos: Pb, Cd, Co y Hg en la forma de acetato de plomo trihidratado, cloruro de cadmio, cloruro de cobalto hexahidratado y cloruro de mercurio (II) respectivamente. El ensayo fue desarrollado siguiendo el método de dilución en agar de Lalitha (2005).

Se colocó 5 μ l de 10^5 - 10^6 ufc/ml (cultivo *overnight*) de cada una de las cepas en agar nutritivo (AN) a pH 4 y 5 suplementado con diferentes concentraciones de metales. Las concentraciones de los metales probados fueron de 0.01 mM de sales de Hg y 0.5 mM de sales de Co, Cd y Pb respectivamente y una mezcla de todos los metales al 0.5 mM. Luego las placas fueron incubadas a 5 - 7°C de temperatura por un tiempo aproximado de 30 días. Cumplido el plazo de incubación, se consideró como positivas para la resistencia a metales pesados, a aquellas cepas que presentaron crecimiento en las placas suplementadas con dichas sustancias.

b. Prueba de toxicidad a metales pesados: concentración mínima inhibitoria (MIC)

Se realizó esta prueba para determinar la concentración mínima a la cual el crecimiento de las bacterias se ve inhibido siguiendo la metodología de Lalitha (2005).

Se procedió a usar placas conteniendo 20 ml de agar nutritivo a pH 5 y fueron suplementadas con diferentes concentraciones de Pb y Cd, siendo estas: 0.005 mM, 0.01 mM, 0.05 mM, 0.1 mM, 0.5 mM, 1 mM, 2.5 mM y 5 mM Sabry *et al.* (1997). Se usaron 3 repeticiones para cada concentración de cada metal.

Luego se procedió a inocular las placas con una microgota de 5 μ l de cada cepa aislada conteniendo aproximadamente 10^5 - 10^6 ufc/ml. Finalmente se procedió a

incubar las placas a una temperatura de 5 - 7°C por un tiempo aproximado de 30 días.

3.2.10 Análisis de datos

Se utilizó un diseño completamente al azar, realizándose un análisis de variancia y la prueba de comparaciones múltiples de Mínima Diferencia Significativa (LSD). Para esto se utilizó el programa estadístico *Statgraphics Centurion XVI*. Las desviaciones estándar y los gráficos se realizaron con el programa *Excel*. Para el análisis de conglomerados se usó el método del vecino más cercano, Euclideana cuadrada.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 Aislamiento de bacterias psicrótrofas

Las bacterias psicrótrofas empleadas en este trabajo fueron aisladas del Proyecto Perú Biodiverso GTZ - CONCYTEC 2009 a partir de muestras de la rizósfera de las plántulas de maca, así como también de muestras de suelo de campos que no presentaban cultivo. Los terrenos muestreados están ubicados en el distrito de San Pedro de Cajas, provincia de Tarma, Departamento de Junín (Anexo A1).

Para la selección y aislamiento de bacterias psicrótrofas, se sometió a las cepas aisladas de los muestreos a temperaturas de 5 - 7°C, tomándose como tolerantes al frío aquellas que presentaron crecimiento a dichas temperaturas.

En total lograron aislarse 44 cepas psicrótrofas de los diferentes campos muestreados (Tabla 1).

Tabla 1. Distribución de muestras de suelo tomadas para el ensayo.

Lugar	Número de cepas aisladas	Suelo	Condición de campo	Muestras
Galpón Condorín	4	Rizosférico (MC1)	1° año de cosecha	1
				2
				3
				4
	4	Sin cultivo (C1)		R1
				R2
Acomachay	19	Rizosférico (MC2)	2° año de cosecha	1
				2
				3
				4
	11	Sin cultivo (C2)		R1
				R2
Condorín	6	Sin cultivo (D1)	10 años de descanso	R1
				R2

4.2 Caracterización morfológica

Del total de cepas aisladas, 23 pertenecieron a suelo rizosférico (MC1 y MC2) y 21 a suelo sin cultivo (C1, C2 y D1) (Tabla 2).

Tabla 2. Listado de cepas de bacterias psicrótrofas aisladas de Junín.

Cepa	Procedencia	Cepa	Procedencia	Cepa	Procedencia
LMTK1	M1C1/3b	LMTK16	M4C2/2c	LMTK31	M4C2/4b
LMTK2	M1C1/3c	LMTK17	C2R1/4b	LMTK32	M3C2/2d
LMTK3	M1C1/3d	LMTK18	M4C2/3c	LMTK33	M4C2/4a
LMTK4	M1C2/3a	LMTK19	C2R1/3b	LMTK34	C1R1/4c
LMTK5	C1R1/2a	LMTK20	M3C2/2a	LMTK35	M3C2/2c
LMTK6	C2R1/2a1	LMTK21	M2C1/4a	LMTK36	M3C2/2b
LMTK7	C2R1/2a2	LMTK22	C2R2/4a	LMTK37	M3C2/4a
LMTK8	C2R2/2a	LMTK23	D1R1/3b	LMTK38	C2R1/3c
LMTK9	C2R2/2d	LMTK24	D1R1/2a	LMTK39	M3C2/3c
LMTK10	C2R2/2f	LMTK25	M4C2/2a	LMTK40	M4C2/3d
LMTK11	C2R1/3a	LMTK26	M2C2/3b	LMTK41	M4C2/3a
LMTK12	M2C2/3a	LMTK27	M4C2/3b	LMTK42	C2R1/4a
LMTK13	D1R1/2c	LMTK28	C1R1/4b1	LMTK43	C1R1/4a
LMTK14	D1R1/3a	LMTK29	M4C2/2b	LMTK44	M3C2/4
LMTK15	D1R1/2b	LMTK30	D1R1/2d		

4.2.1 Caracterización microscópica

La microscopía confirmó que de la totalidad de 44 cepas aisladas, 9 fueron Gram negativas y 35 Gram positivas (Tabla 3). Se pudo observar, con un aumento de 100X, que la totalidad de las cepas presentaron forma bacilar, las cuales en su mayoría se

encontraban formando cadenas de dos a más unidades celulares. Además, se observó que todas las cepas fueron catalasa positivas y se confirmó las bacterias Gram positivas mediante la prueba de KOH que resultaron ser negativas para este ensayo, a diferencia de las bacterias Gram negativas que dieron resultados positivos en el ensayo de KOH.

4.2.2 Caracterización macroscópica

Las bacterias psicrótrofas aisladas demostraron tener un crecimiento relativamente lento a temperaturas de 5 - 7°C, siendo este de un promedio de entre 4 a 5 días para poder observar colonias definidas y permitir su diferenciación.

Todas las cepas aisladas fueron evaluadas en cuanto a la textura, tamaño de la colonia, forma, color y borde (Tabla 3).

Tabla 3. Caracterización macroscópica de las cepas psicrótrofas aisladas.

Cepa	Tinción Gram	Tamaño (mm)	Forma	Color	Borde	Textura
LMTK1	positiva	4	Circular	Crema	Regular	Ligosa
LMTK2	positiva	3	Circular	Crema	Regular	Ligosa
LMTK3	positiva	4	Circular	Crema	Regular	Ligosa
LMTK4	positiva	4	Circular	Crema	Regular	Ligosa
LMTK5	positiva	3	Circular	Crema	Regular	Ligosa
LMTK6	positiva	1	Circular	Amarillo	Regular	Ligosa
LMTK7	positiva	2	Circular	Crema	Regular	Ligosa
LMTK8	positiva	2	Circular	Crema translúcido	Irregular	Ligosa
LMTK9	positiva	1.5	Circular	Crema	Regular	Ligosa
LMTK10	positiva	2	Circular	Crema	Regular	Ligosa
LMTK12	positiva	1	Circular	Crema translúcido	Irregular	Acuosa
LMTK13	positiva	2	Circular	Crema	Regular	Cremosa
LMTK14	positiva	3	Circular	Crema	Regular	Ligosa

LMTK15	positiva	2	Circular	Crema	Regular	Ligosa
LMTK16	positiva	3	Circular	Blanca	Regular	Ligosa
LMTK17	positiva	3.5	Circular	Blanca	Regular	Ligosa
LMTK18	positiva	2	Circular	Blanca	Irregular	Ligosa
LMTK19	positiva	3	Circular	Blanca	Regular	Ligosa
LMTK20	positiva	3	Circular	Blanca	Regular	Ligosa
LMTK21	positiva	2	Circular	Blanca	Regular	Cremosa
LMTK22	positiva	2.5	Circular	Blanca	Regular	Cremosa
LMTK23	positiva	1	Circular	Crema	Regular	Ligosa
LMTK24	positiva	3	Circular	Blanca	Regular	Ligosa
LMTK25	positiva	3	Circular	Blanca	Regular	Ligosa
LMTK26	positiva	2.5	Circular	Blanca	Regular	Ligosa
LMTK27	positiva	2	Circular	Blanca	Irregular	Cremosa
LMTK29	positiva	1	Circular	Crema	Regular	Ligosa
LMTK31	positiva	1	Circular	Blanca	Regular	Ligosa
LMTK33	positiva	1.5	Circular	Crema	Regular	Ligosa
LMTK37	positiva	2	Ovalada	Blanca translúcida	Regular	Acuosa
LMTK38	positiva	2	Ovalada	Blanca translúcida	Regular	Acuosa
LMTK39	positiva	2	Ovalada	Blanca translúcida	Regular	Acuosa
LMTK40	positiva	1	Circular	Blanca translúcida	Regular	Acuosa
LMTK41	positiva	1	Circular	Blanca translúcida	Regular	Acuosa
LMTK44	positiva	1	Circular	Crema translúcido	Regular	Acuosa
<hr/>						
LMTK11	negativa	2	Circular	Crema translúcido	Regular	Ligosa
LMTK28	negativa	1.5	Circular	Crema translúcido	Regular	Ligosa
LMTK30	negativa	1.5	Circular	Crema translúcido	Regular	Ligosa
LMTK32	negativa	1.5	Circular	Crema translúcido	Regular	Ligosa
LMTK34	negativa	1.5	Circular	Crema translúcido	Regular	Ligosa

LMTK35	negativa	1.5	Circular	Crema translúcido	Regular	Ligosa
LMTK36	negativa	1.5	Circular	Crema translúcido	Regular	Ligosa
LMTK42	negativa	1	Circular	Crema translúcido	Regular	Acuosa
LMTK43	negativa	3	Circular	Crema	Regular	Ligosa

En cuanto a las características morfológicas de las cepas aisladas, se observó que las Gram negativas en su mayoría fueron de color crema translúcido y de textura ligosa, además fueron de un tamaño medio entre 1 y 3 mm de diámetro, todas sin excepción presentaron bordes regulares y forma circular. Además todas las cepas Gram negativas fueron aisladas de los campos sin cultivo con excepción de las cepas LMTK32, LMTK35 y LMTK36 que fueron aisladas a partir del suelo rizosférico.

Por otro lado, se encontró más variabilidad en cuanto a morfología de las cepas Gram positivas. Todas presentaron bordes regulares, con excepción de las cepas LMTK27, LMTK18, LMTK12 y LMTK8; en cuanto a la forma de la colonia, sólo las cepas LMTK37, LMTK38 y LMTK39 tuvieron forma ovalada, además fueron del mismo color y la misma textura, es posible que por ser iguales en todas las características morfológicas se trate del mismo género de bacteria. Respecto al color podemos decir que todas las Gram positivas presentaron colores muy parecidos, predominando los cremas y blancos con algunas variaciones. Sin embargo se puede resaltar que la cepa LMTK6 fue de un color amarillo y presentó una textura cremosa, por estas características únicas podemos inferir que se trata de un género de bacteria totalmente distinto a la demás cepas aisladas dentro del grupo de las Gram positivas.

Las diferencias en las morfologías de las colonias se verán confirmadas una vez que se haga la caracterización molecular la cual despejará las dudas en cuanto al género y probablemente la especie de las bacterias aisladas.

4.3 Caracterización fisiológica

4.3.1 Crecimiento a diferentes temperaturas

Se realizó un ensayo de crecimiento a diferentes temperaturas de las 44 cepas aisladas para verificar si pertenecen al grupo de bacterias psicrótrofas o psicrófilas. Las temperaturas de ensayo fueron: 6°C, 12°C, 22°C y 28°C. La escala de evaluación fue de 0 a 4, 0 significa ningún crecimiento y 4 el crecimiento máximo de la colonia. El crecimiento de las colonias se monitoreó diariamente durante los 7 días que duró la evaluación (Anexo A2).

Se observó que la totalidad de las cepas crecieron a una temperatura de 6°C, siendo el crecimiento más lento a los 7 días aproximadamente, aunque se pudo evidenciar el crecimiento de algunas cepas transcurridos 3 días desde que fueron sembradas, siendo estas las de crecimiento más rápido. Se observó crecimiento máximo (con valor 4), a los 7 días de evaluación, para las cepas LMTK1, LMTK6, LMTK11, LMTK22, LMK28, LMTK30, LMTK32, LMTK34, LMTK35 y LMTK36 correspondiendo al 22.73% de las cepas. Mientras que sólo se encontró una cepa que obtuvo el menor tamaño (1), siendo esta la cepa LMTK26. El 15.91% de las cepas alcanzaron un nivel (2) de crecimiento a partir del cuarto día de evaluación en adelante. Por otro lado, el 59.09% de las cepas alcanzaron el nivel 3 de crecimiento, superando el porcentaje encontrado en el máximo nivel de crecimiento. De estos resultados podemos inferir que todas las cepas se encuentran adaptadas a crecer a bajas temperaturas, pero para la gran mayoría de ellas 6°C no es su temperatura óptima de crecimiento. Esta adaptación se debe a que fueron aisladas a partir de la zona altoandina cuyos rangos de temperatura varían desde los 15°C a 5°C aproximadamente y ocasionalmente hay presencia de heladas (temperaturas bajo 0°C) (Fig. 2D).

A 12°C el 100% de las cepas presentó crecimiento, de las cuales el 54.55% alcanzó el máximo crecimiento, todas las cepas alcanzaron tamaños de colonias adecuados para realizar un aislamiento posterior, es decir, se encontraron valores de 2, 3 y 4 en la escala de evaluación. Además se observó también que el 40.91% de las cepas obtuvo un nivel de crecimiento de 3, no se observó cepas que presentaran crecimiento o que presentaran el nivel de crecimiento menor (1). De estos resultados podemos afirmar que las cepas en

su mayoría pertenecen al grupo de bacterias psicrótrofas, ya que la temperatura de 12°C resulta ser la más adecuada para el crecimiento de las cepas, en donde el 100% creció y además el tamaño de colonia fue adecuado (Fig. 2C).

A los 22°C el 61.36% de las cepas obtuvieron el máximo valor de crecimiento a los 7 días de evaluación, también se observó que el 4.55% y 6.82% se encontraron dentro de los valores 1 y 2 de crecimiento respectivamente, evidenciando un tamaño de colonia pequeño. Se observó que todas las cepas crecieron a esta temperatura, alcanzando el máximo nivel de crecimiento la mayoría de las cepas, estos resultados nos confirman la afirmación anterior, en donde se indica que aproximadamente el 96% de cepas pertenecen al grupo de bacterias psicrótrofas ya que su temperatura óptima es 22°C pero se encuentran adaptadas a crecer a 6 y 12°C (Fig. 2B).

Finalmente a la temperatura de 28°C, muchas veces considerada óptima para varios microorganismos, se observó que el 4.55% de cepas no presentó crecimiento, este comportamiento demuestra que estas cepas, que no crecieron a 28°C, pertenecen al grupo de bacterias psicrófilas ya que no crecen a un rango de temperatura donde normalmente crecen lo mesófilos (Malay, 2006). Por otro lado, el 50% de las cepas obtuvo el máximo nivel de crecimiento (4) a esta temperatura (Fig. 2A).

Se observó que para el 95.45% de las cepas a medida que pasa el tiempo de incubación para todas las temperaturas, el tamaño de la colonia se incrementa gradualmente, pero a una temperatura de 6°C el incremento fue mucho menor, mientras que a 28°C y 22°C el crecimiento de las colonias fue más rápido. A las temperaturas de 6°C y 12°C, a las 24 horas de evaluación, se observó el crecimiento de algunas cepas correspondiendo al 34.09% y 63.64% respectivamente. De los resultados observados se puede destacar que el período de adaptación de las cepas aisladas a bajas temperaturas es mucho menor en comparación a lo encontrado por Calvo & Zúñiga (2010); ya que al cabo de un máximo de 4 días se pueden observar crecimiento para todas las cepas a la temperatura de 6°C que fue la más baja.

Por la evaluación de los resultados de este ensayo podemos afirmar que las cepas pertenecen al grupo de los psicrótrofos en su mayoría, ya que tienen la capacidad de crecer tanto a 6°C como a 28°C (Malay, 2006).

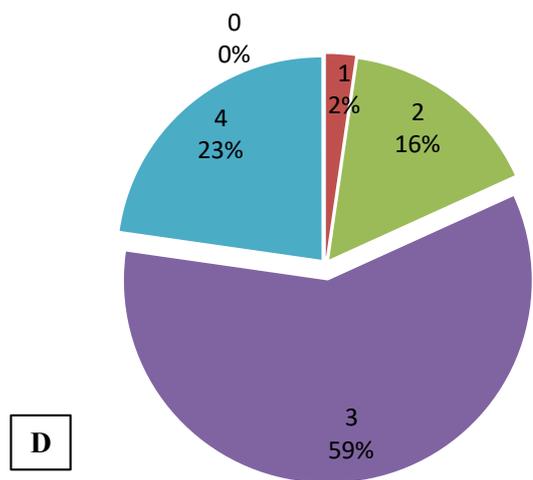
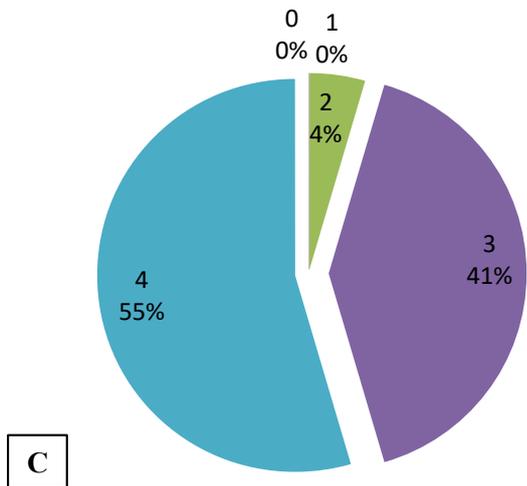
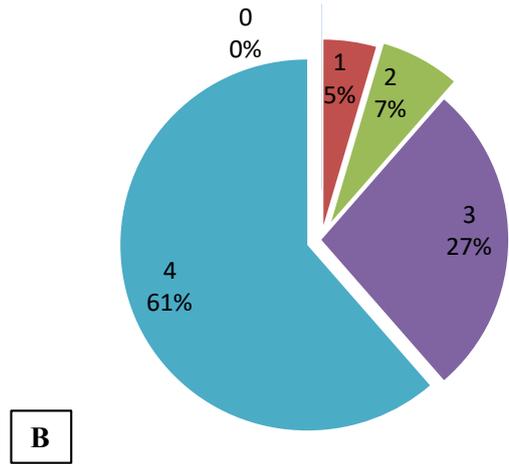
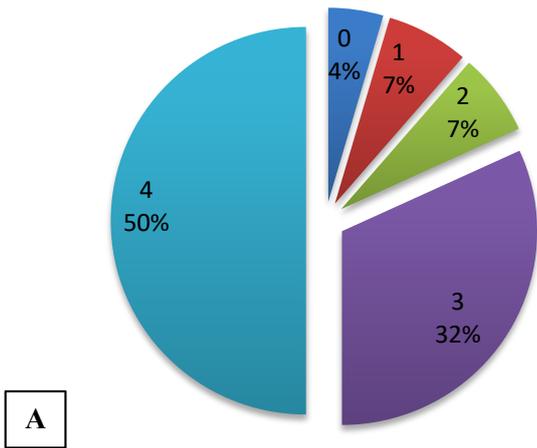


Fig. 2. Porcentaje de los niveles de crecimiento a diferentes temperaturas. A: Crecimiento a 28°C. B: Crecimiento a 22°C. C: Crecimiento a 12°C. D: Crecimiento a 6°C.

4.4 Caracterización molecular

4.4.1 Amplificaciones BOX – PCR

La técnica de amplificaciones rep-PCR permite determinar la diversidad bacteriana al distinguir diferentes cepas dentro de una misma especie y/o población bacteriana mediante la reacción de PCR y la aplicación de oligonucleótidos basados en las familias de elementos (secuencias) repetidos REP, ERIC y BOX, los cuales ocurren naturalmente, son altamente conservados y presentes en múltiples copias en el genoma de las bacterias (Lupski & Weinstock, 1992). Estos elementos y las técnicas de PCR correspondientes son denominados colectivamente como rep - PCR. De esta manera, se amplifican diferentes fragmentos de ADN que están localizados entre estos elementos resultando así en patrones de bandas (*fingerprints*) específicos e individuales para cada cepa (o clon bacteriano analizado) (Versalovic *et al.*, 1994).

Se escogió un total de 22 cepas psicrótrofas para la caracterización molecular, fueron seleccionadas por su comportamiento observado en ensayos de promoción de crecimiento a nivel *in vitro*. Mediante la técnica BOX – PCR, se encontraron 19 perfiles BOX diferentes, lo cual indica la gran diversidad de cepas aisladas (Fig. 3 y 4). Los diferentes perfiles observados corresponden a:

Perfil A: LMTK1

Perfil A1: LMTK4

Perfil A2: LMTK5

Perfil A3: LMTK7 y LMTK10

Perfil A4: LMTK15

Perfil A5: LMTK25

Perfil A6: LMTK14

Perfil A7: LMTK24

Perfil B: LMTK37

Perfil B1: LMTK39

Perfil C: LMTK33

Perfil D: LMTK6

Perfil E: LMTK11

Perfil E1: LMTK36

Perfil F: LMTK28 y LMTK30

Perfil F1: LMTK32 y LMTK34

Perfil G: LMTK35

Perfil H: LMTK43

Perfil I: LMTK42

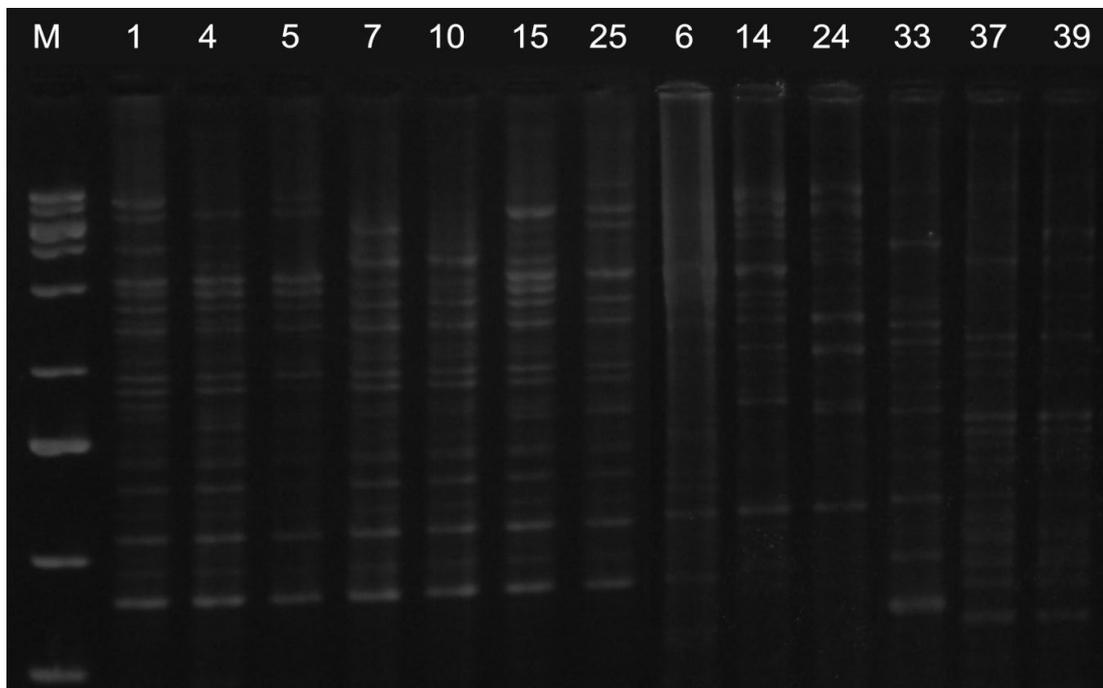


Fig. 3. Perfiles BOX de cepas de bacterias psicrótrofas Gram positivas. Filas 1, 4, 5, 7, 10, 15, 25, 14 y 24: perfil A – A7, fila 37: perfil B, fila 39: perfil B1, fila 33: perfil C, fila 6: perfil D, fila M: marcador de peso molecular 1Kb *plus Fermentas*.

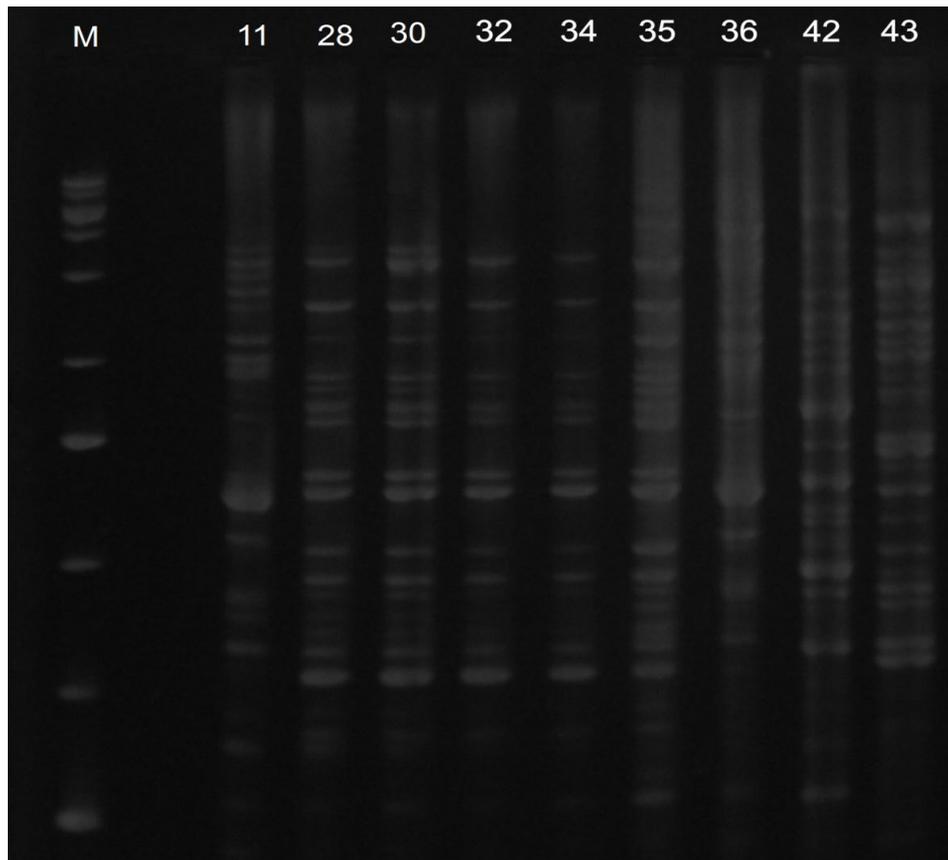


Fig. 4. Perfiles BOX de cepas de bacterias psicrótrofas Gram negativas. Fila 11: perfil E, fila 36: perfil E1, filas 28 y 30: perfil F, filas 32 y 34: perfil F1, fila 35: perfil G, fila 43: perfil H, fila 42: perfil I, fila M: marcador de peso molecular 1Kb *plus Fermentas*.

4.4.2 Amplificación y secuenciamiento del gen 16S del ARNr y la relación filogenética

La amplificación del gen 16S empleando el par de oligonucleótidos fD1 y rD1 (Weisburg *et al.*, 1991) generó un solo producto de PCR con un tamaño aproximado de 1500 pb. Se recibió de la empresa *Macrogen Inc.* las secuencias de cada una de las cepas con aproximadamente 1000 bases, las cuales fueron contrastadas y editadas con las secuencias disponibles de la base de datos del *GenBank* y *Ez Taxon* (Chun *et al.*, 2007), con las que se determinó la relación entre especies luego de la construcción de un árbol filogenético para el ensamblaje de la secuencia completa del gen 16S.

En base a los resultados, se encontraron nueve cepas pertenecientes al género *Bacillus*, dos relacionadas a *Paenibacillus*, una a *Sporosarcina*, una a *Arthrobacter*, ocho a *Pseudomonas* y una a *Cupriavidus*. Los géneros *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Sporosarcina* y

Paenibacillus se encuentran dentro del grupo de las bacterias Gram positivas, mientras los géneros *Pseudomonas* y *Cupriavidus* se encuentran dentro del grupo de las bacterias Gram negativas. Las cepas caracterizadas pertenecen a tres phylums: phylum Firmicutes (*Bacillus*, *Paenibacillus* y *Sporosarcina*) (Fig. 5), Actinobacteria (*Arthrobacter*) (Fig. 6) y Proteobacteria (*Pseudomonas* y *Cupriavidus*) (Fig. 7).

Para los aislamientos Gram positivos (Tabla 4) (59.09% de las cepas secuenciadas), 69.23% pertenecieron a *Bacillus* sp., 15.38% a *Paenibacillus* sp., 7.69% a *Sporosarcina* sp. y 7.69% a *Arthrobacter* sp. Para el género *Bacillus*, se obtuvieron porcentajes de similitud entre 99.7% y 99.81% a cepas tipo, las mismas que estuvieron altamente relacionadas a *Bacillus simplex* NBCR 15720^T [AB363738] (perfiles A – A7). Las cepas LMTK37 y LMTK39 (perfiles B y B1) se relacionaron al género *Paenibacillus*, con porcentajes de similitud de 97.38% y 95.52% a *P. castaneae* Ch 32^T [EU099594]. Para el caso de la cepa LMTK39 no se puede aseverar con exactitud que esté relacionada con la cepa *P. castaneae*, ya que su porcentaje de similitud es muy bajo debido a una cantidad de pares de bases inferior a las encontradas para la cepa LMTK37. La cepa LMTK33 (perfil C) perteneció al género *Sporosarcina* sp., con un porcentaje de similitud de 98.45% a *S. globispora* DSM 4^T [X68415] y 98.31% a *S. psychrophila* IAM 12468^T [D16277] (Fig. 5).

Finalmente, la cepa LMTK6 (perfil D) estuvo relacionada a las cepas *Arthrobacter nitroguajacolicus* G2-1^T [AJ512504] con 99.79% de similitud y a *A. aurescens* DSM 20116^T [X83405] con 99.51% (Fig. 6).

Tabla 4. Características moleculares y clasificación filogenética de las cepas bacterianas Gram positivas aisladas de la rizósfera de maca.

Cepas secuenciadas para el gen 16S ARNr	Perfil BOX -PCR	Cepas tipo más cercanas basadas en el gen 16S ARNr	Nº accesión de cepas tipo relacionadas	Similitud (%)
LMTK1	A	<i>Bacillus simplex</i> NBRC 15720 ^T	AB363738	99.70
LMTK4	A1	<i>Bacillus simplex</i> NBRC 15720 ^T	AB363738	99.80
LMTK5	A2	<i>Bacillus simplex</i> NBRC 15720 ^T	AB363738	99.80
LMTK7	A3	<i>Bacillus simplex</i> NBRC 15720 ^T	AB363738	99.72
LMTK10	A3	<i>Bacillus simplex</i> NBRC 15720 ^T	AB363738	99.81
LMTK14	A6	<i>Bacillus simplex</i> NBRC 15720 ^T	AB363738	99.58
LMTK15	A4	<i>Bacillus simplex</i> NBRC 15720 ^T	AB363738	99.73
LMTK24	A7	<i>Bacillus simplex</i> NBRC 15720 ^T	AB363738	99.73
LMTK25	A5	<i>Bacillus simplex</i> NBRC 15720 ^T	AB363738	99.73
LMTK37	B	<i>Paenibacillus castaneae</i> Ch 32 ^T	EU099594	97.38
LMTK39	B1	<i>Paenibacillus castaneae</i> Ch 32 ^T	EU099594	95.52*
		<i>Sporosarcina</i> spp.		
LMTK33	C	<i>Sporosarcina globispora</i> DSM 4 ^T	X68415	98.45
		<i>Sporosarcina psychrophila</i> IAM 12468 ^T	D16277	98.31
		<i>Arthrobacter</i> spp.		
LMTK6	D	<i>Arthrobacter nitroguajacolicus</i> G2-1 ^T	AJ512504	99.79
		<i>Arthrobacter aurescens</i> DSM 20116 ^T	X83405	99.51

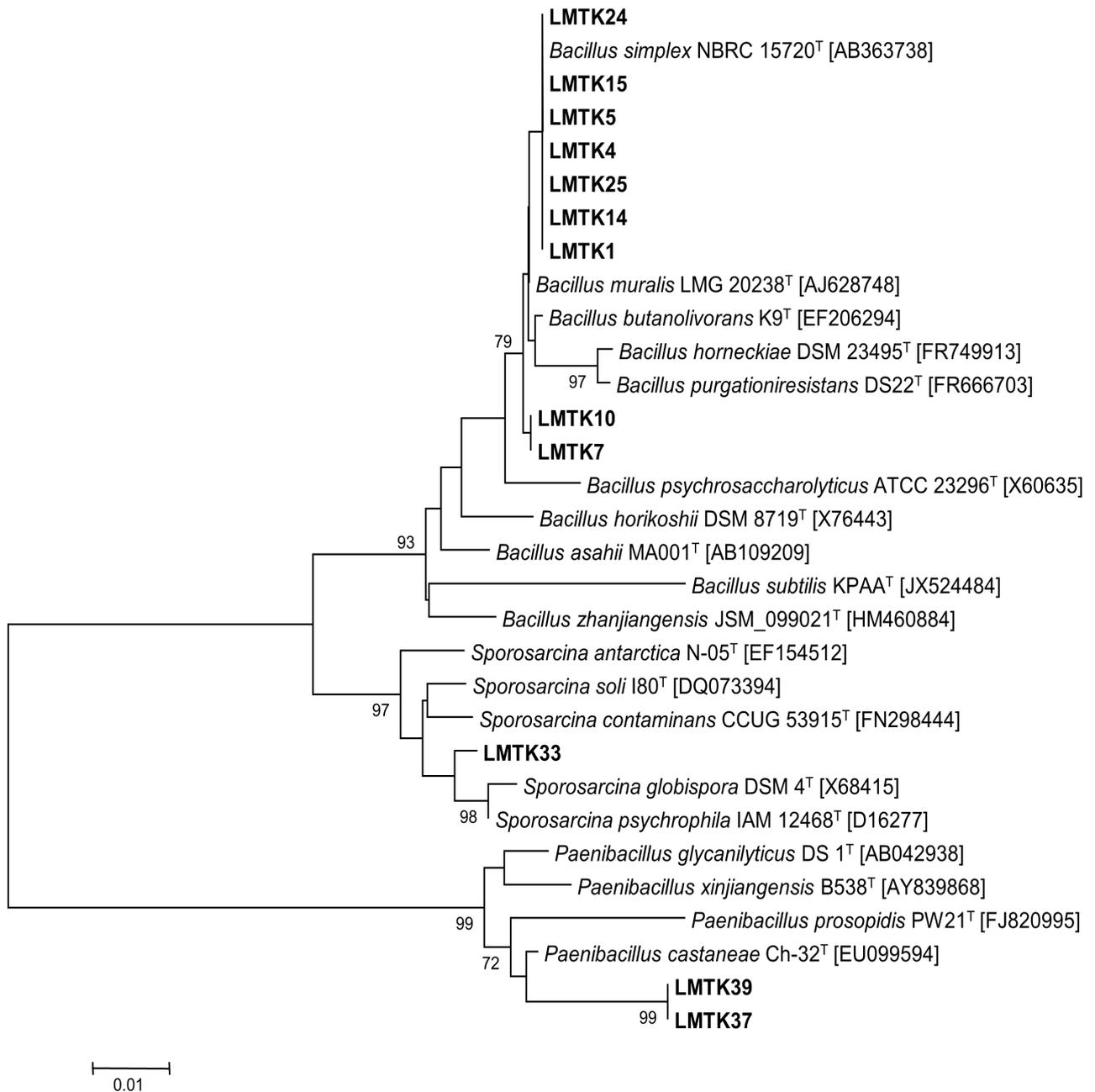


Fig. 5. Árbol filogenético de secuencias del gen 16S ARNr del *Phylum* Firmicutes (incluyen los géneros *Bacillus*, *Paenibacillus* y *Sporosarcina*). El método de reconstrucción filogenética de *Neighbour – joining* y las distancias fueron calculadas de acuerdo al método de Kimura-2 parámetros. Los valores en los puntos de ramificación indican soporte de bootstrap (1000 pseudoreplicas). Las cepas asiladas de la rizósfera de maca, se encuentra en negrita y con letras mayúsculas.

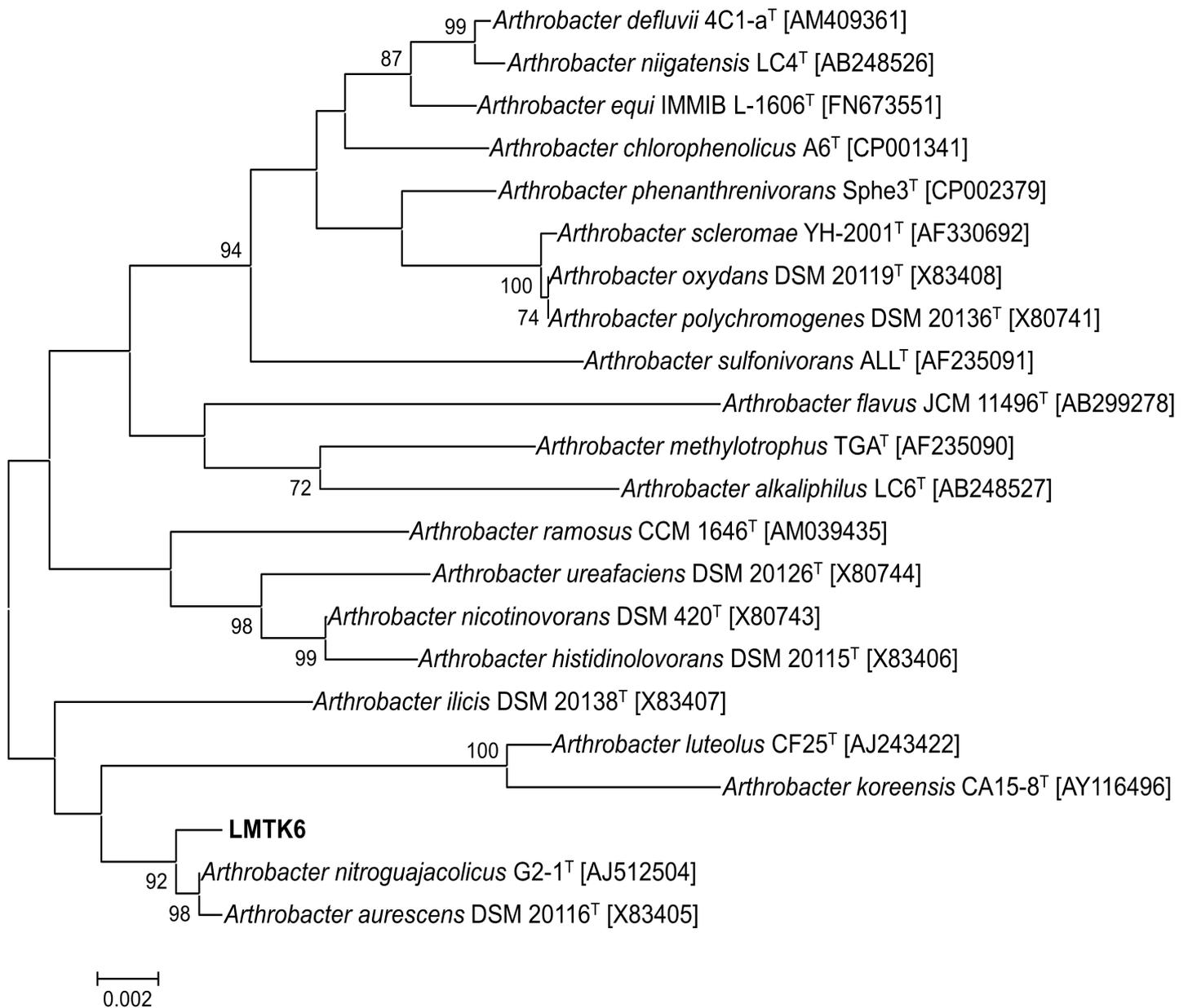


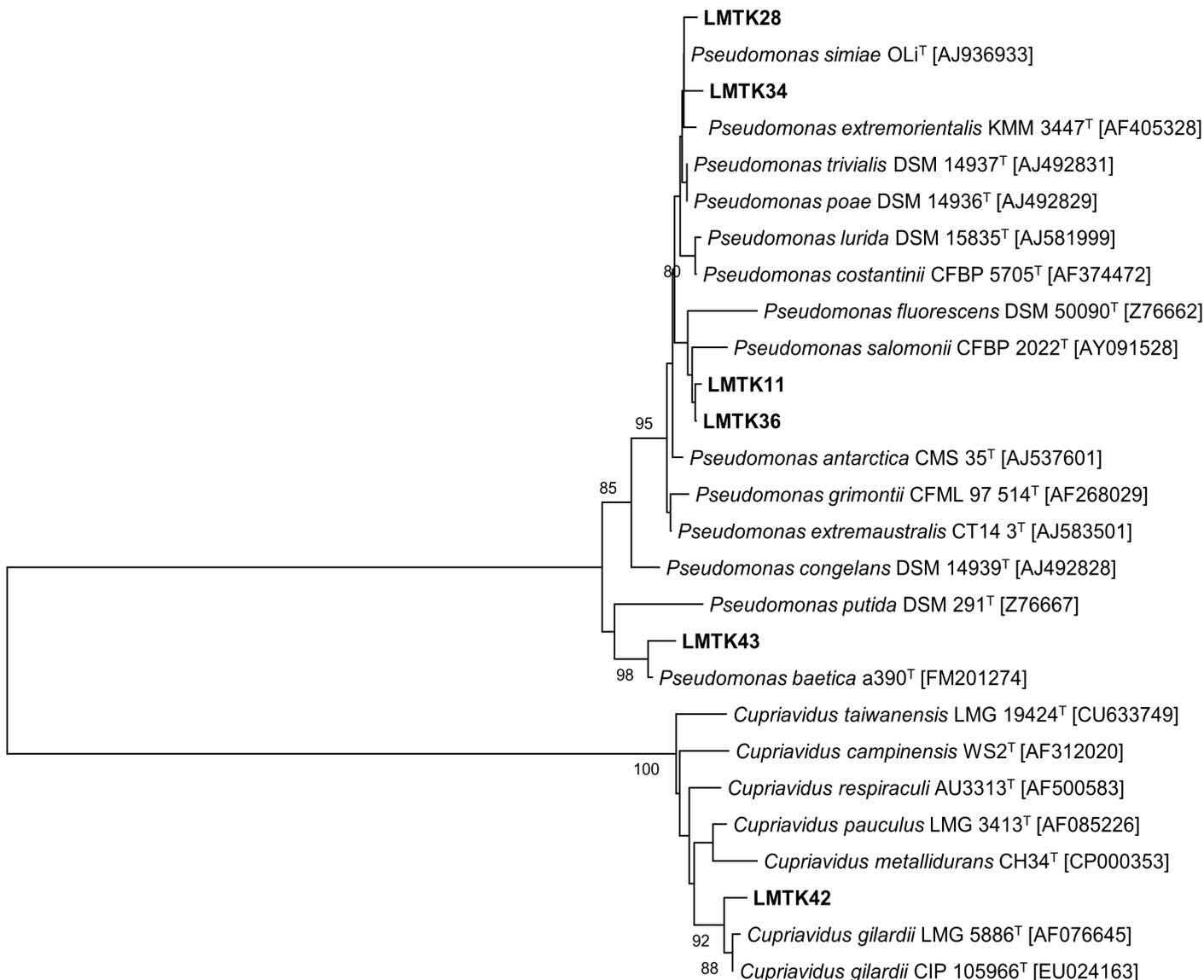
Fig. 6. Árbol filogenético de secuencias del gen 16S ARNr de *Arthrobacter* sp. El método de reconstrucción filogenética de *Neighbour – joining* y las distancias fueron calculadas de acuerdo al método de Kimura-2 parámetros. Los valores en los puntos de ramificación indican soporte de bootstrap (1000 pseudoreplicas). La cepa asilada de la rizósfera de maca LMTK6 se encuentra en negrita y con letra mayúscula.

En el caso de las cepas Gram negativas (Tabla 5) (40.91% de las cepas secuenciadas), 88.89% pertenecieron a *Pseudomonas* sp. y 11.11% a *Cupriavidus* sp. Dentro del género *Pseudomonas*, se destacaron 7 perfiles distintos. Las cepas LMTK11 y LMTK36 pertenecieron a los perfiles E y E1 respectivamente, LMTK28, LMTK30 al perfil F, LMTK32 y LMTK34 al perfil F1, LMTK35 al perfil G, la cepa LMTK43 al perfil H y la cepa LMTK42 al perfil I. Las cepas con el perfil E se ubicaron en el mismo cluster que las cepas *P. trivialis*, *P. grimontii*, y *P. poae*, con porcentajes de similitud entre 99.11% y 99.25% a dichas cepas tipo. La cepa LMTK35 con el perfil G obtuvo un porcentaje de similitud de 97.96%, con la cepa *Pseudomonas simiae* OLi^T [AJ936933]. Las cepas LMTK28 y LMTK30 (perfil F), se ubicaron en el mismo cluster que las cepas *Pseudomonas trivialis* DSM 14937^T [AJ492831] y *Pseudomonas poae* DSM 14936^T [AJ492829], con porcentajes de similitud de 99.17% a cada una de ellas; por otro lado las cepas LMTK32 y LMTK34 (perfil F1) están relacionadas con la cepa *Pseudomonas simiae* OLi^T [AJ936933] con un 99.10% de similitud. Finalmente, la cepa LMTK43 (perfil H) se encuentra altamente relacionada con la cepa tipo *Pseudomonas baetica* a390^T [FM201274], con 99.45% de similitud (Fig. 7).

La cepa LMTK42 (perfil I), se relacionó a *Cupriavidus gilardii* CIP 105966^T con un porcentaje de similitud de 99.62% y a *C. gilardii* LMG 5886^T [AF076645] con 99.51%.

Tabla 5. Características moleculares y clasificación filogenética de las cepas bacterianas Gram negativas aisladas de la rizósfera de maca.

Cepas secuenciadas para el gen 16S ARNr	Perfil BOX -PCR	Cepas tipo más cercanas basadas en el gen 16S ARNr	Nº accesión de cepas tipo relacionadas	Similitud (%)
		<i>Pseudomonas</i> spp.		
LMTK11	E	<i>Pseudomonas trivialis</i> DSM 14937 ^T	AJ492831	99.25
		<i>Pseudomonas grimontii</i> CFML 97-514 ^T	AF268029	99.25
		<i>Pseudomonas</i> spp.		
LMTK36	E ₁	<i>Pseudomonas trivialis</i> DSM 14937 ^T	AJ492831	99.18
		<i>Pseudomonas poae</i> DSM 14936 ^T	AJ492829	99.11
		<i>Pseudomonas</i> spp.		
LMTK28, LMTK30	F	<i>Pseudomonas trivialis</i> DSM 14937 ^T	AJ492831	99.17
		<i>Pseudomonas poae</i> DSM 14936 ^T	AJ492829	99.17
LMTK32, LMTK34	F ₁	<i>Pseudomonas simiae</i> OLi ^T	AJ936933	99.10
LMTK35	G	<i>Pseudomonas simiae</i> OLi ^T	AJ936933	97.96
LMTK43	H	<i>Pseudomonas baetica</i> a390 ^T	FM201274	99.45
		<i>Cupriavidus</i> spp.		
LMTK42	I	<i>Cupriavidus gilardii</i> CIP 105966 ^T	EU024163	99.62
		<i>Cupriavidus gilardii</i> LMG 5886 ^T	AF076645	99.51



0.02

Fig. 7. Árbol filogenético de secuencias del gen 16S rRNA del *Phylum* Proteobacteria (incluyen los géneros *Pseudomonas* y *Cupriavidus*). El método de reconstrucción filogenética de *Neighbour – joining* y las distancias fueron calculadas de acuerdo al método de Kimura-2 parámetros. Los valores en los puntos de ramificación indican soporte de bootstrap (1000 pseudoreplicas). Las cepas asiladas de la rizósfera de maca se encuentran en negrita y con letras mayúsculas.

Se ha encontrado en estudios realizados por Pandey *et al.* (2013) que las cepas de *Bacillus sp.* tienen capacidad de biorremediar metales pesados tales como arsénico y plomo por el mecanismo de reducción de su toxicidad al ser introducidos a la célula bacteriana. Además, poseen características promotoras de crecimiento vegetal demostradas en plántulas de arroz las cuales incrementaron su porcentaje de germinación, elongación de las raíces y aumentaron su actividad proteasa y amilasa cuando fueron inoculadas con las cepas de *Bacillus sp.* (Pandey *et al.*, 2013).

En cuanto al género de *Paenibacillus sp.*, se ha reportado que *Paenibacillus polymyxa* presenta características PGPR pero siempre y cuando se encuentre en presencia de otros microorganismos patógenos: Libera sustancias tales como HCN, sideróforos y antibióticos, los cuales son metabolitos secundarios que suprimen el crecimiento de organismos patógenos que afectan el desarrollo de la planta (Timmusk & Wagner, 1999). Además de su capacidad como PGPR, también ha sido demostrada su capacidad como bacteria biorremediadora de metales pesados y otras sustancias. En un estudio realizado por Morillo *et al.* (2008), se encontró que la cepa de *P. jamaicensis* tiene la capacidad de producir un exopolisacárido el cual mediante el mecanismo de bioabsorción introduce a la célula bacteriana varios metales pesados tales como Cd, Pb, Cu, Ni, Zn y Co, lo cual permite su bioremediación y con ello descontamina el medio ambiente.

Dentro del género *Sporosarcina sp.*, se ha encontrado que *S. ginsengisoli* mediante el proceso de MICP (*microbial induce calcite precipitation*) es capaz de biorremediar grandes cantidades de As (III) presente en el suelo (Varenyam *et al.*, 2012). También se ha encontrado que la bacteria *S. aquimarina*, aislada de la planta *Avicennia marina*, tiene capacidades promotoras del crecimiento, tales como: solubilización de fosfato, fijación del nitrógeno atmosférico, producción de ácido indolacético y producción de sideróforos. Se observó que las plantas inoculadas con esta bacteria desarrollan pelos radiculares y elongan sus raíces significativamente (Janarthinel & Eganathan, 2012).

La cepa LMTK6 obtuvo un 99.79% de similitud con la cepa *Arthrobacter nitroguajacolicus*, y se encuentra en el mismo *cluster* de la cepa *Arthrobacter aurescens* (Fig. 6). Las bacterias de este género se caracterizan por degradar compuestos xenobióticos (nitroaromáticos) tóxicos para el medio ambiente, los cuales son utilizados en la industria química para la fabricación de productos de consumo (Kotouckova *et al.*,

2004). Además de su característica como biorremediadora, Barnerjee *et al.* (2010) ha encontrado que la cepa *Arthrobacter* sp. también posee características de rizobacteria promotora del crecimiento vegetal, debido a su capacidad de solubilizar fosfato y producir AIA.

Respecto al género *Pseudomonas* sp., existe una gran variedad de estudios donde se demuestra su capacidad PGPR. Divya & Kumar (2011) afirman que el género *Pseudomonas* sp. además de tener capacidades de promoción del crecimiento en plantas, también posee la característica de biorremediar hidrocarburos.

Cupriavidus también posee características benéficas para los cultivos. Sachdev *et al.* (2009) encontraron que *C. respiraculi* aislada de la rizósfera de trigo (*Triticum aestivum*) es capaz de fijar nitrógeno atmosférico, producir AIA y solubilizar fosfato. Además se sabe que el género *Cupriavidus* sp., en este caso la bacteria *Cupriavidus metallidurans*, tiene la capacidad de resistir altas concentraciones de metales, como selenito, el cual lo reduce a Se elemental, que es fácilmente inmovilizado por la biomasa de la bacteria (Avoscan *et al.*, 2006).

4.5 Evaluación de las cepas psicrótrofas como promotoras del crecimiento vegetal *in vitro*

4.5.1 Producción de Ácido indolacético

La capacidad para producir esta fitohormona fue evaluada mediante la realización de una prueba cuantitativa (subtítulo 3.2.8, apartado a). Se evaluaron un total de 44 cepas psicrótrofas, de las cuales, 15 resultaron positivas para esta prueba a una temperatura de 22°C durante 11 días de incubación, 9 a una temperatura de 12°C por 19 días de incubación y 6 a una temperatura de incubación de 6°C por un lapso de 28 días, correspondiendo al 34.09%, 20.45% y 13.64% de las cepas respectivamente.

En cuanto a los resultados cualitativos, se sabe que el color de la reacción con el reactivo de *Salkowsky* puede variar según el compuesto detectado, caracterizándose el AIA por generar un color de rosado a fucsia en reacción con dicho reactivo (Bric *et al.*, 1991). Además, la tonalidad de la coloración de la reacción es directamente

proporcional a la cantidad de AIA producido (Bric *et al*, 1991), de modo que, se puede confirmar de acuerdo a los datos obtenidos, que efectivamente hay una correlación entre la intensidad de color obtenida y la cantidad de AIA presente (Fig. 8)

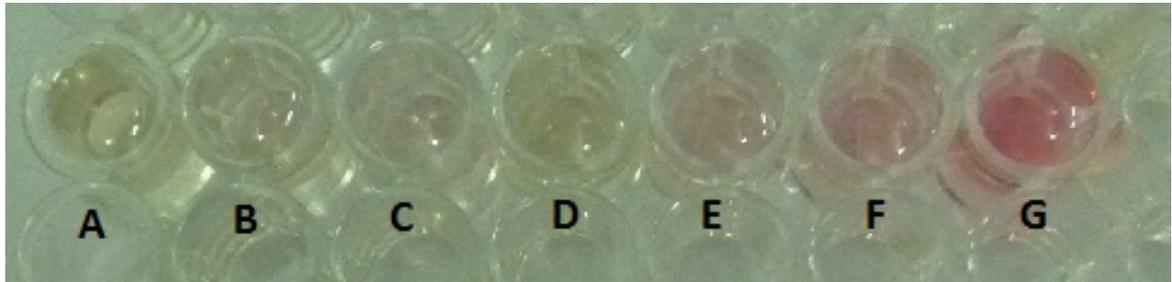


Fig. 8. Producción de AIA a 22°C. A, control negativo; B, cepa LMTK30; C, cepa LMTK7; D, cepa LMTK33; E, cepa LMTK36; F, cepa LMTK43; G, cepa LMTK37.

La aparición del color fucsia se debe a una reacción oxidativa causada por el ácido sulfúrico, y una transaminación que lleva a la sustitución del grupo amino por el Cl del FeCl_3 , presente en el reactivo de *Salkowsky* (Gordon & Weber, 1950).

Respecto a los resultados cuantitativos, se observó que la cepa con mayor producción de AIA a una temperatura de incubación de 22°C y 12°C fue LMTK37 con 60.64 $\mu\text{g/ml}$ y 31.11 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente, mientras que a una temperatura de 6°C, la cepa LMTK11 presentó la mayor producción de AIA con un valor de 3.71 $\mu\text{g/ml}$ (Tabla 6). Por lo que se pudo observar que los niveles de producción de AIA fueron mayores a temperaturas altas (22°C) que a temperaturas bajas (6°C y 12°C). Estos datos fueron concordantes con lo reportado en estudios anteriores, los cuales sugieren que la producción de AIA es mayor en rangos de temperatura mesofílica en comparación con valores encontrados en temperaturas bajas (Selvakumar *et al.*, 2008). Sin embargo, las cepas LMTK10, LMTK11, LMTK39 y LMTK42 obtuvieron mayores valores de AIA en la temperatura de incubación intermedia (12°C) en comparación con los valores encontrados para una temperatura de 22°C.

De los resultados se puede observar que la capacidad de producción de AIA es muy variable entre las cepas de bacterias psicrótrofas, esto se puede atribuir a que su expresión depende de la ruta biosintética de la fitohormona, la localización de los genes

involucrados (ya sean cromosomales o plasmídicos), secuencias regulatorias, presencia de enzimas que puedan convertir el AIA libre en su forma conjugada inactivándolo, y los distintos factores de estrés. A pesar de la variedad de factores de estrés, los cuales modulan la expresión de la producción del AIA en las bacterias, una característica común es que los genes involucrados en la biosíntesis se encuentren regulados por los factores de estrés asociados con el ambiente del suelo y la planta (Patten & Glick, 1996; Spaepen *et al.*, 2007).

Tabla 6. Producción de AIA a diferentes temperaturas de incubación

Campo muestreado	Tipo de suelo	Cepas	22°C	12°C	6°C
Galpón Condorín	Rizosférico	LMTK1	0.00	0.00	0.00
		LMTK2	0.00	0.00	0.00
		LMTK3	0.00	0.00	0.00
		LMTK21	0.00	0.00	0.00
	Sin cultivo	LMTK5	0.00	0.00	0.00
		LMTK28	3.71	0.00	0.80
		LMTK34	0.00	0.00	0.00
			20.77	11.11	1.24
Acomachay	Rizosférico	LMTK4	0.00	0.00	0.00
		LMTK12	1.91	0.00	0.00
		LMTK16	0.00	0.00	0.00
		LMTK18	0.00	0.00	0.00
		LMTK20	0.00	0.00	0.00
		LMTK25	1.81	0.86	0.00
		LMTK26	0.00	0.00	0.00
		LMTK27	0.00	0.00	0.00
		LMTK29	0.00	0.00	0.00
		LMTK31	0.00	0.00	0.00
	LMTK32	2.03	0.00	1.37	
	LMTK33	12.28	0.00	0.00	
	LMTK35	0.00	0.00	0.00	
	LMTK36	12.79	5.99	0.86	
	LMTK37	60.64	31.11	0.00	
	LMTK39	0.39	1.49	0.00	
	LMTK40	0.00	0.00	0.00	
	LMTK41	0.00	0.00	0.00	
	LMTK44	0.00	0.00	0.00	
	Sin cultivo	LMTK6	2.89	0.00	0.00
LMTK7		6.97	3.01	0.00	
LMTK8		2.35	0.00	0.00	
LMTK9		0.00	0.00	0.00	
LMTK10		1.78	4.85	0.00	
LMTK11		5.35	15.10	3.71	
LMTK17		0.00	0.00	0.00	
LMTK19		0.00	0.00	0.00	
LMTK22		0.00	0.00	0.00	
LMTK38		0.00	0.00	0.00	
LMTK42	2.98	9.78	0.92		
Condorín	Sin cultivo (descanso 10 años)	LMTK13	0.00	0.00	0.00
		LMTK14	0.00	0.00	0.00
		LMTK15	0.00	0.00	0.00
		LMTK23	0.00	0.00	0.00
		LMTK24	0.00	0.00	0.00
		LMTK30	0.00	0.00	0.00

4.5.2 Solubilización de fosfatos bicálcico y tricálcico

El fósforo es uno de los principales factores limitantes para la producción de los cultivos, esto se debe a la elevada fijación que éste sufre en el suelo. La mayor cantidad de fósforo aplicado al suelo es rápidamente fijado y con ello se encuentra muy poca cantidad disponible para las raíces de las plantas.

Los fosfatos inorgánicos en los suelos ácidos se asocian con el hierro (Fe) y aluminio (Al), compuestos donde, como el fosfato de calcio (Ca), son las formas predominantes de fosfatos inorgánicos en suelos neutros y calcáreos (Fankem *et al.*, 2006).

El ensayo fue realizado a tres diferentes temperaturas de incubación (6°C, 12°C y 22°C), con distintos tiempos de incubación, a menor temperatura mayor tiempo de incubación.

De las 44 cepas analizadas en el ensayo de solubilización de fosfato, 10 solubilizaron el fosfato bicálcico y 9 solubilizaron el fosfato tricálcico, correspondiendo al 22.73% y 20.45% respectivamente. Se sabe que la vía principal de solubilización es mediante la producción de ácidos orgánicos tales como el ácido nítrico y sulfúrico. Los ácidos orgánicos permiten que haya solubilización debido a que la presencia de estos implica un descenso en el pH, lo que es necesario para que se pueda llevar a cabo la solubilización (Bobadilla & Rincón, 2008).

Se observó que a una temperatura de evaluación de 22°C sólo se observó solubilización en el medio con fosfato tricálcico por parte de la cepa LMTK11, la cual presentó un halo de 2 mm² a los 8 días de incubación. En cuanto a la solubilización de fosfato bicálcico, 10 cepas mostraron solubilización, siendo la cepa LMTK11 la que obtuvo el mayor halo (11.5 mm²) (Fig. 9, Anexo A3); las 9 cepas restantes presentaron halos menores variando desde 1.25 a 9 mm² (Fig. 10 y 11, Anexo A3), de donde la cepa LMTK6 presentó el menor halo de solubilización. En cuanto a la eficiencia de solubilización (a los 8 días de evaluación), se observó que la cepa LMTK11 en fosfato tricálcico obtuvo una eficiencia de solubilización de 128.57; mientras que en la solubilización del fosfato bicálcico la eficiencia de solubilización la cepa LMTK6 obtuvo la menor eficiencia de solubilización (119.23), mientras que las cepas LMTK32 y LMTK28 mostraron la mayor eficiencia de solubilización con un valor de 260 para cada una (Tabla 7).

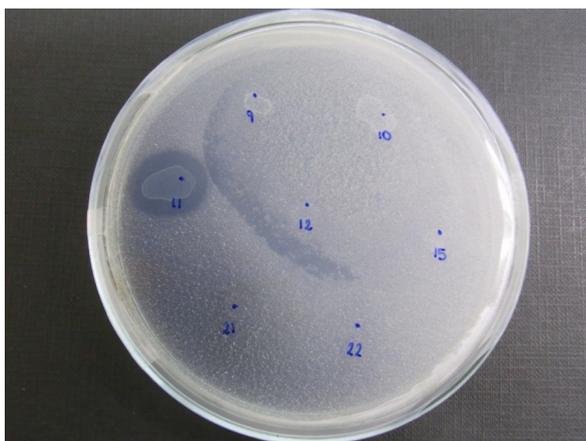


Fig. 9. Solubilización de fosfato bicálcico a 22°C (8días).

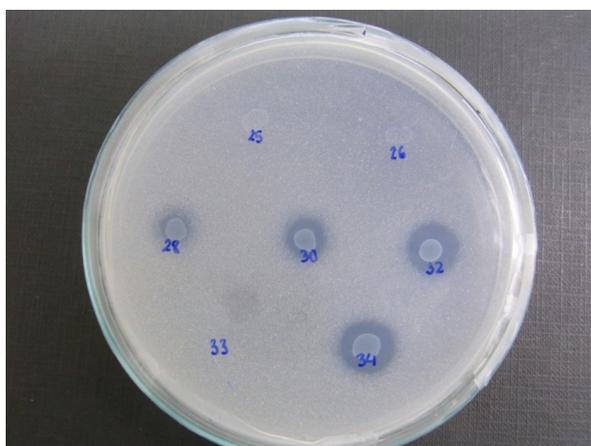


Fig. 10. Solubilización de fosfato bicálcico a 22°C (8 días).

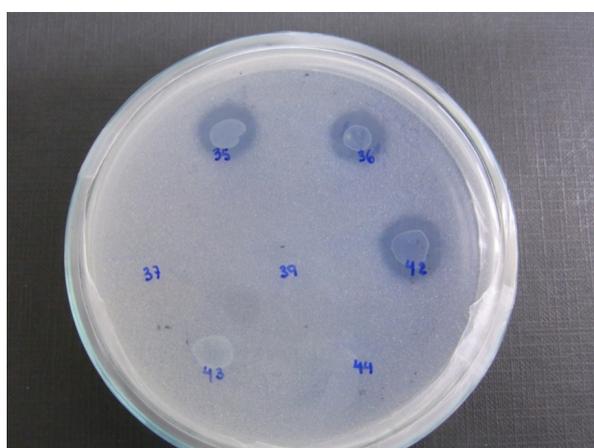


Fig. 11. Solubilización de fosfato bicálcico a 22°C (8días).

A una temperatura de 6°C, en cuanto a la solubilización de fosfato tricálcico, se observó que todos los halos de solubilización fueron menores en comparación con los halos de solubilización obtenidos en el medio con fosfato bicálcico. En cuanto a los resultados obtenidos en fosfato bicálcico, la cepa LMTK11 obtuvo el mayor halo de solubilización con 18 mm², mientras que el menor halo lo presentó la cepa LMTK43 con 3.25 mm² (Anexo A4). En cuanto a la eficiencia de solubilización, a los 36 días de evaluación, varió de 131.71 a 311.76 en fosfato bicálcico, donde la cepa LMTK43 obtuvo el menor valor y la cepa LMTK11 el mayor valor, este resultado fue concordante en cuanto al halo de solubilización (Tabla 7).

En el medio con fosfato tricálcico, el mayor halo de solubilización lo obtuvo la cepa LMTK34 con un valor de 4.5 mm², por el contrario, la cepas que obtuvieron los halos más pequeños fueron LMTK11, LMTK36 y LMTK42 con un valor de 1 mm² (Anexo A5). En cuanto a la eficiencia de solubilización, los valores variaron de 102.99 a 160, siendo la cepa LMTK35 la que obtuvo el mayor valor, sin embargo tuvo un menor halo (3.5 mm²), mientras que la cepa LMTK34 que obtuvo el mayor halo presentó un valor de eficiencia de solubilización de 156 (Tabla 7). Cabe mencionar que la cepa LMTK6 no presentó halo de solubilización para ninguno de las dos fuentes de fosfato.

De los resultados obtenidos a una temperatura de 12°C en los halos de solubilización en fosfato bicálcico, la cepa LMTK11 obtuvo el mayor halo de solubilización con un área de 26 mm² (Fig. 13 y 14, Anexo A6), a diferencia de la cepa LMTK6 la cual presentó un halo de 5.25 mm². Para el parámetro de eficiencia de solubilización, se obtuvo valores entre 171.43 a 472.73 en fosfato bicálcico, donde las cepas LMTK28 y LMTK34 obtuvieron el valor máximo, mientras que la cepa LMTK43 obtuvo el menor valor (Tabla 7). Respecto a la solubilización de fosfato tricálcico, la cepa LMTK30 presentó el mayor halo de solubilización con un área de 3.25 mm² (Fig. 12, Anexo A7), con una eficiencia de solubilización de 148.15, mientras que las cepas LMTK42 y LMTK43 presentaron halos de 1.25 mm² con eficiencias de solubilización de 112.82 y 114.29 respectivamente. La eficiencia de solubilización en fosfato tricálcico varió entre los valores de 112.82 a 152.38, la cepa que obtuvo el mayor valor de eficiencia de solubilización fue LMTK35, sin embargo no fue esta la que obtuvo el mayor halo de solubilización (Tabla 7).

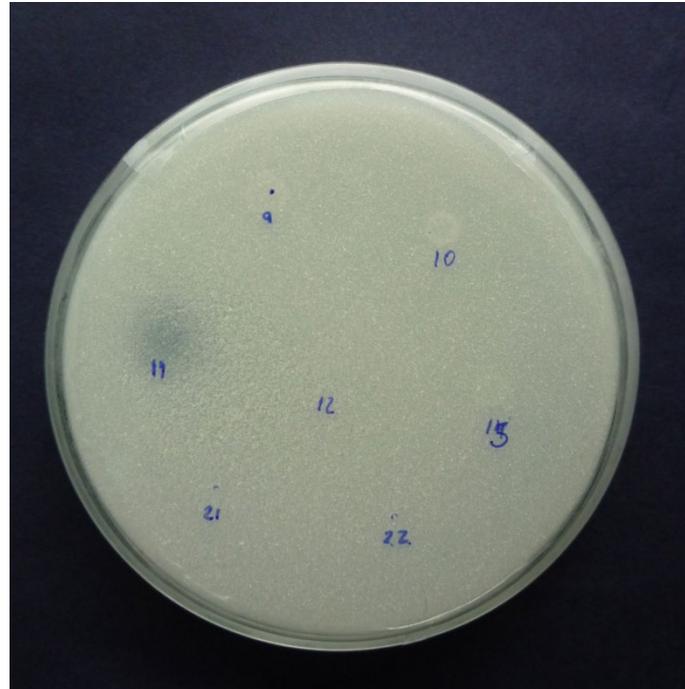
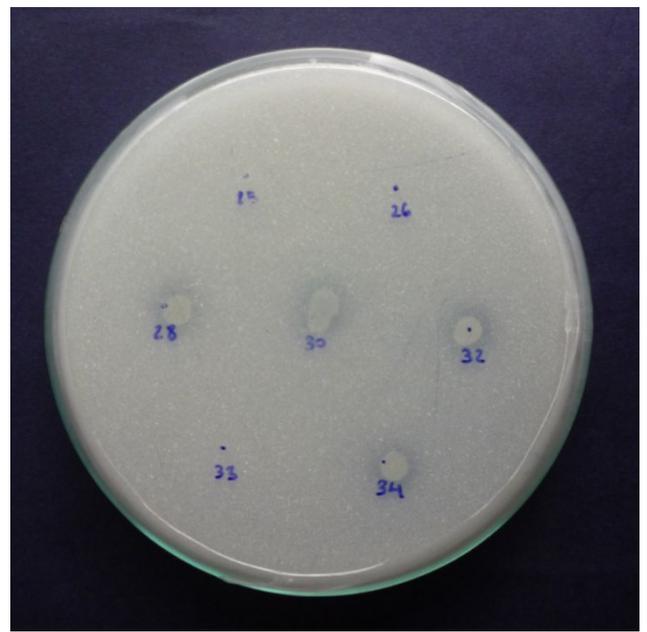
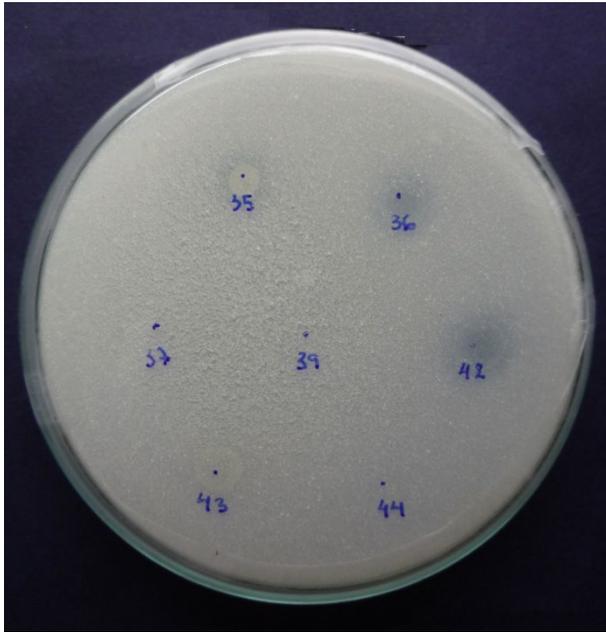
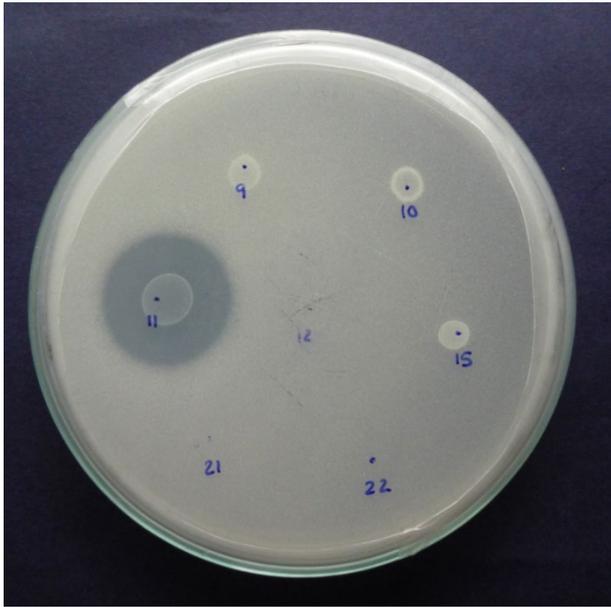
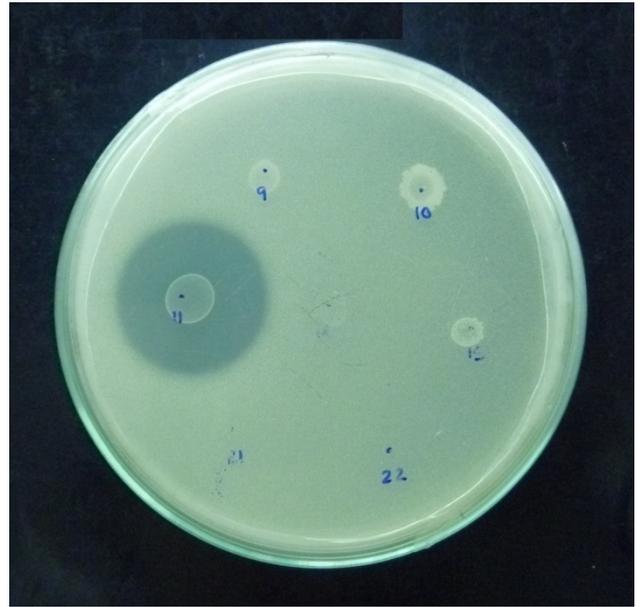


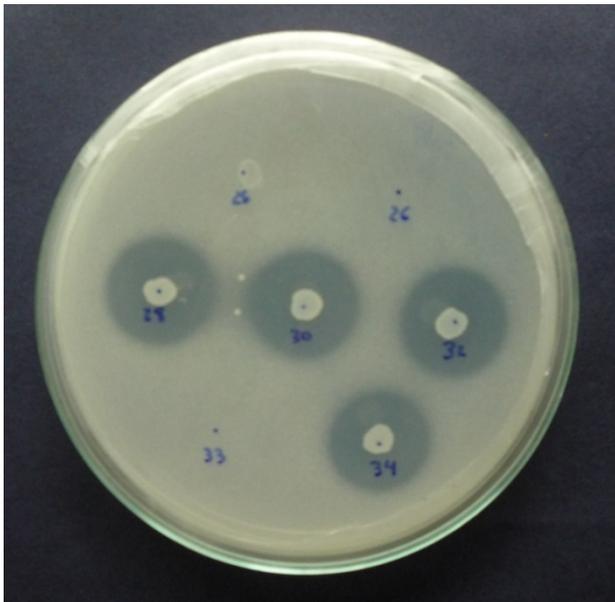
Fig. 12. Solubilización de fosfato tricálcico a 12°C (8 días).



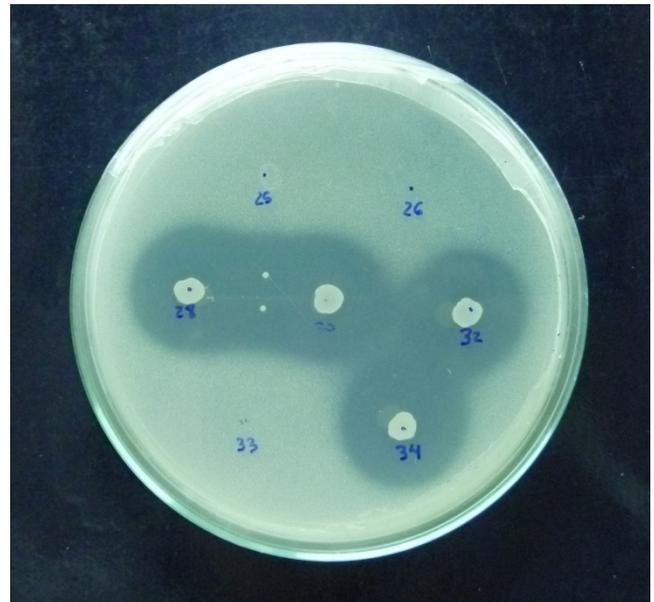
A



B

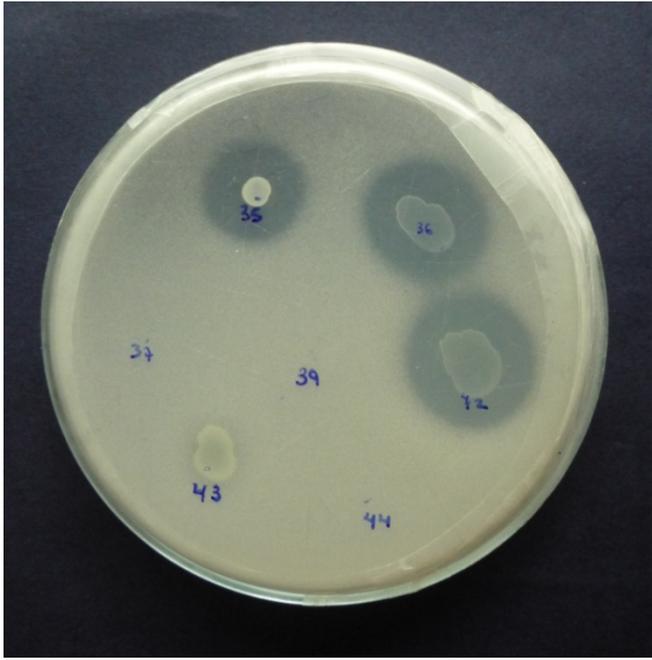


A

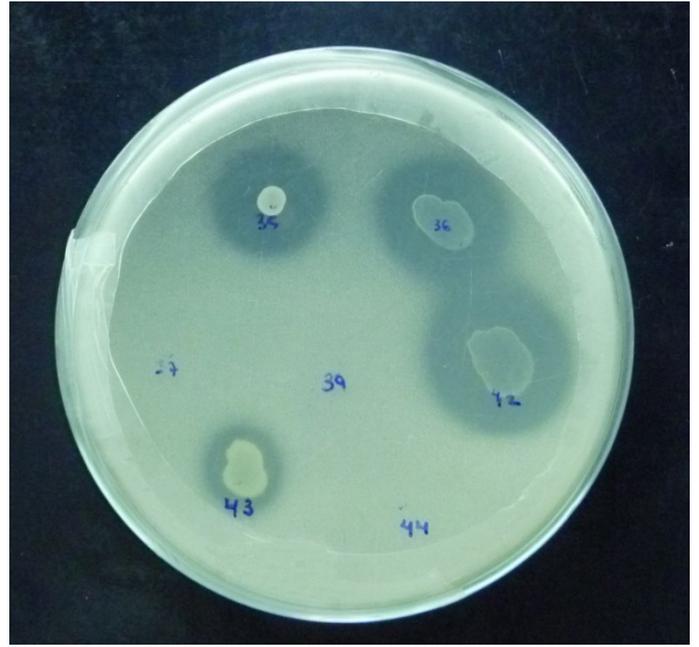


B

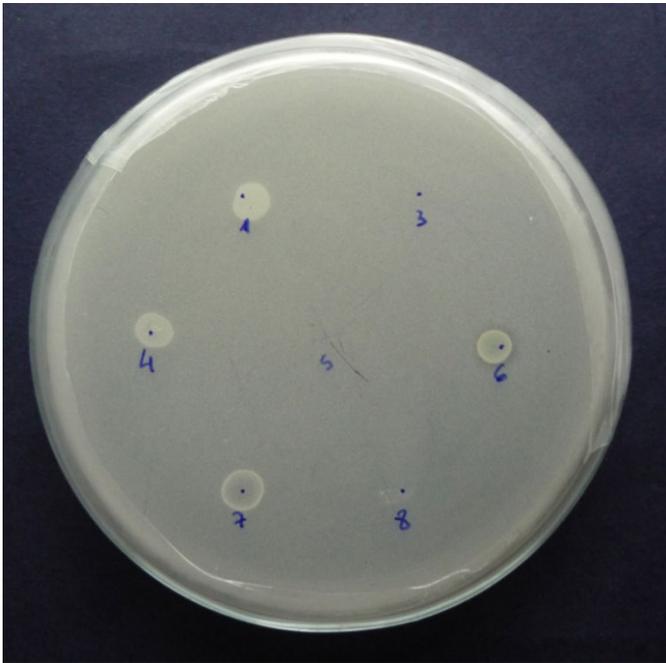
Fig. 13. Solubilización de fosfato bicálcico a 12°C. A: evaluación a los 8 días de incubación, B: evaluación a los 36 días de incubación.



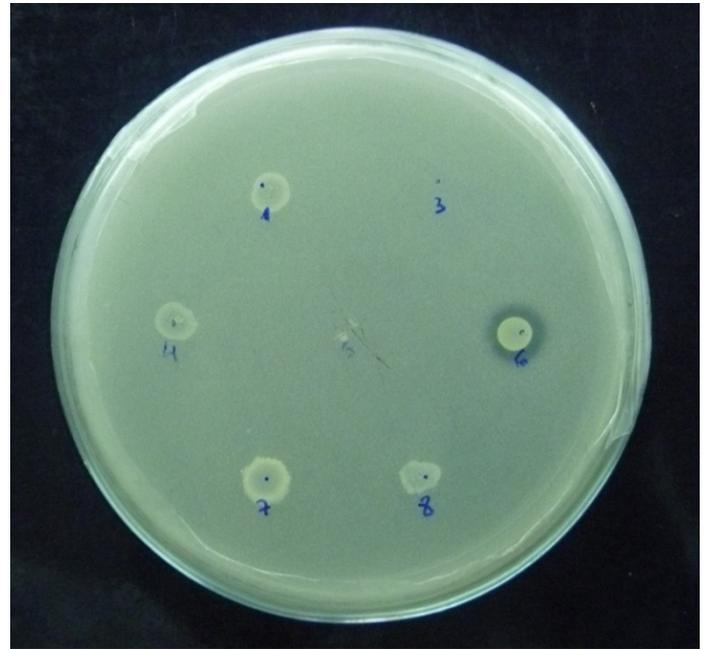
A



B



A



B

Fig. 14. Solubilización de fosfato bicálcico a 12°C. A: evaluación a los 8 días de incubación, B: evaluación a los 36 días de incubación.

En las figuras 15, 16, 17, 18 y 19, se evidencia que la solubilización es progresiva y alcanza su pico máximo entre los 6 y 8 días a 22°C de incubación, 19 y 22 días a 12°C y 6°C de incubación, dependiendo de la cepa, y después se mantiene constante.

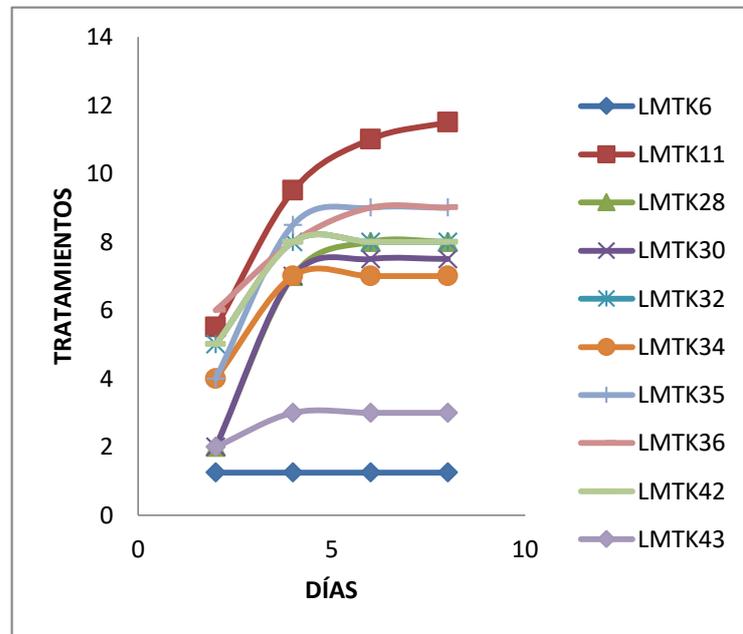


Fig. 15. Solubilización de fosfato bicálcico a 22°C.

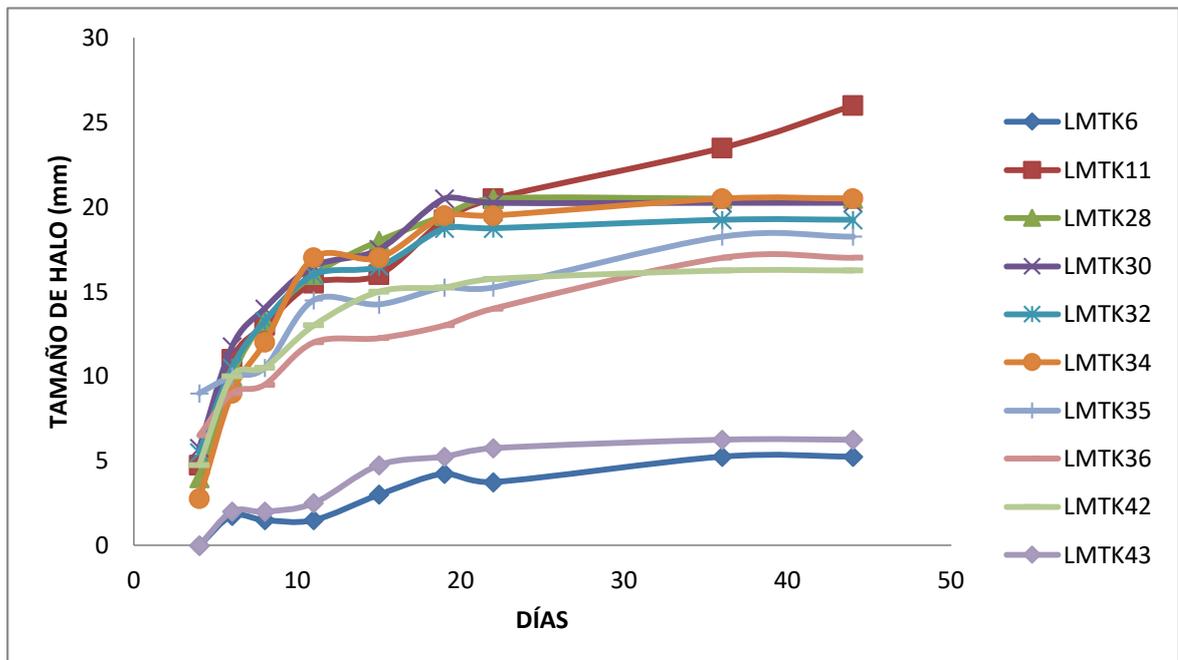


Fig. 16. Solubilización de fosfato bicálcico a 12°C.

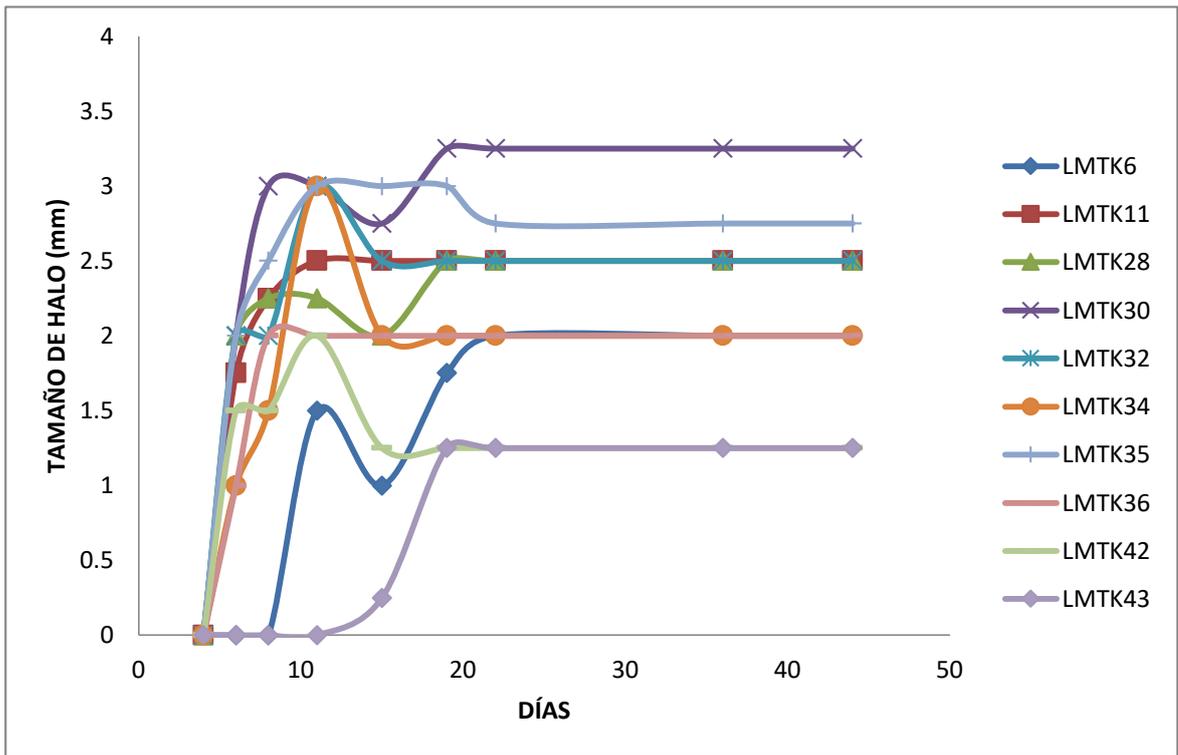


Fig. 17. Solubilización de fosfato tricálcico a 12°C.

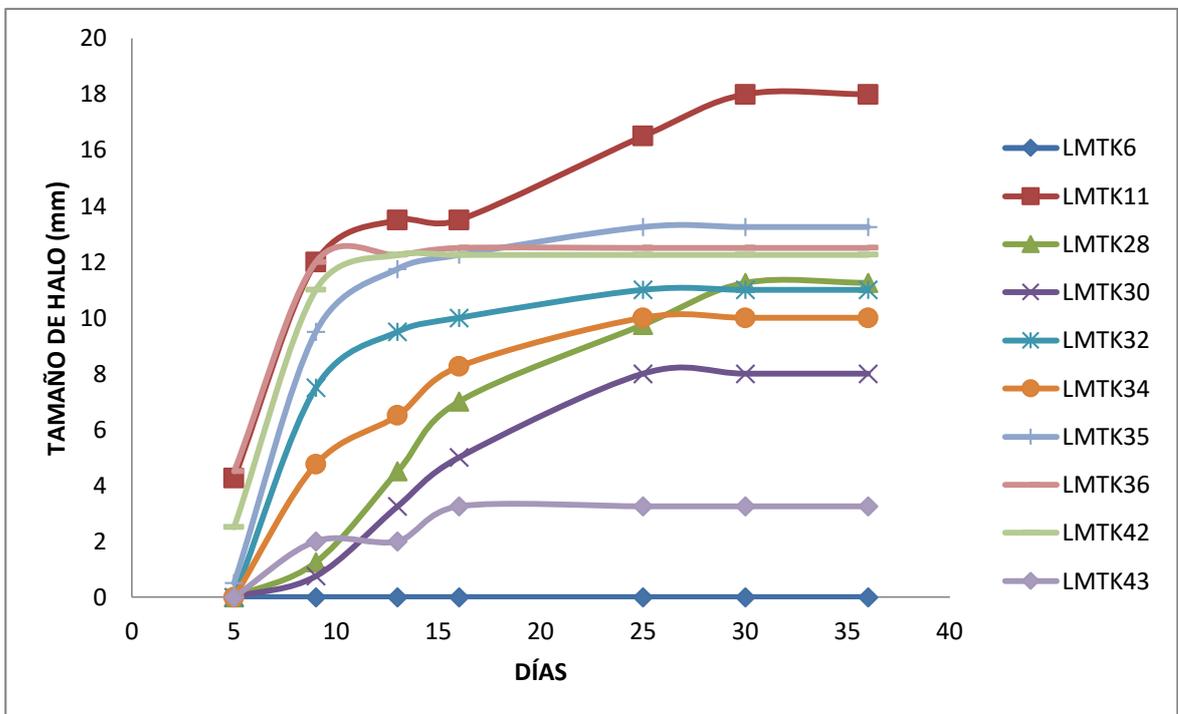


Fig. 18. Solubilización de fosfato bicálcico a 6°C.

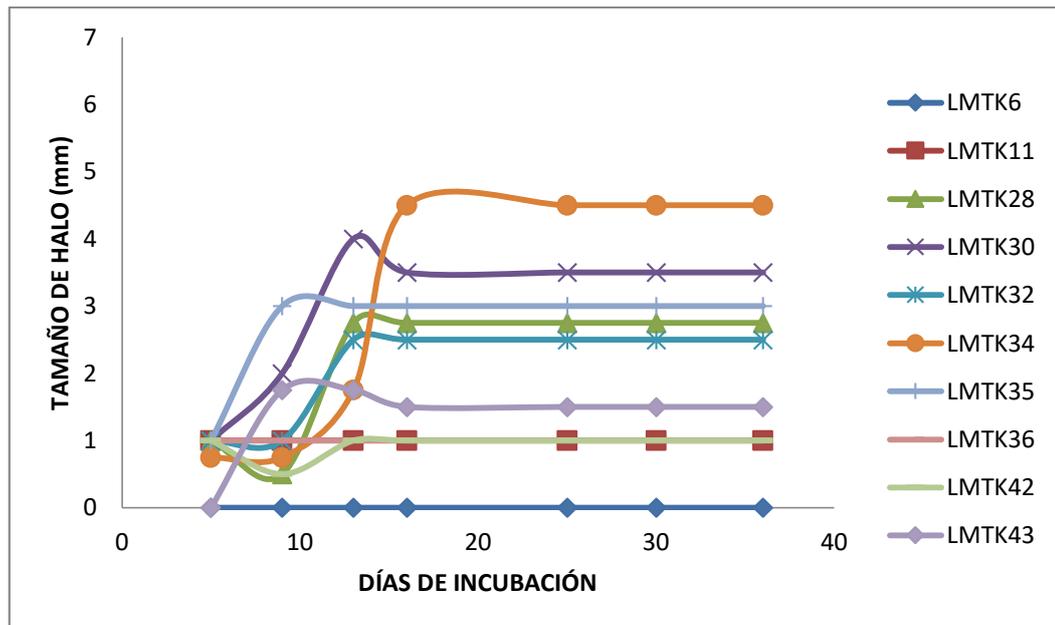


Fig. 19. Solubilización de fosfato tricálcico a 6°C.

Cabe resaltar que la solubilización de fosfato tricálcico fue menor en comparación con la solubilización del fosfato bicálcico, evidenciado por los pequeños halos de solubilización así como una baja eficiencia de solubilización (Tabla 7, Fig. 17 y 19). Estos resultados fueron contradictorios a lo reportado por Matsubara (2010), donde se pudo observar que las cepas eran más eficientes solubilizando fosfato tricálcico que fosfato bicálcico.

Al momento de evaluar la solubilización de fosfato a lo largo del tiempo, se observó que la solubilización paró, sin embargo la colonia seguía en crecimiento (Fig. 17 – 19). Este cambio puede estar relacionado con la transferencia de iones de la parte más vieja de la colonia (zona central) hacia los bordes reduciéndose los intercambios con el medio exterior, por eso se ve una disminución en el tamaño del halo (Fig. 17 y 19) (Nguyen *et al.*, 1992)

En cuanto a la eficiencia de solubilización, se observó que no siempre existe una relación directa entre halo de solubilización y eficiencia de solubilización, esto debido a lo explicado anteriormente respecto al continuo crecimiento de la colonia y la reducción del intercambio iónico responsable de la acidificación y por lo tanto de la solubilización. Además se destacó que la eficiencia de solubilización de fosfato bicálcico, a una temperatura de 12°C, fue mayor en comparación con los valores de eficiencia a las

temperaturas de 22°C y 6°C, así como también para la eficiencia de solubilización de fosfato tricálcico, excepto para las cepas LMTK43, LMTK35 y LMTK34 en donde los valores hallados a una temperatura de 6°C fueron mayores que los encontrados a 12°C (Tabla 7).

De los resultados obtenidos se pudo observar que aunque las mayoría de las cepas pertenecen al mismo género, poseen capacidades y eficiencia de solubilización distintas, esto tiene relación con lo descrito por Chen *et al.*, (2006) en donde se encontraron diferencias en la solubilización de fosfatos por parte de dos cepas aisladas que pertenecían a la misma especie, una cepa de *B. megaterium* presentaba diferencias en cuanto al mecanismo de solubilización mediante producción de ácidos orgánicos, mientras otra cepa de la misma especie no tuvo la capacidad de producir ácidos orgánicos. Esto significa que cada microorganismo aunque tenga similares características genéticas con otro, son independientes en cuanto a su actividad fosfato solubilizadora.

El sustrato empleado como fuente de fósforo también influye en la capacidad solubilizadora de las bacterias. Lemke *et al.*, (1995), demostró el efecto de diferentes fuente de fósforo, probando tres sustratos con características diferentes, concluyendo que en la utilización de las diferentes fuentes de fósforo por las bacterias había una relación entre el sustrato y la hidrofobicidad de la superficie de la membrana celular pues ciertos sustratos fueron solubilizados por algunas bacterias y no por otras (Bobadilla & Rincón, 2008).

En cuanto a la eficiencia de solubilización, se obtuvo mayores valores de eficiencia en las tres temperaturas para fosfato bicálcico y tricálcico en comparación con lo encontrado por Nguyen *et al.*, 1992 a 25°C, que los valores máximos de eficiencia para fosfato tricálcico y bicálcico fueron de 125 y 152 respectivamente. Así mismo, en la investigación realizada por Trivedi & Pandey (2007) a temperaturas de 4 y 10°C obtuvieron eficiencias que variaron de 25.8 a 375.4 y 31.7 a 456.5 respectivamente, resultados que tuvieron mayor similitud con los encontrados en el presente estudio.

Sin embargo, a pesar de los resultados positivos encontrados, es recomendable realizar evaluaciones en medio líquido, ya que muchas bacterias solubilizan mejor el fosfato cuando se encuentran en un medio líquido, además usando un medio líquido se pueden encontrar bacterias que no producen un halo de solubilización en placas.

Tabla 7. Eficiencia de solubilización de 10 cepas en dos diferentes fuentes de calcio insoluble a los 8 días de evaluación a 22°C y a los 36 días de evaluación a 12°C y 6°C.

CEPAS	22°C		12°C		6°C	
	Eficiencia en CaHPO ₄	Eficiencia en Ca ₃ (PO ₄) ₂	Eficiencia en CaHPO ₄	Eficiencia en Ca ₃ (PO ₄) ₂	Eficiencia en CaHPO ₄	Eficiencia en Ca ₃ (PO ₄) ₂
LMTK6	119.23	0.00	187.50	128.57	0.00	0.00
LMTK11	215.00	128.57	361.11	127.78	311.76	108.70
LMTK28	260.00	0.00	472.73	145.45	221.62	137.93
LMTK30	250.00	0.00	452.17	148.15	194.12	125.00
LMTK32	260.00	0.00	434.78	145.45	237.50	138.46
LMTK34	216.67	0.00	472.73	133.33	211.11	156.25
LMTK35	228.57	0.00	447.62	152.38	296.30	160.00
LMTK36	250.00	0.00	270.00	125.00	213.64	105.41
LMTK42	200.00	0.00	244.44	112.82	216.67	102.99
LMTK43	128.57	0.00	171.43	114.29	131.71	115.00

Con estos resultados, se demuestra la capacidad de las bacterias aisladas para transformar el fosfato insoluble en una forma disponible para ser utilizado por las plantas.

4.5.3 Germinación de semillas

El tratamiento de semillas con inoculantes microbianos ha sido empleado para promover y acelerar la germinación. Según Kloepper *et al.* (1991), ciertas bacterias dentro de las denominadas PGPR, rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, pueden mejorar la germinación de semillas a través de la producción y liberación de algunas sustancias reguladoras del crecimiento vegetal como auxinas, citoquininas o giberelinas.

Se realizaron ensayos usando semillas de trébol rojo (*Trifolium pratense* L.) como sujeto prueba. Se probaron 20 de las 44 cepas aisladas de la rizósfera de maca (subtítulo 3.2.4), seleccionadas por sus capacidades de producción de AIA y solubilización de fosfato. Además, también se escogió algunas cepas que no presentaron producción AIA

ni solubilizaban fosfato (Tabla 8). Como control negativo se usó caldo nutritivo sin inocular. La temperatura escogida para realizar el ensayo fue de 12°C y 22°C.

Tabla 8. Cepas psicrótrofas seleccionadas para el ensayo de germinación.

Campo muestreado	Tipo de suelo	Cepas	Capacidad solubilizadora de fosfato	Producción de AIA	Sin capacidad PGPR*
Galpón Condorín	Rizosférico	LMTK1			x
	Sin cultivo	LMTK5			x
		LMTK28	x	x	
		LMTK34	x		
		LMTK43	x	x	
Acomachay	Rizosférico	LMTK4			x
		LMTK25		x	
		LMTK32	x	x	
	Sin cultivo	LMTK33			x
		LMTK36	x	x	
		LMTK37		x	
		LMTK39		x	
	Sin cultivo	LMTK6	x	x	
		LMTK7		x	
		LMTK10		x	
LMTK11		x	x		
LMTK42		x	x		
Condorín (descanso 10 años)	Sin cultivo	LMTK14			x
		LMTK15			x
		LMTK24			x

*: Sólo se probó producción de AIA y solubilización de fosfato.

En el ensayo a 22°C a las 21 horas de evaluación, se observó que todas las cepas analizadas obtuvieron porcentajes de germinación superiores al control con diferencias significativas (Anexo 3), excepto para las cepas LMTK7, LMTK34, LMTK37, LMTK39 y LMTK43 (Fig. 20).

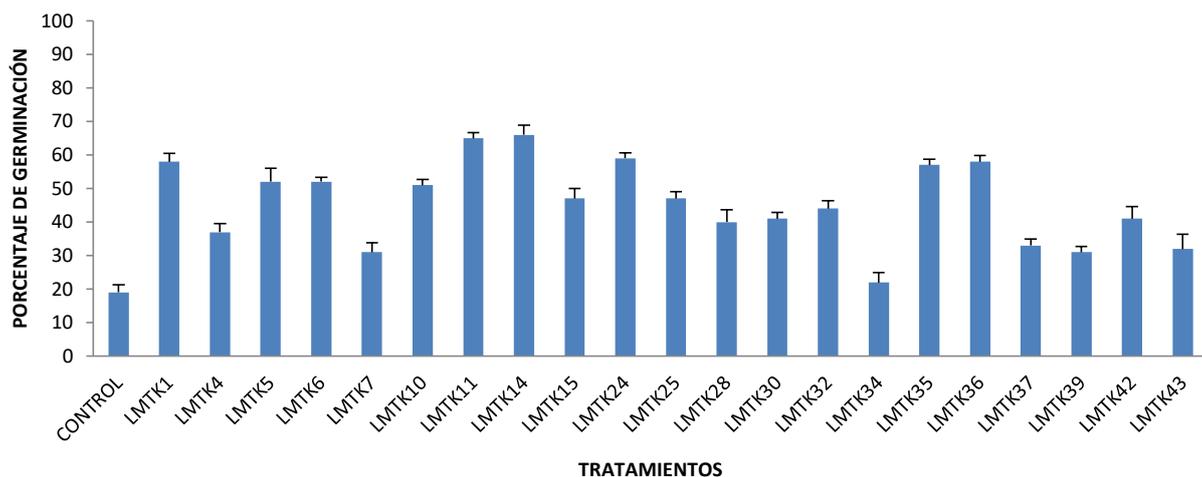


Fig. 20. Efecto de la inoculación en la germinación de semillas de trébol rojo a las 21 horas de evaluación a 22°C.

Todas las cepas que superaron significativamente al control presentaron características PGPR (producción de AIA y solubilización de fosfato), excepto en el caso de las cepas LMTK1, LMTK4, LMTK5, LMTK14, LMTK15, LMTK24 y LMTK30 que produjeron AIA ni solubilizaron fosfato. En el caso de estas cepas es posible que posean otras características PGPR como producción de citoquininas y giberelinas las cuales también son hormonas del crecimiento en plantas y por ello es que mostraron mejores resultados comparadas con el control.

A las 45 horas de evaluación (22°C) el 90.48% de las cepas evaluadas fueron superiores en el porcentaje de germinación comparada con el control (Fig. 21), pero de éstas, sólo las cepas LMTK1, LMTK6, LMTK7, LMTK14, LMTK15, LMTK24 y LMTK36 fueron significativamente superiores al control (Anexo E1).

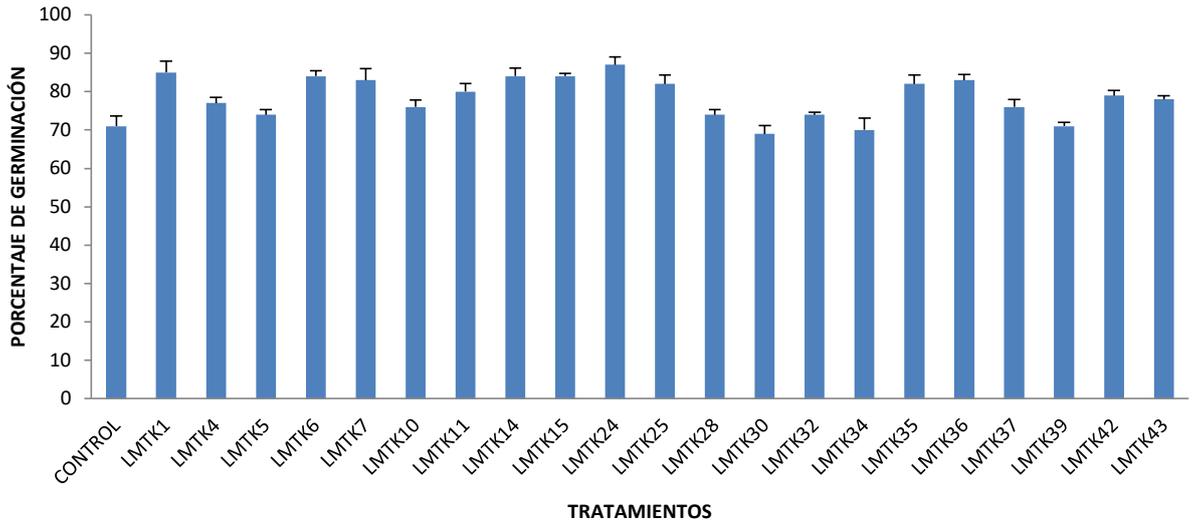


Fig. 21. Efecto de la inoculación en la germinación de semillas de trébol rojo a las 45 horas de evaluación a 22°C.

A las 72 horas de evaluación ya no se encontraron diferencias significativas entre las cepas y el control. Sin embargo las cepas LMTK6, LMTK7, LMTK14, LMTK24, LMTK25, LMTK35, LMTK36 y LMTK37 mostraron resultados superiores al control con porcentajes que variaron entre 89 y 95% de germinación, mientras que el resultado observado para el control fue de 89% (Fig. 22).

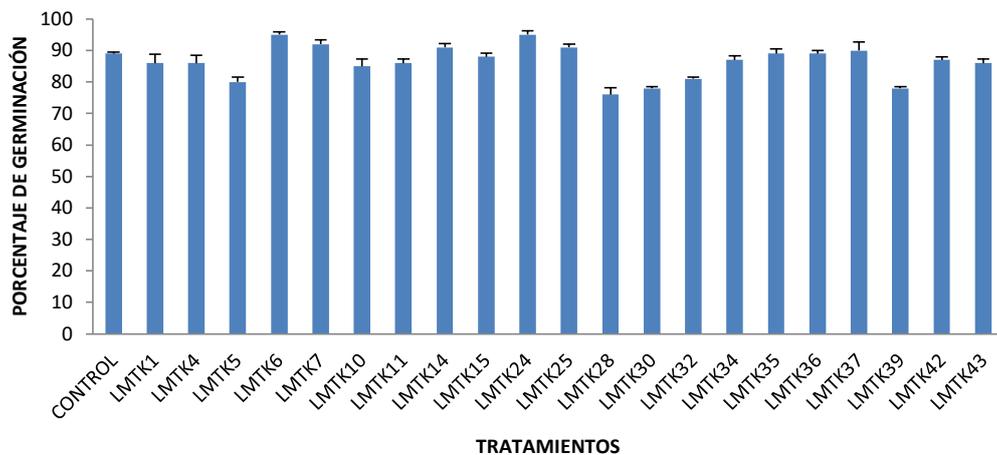


Fig. 22. Efecto de la inoculación en la germinación de semillas de trébol rojo a las 72 horas de evaluación a 22°C.

Finalmente a las 96 horas de evaluación solamente las cepas LMTK7, LMTK4, LMTK6 y LMTK24 mostraron resultados superiores al control, mostrando porcentajes de germinación de 94 a 99% mientras que el control presentó 93% de porcentaje de germinación; sin embargo aunque los resultados para estas cepas superaron al control, no se encontraron diferencias significativas para ninguno de ellos (Fig. 23).

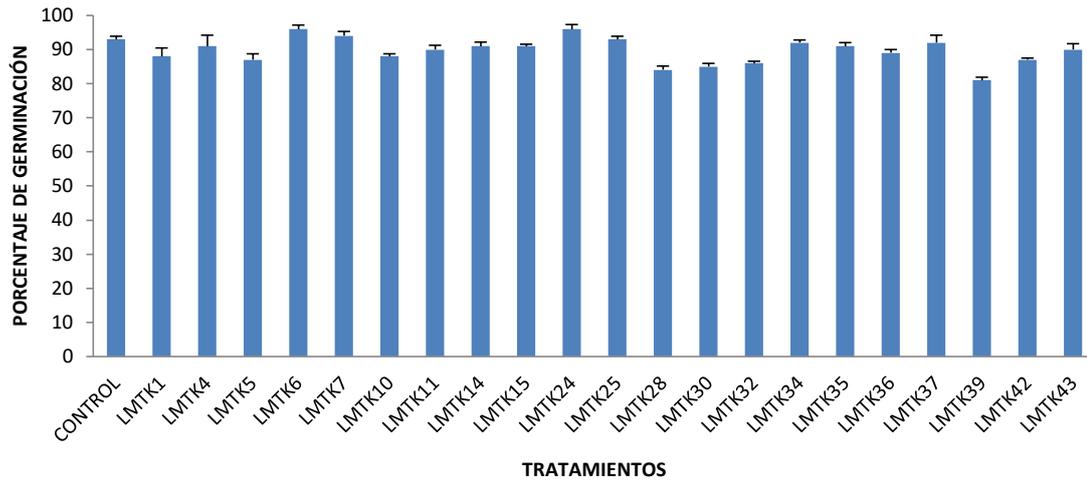


Fig. 23. Efecto de la inoculación en la germinación de semillas de trébol rojo a las 96 horas de evaluación a 22°C.

En el segundo ensayo realizado a 12°C se observó claramente que los porcentajes de germinación fueron mucho menores en todos los casos en comparación con los resultados obtenidos a 22°C, de esto podemos deducir que la temperatura es un factor muy importante para la germinación de las plantas, y cuando la temperatura disminuye también lo hace la germinación de las plantas expuestas a estas condiciones.

En este caso sólo el 25% de las cepas evaluadas mostraron mejores resultados que el control a las 24 horas de evaluación. Se observó un incremento en el porcentaje de germinación a las 24 horas de iniciado el ensayo, por parte de las cepas LMTK5, LMTK10, LMTK24, LMTK25 y LMTK28, siendo significativo para las 3 últimas (Anexo E2), las cuales obtuvieron el 39%, 42% y 41% de semillas germinadas respectivamente, mientras que el control obtuvo el 26% (Fig. 24).

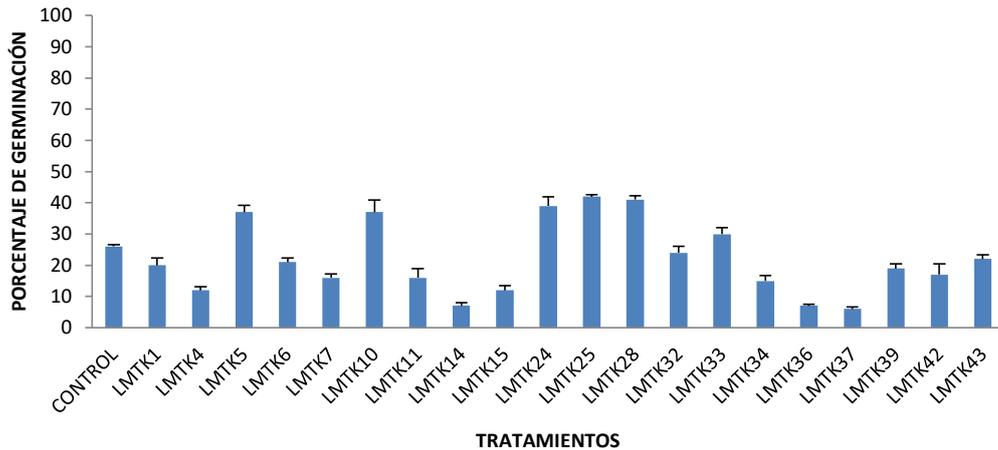


Fig. 24. Efecto de la inoculación en la germinación de semillas de trébol rojo a las 24 horas de evaluación a 12°C.

A las 30 horas de evaluación, se observó que las cepas LMTK5, LMTK10, LMTK24, LMTK25 y LMTK28 mantenían la superioridad en cuanto a número de semillas germinadas con valores de 62%, 52%, 63%, 56% y 59% en comparación con el control que obtuvo un 51% de semillas germinadas, también se puede destacar que la cepa LMTK33 aumentó su porcentaje de germinación al 52% en comparación con el 30% obtenido a las 24 horas de evaluación, superando así al control. Sin embargo, aunque se vio un aumento en el porcentaje de germinación, los valores de las cepas psicrótrofas no fueron significativamente diferentes al control (Fig. 25).

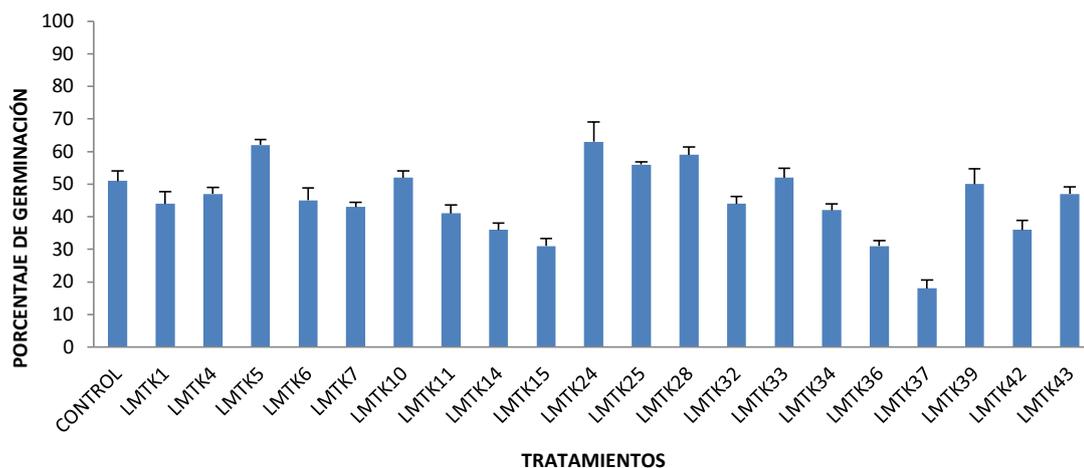


Fig. 25. Efecto de la inoculación en la germinación de semillas de trébol rojo a las 30 horas de evaluación a 12°C.

A las 36 horas de evaluación se observó una mayor cantidad de cepas que aumentaron su porcentaje de germinación y superaron al control, siendo estas LMTK4, LMTK6 y LMTK32, con valores de 65%, 70% y 65%, mientras que las cepas LMTK39 y LMTK43 aumentaron su germinación hasta igualar al control con un 65% de porcentaje de germinación, adicionalmente las cepas LMTK5, LMTK10, LMTK24, LMTK25, LMTK28 y LMTK33 continuaron aumentando a 75%, 70%, 72%, 69%, 75% y 71% respectivamente. Al igual que los resultados a las 30 horas de evaluación, no se encontraron diferencias significativas entre las cepas con mayor porcentaje de germinación y el control (Fig. 26).

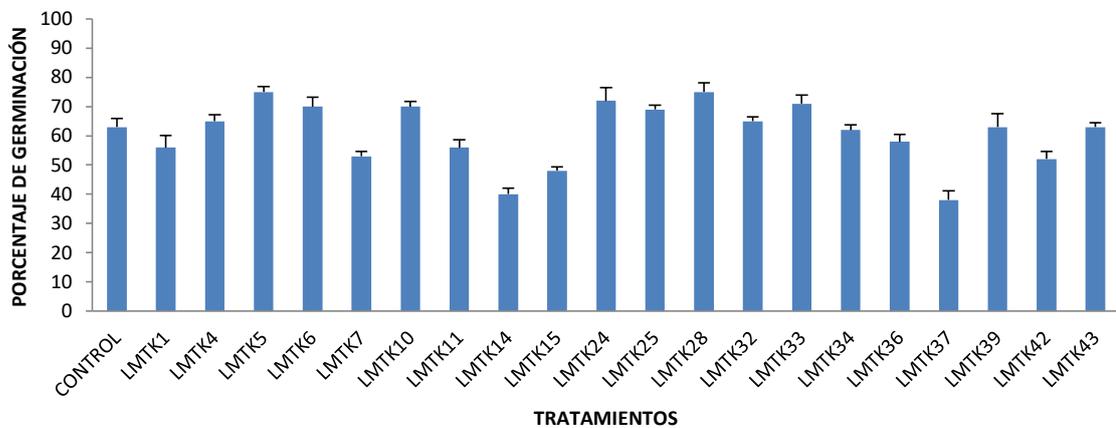


Fig. 26. Efecto de la inoculación en la germinación de semillas de trébol rojo a las 36 horas de evaluación a 12°C.

Al observar los resultados de la germinación a las 42 horas, se determinó que sólo las cepas LMTK10, LMTK24 y LMTK28 presentaron mayor porcentaje de germinación comparadas con el control, mostrando valores de 83%, 86% y 85% respectivamente, superando el 81% conseguido con el control, sin embargo no se encontraron diferencias significativas respecto al control. A pesar que las cepas que anteriormente superaban al control también muestran aumento en la germinación, éste incremento no fue suficientemente para superar al control (Fig. 27).

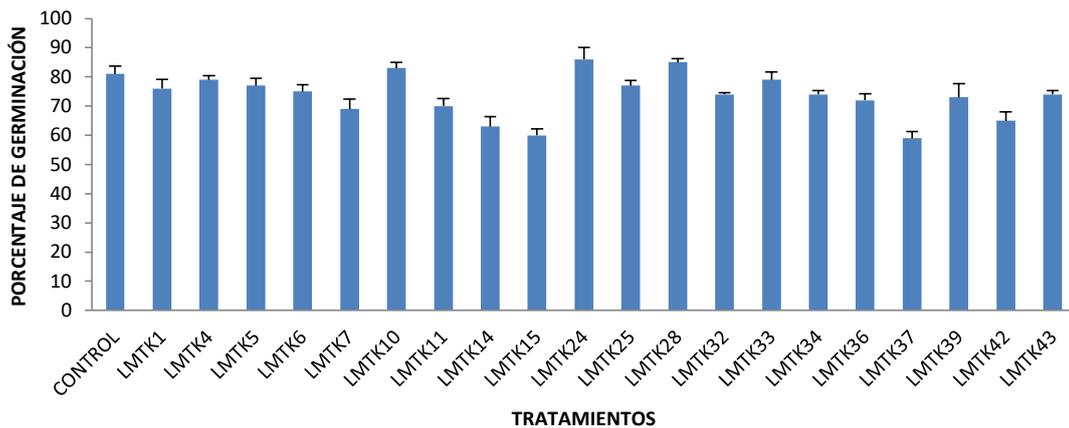


Fig. 27. Efecto de la inoculación en la germinación de semillas de trébol rojo a las 42 horas de evaluación a 12°C.

A las 48 horas de evaluación, las cepas LMTK10, LMTK24 y LMTK28, continuaron mostrando un mayor número de semillas germinadas (90% para las primeras y 92% para LMTK28) en comparación con el control (85%), mientras que las cepas LMTK32 y LMTK33 aumentaron la cantidad de semillas germinadas (86% y 89% respectivamente) en comparación con los resultados a las 42 horas de evaluación, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas. Otra observación que se puede resaltar de los resultados obtenidos es que a partir de las 48 horas de evaluación los resultados llegan a ser muy similares, casi al punto de igualarse el porcentaje de germinación en todos los tratamientos incluyendo el control (Fig. 28).

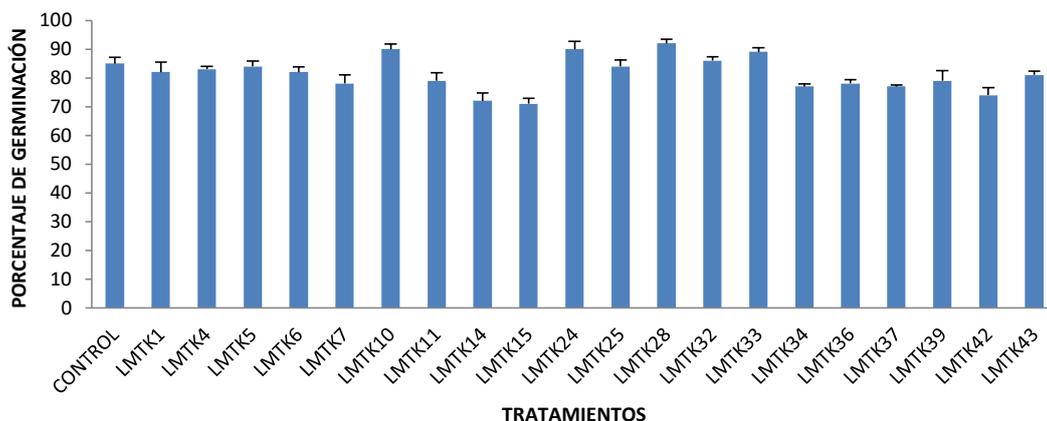


Fig. 28. Efecto de la inoculación en la germinación de semillas de trébol rojo a las 48 horas de evaluación a 12°C.

Finalmente se realizó una última evaluación a las 72 horas, en donde las cepas LMTK1, LMTK4, LMTK5, LMTK7, LMTK10, LMTK11, LMTK24, LMTK25, LMTK28, LMTK32, LMTK33 y LMTK37 mostraron valores entre 90% al 97%, los cuales fueron superiores al control (89%), no se encontraron diferencias significativas con el control (Fig. 29).

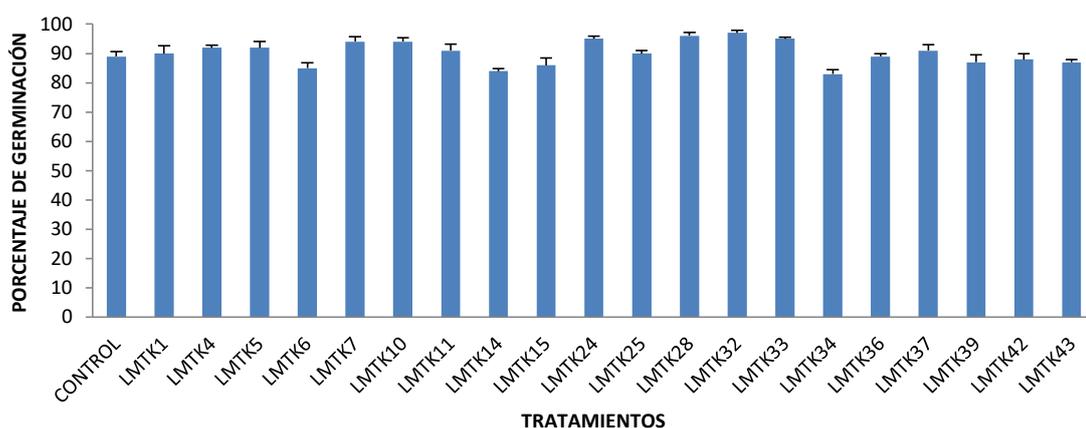


Fig. 29. Efecto de la inoculación en la germinación de semillas de trébol rojo a las 72 horas de evaluación a 12°C.

Durante toda la duración del ensayo de germinación se pudo observar que las cepas que presentaron mayores porcentajes de germinación en cada día de evaluación fueron LMTK10, LMTK24 y LMTK28. Se puede destacar a la cepa LMTK24, la cual fue la que mostró mayores porcentajes de germinación a pesar de no contar con capacidad de producción de AIA ni solubilización de fosfato (Fig. 30).

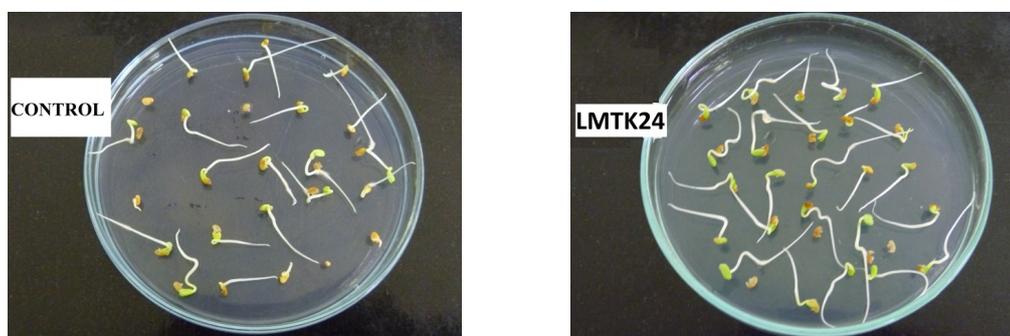


Fig. 30. Efecto de la inoculación en la germinación de semillas de trébol rojo a las 48 horas de evaluación.

4.6 Promoción del crecimiento en plántulas de trébol rojo

El uso de fertilizantes químicos en las cosechas es una práctica muy común en las zonas donde se desarrolla la agricultura, y esto se debe a que se tiene un fácil acceso a ellas, se encuentran subsidiadas, son fáciles de aplicar, y da buenos resultados (a corto plazo). Sin embargo, el uso de estos fertilizantes químicos a largo plazo trae consecuencias negativas, ya que contaminan el suelo, agua, plantas y animales. La alternativa a estos fertilizantes químicos es la introducción de bioinoculantes a partir de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR), las cuales cuentan con la capacidad de promoción del crecimiento en los cultivos y también ejercer un biocontrol en los patógenos que pudieran estar presentes en el ambiente, sin producir un efecto nocivo en plantas y animales y sin contaminar el suelo y agua (Pandey *et al.*, 2004).

En este ensayo se utilizaron potes o macetas de 13 x 6 cm con arena lavada, esterilizada y finalmente humedecida con agua destilada estéril. Este ensayo se realizó dos veces.

La primera vez se seleccionaron a las cepas LMTK14, LMTK24, LMTK25, LMTK28 y LMTK32. La cepa LMTK24 fue seleccionada por su comportamiento favorable en germinación a 12 y 20°C (apartado 4.5.3). Las cuatro últimas fueron seleccionadas por su capacidad de mejorar la germinación a 12 y 20°C (determinada en el apartado 4.5.3), además de solubilizar fosfato y producir AIA para las cepas LMTK32 y LMTK28 (apartado 4.5.1 y 4.5.2), mientras que para la cepa LMTK25 sólo tenemos la capacidad de producción de AIA. En el caso de la cepa LMTK14 se la seleccionó para determinar si a pesar de no poseer aparentemente ninguna característica promotora del crecimiento, tal vez tendría algún efecto positivo en plántulas.

En los resultados obtenidos de esta primera parte, cosecha realizada a los 18 días de incubación, las cepas LMTK14 y LMTK24 mostraron un peso seco aéreo superior comparado con los controles N⁺ y N⁻, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas para este parámetro (Anexo E3). Respecto al parámetro, tamaño de plántulas, de los datos obtenidos a los 18 días de evaluación, las cepas LMTK14, LMTK24 y LMTK32 mostraron un tamaño promedio de 20.31, 18.21 y 18.27 mm respectivamente, superando a los controles N⁻ y N⁺ que obtuvieron 17.18 mm y 18.03 mm respectivamente, pero a pesar de ello, tampoco se encontraron diferencias significativas para este parámetro (Anexo E3).

Con los datos obtenidos en el primer ensayo, se realizó un segundo ensayo seleccionando a las cepas que dieron mejores resultados (LMTK14 y LMTK32) además de respectivos controles N+ y N-.

En el segundo ensayo, en el parámetro de emergencia de plántulas, se observó que la cepa LMTK14 mostraba ligeramente mayor cantidad de semillas en emergencia, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre ésta y los controles (Anexo E4).

Para la evaluación de este ensayo se realizaron dos cosechas de las plántulas de trébol, una a los 15 días de evaluación y otra a los 37 días de evaluación.

Se obtuvo que la cepa LMTK14 presentó diferencias significativas a los 15 días de evaluación en el parámetro de peso seco aéreo con respecto a la cepa LMTK32 (Tabla 9), a pesar que esta última posee la capacidad de producción de ácido indolacético a diferencia de la anterior, lo que significaría un aumento del crecimiento vegetal y por consiguiente del peso; es posible que la cepa LMTK14 posea otras características PGPR como producción de citoquininas o giberelinas o ambas por haber mostrado mejores resultados que los controles (Dorffling, 1982; Tsavkelova, 2006). Por otra parte, en el parámetro de altura de planta, se observó que las plántulas inoculadas con las cepas LMTK14 y LMTK32 poseían mayor altura de planta (6.99 y 6.45 cm respectivamente) en comparación con los controles N+ y N-, a pesar de ello, no se encontraron diferencias significativas entre ninguno de los tratamientos comparados con los controles (Anexo E4).

Luego se realizó una segunda cosecha a los 37 días de evaluación, de donde, se encontró que la cepa LMTK14 posee una tendencia positiva en el parámetro de peso seco radicular con respecto al control N+, incrementándolo en un 7.23%, siendo también superior a la cepa bacteriana LMTK32. Asimismo, se obtuvo una tendencia positiva en el parámetro peso seco aéreo, de donde la cepa LMTK14 supera a los controles N+ y N- (Tabla 10, Fig. 31). En cuanto al parámetro altura de la planta, al igual que en la evaluación a los 15 días de cosecha, se observó un mayor tamaño en las plántulas inoculadas con las cepas LMTK14 y LMTK32 (Fig. 31 y Fig. 32), sin embargo, esto no significó el hallazgo de diferencias significativas entre estas con los respectivos controles (Anexo E4).

Por lo tanto, la cepa LMTK14 a pesar de no poseer las capacidades PGPR de producción de ácido indolacético ni solubilización de fosfato, tiene grandes posibilidades de ser utilizada como bioinoculante por los resultados positivos obtenidos en el peso seco de las plántulas posiblemente causadas por la producción de otras hormonas que no fueron evaluadas en este estudio.

Tabla 9. Altura, peso fresco y peso seco de plántulas de trébol a los 15 días de evaluación.

Tratamiento	Altura (mm)	Peso Fresco (g)	Peso Seco (g)
Control N -	6.426	1.065	0.070
Control N +	6.350	1.273	0.080
LMTK14	6.992	1.240	0.073
LMTK32	6.446	1.099	0.064

Tabla 10. Altura, peso fresco y peso seco plántulas de trébol a los 37 días de evaluación.

Tratamiento	Altura (mm)	Peso Fresco (g)	Peso Seco (g)
Control N -	12.678	1.608	0.181
Control N +	12.166	1.859	0.175
LMTK14	13.296	1.690	0.188
LMTK32	12.852	1.519	0.152



Fig. 31. Promoción del crecimiento a nivel plantas *in vitro* en macetas.



Fig. 32. Comparación de tamaño entre el control positivo y los tratamientos. N-: control sin KNO_3 , 14: plantas inoculadas con la cepa LMTK14. 32: plantas inoculadas con la cepa LMTK32.

4.7 Ensayos con metales pesados

4.7.1 Ensayo de cepas psicrótrofas con resistencia a metales pesados

La liberación de metales pesados por la acción de la industria, uso de agroquímicos y demás sustancias liberadas por el hombre, significa una amenaza al medioambiente y al suelo. El estándar de calidad ambiental para suelo agrícola de cadmio total es de 1.4 mg/kg MS (MS: materia seca) y de plomo total de 70 mg/kg MS (MINAM, 2012). La acumulación de metales pesados en el suelo conlleva a cambios en la actividad microbiana y en su fertilidad. Consecuentemente, el aumento en la concentración de metales en el suelo y su translocación a los órganos de las plantas puede tener efectos indeseables en el crecimiento de dichas plantas (Ahmed *et al.*, 2008). Sin embargo, se sabe de la existencia de un diverso grupo de bacterias de vida libre que habitan en el suelo, las cuales pueden mejorar el crecimiento de la planta y mitigar los efectos tóxicos de los metales pesados (Belimov *et al.*, 2004).

Se evaluó a las 20 cepas seleccionadas para el ensayo de germinación (subtítulo 4.4.3) en su capacidad de resistencia a metales pesados. Se observó que el 55% de las cepas

mostraron resistencia a los metales pesados, esto quedó evidenciado por el crecimiento de las colonias en el medio suplementado con 0.5 mM de Pb, Cd, Co y 0.01mM de Hg.

Se observó una mayor cantidad de cepas que crecieron en las placas a pH 5 suplementadas con Pb, en comparación con las placas a pH 4. Esto puede ser a que el Cd es más tóxico que el plomo (ATSDR, 2011). Las cepas LMTK5, LMTK11, LMTK28, LMTK32, LMTK33, LMTK34, LMTK36, LMTK42 y LMTK43 mostraron crecimiento en las placas a pH 4 y 5 suplementadas con cadmio. Mientras que en las placas suplementadas con Pb además de las anteriores, también se observó crecimiento de las cepas LMTK37 y LMTK39 en las placas a pH 5, sin embargo a pH 4 sólo se observó crecimiento de las cepas LMTK5 y LMTK43.

En cuanto a los otros metales sólo se observó crecimiento de la cepa LMTK11 en las placas con mercurio (Hg) a pH 4 y 5, mientras que para la placa suplementada con cobalto (Co) sólo se observó crecimiento de las cepas LMTK11, LMTK32 y LMTK36 a pH 5 pero no se registró crecimiento a pH 4.

Respecto a las placas que fueron suplementadas con la mezcla de todos los metales (Pb, Cd, Co y Hg), sólo creció la cepa LMTK11 aunque en muy poca cantidad.

4.7.2 Ensayo de mínima concentración inhibitoria de metales pesados (MIC)

Para el ensayo de determinación de la mínima concentración inhibitoria, sólo se usaron los metales Pb y Cd ya que son los que se encuentran con mayor frecuencia en el medio ambiente, así como también fueron encontrados en el análisis de suelo de los campos muestreados (Anexo F1).

De los resultados obtenidos en general, se observó que ninguna de las cepas mostró crecimiento a concentraciones de 2.5 mM y 5 mM en ambos metales (Pb y Cd). Las cepas que mostraron tolerancia a una mayor concentración de sales de Pb fueron LMTK11, LMTK28, LMTK32, LMTK34, LMTK36, LMTK39, LMTK42 y LMTK43, con una mínima concentración inhibitoria de 1 mM, por otro lado, las cepas LMTK11, LMTK28, LMTK32, LMTK34, LMTK36 y LMTK42 mostraron una mínima concentración inhibitoria de 2.5 mM para las sales de Cd mostrando una mayor tolerancia a dicho metal (Tabla 11 y 12, Anexo A8).

Tabla 11. Susceptibilidad de las 11 cepas aisladas a Cd y Pb.

Metales	% Acumulativo de las cepas susceptibles a las siguientes concentraciones (mmol/l)							
	0.005	0.01	0.05	0.1	0.5	1	2.5	5
Pb	0.00	0.00	0.00	0.00	27.27	100	100	100
Cd	0.00	0.00	27.27	36.36	36.36	45.45	100	100

Tabla 12. Concentración Mínima Inhibitoria de Cd y Pb para 11 cepas psicrótrofas

Cepas	MIC (mM)	
	Cd	Pb
LMTK5	0.05	0.5
LMTK37	0.1	0.5
LMTK39	0.05	1.0
LMTK33	0.05	0.5
LMTK11	2.5	1.0
LMTK28	2.5	1.0
LMTK32	2.5	1.0
LMTK34	2.5	1.0
LMTK36	2.5	1.0
LMTK42	2.5	1.0
LMTK43	1.0	1.0

En cuanto al tamaño final de las colonias, el diámetro fue variable dependiendo de la concentración de metal y de la cepa usada. Se observó una relación inversa entre la concentración del metal y el diámetro de la colonia; a medida que aumentaba la concentración del metal (Pb o Cd) el diámetro de la colonia iba disminuyendo. El tiempo de aparición de la colonia también resulta variable y es directamente proporcional a la concentración del metal presente en el medio de cultivo (Anexo A8). Esta disminución en

el crecimiento, o la falta de este, se puede deber a los efectos tóxicos que ambos metales ocasionan en las células bacterianas afectando además el crecimiento celular, metabolismo y la diferenciación, estos efectos incluyen el bloqueo de grupos funcionales de moléculas importantes como enzimas, polinucleótidos, el sistema de transporte de nutrientes y iones esenciales, sustitución o desplazamiento de iones esenciales en sitios celulares, desnaturalización e inactivación de enzimas, alteración de la integridad de la membrana bacteriana y de las organelas (Ochiai, 1987; Gadd, 1992).

Mediante un ANOVA simple se encontró diferencias significativas en los diámetros de las colonias con los tratamientos con cadmio y plomo desde el primer día de evaluación (4 días de incubación a 6°C); sin embargo, en las evaluaciones realizadas el último día (28° día) se observó una mayor heterogeneidad (Anexo E5).

Otro aspecto que se pudo observar es el crecimiento superior o inferior de algunas colonias, en comparación con el control en determinadas concentraciones del metal, como es el caso de la cepa LMTK43, cuyo crecimiento en diámetro en presencia de Pb es superior al control en las concentraciones 0.005 mM, 0.01 mM y 0.05 mM, observándose en ésta última el máximo crecimiento con un valor de diámetro promedio de 76.67 ± 23.09 mm para el último día de evaluación (día 28), en comparación con el control que posee una media de 29.33 ± 5.51 mm, presentando diferencias altamente significativas. Por otro lado, para el crecimiento en presencia de Cd, sólo se observó un ligero crecimiento superior con respecto al control a una concentración mínima de ensayo (0.005mM), obteniéndose una media de 32.7 ± 4.2 mm en el último día de evaluación (Fig. 33). La cepa LMTK43 presenta una mayor tolerancia hacia ambos metales, donde se observa un diámetro mayor respecto al control de hasta 38,7% más (Anexo A8). Este comportamiento podría deberse a una posible capacidad biorremediadora que le permite utilizar el metal como un potenciador en su crecimiento. Esto se pudo observar en el estudio realizado por Azario *et al.* (2010) donde el crecimiento de *Escherichia coli* se incrementó significativamente en presencia de Cromo (Cr), Cd y Pb o en la combinación de estos.

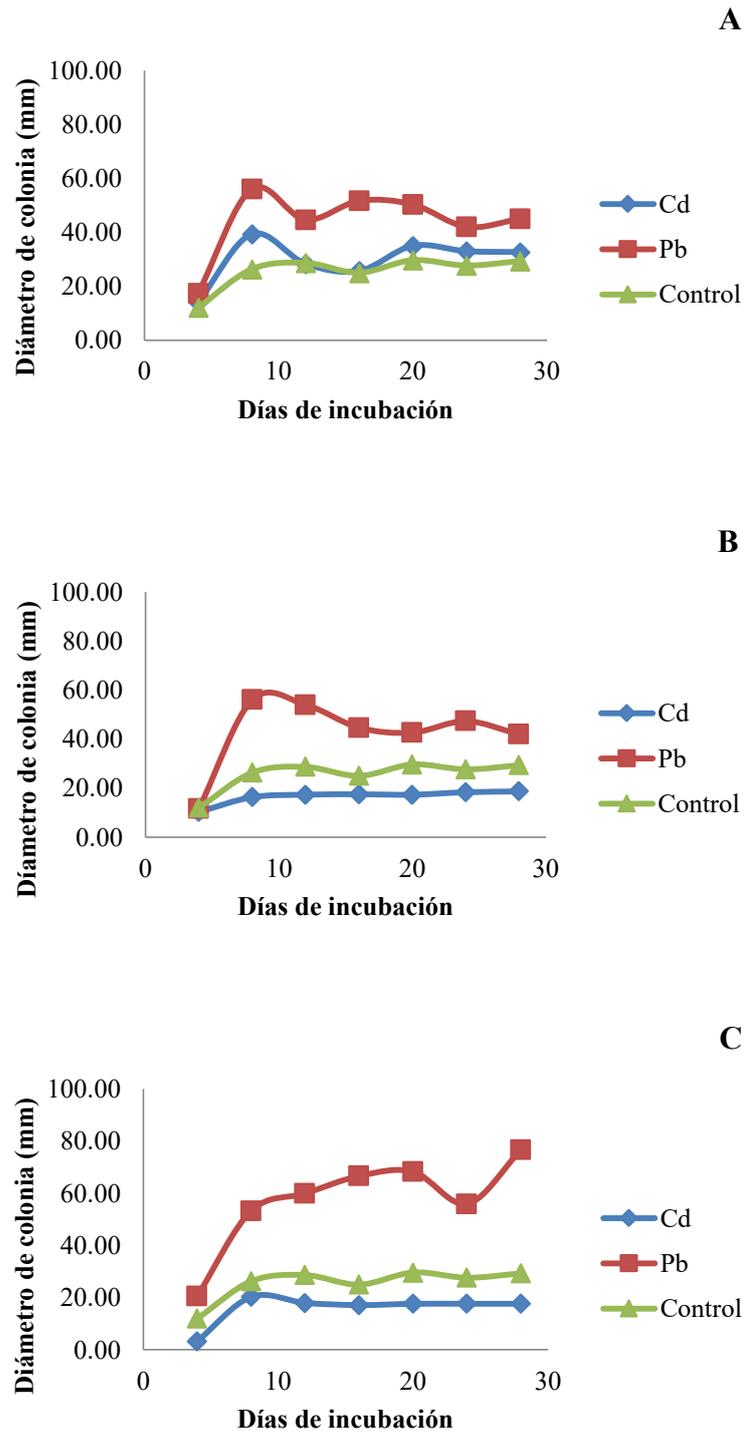


Figura 33. Efecto de Cd y Pb en el crecimiento de la cepa LMTK43 a las concentraciones 0.005 mM (A), 0.01 mM (B), y 0.05 mM (C).

A pesar que las todas las cepas crecieron a diferentes concentraciones de metales, para todas se observó una resistencia al crecimiento en presencia de Cd y Pb cuando las concentraciones fueron superiores a 0.1 mM en ambos metales. Esto se puede observar más claramente en el caso de la cepa LMTK33, donde en las tres concentraciones mínimas de ambos metales (0.005 mM, 0.01 mM y 0.05 mM) se observó un diámetro de colonia menor en comparación con el diámetro del control ($48,67 \pm 5,13$ mm) (Anexo E5) (Fig. 34).

Además, la cepa LMTK33 (Fig.34) así como las cepas LMTK37, LMTK39 y LMTK42, presentaron un crecimiento retardado, esto mostró una tendencia más marcada a medida que aumentaba la concentración de los metales. El origen de este comportamiento se debe a la toxicidad de ambos metales que va en aumento mientras aumenta la concentración. Entre las cepas probadas, la LMTK5 y LMTK33 presentan una menor tolerancia hacia ambos metales, siendo más susceptibles.

También se pudo observar que la morfología de las colonias fue variable, presentando diversas formas como circulares, estrelladas o irregulares, y en algunos casos se observó la formación de varios halos alrededor de las colonias (Fig.35).

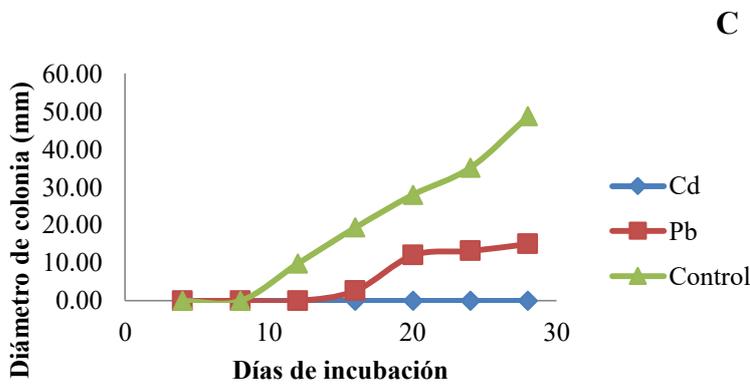
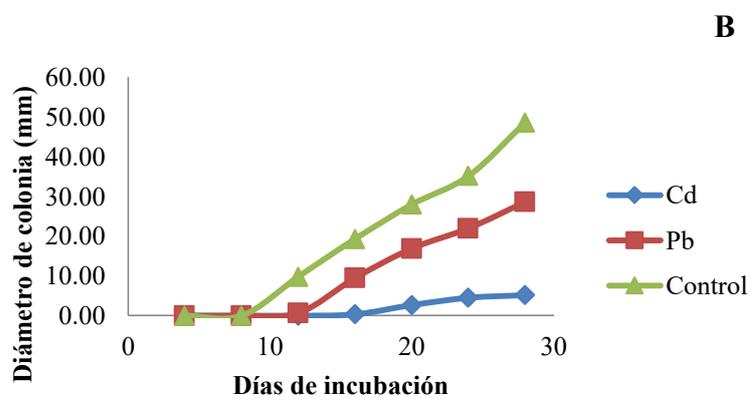
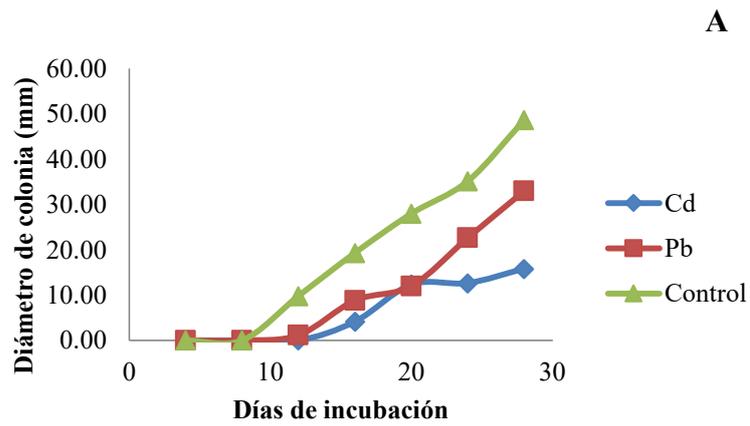


Figura 34. Efecto del Cd y Pb en el crecimiento de la cepa LMTK33 a las concentraciones 0.005 mM (A), 0.01 mM (B), y 0.05 mM (C).

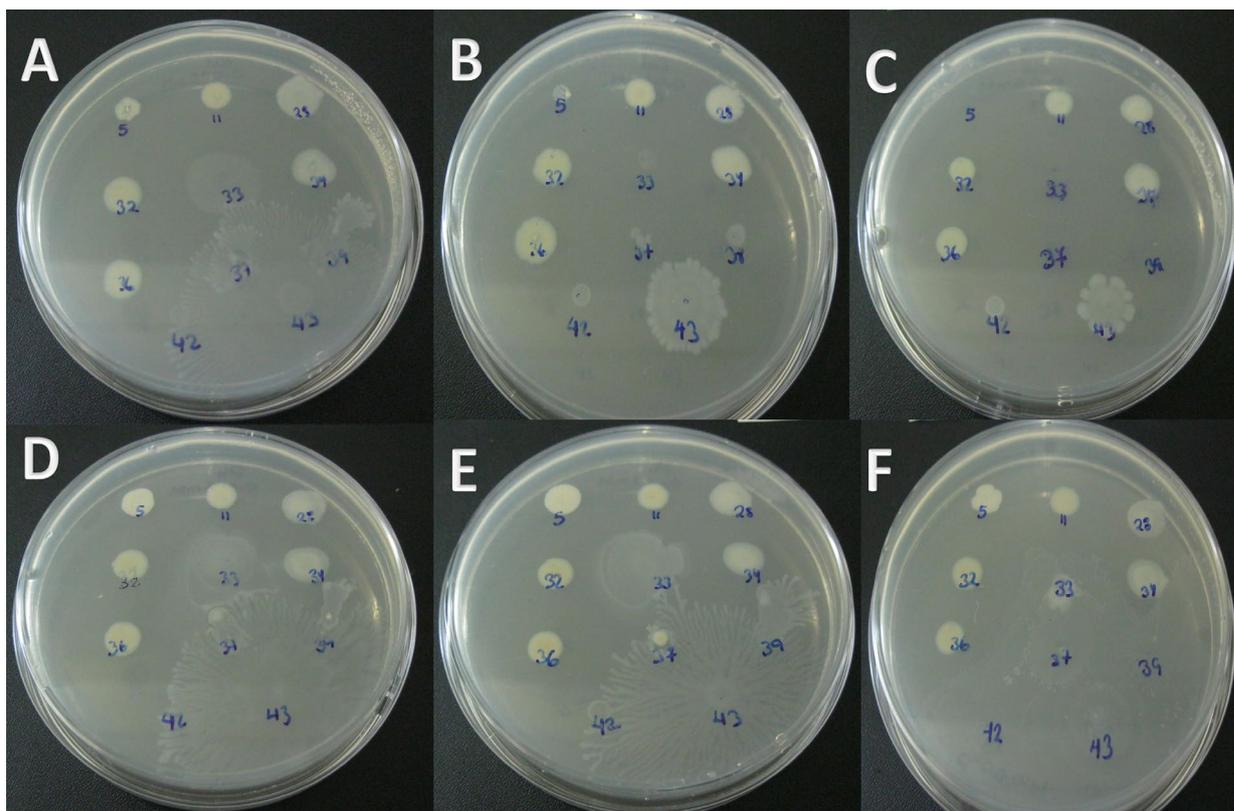


Figura 35. Efecto de 3 concentraciones de los metales pesados Cd y Pb en el crecimiento de 11 cepas psicrótrofas evaluadas a los 28 días. A: Cd a 0.005mM, B: Cd a 0.01mM, C: Cd a 0.05mM, D: Pb a 0.005mM, E: Pb a 0.01mM, F: Pb a 0.05mM.

En forma general se puede apreciar una mayor tolerancia al Pb que al Cd en todas las 11 cepas ensayadas, con excepción de la cepa LMTK42, donde se observó un mayor diámetro de las colonias en presencia de Cd. La resistencia a las diferentes concentraciones de metales se puede explicar por varios mecanismos por medio de los cuales los microorganismos pueden reducir la actividad y disponibilidad de los metales o los pueden convertir de formas activas a formas inactivas (Pal *et al.*, 2010) (Fig. 36).

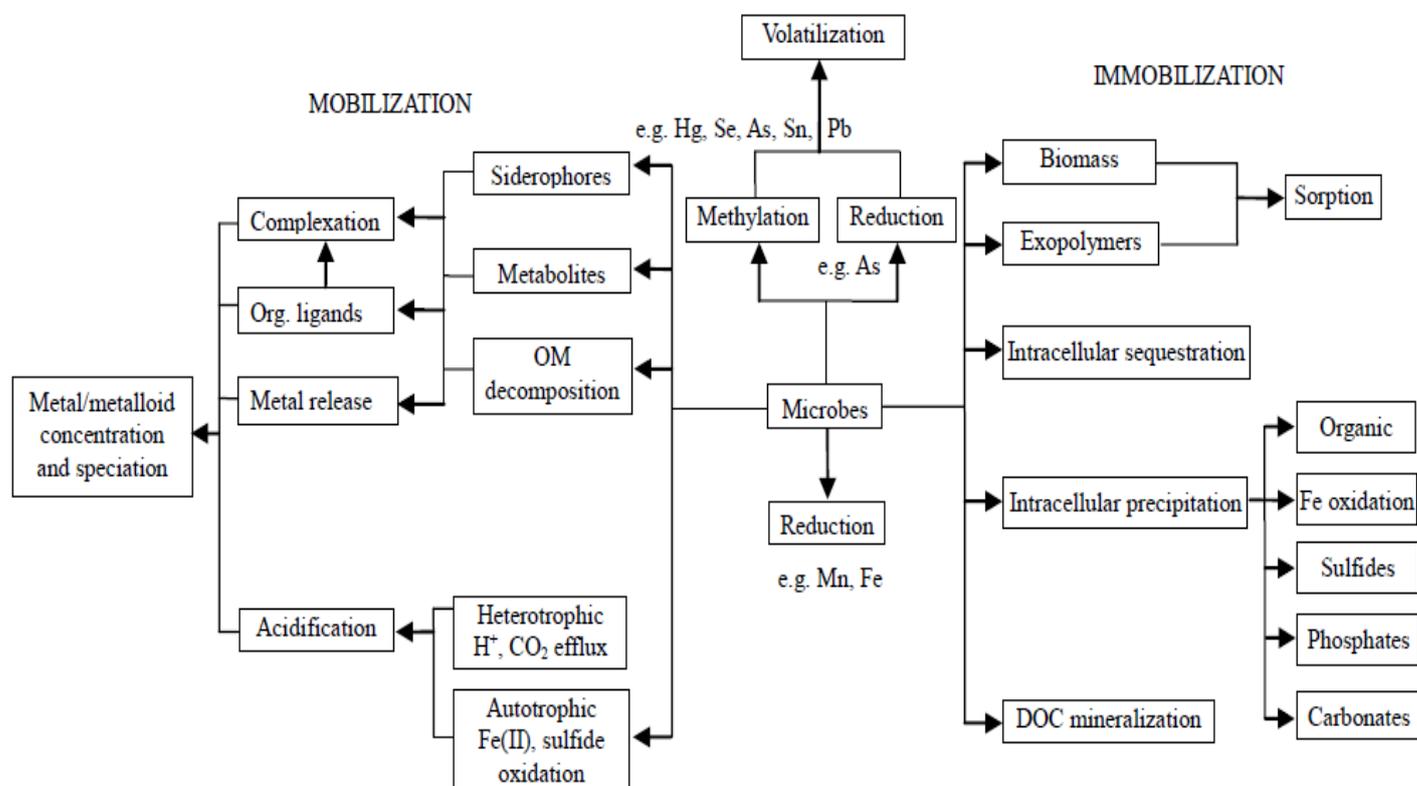


Fig. 36. Procesos involucrados en la movilización e inmovilización de metales y metaloides (modificado de Wenzel, 2009; Pal *et al.*, 2010)

4.8 Análisis integrado de características fenotípicas

Se empleó el análisis de agrupamientos o Dendograma para evaluar la relación entre las distintas características fenotípicas anteriormente evaluadas (subtítulos 4.3.1, 4.5.1 - 4.5.3). Esta representación gráfica sintetiza y muestra la relación en grado de similitud entre dos cepas o grupos de cepas a partir de la información obtenida de la matriz de coeficientes de similitud de todos los pares posibles de cepas (Crisci & López, 1983).

Se consideraron a las 20 cepas psicrótrofas anteriormente seleccionadas, tomando en cuenta los ensayos de producción de AIA, solubilización de fosfatos bicálcico y tricálcico, porcentaje de germinación y crecimiento de las cepas a diferentes temperaturas. Además se hizo por separado tomando en cuenta las diferentes

temperaturas de evaluación. De esta manera, se obtuvieron los dendogramas mostrados en las figuras mostradas a continuación (Fig. 37, 38 y 39).

A 22°C (Fig. 37, Anexo E6), se observó la separación de las cepas en tres *clusters*, siendo el factor determinante de su agrupación la capacidad de solubilización de fosfatos, seguido de la producción de AIA y finalmente en nivel de crecimiento. El primer cluster está conformado por las cepas LMTK1, LMTK15, LMTK24, LMTK10, LMTK25 y LMTK7, este agrupamiento se debe a que todas estas cepas no presentaron solubilización tanto de fosfato bicálcico ni tricálcico, además, presentaron un crecimiento máximo a esta temperatura. En cuanto a la producción de AIA, las cepas LMTK7, LMTK10 y LMTK25 produjeron cantidades de 6.97, 1.78 y 1.81 µg/ml, sin embargo las cepas LMTK1, LMTK15 y LMTK24 no produjeron AIA. En un segundo *cluster*, conformado por las cepas LMTK28, LMTK32, LMTK34, LMTK36 y LMTK43, se observó que todas solubilizaron fosfato bicálcico, así como también la capacidad de producir ácido indolacético (con excepción de la cepa LMTK34). Para un tercer *cluster* formado por las cepas LMTK4, LMTK5, LMTK14, LMTK33, LMTK6 y LMTK39, se caracterizaron porque ninguna solubilizó fosfatos, sin embargo las cepas LMTK33, LMTK6 y LMTK39 produjeron AIA. Cabe resaltar la presencia de las cepas LMTK11, LMTK42 y LMTK37 como *outgroup*. En el caso de la cepa LMTK11, es la única que mostró solubilización en fosfato bicálcico y tricálcico, además de produjo 5.354 µg/ml de AIA y obtuvo un nivel de crecimiento medio (nivel 3). En cuanto a la cepa LMTK42, produjo 2.98 µg/ml de AIA, solubilizó fosfato bicálcico y obtuvo un nivel de crecimiento mínimo (nivel 1). Con respecto a la cepa LMTK37 muestra una gran producción de AIA (60.639 µg/ml), sin embargo, no solubiliza fosfatos bicálcico ni tricálcico y su nivel de crecimiento muestra un valor de 2.

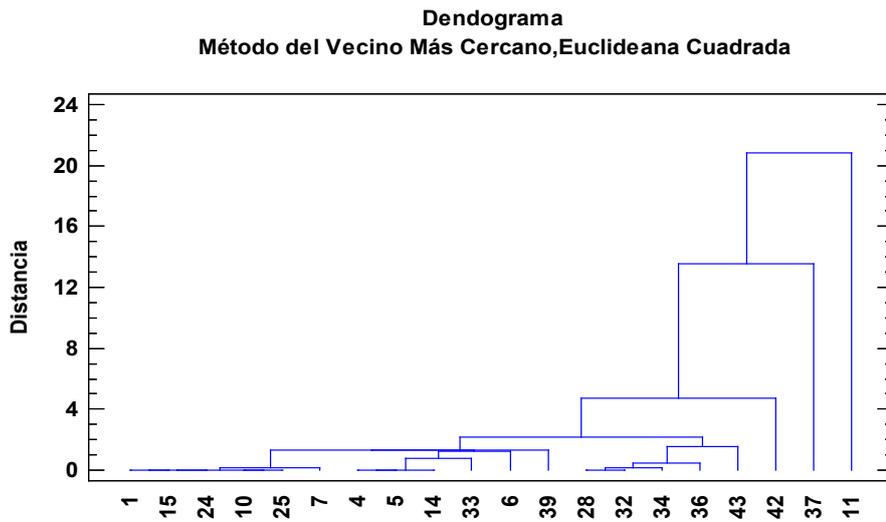


Fig. 37. Dendrograma fenotípico de las caracterizaciones fisiológicas de las bacterias psicrótrofas aisladas, así como por sus capacidades promotoras del crecimiento vegetal a 22°C. Método del vecino más cercano.

A la temperatura de evaluación de 12°C (Fig. 38, Anexo E6), también se observó la agrupación en dos *clusters*, en este caso, el factor que influye para la agrupación se da principalmente por la capacidad de solubilización de fosfato, luego producción de AIA y finalmente el nivel de crecimiento. Se muestra un primer *cluster* conformado por las cepas LMTK6, LMTK36, LMTK11, LMTK34, LMTK28, LMTK32, LMTK42 y LMTK43 las cuales tienen en común su capacidad de solubilizar fosfato bicálcico y tricálcico, en cuanto a la producción de AIA, para este primer *cluster*, las cepas LMTK36, LMTK11, LMTK42 y LMTK43 obtuvieron concentraciones entre 5.99 y 15.10 µg/ml, mientras que las cepas LMTK6, LMTK28, LMTK32 y LMTK34 no produjeron AIA, en cuanto al nivel de crecimiento, todas las cepas del *cluster* presentaron niveles medios y máximos. El segundo *cluster* está conformado por las cepas LMTK1, LMTK5, LTMK14, LMTK15, LMTK25, LMTK39, LMTK4, LTMK24, LMTK33, LMTK7 y LMTK10 las cuales se caracterizaron por ser incapaces de solubilizar fosfatos. Además, este segundo grupo se divide en dos subgrupos, el primero conformado por las cepas LMTK4, LTMK24, LMTK33, LMTK7 y LMTK10, de donde las cepas LMTK7 y LMTK10 fueron las únicas con la capacidad de producción de AIA

mostrando valores de 3.01 y 4.85 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente, además este subgrupo se caracterizó por presentar un crecimiento de nivel medio (nivel 3). El segundo subgrupo, conformado por las cepas LMTK1, LMTK5, LMTK14, LMTK15, LMTK25 y LMTK39, las cuales no produjeron AIA. Este subgrupo se separa del otro por el crecimiento a diferentes temperaturas, mostrando un menor crecimiento en comparación con el subgrupo conformado por las cepas LMTK1, LMTK5, LMTK14, LMTK15, LMTK25, LMTK39, de las cuales sólo las cepas LMTK25 y LMTK39 produjeron AIA (0.86 y 1.49 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente), todas las cepas presentaron crecimiento medio (nivel 3) excepto la cepa LMTK1 la cual presentó crecimiento máximo. La cepa LMTK37 se muestra como *outgroup*, de donde, se observó que no tuvo la capacidad de solubilizar fosfatos, produjo la mayor cantidad de AIA comparada con las demás cepas y mostró un crecimiento máximo a esta temperatura.

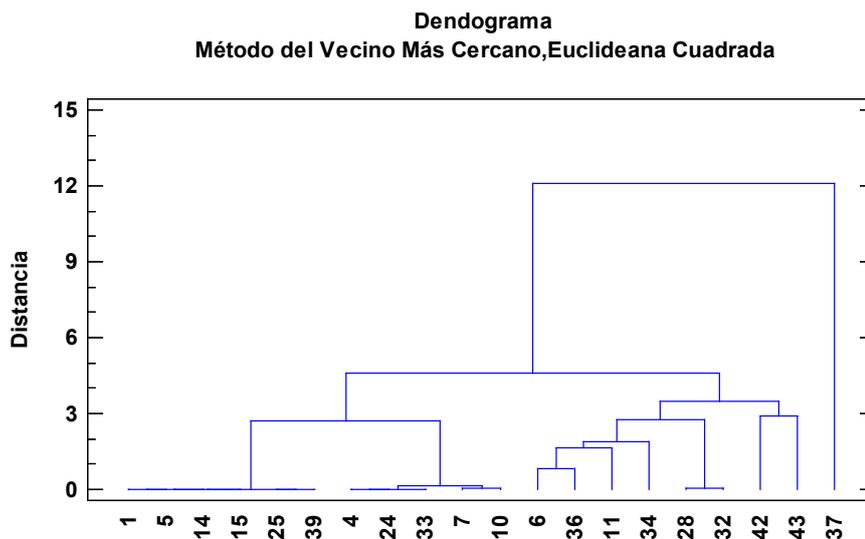


Fig. 38. Dendrograma fenotípico de las caracterizaciones fisiológicas de las bacterias psicrótrofas aisladas, así como por sus capacidades promotoras del crecimiento vegetal a 12°C. Método del vecino más cercano.

A 6°C (Fig. 39, Anexo E6), se observó la formación de dos *clusters*. El primer *cluster* lo conforman las cepas LMTK28, LMTK36, LMTK32, LMTK34, LMTK42 y LMTK43 agrupadas principalmente por su capacidad de solubilizar fosfatos bicálcico y

tricálcico; las cepas LMTK28, LMTK36, LMTK32, LMTK42 y LMTK43 produjeron AIA con valores entre 0.80 $\mu\text{g/ml}$ y 1.37 $\mu\text{g/ml}$, la única excepción de este primer *cluster* fue la cepa LMTK34 que no solubilizó fosfato. En cuanto al nivel de crecimiento, las cepas LMTK42 y LMTK43 obtuvieron un nivel medio (nivel 3), mientras que LMTK28, LMTK36, LMTK32 y LMTK34 obtuvieron el nivel máximo de crecimiento a esta temperatura.

El segundo *cluster*, conformado por las cepas LMTK1, LMTK6, LMTK5, LMTK7, LMTK14, LMTK15, LMTK24, LMTK25, LMTK33, LMTK37, LMTK4, LMTK10 y LMTK39 no solubilizan fosfatos bicálcico ni tricálcico, en cuanto a la producción de AIA, ninguna de las cepas pertenecientes a este grupo mostró producción de AIA, es por ello que se encuentran agrupadas en este *cluster*. La cepa LMTK11 se presenta como un *outgroup*, teniendo como característica un crecimiento óptimo a esta temperatura (nivel 4), además de la capacidad de solubilizar fosfato bicálcico y tricálcico, siendo el valor de eficiencia de solubilización para fosfato bicálcico el máximo a esta temperatura (311.76), así como también obtuvo la mayor producción de AIA con un valor de 3.709 $\mu\text{g/ml}$.

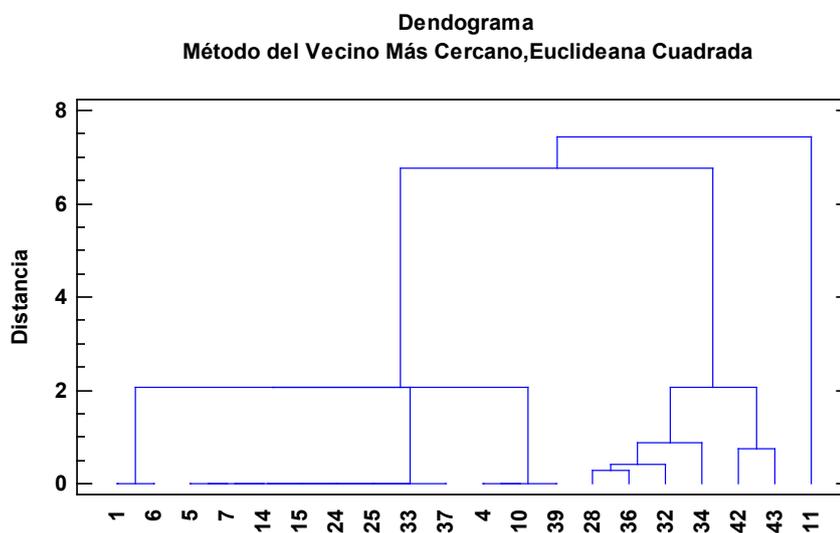


Fig. 39. Dendrograma fenotípico de las caracterizaciones fisiológicas de las bacterias psicrótrofas aisladas, así como por sus capacidades promotoras del crecimiento vegetal a 6°C. Método del vecino más cercano.

Cuando analizamos a todos los factores evaluados a las tres temperaturas (solubilización de fosfatos, producción de AIA, nivel de crecimiento, germinación y MIC en metales pesados) (Fig. 40), se observó la formación de dos grandes conglomerados. El primer conglomerado está conformado por las cepas LMTK1, LMTK14, LMTK15, LMTK7, LMTK4, LMTK5, LMTK10, LMTK24, LMTK25, LMTK39, LMTK6 y LMTK33, mientras que en el segundo conglomerado se encuentran las cepas LMTK11, LMTK28, LMTK32, LMTK36, LMTK34 y LMTK42. La solubilización de fosfato es un factor determinante para la formación de estos conglomerados seguido por la capacidad de tolerar metales pesados. En el segundo conglomerado o *cluster* se encuentran las cepas que poseen la capacidad de solubilizar fosfatos bicálcico y tricálcico, además de la capacidad de tolerar diferentes concentraciones de Pb y Cd. A diferencia del primer conglomerado, las cepas del segundo *cluster* no presentaron capacidad de solubilizar fosfatos y tampoco fueron capaces de tolerar diferentes concentraciones de Pb y Cd, excepto las cepas LMTK5, LMTK39 y LMTK33 las cuales presentaron tolerancia al Cd y Pb de donde LMTK5 y LMTK33 fueron las que presentaron menor y mayor diámetro de crecimiento respectivamente. En cuanto a la producción de AIA, las cepas LMTK36 y LMTK43 fueron las únicas en producir la fitohormona a las tres temperaturas, mientras que LMTK28, LMTK32 produjeron AIA a 22°C y 6°C, en cambio la cepa LMTK34 no mostró producción de AIA. En cuanto al crecimiento a diferentes temperaturas, todas las cepas de este *cluster* presentaron niveles de crecimiento medios y máximos a las tres temperaturas. Finalmente en cuanto a la germinación, para el segundo *cluster* no se observó una relación entre los porcentajes de germinación y el agrupamiento de las cepas, con esto se puede deducir que el porcentaje de germinación no es determinante para la agrupación de los *clusters*.

Por otro lado se observó que las cepas, LMTK43 y LMTK37, cada una es un *outgroup*. La cepa LMTK 43 posee la capacidad de producir AIA a las tres temperaturas evaluadas, solubilizar fosfatos bicálcico y tricálcico, tolerar concentraciones de 0.5 mM de Pb y Cd. La cepa LMTK37 sólo produjo AIA a 22°C y 12°C siendo estos los máximos valores producidos (60.64 µg/ml y 31.11 µg/ml), además no presentó capacidad para solubilizar fosfatos a ninguna de las temperaturas evaluadas, pero sí presentó tolerancia a Pb (0.5 mM) y Cd (0.01 mM).

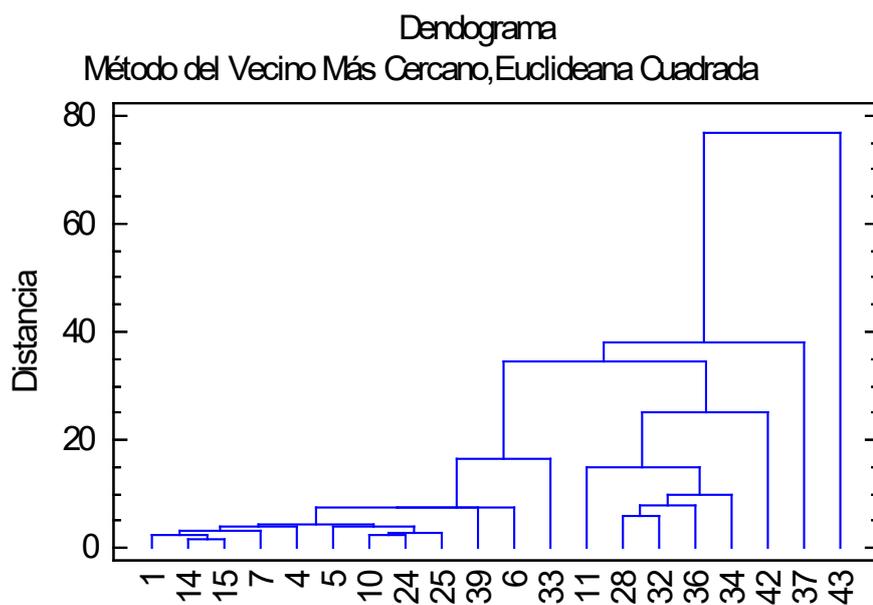


Fig. 40. Dendograma fenotípico de las características fisiológicas, capacidades promotoras del crecimiento vegetal a todas las temperaturas evaluadas y tolerancia a distintas concentraciones de Pb y Cd de las bacterias psicrótrofas aisladas. Método del vecino más cercano.

V. CONCLUSIONES

Al finalizar el presente trabajo de investigación se llegó a las siguientes conclusiones:

1. Se aislaron un total de 44 cepas psicrótrofas de la rizósfera del cultivo de maca, proveniente de San Pedro de Cajas – Junín, de las cuales sólo el 4% fueron psicrófilas.
2. De las cepas aisladas el 79.55% fueron Gram positivas, predominando la especie *Bacillus simplex*. Dentro de las bacterias Gram negativas prevalecieron las del género *Pseudomonas* sp. (88.89%).
3. La caracterización molecular mediante perfiles BOX-PCR arrojó que los microorganismos aislados pertenecen principalmente a los géneros *Bacillus* sp., *Paenibacillus* sp., *Sporosarcina* sp., *Arthrobacter* sp., *Pseudomonas* sp. y *Cupriavidus* sp.
4. En cuanto a la producción de AIA, el 34.09%, 20.45% y 13.64% de las cepas produjeron AIA a 22°C, 12°C y 6°C respectivamente. La capacidad de producción de AIA disminuyó conforme la temperatura baja.
5. De las 44 cepas aisladas, 22.73% fueron capaces de solubilizar el fosfato bicálcico a 6°C, 12°C y 22°C, mientras que el 20.45% solubilizó fosfato tricálcico a 12°C y 6°C. Se determinó que 12°C es la temperatura óptima para la solubilización de fosfato bicálcico y tricálcico en estas bacterias.
6. Del total de 20 cepas probadas en el ensayo de germinación, solo las cepas LMTK24 y LMTK25 (*Bacillus simplex*) y LMTK28 (*Pseudomonas* sp.) mejoran significativamente la germinación respecto al control en plantas de trébol rojo a una temperatura de 12°C.
7. Las cepas LMTK5 (*Bacillus simplex*), LMTK37, LMTK39 (*Paenibacillus* sp.), LMTK33 (*Sporosarcina* sp.), LMTK11, LMTK28, LMTK32, LMTK36, LMTK34, LMTK43 (*Pseudomonas* sp.) y LMTK42 (*Cupriavidus gilardii*) son potenciales

biorremediadoras debido a su capacidad de tolerar concentraciones de hasta 1 mM de Cd y 0.5 mM de Pb.

8. Las cepas LMTK28 y LMTK32 (*Pseudomonas* sp.), pueden ser utilizadas como bioinoculantes en la zona altoandina con presencia de contaminantes en el suelo, por sus características de crecimiento a bajas temperaturas, promoción del crecimiento y su tolerancia a metales pesados.
9. Del análisis integrado se observó que a las tres temperaturas evaluadas, la capacidad de solubilización de fosfato y resistencia a metales pesados son los principales factores que determinan la agrupación de cepas en conglomerados.

VI. RECOMENDACIONES

1. Determinar la solubilización de fosfatos en medio líquido, por tener mayor sensibilidad que en medio sólido.
2. Determinar también la solubilización de fosfato en medios a un pH ácido en el caso de trabajar con cepas aisladas de la región altoandina, ya que esta zona se caracteriza por poseer suelos ácidos y con presencia de sales de hierro y aluminio.
3. Evaluar la capacidad de absorción de metales pesados por parte de las cepas tolerantes a estos mediante ensayos utilizando plantas con presencia de metales en su interior.
4. Realizar el secuenciamiento y caracterización molecular de las cepas psicrótrofas restantes, además de analizar sus potenciales capacidades como promotoras de crecimiento.
5. Evaluar a nivel de plántulas *in vitro* a todas las cepas con capacidades promotoras de crecimiento encontradas en este estudio.
6. Realizar ensayos de otras capacidades de promoción del crecimiento vegetal, tales como, producción de sideróforos, antagonismo, metabolitos volátiles, etc., a las cepas psicrótrofas aisladas en este estudio.
7. Evaluar las cepas con resultados positivos en cuanto a promoción de crecimiento y tolerancia a metales a nivel de campo en la zona altoandina.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abd-Alla M.H. 1994. Phosphatases and the utilization of organic phosphorus by *Rhizobium leguminosarum* biovar *viceae*. Lett. Appl. Microbiol. 18: 294 - 296.
2. Ahmed P., Wani A.E., Saghir M.D., Khan A.E. & Zaidi A. 2008. Effect of metal -tolerant plant growth - promoting *Rhizobium* on the performance of pea grown in metal-amended soil. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 55: 33 - 42.
3. Alam S., Khalil S., Ayub N. & Rashid M. 2002. In vitro solubilization of inorganic phosphate by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) from maize rhizosphere. Int. J. Agric. Biol. 4 (4): 454 - 458.
4. Alexander, M. 1980. Transformaciones microbianas del fósforo: Introducción a la microbiología del suelo. AGT editor. México. 355-371 pp.
5. Alikhani H., Saleh-Rastin, N. & Antoun H. 2006. Phosphate solubilization activity of rhizobia native to Iranian soils. Plant Soil. 287: 35 - 41.
6. Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaeffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic. Acids. Res. 25: 3389 - 3402.
7. Amara, M.A.T. & Dahdoh, M.S.A. 1997. Effect of inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield and uptake of nutrients by wheat grown on sandy soil. Egyp. J. Soil Sci. 37: 467 - 484.
8. APHA (American Public Health Association). 1998. Standard Methods for Examination of Water and Waste Water. 20 ed. Washington DC, US.
9. Arshad, M. & Frankenberger, W. T. 1991. Microbial production of plant hormones. Plant. Soil. 133: 1 - 8.
10. Arshad M. & Frankenberger W.T. Jr. 1998. Plant growth regulating substances in the rhizosphere: microbial production and functions. Adv. Agron. 62: 146 - 151.

11. Asghar, H.N., Zahir, Z.A., Arshad, M. & Khaliq, A. 2002. Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth promoting activities in *Brassica juncea* L. Biol. Fertil. Soils. 35: 231 - 237.
12. ATSDR. 2011. Top 20 Hazardous Substances. ATSDR/EPA Priority List for 2011. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. US Department of Health and Human Services. (<http://www.atsdr.cdc.gov/spl/>).
13. Avoscan, L., Collins, R., Carriere, M., Gouget, B. & Covés, J. 2006. Seleno-L-methionine is the predominant organic form of Selenium in *Cupriavidus metallidurans* CH34 exposed to Selenite or Selenate. Appl. Environ. Microbiol. 72 (9): 6414 - 6416.
14. Azario, R.; Salvarezza, S.; Ibarra, A. & García, M. 2010. Efecto del cromo hexavalente y trivalente sobre el crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 35218. Información Tecnológica. 21 (1): 51 – 56.
15. Banerjee, S., Palit, R., Sengupta, Ch. & Standing, D. 2010. Stress induced phosphate solubilization by *Arthrobacter sp.* and *Bacillus sp.* isolated from tomato rhizosphere. Aust. J. Crop Sci. 4 (6): 378 - 383.
16. Bartling, D., Seedorf, M., Mithofer, A. & Weiler, E. W. 1992. Cloning and expression of an *Arabidopsis* nitrilase which can convert indole-3-acetonitrile to the plant hormone, indole-3-acetic acid. Eur. J. Biochem. 205: 417 - 424.
17. Belimov, A.A., Kunacova, A.M., Safronova, V.I., Stepanok, V.V., Yudkin, L.Y., Alekseev, Y.V. & Kozhmyakov, A.P. 2004. Employment of rhizobacteria for the inoculation of barley plants cultivated in soil contaminated with lead and cadmium. Microbiology. 73 (1): 99 - 106.
18. Bergey, J., Hendricks, D. & Holt, J. 2000. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9 Ed. Philadelphia, US. Editorial Lippincott Williams & Wilkins.
19. Biswas, J.C., Ladha, J.K. & Dazzo, F.B. 2000a. Rhizobia inoculation improves nutrient uptake and growth of lowland rice. Soil Sci. Soc. Am. J. 64: 1644 - 1650.

20. Bloemberg G. & Lugtenberg B. 2001. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by Rhizobacteria. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4: 343 - 350.
21. Bobadilla, C. & Rincón, S. 2008. Aislamiento y producción de bacterias fosfato solubilizadoras a partir de compost obtenido de residuos de plaza. Tesis Lic. Microbiol. Indust. Bogotá, Colombia. Pontificia Universidad Javeriana. pp. 97.
22. Bric, J., Bostock, R. & Silvestone, S. 1991. Rapid in situ assay for indolacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. *Appl. Environ. Microbiol.* 57(2): 535 - 538.
23. Broughton, W.J. & Dilworth, M.J. 1971. Control of leghaemoglobin synthesis in snake beans. *Biochem. J.* 125: 1075 - 1080.
24. Calvo, P. & Zúñiga, D. 2010. Caracterización fisiológica de cepas de *Bacillus* spp. aisladas de la rizósfera de papa (*Solanum tuberosum*). *Ecol. Apl.* 9 (1): 31 - 39.
25. Celis, L. & Gallardo I. 2008. Estandarización de métodos de detección para promotores de crecimiento vegetal (ácido indol acético y giberelinas) en cultivos microbianos. Tesis Lic. Microbiol. Agric. Veter. Bogotá, Colombia. Pontificia Universidad Javeriana. pp. 159.
26. Chen, Y., Mei, R., Lu, S., Liu, L. & Kloepper, J.W. 1994. The use of yield increasing bacteria as plant growth promoting rhizobacteria in Chinese agriculture. In *Management of Soil Born Diseases* ed. Gupta, V.K. and Utkhede, R. pp. 1–13. New Dehli, India: M/S Narosa Pub. House.
27. Chen, y., Rekha, P., Arun, A., Shen, F., Lai, W. & Young, C. 2006. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *App. Soil Ecol.* 34: 33-41.
28. Chun, J., Lee, J.-H., Jung, Y., Kim, M., Kim, S., Kim, B. K. & Lim, Y. W. 2007. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57: 2259 - 2261.

29. Compant S., Duffy B., Nowak J., Clément C. & Barka E. A. 2005. Use of Plant Growth - Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (9): 4951 - 4959.
30. Costacurta, A. & Vanderleyden, J. 1995. Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* 21 (1): 1 - 18.
31. Coyne, M. 2000. *Microbiología del suelo: Un enfoque exploratorio*. Ed. Paraninfo. Madrid, España. pp. 178 - 182.
32. Crisci, J.V. & López, M.F. 1983. *Introducción a la teoría y práctica de la taxonomía numérica*. Organización de los Estados Americanos. Washington, U.S.A.
33. Divya, B. & Kumar, M. D. 2011. Plant – Microbe interaction with enhanced bioremediation. *Res. J. Biotechnol.* 6 (4): 72 - 79.
34. Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Vande Broek, A. & Vanderleyden, J. 1999. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. *Plant Soil.* 212: 155 - 164.
35. Dopson, M., Baker-Austin, C., Ram Koppineedi, P. & Bond, P. L. 2003. Growth in sulfidic mineral environments: metal resistance mechanisms in acidophilic micro-organisms. *Microbiol.* 149 (8): 1959 - 1970.
36. Dörffling K. 1982. *Das Hormonsystem der Pflanzen*, Stuttgart: Thieme.
37. EPA Environmental Protection Agency. 2012a. Lead. (En línea). United States of America. (Consultado 11 nov. 2012). Página web. Disponible en <http://www.epa.gov/lead/>
38. EPA Environmental Protection Agency. 2012b. Cadmium fact sheet. (En línea). United States of America. (Consultado 11 nov. 2012). Página web. Disponible en <http://www.epa.gov/wastes/hazard/wastemin/minimize/factshts/cadmium.pdf>
39. Fankem, H., Nwaga, D., Deubel, A., Dieng, L., Merbach, W. & Etoa, F.X. 2006. Occurrence and functioning of phosphate solubilizing microorganism

- from oil palm tree (*Elaeis guineensis*) rhizosphere in Cameroon. Afr. J. Biotechnol. 5 (24): 2450 - 2460.
40. Fernández, L.; Zalba, P.; Gómez, M. & Sagardoy, M. Bacterias Solubilizadoras de Fosfato Inorgánico Aisladas de Suelos de la Región Sojera. 2005. Cienc. Suelo. 23 (1) 31 - 37.
 41. Frame J., Charlton J.F.L. & Laidlaw A.S. 1998. Temperate Forage Legumes. *Trifolium pratense*. (Online). Consultado 23 de enero 2012. <http://www.fao.org/ag/AGP/AGPC/doc/gbase/data/pf000349.htm>
 42. Frankenberger W.T. & Arshad M. 1995. Phytohormones in Soil: Microbial Production and Function. Ed. Marcel Dekker. New York NY USA. pp. 503.
 43. Gadd, G.M. 1992. Metals and microorganism: a problem of definition. FEMS Microbiol. Lett. 100: 197 - 204.
 44. Glick, B.R. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. Can. J. Microbiol. 41: 109 - 117.
 45. Gonzales, G. 2010. Maca: Del alimento perdido de los incas al milagro de los andes. Estudio de seguridad alimentaria y nutricional. Segurança Alimentar e Nutricional, Campinas. 17 (1): 16 – 36.
 46. Gordon S. & Weber R. 1951. Colorimetric estimation of indolacetic acid. Division of Biological and Medical Research. Argonne National Laboratory. Chicago, Illinois.
 47. Gruen, H. W. 1959. Auxin and fungi. Annu. Rev. Plant Physiol. 10: 405 - 440.
 48. Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95-98.
 49. Health Protection Agency. 2010. Potassium Hydroxide Test. National Standard Method BSOP TP 30 Issue 2. http://www.hpa-standardmethods.org.uk/pdf_sops.asp.

50. Hilali, A., Przrost, D., Broughton, W.J. & Antoun, A. 2001. Effects de l'inoculation avec des souches de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* sur la croissance du blé dans deux sols du Maroc. *Can. J. Microbiol.* 47: 590 - 593.
51. INRENA (Instituto Nacional de Recursos Naturales). 2008 - 2012. Plan maestro de la Reserva Nacional de Junín. Lima. En línea. Consultado el 12 de diciembre 2012. Disponible en <http://www.sernanp.gob.pe/sernanp/bplanesmaestros.jsp>
52. Janarthine1, R. S. & Eganathan, P. 2012. Plant growth promoting of endophytic *Sporosarcina aquimarina* SjAM16103 isolated from the Pneumatophores of *Avicenniamarina* L. *Int. J. Microbiol.* 2012 (10): 1145 - 1155.
53. Kamnev, A. 2003. Phytoremediation of heavy metals: an overview. *Mar. Biotechnol.* 8: 269 - 319.
54. Kameneva, S.V. & Muronets, E.M. 1999. *Genetika.* 35(11): 1480 - 1494.
55. Kaper, J. M. & Veldstra, H. 1958. On the metabolism of tryptophan by *Agrobacterium tumefaciens*. *Biochim. Biophys. Acta.* 30: 401 - 420.
56. Karami A. & Shamsuddin Z. 2010. Phytoremediation of heavy metals with several efficiency enhancer methods. *Afr. J. Biotechnol.* 9(25): 3689 - 3698.
57. Khan M. S., Zaidi A. & Wani P. A. 2007. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture - a review. *Agron. Sustain. Dev.* 27: 29 - 43.
58. Khalid A., Arshad M. & Zahir Z. A. 2004. Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *J. Appl. Microbiol.* 96: 473 - 480.
59. Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16: 111 - 120.
60. Kloepper J. W., Zablotowicz R. M., Tipping E. M. & Lifshitz R. 1991. Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers. D. L. Keister & P. B. Cregan (Eds). *The rhizosphere and plant growth* (pp. 315 - 326). The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.

61. Kloepper, J.W., Leong, J., Teintze, M. & Schroth, M.N. 1980. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth promoting rhizobacteria. *Nature* 286: 885 - 886.
62. Kotouckova, L., Schumann, P., Durnova, E., Sproer, C., Sedlacek, I., Neca, J., Zdrahal, Z. & Nemeč, M. 2004. *Arthrobacter nitroguajacolicus* sp. nov., a novel 4-nitroguaiacol-degrading actinobacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 773 - 777.
63. Kravchenko L.V., Borovkov A.V. & Pshikvil Z. 1991. The possibility of auxin biosynthesis in wheat rhizosphere by associated nitrogen - fixing bacteria. *Mikrobiologiya.* 60: 927 - 931.
64. Labra D., Montes S., Rodríguez A., Pérez S., Guerrero A., Amezcua M., Pérez N. & Rodríguez A. 2010. Growth response and heavy metals tolerance of *Axonopus affinis*, inoculated with plant growth promoting rhizobacteria. *Afr. J. Biotechnol.* 9 (51): 8772 - 8782.
65. Lalitha, M.K. 2005. Manual on Antimicrobial Susceptibility Testing. Indian Assoc. of Med. Microbiol. pp. 46. Disponible en línea en <http://www.ijmm.org/documents/Antimicrobial.doc>
66. Lambrecht, M., Okon, Y., Vande Broek, A. & Vanderleyden, J. 2000. Indole-3-acetic acid: a reciprocal signaling molecule in bacteria–plant interactions. *Trends. Microbiol.* 8: 298 - 300.
67. Ledin, M., Krantz-Rulcker, C. & Allard, B. 1996. Zn, Cd and Hg accumulation by microorganisms, organic and inorganic soil components in multicompartment system. *Soil Biol. Biochem.* 28:791 - 799.
68. Lemke, M., Churchili, P. & Wetzal, R. 1995. Effect of substrate and cell surface hydrophobicity on phosphate utilization in bacteria. *App. Environ. Microbiol.* 61 (3): 913 – 919.
69. Libbert, E., Fiscer, E., Drawert, A. & Schröder, R. 1970. Pathways of IAA production from tryptophan by plants and by their epiphytic bacteria: a comparison II. Establishment of the tryptophan metabolites, effects of a native inhibitor. *Physiol. Plant.* 23: 278 - 286.

70. Lupski, J.R. & Weinstock, G.M. 1992. Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. *J. Bacteriol.* 174: 4525 - 4529.
71. Ma Y., Prasad M.N.V., Rajkumar M. & Freitas H. 2011. Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils. *Biotechnol. Adv.* 29: 248 - 258.
72. Malay Kumar Ray. 2006. *Stress Response: A Molecular Biology Approach.* Cold-stress response of low temperature adapted bacteria. Ed. Amere S. Sreedhar and Usha K. Srinivas. Kerala, India. *Research Signpost.* 23.
73. Martens, D.A. & Frankenberger W.T. Jr. 1994. Assimilation of exogenous 2-¹⁴C-indole acetic acid and 3-¹⁴C-tryptophan exposed to the roots of three wheat varieties. *Plant Soil* 166: 281 - 290.
74. Matsubara, J. M. 2010. Diversidad fenotípica y molecular de bacterias simbióticas del cultivo de pallar (*Phaseolus lunatus* L.) en el valle de Supe – Barranca. Tesis Lic. Biol. Lima, Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina. pp. 115.
75. MINAM (Ministerio del Ambiente). 2012. Resolución ministerial N° 307 - 2012 – MINAM. <http://www.minam.gob.pe>
76. Mishra P. K., Mishra S., Selvakumar G., Bisht S. C., Bisht J. K., Kundu S. & Gupta H. S. 2008. Characterization of a psychrotolerant plant growth promoting *Pseudomonas* sp. strain PGERs17 (MTCC 9000) isolated from North Western Indian Himalayas. *Ann. Microbiol.* 58 (4): 561 - 568.
77. Mishra P. K., Mishra S., Selvakumar G., Bisht S. C., Bisht J. K., Kundu S. & Gupta H. S. 2009. Isolation, molecular characterization and growth-promotion activities of a cold tolerant bacterium *Pseudomonas* sp. NARs9 (MTCC9002) from the Indian Himalayas. *Biol. Res.* 42: 305 - 313.
78. Morillo, J., García-Ribera, R., Quesada, T., Aguilera, M., Ramos-Cormenzana, A. & Monteoliva-Sánchez, M. 2008. Biosorption of heavy metals by the exopolysaccharide produced by *Paenibacillus jamilae*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24: 2699 - 2704.

79. Morita, R. Y. 1975. Psychrophilic bacteria. *Bacteriol. Rev.* 39 (2): 144 - 167.
80. Nautiyal, C. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.* 170: 65 - 270.
81. Nguyen, C.; Yan, W.; Le Tacon, F. & Lapeyrie, F. 1992. Genetic variability of phosphate solubilizing activity by monocaryotic and dicaryotic mycelia of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* (Maire) P.D. Orton. *Plant Soil.* 143: 193 - 199.
82. Nelson, L. 2004. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Prospects for New Inoculants. (En línea). Consultado 24 enero 2012. Disponible en <http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/cm/review/2004/rhizobacteria/>. Plant Management Network International. Crop Management.
83. Nies, D.H. 1999. Microbial heavy metal resistance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51: 730 - 750.
84. Nowak, J. 1998. Review benefits of in vitro “bacterization” of plant tissue cultures with microbial inoculants. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 34: 122 - 130.
85. Oberhansli, T., Defago, G. & Haas, D. 1991. Indole-3-acetic-acid (IAA) synthesis in the biocontrol strain CHA0 of *Pseudomonas fluorescens* – role of tryptophan side-chain oxidase. *J. Gen. Microbiol.* 137: 2273 - 2279.
86. Ochiai, E.I. 1987. General principles of biochemistry of the elements. Plenum Press. New York. 461 pp.
87. Ogata, K., Zúñiga, D. 2008. Estudio de la microflora de la rizósfera de *Caesalpinia spinosa* en la provincia de Huánuco. *Zonas Áridas.* 12 (1): 191 - 208.
88. Pal, S., Patra, A. K., Reza, S. K., Wildi, W. & Poté, J. 2010. Use of bio-resources for remediation of soil pollution. *Nat. Resour.* 1: 110 - 125.
89. Pandey, S., Kumar Ghosh, P., Ghosh, S., Kumar De & T. Kanti Maiti, T. 2013. Role of heavy metal resistant *Ochrobactrum* sp. and *Bacillus* spp. strains in bioremediation of a rice cultivar and their PGPR like activities. *J. Microbiol.* 51 (1): 11 - 17.

90. Pandey, A., Trivedi, P., Kumar, B., Chaurasia, B., Singh, S. & Palni, L. M. S. 2004. Biotechnological approaches for sustainable development: Development of microbial inoculants for enhancing plant performance in the mountains. Eds. M. S. Reddy & S. Khanna. New Delhi. Allied Publishers Pvt. Ltd. 425 p.
91. Pandey, S., Kumar Ghosh, P., Ghosh, S., Kumar De & T. Kanti Maiti, T. 2013. Role of heavy metal resistant *Ochrobactrum* sp. and *Bacillus* spp. strains in bioremediation of a rice cultivar and their PGPR like activities. J. Microbiol. 51 (1): 11 - 17.
92. Paredes, M. & Espinosa, D. 2010. Ácidos orgánicos producidos por rizobacterias que solubilizan fosfato: una revisión crítica. Terra Latinoamericana. 28 (1): 61 - 70.
93. Patten, C. & Glick, B.R. 1996. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. Can. J. Microbiol. 42 (3): 207 - 220.
94. Perley, J. W. & Stowe, B. B. 1966. On the ability of *Taphrina deformans* to produce indoleacetic acid from tryptophan by way of tryptamine. Plant. Physiol. 41: 234 - 237.
95. Poole, R. K. & Gadd, G. M. 1989. Metal - microbe interactions. Oxford. IRL Press. 99 - 117.
96. Príncipe, A., Alvarez, F., Castro, M., Zachi, L., Fischer, S., Mori, G. & Jofré, E. 2007. Biocontrol and PGPR features in native strains isolated from saline soils of Argentina. Curr. Microbiol. 55: 314 - 322.
97. Rodríguez, H. & Fraga, R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. Biotech. Adv. 17: 319 - 339.
98. Rogers, J. S., & Swofford, D. L. 1998. A fast method for approximating maximum likelihoods of phylogenetic trees from nucleotide sequences. Syst. Biol. 47: 7 - 89.
99. Rojas, M. & Ramirez, H. 1993. Control hormonal del desarrollo de las plantas: fisiología, tecnología y experimentación. Limusa. Méjico. pp. 263.

100. Rouch, D.A, Lee, T.O.B. & Morby, A.P. 1995. Understanding cellular responses to toxic agents: a model for mechanisms - choice in bacterial resistance. *J. Ind. Microbiol.* 14: 132 - 41.
101. Sabry, S. A., Ghozlan, H. A. & Abou-Zeid, D. M. 1997. Metal tolerance and antibiotic resistance patterns of a bacterial population isolated from sea water. *J. Appl. Microbiol.* 82: 245 - 252.
102. Sachdev, D., Agarwal, V., Verma, P., Shouche, Y., Dhakephalkar, P. & Chopade, B. 2009. Assessment of microbial biota associated with rhizosphere of wheat (*Triticum aestivum*) during flowering stage and their plant growth promoting traits. *Internet J. Microbiol.* 7 (2): DOI: 10.5580/21a7
103. Saitou, N. & Nei, M. 1987. The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406 - 425.
104. Sarwar, M. & Kremer, R.J. 1995a. Determination of bacterially derived auxins using a microplate method. *Lett. Appl. Microbiol.* 20: 282 - 285.
105. Sarwar, M. & Kremer, R.J. 1995b. Enhanced suppression of plant growth through production of L-tryptophan-derived compounds by deleterious rhizobacteria. *Plant Soil* 172: 261 - 269.
106. Selvakumar, G., Mohan, M., Kundu S., Gupta, A.D., Joshi, P., Nazim, S. & Gupta, H.S. 2008. Cold tolerance and plant growth promotion potential of *Serratia marcescens* strain SRM (MTCC 8708) isolated from flowers of summer squash (*Cucurbita pepo*). *Lett. Appl. Microbiol.* 46: 171 - 175.
107. Spaepen, S., Vanderleyden, J. & Remans, R. 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol. Rev.* 31: 425 - 448.
108. Steenhoudt, O. & Vanderleyden, J. 2000. *Azospirillum* a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiol. Rev.* 24: 487 - 506.

109. Sylvia, D.M., Fuhrmann, J.J., Hartel, P.G. & Zuberer, D.A. 1998. Principles and applications of soil microbiology. Prentice-Hall, Inc. Upper Saddle River, NJ. 550 pp.
110. Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.* 28 (10): 2731 - 2739.
111. Thompson, J. D., Gibson, T. J, Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins. D. G. 1997. CLUSTALX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl. Acids. Res.* 25: 4876 - 4882.
112. Tilak, K. V. B. R., Ranganayaki, N., Pal, K. K., De R., Saxena, A. K., Nautiyal, C., Mittal, S., Tripathi, A. K. & Johri, B. N. 2005. Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. *Curr. Sci.* 89 (1): 136 - 150.
113. Timmusk, S. & Wagner, E. G. H. 1999. The Plant-Growth-Promoting Rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* induces changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression: A possible connection between biotic and abiotic stress responses. *Plant Physiol.* 12 (11): 951 - 959.
114. Torriani-Gorini, A., Yagil, E. & Silver, S. 1994. Phosphate in microorganisms: cellular and molecular biology. Regulation of phosphate metabolism and transport. ASM Press. Washington DC, USA. pp. 345.
115. Trivedi, P. & Pandey, A. 2007. Low temperature phosphate solubilization and plant growth promotion by psychrotrophic bacteria, isolated from Indian Himalayan region. *Res. J. Micorbiol.* 2 (5): 454 – 461.
116. Tsavkelova, E. A., Klimova, S. Yu., Cherdyntseva, T. A. & Netrusov, A. I. 2006. Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. *Appl. Biochem. Microbiol.* 42 (2): 117 - 126.
117. Upadhyay, A. & Srivastava, S. 2010. Evaluation of multiple plant growth promoting traits of an isolate of *Pseudomonas fluorescens* strain Psd. *Indian J. Exp. Biol.* 48: 601 - 609.

118. Varenayam, A., Xiangliang, P., Qinglong, F. & Daoyong, Z. 2012. Biomineralization based remediation of As (III) contaminated soil by *Sporosarcina ginsengisoli*.
119. Versalovic, J., Koeuth, T. & Lupski, J.R. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* 19 (24): 6823 - 6831.
120. Versalovic, J., Schneider, M. De Bruijin, F.J. & Lupski, J.R. 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based PCR (rep-PCR). *Methods Mol. Cell. Biol.* 5: 25 - 40.
121. Vincent, J.M. 1970. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. *Internat. Biol. Prog. Handbook N° 15.* Oxford, UK. Blackwell.
122. Waranusantigul, P. 2009. Phytoremediation potential of lead by *Buddleja* sp. and effects of its rhizobacteria on metal uptake. Tesis Ph. D. Biol. Mahidol, Bangkok. Mahidol University. pp. 146.
123. Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A. & Lane, D.J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173: 697 - 703.
124. Wenzel, W. W. 2009. Rhizosphere Processes and Management in Plant-Assisted Bioremediation (Phytoremediation) of Soils. *Plant Soil.* 321 (1): 385-408.
125. Yadav, K.S. & Dadarwal, K.R. 1997. Biotechnological approaches in soil microorganisms for sustainable crop production. Phosphate solubilization and mobilization through soil microorganisms. Scientific Publishers, Jodhpur, India. pp. 351.
126. Zúñiga, D. 2009. Caracterización y selección de bacterias promotoras de crecimiento en el cultivo orgánico de maca (*Lepidium meyenii* Walpers) como herramienta biotecnológica para mejorar su calidad productiva. Informe Técnico Final. Proyecto Perú Biodiverso - GTZ - CONCYTEC.

ANEXO 1: TABLAS

Tabla A2. Niveles de crecimiento de cepas psicrótrofas a diferentes temperaturas.

Cepa	1° día				2° día				4° día				5° día				6° día			
	28°C	22°C	12°C	6°C																
LMTK1	4	3	0	1	4	3	2	1	4	4	4	2	4	4	4	4	4	4	4	4
LMTK2	4	2	0	0	4	3	2	1	4	3	3	2	4	3	4	3	4	3	4	3
LMTK3	4	3	0	0	4	3	2	1	4	3	3	2	4	3	4	2	4	3	4	3
LMTK4	4	3	0	0	4	3	2	1	4	3	3	2	4	3	3	2	4	3	3	2
LMTK5	4	2	1	0	4	3	4	1	4	3	4	2	4	3	4	3	4	3	4	3
LMTK6	4	3	2	2	4	3	3	3	4	3	3	3	4	3	4	3	4	3	4	4
LMTK7	3	2	1	1	3	4	3	2	3	4	3	3	3	4	3	3	3	4	3	3
LMTK8	2	1	1	0	4	4	2	1	4	4	3	2	4	4	3	2	4	4	3	3
LMTK9	3	3	1	0	4	4	3	2	4	4	3	2	4	4	3	2	4	4	4	3
LMTK10	4	4	1	0	4	4	3	2	4	4	3	2	4	4	3	2	4	4	3	2
LMTK11	3	2	2	2	3	3	4	4	3	3	4	4	3	3	4	4	3	3	4	4
LMTK12	2	1	1	0	3	4	3	1	3	4	3	2	4	4	3	2	4	4	3	2
LMTK13	3	2	1	1	3	3	3	2	3	3	4	2	3	3	4	2	3	3	4	2
LMTK14	3	3	1	0	3	3	3	2	3	3	4	3	3	3	4	3	3	3	4	3
LMTK15	4	4	0	0	4	4	3	1	4	4	4	2	4	4	4	3	4	4	4	3
LMTK16	3	3	0	0	3	4	4	2	3	4	4	2	3	4	4	3	3	4	4	3
LMTK17	4	3	1	1	4	4	4	3	4	4	4	3	4	4	4	3	4	4	4	3
LMTK18	4	3	2	1	4	3	3	2	4	3	3	3	4	3	3	4	3	3	3	3
LMTK19	3	4	0	1	3	4	3	2	3	4	4	3	3	4	4	3	3	4	4	3
LMTK20	3	3	0	0	3	3	3	1	3	3	4	3	3	3	4	3	3	3	4	3
LMTK21	4	4	1	0	4	4	2	1	4	4	3	2	4	4	3	2	4	4	3	2
LMTK22	2	1	1	0	2	2	3	1	2	2	3	3	2	2	3	3	3	3	4	4
LMTK23	2	0	0	0	2	3	1	0	2	3	2	1	2	3	2	1	2	4	4	3
LMTK24	3	3	1	0	3	4	3	2	3	4	3	3	4	4	3	3	4	4	3	3
LMTK25	4	4	0	0	4	4	3	1	4	4	3	2	4	4	4	3	4	4	4	3
LMTK26	3	3	0	0	3	3	1	1	3	4	2	1	3	4	2	1	3	4	2	1
LMTK27	4	4	1	0	4	4	3	2	4	4	3	3	4	4	3	3	4	4	3	3
LMTK28	3	3	2	1	3	4	3	3	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4
LMTK29	4	4	1	0	4	4	2	1	4	4	3	2	4	4	3	2	4	4	3	2
LMTK30	3	2	2	1	3	4	3	2	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
LMTK31	0	0	1	0	0	1	1	0	1	3	3	1	2	3	3	1	2	4	3	3
LMTK32	3	2	1	1	3	4	2	2	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4
LMTK33	2	1	1	0	2	3	2	1	2	3	3	2	2	3	3	3	2	3	3	3
LMTK34	3	2	1	0	3	4	3	2	3	4	4	4	3	4	4	4	3	4	4	4
LMTK35	3	3	2	1	3	4	3	2	3	4	4	4	3	4	4	4	3	4	4	4
LMTK36	3	2	2	1	4	4	4	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
LMTK37	1	0	0	0	1	2	1	0	1	2	3	1	1	2	3	1	1	2	4	3
LMTK38	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	2	2	0	1	3	3	0	1	3	3
LMTK39	1	1	0	0	1	2	1	0	1	2	3	1	1	2	3	1	1	2	4	2
LMTK40	3	3	1	1	3	4	3	2	4	4	3	3	4	4	3	3	4	4	3	3
LMTK41	0	0	0	0	1	1	1	0	1	2	2	3	1	2	2	3	1	2	3	3
LMTK42	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	2	1	0	1	2	1	0	1	2	3
LMTK43	2	2	1	0	3	4	3	2	3	4	3	3	3	4	3	3	3	4	3	3
LMTK44	2	2	2	1	2	4	3	3	4	4	4	3	4	4	4	3	4	4	4	3

Tabla A3. Solubilización de fosfato bicálcico a 22°C de incubación.

Cepa	Halo de solubilización (mm)			
	2° Día	4° Día	6° Día	8° Día
LMTK6	1.25	1.25	1.25	1.25
LMTK11	5.5	9.5	11	11.5
LMTK28	2	7	8	8
LMTK30	2	7	7.5	7.5
LMTK32	5	8	8	8
LMTK34	4	7	7	7
LMTK35	4	8.5	9	9
LMTK36	6	8	9	9
LMTK42	5	8	8	8
LMTK43	2	3	3	3

Tabla A4. Solubilización de fosfato bicálcico a 6°C.

Cepa	Halo de solubilización (mm)						
	5° Día	9° Día	13° Día	16° Día	25° Día	30° Día	36° Día
LMTK6	0	0	0	0	0	0	0
LMTK11	4.25	12	13.5	13.5	16.5	18	18
LMTK28	0	1.25	4.5	7	9.75	11.25	11.25
LMTK30	0	0.75	3.25	5	8	8	8
LMTK32	0	7.5	9.5	10	11	11	11
LMTK34	0	4.75	6.5	8.25	10	10	10
LMTK35	0.5	9.5	11.75	12.25	13.25	13.25	13.25
LMTK36	4.5	12	12.25	12.5	12.5	12.5	12.5
LMTK42	2.5	11	12.25	12.25	12.25	12.25	12.25
LMTK43	0	2	2	3.25	3.25	3.25	3.25

Tabla A5. Solubilización de fosfato tricálcico a 6°C.

Cepa	Halo de solubilización (mm)						
	5° Día	9° Día	13° Día	16° Día	25° Día	30° Día	36° Día
LMTK6	0	0	0	0	0	0	0
LMTK11	1	1	1	1	1	1	1
LMTK28	1	0.5	2.75	2.75	2.75	2.75	2.75
LMTK30	1	2	4	3.5	3.5	3.5	3.5
LMTK32	1	1	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
LMTK34	0.75	0.75	1.75	4.5	4.5	4.5	4.5
LMTK35	1	3	3	3	3	3	3
LMTK36	1	1	1	1	1	1	1
LMTK42	1	0.5	1	1	1	1	1
LMTK43	0	1.75	1.75	1.5	1.5	1.5	1.5

Tabla A6. Solubilización de fosfato bicálcico a 12°C.

Cepa	Halo de solubilización (mm)								
	4° Día	6° Día	8° Día	11° Día	15° Día	19° Día	22° Día	36° Día	44° Día
LMTK6	0	1.75	1.5	1.5	3	4.25	3.75	5.25	5.25
LMTK11	4.75	11	13	15.5	16	19.25	20.5	23.5	26
LMTK28	4	10	13.25	16	18	19.5	20.5	20.5	20.5
LMTK30	5.75	11.75	14	16.5	17.5	20.5	20.25	20.25	20.25
LMTK32	5.5	10.5	13.25	16	16.5	18.75	18.75	19.25	19.25
LMTK34	2.75	9	12	17	17	19.5	19.5	20.5	20.5
LMTK35	9	10	10.5	14.5	14.25	15.25	15.25	18.25	18.25
LMTK36	6.5	9	9.5	12	12.25	13	14	17	17
LMTK42	4.75	10	10.5	13	15	15.25	15.75	16.25	16.25
LMTK43	0	2	2	2.5	4.75	5.25	5.75	6.25	6.25

Tabla A7. Solubilización de fosfato tricálcico a 12°C.

Cepa	Halo de solubilización (mm)								
	4° Día	6° Día	8° Día	11° Día	15° Día	19° Día	22° Día	36° Día	44° Día
LMTK6	0	0	0	1.5	1	1.75	2	2	2
LMTK11	0	1.75	2.25	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
LMTK28	0	2	2.25	2.25	2	2.5	2.5	2.5	2.5
LMTK30	0	2	3	3	2.75	3.25	3.25	3.25	3.25
LMTK32	0	2	2	3	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
LMTK34	0	1	1.5	3	2	2	2	2	2
LMTK35	0	2	2.5	3	3	3	2.75	2.75	2.75
LMTK36	0	1	2	2	2	2	2	2	2
LMTK42	0	1.5	1.5	2	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25
LMTK43	0	0	0	0	0.25	1.25	1.25	1.25	1.25

Tabla A8. Efecto de los metales pesados Cd y Pb en el crecimiento de 11 bacterias psicrótrofas

Cepa	Concentración (mM)	4° DÍA			8° DÍA			12° DÍA			16° DÍA			20° DÍA			24° DÍA			28° DÍA		
		Cd	Pb	CN	Cd	Pb	CN	Cd	Pb	CN	Cd	Pb	CN	Cd	Pb	CN	Cd	Pb	CN	Cd	Pb	CN
LMTK5	0.005	1.67	4.17	12.00	4.17	7.00	26.33	3.33	7.17	28.67	3.67	7.67	25.00	4.00	7.50	8.50	4.50	8.00	7.67	4.17	7.67	7.50
	0.01	0.00	4.67	12.00	1.50	6.33	26.33	3.50	7.17	28.67	3.83	7.33	25.00	3.83	7.33	8.50	4.00	7.50	7.67	4.00	7.50	7.50
	0.05	0.00	0.00	12.00	0.00	5.17	26.33	0.00	7.17	28.67	0.00	7.00	25.00	0.00	7.17	8.50	0.00	7.50	7.67	0.00	7.17	7.50
	0.1	0.00	0.67	12.00	0.00	3.67	26.33	0.00	5.67	28.67	0.00	5.83	25.00	0.00	6.00	8.50	0.00	6.33	7.67	0.00	6.33	7.50
	0.5	0.00	0.00	12.00	0.00	0.00	26.33	0.00	0.00	28.67	0.00	0.00	25.00	0.00	0.00	8.50	0.00	0.00	7.67	0.00	0.00	7.50
	1.0	0.00	0.00	12.00	0.00	0.00	26.33	0.00	0.00	28.67	0.00	0.00	25.00	0.10	0.00	8.50	0.10	0.00	7.67	0.17	0.00	7.50
	2.5	0.00	0.00	12.00	0.00	0.00	26.33	0.00	0.00	28.67	0.00	0.00	25.00	0.00	0.00	8.50	0.00	0.00	7.67	0.00	0.00	7.50
	5.0	0.00	0.00	12.00	0.00	0.00	26.33	0.00	0.00	28.67	0.00	0.00	25.00	0.00	0.00	8.50	0.00	0.00	7.67	0.00	0.00	7.50
LMTK11	0.005	3.17	4.67	4.67	3.67	6.00	5.83	6.50	6.67	6.67	7.00	7.17	6.83	6.83	7.17	7.33	7.50	7.50	7.67	7.67	7.33	7.50
	0.01	4.17	4.67	4.67	5.67	5.83	5.83	6.67	6.50	6.67	7.33	6.83	6.83	7.50	6.67	7.33	8.50	6.67	7.67	8.33	7.33	7.50
	0.05	4.33	4.67	4.67	5.00	6.17	5.83	5.67	7.00	6.67	6.00	7.00	6.83	6.50	7.00	7.33	6.67	7.67	7.67	7.33	7.50	7.50
	0.1	4.00	4.33	4.67	4.67	6.00	5.83	4.83	6.67	6.67	5.33	7.17	6.83	5.67	7.33	7.33	5.50	7.83	7.67	5.50	8.00	7.50
	0.5	0.00	2.17	4.67	3.83	4.33	5.83	4.00	5.00	6.67	4.00	5.33	6.83	3.83	6.17	7.33	4.00	5.67	7.67	4.00	6.17	7.50
	1.0	0.00	0.00	4.67	0.00	0.00	5.83	0.00	0.00	6.67	0.00	0.00	6.83	3.67	0.00	7.33	2.70	0.00	7.67	4.00	0.00	7.50
	2.5	0.00	0.00	4.67	0.00	0.00	5.83	0.00	0.00	6.67	0.00	0.00	6.83	0.00	0.00	7.33	0.00	0.00	7.67	0.00	0.00	7.50
	5.0	0.00	0.00	4.67	0.00	0.00	5.83	0.00	0.00	6.67	0.00	0.00	6.83	0.00	0.00	7.33	0.00	0.00	7.67	0.00	0.00	7.50
LMTK28	0.005	4.83	6.67	6.17	10.00	9.17	7.67	11.00	10.50	8.50	11.50	10.50	8.83	11.33	10.83	9.17	12.17	10.83	9.50	12.00	11.00	9.67
	0.01	5.17	6.33	6.17	6.67	8.50	7.67	8.17	9.67	8.50	9.00	9.83	8.83	9.00	10.33	9.17	9.83	9.67	9.50	9.67	10.33	9.67
	0.05	5.17	6.50	6.17	7.17	11.00	7.67	8.00	11.17	8.50	8.67	12.33	8.83	8.50	13.33	9.17	8.67	13.00	9.50	8.67	12.33	9.67
	0.1	4.33	5.33	6.17	6.17	7.33	7.67	7.33	7.83	8.50	8.33	8.50	8.83	8.33	8.50	9.17	8.33	8.83	9.50	8.67	8.83	9.67
	0.5	0.00	0.67	6.17	3.50	4.50	7.67	3.67	5.00	8.50	4.17	5.83	8.83	4.00	6.50	9.17	4.00	7.00	9.50	4.83	7.50	9.67
	1.0	0.00	0.00	6.17	0.00	0.00	7.67	0.33	0.00	8.50	0.70	0.00	8.83	0.50	0.00	9.17	1.40	0.00	9.50	1.50	0.00	9.67
	2.5	0.00	0.00	6.17	0.00	0.00	7.67	0.00	0.00	8.50	0.00	0.00	8.83	0.00	0.00	9.17	0.00	0.00	9.50	0.00	0.00	9.67
	5.0	0.00	0.00	6.17	0.00	0.00	7.67	0.00	0.00	8.50	0.00	0.00	8.83	0.00	0.00	9.17	0.00	0.00	9.50	0.00	0.00	9.67
LMTK32	0.005	5.00	4.83	4.17	6.50	6.17	5.50	7.33	7.17	6.50	8.00	7.50	6.83	8.17	7.67	7.17	8.67	7.67	7.00	8.50	7.50	6.67
	0.01	5.00	4.83	4.17	6.50	6.67	5.50	7.50	7.00	6.50	8.50	7.00	6.83	9.17	7.00	7.17	9.50	7.17	7.00	9.50	7.67	6.67
	0.05	4.50	5.00	4.17	5.33	6.33	5.50	6.17	6.83	6.50	6.50	6.50	6.83	6.67	7.17	7.17	6.67	7.33	7.00	7.00	7.33	6.67
	0.1	4.17	5.00	4.17	5.00	6.33	5.50	5.17	7.17	6.50	5.17	7.33	6.83	5.67	7.67	7.17	5.67	8.17	7.00	5.67	8.00	6.67
	0.5	0.00	2.00	4.17	4.17	7.33	5.50	4.17	7.00	6.50	4.67	8.17	6.83	4.33	8.50	7.17	4.50	9.83	7.00	4.67	8.50	6.67

	1.0	0.00	0.00	4.17	0.00	0.00	5.50	2.57	0.00	6.50	2.67	0.00	6.83	3.67	0.00	7.17	2.37	0.00	7.00	3.67	0.00	6.67
	2.5	0.00	0.00	4.17	0.00	0.00	5.50	0.00	0.00	6.50	0.00	0.00	6.83	0.00	0.00	7.17	0.00	0.00	7.00	0.00	0.00	6.67
	5.0	0.00	0.00	4.17	0.00	0.00	5.50	0.00	0.00	6.50	0.00	0.00	6.83	0.00	0.00	7.17	0.00	0.00	7.00	0.00	0.00	6.67
LMTK33	0.005	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.17	9.83	4.17	8.83	19.33	12.33	12.00	28.00	12.67	22.67	35.17	15.83	33.00	48.67
	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.67	9.83	0.33	9.50	19.33	2.67	16.92	28.00	4.50	22.00	35.17	5.17	28.67	48.67
	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	9.83	0.00	2.67	19.33	0.00	12.00	28.00	0.00	13.17	35.17	0.00	15.00	48.67
	0.1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.67	9.83	0.00	9.00	19.33	0.00	15.33	28.00	0.00	16.00	35.17	0.00	16.50	48.67
	0.5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	9.83	0.00	0.00	19.33	0.00	0.00	28.00	0.00	0.00	35.17	0.00	0.00	48.67
	1.0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	9.83	0.00	0.00	19.33	0.00	0.00	28.00	0.00	0.00	35.17	0.00	0.00	48.67
	2.5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	9.83	0.00	0.00	19.33	0.00	0.00	28.00	0.00	0.00	35.17	0.00	0.00	48.67
	5.0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	9.83	0.00	0.00	19.33	0.00	0.00	28.00	0.00	0.00	35.17	0.00	0.00	48.67
LMTK34	0.005	6.50	6.83	6.17	7.83	8.67	7.33	8.83	9.00	8.17	9.50	9.33	8.67	9.50	8.33	9.00	9.67	9.33	8.67	9.83	9.50	9.17
	0.01	5.17	6.33	6.17	6.83	7.83	7.33	8.00	7.00	8.17	8.67	8.83	8.67	8.67	7.83	9.00	9.67	8.83	8.67	9.50	9.33	9.17
	0.05	4.67	6.67	6.17	7.17	8.00	7.33	7.83	8.17	8.17	8.33	9.83	8.67	8.50	10.00	9.00	8.33	9.67	8.67	8.50	9.67	9.17
	0.1	3.83	5.83	6.17	5.67	7.17	7.33	6.67	8.00	8.17	7.17	8.33	8.67	7.33	8.17	9.00	7.17	8.83	8.67	7.33	9.17	9.17
	0.5	0.00	0.00	6.17	4.00	2.33	7.33	4.00	4.17	8.17	4.00	4.67	8.67	4.17	4.33	9.00	4.00	4.50	8.67	4.17	4.50	9.17
	1.0	0.00	0.00	6.17	0.00	0.00	7.33	0.00	0.00	8.17	0.10	0.00	8.67	0.27	0.00	9.00	0.40	0.00	8.67	0.43	0.00	9.17
	2.5	0.00	0.00	6.17	0.00	0.00	7.33	0.00	0.00	8.17	0.00	0.00	8.67	0.00	0.00	9.00	0.00	0.00	8.67	0.00	0.00	9.17
	5.0	0.00	0.00	6.17	0.00	0.00	7.33	0.00	0.00	8.17	0.00	0.00	8.67	0.00	0.00	9.00	0.00	0.00	8.67	0.00	0.00	9.17
LMTK36	0.005	5.67	4.83	5.00	7.17	6.33	6.17	6.83	6.83	7.17	8.17	7.33	7.67	8.17	7.33	7.50	8.17	7.33	7.83	8.83	7.33	8.00
	0.01	4.83	4.67	5.00	6.83	5.83	6.17	7.50	5.83	7.17	8.33	7.00	7.67	8.83	6.50	7.50	9.17	6.67	7.83	9.00	7.17	8.00
	0.05	4.67	4.83	5.00	5.17	6.17	6.17	6.17	6.33	7.17	6.50	6.67	7.67	6.67	6.50	7.50	6.83	7.17	7.83	7.00	6.83	8.00
	0.1	4.17	4.67	5.00	4.50	6.17	6.17	4.83	6.50	7.17	5.00	7.00	7.67	5.33	7.33	7.50	5.17	7.67	7.83	5.17	7.50	8.00
	0.5	0.00	0.00	5.00	4.17	5.83	6.17	4.00	6.17	7.17	4.17	6.42	7.67	4.33	6.67	7.50	4.17	7.00	7.83	4.00	7.00	8.00
	1.0	0.00	0.00	5.00	0.00	0.00	6.17	3.67	0.00	7.17	2.33	0.00	7.67	3.67	0.00	7.50	2.50	0.00	7.83	3.67	0.00	8.00
	2.5	0.00	0.00	5.00	0.00	0.00	6.17	0.00	0.00	7.17	0.00	0.00	7.67	0.00	0.00	7.50	0.00	0.00	7.83	0.00	0.00	8.00
	5.0	0.00	0.00	5.00	0.00	0.00	6.17	0.00	0.00	7.17	0.00	0.00	7.67	0.00	0.00	7.50	0.00	0.00	7.83	0.00	0.00	8.00
LMTK37	0.005	0.00	0.00	0.00	1.67	1.50	0.83	2.17	0.50	4.00	5.67	9.00	4.67	7.33	5.67	5.83	7.33	9.00	5.67	6.83	10.00	6.00
	0.01	0.00	0.33	0.00	0.50	2.83	0.83	2.33	6.00	4.00	3.67	5.00	4.67	3.67	7.58	5.83	4.00	7.67	5.67	4.17	8.67	6.00
	0.05	0.33	0.33	0.00	0.67	1.00	0.83	0.83	5.50	4.00	1.00	12.50	4.67	0.00	19.67	5.83	1.17	20.33	5.67	0.00	18.00	6.00
	0.1	0.00	0.00	0.00	0.00	2.00	0.83	0.00	5.83	4.00	0.00	8.83	4.67	0.00	9.33	5.83	0.00	9.33	5.67	0.00	9.00	6.00
	0.5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.83	0.00	0.00	4.00	0.00	0.00	4.67	0.00	0.00	5.83	0.00	0.00	5.67	0.00	0.17	6.00
	1.0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.83	0.00	0.00	4.00	0.00	0.00	4.67	0.00	0.00	5.83	0.00	0.00	5.67	0.00	0.00	6.00
	2.5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.83	0.00	0.00	4.00	0.00	0.00	4.67	0.00	0.00	5.83	0.00	0.00	5.67	0.00	0.00	6.00
	5.0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.83	0.00	0.00	4.00	0.00	0.00	4.67	0.00	0.00	5.83	0.00	0.00	5.67	0.00	0.00	6.00
LMTK39	0.005	0.00	0.00	0.00	1.67	1.50	1.17	2.83	2.33	4.33	5.17	7.67	4.17	6.33	8.00	4.50	6.67	8.50	5.67	7.33	9.67	5.50

	0.01	0.00	0.00	0.00	4.00	0.67	1.17	3.50	9.50	4.33	4.00	11.00	4.17	4.17	12.08	4.50	4.67	13.33	5.67	4.50	13.33	5.50
	0.05	0.00	0.00	0.00	0.67	0.33	1.17	0.00	5.00	4.33	0.00	12.50	4.17	0.00	12.33	4.50	0.00	11.67	5.67	0.00	13.33	5.50
	0.1	0.00	0.00	0.00	0.00	2.00	1.17	0.00	2.00	4.33	0.00	6.67	4.17	0.00	7.67	4.50	0.00	7.67	5.67	0.00	7.50	5.50
	0.5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.17	0.00	0.00	4.33	0.00	0.00	4.17	0.00	0.83	4.50	0.00	2.00	5.67	1.50	4.00	5.50
	1.0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.17	0.00	0.00	4.33	0.00	0.00	4.17	0.00	0.00	4.50	0.00	0.00	5.67	0.00	0.00	5.50
	2.5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.17	0.00	0.00	4.33	0.00	0.00	4.17	0.00	0.00	4.50	0.00	0.67	5.67	0.00	2.00	5.50
	5.0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.17	0.00	0.00	4.33	0.00	0.00	4.17	0.00	0.00	4.50	0.00	0.00	5.67	0.00	0.00	5.50
LMTK42	0.005	0.00	0.00	0.00	4.17	0.00	2.67	3.83	0.00	2.33	4.17	0.00	3.50	3.83	0.00	3.67	4.00	0.10	3.67	4.00	1.33	3.67
	0.01	0.00	0.00	0.00	3.67	2.17	2.67	3.50	2.33	2.33	3.67	2.33	3.50	3.83	3.33	3.67	4.83	3.50	3.67	3.83	4.00	3.67
	0.05	0.00	0.00	0.00	3.83	0.00	2.67	4.00	0.00	2.33	4.00	0.00	3.50	4.00	0.00	3.67	3.83	0.00	3.67	4.17	0.00	3.67
	0.1	0.00	0.00	0.00	3.50	3.33	2.67	3.50	2.50	2.33	3.67	2.50	3.50	3.50	2.67	3.67	3.50	2.83	3.67	3.83	2.83	3.67
	0.5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.67	3.50	0.00	2.33	3.50	0.00	3.50	3.67	1.17	3.67	3.50	2.67	3.67	3.83	2.50	3.67
	1.0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.67	0.00	0.00	2.33	0.00	0.00	3.50	1.17	0.00	3.67	3.50	0.00	3.67	3.67	0.00	3.67
	2.5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.67	0.00	0.00	2.33	0.00	0.00	3.50	0.00	0.00	3.67	0.00	0.00	3.67	0.00	0.00	3.67
	5.0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.67	0.00	0.00	2.33	0.00	0.00	3.50	0.00	0.00	3.67	0.00	0.00	3.67	0.00	0.00	3.67
LMTK43	0.005	14.00	17.33	12.00	39.33	56.00	26.33	28.33	44.67	28.67	25.67	51.67	25.00	35.00	50.33	29.67	33.00	42.00	27.67	32.67	45.00	29.33
	0.01	10.33	11.67	12.00	16.33	56.00	26.33	17.33	54.00	28.67	17.50	44.67	25.00	17.33	42.67	29.67	18.33	47.33	27.67	18.67	42.00	29.33
	0.05	3.33	20.67	12.00	20.33	53.33	26.33	18.00	60.00	28.67	17.17	66.67	25.00	17.67	68.33	29.67	17.67	56.00	27.67	17.67	76.67	29.33
	0.1	3.67	9.67	12.00	8.17	32.67	26.33	9.83	37.00	28.67	9.83	30.67	25.00	9.83	32.00	29.67	9.67	30.67	27.67	10.33	32.00	29.33
	0.5	0.00	3.33	12.00	0.00	13.33	26.33	0.00	22.33	28.67	2.83	22.33	25.00	2.67	26.33	29.67	2.50	24.17	27.67	3.50	24.17	29.33
	1.0	0.00	0.00	12.00	0.00	0.00	26.33	0.00	0.00	28.67	0.00	0.00	25.00	0.00	0.00	29.67	0.00	0.00	27.67	0.00	0.00	29.33
	2.5	0.00	0.00	12.00	0.00	0.00	26.33	0.00	0.00	28.67	0.00	0.00	25.00	0.00	0.00	29.67	0.00	0.00	27.67	0.00	0.00	29.33
	5.0	0.00	0.00	12.00	0.00	0.00	26.33	0.00	0.00	28.67	0.00	0.00	25.00	0.00	0.00	29.67	0.00	0.00	27.67	0.00	0.00	29.33

ANEXOS 2: FIGURAS

MEMORIAS PESAJOS. 2^{da} Ax.



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA
 FACULTAD DE AGRONOMIA - DEPARTAMENTO DE SUELOS
 LABORATORIO DE ANALISIS DE SUELOS, PLANTAS, AGUAS Y FERTILIZANTES
ANALISIS DE SUELOS : CARACTERIZACION



Solicitante : DRA. DORIS ZUÑIGA DAVILA
 Departamento : JUNIN
 Distrito : SAN PEDRO DE CAJAS
 Referencia : H.R. 23083-035C-09
 Provincia : JUNIN
 Predio :
 Fecha : 01-07-09
 Faci.: 15048

Numero de Muestra	C.E. (1-1) ds/m	CaCO ₃ %	M.O. %	P ppm	K ppm	Analisis Mecanico			Clase Textural	CIC	Cambiables me/100g					Suma de Calones	Suma de Bases	% Sat De Bases	
						Arena %	Limn %	Arcilla %			Ca ²⁺	Mg ²⁺	K ⁺	Na ⁺	Al ³⁺ + H ⁺				
M5 C1	5.20	0.51	0.00	7.8	36.7	162	60	30	10	Fr.A.	18.72	9.14	0.63	0.31	0.10	0.20	10.39	10.19	54
M5 C2	5.21	0.24	0.00	8.0	56.1	196	66	26	8	Fr.A.	24.00	9.95	0.97	0.47	0.12	0.20	11.70	11.50	48

A = Arena ; A.Fr. = Arena Franca ; Fr.A. = Franco Arenoso ; Fr. = Franco ; Fr.L. = Franco Limoso ; L = Limoso ; Fr.Ar.A. = Franco Arcillo Arenoso ; Fr.Ar. = Franco Arcilloso ; Fr.Ar.L. = Franco Arcillo Limoso ; Ar.A. = Arcillo Arenoso ; Ar.L. = Arcillo Limoso ; Ar. = Arcilloso

Numero de Muestra	Lab	Campo	Elementos					Metales Pesados			Cl
			B ppm	Cu ppm	Fe ppm	Mn ppm	Zn ppm	Cd ppm	Cr ppm	Pb ppm	
M5 C1			1.6	2.0	147.5	17.3	9.6	1.98	18.87	56.41	56.8
M5 C2			0.0	2.0	185.6	7.8	5.0	1.43	13.86	33.92	71.0

Lab. Analisis de Suelos, Facultad de Agronomía - UNALM
 Ing. Braulio La Torre Martínez
 Laboratorio

Av. La Universidad s/n. La Molina. Campus UNALM - Tel/fx.: 349 5669 349 5647 Anexo: 222 Telefax: 349 5622 e-mail: lab_suelo@lamolina.edu.pe

Fig. F1: Análisis de suelos

ANEXO 3: ESTADÍSTICA

E1. Germinación a 22°C

Porcentaje de germinación de semillas de trébol rojo

21 horas

Tabla ANOVA para Porcentaje de germinación por tratamiento

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	14763.1	21	703.004	6.36	0.0000
Intra grupos	7292.0	66	110.485		
Total (Corr.)	22055.1	87			

Pruebas de Múltiple Rangos para Porcentaje de germinación por tratamiento

Método: 95.0 porcentaje LSD

<i>Tratamientos</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
CONTROL	4	19.0	X
LMTK34	4	22.0	X
LMTK7	4	31.0	XX
LMTK39	4	31.0	XX
LMTK43	4	32.0	XX
LMTK37	4	33.0	XXX
LMTK4	4	37.0	XXX
LMTK28	4	40.0	XXXX
LMTK42	4	41.0	XXXX
LMTK30	4	41.0	XXXX
LMTK32	4	44.0	XXXXX
LMTK25	4	47.0	XXXXX
LMTK15	4	47.0	XXXXX
LMTK10	4	51.0	XXXXX
LMTK6	4	52.0	XXXXX
LMTK5	4	52.0	XXXXX
LMTK35	4	57.0	XXXX
LMTK36	4	58.0	XXXX
LMTK1	4	58.0	XXXX
LMTK24	4	59.0	XXX
LMTK11	4	65.0	XX
LMTK14	4	66.0	X

Porcentaje de germinación de semillas de trébol rojo

45 horas

Tabla ANOVA para Porcentaje de germinación por tratamientos

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	2491.09	21	118.623	1.90	0.0256
Intra grupos	4124.0	66	62.4848		
Total (Corr.)	6615.09	87			

Pruebas de Múltiple Rangos para Porcentaje de germinación por tratamientos

Método: 95.0 porcentaje LSD

<i>Tratamientos</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
LMTK30	4	69.0	X
LMTK34	4	70.0	X
CONTROL	4	71.0	XX
LMTK39	4	71.0	XX
LMTK32	4	74.0	XXX
LMTK28	4	74.0	XXX
LMTK5	4	74.0	XXX
LMTK10	4	76.0	XXXX
LMTK37	4	76.0	XXXX
LMTK4	4	77.0	XXXX
LMTK43	4	78.0	XXXX
LMTK42	4	79.0	XXXX
LMTK11	4	80.0	XXXX
LMTK25	4	82.0	XXX
LMTK35	4	82.0	XXX
LMTK7	4	83.0	XX
LMTK36	4	83.0	XX
LMTK6	4	84.0	XX
LMTK15	4	84.0	XX
LMTK14	4	84.0	XX
LMTK1	4	85.0	XX
LMTK24	4	87.0	X

Porcentaje de germinación de semillas de trébol rojo

72 horas

Tabla ANOVA para Porcentaje de germinación por tratamientos

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	2225.45	21	105.974	2.69	0.0012
Intra grupos	2600.0	66	39.3939		
Total (Corr.)	4825.45	87			

Pruebas de Múltiple Rangos para Porcentaje de germinación por tratamientos

Método: 95.0 porcentaje LSD

<i>Tratamientos</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
LMTK28	4	76.0	X
LMTK39	4	78.0	XX
LMTK30	4	78.0	XX
LMTK5	4	80.0	XXX
LMTK32	4	81.0	XXXX
LMTK4	4	82.0	XXXXX
LMTK10	4	85.0	XXXXXX
LMTK1	4	86.0	XXXXXX
LMTK43	4	86.0	XXXXXX
LMTK11	4	86.0	XXXXXX
LMTK42	4	87.0	XXXXXX
LMTK34	4	87.0	XXXXXX
LMTK15	4	88.0	XXXXXX
CONTROL	4	89.0	XXXX
LMTK36	4	89.0	XXXX
LMTK35	4	89.0	XXXX
LMTK37	4	90.0	XXX
LMTK25	4	91.0	XX
LMTK14	4	91.0	XX
LMTK7	4	92.0	XX
LMTK6	4	92.0	XX
LMTK24	4	95.0	X

Porcentaje de germinación de semillas de trébol rojo

96 horas

Tabla ANOVA para Porcentaje de germinación por tratamientos

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	1487.27	21	70.8225	2.84	0.0007
Intra grupos	1648.0	66	24.9697		
Total (Corr.)	3135.27	87			

Pruebas de Múltiple Rangos para Porcentaje de germinación por tratamientos

Método: 95.0 porcentaje LSD

<i>Tratamientos</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
LMTK39	4	81.0	X
LMTK28	4	84.0	XX
LMTK30	4	85.0	XXX
LMTK32	4	86.0	XXXX
LMTK42	4	87.0	XXXXX
LMTK5	4	87.0	XXXXX
LMTK10	4	88.0	XXXXXX
LMTK1	4	88.0	XXXXXX
LMTK36	4	89.0	XXXXXX
LMTK43	4	90.0	XXXXXX
LMTK11	4	90.0	XXXXXX
LMTK15	4	91.0	XXXXXX
LMTK14	4	91.0	XXXXXX
LMTK35	4	91.0	XXXXXX
LMTK37	4	92.0	XXXXXX
LMTK34	4	92.0	XXXXXX
LMTK25	4	93.0	XXXXX
CONTROL	4	93.0	XXXXX
LMTK7	4	94.0	XXXX
LMTK4	4	95.0	XXX
LMTK24	4	96.0	XX
LMTK6	4	99.0	X

E2. Germinación a 12°C

Porcentaje de germinación de semillas de trébol rojo

24 horas

Tabla ANOVA para Porcentaje de germinación por Tratamiento

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	11043.1	21	525.861	8.63	0.0000
Intra grupos	4020.0	66	60.9091		
Total (Corr.)	15063.1	87			

Pruebas de Múltiple Rangos para Porcentaje de germinación por Tratamiento

Método: 95.0 porcentaje LSD

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
LMTK 37	4	6.0	X
LMTK 36	4	7.0	X
LMTK 14	4	7.0	X
LMTK 15	4	12.0	XX
LMTK 4	4	12.0	XX
LMTK 34	4	15.0	XXX
LMTK 7	4	16.0	XXX
LMTK 11	4	16.0	XXX
LMTK 42	4	17.0	XXX
LMTK 39	4	19.0	XXX
LMTK 1	4	20.0	XXX
LMTK 6	4	21.0	XXX
LMTK 43	4	22.0	XXXX
LMTK 32	4	24.0	XXX
CONTROL	4	26.0	XXXX
LMTK 33	4	30.0	XXXX
LMTK 5	4	37.0	XXX
LMTK 10	4	37.0	XXX
LMTK 24	4	39.0	XX
LMTK 28	4	41.0	XX
LMTK 25	4	42.0	X

Porcentaje de germinación de semillas de trébol rojo

30 horas

Tabla ANOVA para Porcentaje de germinación por Tratamiento

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	10362.4	21	493.446	3.85	0.0000
Intra grupos	8452.0	66	128.061		
Total (Corr.)	18814.4	87			

Pruebas de Múltiple Rangos para Porcentaje de germinación por Tratamiento

Método: 95.0 porcentaje LSD

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
LMTK 37	4	18.0	X
LMTK 36	4	31.0	XX
LMTK 15	4	31.0	XX
LMTK 14	4	36.0	XX
LMTK 42	4	36.0	XX
LMTK 11	4	41.0	XXX
LMTK 34	4	42.0	XXX
LMTK 7	4	43.0	XXX
LMTK 32	4	44.0	XXXX
LMTK 1	4	44.0	XXXX
LMTK 6	4	45.0	XXXX
LMTK 43	4	47.0	XXXX
LMTK 4	4	47.0	XXXX
LMTK 39	4	50.0	XXXXX
CONTROL	4	51.0	XXXXX
LMTK 33	4	52.0	XXXX
LMTK 10	4	52.0	XXXX
LMTK 25	4	56.0	XXXX
LMTK 28	4	59.0	XXX
LMTK 5	4	62.0	XX
LMTK 24	4	63.0	X

Porcentaje de germinación de semillas de trébol rojo

36 horas

Tabla ANOVA para Porcentaje de germinación por Tratamiento

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	8919.45	21	424.736	3.70	0.0000
Intra grupos	7572.0	66	114.727		
Total (Corr.)	16491.5	87			

Pruebas de Múltiple Rangos para Porcentaje de germinación por Tratamiento

Método: 95.0 porcentaje LSD

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
LMTK 37	4	38.0	X
LMTK 14	4	40.0	X
LMTK15	4	48.0	XX
LMTK 42	4	52.0	XXX
LMTK 7	4	53.0	XXX
LMTK 1	4	56.0	XXX
LMTK 11	4	56.0	XXX
LMTK 36	4	58.0	XXXX
LMTK 34	4	62.0	XXXXX
LMTK 43	4	63.0	XXXXX
LMTK 39	4	63.0	XXXXX
CONTROL	4	63.0	XXXXX
LMTK 32	4	65.0	XXXX
LMTK 4	4	65.0	XXXX
LMTK 25	4	69.0	XXX
LMTK 6	4	70.0	XXX
LMTK 10	4	70.0	XXX
LMTK 33	4	71.0	XXX
LMTK 24	4	72.0	XX
LMTK 28	4	75.0	X
LMTK 5	4	75.0	X

Porcentaje de germinación de semillas de trébol rojo

42 horas

Tabla ANOVA para Porcentaje de germinación por Tratamiento

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	4782.0	21	227.714	2.16	0.0096
Intra grupos	6972.0	66	105.636		
Total (Corr.)	11754.0	87			

Pruebas de Múltiple Rangos para Porcentaje de germinación por tratamiento por Tratamiento

Método: 95.0 porcentaje LSD

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
LMTK 37	4	59.0	X
LMTK 15	4	60.0	XX
LMTK 14	4	63.0	XXX
LMTK 42	4	65.0	XXXX
LMTK 7	4	69.0	XXXXX
LMTK 11	4	70.0	XXXXX
LMTK 36	4	72.0	XXXXXX
LMTK 39	4	73.0	XXXXXX
LMTK 32	4	74.0	XXXXX
LMTK 43	4	74.0	XXXXX
LMTK 34	4	74.0	XXXXX
LMTK 6	4	75.0	XXXX
LMTK 1	4	76.0	XXXX
LMTK 25	4	77.0	XXXX
LMTK 5	4	77.0	XXXX
LMTK 33	4	79.0	XXX
LMTK 4	4	79.0	XXX
CONTROL	4	81.0	XX
LMTK 10	4	83.0	XX
LMTK 28	4	85.0	X
LMTK 24	4	86.0	X

Porcentaje de germinación de semillas de trébol rojo

48 horas

Tabla ANOVA para Porcentaje de germinación por Tratamiento

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	3122.36	21	148.684	2.03	0.0158
Intra grupos	4844.0	66	73.3939		
Total (Corr.)	7966.36	87			

Pruebas de Múltiple Rangos para Porcentaje de germinación por Tratamiento

Método: 95.0 porcentaje LSD

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
LMTK 15	4	71.0	X
LMTK 14	4	72.0	XX
LMTK 42	4	74.0	XXX
LMTK 37	4	77.0	XXXX
LMTK 34	4	77.0	XXXX
LMTK 7	4	78.0	XXXXX
LMTK 36	4	78.0	XXXXX
LMTK 39	4	79.0	XXXXX
LMTK 11	4	79.0	XXXXX
LMTK 43	4	81.0	XXXXXX
LMTK 1	4	82.0	XXXXXX
LMTK 6	4	82.0	XXXXXX
LMTK 4	4	83.0	XXXXXX
LMTK 25	4	84.0	XXXXX
LMTK 5	4	84.0	XXXXX
CONTROL	4	85.0	XXXX
LMTK 32	4	86.0	XXXX
LMTK 33	4	89.0	XXX
LMTK 24	4	90.0	XX
LMTK 10	4	90.0	XX
LMTK 28	4	92.0	X

Porcentaje de germinación de semillas de trébol rojo

72 horas

Tabla ANOVA para Porcentaje de germinación por Tratamiento

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	1343.27	21	63.9654	1.47	0.1215
Intra grupos	2880.0	66	43.6364		
Total (Corr.)	4223.27	87			

Pruebas de Múltiple Rangos para Porcentaje de germinación por Tratamiento

Método: 95.0 porcentaje LSD

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
LMTK 34	4	83.0	X
LMTK 14	4	84.0	X
LMTK 6	4	85.0	XX
LMTK 15	4	86.0	XXX
LMTK 43	4	87.0	XXXX
LMTK 39	4	87.0	XXXX
LMTK 42	4	88.0	XXXXX
LMTK36	4	89.0	XXXXX
CONTROL	4	89.0	XXXXX
LMTK 1	4	90.0	XXXXX
LMTK 25	4	90.0	XXXXX
LMTK 11	4	91.0	XXXXX
LMTK 37	4	91.0	XXXXX
LMTK 5	4	92.0	XXXXX
LMTK 4	4	92.0	XXXXX
LMTK 7	4	94.0	XXXX
LMTK 10	4	94.0	XXXX
LMTK 24	4	95.0	XXX
LMTK 33	4	95.0	XXX
LMTK 28	4	96.0	XX
LMTK 32	4	97.0	X

E3. Primer ensayo de crecimiento de plántulas de trébol rojo en potes o macetas

Altura de plántula (11 días)

Tabla ANOVA para TAMAÑO 11 DÍAS por TRATAMIENTO

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	73.1652	6	12.1942	1.90	0.1288
Intra grupos	135.027	21	6.42985		
Total (Corr.)	208.192	27			

Pruebas de Múltiple Rangos para TAMAÑO 11 DÍAS por TRATAMIENTO

Método: 95.0 porcentaje LSD

<i>TRATAMIENTO</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
LMTK28	4	10.7087	X
N-	4	13.0893	XX
LMTK25	4	13.6167	XX
N+	4	14.3897	XX
LMTK24	4	14.4646	X
LMTK32	4	14.7547	X
LMTK14	4	16.3661	X

Altura de plántula (18 días)

Tabla ANOVA para TAMAÑO 18 DÍAS por TRATAMIENTO

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	45.3246	6	7.5541	1.17	0.3585
Intra grupos	135.422	21	6.44864		
Total (Corr.)	180.746	27			

Pruebas de Múltiple Rangos para TAMAÑO 18 DÍAS por TRATAMIENTO

Método: 95.0 porcentaje LSD

<i>TRATAMIENTO</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
LMTK28	4	15.7917	X
N-	4	17.1829	XX
LMTK25	4	17.3334	XX
N+	4	18.0318	XX
LMTK24	4	18.2115	XX
LMTK32	4	18.2741	XX
LMTK14	4	20.3084	X

Peso Fresco Radicular (PFR)

Tabla ANOVA para PFR por Tratamientos

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	0.0098573	6	0.00164288	2.95	0.0299
Intra grupos	0.0116792	21	0.000556154		
Total (Corr.)	0.0215365	27			

Pruebas de Múltiple Rangos para PFR por Tratamientos

Método: 95.0 porcentaje LSD

<i>Tratamientos</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
LMTK28	4	0.02815	X
LMTK25	4	0.0306	XX
LMTK14	4	0.0329	XX
LMTK24	4	0.04845	XXX
LMTK32	4	0.057175	XXX
N+	4	0.063625	XX
N-	4	0.082925	X

Peso Seco Radicular (PSR)

Tabla ANOVA para PSR por Tratamientos

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	0.0000268093	6	0.00000446821	2.03	0.1071
Intra grupos	0.000046295	21	0.00000220452		
Total (Corr.)	0.0000731043	27			

Pruebas de Múltiple Rangos para PSR por Tratamientos

Método: 95.0 porcentaje LSD

<i>Tratamientos</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
LMTK25	4	0.003	X
LMTK28	4	0.0042	X
LMTK32	4	0.004325	XX
LMTK14	4	0.004625	XX
LMTK24	4	0.00495	XX
N+	4	0.00505	XX
N-	4	0.0065	X

Peso Fresco parte Aérea

Tabla ANOVA para PFA por Tratamientos

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	0.0108861	6	0.00181435	1.27	0.3149
Intra grupos	0.0301092	21	0.00143377		
Total (Corr.)	0.0409953	27			

Pruebas de Múltiple Rangos para PFA por Tratamientos

Método: 95.0 porcentaje LSD

<i>Tratamientos</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
LMTK28	4	0.08555	X
LMTK25	4	0.089825	X
LMTK32	4	0.0971	XX
N+	4	0.105	XX
LMTK24	4	0.114175	XX
LMTK14	4	0.116175	XX
N-	4	0.148675	X

Peso Seco parte Aérea

Tabla ANOVA para PSA por Tratamientos

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	0.0000125986	6	0.00000209976	1.54	0.2128
Intra grupos	0.00002856	21	0.00000136		
Total (Corr.)	0.0000411586	27			

Pruebas de Múltiple Rangos para PSA por Tratamientos

Método: 95.0 porcentaje LSD

<i>Tratamientos</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
LMTK25	4	0.007	X
LMTK28	4	0.00735	XX
LMTK32	4	0.007675	XX
N+	4	0.0077	XX
N-	4	0.007875	XX
LMTK24	4	0.008725	X
LMTK14	4	0.009025	X

E4. Segundo ensayo de crecimiento de plántulas de trébol rojo en potes o macetas

Emergencia de plántulas (2 días)

Tabla ANOVA para Emergencia Día 2 por Tratamiento

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	25.0938	3	8.36458	0.53	0.6683
Intra grupos	445.625	28	15.9152		
Total (Corr.)	470.719	31			

Pruebas de Múltiple Rangos para Emergencia Día 2 por Tratamiento

Método: 95.0 porcentaje LSD

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
LMTK32	8	1.875	X
N-	8	3.0	X
N+	8	3.125	X
LMTK14	8	4.375	X

Emergencia de plántulas (3 días)

Tabla ANOVA para Emergencia Día 3 por Tratamiento

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	67.5937	3	22.5312	0.43	0.7349
Intra grupos	1475.88	28	52.7098		
Total (Corr.)	1543.47	31			

Pruebas de Múltiple Rangos para Emergencia Día 3 por Tratamiento

Método: 95.0 porcentaje LSD

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
LMTK32	8	23.75	X
LMTK14	8	26.75	X
N+	8	26.875	X
N-	8	27.5	X

Emergencia de plántulas (4 días)

Tabla ANOVA para Emergencia Día 4 por Tratamiento

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	25.0938	3	8.36458	0.64	0.5953
Intra grupos	365.625	28	13.058		
Total (Corr.)	390.719	31			

Pruebas de Múltiple Rangos para Emergencia Día 4 por Tratamiento

Método: 95.0 porcentaje LSD

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
LMTK14	8	34.625	X
N+	8	35.625	X
LMTK32	8	36.375	X
N-	8	37.0	X

Emergencia de plántulas (5 días)

Tabla ANOVA para Emergencia Día 5 por Tratamiento

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	43.8438	3	14.6146	1.16	0.3429
Intra grupos	353.125	28	12.6116		
Total (Corr.)	396.969	31			

Pruebas de Múltiple Rangos para Emergencia Día 5 por Tratamiento

Método: 95.0 porcentaje LSD

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
LMTK14	8	37.75	X
N+	8	38.375	X
LMTK32	8	39.125	X
N-	8	40.875	X

Emergencia de plántulas (6 días)

Tabla ANOVA para Emergencia Día 6 por Tratamiento

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	40.3438	3	13.4479	1.28	0.3011
Intra grupos	294.625	28	10.5223		
Total (Corr.)	334.969	31			

Pruebas de Múltiple Rangos para Emergencia Día 6 por Tratamiento

Método: 95.0 porcentaje LSD

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
LMTK14	8	39.0	X
N+	8	39.375	X
LMTK32	8	39.625	X
N-	8	41.875	X

Emergencia de plántulas (8 días)

Tabla ANOVA para Emergencia Día 8 por Tratamiento

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	37.0937	3	12.3646	1.38	0.2701
Intra grupos	251.375	28	8.97768		
Total (Corr.)	288.469	31			

Pruebas de Múltiple Rangos para Emergencia Día 8 por Tratamiento

Método: 95.0 porcentaje LSD

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
LMTK14	8	40.625	X
LMTK32	8	41.25	X
N+	8	41.5	X
N-	8	43.5	X

Emergencia de plántulas (9 días)

Tabla ANOVA para Emergencia Día 9 por Tratamiento

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	31.5938	3	10.5313	1.18	0.3346
Intra grupos	249.625	28	8.91518		
Total (Corr.)	281.219	31			

Pruebas de Múltiple Rangos para Emergencia Día 9 por Tratamiento

Método: 95.0 porcentaje LSD

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
LMTK14	8	41.375	X
N+	8	41.875	X
LMTK32	8	42.125	X
N-	8	44.0	X

Altura de planta (15 días de evaluación)

Tabla ANOVA para Altura planta (cm) por Tratamiento

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	1.04307	3	0.34769	1.16	0.3666
Intra grupos	3.60873	12	0.300727		
Total (Corr.)	4.65179	15			

Pruebas de Múltiple Rangos para Altura planta (cm) por Tratamiento

Método: 95.0 porcentaje LSD

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
N +	4	6.3525	X
N -	4	6.4275	X
LMTK 32	4	6.445	X
LMTK 14	4	6.9925	X

Peso Fresco de parte Aérea (15 días de evaluación)

Tabla ANOVA para Peso Fresco Aéreo por Tratamiento

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	0.0336122	3	0.0112041	1.58	0.2466
Intra grupos	0.0853195	12	0.00710996		
Total (Corr.)	0.118932	15			

Pruebas de Múltiple Rangos para Peso Fresco Aéreo por Tratamiento

Método: 95.0 porcentaje LSD

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
N -	4	1.016	X
LMTK 32	4	1.034	X
N +	4	1.10025	X
LMTK 14	4	1.12725	X

Peso Seco parte Aérea (15 días de evaluación)

Tabla ANOVA para Peso Seco Aéreo por Tratamiento

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	0.000137188	3	0.0000457292	4.76	0.0207
Intra grupos	0.00011525	12	0.00000960417		
Total (Corr.)	0.000252438	15			

Pruebas de Múltiple Rangos para Peso Seco Aéreo por Tratamiento

Método: 95.0 porcentaje LSD

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
LMTK 32	4	0.05925	X
N -	4	0.0615	XX
N +	4	0.06575	X
LMTK 14	4	0.06625	X

Peso Fresco Radicular (15 días de evaluación)

Tabla ANOVA para Peso Fresco Radicular por Tratamiento

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	0.0133332	3	0.00444442	10.59	0.0011
Intra grupos	0.0050345	12	0.000419542		
Total (Corr.)	0.0183677	15			

Pruebas de Múltiple Rangos para Peso Fresco Radicular por Tratamiento

Método: 95.0 porcentaje LSD

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
LMTK 32	4	0.1395	X
N -	4	0.20275	X
LMTK 14	4	0.207	X
N +	4	0.20825	X

Peso Seco Radicular (15 días de evaluación)

Tabla ANOVA para Peso Seco Radicular por Tratamiento

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	0.000201187	3	0.0000670625	6.25	0.0084
Intra grupos	0.00012875	12	0.0000107292		
Total (Corr.)	0.000329937	15			

Pruebas de Múltiple Rangos para Peso Seco Radicular por Tratamiento

Método: 95.0 porcentaje LSD

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
LMTK 32	4	0.0095	X
LMTK 14	4	0.01275	XX
N +	4	0.017	XX
N -	4	0.0185	X

Altura de planta (cm) (37 días de evaluación)

Tabla ANOVA para Altura de planta por Tratamiento

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	2.62207	3	0.874023	0.79	0.5209
Intra grupos	13.2242	12	1.10201		
Total (Corr.)	15.8462	15			

Pruebas de Múltiple Rangos para Altura de planta por Tratamiento

Método: 95.0 porcentaje LSD

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
N+	4	12.165	X
N-	4	12.6775	X
LMTK32	4	12.855	X
LMTK14	4	13.295	X

Peso Fresco parte Aérea (37 días de evaluación)

Tabla ANOVA para Peso Fresco Aéreo por Tratamiento

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	0.388956	3	0.129652	10.06	0.0013
Intra grupos	0.15458	12	0.0128816		
Total (Corr.)	0.543536	15			

Pruebas de Múltiple Rangos para Peso Fresco Aéreo por Tratamiento

Método: 95.0 porcentaje LSD

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
N -	4	1.4615	X
LMTK 14	4	1.49825	X
LMTK 32	4	1.5135	X
N +	4	1.8485	X

Peso Seco parte Aérea (37 días de evaluación)

Tabla ANOVA para Peso Seco Aéreo por Tratamiento

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	0.00122625	3	0.00040875	4.04	0.0336
Intra grupos	0.0012135	12	0.000101125		
Total (Corr.)	0.00243975	15			

Pruebas de Múltiple Rangos para Peso Seco Aéreo por Tratamiento

Método: 95.0 porcentaje LSD

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
LMTK 32	4	0.15625	X
N -	4	0.1645	XX
N +	4	0.1765	X
LMTK 14	4	0.17725	X

Peso Fresco Radicular (37 días de evaluación)

Tabla ANOVA para Peso Fresco Radicular por Tratamiento

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	0.152839	3	0.0509462	10.23	0.0013
Intra grupos	0.0597485	12	0.00497904		
Total (Corr.)	0.212587	15			

Pruebas de Múltiple Rangos para Peso Fresco Radicular por Tratamiento

Método: 95.0 porcentaje LSD

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
LMTK 32	4	0.325	X
N +	4	0.4695	X
LMTK 14	4	0.48875	X
N -	4	0.59975	X

Peso Seco Radicular (37 días de evaluación)

Tabla ANOVA para Peso Seco Radicular por Tratamiento

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	0.00299625	3	0.00099875	16.84	0.0001
Intra grupos	0.0007115	12	0.0000592917		
Total (Corr.)	0.00370775	15			

Pruebas de Múltiple Rangos para Peso Seco Radicular por Tratamiento

Método: 95.0 porcentaje LSD

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
LMTK 32	4	0.02875	X
N +	4	0.0415	X
LMTK 14	4	0.0445	X
N -	4	0.06675	X

E5. Mínima Concentración Inhibitoria (MIC)

- Crecimiento en 2 Metales: Cd y Pb
- 8 Concentración de metal en las que se ensayo y un control: Control (T1), 0.005 Mm (T2), 0.01 mM (T3), 0.05 mM (T4), 0.1 mM (T5), 0.5 mM (T6), 1 mM (T7), 2.5 mM (T8), 5 Mm (T9)
- 11 Cepas Psicrótrofes a evaluar: LMTK5 (C1), LMTK11(C2), LMTK28(C3), LMTK32 (C4), LMTK33(C5), LMTK34 (C6), LMTK36(C7), LMTK37(C8), LMTK39(C9), LMTK42 (C10) y LMTK43(C11).
- 7 Evaluaciones, cada 4 días: Día 4°, 8°, 12°, 16°, 20°, 24° y 28°.

Cadmio (Cd)

4° Día de evaluación en Cd

Tabla ANOVA para Diámetro de colonia por concentración de sales de Cd

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	2359,21	98	24,0736	32,28	0,0000
Intra grupos	147,667	198	0,745791		
Total (Corr.)	2506,88	296			

Pruebas de Múltiple Rangos para Diámetro de colonia por concentración de sales de Cd

Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
CdT7C10	3	0	X
CdT7C11	3	0	X
CdT7C5	3	0	X
CdT7C3	3	0	X
CdT7C2	3	0	X
CdT7C4	3	0	X
CdT9C10	3	0	X
CdT8C3	3	0	X
CdT8C2	3	0	X
CdT8C5	3	0	X
CdT7C7	3	0	X
CdT7C8	3	0	X
CdT9C2	3	0	X
CdT7C6	3	0	X
CdT9C4	3	0	X
CdT1C10	3	0	X
CdT8C4	3	0	X
CdT9C1	3	0	X
CdT9C6	3	0	X
CdT8C6	3	0	X
CdT2C9	3	0	X
CdT1C9	3	0	X
CdT8C11	3	0	X
CdT7C9	3	0	X

CdT8C1	3	0	X
CdT2C10	3	0	X
CdT1C5	3	0	X
CdT3C5	3	0	X
CdT8C9	3	0	X
CdT9C11	3	0	X
CdT3C8	3	0	X
CdT3C9	3	0	X
CdT4C1	3	0	X
CdT4C10	3	0	X
CdT8C8	3	0	X
CdT2C5	3	0	X
CdT9C7	3	0	X
CdT9C3	3	0	X
CdT4C5	3	0	X
CdT1C8	3	0	X
CdT2C8	3	0	X
CdT9C5	3	0	X
CdT4C9	3	0	X
CdT5C1	3	0	X
CdT5C10	3	0	X
CdT3C1	3	0	X
CdT9C8	3	0	X
CdT3C10	3	0	X
CdT8C7	3	0	X
CdT5C5	3	0	X
CdT8C10	3	0	X
CdT9C9	3	0	X
CdT5C8	3	0	X
CdT5C9	3	0	X
CdT6C1	3	0	X
CdT6C10	3	0	X
CdT6C11	3	0	X
CdT6C2	3	0	X
CdT6C3	3	0	X
CdT6C4	3	0	X
CdT6C5	3	0	X
CdT6C6	3	0	X
CdT6C7	3	0	X
CdT6C8	3	0	X
CdT6C9	3	0	X
CdT7C1	3	0	X
CdT4C8	3	0,333333	XX
CdT2C1	3	1,66667	X
CdT2C2	3	3,16667	X
CdT4C11	3	3,33333	XX
CdT1C1	3	3,66667	XXX
CdT5C11	3	3,66667	XXX
CdT5C6	3	3,83333	XXXX
CdT5C2	3	4,0	XXXX
CdT5C7	3	4,16667	XXXX
CdT3C2	3	4,16667	XXXX
CdT5C4	3	4,16667	XXXX
CdT1C4	3	4,16667	XXXX
CdT5C3	3	4,33333	XXXXX
CdT4C2	3	4,33333	XXXXX

CdT4C4	3	4,5	XXXXX
CdT4C7	3	4,66667	XXXX
CdT4C6	3	4,66667	XXXX
CdT1C2	3	4,66667	XXXX
CdT3C7	3	4,83333	XXXX
CdT2C3	3	4,83333	XXXX
CdT3C4	3	5,0	XXXX
CdT1C7	3	5,0	XXXX
CdT2C4	3	5,0	XXXX
CdT3C6	3	5,16667	XXXX
CdT3C3	3	5,16667	XXXX
CdT4C3	3	5,16667	XXXX
CdT2C7	3	5,66667	XXX
CdT1C3	3	6,16667	XX
CdT1C6	3	6,16667	XX
CdT2C6	3	6,5	X
CdT3C11	3	10,3333	X
CdT1C11	3	12,0	X
CdT2C11	3	14,0	X

28° Día de evaluación en Cd

Tabla ANOVA para Diámetro de colonia por concentración de sales de Cd

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	15322,6	98	156,353	79,98	0,0000
Intra grupos	387,073	198	1,95492		
Total (Corr.)	15709,7	296			

Pruebas de Múltiple Rangos para Diámetro de colonia por concentración de sales de Cd

Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
CdT4C5	3	0	X
CdT9C5	3	0	X
CdT9C2	3	0	X
CdT8C8	3	0	X
CdT4C8	3	0	X
CdT9C7	3	0	X
CdT5C1	3	0	X
CdT4C9	3	0	X
CdT8C7	3	0	X
CdT5C8	3	0	X
CdT6C1	3	0	X
CdT5C5	3	0	X
CdT7C5	3	0	X
CdT6C5	3	0	X
CdT5C9	3	0	X
CdT8C10	3	0	X
CdT7C11	3	0	X

CdT8C3	3	0	X
CdT9C11	3	0	X
CdT8C5	3	0	X
CdT9C4	3	0	X
CdT4C1	3	0	X
CdT6C8	3	0	X
CdT9C3	3	0	X
CdT8C11	3	0	X
CdT8C4	3	0	X
CdT9C9	3	0	X
CdT9C8	3	0	X
CdT8C6	3	0	X
CdT9C10	3	0	X
CdT7C8	3	0	X
CdT9C1	3	0	X
CdT8C9	3	0	X
CdT9C6	3	0	X
CdT8C2	3	0	X
CdT7C9	3	0	X
CdT8C1	3	0	X
CdT7C1	3	0,166667	X
CdT7C6	3	0,433333	X
CdT7C3	3	1,5	XX
CdT6C9	3	1,5	XX
CdT6C11	3	3,5	XX
CdT1C10	3	3,66667	XX
CdT7C7	3	3,66667	XX
CdT7C4	3	3,66667	XX
CdT7C10	3	3,66667	XX
CdT6C10	3	3,83333	XX
CdT3C10	3	3,83333	XX
CdT5C10	3	3,83333	XX
CdT6C2	3	4,0	XX
CdT2C10	3	4,0	XX
CdT3C1	3	4,0	XX
CdT7C2	3	4,0	XX
CdT6C7	3	4,0	XX
CdT6C6	3	4,16667	XX
CdT2C1	3	4,16667	XX
CdT4C10	3	4,16667	XX
CdT3C8	3	4,16667	XX
CdT3C9	3	4,5	XX
CdT6C4	3	4,66667	XXX
CdT6C3	3	4,83333	XXXX
CdT3C5	3	5,16667	XXXXXX
CdT5C7	3	5,16667	XXXXXX
CdT5C2	3	5,5	XXXXXXX
CdT1C9	3	5,5	XXXXXXX
CdT5C4	3	5,66667	XXXXXXX
CdT1C8	3	6,0	XXXXXXX

CdT2C8	3	6,83333	XXXXXX
CdT1C4	3	7,0	XXXXXX
CdT4C7	3	7,0	XXXXXX
CdT4C4	3	7,0	XXXXXX
CdT5C6	3	7,33333	XXXXXX
CdT2C9	3	7,33333	XXXXXX
CdT4C2	3	7,33333	XXXXXX
CdT1C2	3	7,5	XXXXXX
CdT2C2	3	7,66667	XXXXXXX
CdT1C7	3	8,0	XXXXXX
CdT3C2	3	8,33333	XXXXXX
CdT1C1	3	8,5	XXXXXX
CdT4C6	3	8,5	XXXXXX
CdT2C4	3	8,5	XXXXXX
CdT5C3	3	8,66667	XXXXXX
CdT4C3	3	8,66667	XXXXXX
CdT2C7	3	8,83333	XXXXXX
CdT3C7	3	9,0	XXXXXX
CdT1C6	3	9,16667	XXXXXX
CdT3C6	3	9,5	XXXX
CdT3C4	3	9,5	XXXX
CdT3C3	3	9,66667	XXX
CdT1C3	3	9,66667	XXX
CdT2C6	3	9,83333	XXX
CdT5C11	3	10,3333	XX
CdT2C3	3	12,0	X
CdT2C5	3	15,8333	X
CdT4C11	3	17,6667	XX
CdT3C11	3	18,6667	X
CdT1C11	3	29,3333	X
CdT2C11	3	32,6667	X
CdT1C5	3	48,6667	X

Plomo (Pb)

4° Día de evaluación en Pb

Tabla ANOVA para Diámetro de colonia por concentración de sales de Pb

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	4023,65	98	41,0577	50,23	0,0000
Intra grupos	161,833	198	0,81734		
Total (Corr.)	4185,49	296			

Pruebas de Múltiple Rangos para Diámetro de colonia por concentración de sales de Pb

Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
PbT9C8	3	0	X
PbT6C6	3	0	X
PbT6C7	3	0	X
PbT6C5	3	0	X
PbT7C2	3	0	X
PbT6C9	3	0	X
PbT7C9	3	0	X
PbT8C10	3	0	X
PbT6C8	3	0	X
PbT7C3	3	0	X
PbT7C4	3	0	X
PbT8C11	3	0	X
PbT7C11	3	0	X
PbT7C1	3	0	X
PbT8C8	3	0	X
PbT9C3	3	0	X
PbT8C6	3	0	X
PbT8C2	3	0	X
PbT8C4	3	0	X
PbT8C1	3	0	X
PbT8C3	3	0	X
PbT9C4	3	0	X
PbT7C8	3	0	X
PbT7C5	3	0	X
PbT8C7	3	0	X
PbT2C10	3	0	X
PbT1C5	3	0	X
PbT7C6	3	0	X
PbT7C10	3	0	X
PbT8C5	3	0	X
PbT9C6	3	0	X
PbT3C9	3	0	X
PbT4C1	3	0	X
PbT4C10	3	0	X
PbT2C5	3	0	X
PbT8C9	3	0	X
PbT9C5	3	0	X
PbT1C10	3	0	X

PbT4C5	3	0	X
PbT1C8	3	0	X
PbT2C8	3	0	X
PbT9C2	3	0	X
PbT4C9	3	0	X
PbT2C9	3	0	X
PbT5C10	3	0	X
PbT1C9	3	0	X
PbT9C1	3	0	X
PbT3C10	3	0	X
PbT9C10	3	0	X
PbT5C5	3	0	X
PbT9C9	3	0	X
PbT9C7	3	0	X
PbT5C8	3	0	X
PbT5C9	3	0	X
PbT6C1	3	0	X
PbT6C10	3	0	X
PbT3C5	3	0	X
PbT9C11	3	0	X
PbT7C7	3	0	X
PbT4C8	3	0,333333	X
PbT3C8	3	0,333333	X
PbT6C3	3	0,666667	XX
PbT5C1	3	0,666667	XX
PbT1C1	3	1,33333	XXX
PbT6C4	3	2,0	XXX
PbT6C2	3	2,16667	XX
PbT6C11	3	3,33333	XX
PbT2C1	3	4,16667	XX
PbT5C2	3	4,33333	XXX
PbT1C2	3	4,33333	XXX
PbT1C4	3	4,5	XXXX
PbT3C7	3	4,66667	XXXX
PbT2C2	3	4,66667	XXXX
PbT5C7	3	4,66667	XXXX
PbT3C2	3	4,66667	XXXX
PbT3C1	3	4,66667	XXXX
PbT4C2	3	4,66667	XXXX
PbT1C7	3	4,66667	XXXX
PbT3C4	3	4,83333	XXX
PbT4C7	3	4,83333	XXX
PbT2C7	3	4,83333	XXX
PbT2C4	3	4,83333	XXX
PbT5C4	3	5,0	XXXX
PbT4C4	3	5,0	XXXX
PbT5C3	3	5,33333	XXXXX
PbT1C6	3	5,33333	XXXXX
PbT1C3	3	5,66667	XXXXXX
PbT5C6	3	5,83333	XXXX
PbT3C6	3	6,33333	XXX
PbT3C3	3	6,33333	XXX
PbT4C3	3	6,5	XX
PbT4C6	3	6,66667	XX
PbT2C3	3	6,66667	XX
PbT2C6	3	6,83333	X

PbT5C11	3	9,66667	X
PbT1C11	3	10,1667	X
PbT3C11	3	11,6667	X
PbT2C11	3	17,3333	X
PbT4C11	3	20,6667	X

28° días de evaluación en Pb

Tabla ANOVA para Diámetro de colonia por concentración de sales de Pb

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	39507,7	98	403,14	27,33	0,0000
Intra grupos	2920,67	198	14,7508		
Total (Corr.)	42428,4	296			

Pruebas de Múltiple Rangos para Diámetro de colonia por concentración de sales de Pb

Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
PbT7C4	3	0	X
PbT6C5	3	0	X
PbT9C1	3	0	X
PbT9C6	3	0	X
PbT9C11	3	0	X
PbT8C6	3	0	X
PbT7C5	3	0	X
PbT8C4	3	0	X
PbT6C1	3	0	X
PbT9C5	3	0	X
PbT9C4	3	0	X
PbT8C3	3	0	X
PbT7C3	3	0	X
PbT8C2	3	0	X
PbT7C8	3	0	X
PbT7C2	3	0	X
PbT7C11	3	0	X
PbT8C10	3	0	X
PbT7C9	3	0	X
PbT8C5	3	0	X
PbT9C9	3	0	X
PbT8C1	3	0	X
PbT7C1	3	0	X
PbT7C10	3	0	X
PbT8C8	3	0	X
PbT9C7	3	0	X
PbT9C2	3	0	X
PbT7C6	3	0	X
PbT8C11	3	0	X

PbT9C8	3	0	X
PbT9C10	3	0	X
PbT9C3	3	0	X
PbT7C7	3	0	X
PbT4C10	3	0	X
PbT8C7	3	0	X
PbT6C8	3	0,166667	XX
PbT2C10	3	1,33333	XXX
PbT8C9	3	2,0	XXXX
PbT6C10	3	2,5	XXXXX
PbT5C10	3	2,83333	XXXXXX
PbT3C10	3	4,0	XXXXXXXX
PbT1C10	3	4,0	XXXXXXXX
PbT6C9	3	4,0	XXXXXXXX
PbT6C6	3	4,5	XXXXXXXXX
PbT1C9	3	5,0	XXXXXXXXXX
PbT6C2	3	6,16667	XXXXXXXXXXX
PbT5C1	3	6,33333	XXXXXXXXXX
PbT4C7	3	6,83333	XXXXXXXXXX
PbT6C7	3	7,0	XXXXXXXXXX
PbT3C7	3	7,16667	XXXXXXXXXXX
PbT4C1	3	7,16667	XXXXXXXXXXX
PbT2C2	3	7,33333	XXXXXXXXXXX
PbT3C2	3	7,33333	XXXXXXXXXXX
PbT2C7	3	7,33333	XXXXXXXXXXX
PbT4C4	3	7,33333	XXXXXXXXXXX
PbT6C3	3	7,5	XXXXXXXXXXX
PbT5C9	3	7,5	XXXXXXXXXXX
PbT5C7	3	7,5	XXXXXXXXXXX
PbT3C1	3	7,5	XXXXXXXXXXX
PbT4C2	3	7,5	XXXXXXXXXXX
PbT1C2	3	7,5	XXXXXXXXXXX
PbT2C4	3	7,5	XXXXXXXXXXX
PbT3C4	3	7,66667	XXXXXXXXXX
PbT2C1	3	7,66667	XXXXXXXXXX
PbT1C4	3	7,83333	XXXXXXXXXX
PbT5C4	3	8,0	XXXXXXXXXX
PbT5C2	3	8,0	XXXXXXXXXX
PbT1C7	3	8,0	XXXXXXXXXX
PbT1C1	3	8,0	XXXXXXXXXX
PbT6C4	3	8,5	XXXXXXX
PbT1C8	3	8,66667	XXXXXXX
PbT3C8	3	8,66667	XXXXXXX
PbT5C3	3	8,83333	XXXXXXX
PbT1C3	3	8,83333	XXXXXXX
PbT5C8	3	9,0	XXXXXXX
PbT1C6	3	9,0	XXXXXXX
PbT5C6	3	9,16667	XXXXXXX
PbT3C6	3	9,33333	XXXXXXX
PbT2C6	3	9,5	XXXXXXX
PbT2C9	3	9,66667	XXXXXXX
PbT4C6	3	9,66667	XXXXXXX
PbT2C8	3	10,0	XXXXXXX
PbT3C3	3	10,3333	XXXXXXX
PbT2C3	3	11,0	XXXXXX
PbT4C3	3	12,3333	XXXXXX

PbT4C9	3	13,3333	XXXX
PbT3C9	3	13,3333	XXXX
PbT4C5	3	15,0	XXX
PbT5C5	3	16,5	XX
PbT4C8	3	18,0	XX
PbT6C11	3	24,1667	XX
PbT1C11	3	25,8333	XX
PbT3C5	3	28,6667	XXX
PbT5C11	3	32,0	XXX
PbT2C5	3	33,0	XX
PbT1C5	3	37,5	XX
PbT3C11	3	42,0	XX
PbT2C11	3	45,0	X
PbT4C11	3	76,6667	X

CEPA LMTK33 (C5)

A las concentraciones Control (T1), 0.005 Mm (T2), 0.01 mM (T3), 0.05 mM (T4)

Tabla ANOVA para Diámetro de LMTK33 por diferentes concentraciones de Cd y Pb

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	5167,64	6	861,274	31,43	0,0000
Intra grupos	383,667	14	27,4048		
Total (Corr.)	5551,31	20			

Pruebas de Múltiple Rangos para Diámetro de LMTK33 por diferentes concentraciones de Cd y Pb

Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>Tratamientos</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
CdT4C5	3	0	X
CdT3C5	3	5,16667	X
PbT4C5	3	15,0	X
CdT2C5	3	15,8333	X
PbT3C5	3	28,6667	X
PbT2C5	3	33,0	X
Control	3	48,6667	X

CEPA LMTK43 (11)

A las concentraciones Control (T1), 0.005 Mm (T2), 0.01 mM (T3),
0.05 mM (T4)

Tabla ANOVA para Diámetro de LMTK43 por diferentes concentraciones de Cd y Pb

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	7345,81	6	1224,3	12,06	0,0001
Intra grupos	1421,33	14	101,524		
Total (Corr.)	8767,14	20			

Pruebas de Múltiple Rangos para Diámetro LMTK43 por diferentes concentraciones de Cd y Pb

Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>Tratamientos</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
CdT4C11	3	17,6667	X
CdT3C11	3	18,6667	X
Control	3	29,3333	XX
CdT2C11	3	32,6667	XX
PbT3C11	3	42,0	X
PbT2C11	3	45,0	X
PbT4C11	3	76,6667	X

E6. Análisis de Conglomerados

Evaluación a 22°C

Datos/VARIABLES:

AIA 22°C

BiCa 22°C

TriCa 22°C

Crecimiento 22°C

Número de casos completos: 20

Método de Conglomeración: Vecino Más Cercano (Vínculo Simple)

Métrica de Distancia: Euclídeana Cuadrada

Conglomeración: observaciones

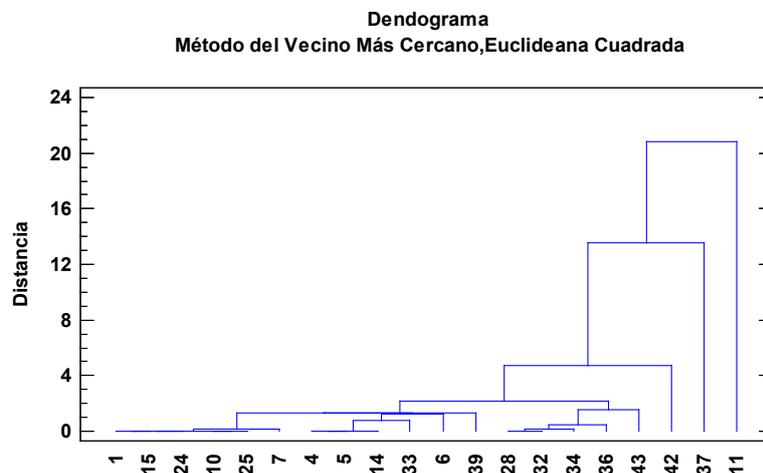
Estandarizar: sí

Resumen de Conglomeración

Conglomerado	Miembros	Porcentaje
1	20	100.00

Centroides

Conglomerado	AIA 22°C	BiCa 22°C	TriCa 22°C	Creem 22°C
1	6.71925	82.4735	6.4285	3.35



Evaluación a 12°C

Datos/VARIABLES:

AIA 12°C
BiCa 12°C
TriCa 12°C
Crecimiento 12°C

Número de casos completos: 20

Método de Conglomeración: Vecino Más Cercano (Vínculo Simple)

Métrica de Distancia: Euclídeana Cuadrada

Conglomeración: observaciones

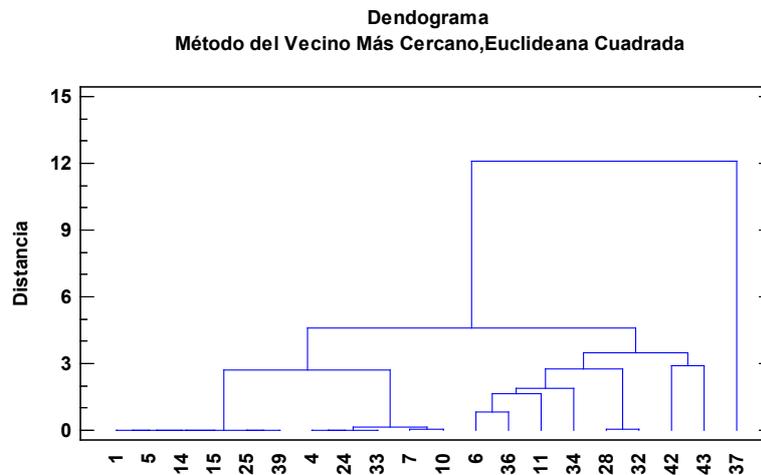
Estandarizar: sí

Resumen de Conglomeración

<i>Conglomerado</i>	<i>Miembros</i>	<i>Porcentaje</i>
1	20	100.00

Centroides

<i>Conglomerado</i>	<i>AIA 12°C</i>	<i>BiCa 12°C</i>	<i>TriCa 12°C</i>	<i>Crecm 12°C</i>
1	4.16585	130.736	51.6345	3.5



Evaluación a 6°C

Datos/VARIABLES:

AIA 6°C
BiCa 6°C
TriCa 6°C
Crecimiento 6°C

Número de casos completos: 20

Método de Conglomeración: Vecino Más Cercano (Vínculo Simple)

Métrica de Distancia: Euclídeana Cuadrada

Conglomeración: observaciones

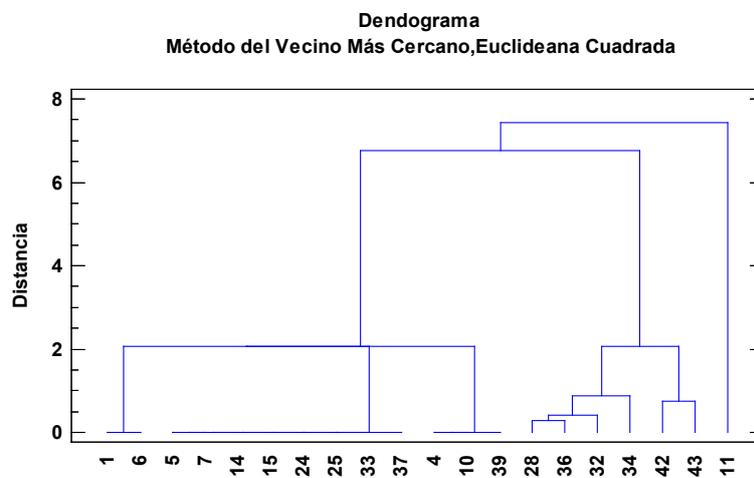
Estandarizar: sí

Resumen de Conglomeración

<i>Conglomerado</i>	<i>Miembros</i>	<i>Porcentaje</i>
1	20	100.00

Centroides

<i>Conglomerado</i>	<i>AIA 6°C</i>	<i>BiCa 6°C</i>	<i>TriCa 6°C</i>	<i>Creem 6°C</i>
1	0.44495	77.2005	43.237	3.2



Evaluación de todos los datos a tres diferentes temperaturas

Análisis de Conglomerados

Datos/VARIABLES:

%Germ
 AIA 12°C
 AIA 22°C
 AIA 6°C
 Cd 0.005
 Cd 0.01
 Cd 0.05
 Cd 0.1
 Cd 0.5
 Cd 1
 Crecimiento 12°C
 Crecimiento 22°C
 Crecimiento 6°C
 ESBi12°C
 ESBi22°C
 ESBi6°C
 ESTri12°C
 ESTri6°C
 Pb 0005
 Pb 001
 Pb 005
 Pb 01
 Pb 05

Número de casos completos: 20

Método de Conglomeración: Vecino Más Cercano (Vínculo Simple)

Métrica de Distancia: Euclideana Cuadrada

Conglomeración: observaciones

Estandarizar: sí

Resumen de Conglomeración

<i>Conglomerado</i>	<i>Miembros</i>	<i>Porcentaje</i>
1	20	100,00

Centroides

<i>Conglomerado</i>	<i>%Germ</i>	<i>AIA</i> <i>12°C</i>	<i>AIA</i> <i>22°C</i>	<i>AIA</i> <i>6°C</i>	<i>Cd</i> <i>0.005</i>	<i>Cd</i> <i>0.01</i>	<i>Cd</i> <i>0.05</i>	<i>Cd</i> <i>0.1</i>	<i>Cd</i> <i>0.5</i>	<i>Cd</i> <i>1</i>
1	22,0	4,1658	6,7192	0,4449	5,883	4,317	3,017	2,325	1,525	0,8555
		5	5	5						

<i>Conglomerado</i>	<i>Crecm</i> <i>12°C</i>	<i>Crecm</i> <i>22°C</i>	<i>Crecm</i> <i>6°C</i>	<i>ESBi12°C</i>	<i>ESBi22°C</i>	<i>ESBi6°C</i>	<i>ESTri12°C</i>	<i>ESTri6°C</i>
1	3,5	3,35	3,2	130,736	82,4735	77,2005	51,6345	43,237

<i>Conglomerado</i>	<i>Pb 0.005</i>	<i>Pb 0.01</i>	<i>Pb 0.05</i>	<i>Pb 0.1</i>	<i>Pb 0.5</i>
1	7,4665	7,3	8,6915	5,783	3,2255

